

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Pap Pál

**KOLINERG MODULÁCIÓ VIZSGÁLATA PATKÁNY
NUCLEUS COCHLEARIS ÓRIÁSSEJTJEIN ÉS
ASTROCYTÁIN**



Témavezető: Dr. Szűcs Géza

**DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2010**

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Bevezetés, célkitűzések.....	4
Irodalmi áttekintés.....	5
A hallási információ központi idegrendszeri feldolgozásának vázlata.....	5
A nucleus cochlearis felépítő neuronféleségek.....	6
Az óriássejtek jellemzése.....	8
Kolinerg moduláció a nucleus cochlearisban.....	9
A kolinerg receptorok.....	10
Az idegrendszerben található gliasejtek áttekintése.....	11
Az astrocyták szerkezeti és funkcionális sajátosságai.....	12
Anyagok és módszerek.....	16
Túlélő szövetpreparátum készítése.....	16
Patch-clamp mérések és az adatok feldolgozása.....	16
Neuronok biocitin jelölése.....	18
Primer astrocytatenyészet készítése.....	18
Immuncitokémia.....	19
Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérése.....	20
Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérésének elve.....	20
Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérőrendszer felépítése.....	21
Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérés kivitelezése, a nyert adatok feldolgozása.....	22
Kvantitatív „real-time” PCR (Q-PCR).....	23
Vegyszerek, statisztika.....	24
Eredmények.....	25
I. Kolinerg neuromoduláció patkány DCN óriásneuronjain.....	25
Az óriássejtek azonosítása.....	25
CCh alkalmazása megnöveli az óriássejtek tüzelési frekvenciáját.....	26
CCh hatása a felszíni és a mély réteg felől kiváltott IPSC-kre.....	28
CCh hatása a felszíni és a mély réteg felől kiváltott EPSC-kre.....	32
Posztszinaptikus CCh hatás az óriássejteken.....	37
A funkcionális eredményeket alátámasztó Q-PCR adatok.....	41
II. Kolinerg ingerléssel kiváltott intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációváltozások CN-ből készített primer astrocytatenyészetekben.....	43
CCh hatására kialakuló Ca^{2+} -koncentrációváltozások vizsgálata.....	43

A CCh-lal kiváltott Ca^{2+} -tranziensek időbeli lezajlásának vizsgálata.....	47
Az astrocytákra gyakorolt CCh hatás mechanizmusa	50
Megbeszélés	56
Kolinerg neuromoduláció patkány DCN óriás neuronjain	56
A CN-ban zajló kolinerg moduláció.....	56
A CCh hatás célpontjait képező neuronhálózatok: a kolinerg moduláció funkcionális jelentősége.....	57
Kolinerg ingerléssel kiváltott intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációváltozások CN-ból izolált primer astrocytatenyészetekben	61
A nucleus cochlearis astrocytáinak kolinerg receptorai.....	61
Intracelluláris Ca^{2+} -tranziensek astrocytákban.....	63
Összefoglalás.....	66
Summary	67
Irodalomjegyzék.....	68
Hivatkozott közlemények jegyzéke.....	68
A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke.....	77
A tézisekben fel nem használt egyéb tudományos munkák jegyzéke	79
Tárgyszavak	81
Köszönetnyilvánítás	82
Függelék.....	83
Rövidítések jegyzéke	84
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai.....	86

Bevezetés, célkitűzések

A nucleus cochlearis (cochlear nuclei, CN) a hallás információ feldolgozásának első agytörzsi szintű állomása. Korábbi eredmények bizonyították, hogy a kolinerg moduláció a CN-ban erősítő szerepet tölt be, bár annak celluláris folyamatai máig nem ismertek. A jelen értekezésben bemutatott kísérletes munka laboratóriumunk azon törekvéséhez csatlakozik, hogy új információkat nyerjünk a patkány CN felépítéséről és működéséről. Fő célom ezen belül a CN kolinerg modulációjával összefüggő jelenségek tanulmányozása volt.

A munka első részében a dorsalis CN-ből (dorsal cochlear nuclei, DCN) készített túlélő szelet preparátumokon patch-clamp technika alkalmazásával az óriássejtek elektrofiziológiai sajátosságait tanulmányoztam. A kísérletek során az alábbi feladatok megoldását kívántam elérni.

1. A muszkarinerg acetilkolin receptorok (mAChR) CN-ban történő expressziójának vizsgálata az életkor függvényében mRNS szinten.

2. A kolinerg agonista karbamil-kolin óriássejtek elektrofiziológiai sajátosságaira gyakorolt hatásának elemzése, az óriássejtek azonosítása.

3. Az óriássejteken a DCN felszíni és mély rétegei felől végzett stimulációval kiváltott gátló és serkentő posztszinaptikus áramok vizsgálata, és a karbamil-kolin posztszinaptikus áramokra gyakorolt hatásának elemzése.

4. A karbamil-kolin alkalmazás esetleges posztszinaptikus következményeinek felderítése.

Az elmúlt évtizedekben kimutatták, hogy a neuronok közti szinapszisban az astrocyták befolyásolhatják a neuronok közti ingerületátvitelt. Ezért egy agyterület neuronjainak vizsgálata mellett fontos az ott jelenlévő astrocyták tanulmányozása is. A munka második részében a CN-ből készített primer astrocytatenyészetekben a kolinerg moduláció mechanizmusát karbamil-kolin alkalmazásával kiváltott citoplazmatikus kalcium-koncentrációváltozások segítségével tanulmányoztam. A megoldandó feladatok az alábbiak voltak.

1. Primer astrocytatenyészet indítása és az azokban található sejtek azonosítása.

2. Egyes mAChR altípusok expressziójának kimutatása az astrocytatenyészetekben mRNS és fehérje szinten.

3. Karbamil-kolin alkalmazásával kiváltott citoplazmatikus kalcium-tranziensek kinetikai sajátosságainak és farmakológiai befolyásolhatóságának elemzése.

Irodalmi áttekintés

A hallási információ központi idegrendszeri feldolgozásának vázlata

A környezetükben keletkező hang igen fontos információforrás a szárazföldi élőlények életében. Emlősökben és madarakban egyaránt lényeges a külvilág megismerésében, ezzel az ön- és fajfenntartás feltételeinek biztosításában valamint az egyedek közötti kommunikáció létrehozásában is.

A környezetben generálódó hanginger longitudinális levegőrezgés formájában éri el a fület. Ez az érzékszerv, valamint a hozzá csatlakozó hallópálya természetesen az egyes fajokban eltérő felépítést mutat, ezért a jelen vázlatos áttekintés az emlősökön belül is elsősorban a rágcsálókra vonatkozik; tekintettel arra, hogy a később bemutatott kísérletek patkányokon készültek. Ezen állatcsoport egyedeire is igaz, hogy hallószervük három részre osztható: külső, közép- és belsőfülre. A külső fület alkotó fülkagyló és külső hallójárat a hangrezgések felfogását és vezetését biztosítják. A középfül a hallócsontocskákkal erősítő funkciót lát el és lehetővé teszi a levegő rezgéseinek áttevődését a belsőfül folyadékterére. A belső fület alkotó cochleában található az érzéksejteket (szőrsejteket) tartalmazó Corti-féle szerv, ez gondoskodik a hallási ingerület kialakulásáról, az úgynevezett mechanoelektromos transzdukció révén (Fonyó, 1999).

A hangingert jellemző egyik paraméter annak frekvenciája. Az úgynevezett „tisza hang” egyetlen frekvenciájú rezgést jelent. A hanginger feldolgozása során a frekvencia a keletkezett hangérzet magasságát határozza meg. A környezetben keletkezett hangingerek túlnyomórészt nem tiszta hangok, mert általában több, eltérő frekvenciájú komponens tartalmaznak. Az összetett hangokra jellemző lehet, hogy az adott frekvenciájú alaphangot felharmónikusok kísérik, amelyek rezgésszáma az alaphang frekvenciájának egész-számú többszöröse. Az így kialakuló hangok az úgynevezett zenei hangok, ezek esetében a felharmónikusok a hangérzet színezetét határozzák meg. Vannak olyan összetett hangok is, amelyek esetében a komponensek frekvenciája nem a fenti szabályszerűség szerint alakul, ezek a nem-zenei hangok vagy zörejek. Nyilvánvaló, hogy mind a hangmagasság, mind a hangszín érzékelésének alapfeltétele a levegőrezgés(ek) frekvenciájának megkülönböztetése. A hangingereket jellemző harmadik sajátosság energiatartalmuk, ami a hangérzet jellemzői közül a hangerősséget határozza meg (Fonyó, 1999).

A hangrezgések frekvenciájának analízise a Corti-féle szervben az itt található szőrsejtek tonotópiás elrendeződésének segítségével történik. A belső fül megfelelő

képleteinek tulajdonságai azt eredményezik, hogy a magasabb frekvenciával jellemezhető hangokat a cochlea bázisán, míg az alacsonyabbakat annak a csúcsi részén található szőrsejtek érzékelik. A frekvencia által meghatározott pozícióban levő szőrsejtek ingerelésének mértékét a hanghullámok amplitúdója szabja meg, azaz a hanginger feldolgozása tulajdonképpen már a receptorsejtek szintjén elkezdődik. A hangérzet jellemzőinek (hangmagasság, hangszín, hangerősség) kialakulásához valamint a hangforrás lokalizációjához azonban már a hallópálya centrálisabb elemeinek tevékenységére van szükség (Fonyó, 1999).

A szőrsejteket az elsődleges érzőneuronok, a ganglion spiraleet alkotó bipoláris neuronok perifériás axonjai innerválják, az ingerületbe került szőrsejtek az axonvégződéseken glutamátfelszabadulás révén akcióspotenciálokat generálnak. Az így létrejött ingerület ugyanezen neuronok centrális axonjain terjed a CN-ba. A CN a hallási információ agytörzsi szintű feldolgozásának első állomása, ahol az elsődleges érzőneuronok az ingerületet a másodlagos érzőneuronoknak adják át. A másodlagos projekciós neuronok axonjai a CN-t elhagyva az oliva komplexbe jutnak. Fontos megjegyezni, hogy ez a kapcsolat már részben azonos, részben ellenoldali, azaz inntől kezdve mindkét hallószerv kétoldali képvisellel rendelkezik, lehetővé téve a két fül által hallott hang összehasonlítását, ami a hangforrás lokalizálásának alapvető feltétele. A hallópálya további fontos állomásai a középagyban található lemniscus lateralis és colliculus inferior, majd a thalamusban elhelyezkedő corpus geniculatum mediale, végül a hallókéreg (Fonyó, 1999). A jelen értekezésben bemutatott munka célja a CN tanulmányozása volt, ezért a következőkben ezen agytörzsi mag szerkezetének és működésének bemutatása történik meg.

A nucleus cochlearist felépítő neuronféleségek

A CN két fő részre, a dorsalis (DCN) és ventralis (VCN) magra osztható; a VCN-on belül elülső (aVCN) és hátsó (pVCN) területet szokás elkülöníteni. A CN valamennyi részére jellemző, hogy nagyszámú neurontípus különböztethető meg benne. Ezek egy része projekciós jellegű, azaz axonjuk elhagyja a CN-t, és a felsőbb hallóközpontokba tart. A neuronok másik (nagyobb része) interneuron, a magon belüli hálózatok kialakításában vesz részt (Szűcs és Rusznák, 2002).

Az aVCN jellegzetes projekciós neuronjai a multipolaris sejtek, ezek egyik típusát az úgynevezett bushy-sejtek képezik, a másik típusba a csillag alakú (stellate) neuronok sorolhatók (Wu és Oertel, 1984). A bushy-sejtek egy része a hallóideg (n. acusticus; NA)

belépő axonjai között, gyöngysorszerűen helyezkedik el (szferikális bushy-sejtek). A globuláris bushy-sejtek ugyancsak a NA belépésénél találhatók, de ez a csoport nem mutatja a szferikális sejtekre jellemző elrendeződést. Elhelyezkedésük és morfológiai megjelenésük eltérése (Rhode és mtsai., 1983; Wu és Oertel, 1984) ellenére a bushy-sejtek funkciója ugyanaz: a beérkező információ kezdetéről adnak pontos információt. Elektromos válaszuk ugyanis „primary-like”, azaz az ingerlés kezdetén egyetlen akcióspotenciált tüzelnek, amit igen gyors adaptáció követ (Rhode és mtsai., 1983; Wu és Oertel, 1984).

A pVCN területén található legjellegzetesebb projekciós neuroncsoport az octopus-sejtek populációja. Ezen neuronok dendritjei számos hallóideg-axonnal állnak kapcsolatban és aktiválásukhoz ezen axonok jelentős részén egyidejűleg érkező ingerületre van szükség. E sajátosság alapján az octopus-sejteknek „coincidence detector” funkciót tulajdonítanak (Rhode és mtsai., 1983; Webster és Trune, 1982).

A DCN szerkezete rendezettebb, mint a VCN-é, hiszen itt négy koncentrikusan elhelyezkedő réteg figyelhető meg (Brawer és mtsai., 1974), igaz, ezen rétegek megjelenése, sőt megléte jellegzetes fajspecifikus különbségeket mutat. Patkányban a felszínhez legközelebb a molekuláris réteg (1. réteg) helyezkedik el, amelyik főként a szemcsesejtek axonjait tartalmazza, de megtalálhatóak itt a szemcsesejtek sejttestjei is. Ezt követi a projekciós fusiform- (vagy piramis-) sejtek rétege (2. réteg), ahol a piramis-sejtek mellett cartwheel-, szemcse- és csillagsejtek szómái lelhetők fel. A 3. rétegben a piramis-sejtek basalis dendritfáját találjuk néhány interneuronnal együtt míg a legmélyebb, 4. réteg jellegzetes sejtípusát a projekciós feladatú óriás- (giant) sejtek képezik (Szűcs és Rusznák, 2002). Megemlítendő még, hogy elsősorban a DCN felszínén egyes fajokban megtalálhatók az úgynevezett Purkinje-szerű sejtek (PLC), amelyeknek egyes szerzők projekciós szerepet tulajdonítanak (Hurd és Feldman, 1994; Spatz, 1997).

Míg a CN-ban található projekciós neuronok azonosítására, elhelyezkedésére, funkciójára vonatkozó elképzelések sok vonatkozásban egybehangzóak, az itt található interneuronok esetében a kép ellentmondásosabb. Az irodalomban számos sejtfeleség került leírásra, ezek közül a szemcsesejtek és a cartwheel-neuronok jellemzése egyértelmű, a többi sejtfeleség esetében azonban még azok megkülönböztetése sem megnyugtatóan lezárt kérdés (Szűcs és Rusznák, 2002).

Az óriássejtek jellemzése

A jelen munkában bemutatásra kerülő elektrofiziológiai kísérletek az óriássejtek kolinerg modulációjával foglalkoznak. Mint azt fentebb említettük, ezen sejtek jellegzetes előfordulási helye a DCN 4. rétege, ugyanakkor kisszámban elszórtan megtalálhatók a VCN területén is (Osen, 1969). Az óriássejtek 50 μm -es sejtest átmérőjükkel valóban nagy sejtek, hasonlóan nagy sejtmaggal és sejtmagvacskával. Habár a szokásos sagittális metszetekben tri- vagy multipoláris szómájuk szokatlanul nagynak tűnik, más irányú metszések felfedik, hogy a sejtest vékony és elnyújtott. Az óriássejtek előfordulását több állatfajban is leírták, többek között rágcsálókban és macskákban, utóbbi fajban különösen nagy számban lelhetők fel (Harrison és Irving, 1965, 1966; Moore és Osen, 1979; Webster és Trune, 1982). Egyes esetekben nehézséget okozhat az óriássejtek elkülönítése a VCN vagy a DCN nagy multipoláris sejtjeitől. Az azonosítás során segítséget nyújthat, hogy az óriássejtek hosszabb és vékonyabb dendritekkel rendelkeznek és a sejtestjük is kevésbé szabályos sokszög alakot mutat mint a multipoláris sejteké (Szűcs és Rusznák, 2002).

Az óriássejtek dendritfája szerteágazó, egyetlen sejt arborizációja a CN 500-600 μm széles területét is képes lefedni. Ez a méret azt eredményezi, hogy ennek a sejtípusnak a nyúlványai a CN-ban egyedülálló módon behálózhatják mind a VCN, mind a DCN rétegeit. Ezen speciális elrendezés eredményeként az óriássejtek nagymennyiségű információt fogadnak az akusztikus rostok felől, és ez által képesek az érkező akusztikus bemenetek integrálására (Rhode és mtsai., 1983). Ezzel a kiterjedt bemenettel magyarázhatók a funkciójukra vonatkozó megállapítások, melyek azt jelzik, hogy szokatlanul nagy frekvenciájú és dinamikájú akcióspotenciál-sorozatokat generálnak. Az óriássejtek axonjaik és axonkollaterálisai révén ugyancsak kiterjedt projekciós területtel rendelkeznek, jellemző módon az ellenoldali colliculus inferiorba futnak, de axonvégződéseik megtalálhatók mind az azonos oldali, mind az ellenoldali CN-ban is (Osen, 1972; Ryugo és mtsai., 1981).

Az óriás-sejtek jelentős túllövéssel jellemezhető akcióspotenciáljait kettős utóhiperpolarizáció követi (Zhang és Oertel, 1993). Az első utóhiperpolarizáció kifejezett, a membránpotenciált a nyugalmi membránpotenciálnál negatívabb értékre állítja, függetlenül a tüzelést kiváltó stimulus intenzitásától. A második utóhiperpolarizáció nagysága ezzel szemben változó. Az óriássejtek hallóideg felőli, illetve az aVCN irányából történő stimulálását követő eredmények elemzéséből úgy tűnik, hogy ezek a sejtek közvetlen serkentő bemenetet kapnak a NA-tól valamint a VCN neuronjai irányából (a szemcsesejtektől és a

csillagsejtektől). Utóbbi sejtek mono- és poliszinaptikus úton egyaránt kapcsolódhatnak az óriássejtekhez (összefoglaló áttekintés végett lásd, Szűcs és Rusznák, 2002). Leírtak ugyanakkor olyan, a DCN-ba lokalizálható neuronokat is (tuberculoventralis sejtek), amelyek gátló (glicinerg) axonokat küldenek az óriássejtek felé. Ezek hatása 1 $\mu\text{mol/l}$ sztrichnin alkalmazásával kivédhető (Szűcs és Rusznák, 2002).

Kolinerg moduláció a nucleus cochlearisban

Szenzoros működések esetében, beleértve az érzékszerveket is, nem ritka az, hogy centrálisabb területekről érkező axonok módosítják az afferens pályák tevékenységét. Számos adat utal arra, hogy ilyen, elsősorban kolinerg neuronok által biztosított moduláció jelen van a CN-ban, és fontos szerepet játszik a magban található idegsejtek aktivitásának a beállításában. Morfológiai tanulmányok során például kolin-acetil-transzferáz- és vezikuláris-kolin-transzporter-pozitív végződéseket mutattak ki a mag különféle neuronjain (Yao és Godfrey, 1995). A DCN-ban muszkarinerg acetilkolin-(ACh-) receptor expressziót írtak le (Happe és Morley, 1998), és számos funkcionális jellegű munkában is vizsgálták a kolinerg moduláció hatásait (Osen és mtsai., 1984; Sherriff és Henderson, 1994; Irie és mtsai., 2006). Ezekkel az eredményekkel tökéletes összhangban állnak azok a megfigyelések, melyek *in vivo* preparátumokban végzett kísérletek során születtek, és arra vonatkoznak, hogy mind a muszkarinerg ACh-receptorok antagonistái, mind az aceti-kolin-észteráz gátlószerei hatékonyan változtatták meg az agytörzsi hanginger által kiváltott potenciálokat (Zhang és Kaltenbach, 2000). Mindezen megfigyelések feltételezik, hogy a hallópálya mentén tónusos kolinerg serkentő hatás érvényesül.

A kolinerg moduláció szerepére utaló további adatok szerint a CN-ban található cartwheel- és piramis-neuronok kolinerg receptorainak aktivációja képes megnövelni az említett sejtek akcióspotenciál-tüzelésének a frekvenciáját (Chen és mtsai., 1994a; Zhang és Kaltenbach, 2000). Más eredmények szerint a CN kolinerg stimulációja mind nikotinerg, mind muszkarinerg (főként M2 és M4) receptorokon keresztül is megvalósulhat (Chen és mtsai., 1994a; 1994b; 1995; 1999). Amellett, hogy beállítja a hallórendszer számos struktúrájának ingerlékenységét és befolyásolja a hallószerv fiziológiai funkcióit, a hallópályák kolinerg modulációja számos kóros esetben is speciális jelentőséggel bír (pl. nagy intenzitású hanginger okozta károsodások vagy cochlearis sérülések esetén). Ezekben az esetekben a muszkarinerg kolinerg receptorok és a kolin-acetil-transzferáz enzim upregulációjáról számoltak be (Jin és mtsai., 2005; 2006; Jin és Godfrey, 2006; Kaltenbach és

Zhang, 2007). A kolinerg moduláció szerepének nagyon érdekes és meggyőző példája, amikor vezetékes halláskárosodás esetén az ellenkező oldali fül akusztikus stimulációja az adott oldali CN fokozott aktivitását okozza (Sumner és mtsai., 2005; Bledsoe és mtsai., 2009). Összességében tehát a rendelkezésre álló adatok szerint a kolinerg moduláció a CN-ban erősítő szerepet tölt be, a serkentő hatás sejtszintű szerveződésének részletei azonban még nem ismertek.

A kolinerg receptorok

Az emlősök szervezetében található ACh-receptorok két fő csoportra oszthatók, ezek a jólismert nikotinerg és muszkarinerg kolinerg receptorok. A nikotinerg ACh-receptorok (nAChR) az ionotróp receptorok közé tartoznak és tovább csoportosíthatók muszkuláris és neuronális típusokra. A muszkuláris típusú nAChR öt alegységből tevődik össze (2α , β , γ és δ), ahol minden alegység négy transzmembrán doménnel bír, míg a neuronális típusú nAChR α és β alegységekből szerelődik össze. További különbséggé említhető, hogy míg a muszkuláris típusú nAChR főként Na^+ -ra és kisebb mértékben K^+ -ra permeabilis, és az idegharántcskolt izom kapcsolat (neuromuscularis junctio) kialakításában játszik fontos szerepet, addig a neuronális típusú nAChR főként Ca^{2+} -ra permeabilis, és az idegrendszer minden centrális és perifériás részén megtalálható (összefoglaló áttekintés végett lásd, van Koppen és Kaiser, 2003).

A muszkarinerg ACh receptorok (mAChR) a metabotróp receptorok családjába tartoznak, G-proteinhez kapcsolt, hét transzmembrán doménnel bíró fehérjék. Ebben a csoportban 5 altípust különböztetnek meg (a továbbiakban M1-M5 formában hivatkozunk rájuk). Az M1, M3 és M5 receptorok a $\text{G}\alpha_{q/11}$ és a $\text{G}\alpha_{13}$ G-proteineken keresztül, a foszfolipáz-C (PLC) és a foszfolipáz-D (PLD) útvonalon fejtik ki hatásukat. A PLC hatására inozitol-4,5-biszfoszfátból diacil-glicerol (DAG) és inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP_3) keletkezik. A DAG protein-kináz-C (PKC) enzimet aktiválhat, mely aztán több foszforilációs feladatot is betölthet (pl. MAP-kináz útvonal szabályozása). Az IP_3 kapcsolódik az endoplazmatikus retikulum (ER) membránjában elhelyezkedő receptorához (IP_3R) és kalcium felszabadulást vált ki, ami az intracelluláris kalciumkoncentráció növekedését eredményezi (Caulfield, 1993; Rümenapp és mtsai., 2001; összefoglaló áttekintés végett lásd, van Koppen és Kaiser, 2003). Az M2 és M4 receptor altípusok a fentiektől élesen eltérő módon G_i és G_o G-proteinek révén az adenilát-cikláz enzim gátlását idézik elő (összefoglaló áttekintés végett lásd, van Koppen és Kaiser, 2003).

A szervezetben általában, és ezen belül a központi idegrendszerben is, valamennyi mAChR altípus sajátos expressziós mintázatot mutat, és számos kolinerg hatás mediációjában vesz részt (Caulfield, 1993; Levey és mtsai, 1991; összefoglaló áttekintés végett lásd, van Koppen és Kaiser, 2003). A teljesség igénye nélkül említhető, hogy az M1 receptor szabályozza a központi idegrendszerben a MAP-kináz aktivációt, ami fontos szerepet játszik a memóriefunkcióban (Hamilton és Nathanson, 2001). Kimutatták továbbá, hogy M1 deficiens egerekben fokozódik a dopaminerg neurotranszmisszió hatékonysága, ami fokozott motoros aktivitáshoz vezet (Gerber és mtsai, 2001). Az M2 receptorok szerepét igazolták a mAChR-függő bradycardia kialakulásában, valamint a gyomor-fundus, a húgyhólyag és a trachea kolinerg agonista-indukált kontrakciójában (Stengel és mtsai, 2000). Az M3 típusú receptoroknak kulcsszerepet tulajdonítanak a nyálszekréció szabályozásában, a pupillaszűkület létrehozásában valamint a húgyhólyag detrusor izmának kontrakciójában (Matsui és mtsai, 2000). Az M4 receptorok az M1 receptorokhoz hasonlóan a központi idegrendszeri dopaminerg mechanizmusokat befolyásolják (Gomez és mtsai, 1999), míg az M5 receptorok szerepét az agyi artériák és arteriolák kolinerg dilatációjában írták le (Yamada és mtsai, 2001).

Az idegrendszerben található gliasejtek áttekintése

Az idegrendszerben korábban döntően passzív szerepet tulajdonítottak a gliasejteknek. Az utóbbi évtizedekben azonban beigazolódott, hogy ez a szerep lényegesen aktívabb, olyannyira, hogy a gliasejtek akár a neuronok közötti szinaptikus transzmissziót is képesek befolyásolni. Ennek ismeretében belátható, hogy egy-egy központi idegrendszeri terület működésének pontos leírásához a neuronális funkciók elemzése mellett szükséges az ott található gliasejtek azonosítása és szerepük meghatározása is.

Morfológiai jellegű vizsgálatokra alapozva a gliasejteknek két fő csoportja különíthető el (Víg, 2002). Az egyik csoportot a perifériás glia képezi, ide tartoznak a Schwann-sejtek, a perifériális idegdúcokban az idegsejtek sejtestét körülvevő satellita sejtek, valamint a telóglia, az idegvégződések körül található kiegészítő sejtek (Víg, 2002).

A központi idegrendszer területén található gliasejtek képezik a másik fő csoportot, amelyet centrális gliának nevezünk. Ez a főcsoport is további alcsoportokra osztható. A mikroglia alcsoportot alkotják az oligodendroglia sejtek (ezek képezik a központi idegrendszer idegnyúlványainak myelin-hüveljét) valamint a mesoglia sejtek. Utóbbiak a

kapillárisok körüli térből bevándorló mesodermális eredetű macrophag sejtek, melyeknek phagocytá funkciót tulajdonítanak (Vígh, 2002).

A centrális glia másik alcsoportja a makroglia. Ennek a csoportnak a tagjait astrocyta sejteknek is nevezzük, mivel jellegzetességük a relative nagy sejttest, és a csillagalakban szerteágazó nyúlványok. Még az astrocyták sem képeznek azonban egységes csoportot, a plazmás astrocyta sejtek az agy szürkeállományában gyakoriak, míg a rostos astrocyta elemek az agy fehérállományában találhatók meg (Vígh, 2002).

A fenti csoportosítás elsősorban azon gliasejt-féleségeket tartalmazza, amelyek meglehetősen általánosan fordulnak elő az idegrendszer perifériás vagy központi részében. Az említett sejtfeleségeken túl a gliasejtek közé sorolnak számos olyan sejtet is, amelyek az idegrendszer egy-egy speciális területén helyezkednek el, rendszerint körülírt funkcióval. Ide tartoznak a központi idegrendszer üregeit (agykamrák, canalis centralis) bélelő ependymasejtek, a hypophysis hátsó lebenyében fellelhető pituicyták, és a kisagyban leírt Fananas-féle tollassejtek (Vígh, 2002). Főemlősök agyán végzett vizsgálatok segítségével kimutatták, hogy az egyedfejlődés során a neuronok migrációja a subventriculáris zónából a végleges helyükre az úgynevezett radiális gliasejtek nyúlványainak segítségével történik (Rakic, 1972). Megállapították továbbá, hogy míg a neuron-migrációt követően a központi idegrendszer nagy részén ezek a gliasejtek nyúlványaikat visszahúzza csillag alakú astrocytákká alakulnak (Schmechel és Rakic, 1979); addig egyes területeken a radiális gliasejtek megmaradnak. Az ilyen „túlélő” radiális gliasejtek alkotják a kisagyi Bergmann-gliát vagy a retina Müller-sejtjeit (összefoglaló áttekintés végett lásd, Kimelberg, 2004).

Mint azt a fenti vázlatos áttekintés jelzi, az egyes gliasejt-típusok eltérő módon vesznek részt az idegrendszer működésének támogatásában és modulálásában. Úgy tűnik ugyanakkor, hogy szerkezetüknél, kiterjedt kapcsolatrendszerüknél és működésüknél fogva elsősorban az astrocyták azok az elemek, amelyek különösen hatékonyan és kiterjedten képesek a neuronális működések befolyásolására. A CN tanulmányozása során tehát mindenképpen indokoltnak látszott a kísérleteket kiterjeszteni a magban található astrocyták egyes sajátosságainak vizsgálatára is.

Az astrocyták szerkezeti és funkcionális sajátosságai

Az astrocyták képezik a gliasejtek legáltalánosabban előforduló és legösszetettebb funkcióval rendelkező csoportját. Az irodalomban leggyakrabban alkalmazott csoportosítás szerint plazmás és rostos astrocytákat különítenek el, melyek közül az előbbieket az agy szürke-

, míg az utóbbi annak fehérállományában található. A rostos astrocyták számos nyúlványt küldenek a tér minden irányába, míg a plazmás astrocyták rövid, elágazó nyúlványokkal rendelkeznek (Kettenman és Ransom, 1995; Privat és mtsai., 1995). E csoportosítás mellett ugyanakkor léteznek felosztások más szempontok mentén is. A látóidegben valamint a retinális ganglion sejtek axonjai körül például egyes és kettes típusú astrocytákat különítenek el, ahol az egyes típus a vérereket fogja körül, míg a kettes a Ranvier-befűződéseket borítja (Zigmond és mtsai, 1999). Az astrocyták az egyedfejlődés során több precursor sejtől is kialakulhatnak, mint pl. astrocyta precursor sejtekből (glia restricted precursor, GRP), továbbá a neuronok és gliasejtek közös őssejtjeiből és nem utolsósorban a radiális gliából (Liu és mtsai, 2002). Az astrocyták idegrendszerben betöltött funkciói közé tartozik az, hogy intermediér filamentumaik révén (pl. Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP) támasztják a neuronális elemeket, nyúlványaik mintegy burkot képeznek a szinapszisok körül, segítenek a neurotranszmitterek és a K-ionok extracelluláris térből történő eltávolításában, ami igen fontos az idegsejtek működési feltételeinek fenntartásában (Kristjan R. Jessen, 2004).

Az astrocyták sejttenyészetben vagy *in situ* szövetben történő azonosítására ma a legelfogadottabb marker a GFAP. Ugyanakkor egyes szerzők azt is leírták, hogy az egyedfejlődés során, valamint központi idegrendszeri sérülést követően az astrocyták GFAP expressziója megváltozik. Egyes precursor sejtalakok például nem mutatnak GFAP pozitivitást, míg az érett alakok igen (Liu és mtsai, 2002). A rágcslók Müller-sejtjei normál körülmények között GFAP negatívak, míg sérülés következtében GFAP pozitívvá alakulnak (Zhuo és mtsai, 1997). Astrocyták azonosítására egyébként más markereket is ismer az irodalom, ilyen például az S100 β kalciumkötő fehérje vagy az astrocyta specifikus glutamát-aszpartát transzporter, a GLAST (GLutamate ASpartate Transporter) [más néven GLT-1 (Glutamate transporter-1) illetve EAAT2 (Excitatory Amino Acid Transporter 2); Shibata és mtsai, 1997]. Bizonyos esetekben azonban, az említett bizonytalanságok miatt, csak a markerek kombinált kimutatását tekintik biztos módszernek (összefoglaló áttekintés végezt lásd, Kimelberg, 2004).

Az astrocyták morfológiai sajátosságai mellett számos adat áll rendelkezésünkre elektrofiziológiai tulajdonságaikról is. Korábbi vizsgálatok ebben az esetben is két fő csoportot különböztettek meg, passzív és komplex astrocytákat. A passzív sejteket idő- és feszültség-független áramok (klasszikus ohmikus áramok), relatíve hiperpolarizált nyugalmi membránpotenciál, alacsony bemenő ellenállás és az úgynevezett dye-coupling megléte jellemzik. Ezzel szemben a komplex sejtekre feszültségfüggő K⁺-áramok, TTX-érzékeny, gyors kinetikájú Na⁺-áramok, a passzív sejtekhez képest depolarizáltabb membránpotenciál és

magasabb bemenő ellenállás valamint a dye-coupling [egy sejtbe közvetlenül bejuttatott jelölőanyag a szomszédos sejtekbe is áttérjed, igazolva az így jelölt sejtek valamilyen molekuláris kapcsolódását, (pl. gap-junction)] hiánya jellemző (Walz, 2000; Jabs és mtsai, 1997; Seifert és Steinhauser, 1995). Patkány hippocampusból frissen izolált astrocytákon végzett kísérletek alapján a passzív sejtek közé sorolhatók a közel ohmikus sajátságokkal rendelkező úgynevezett variábilis egyenirányító astrocyták (variably rectifying astrocytes, VRA), míg a kifelé egyenirányító astrocyták (outward rectifying astrocytes, ORA) számos K^+ -áramukkal valamint feszültség-függő Na^+ -áramukkal inkább a komplex sejtek közé tartozhatnak (Zhou és Kimelberg, 2000; 2001). Egy másik tanulmányban, ugyancsak patkány hippocampusból izolált túlélő szeletek különböző régiókban elhelyezkedő astrocyták vizsgálata során három különböző áram-feszültség karakterisztikájú áramot mutattak ki. A „komplex” sajátságokkal bíró sejtekre jellemző, hogy feszültség- és időfüggő, tranziens, kifelé egyenirányító áramokat produkálnak; a „befelé egyenirányító” sejtek hiperpolarizációra aktiválódnak, és kismértékű időfüggő inaktivációt mutatnak; a „lineáris” sajátságokat mutató astrocyták esetén pedig időfüggetlen vagy kismértékben időfüggő aktiváció és inaktiváció figyelhető meg (D'Ambrosio és mtsai., 1998).

A fent említett sajátságok összességében inkább azt a korábbi felfogást támogatják, amely az astrocytákat a központi idegrendszer passzív elemeinek tartja. A legutóbbi egy-két évtizedben azonban számos kutatócsoport kezdett foglalkozni a neuronok és astrocyták közötti kommunikáció kérdésével és az eredményeik alapján az astrocytáknak lényegesen aktívabb szerepet kell tulajdonítanunk (Araque és mtsai., 2001; Carmignoto, 2000; Castonguay és mtsai., 2001; Haydon, 2001; Perea és Araque, 2002). A módosulást eredményező kutatások több neurotranszmitter (NT) receptort is kimutattak az astrocyták felszínén, például glutamát-, katekolamin-, GABA-, hisztamin-, ATP- és ACh-receptorokat (Kettenman és Ransom, 1995; Porter és McCarthy, 1997; összefoglaló áttekintés végett lásd, Verkhratsky és mtsai., 1998). Az astrocyták sejt felszíni NT-receptorai főként metabotróp típusúak, de előfordulnak köztük ionotróp jellegűek is. A metabotróp receptorok közül több az intracelluláris kalcium koncentráció befolyásolásán keresztül fejti ki hatását (Araque és mtsai., 2002; Porter és McCharty, 1996; Shelton és McCharty, 1999, 2000; összefoglaló áttekintés végett lásd, Verkhratsky és mtsai., 1998). Más közlemények arról is beszámoltak, hogy az astrocyták maguk szabadítanak fel transzmitterként működő anyagokat, pl. glutamátot, $TNF\alpha$ -t és ATP-t (Araque és mtsai., 1998; Arcuino és mtsai., 2002; Beattie és mtsai., 2002). Ezek az anyagok, amelyeket újabban gliotranszmittereknek neveznek, hathatnak a neuronok közötti kémiai neurotranszmisszióra, akár a preszinaptikus NT-

felszabadulás, akár a posztszinaptikus válasz befolyásolásával (Perea és Araque, 2005; Fiacco és McCarthy, 2004). Mindezek eredményeként az eddig két neuron által képzett kémiai szinapszis felépítése egy harmadik résztvevővel, nevezetesen a nyúlványával a szinapszist beburkoló astrocytával bővült ki, ezért újabban ezt a szerkezetet „tripartite”, azaz háromosztatú szinapszishoz is nevezik (Volterra és Bezzi, 2002).

Anyagok és módszerek

Túlélő szeletpreparátum készítése

A kísérletekhez 10-14 napos (n=193) Wistar patkányokat használtunk, az alkalmazott eljárásokat a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága jóváhagyta. A preparálás fő lépései megegyeztek a laboratóriumunkban hosszabb ideje alkalmazott technikával (lásd pl. Rusznák és mtsai., 1997). Az állat dekapitálása után a fejet jéghideg (~ -2 °C), alacsony Na⁺-koncentrációjú mesterséges cerebrospinális folyadékba helyeztük (aCSF; 250 mmol/l szacharóz; 2,5 mmol/l KCl; 26 mmol/l NaHCO₃; 10 mmol/l glükóz; 1,25 mmol/l NaH₂PO₄; 2 mmol/l CaCl₂; 1 mmol/l MgCl₂; 3 mmol/l mio-inozitol; 0,5 mmol/l C-vitamin; 2 mmol/l nátrium-piruvát). Sagittalis metszést ejtettünk a fejbőrön, valamint a nyaki csonkon maradt izomzaton. Ezen képletek felpreparálását a nyakcsigolyák csigolyaívének átmetszése, majd a koponyán ejtett sagittalis, valamint a két orbitát összekötő coronalis irányú metszés követte. Az így bemetszett, még nem teljesen elcsontosodott koponyacsontok kettépattinthatók voltak, és az agy hozzáférhetővé vált. A bulbus olfactoriusok, valamint az erek és agyidegek (köztük a legmarkánsabb nervus trigeminus) átmetszése után az agy kibuktathatóvá vált. Az eltávolított agyat a mediansagittalis síkban megfeleztük, majd a középagy szintjében leválasztottuk az agytörzset. Az agytörzs dorsalis felszínéről óvatosan eltávolítottuk az agyhártyát és az ereket. A két agytörzsdarabot azok mediális felszínén cianoakrilát alapú ragasztóval egy fémtökre rögzítettük. A kisagy eltávolítását követően Microm HM 650 V vibrotóm (Microm International GmbH, Walldorf, Németország) segítségével 200 µm vastag sagittalis szeleteket készítettünk. A szeleteket 1 órán át pihentettük az inkubációs kamrában, amelyik 37 °C-os, 95% O₂ és 5% CO₂ gázkeverékkel átbuborékolgatott normál aCSF oldatot tartalmazott, majd hagytuk szobahőmérsékletre (~20–22 °C) lehűlni. (az oldat összetétele ugyanaz, mint az alacsony Na⁺-koncentrációjú aCSF-é kivéve, hogy szacharóz helyett 125 mmol/l NaCl-ot tartalmazott). A kísérlet kezdetéig a szeleteket folyamatos oxigenálás mellett ebben az inkubációs kamrában tároltuk.

Patch-clamp mérések és az adatok feldolgozása

A kísérletekhez 63x-os nagyítású vízimmerziós objektívvel ellátott, differenciál interferencia kontraszt (DIC, Nomarski) optikával felszerelt Axioskop mikroszkópot (Zeiss, Oberkochen, Németország) használtunk. A szeleteket a mérőedénybe helyeztük és a kísérlet

alatt folyamatosan oxigenált normál aCSF oldattal perfundáltattuk. A patch-clamp mérésekhez szükséges elektródákat vertikális elrendezésű pipetta-húzó készülék (Narishige P-830, Tokyo, Japán) segítségével készítettük. A pipettába kerülő belső oldat összetétele a következő volt: 114 mmol/l K-glükonát; 4 mmol/l KCl; 10 mmol/l HEPES; 4 mmol/l K₂-ATP; 0,3 mmol/l Na₃-GTP; 10 mmol/l Na₂-foszfokreatinin; 2 mmol/l K₂-Lucifer Yellow; 8 mmol/l biocitin. A vizsgált neuronok spontán akcióspotenciál-tüzelésének kivédésére egyes kísérletekben a gyors, feszültségfüggő Na⁺-csatornákat blokkoló QX314-kloridot (5 mmol/l; Tocris) is adtunk a pipettaoldathoz. A pipettaoldattal történő feltöltés után a mikroelektródák ellenállása 1,8-2,2 MΩ között változott.

Az elektrofiziológiai méréseket Axopatch 200A (Molecular Devices, Union City, CA, USA) erősítő segítségével, a patch-clamp technika teljes-sejtes elrendezésében végeztük. Feszültség-clamp üzemmódban a tartófeszültséget -60 mV-ra állítottuk, mely membránpotenciál érték mellett mind a spontán, mind a kiváltott posztzinaptikus áramokat (PSC-k) vizsgálhattuk. A kiváltott PSC-eket BioStim STC-7a stimulátorra csatlakoztatott monopoláris stimuláló elektróda segítségével generáltuk (Supertech, Pécs, Magyarország). Az ingerlő elektródát vagy a felszínes, vagy a mélyebb rétegekbe szúrtuk be; az ingerelt sejt sejttestje és a stimuláló elektróda közti távolság 50-100 μm között változott. A stimuláló impulzusok frekvenciáját 50 Hz-re állítottuk, az amplitudójukat pedig olyan értéken tartottuk, amely éppen képes volt kiváltani PSC-eket, miközben a hatástalan ingerlések száma a lehető legkevesebb volt („minimális stimulálás”).

A gátló PSC-eket (IPSC) 10 μmol/l 2,3-dihidroxi-6-nitro-7szulfamoil-benzo[f]quinoxalin-2,3-dion (NBQX) és 50 μmol/l D-2-amino-5-foszfonopentanoát (D-AP5; Tocris) jelenlétében, azaz a glutamáterg neurotranszmisszió gátlása mellett vizsgálhattuk. A serkentő PSC-k (EPSC) kiváltása 1 μmol/l sztrichnin és 10 μmol/l bicucullin kombinált alkalmazása mellett történt. Az egyes kísérletek során, a kapott PSC-eket a mérési sor végén a megfelelő gátlószerekkel gátoltuk, így bizonyítva, hogy azok valóban a preszinaptikus ingerlés következményei voltak. Néhány kísérletben áram-clamp elrendezésben vizsgáltuk a neuronok spontán, valamint karbamil-kolin (karbakol, CCh) adásával kiváltott membránpotenciál-változásait, köztük az akcióspotenciálokat is.

Az adatgyűjtést CLAMPEX és FETCHEX 6.0 szoftverek segítségével (Molecular Devices, Union City, CA, USA), míg az adatelemzést Clampfit 9.0 (Molecular Devices, Union City, CA, USA) és a MiniAnalysis (Synaptosoft, Decatur, GA, USA) programokkal végeztük. Az adatelemzés során kiszámoltuk az úgynevezett „paired-pulse ratio”-t (PPR), amit a második és az első PSC-k amplitúdóinak hányadosa adott meg (Zucker és Regehr,

2002). Ahhoz, hogy igazoljuk a CCh preszinaptikus hatását, mérésenként 20 görbe alapján kiszámoltuk a PSC-k csúcsamplitúdóinak variációs koefficiensét (CV; $CV = SD/\text{átlag}$). Az alkalmazott anyag hatásának preszinaptikus jellegét az $1/CV^2$ érték szignifikáns csökkenése jelezte (Faber és Korn, 1991).

Neuronok biocitin jelölése

A patch-clamp mérések alatt a vizsgált sejtek feltöltődtek a pipettaoldatban levő biocitinnel. Az elektrofiziológiai kísérleteket követően a szeleteket egy éjszakán át fixáltuk 4% paraformaldehidet tartalmazó foszfát pufferben (PB; 0,1 mol/l Na_2HPO_4 ; 0,1 mol/l NaH_2PO_4 ; pH=7,4). A fixált szeleteket 0,1% Triton-X 100 és 10% borjú szérum tartalmú foszfát-pufferelt sóoldatban permeabilizáltuk (PBS; 136,75 mmol/l NaCl; 2,68 mmol/l KCl; 8,1 mmol/l Na_2HPO_4 ; 1,47 mmol/l KH_2PO_4 ; 0,49 mmol/l $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 0,9 mmol/l CaCl_2 , pH=7,2)) 60 percig, szobahőmérsékleten. Ezt követően a szeleteket 10 percig PB oldatban mostuk, majd streptavidinnel konjugáltatott Alexa 488 (1:300; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) tartalmú PB oldatban inkubáltuk 90 percig. A fixálás kivételével (amit 4 °C-on végeztünk) minden lépés szobahőmérsékleten történt. Legvégül a szeleteket lefedtük, majd a biocitin fluoreszcenciát Zeiss LSM 510 konfokális lézer-scanning mikroszkóp (Zeiss, Oberkochen, Németország) segítségével vizsgáltuk és rögzítettük.

Primer astrocytatenyészet készítése

A sejttenyészet indításához 7-9 napos Wistar patkányokat használtunk. A preparálás fő lépései megegyeztek a szelet-preparátum készítésének ismertetésekor leírt technikával. A dekapitálást követően a levágott fejet ebben az esetben steril, még jégkristályokat is tartalmazó preparáló oldatba helyeztük. A preparáló oldat (DS) összetétele a következő volt: 136 mmol/l NaCl; 5,2 mmol/l KCl; 0,64 mmol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0,22 mmol/l KH_2PO_4 ; 16,6 mmol/l glükóz; 22 mmol/l szaharóz; 10 mmol/l HEPES, kiegészítve 0,06 U/ml penicillinnel (SANAVITA Gmbh, Pécs) és 0,06 mg/ml streptomycinnel (TEVA, Debrecen). A CN feltárása után azt csipesz segítségével leválasztottuk, és DS oldatot tartalmazó sterilizált üvegcsőbe helyeztünk (innen kezdve végig steril körülmények között dolgoztunk). A CN az agytörzs laterális részén, a kisagy alatt található, jól körülírt, könnyecsepp alakú képződmény, melynek izolálása során mindent megtettünk annak érdekében, hogy a leválasztás során más agyterületből származó szövet ne keveredjen a CN darabokhoz. A tenyészet indításához általában 3-4 kísérleti állat CN-ait használtunk fel. A magokat 30 percig 10% tripszin

tartalmú DS oldatban inkubáltuk (37 °C). A tripszin hatását foetalis borjúsérumot (FBS) tartalmazó tápoldat segítségével állítottuk le. A tápoldat úgynevezett „Minimum Essential Medium” (MEM) volt, amelyik 10% FBS-ot, 50 U/ml penicillint (SANAVITA Gmbh, Pécs), 50 µg/ml streptomycint (TEVA, Debrecen) és 1,25 µg/ml Amphotericin B-t (Gibco, UK) tartalmazott. A tripszinnel emésztett szövetdarabokat 10% FBS tartalmú tápoldatban 3-szor triturláltuk, egyre kisebb átmérőjű, polírozott hegygel rendelkező Pasteur-pipettákkal. Az így nyert sejtszuszpenziót 100000 sejt/ml sűrűségűre hígítottuk, majd a szuszpenzió 0,5 ml-es mennyiségeit a 24 lyukú tenyésztőedény alján elhelyezkedő fedőlemezekre rétegeztük. A tenyészetet 37 °C-on, 5% CO₂-t tartalmazó légkörben termosztátban tartottuk. A tápoldatot (10% FBS tartalmú MEM) először a tenyészet elkészítésének másnapján, majd ezt követően 2 naponta cseréltük. Az itt vázolt tenyésztési körülmények között a neuronok nagy része elpusztult, míg az astrocyták folyamatosan osztódtak és növekedtek. A fedőlemezeken a sejteket kb. 80-100%-os konfluenciaszintig tenyésztettük, majd passzáltuk őket.

Immuncitokémia

Immuncitokémiai jelöléseknél 7-10 napos, 70-80%-os konfluencia szintet elérő astrocytatenyészeteket alkalmaztunk. A fedőlemezeket nedves kamrába téve PBS oldattal (136,75 mmol/l NaCl; 2,68 mmol/l KCl; 8,1 mmol/l Na₂HPO₄; 1,47 mmol/l KH₂PO₄; 0,49 mmol/l MgCl₂ × 6H₂O; 0,9 mmol/l CaCl₂, pH = 7,2) mostuk, ezt követte a fixálás 4%-os paraformaldehid oldatban 15 percig, 4 °C-on, majd 100 mmol/l glicint tartalmazó PBS oldattal mostuk őket 3 × 5 percen keresztül. A mosást a permeabilizálás követte (0,1% Triton-X 100 PBS oldatban, 10 percen keresztül). Újabb PBS-ben történő mosás után az aspecifikus kötőhelyek blokkolása következett 1% BSA-t (borjú szérum albumint) tartalmazó PBS oldattal (blokkoló oldat) 30 percig. A primer antitesteket (1. táblázat) blokkoló oldatban hígítottuk és egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk vele a sejteket. Másnap PBS-sel lemostuk a felesleges primer ellenanyagot, majd a szekunder antitesttel (1. táblázat) 60 percen keresztül inkubáltuk a mintákat amit ismét mosás követett, végül DAPI-val (4',6-diamidino-2-phenylindol; Vector Laboratories Inc., Burlingame, UK) kiegészített oldattal fedtük le a lemezeket. A fixálás és a primer antitesttel történő jelölés kivételével a lépések szobahőmérsékleten történtek. Az M1 és M3 receptorok ellen termeltett primer antitesteket, specifikusságuk vizsgálata érdekében, negatív kontroll kísérletekben blokkoló peptiddel inkubáltuk elő. Az immunizáló peptidet és a primer antitestet 30 percig, szobahőmérsékleten, blokkoló oldatban inkubáltuk a vegyszer leírásának megfelelő arányban keverve (Alomone,

Jerusalem, Izrael). Néhány esetben az immunjelölést olyan fedőlemezen végeztük, amelyiken előzőleg Ca^{2+} tranziensek mérése történt (lásd később).

Az immunreakciók vizsgálatához RT Color CCD kamerával felszerelt Nikon Eclipse 600W fluoreszcens mikroszkópot alkalmaztunk (Nikon, Tokyo, Japan), a felvételeket a Spot RT v3.5 szoftver segítségével készítettük. Néhány esetben az immunfestés eredményét konfokális lézer-scanning mikroszkóppal detektáltuk, ilyenkor az egyedi rétegfelvételek rögzítése és azok szummálása az LSM Image Browser program (Zeiss Oberkochen, Németország) segítségével történt. Az esetek egy részében az eredeti képeken a fényerőt és a kontrasztot módosítottuk (minden esetben elvégezve ugyanazokat a módosításokat a kontroll (háttér) felvételeken is), de más változtatást nem végeztünk. A végleges, bemutatásra kerülő ábrákat az Adobe Photoshop 7.0 program segítségével készítettük.

1. táblázat: Az immuncitokémiai jelölések során alkalmazott primer és szekunder antitestek

Antitest	Specifititás	Hígítás	Gazdaállat	Forgalmazó
Elsődleges antitestek				
Anti-GFAP	patkány, egér	1:200	nyúl	DAKO ^a
Anti-GFAP	patkány, ember	1:100	kecske	Santa Cruz ^b
Anti-M1	patkány	1:100	nyúl	Alomone ^c
Anti-M3	patkány	1:400	nyúl	Alomone ^c
Másodlagos antitestek				
Anti-nyúl FITC		1:200	kecske	Vector ^d
Anti-nyúl Texas Red		1:200	kecske	Vector ^d
Anti-kecske FITC		1:500	szamár	Santa Cruz ^b

^aDAKO, Glostrup, Hollandia; ^bSanta Cruz, CA, USA; ^cAlomone, Jerusalem, Izrael; ^dVector, Burlingame, CA, USA.

GFAP, glial fibrillary acidic protein; M1/3, 1-es illetve 3-as típusú muszkarinerg kolinerg receptor; FITC, fluorescein izotiocianat.

Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérése

Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérésének elve

Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérésére a Fluo-4 fluoreszcens Ca^{2+} -indikátor acetoximetil-észter formáját alkalmaztuk (Fluo-4-AM; Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). A festéket dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk fel, a kapott törzsoldatot (2 mmol/l)

-20 °C-on tároltuk. A kísérlet előtt a törzsoldatot HEPES tartalmú aCSF oldatban (HaCSF; 135 mmol/l NaCl; 3 mmol/l KCl; 10 mmol/l glükóz; 2 mmol/l CaCl₂; 1 mmol/l MgCl₂; 10 mmol/l HEPES; pH = 7,2; ozmolaritás = 305 mosm/kg) 2 µmol/l-re hígítottuk. Az így nyert munkaoldathoz 2,5 mmol/l probenecidet is adtunk, hogy csökkentsük az ABC-transzporterek által kijuttatott festék mennyiségét, továbbá 1% BSA-t is alkalmaztunk, mert egyes szerzők szerint ez segíti a sejtek túlélését (Takahashi és mtsai., 1999). A Fluo-4-AM-re jellemző, hogy észter csoportja következtében lipidpermeábilis, így bediffundál a sejtekbe. Ennek elősegítésére a fent leírt munkaoldatban 30 percig inkubáltuk a sejteket (37 °C, 95% O₂ és 5% CO₂). Az intracelluláris térbe történt bejutást követően az ott jelenlevő nem-specifikus észterázok lehasítják a molekula lipofil csoportjait, ami szabaddá teszi a töltéssel rendelkező részeket. Az így kapott molekula jóval lassabban távozik a sejtől, mint a kiindulási vegyület. Az észterifikált csoportok hidrolízise érdekében a sejteket további 30 percig inkubáltuk az előzővel megegyező összetételű, de festéket már nem tartalmazó extracelluláris oldatban.

A Fluo-4 festék azon Ca²⁺-indikátorok közé tartozik, amelyek emissziója Ca²⁺ hatására a teljes spektrumban fokozódik, azaz nem alkalmas úgynevezett „ratiometric” mérésekhez (a festék excitációs és emissziós maximuma 494 és 515 nm). Az ilyen indikátorok esetében a Ca²⁺-koncentráció számítása csak a sejtben belüli festékkoncentráció ismeretében kivitelezhető, körülményes kalibrálási eljárást követően. Kísérleteink során nem tettünk erőfeszítést sem a festékkoncentráció meghatározására, sem ilyen kalibráció elvégzésére, ezért csak a Ca²⁺-koncentrációval arányos fluoreszcenciaintenzitást tudtuk megadni, úgynevezett „önkéntes egységek”-ben (arbitrary unit; AU). Mindazonáltal az értekezésben a „Ca²⁺-koncentráció”, „Ca²⁺-tranzienst”, stb. kifejezéseket is alkalmazzuk a pontosabb „fluoreszcenciaintenzitás”, „fluoreszcenciatrienziens” helyett.

Az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció mérőrendszer felépítése

A citoplazmatikus Ca²⁺-koncentráció mérésére szolgáló rendszer öt [1-5] részből épül fel, melyek közül három a Till Photonics GmbH (Gräfelfing, Németország) terméke. A mérőhely alapja [1] ugyanaz a konvencionális elrendezésű Axioskop mikroszkóp (Zeiss, Oberkochen, Németország), amelyet az elektrofiziológiai mérések leírásakor említettünk. A fluoreszcencia mérésekhez ugyanakkor a mikroszkópot ki kellett bővíteni a szükséges optikai elemekkel. Ezek közé tartozott egy dikroikus tükör (XF2010 505DRLP; Omega Drive, Brattleboro, VT, USA), valamint egy emissziós szűrő (LP 515). A fényforrás [2] egy Xenon-izzó alapú Polychrom V egység, az ebben található monokromátor segítségével állítottuk a

gerjesztő fény hullámhosszát 494 nm-re. Az emittált fényt egy CCD kamera [3] segítségével detektáltuk (SensiCam, Pco. imaging, AG, Kelheim, Németország). A mérőrendszer vezérlő elemei az „imaging control unit” (ICU) hardver egység [4] és a Till Vision szoftver 4.0.1.3 verziója [5], melyek a fényforrás és a kamera összehangolása révén lehetővé teszik a valós idejű („real-time”) mérést. A rögzített képek felbontását 260×344 pixelnek választottuk, ami még hosszú protokollok esetén is megengedte a valós idejű mérést. A képpontok összevonását („binning”) 1-4 között, az expozíciós időt 20-200 ms között változtattuk, a ciklusidőt pedig 500 ms-ra állítottuk.

Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérés kivitelezése, a nyert adatok feldolgozása

A mikroszkóp tárgyasztalán egy kisebb kád (űrtartalma kb. 1 ml) foglalt helyet, melyben az inkubáló oldat (HaCSF) egy perfúziós rendszer segítségével folyamatosan áramoltatható. A mérés során ebbe a kádba helyeztük a fedőlemezeket, melyeket a 63x-os nagyítású vízimmerziós objektív segítségével vizsgáltunk, szobahőmérsékleten. Az ötsatornás perfúziós rendszer lehetővé tette, hogy egy protokoll alatt különböző oldatokat alkalmazzunk a mérőkádban. A perfúziós rendszer csatornáit manuálisan váltottuk, a perfúzió sebessége 10 ml/perc volt. A Ca^{2+} -tranzienseket legtöbbször CCh, illetve néhány esetben muszkarin segítségével váltottuk ki, míg a mAChR-ok szerepét általános vagy altípus-specifikus gátlószerek segítségével vizsgáltuk [atropin, hexamethonium, pirenzepin, 4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidin methiodid (4-DAMP), (Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK)].

A mérés kezdetén a kamera látóterében úgynevezett „region of interest” (ROI) területeket jelöltünk ki a szoftver segítségével. Ezek közül az egyik sejtet nem tartalmazó terület volt, ez szolgált a háttér fluoreszcenciaintenzitásának meghatározására. Az úgynevezett „kinetic view” módban a szoftver az előzőleg meghatározott ROI-k átlagos fluoreszcenciaintenzitásait adta meg önkényes egységekben (AU), és az idő függvényben ábrázolta is ezen értékeket. Az úgynevezett „image view” módban a fluoreszcencia emisszió térbeli eloszlását rögzítette a rendszer, majd az intenzitással arányos színskálán vagy fekete-fehér („greyscale”) skálán kódolt képeket ugyancsak az idő függvényében jelenítette meg.

A „kinetic view” módban rögzített Ca^{2+} -tranziensek feldolgozásakor a jelet szűrtük a szomszédos 3 pont átlagának számításával. Az analízis során először kiszámoltuk a háttér fluoreszcenciaintenzitás (F_h) nagyságát a sejtet nem tartalmazó ROI-ban, a Ca^{2+} -tranziens kiváltását megelőző 10 s alatt kapott fluoreszcenciaintenzitás-értékek átlagaként. Ezt követően a sejteket tartalmazó egyes ROI-k nyugalmi fluoreszcenciaintenzitásait (F_{ny})

állapítottuk meg, ugyancsak a Ca^{2+} -tranziens kiváltását megelőző 10 s alatt kapott fluoreszcenciaintenzitás-értékek átlagaként. A fluoreszcencia (Ca^{2+}) tranziensek helyét és csúcsértékét (F_{max}) a legnagyobb átlagot adó 3 mérési pont határozta meg. A fluoreszcenciaintenzitás-változás amplitúdóját ($\Delta F/F$) ezen adatok birtokában a

$$\Delta F/F = (F_{\text{max}} - F_{\text{ny}})/(F_{\text{ny}} - F_{\text{h}}) \quad (1)$$

összefüggés segítségével számoltuk (Takahashi és mtsai., 1999). Ugyanazon astrocytán egymást követően kiváltott Ca^{2+} -jelek amplitúdójának összehasonlításához a relatív fluoreszcenciaintenzitás-változás ($\Delta F/F_{\text{rel}}$) értékét a

$$\Delta F/F_{\text{rel}} = (\Delta F/F_2)/(\Delta F/F_1) \quad (2)$$

képlettel határoztuk meg, ahol a $\Delta F/F_1$ a Ca^{2+} -tranziens csúcsértéke az első CCh alkalmazást követően, míg $\Delta F/F_2$ a Ca^{2+} -jel maximális nagysága a második CCh alkalmazást követően (függetlenül attól, hogy az agonistát magában vagy valamely más szerrel egyidejűleg adtuk). Néhány esetben harmadik Ca^{2+} -tranziens kiváltására is sor került, ilyenkor is az első tranziens amplitúdójára normáltuk a jel nagyságát.

A fluoreszcenciajelek feldolgozásához és ábrázolásához az Origin7 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) és a Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) programokat használtunk.

Kvantitatív „real-time” PCR (Q-PCR)

A Q-PCR kísérletek egy részében az RNS mintát 3-80 napos patkányok CN-aiból izoláltuk. A teljes RNS kivonására Trizol-reagenst használtunk (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), majd azt 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően a Trizolos szuszpenziót 0,2 ml kloroformmal kevertük össze, majd 4 °C-on, 12000 g-vel 15 percig centrifugáltuk. A felső, vizes fázist, amely az RNS-t tartalmazta, leszívtuk, összekevertük 0,5 ml izopropanollal, majd 10 percig jégen inkubáltuk. Ezt 10 perces centrifugálás követte 12000 g-vel 4 °C-on, végül a pelletet 75%-os etanolban mostuk. A kísérletek másik részében a teljes RNS-t RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Németország) segítségével konfluens astrocytatenyészetekből izoláltuk, a használati útmutatóban megjelölt mintaprotokoll alkalmazásával.

Az RNS mennyiségének és tisztaságának meghatározását Nano-Drop 1000 spektrofotométer (Wilmington, DE, USA) segítségével végeztük. Mivel az M1 és M3 receptorokra tervezett primerek nem exon-exon határra lettek tervezve és szintetizálva, a reverz transzkripciót megelőzően DN-ázzal történő emésztés volt szükséges, amit RQ1 DNáz enzim (Promega, Madison, WI, USA) segítségével végeztünk. A protokoll megegyezett az enzim adatlapján leírtakkal. A teljes RNS 1 µg-jából kiindulva 10U AMV reverz-transzkriptázt (Promega) és 0.5 µg/µl random primert (és a másik olalon milyen primert tartalmazott?) (Promega) felhasználva állítottunk elő cDNS-t. A Q-PCR kivitelezése az ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) készülék segítségével történt, az 5' nukleáz módszer felhasználásával. A PCR amplifikáció TaqMan primerek és próbák alkalmazásával történt (Assay ID: Rn00589936_s1 az M1-es, Rn02532311_s1 az M2-es; Rn00560986_s1, az M3-as, Rn01512605_s1 az M4-es és Rn00569370_m1 az M5-ös mAChR esetében), a TaqMan Universal PCR Master Mix protokoll (Applied Biosystems) alapján. Belső kontrollként β-aktin szolgált (Assay ID: Rn00667869_m1), így az egyes mAChR mRNS-ek expressziójának relatív mennyiségét erre normálva fejeztük ki a ΔCT módszer (Applied Biosystems) segítségével. Ide nekem hiányoznak azok a primer szekvenciák, amelyek megadhatóak, kiegészítve azzal, hogy ezek az mRNS mely nuleotidjai közötti bázisokkal homológok)

Vegyszerek, statisztika

Amennyiben nincs másként megadva, a vegyszereket a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) magyar képviselőjétől rendeltük.

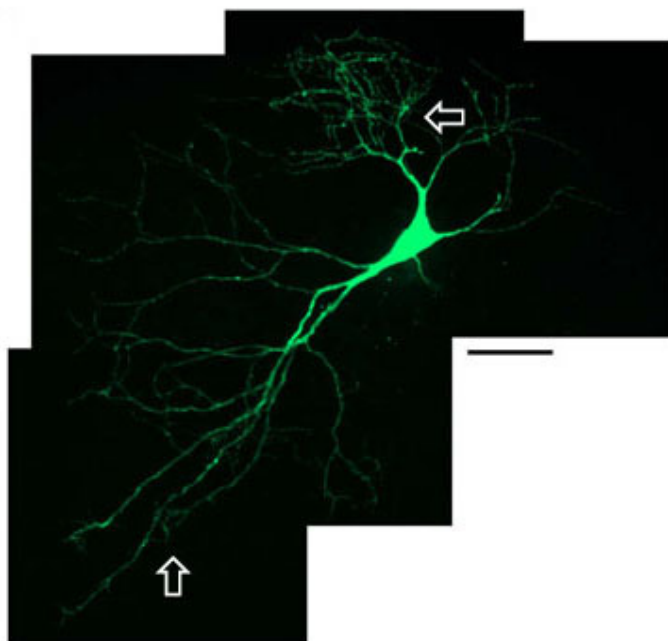
Az eredmények átlag $\pm$ SEM formájában vannak feltüntetve. A statisztikai elemzés során a szignifikanciát Student-féle kétmintás t-próbával állapítottuk meg. A változást akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a $p < 0,05$ feltétel teljesült.

Eredmények

I. Kolinerg neuromoduláció patkány DCN óriásneuronjain

Az óriássejtek azonosítása

A DCN óriássejtjeinek morfológiáját már részletesen leírták (Ryugo és Willard, 1985; Zhang és Oertel, 1993; Alibardi, 1999), azonosításuk a sejttest mérete és alakja valamint a dendritfa alakja és arborizációja alapján végezhető el. Az óriás-neuronok kiválasztásánál a sikeres találatok számának növelése érdekében eleve a DCN mély rétegében található, nagy sejttesttel rendelkező neuronokat céloztuk meg. A sejtek egyértelmű azonosítása érdekében az elektrofiziológiai mérések alatt biocitinnel töltöttük fel őket, és egy szeletben csak egy sejten végeztünk mérést. A sejtek morfológiáját az azok sejttestjét és dendritfáját egyaránt kirajzoló konfokális felvételek alapján állapítottuk meg (1. ábra).



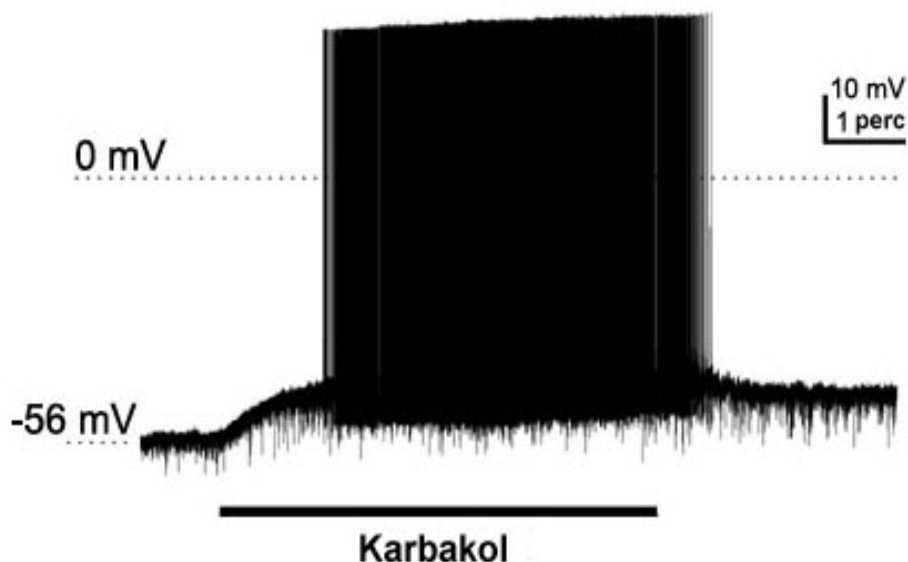
1. ábra: Biocitinnel jelölt DCN óriásneuron

A konfokális mikroszkóppal készült kép jól szemlélteti az óriássejtnek a DCN felszíni (horizontális nyíl) és a mély (vertikális nyíl) rétegébe nyúló, igen szerteágazó dendritfáját. A sejt nagyságát jól érzékelteti, hogy az ábra elkészítéséhez több látótérben készített konfokális felvétel összeszerkesztésére volt szükség. A kalibráció 50 µm-t jelöl.

Az óriássejtek morfológiai azonosításánál a következő kritériumokat vettük figyelembe: nagy szomaátmérőjű (30-50 μm), poligonális sejttest, mely négy vagy több dendritörzset bocsájt ki a DCN minden rétege irányába és ugyanakkor a felszíni rétegben különösen gazdagon elágazó nyúlványrendszert képez (1. ábra). Azokat a mérési eredményeket, melyeket a fent említett kritériumoknak nem egyértelműen megfelelő sejteken kaptunk, a későbbi elemzés során nem vettük figyelembe. Az elvégzett kísérletek során összesen 294 sejtet vizsgáltunk meg, melyek közül 184 felelt meg a fent leírt morfológiai kritériumoknak, azaz bizonyult óriásneuronnak.

CCh alkalmazása megnöveli az óriássejtek tüzelési frekvenciáját

Áram-clamp üzemmódban végzett kísérleteink szerint 36 óriássejtként azonosított neuronon a nyugalmi membránpotenciál $-51 \pm 2 \text{ mV}$ -nak adódott. A vizsgált sejtek közül három külső ingerlés hiányában is akcióspotenciálokat generált, tüzelési frekvenciájuk átlagértéke $2,4 \pm 0,5 \text{ Hz}$ volt.

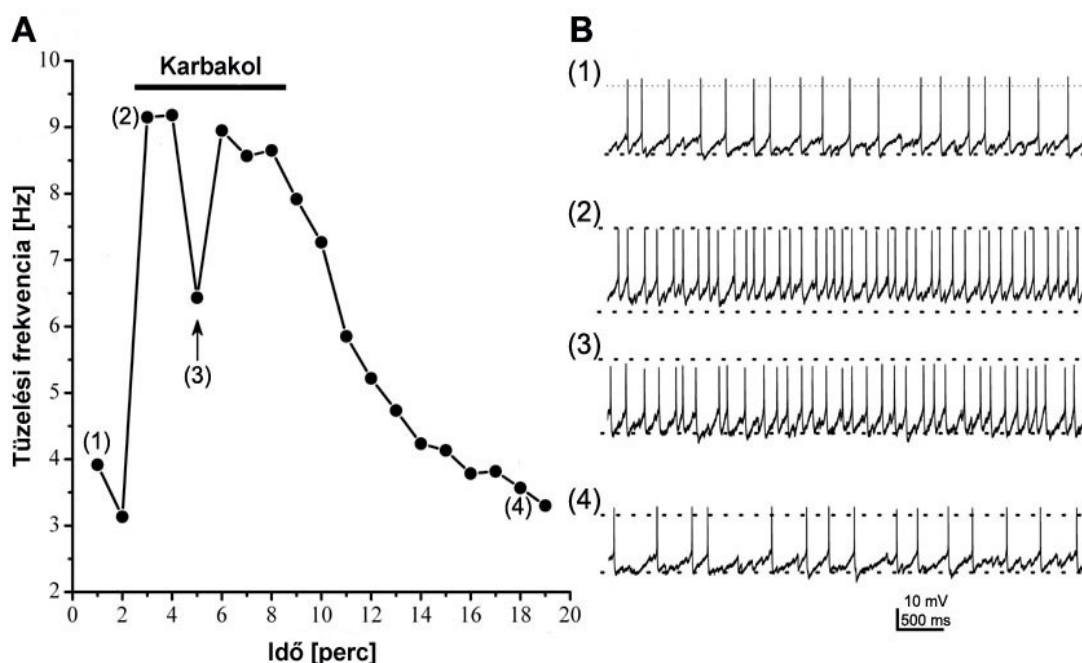


2. ábra: CCh hatása az óriássejtek elektrofiziológiai sajátosságaira

Az ábra az 1. ábrán bemutatott sejt 50 $\mu\text{mol/l}$ CCh hatására kialakult depolarizációját és akcióspotenciál-tüzelését mutatja be. Látható, hogy már 50 $\mu\text{mol/l}$ CCh is igen aktív tüzelésre bírja az óriás-neuronokat.

50 $\mu\text{mol/l}$ CCh alkalmazását követően (az agonista alkalmazása mindig minimum 3 percig tartott) az óriássejtek nyugalmi membránpotenciálja $-45 \pm 1 \text{ mV}$ -ra ($n = 36$) csökkent, ezzel egyidejűleg minden vizsgált sejt magas frekvenciájú akcióspotenciál-tüzelést produkált ($7,3 \pm 1,3 \text{ Hz}$; $n = 36$), függetlenül attól, hogy előzőleg kontroll körülmények között mutatott-e spontán tüzelést vagy sem (2. ábra).

Annak érdekében, hogy kiderítsük, a tüzelési aktivitás háttérében vajon kizárólag a CCh okozta depolarizáció áll-e, vagy annak létrehozásában más mechanizmusok (pl. a rajtuk található muszkarinos receptorok aktiválódása) is szerepet játszanak, a CCh kezelés alatt egyes kísérletekben hiperpolarizáló áramot vezettünk a sejtekbe, hogy visszaállítsuk azok nyugalmi membránpotenciál-értékét. Mint az a 3. ábrán látható, repolarizáció hatására az óriássejtek akcióspotenciál-tüzelési frekvenciája csökkent ($4,5 \pm 2,0 \text{ Hz}$; $n = 3$), de teljesen nem szűnt meg (a spontán tüzelést produkáló sejtek esetén nem csökkent le a kiindulási értékre).



3. ábra: CCh hatása az óriássejtek akcióspotenciál-tüzelésére

Az ábra A része egy spontán tüzelést mutató óriássejt tüzelési frekvenciáját jelzi. A frekvenciát 1 perces időtartamokra számoltuk ki és ábrázoltuk 50 $\mu\text{mol/l}$ CCh alkalmazása előtt, közben és után. A kísérlet 4. és 6. perce között a membránpotenciált a nyugalmi értékre állítottuk vissza hiperpolarizáló áram segítségével (3). A B ábrarész a mérés kiválasztott részleteit mutatja be, az egyes részletek helyét a kísérlet egészében a két ábrarészen látható számok azonosítják.

Ezek az eredmények azt igazolják, hogy a CCh okozta depolarizáció csak részben felelős az óriássejtek megemelkedett aktivitásáért. A CCh kimosását követően a hatás részben reverzibilisnek bizonyult, a membránpotenciál értéke a kiindulási érték közelébe állt vissza (-52 ± 3 mV; $n = 36$). Az akcióspotenciál-tüzelés a CCh kimosását követően vagy megszűnt (azon sejtek esetén melyek a kiinduláskor nem tüzeltek, $n=33$), vagy a tüzelési frekvencia visszaállt a kontroll (kiindulási) értékre ($2,6 \pm 0,5$ Hz; $n = 3$).

A DCN óriássejtjein érvényesülő kolinerg modulációs hatás jelenlétét és élettani szerepét neostigmin alkalmazásával is megvizsgáltuk. Feltételeztük, hogy amennyiben a kolinerg moduláció funkcionálisan jelen van, akkor az acetilkolin-észteráz gátlását követően, azaz a jelenlévő ACh mennyiségének fokozódásával hasonló változást kellene tapasztalnunk a nyugalmi membránpotenciál értékében és a tüzelési mintázatban, mint amilyent a CCh alkalmazását követően láttunk. A 4. ábra igazolja, hogy ez a feltételezésünk megerősítést nyert. A neostigmin ($50 \mu\text{mol/l}$) alkalmazása $8,5 \pm 2,7$ mV-tal depolarizálta a vizsgált sejteket ($n = 5$) és rajtuk akcióspotenciál tüzelést váltott ki. Az ábrán az is megfigyelhető, hogy a neostigmin hatása jelentős késéssel alakult ki, és hasonlóképpen jelentős késéssel szűnt meg a CCh hatás időviszonyaihoz képest. Ennek a különbségnek a magyarázata kézenfekvő: a neostigmin alkalmazását követően a kolineszteráz-gátlás kialakulása és az intrinsic ACh felhalmozódása hosszabb időt igényel, mint a CCh közvetlen agonista hatásának kialakulása.



4. ábra: Neostigmin hatása óriássejt elektrofiziológiai sajátságaira

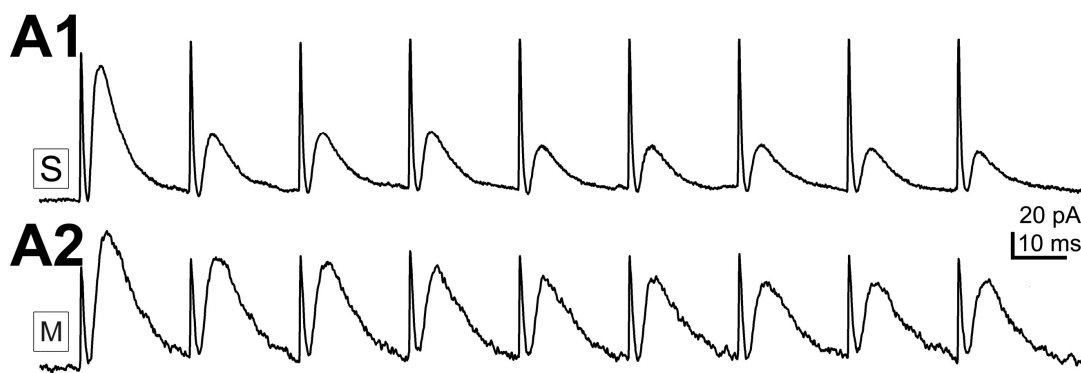
Az extracelluláris közegben alkalmazott $50 \mu\text{mol/l}$ neostigmin a sejt depolarizációját és akcióspotenciál-tüzelését ($5,49$ Hz) váltotta ki. Megfigyelhető, hogy mind a hatás kialakulása, mind annak megszűnése lényegesen lassabb, mint azt a CCh alkalmazása esetén láttuk (2. ábra).

CCh hatása a felszíni és a mély réteg felől kiváltott IPSC-kre

Az óriássejteken kiváltott IPSC-k vizsgálatához a serkentő szinaptikus bemeneteket a glutamátreceptor antagonisták NBQX és D-AP5 kombinált alkalmazásával gátoltuk. A vizsgált 162 sejt közül 146 esetében spontán gátló posztszinaptikus áramokat (sIPSC)

detektáltunk, amelyek 1 $\mu\text{mol/l}$ sztrichnin és 10 $\mu\text{mol/l}$ bikukullin együttes adásával teljesen kivédhetőnek bizonyultak ($n = 93$). Míg a sztrichnin önmagában is teljesen gátolta a sIPSC-ket, addig a bikukullin sztrichnin nélkül alkalmazva csökkentette ugyan a sIPSC-k amplitudóját és frekvenciáját (80 ± 2 -ről 70 ± 2 pA-ra, illetve $6,3 \pm 1,1$ -ről $4,4 \pm 0,4$ Hz-re; $n = 3$; $p = 0,0002$ illetve $0,046$), azokat egyetlen esetben sem gátolta teljesen. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az óriássejteken végződő gátló rostok, melyek aktivitását gátló posztszinaptikus áramok (IPSC-k) formájában detektáltuk, főként glicinergek, és csak kisebb, bár nem elhanyagolható részük GABA-erg végződés.

A DCN felszíni, illetve mély rétegei felől, elektromos ingerléssel kiváltott IPSC-sorozatok első tagjait összehasonlítva nem találtunk szignifikáns eltérést. Különbséget állapítottunk meg ugyanakkor a két ingerlési forma között abban, hogy a kiváltott sorozatokon belül mennyire állandó az egyedi IPSC-k nagysága. Az 5. ábrán látható, hogy a felszíni réteg stimulálását követően kapott IPSC-k határozott rövid távú depressziót (short-term depression; STD) mutattak, szemben a mély rétegben történő ingerlést követően kialakult IPSC-kel. Utóbbiak esetében sem STD, sem rövid távú facilitáció (short-term facilitation; STF) nem volt megfigyelhető. Az IPSC-k rövid távú változásainak kvantitatív jellemzésére a PPR értéket

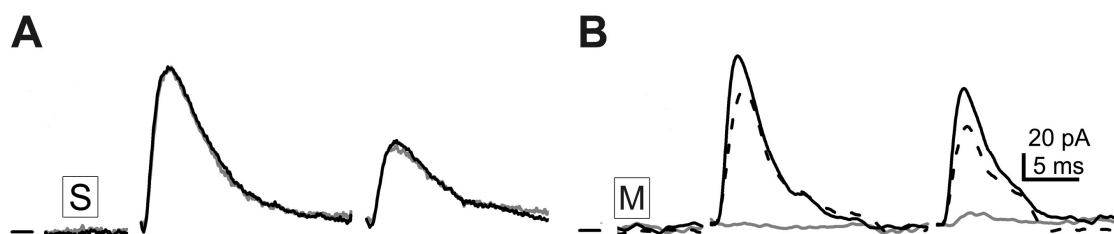


5. ábra: Elektromos ingerléssel kiváltott IPSC sorozatok óriássejteken

Az ábra a DCN felszíni (S) és mély (M) rétegei felől elektromos ingerléssel kiváltott IPSC-ket hasonlítja össze. Az ábrán bemutatott jeleket 10-10 egyedi regisztrátum átlagaként kaptuk. Megfigyelhető, hogy a felszíni réteg felől történő ingerlés esetén a második IPSC amplitudója jelentősen csökkent az elsőéhez képest (STD). A mély réteg felőli ingerlés esetén az IPSC-k nagyságában jelentős változást nem figyeltünk meg. A regisztrátumokon az IPSC-ket megelőző tüskeszerű jelek az ingerlés okozta műtermékek.

használtuk. A PPR átlagértéke a felszíni réteg felől történő ingerlés esetén $0,5 \pm 0,1$ ($n = 8$) volt, míg a mély réteg felőli ingerléssel kiváltott IPSC sorozatok esetén $0,95 \pm 0,2$ -nek adódott ($n = 8$).

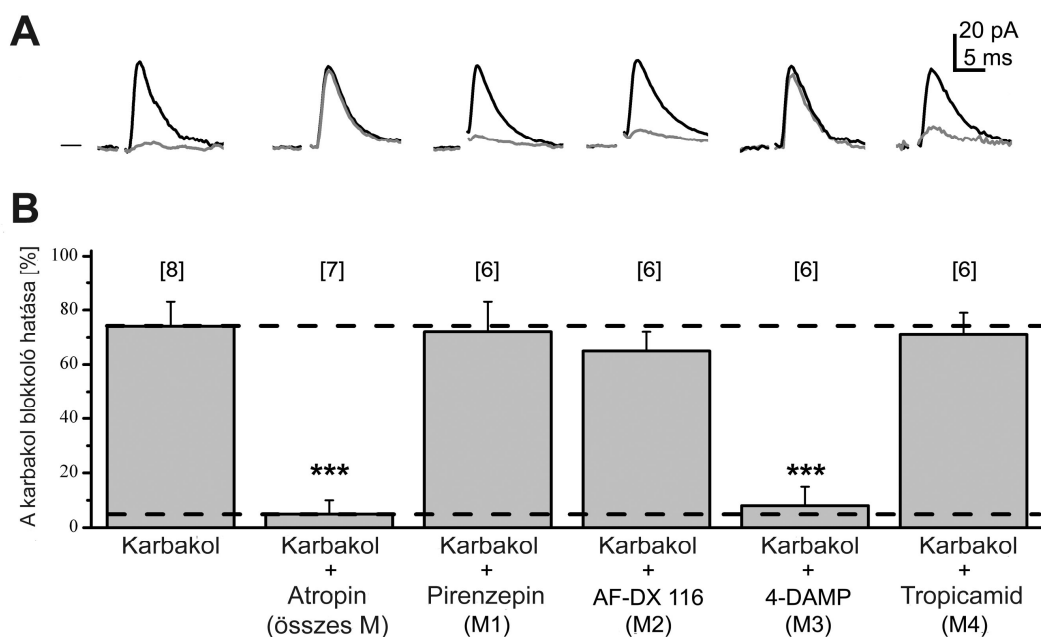
A két különböző irányból kiváltott IPSC-k markáns eltérést mutattak a CCh alkalmazására adott válaszaikban is. Amennyiben a felszíni réteg felől váltottuk ki az IPSC-eket, a kolinerg agonista alkalmazását követően sem az IPSC-k amplitúdójában, sem a PPR értékében nem tapasztaltunk változásokat (6. ábra A része). Az összes hasonló kísérletet figyelembe véve CCh jelenlétében az első kiváltott IPSC-k amplitúdója 138 ± 9 pA-nak adódott, míg a kontroll esetben, CCh nélkül ez az érték 126 ± 28 pA volt ($n = 8$). A PPR nagyságában még kismértékű változást sem tapasztaltunk, értéke mindkét esetben $0,5 \pm 0,1$ -nek adódott ($n = 8$). A mély réteg felől történő ingerlés esetén a CCh már igen jelentős hatást gyakorolt az IPSC-kre (6. ábra B része). Az agonista hatására az első IPSC nagysága 120 ± 18 pA-ról 32 ± 11 pA-ra ($26 \pm 9\%$ -ra) csökkent ($n = 8$; $p = 0,000154$). A második (és az azt követő) IPSCk amplitúdója ugyancsak csökkent CCh jelenlétében, a PPR értéke pedig $1,15 \pm 0,1$ -re változott (igaz, ez a változás nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak; $p = 0,165$). A CCh hatása minden esetben reverzibilisnek bizonyult.



6. ábra: CCh hatása az óriássejteken elektromos ingerléssel kiváltott IPSC sorozatokra

Az ábra $50 \mu\text{mol/l}$ CCh hatását mutatja be felszíni (S) és mély (M) réteg felől történő ingerléssel kiváltott IPSC-kre. A folytonos vonal jelzi a kontroll görbéket, a szaggatott vonal a kimosást követően rögzített IPSC-eket, míg a szürke vonalak a CCh jelenlétében kapott görbéket mutatják (valamennyi feltüntetett görbe 10-10 egyedi regisztrátum átlagolásával készült). A jobb láthatóság érdekében az ingerlés okozta műtermékeket eltávolítottuk. Megfigyelhető, hogy amíg a felszíni réteg felől kiváltott IPSC-k estében a CCh kezelés semmilyen látható hatással nem bírt, addig a mély rétegek ingerlése esetén a kolinerg agonista jelentősen és reverzibilisen gátolta a kiváltott IPSC-eket.

A kísérletek következő részében azt vizsgáltuk, hogy a DCN mély rétege felőli ingerléssel kiváltott IPSC-kre gyakorolt CCh hatásért mely kolinerg receptorok lehetnek felelősek. Az érintett receptorok azonosítása mAChR antagonistákat alkalmaztunk (7. ábra). A kísérleteket megelőzően a szeleteket az adott gátlószert 1 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban tartalmazó aCSF oldatban inkubáltuk 10 percig, majd a gátlószer jelenlétében 50 $\mu\text{mol/l}$ CCh-t alkalmaztunk. Az IPSC sorozatokat a CCh adása előtt és közben váltottuk ki. Az első IPSC-kre gyakorolt CCh-gátlás mértékét (más szavakkal a CCh-érzékeny komponens nagyságát) úgy határoztuk meg, hogy kiszámoltuk a CCh alkalmazása alatti és előtti első IPSC-k amplitúdójának különbségét, majd azt a CCh adása előtti első IPSC nagyságának százalékában fejeztük ki (a továbbiakban a CCh adása előtti értékekre kontrollként is hivatkozunk).



7. ábra: CCh hatása a DCN mély rétegének elektromos ingerlésével kiváltott IPSC-kre mAChR antagonisták jelenlétében

Az ábra A része a mély réteg ingerlésével kiváltott IPSC sorozatok első tagjait mutatja a CCh alkalmazása előtt (fekete görbék), és a CCh alkalmazása közben (szürke görbék). A B ábrarész a CCh hatására kialakuló gátlás átlagértékeit adja meg. Az oszlopok a CCh önmagában vagy valamelyik gátlószerral történő egyidejű alkalmazása során kapott első IPSC-k amplitúdójának nagyságát adják meg a kontroll (CCh alkalmazása előtti) első IPSC-k amplitúdójának százalékában kifejezve. Az ábra alján tüntettük fel, hogy a CCh-t önmagában vagy melyik gátlószerral kombinációban adtuk, az oszlopok felett szögletes zárójelben pedig az esetszámot adtuk meg.

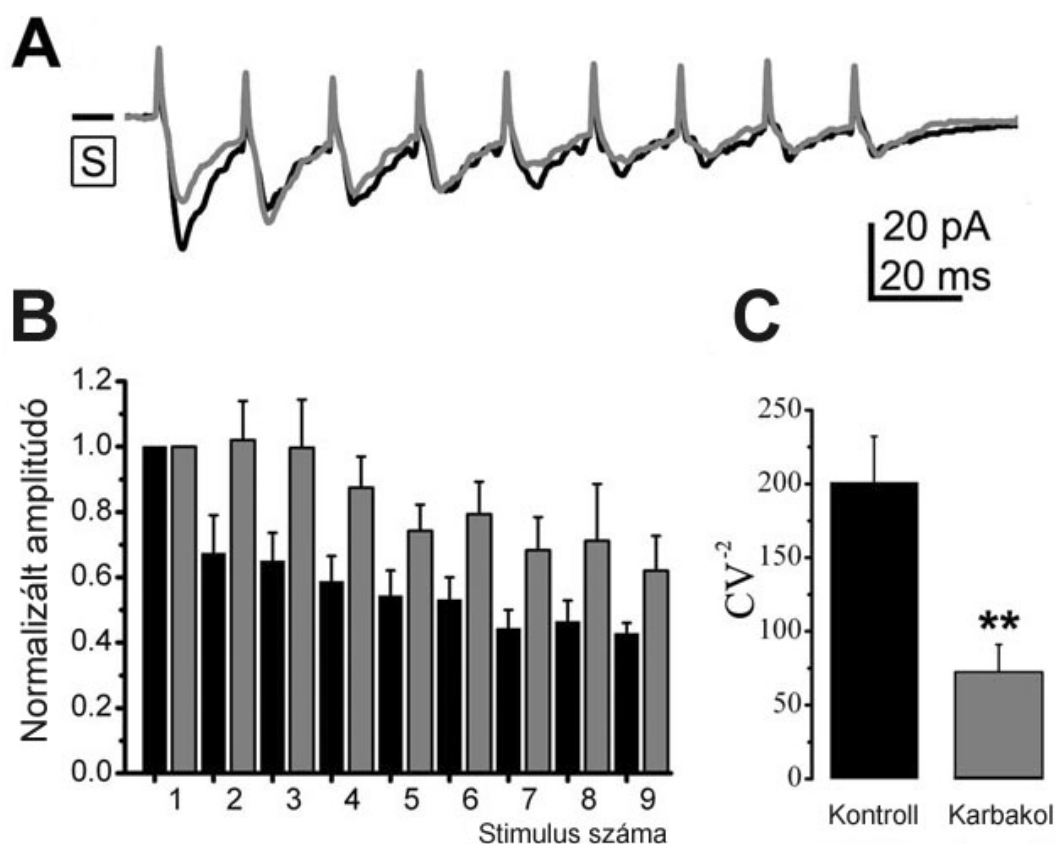
Amennyiben a CCh és valamilyen gátlószer egyidejű alkalmazása esetén kapott gátlás mértékét összevetjük a CCh okozta gátlás nagyságával, megállapíthatjuk, hogy az illető gátlószer milyen mértékben függeszti fel a CCh IPSC-ket gátló hatását.

A fenti módon elvégzett kísérletek eredményeit a 7. ábrán mutatjuk be. Az ábra A részén az IPSC sorozatok első tagjait láthatjuk abban az esetben, amikor a CCh-t önmagában (bal szélső görbék) illetve valamilyen gátlószerrel egyidejűleg alkalmaztuk (reprezentatív kísérletek). Az ábra B része az összes azonos módon végzett kísérlet statisztikai feldolgozása, ahol a CCh okozta IPSC csökkenés mértékét a fent részletezett módon, százalékos formában fejeztük ki. Amint látható, 10 $\mu\text{mol/l}$ atropin teljesen kivédte a CCh IPSC-kre gyakorolt gátló hatását, ennek mértéke ugyanis $74 \pm 9\%$ -ról $5 \pm 5\%$ -ra csökkent ($n = 7$; $p = 0,000845$). Az a tény, hogy az atropin képes volt teljesen kivédeni a CCh hatását, azért is fontos, mert jelzi, hogy a kolinerg modulációs hatás elsősorban mAChR-okon keresztül érvényesülhet. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, vajon a mAChR altípusok közül melyik játszik vagy melyek játszanak szerepet a kolinerg hatás kialakításában, kísérleteket végeztünk a különböző mAChR altípusok specifikus gátlószereinek alkalmazásával. Mint a 7. ábrán is látható, pirenzepin, AF-DX 116 és tropicamid nem befolyásolta jelentősen a CCh hatását. Ezen három antagonistá jelenlétében ugyanis a CCh gátló hatása hasonló mértékű volt, mint nélkülük (72 ± 11 , 65 ± 7 és $71 \pm 8\%$; $p = 0,368$, $0,281$ és $0,144$). Ezek az eredmények tehát azt jelzik, hogy az M1-, M2- és M4-receptorok nem érintettek az IPSC-kre gyakorolt CCh hatás létrehozásában. Ezzel szemben az M3-receptor blokkolása hatékonyan gátolta a CCh hatását, mivel a 4-DAMP jelenlétében a gátló hatás csak $8 \pm 7\%$ ($n = 6$; $p = 0,000225$) volt, azaz a CCh hatás felfüggesztése közel olyan mértékű volt, mint azt az atropin esetében tapasztaltuk.

CCh hatása a felszíni és a mély réteg felől kiváltott EPSC-kre

A kísérletek következő részében CCh-nak a DCN óriássejteken elektromos ingerléssel kiváltott EPSC-kre gyakorolt hatását vizsgáltuk. Ezekben a mérésekben az IPSC-k kialakulását sztrichnin és bikukullin egyidejű alkalmazásával gátoltuk. A 8. ábra A részén látható, hogy a felszíni réteg felőli ingerléssel kiváltott EPSC sorozatok esetén az első tag amplitúdója 45 ± 10 pA-nak adódott ($n = 8$), míg az ezt követő EPSCk egyértelmű STD-t mutattak ($\text{PPR} = 0,72 \pm 0,09$). 50 $\mu\text{mol/l}$ CCh összességében 28%-kal csökkentette az első EPSC-ket (32 ± 12 pA-ra; $n = 8$, $p = 0,0494$), és gyakorlatilag megszüntette az STD-t ($\text{PPR} = 1,02 \pm 0,05$; $n = 8$, $p = 0,0358$). Amennyiben az EPSC sorozatok tagjainak amplitúdóit a sorozaton belüli első EPSC nagyságára normáltuk (8. ábra, B ábrarész), a kapott

relatív amplitúdók nagysága CCh jelenlétében nagyobb volt, mint kontroll körülmények között, jelezve az STD megszűnését (a különbség valamennyi tag esetében szignifikáns). Annak eldöntésére, hogy a CCh a neurotranszmittert tartalmazó vezikulumok felszabadulását gátolja (azaz preszinaptikusan befolyásol), vagy az EPSC-k amplitúdójának csökkenését valamilyen posztzinaptikus támadásponttal idézi elő (pl. módosítja a posztzinaptikus

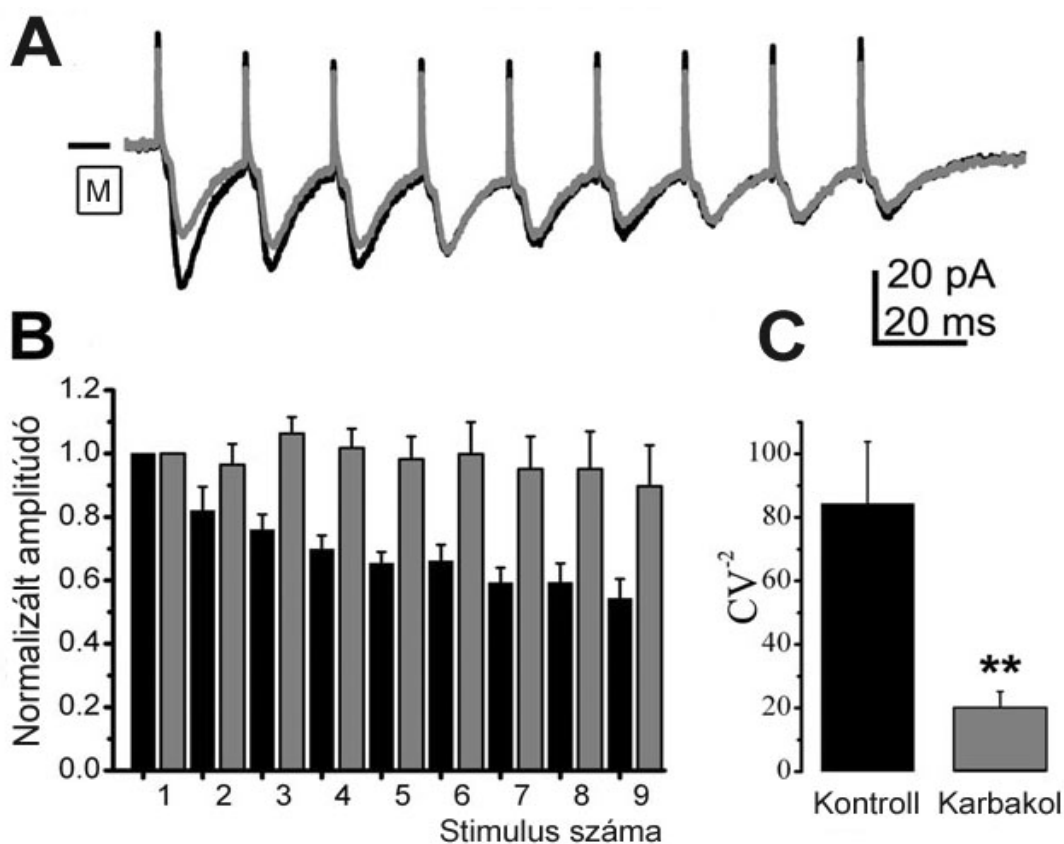


8. ábra: CCh hatása az óriássejteken felszíni ingerléssel kiváltott EPSC-kre

Az ábra A részén a DCN felszíni (S) rétege felőli ingerléssel kiváltott EPSC sorozatok láthatók kontroll körülmények között (fekete görbék) és 50 $\mu\text{mol/l}$ CCh jelenlétében (szürke görbék; mindkét bemutatott görbe tíz egyedi regisztrátum átlaga). Az egyes EPSC-k előtt látható tüskék ingerlési műtermékek. Az ábra B része úgy készült, hogy az egyes kísérletekben az EPSC sorozatok tagjainak amplitúdóját az első tagéra normáltuk, és a kapott relatív amplitúdókat átlagoltuk, az átlagokat a fekete (kontroll) és szürke (CCh) oszlopok jelzik ($n = 8$). Az első tag kivételével CCh jelenlétében az EPSC sorozatok valamennyi tagjának relatív amplitúdója szignifikánsan nagyobb volt, mint kontroll körülmények között. A C ábrarész az $1/\text{CV}^2$ értékeket tünteti fel kontroll körülmények közt (fekete oszlop), és CCh alkalmazását követően (szürke oszlop; $n = 8$).

receptor aktivációját és/vagy vezetőképességét), kiszámoltuk az $1/CV^2$ értékeket. A 8. ábra C részén látható, hogy az $1/CV^2$ érték CCh jelenlétében szignifikánsan csökkent ($p = 0,007037$) jelezve, hogy a DCN mély rétege felőli ingerlés hatására kialakult EPSC-ket a CCh főként preszinaptikus mechanizmus(ok) befolyásolása révén gátolja.

A 9. ábra A része mutatja be azt, hogy a mély réteg felőli ingerléssel kiváltott EPSC sorozatok esetén valamennyi tag amplitúdója nagyobb volt, mint amit a felszíni réteg ingerlése esetében tapasztaltunk (az első EPSC nagysága például 99 ± 6 pA-nak adódott; $n = 6$). Az STD jelensége a mély réteg felőli ingerlés esetén is megfigyelhető volt, igaz, kevésbé kifejezett mértékben ($PPR = 0,82 \pm 0,07$). Az is látható, hogy a mély réteg felőli ingerléssel kapott EPSC-k érzékenyebbek voltak CCh-ra, mint felszíni ingerléssel kiváltott



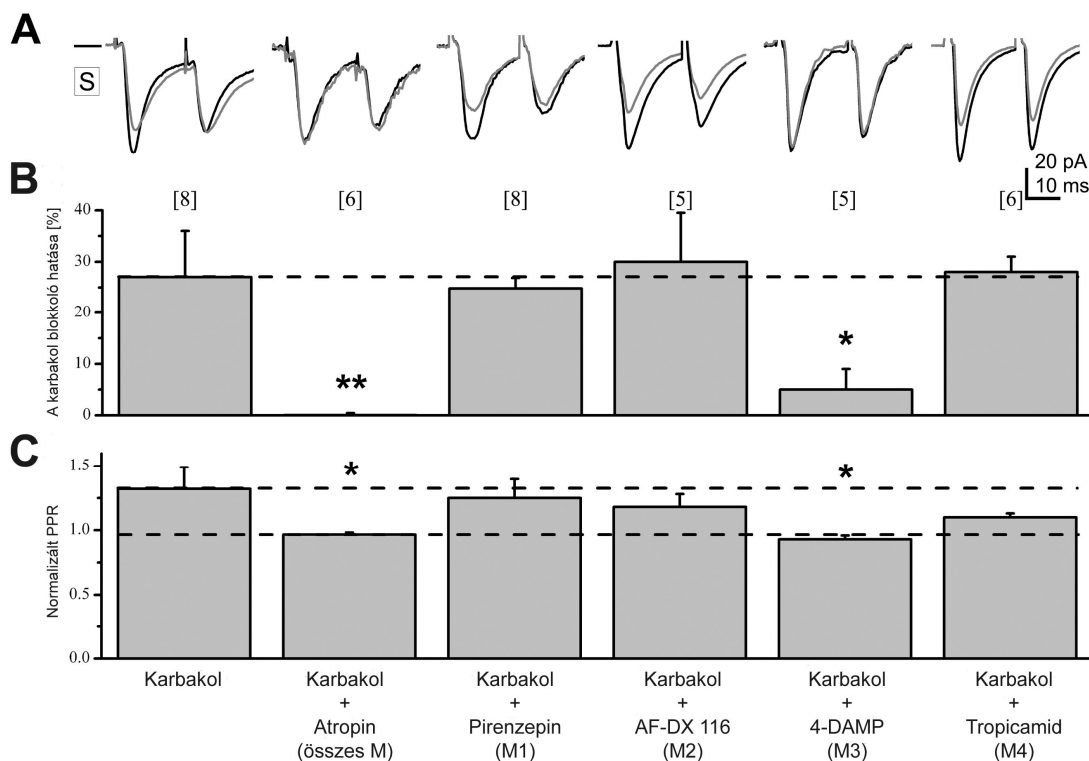
9. ábra: CCh hatása az óriássejteken a mély réteg felőli ingerléssel kiváltott EPSC-kre

Az ábra felépítése és az alkalmazott jelzések ugyanazok, mint a 8. ábra esetében, azzal a különbséggel, hogy az EPSC sorozatok kiváltása a DCN mély (M) rétegének ingerlésével történt ($n = 6$).

társaik, ebben az esetben az első EPSC-k amplitúdója 42%-kal csökkent CCh jelenlétében (átlag 57 ± 7 pA-ra; $n = 6$, $p = 0,049$). A sorozatokon belüli tagok első EPSC-re vonatkoztatott relatív amplitúdóinak meghatározása (9. ábra B rész) ugyanazt az eredményt adta, mint amit a felszíni ingerlés kapcsán láttunk: a CCh jelenlétében valamennyi tag relatív amplitúdója nagyobb volt, mint kontroll körülmények között, azaz az STD jelensége megszűnt. Ezt jelzi a PPR értékének szignifikánsan növekedése is CCh hatására ($1,01 \pm 0,05$; $p = 0,0026$). Mivel az $1/CV^2$ értéke ebben az esetben is szignifikánsan csökkent (9. ábra C része; $p = 0,0362$), kijelenthetjük, hogy a CCh-nak a DCN mély rétege felőli stimulációval kiváltott EPSC-kre gyakorolt hatása ugyancsak preszinaptikus úton valósul meg.

Az elektromos ingerléssel kiváltott EPSC-k kolinerg modulációjában résztvevő receptortípusok azonosítására ugyanazt a kísérleti stratégiát alkalmaztuk, mint az IPSC-k esetében. A felszíni réteg felőli ingerléssel kapott EPSC-kre vonatkozó eredmények összefoglalását a 10. ábra mutatja be. Az ábra A és B részein megfigyelhető, hogy az atropin ebben az esetben is gyakorlatilag teljesen kivédte a CCh-nak az első EPSC-k nagyságára gyakorolt hatását ($p = 0,01$) jelezve, hogy ez a hatás is elsősorban muszkarinerg receptorokon keresztül valósul meg. Altípus-specifikus gátlószerek alkalmazásával vizsgáltuk, hogy mely receptor-altípusok vesznek részt a hatás kialakításában. Pirenzepin, AF-DX 116 és tropicamid nem befolyásolták szignifikánsan a CCh hatását ($p = 0,447$, $0,408$ és $0,434$), míg az M3-specifikus 4-DAMP az atropin hatásához igen hasonló mértékben gátolta a CCh hatását ($p = 0,036$). Ezek az eredmények tehát azt sugallják, hogy a DCN felszíni rétege felőli ingerléssel kiváltott EPSC-kre gyakorolt kolinerg modulációs hatás főként az M3 típusú muszkarinerg receptoron keresztül valósul meg.

A kísérletek során a CCh-nak a PPR-re kifejtett modulációs hatását is meghatároztuk (10. ábra C rész). Erre a célra a relatív PPR értékeket alkalmaztuk, amelyeket úgy kaptunk, hogy a különféle hatóanyagok jelenlétében kapott PPR nagyságát a kontroll körülmények között (azaz mindenféle szer alkalmazását megelőzően) kapott PPR értékre normáltuk. Mint ahogy azt a 10. ábra C részének első oszlopa is mutatja, ez az érték CCh alkalmazása esetén $1,3 \pm 0,2$ jelezve, hogy a CCh önmagában csökkenti az STD-t, esetleg még kisebb mértékű facilitációt is okozhat. Azt is megfigyelhetjük, hogy a CCh-nak ezt a hatását pirenzepin, AF-DX 116 és tropicamid nem szignifikáns módon csökkentette; ugyanakkor atropin és 4-DAMP gyakorlatilag megszüntette ($p = 0,048$ és $0,049$). Ez a megfigyelés is azt a következtetést támasztja alá, hogy a felszíni réteg felől kiváltott EPSC-k kolinerg modulációjában muszkarinerg receptorok, különösképpen az M3 altípus játszik meghatározó szerepet.

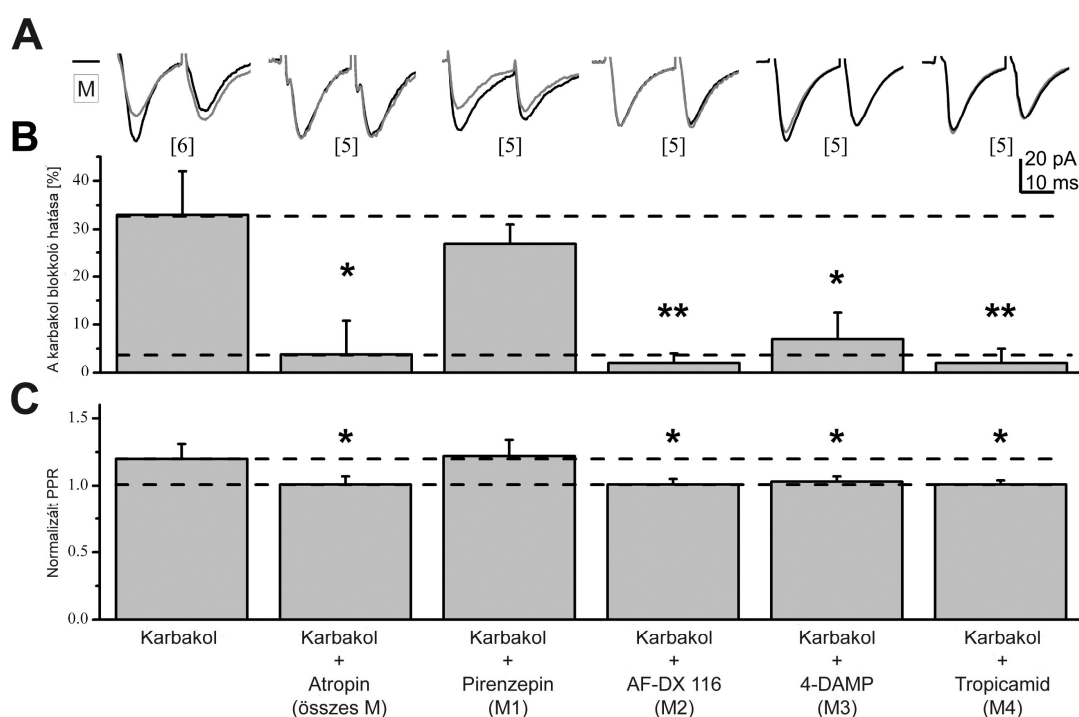


10. ábra: CCh hatása a DCN felszíni rétegének elektromos ingerlésével kiváltott EPSC-kre mAChR antagonisták jelenlétében

Az ábra A részén a DCN felszíni (S) rétege felőli ingerléssel kiváltott EPSC sorozatok első két-két tagját tüntettük fel CCh alkalmazása előtt (fekete görbék) és közben (szürke görbék). Minden feltüntetett görbe 10-10 egyedi regisztrátum átlagát jelenti. Az alkalmazott mAChR gátlószerek neveit és specificitását az ábra alján tüntettük fel. Az ábra B része az első EPSC-kre gyakorolt gátló CCh hatás mértékét adja meg valamennyi kísérlet átlagaként százalékos formában kifejezve (azaz a CCh-t megelőző értékekre normálva), önálló alkalmazás esetében illetve a feltüntetett gátlószerekkel történő előkezelést követően. A szögletes zárójelben látható számok a vizsgált sejtek számát jelölik. A C ábrarész a relatív PPR értékek átlagait adja meg. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Kísérleteket végeztünk annak tanulmányozása céljából is, hogy milyen kolinerg receptorok vesznek részt a DCN mély rétege felőli ingerléssel kiváltott EPSC-k modulációjának megvalósulásában. Az eredményeket a 11. ábra foglalja össze, amelyiknek felépítése teljesen azonos a 10. ábráéval. Megállapítható, hogy a felszíni ingerlésnél látottakkal megegyező módon atropin teljesen meggátolta a CCh hatását [az első EPSC amplitúdójának CCh-kiváltotta gátlása $33 \pm 9\%$ -ról $4 \pm 7\%$ -ra csökkent ($p = 0,048$), és a PPR CCh-okozta kismértékű fokozódása ugyancsak revertálható volt ($1,01 \pm 0,06$; $p = 0,046$)]. Jellemző különbségek figyelhetők meg ugyanakkor az egyes mAChR altípus-specifikus

gátlószerek hatásosságában a felszíni ingerlésnél látottakhoz képest. Pirenzepin ebben az esetben érdemlegesen nem változtatta meg a CCh hatását, míg a másik három specifikus gátlószer az atropinéhoz hasonló hatást váltott ki. Az M2-, M4- és M3-specifikus gátlószerek alkalmazása esetében az első EPSC-kre gyakorolt gátló CCh hatás mértéke csak $2 \pm 2\%$ -nak (AF-DX 116; $p = 0,01$), $2 \pm 3\%$ -nak (tropicamid; $p = 0,0086$) illetve $7 \pm 6\%$ -nak adódott (4-DAMP; $p = 0,043$). A PPR-ra gyakorolt CCh hatás ugyancsak megszűnt, a relatív PPR értéke M2-antagonista alkalmazása esetén $1,01 \pm 0,04$ ($p = 0,036$), M4 receptor blokkoló esetén $1,01 \pm 0,03$ ($p = 0,047$) míg M3 gátlószer jelenlétében $1,03 \pm 0,04$ ($p = 0,049$) volt.



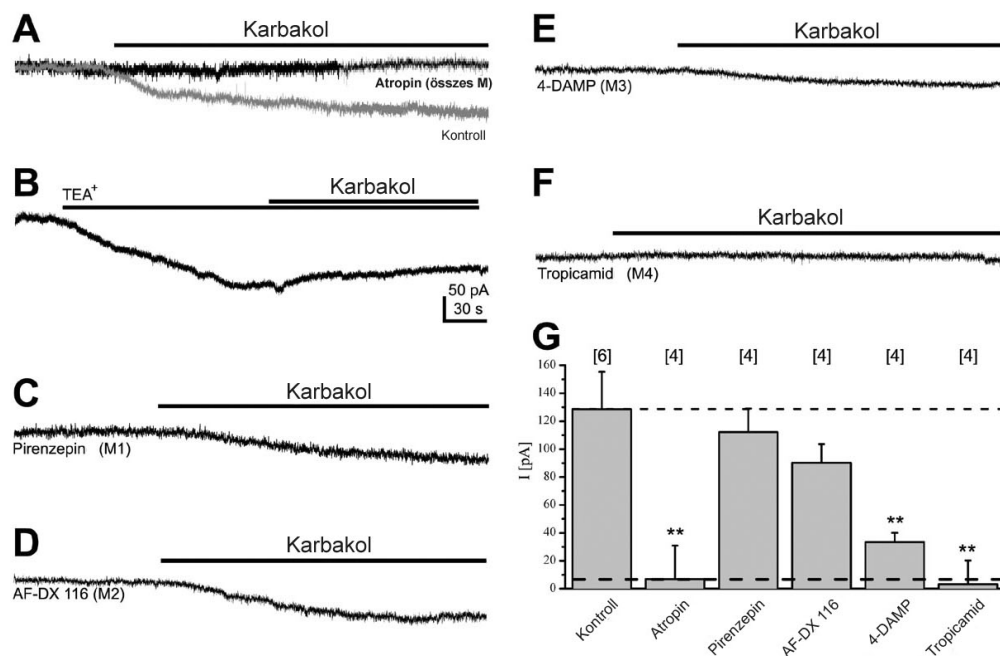
11. ábra: CCh hatása a DCN mély rétegének elektromos ingerlésével kiváltott EPSC-kre mAChR antagonisták jelenlétében

Az ábra felépítése, az alkalmazott jelzések ugyanazok, mint a 10. ábra esetében, azzal a különbséggel, hogy az EPSC sorozatok kiváltása a DCN mély (M) rétegének ingerlésével történt.

Posztzinaptikus CCh hatás az óriássejteken

Az eddig bemutatott eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy a kolinerg moduláció az óriássejteket elérő gátló és serkentő szinaptikus bemeneteket egyaránt befolyásolja. Ezen túlmenően az $1/CV^2$ érték elemzése azt is valószínűsíti, hogy a serkentő szinaptikus aktivitásra gyakorolt CCh hatás elsősorban preszinaptikus mechanizmus(ok)on

keresztül fejlődik ki. Mindezek mellett azonban a kísérletek során azt is megfigyeltük, hogy az óriássejtek tartóárama CCh hatására csökkent, ami az előzőekkel ellentétben arra utalt, hogy a kolinerg ingerlésnek posztszinaptikus következménye is lehet. Ezért a következőkben



12. ábra: CCh hatása óriássejtek tartóáramára

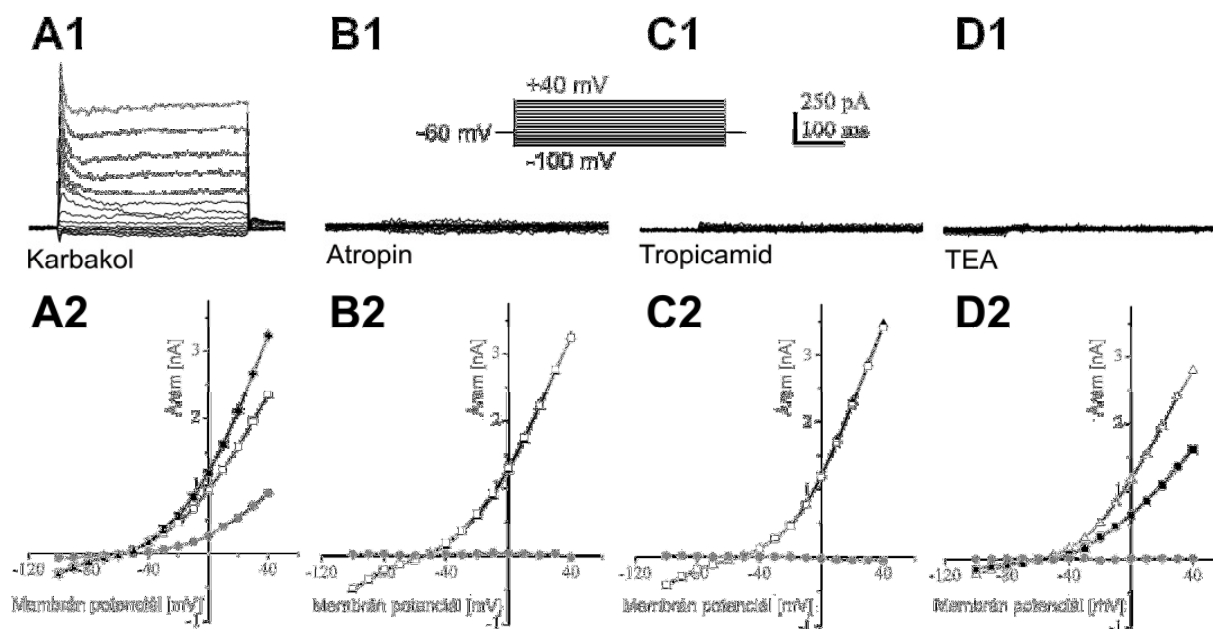
Az A ábrarészen látható kísérlet során egy óriássejt tartóáramát regisztráltuk -40 mV-os tartópotenciálon, a glutamaterg, glicinerg és GABAerg szinaptikus transzmisszió gátlása mellett CCh alkalmazása előtt és közben (szürke vonal). A fekete vonallal jelölt görbét atropin folyamatos jelenlétében regisztráltuk. A B ábrarészen a tartóáram változásait először TEA⁺, majd TEA⁺ és CCh kombinált adásával hoztuk létre. A C-F részekben bemutatott görbék olyan kísérletek során kerültek rögzítésre, amikor a CCh-t valamely mAChR altípus-specifikus gátlószerrel történt előkezelést követően alkalmaztuk (a használt antagonisták neve minden esetben a görbe elején olvasható, zárójelben a specificitást tüntettük fel). A G ábrarész a hasonló módok elvégzett valamennyi kísérlet eredményeit foglalja össze. Az oszlopok a CCh hatására 3 perc alatt kialakuló tartóáramváltozás átlagértékeit adják meg, a szögletes zárójelben látható számok az esetszámot mutatják. **: $p < 0,01$.

olyan méréseket végeztünk, amelyek alkalmasak lehettek a CCh posztszinaptikus hatásainak a felderítésére. Feltételeztük, hogy a posztszinaptikus hatás egy CCh-érzékeny K⁺-áram

módosulását jelenti; és azt, hogy ez a K^+ -áram az M-típusú K^+ -áramnak felel meg. Feltevésünk helyességének igazolására végzett kísérleteinkben az óriássejtek membránpotenciálját -40 mV-on tartottuk; vagyis egy olyan értéken, amelyiken egyetlen feszültségfüggő K^+ -csatorna sem aktív, míg az M-típusú K^+ -csatorna (amennyiben jelen van) kifelé irányuló K^+ -áramot hoz létre. Ezekben a kísérletekben minden szinaptikus aktivitást gátoltunk $10 \mu\text{mol/l}$ bikukullin, $1 \mu\text{mol/l}$ sztrichnin, $10 \mu\text{mol/l}$ NBQX és $50 \mu\text{mol/l}$ D-AP5 együttes alkalmazásával. A 12. ábra A részén jól látható, hogy $50 \mu\text{mol/l}$ CCh a kifelé irányuló tartóáram kifejezett és folyamatos csökkenését okozta (a kezelés 3. percében a tartóáram nagysága 129 ± 27 pA-rel csökkent; $n = 19$). A tartóáramra kifejtett CCh hatás a szer kimosását követően teljesen megszűnt, azaz a hatás teljes mértékben reverzibilisnek bizonyult (tartóáram a CCh alkalmazás előtt -222 ± 92 pA – nak adódott, míg ugyanez az érték a CCh kimosását követően -255 ± 105 pA volt; $p = 0,41$). Az ábrán az is megfigyelhető, hogy $10 \mu\text{mol/l}$ atropin jelenlétében a CCh jóval kisebb hatást gyakorolt a tartóáramra (a csökkenés mindösszesen 7 ± 24 pA volt; $n = 4$) jelezve, hogy ez a hatás valószínűleg mAChR-o(ko)n keresztül valósul meg. További megfigyelés volt, hogy a jólismert, univerzális K^+ -csatornagátló tetraetil-ammónium ion (TEA^+) 10 mmol/l -es koncentrációban ugyanolyan hatást gyakorolt a tartóáramra, mint a CCh. Az áram 146 ± 44 pA-ra csökkent a TEA^+ alkalmazásának 3. percében ($n = 5$); ezt követően CCh és TEA^+ együttes alkalmazása esetén további csökkenést már nem tapasztaltunk (12. ábra B része). Ezek a megfigyelések azt bizonyítják, hogy a -40 mV-os membránpotenciál-értéken tartott óriássejtek tartó áramának CCh hatására kialakuló csökkenése nagy valószínűséggel egy, az ezen a feszültségértéken is jelenlévő K^+ -konduktancia csökkenésének következménye.

Annak meghatározása érdekében, hogy mely mAChR altípusok vehetnek részt a CCh által kiváltott tartóáram csökkenésben, a korábban is használt altípusspecifikus mAChR gátlószereket alkalmaztuk. Ezekben a kísérletekben a szeleteket valamelyik gátlószerrel előinkubáltuk, majd a gátlószer folytatólagos jelenlétében adtuk az $50 \mu\text{mol/l}$ CCh-t. (12. ábra C-F) Az M4-specifikus tropicamid a CCh-indukált tartóáram csökkenését csaknem teljesen kivédte (a tartóáram tropikamid alkalmazása mellett $3,2 \pm 17$ pA $p = 0,004$), ami nagyon hasonló az atropin esetében kapott eredményhez ($6,86 \pm 24$ pA $p = 0,004$). Az M3 blokkoló 4-DAMP kevésbé hatékonyan, de még jelentősen volt képes mérsékelni a CCh-indukált tartóáram csökkenését ($33,4 \pm 6,7$ pA $p = 0,004$). Ezzel szemben a további két vizsgált antagonist (pirenzepin és AF-DX 116) nem módosította szignifikánsan a CCh hatását.

A kolinerg ingerlés tartóáramra kifejtett jelentős hatása tehát felvetette annak lehetőségét, hogy az óriásneuronok rendelkeznek egy CCh-érzékeny K^+ -áramkomponenssel is. A következőkben ezért megvizsgáltuk a kolinerg antagonisták CCh-nak az óriássejtek feszültségfüggő K^+ -áramaira gyakorolt hatását. A feszültség-clamp mérésekben a neuronok



13. ábra: CCh hatása az óriássejtek depolarizáció hatására aktiválódó K^+ -áramaira

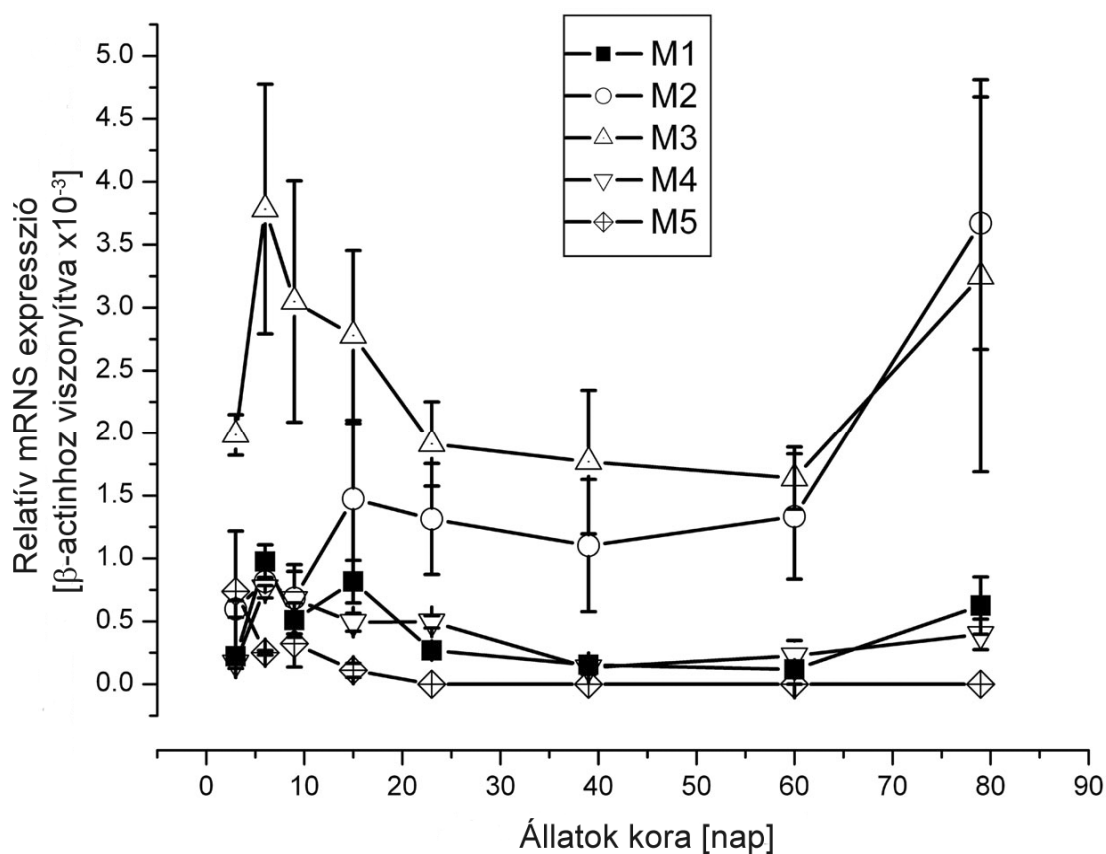
Az ábra A1 része 400 ms időtartamú feszültséglépcsőkkel kiváltott CCh-érzékeny K^+ -áram családot mutat (további részleteket lásd a szövegben). Az A2 ábrarész az ugyanazén mérés során kapott áram-feszültség összefüggéseket mutatja be, kontroll körülmények között (felfelé mutató háromszög), és CCh jelenlétében (CCh-érzékeny komponens, nyitott nyégyszög). A szürke körök jelzik a CCh-érzékeny komponens, amit az előző két összefüggésből számítottunk, végül a lefelé mutató háromszögek jelzik a CCh kimosása utáni állapotot. Az áramok nagyságát valamennyi esetben a feszültséglépcső végén mértük. A B1-B2 és C1-C2 ábrarészekon ábrázolt eredmények az előzőekkel azonos módon végrehajtott mérések eredményei, csak ezekben az esetekben atropin (B1-B2) illetve tropicamid (C1-C2) is jelen volt. A D1-D2 részek a K^+ -csatornagátló TEA^+ jelenlétében elvégzett mérések eredményei, ebben az esetben felfelé irányuló háromszögek jelzik a kontroll értékeket, tele négyzetek adják a TEA^+ jelenlétében kapott értékeket, üres körök adják a TEA^+ és CCh együttes alkalmazása során mért értékeket míg a tele körök az utóbbi két érték különbségeként számított CCh-érzékeny komponens nagyságát tükrözik.

membránpotenciálját -60 mV-on tartottuk, és innen alkalmaztunk 400 ms időtartalmú feszültséglépcsőket a -100 mV és +40 mV közötti feszültségtartományban, 10 mV-os feszültséglépcsőkben. A gyors, feszültségfüggő Na^+ -áramot a külső oldatban alkalmazott 1 $\mu\text{mol/l}$ tetrodotoxinnal gátoltuk, míg a feszültségfüggő Ca^{2+} -áramokat úgy csökkentettük, hogy a külső oldat Ca^{2+} -koncentrációját 0,5 mmol/l-re csökkentettük és 2,5 mmol/l Mg^{2+} -ot adtunk hozzá. A CCh hatását az áramok CCh-érzékeny komponensének kiszámításával jellemeztük. Ez úgy történt, hogy a kontroll körülmények között (CCh adását megelőzően) regisztrált áramtranziensekből rendre kivontuk a CCh jelenlétében nyert tranzienseket. Ilyen különbségi jelalakokat mutat be a 13. ábra A1 része. Az ábra A2 része ugyanazon kísérlet áram-feszültség összefüggéseit mutatja be. Az ábra további részei hasonló kísérleti stratégiával készültek, azzal a különbséggel, hogy a méréseket atropin (B1 és B2), tropicamid (C1 és C2), illetve TEA^+ (D1 és D2) jelenlétében hajtottuk végre. Megállapíthatjuk, hogy a CCh K^+ -áramokra kifejtett hatását atropin és tropicamid teljesen kivédte, ami arra utal, hogy a kolinerg modulációs hatás mAChR-okon, azokon belül is az M4 altípuson keresztül valósul meg. A TEA^+ alkalmazásával végrehajtott mérések ezen túlmenően tovább erősítették azt a korábbi megállapítást, hogy a posztzinaptikus CCh hatás elsősorban K^+ -csatornákra irányul. Látható ugyanis, hogy +40 mV-nál mérve TEA^+ jelenlétében az áram nagysága $2,8 \pm 0,04$ nA-ról $1,60 \pm 0,08$ nA-ra csökkent. Amennyiben a TEA^+ folytatólagos jelenlétében CCh-t is alkalmaztunk, az áram nagysága nem mutatott további csökkenést ($n = 5$). A jelen munka során ugyanakkor nem volt célunk a CCh-érzékeny áram komponens pontosabb azonosítása.

A funkcionális eredményeket alátámasztó Q-PCR adatok

A bemutatott elektrofiziológiai kísérletek során bebizonyosodott, hogy számos mAChR altípus játszik szerepet a DCN kolinerg modulációjában, melyek közül kiemelendő az M3, M2 és M4 altípusok szerepe. Mivel a funkcionális kísérleteket aránylag szűk életkori tartományban, 10-14 napos patkányokon végeztük, nem vehető biztosra, hogy az említett receptorok fiatalabb és/vagy idősebb állatokban is jelen vannak. Annak érdekében, hogy a funkcionális kísérleteink során kapott eredményeinket alátámasszuk, és megvizsgáljuk az mAChR altípusok expressziós szintjének esetleges korfüggő változásait, a Q-PCR technika segítségével különböző korú (3-80 nap) patkányokból izolált CN mintákon meghatároztuk az egyes mAChR altípusok mRNS-ének relatív mennyiségét. A 14. ábra jól mutatja, hogy a 15 napos patkányok esetén az M3 mRNS-ének expressziós szintje volt a legmagasabb, ezt követte az M2-é. Az M1 és M4 mRNS-ének jelenléte ugyancsak kimutatható volt, de jóval

kisebbségben mint az előbbi kettőé, míg az M5 mRNS-ének mennyisége alig érte el a kimutathatóság szintjét. Azt is megfigyelhetjük, hogy a 15 napos és ennél idősebb patkányok esetén az M3 és M2 mRNS mennyisége szignifikánsan nagyobb, mint a többi altípus mRNS-ének mennyisége. Megállapíthatjuk továbbá, hogy az M4 és M1 mRNS szintje 15 napos korban magasabb volt, mint idősebb korban; továbbá azt is, hogy az M5 mRNS szintje 5 naposnál idősebb állatokban már nem volt számottevő.



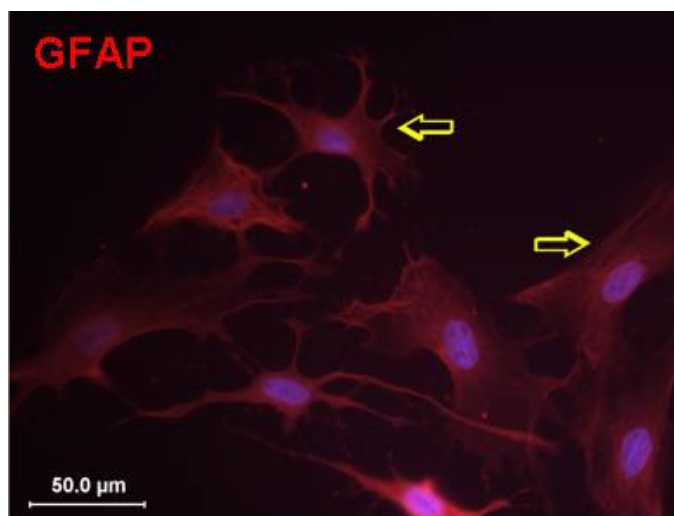
14. ábra: Az egyes mAChR altípusok mRNS expressziója különböző életkorú patkányokban

Az ábrán látható minden mérési pontok három különböző mérés eredményének átlaga. 3 és 23 napos kor között a mintavétel során minden egyes méréshez 3-3 állatot használtunk, míg 40 és 80 napos kor között 2-2-t.

II. Kolinerg ingerléssel kiváltott intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációváltozások CN-ból készített primer astrocytatenyészetekben

CCh hatására kialakuló Ca^{2+} -koncentrációváltozások vizsgálata

Kísérleteinket CN-ból készített primer astrocytatenyészeteken hajtottuk végre. Mint azt a módszerek ismertetésénél hangsúlyoztuk, a tenyésztési körülményeket úgy választottuk meg, hogy azok a gliasejtek növekedéséhez optimálisak legyenek, a neuronok pedig elhaljanak. Ennek ellenére szükségesnek tartottuk megvizsgálni, hogy a tenyészetekben túlélő sejtek valóban astrocyták-e. Eerre a célra a ma is legelfogadottabb astrocyta-specifikus markernek, a GFAP-nek immuncitokémiai kimutatását választottuk. A 15. ábrán látható valamennyi sejt esetében jól megfigyelhető a GFAP-ra jellemző specifikus immunjelölődés, tehát azok astrocytaként azonosíthatók. Valamennyi immuncitokémiai jelöléses kísérletünk alapján a sejtek több mint 90%-a bizonyult GFAP-pozitívnak. Az is látható ugyanakkor a 15. ábrán, hogy az astrocyták morfológiai szempontból nem képeznek homogén populációt. A sejtek egyik csoportja az irodalomból is jól ismert csillag alakot mutatja, kerek sejttesttel és a tér minden irányába szerteágazó nyúlványokkal. A sejtek másik része szétterülő sejttesttel, és néhány rövid nyúlvánnyal jellemezhető. Ez a kettősség a tenyésztés során a passzálásokat követően is megmaradt.



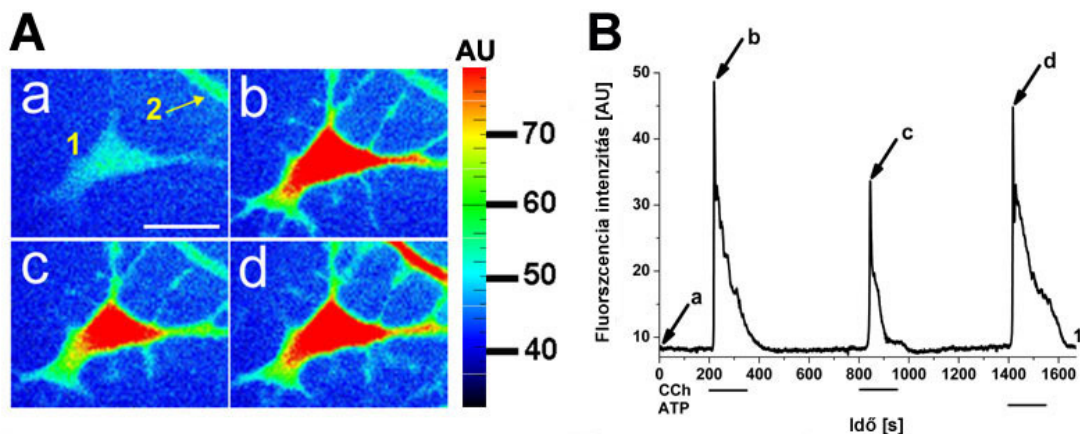
15. ábra: Tenyészetben tartott astrocyták GFAP jelölése

Az ábra tenyészetben fenntartott GFAP-pozitív (piros) sejteket mutat az első passzálást követően (a konfluencia szint kb. 50%). A balra mutató felső nyíl egy csillag alakú astrocytát, míg a jobbra mutató alsó nyíl egy szétterülő formájú sejtet jelöl.

A kolinerg moduláció tanulmányozására astrocytákon végzett kísérletek nagy részében a sejteket 1 mmol/l CCh-lal kezeltük. A megfelelő CCh-koncentráció megállapításához előkísérletekben az agonista különböző dózisait alkalmaztuk. Bár a CCh-ra adott válaszok igen variábilisnak bizonyultak, megállapítottuk, hogy az agonista 50-100 $\mu\text{mol/l}$ -es koncentrációban nagy valószínűséggel kiváltotta a citoplazmatikus Ca^{2+} -szint növekedését, amennyiben a sejt egyáltalán CCh-érzékeny volt (lásd lejjebb). Ezek a dózisok ugyan magasabbak, mint az agyszeleteken végzett kísérletekben használt koncentráció, de astrocytatenyészetben más szerzők is alkalmaztak CCh-t mmol/l-es mennyiségben a biztos válasz kiváltása érdekében (Shao és McCarthy, 1995; Catlin és mtsai., 2000). Jelen munka során azért választottuk az 1 mmol/l-es CCh koncentrációt, hogy a mAChR-okkal rendelkező sejtek közül a lehető legtöbbön váltsunk ki jól detektálható intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációemelkedést.

A 16. ábrán 1 mmol/l CCh adásával kiváltott intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációváltozások figyelhetők meg ($F_{ny} = 8,12 \text{ AU}$; $F_{max1} = 47,66 \text{ AU}$). Megállapítottuk, hogy a CCh által kiváltott Ca^{2+} -koncentráció-növekedés (innenről kezdve tranziens) már a CCh jelenlétében csökkenni kezd, majd a 450 s-os mosás során (ez az időtartam a CCh alkalmazás hosszának háromszorosa) a Ca^{2+} -szint visszaállt a kiindulási értékre ($F_{ny1} = 8,12$; $F_{ny2} = 8,05$). A második CCh alkalmazás során valamivel kisebb nagyságú Ca^{2+} -tranziens kaptunk ($\Delta F/F_1 = 6,17$; $\Delta F/F_2 = 3,98$; csökkenés mértéke 35,5%) (16. ábra B része). Az „image view” módban készült képeken látható, hogy a Ca^{2+} -koncentráció növekedése mind a sejttestben, mind a nyúlványokban létrejött (16. ábra A része).

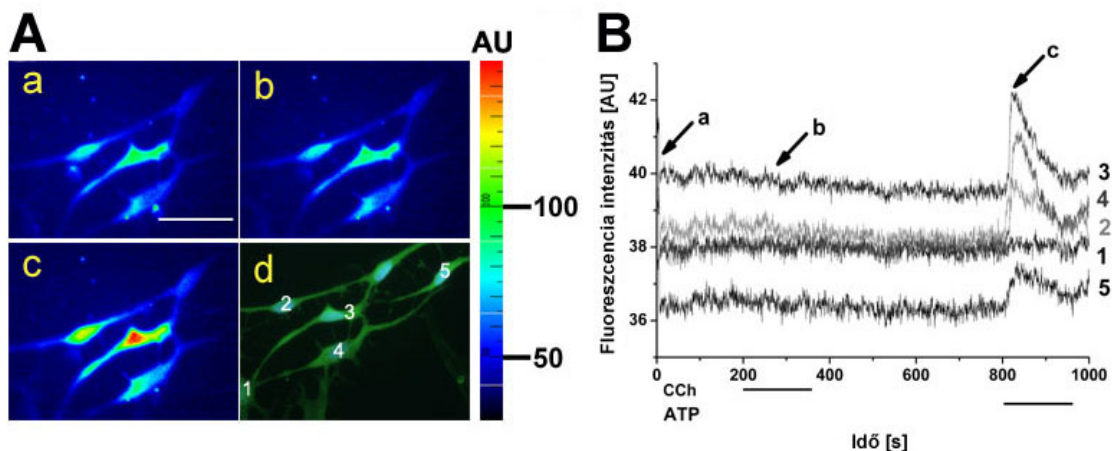
Már a kísérletek elején egyértelművé vált, hogy a vizsgált astrocytáknak csak kis hányada reagál Ca^{2+} -tranziens kialakulásával a kolinerg stimulációra. Annak megállapítására, hogy a CCh-érzékeny sejtek alacsony számának hátterében vajon az astrocyták életképességének csökkenése, vagy valamilyen kedvezőtlen kísérleti körülmény áll-e; esetleg az astrocytáknak valóban csak egy kisebb populációja érzékeny a kolinerg hatásra, ellenőrző kísérletet végeztünk. Több korábbi közlemény is beszámolt arról, hogy az astrocyták nagyon érzékenyek ATP-re, feltehetőleg a felszínükön expresszált purinerg receptorok sokféleségének és nagy számának köszönhetően (James és Butt, 2002; Fumagalli és mtsai., 2003). Ezért kísérleteinkben az ATP-t pozitív kontrollként kívántuk alkalmazni.



16. ábra: CCh-indukált citoplazmatikus Ca^{2+} -tranziensek astrocytákon

Az ábra 1 mmol/l CCh és 0,1 mmol/l ATP alkalmazása során mért fluoreszcenciaintenzitás-változásokat mutat be „image-view” módban (A rész) és „kinetic-view” módban (B ábrarész) (további információ a szövegben). Az A ábrarész a Ca^{2+} -koncentráció térbeli eloszlását mutatja színskódolt önkényes egységekben kifejezve (AU), a kísérlet kezdetén (a) valamint a CCh (b-c) illetve ATP (d) hatására kialakuló tranziensek csúcserősségénél. Az a képen látható lépték 25 μm -t jelöl, és érvényes a három másik képre is. A B ábrarész az 1-gyel jelölt sejt citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentrációváltozásainak időbeli lezajlását mutatja be, a kisbetűk jelölik azon időpontokat, amikor az A részen látható felvételek készültek. A CCh és az ATP alkalmazásának idejét az X tengely alatt látható vízszintes vonalak jelölik.

Mint az a 16. ábrán látható, a két CCh kezelés után alkalmazott 0,1 mmol/l ATP nagyobb Ca^{2+} -tranzienst váltott ki, mint a CCh második alkalmazása ($\Delta F/F_2 = 3,98$ és $\Delta F/F_3 = 5,74$; növekedés mértéke 144%), jelezve a sejt megtartott Ca^{2+} -homeosztázisát. Még meggyőzőbb a 17. ábrán bemutatott kísérlet. Öt sejt közül egyik sem reagált a CCh alkalmazására, míg ATP négy astrocytán kis amplitúdójú, de egyértelmű intracelluláris fluoreszcenciaintenzitás-növekedést idézett elő, igazolva, hogy ezen sejtek életképessége megtartott, és képesek Ca^{2+} -tranzienst létrehozására (17. ábra A és B részei). Mindezek alapján nagy valószínűséggel kijelenthető, hogy az astrocytáknak valóban csak kis része tekinthető CCh-érzékenynek (azaz teljesült, hogy $\Delta F/F_1$ és $\Delta F/F_2$ értéke is nagyobb volt mint nulla). Kísérleteinkben 0,1 mmol/l ATP-t alkalmaztunk és 660 vizsgált sejtből 611 (92%) válaszolt Ca^{2+} -koncentráció növekedéssel. Annak igazolására, hogy a CCh-érzékeny, de ATP-érzékeny sejtek valóban astrocyták-e, néhány esetben a Ca^{2+} -tranziensek regisztrálását követően a sejtek GFAP-jelölését is elvégeztük. A 17. ábra egy ilyen kísérlet alapján készült. A zöld szín jelöli a GFAP-pozitív immunfestődést (17 A/d része) bizonyítva, hogy a csak ATP-re reagáló sejtek is astrocyták.



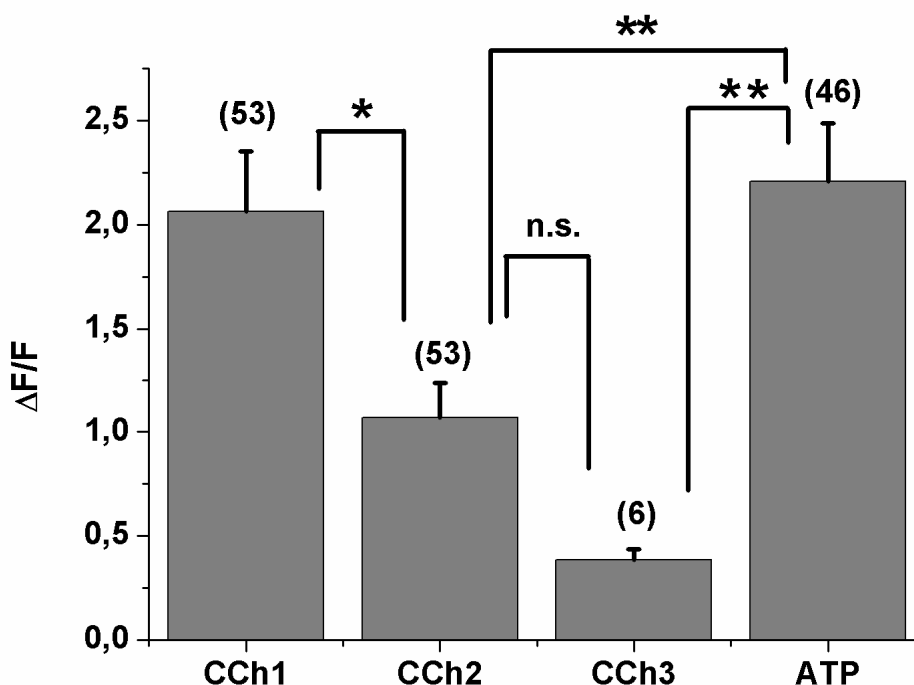
17. ábra: ATP hatása CCh-érzéketlen astrocytákon

Az ábrán bemutatott kísérletben CCh-t és ATP-t alkalmaztunk öt különböző astrocytán. Az A részen látható képek közül három (a, b, c) a kísérlet B részen azonosítható időpontokban készült. A d képen a zöld szín ugyanazon sejtek GFAP-jelölését mutatja. Az a képen látható lépték 50 μm -t jelöl, és mind a négy képre érvényes. A CCh és ATP alkalmazás idejét a B részen alul látható vízszintes vonalak jelzik.

A CCh-érzékeny astrocyták alacsony előfordulásának magyarázatát keresve megvizsgáltuk, hogy kimutatható-e korreláció a CCh-ra reagáló sejtek aránya és a tenyészetek konfluenciájának, passzázs-száma vagy a kísérleti állatok életkora között, de erre vonatkozólag nem találtunk semmilyen összefüggést. Megvizsgáltuk azt is, hogy az eltérő morfológiával rendelkező sejtek között tapasztalható-e különbség a kolinerg ingerlésre adott válaszuk gyakoriságában. A statisztikai analízisben megvizsgált 198 sejt közül 161 volt csillag alakú, 37 pedig szétterülő, az előbbiekből 38,8%, míg az utóbbiakból 27,6% reagált Ca^{2+} -tranzienssel CCh adására (a különbség nem volt szignifikáns). A fenti adatok alapján a továbbiakban nem különböztettük meg a kétféle sejtípust, és megállapítottuk, hogy a kísérleteinkben elemzett 611 astrocyta közül 222, azaz a sejtek 36,3%-a reagált citoplazmatikus Ca^{2+} -tranzienssel kolinerg ingerlésre.

Megfigyeltük, hogy a második CCh alkalmazás lényegesen kisebb Ca^{2+} -tranzienszt hozott létre, mint az első (16. ábra C része). Tekintettel arra, hogy későbbi kísérletekben a CCh hatás farmakológiai befolyásolását terveztük, a kapott hatások értelmezéséhez meg kellett vizsgálnunk, hogy mennyire állandóak az ismételt CCh kezeléssel kiváltott Ca^{2+} -koncentrációváltozások. Ezen kísérletek eredményeit foglalja össze a 18. ábra. Látható, hogy a CCh adással kiváltott tranziensek csúcserőssége az első tranziens nagyságának 51,7%-a, míg a

harmadik CCh kezeléssel kapott jel még további (13,2%-os) csökkenést mutatott. Felmerült a kérdés, hogy vajon ez a csökkenés az astrocyták Ca^{2+} -háztartásának esetleges károsodását vagy fáradását tükrözi-e, esetleg valamilyen más mechanizmus, például tachyphylaxis állhat annak hátterében. Ennek eldöntésére újfent az ATP-t alkalmaztuk. A 18. ábra egyértelműen bizonyítja, hogy a CCh alkalmazásokat követő ATP kezelés olyan Ca^{2+} -tranzienseket eredményez, amelyek amplitúdója gyakorlatilag megegyezik az első CCh alkalmazáskor kapott tranziensekével.



18. ábra: CCh ismételt alkalmazásával kiváltott Ca^{2+} -tranziensek astrocytákon

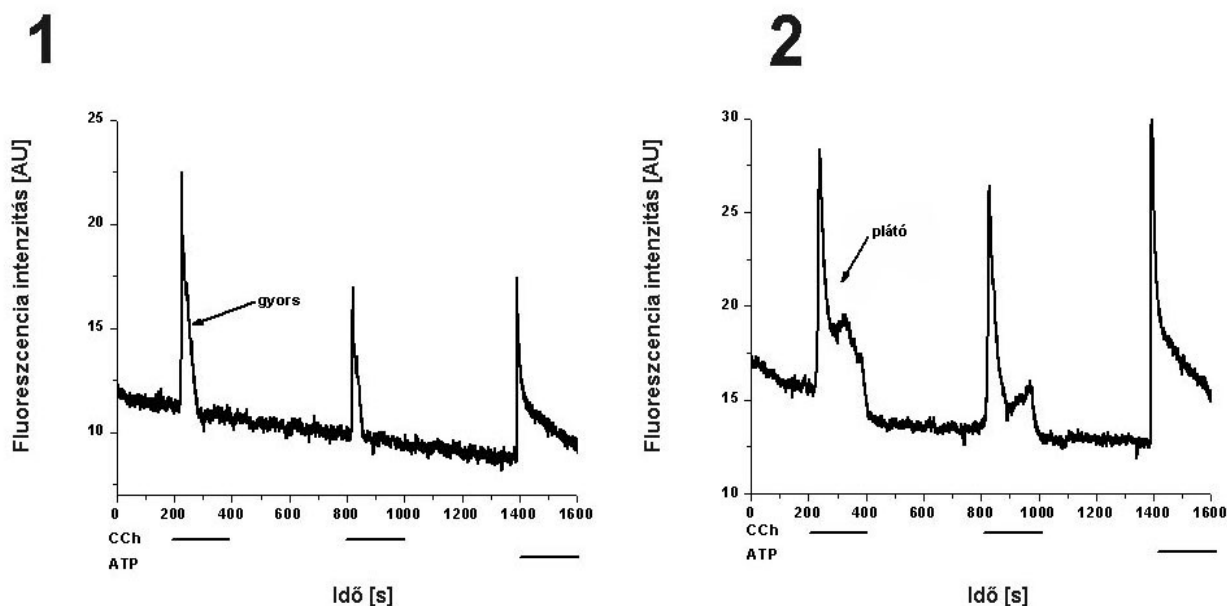
Az ábra az egymást követő CCh alkalmazások (CCh1, CCh2, CCh3) hatására valamint ATP jelenlétében kialakult fluoreszcenciaintenzitás-változások (Ca^{2+} -tranziensek) nagyságának átlagértékeit mutatja be. A vizsgált sejtek számát az oszlopok fölött zárójelben tüntettük fel.

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ns = nem szignifikáns.

A CCh-lal kiváltott Ca^{2+} -tranziensek időbeli lezajlásának vizsgálata

Az astrocytákon CCh-lal létrehozott Ca^{2+} -tranziensek időbeli lezajlása meglehetősen heterogénnek bizonyult. Ezt a sokféleséget mutatja be a 19. ábra. Az egyik esetben gyors lefutású Ca^{2+} -tranzienst tapasztaltunk (19. ábra 1 része). Ebben az esetben a megemelkedett

intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció már a CCh alkalmazás közben visszaállt a nyugalmi szintre (a továbbiakban „gyors” tranziens). Más esetben a Ca^{2+} -tranziensen a gyors csúcsot követően másodlagos Ca^{2+} -koncentrációnövekedés volt megfigyelhető, ami plátó kialakulását eredményezte (innentől „plátó-szerű” tranziens) (19. ábra 2 része). Ez a plátó a CCh alkalmazása alatt végig fennállt, és a Ca^{2+} -koncentráció csak a kimosás fázisában tért vissza a nyugalmi szintre. A plátó szakasz lezajlása is mutatott változékonyságot, a másodlagos Ca^{2+} -koncentrációemelkedés nem mindig volt kifejezett, olykor csak a Ca^{2+} -koncentráció stagnálása vagy egy, a gyors csökkenést követő lényegesen lassúbb csökkenés volt megfigyelhető. A tranziensek ezen két alaptípusa mellett előfordultak olyan esetek is, amikor a gyors kezdeti fázis maradt el, és egy lassan kialakuló és megszűnő tranziens volt jelen illetve oszcillációszerű Ca^{2+} -koncentrációváltozásokat is megfigyeltünk.



19. ábra: CCh hatására kialakuló, eltérő időbeli lezajlású Ca^{2+} -tranziensek astrocytákon

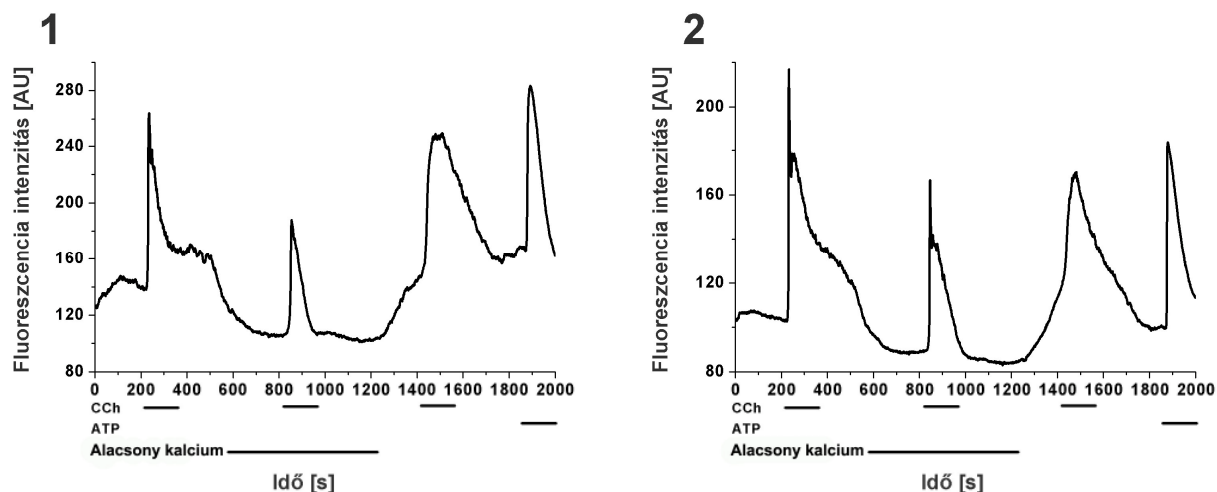
Az ábra 1. részén tranziens jellegű („gyors”) Ca^{2+} -tranziensek láthatók, míg a 2. ábrarész lassúbb lezajlású („plátó-szerű”) jeleket mutat be. A két CCh kezelést valamint a kísérlet végén történt ATP adást az ábrarészek alján látható vízszintes vonalak jelzik.

A CCh által kiváltott különféle Ca^{2+} -tranziensek előfordulási gyakoriságának vizsgálata során arra az eredményre jutottunk, hogy a 222 CCh-érzékeny sejtből 100 (45%) mutatott gyors típusú választ, 112 astrocyta (50,5%) pedig plátó típusú választ. A

fennmaradó 10 sejten (4,5%) lassú tranzienszt vagy Ca^{2+} -oszcillációt tapasztaltunk. Ezen utóbbi jelalakok előfordulása azonban annyira ritka volt, hogy jelen munka keretein belül eltekintettünk szisztematikus vizsgálatuktól.

A Ca^{2+} -tranziensek heterogén időbeli lefutása arra utalt, hogy a CCh-indukált citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentrációnövekedés kialakításában több mechanizmus is szerepet játszhat. Kézenfekvő kérdésként merült fel, hogy az extracelluláris Ca^{2+} részt vesz-e a CCh-függő Ca^{2+} -jelek létrehozásában. A kérdés megválaszolása céljából csökkentett Ca^{2+} -tartalmú külső oldatban is megvizsgáltuk a CCh-indukált Ca^{2+} -tranzienseket. Az elvégzett kísérletek közül kettőt mutat be a 20. ábra. Először normál Ca^{2+} -tartalmú (2 mmol/l) aCSF oldatban váltottunk ki Ca^{2+} -tranzienseket CCh adsásával, amelyek plátó-szerűek voltak. Ezt követően az inkubáló oldatot alacsony (0,2 mmol/l) Ca^{2+} -tartalmúra cseréltük, és megismételtük a CCh alkalmazását. Látható, hogy a nyugalmi citoplazmatikus Ca^{2+} -szint a Ca^{2+} -elvonás hatására csökken, a CCh-lal kiváltott tranziens pedig csak a gyors fázist produkálta, a plátó komponens elmaradt. A normál Ca^{2+} -tartalmú oldatra történő visszatérés után megfigyelhető volt a nyugalmi Ca^{2+} -szint emelkedése; továbbá, hogy bár a kezdeti, plátó-szerű lefutás nem állt vissza, a CCh hatására kialakuló Ca^{2+} -tranziens jelentősen kiszélesedett, jelezve egy lassú komponens megjelenését.

Csökkentett Ca^{2+} -tartalmú külső oldatban összesen 14 astrocytán végeztünk mérést. A 0,2 mmol/l Ca^{2+} -tartalmú oldat alkalmazásakor a nyugalmi Ca^{2+} -szintnek megfelelő fluoreszcenciaintenzitás a kiindulási érték $82,4 \pm 3,8\%$ -ára csökkent ($p < 0,01$), amely 2 mmol/l Ca^{2+} -tartalmú aCSF oldatra történő visszaállást követően sem változott (a kiindulási érték $90,9 \pm 7,7\%$ -a, $p > 0,05$). A vizsgált sejtek közül ötben gyors Ca^{2+} -tranzienszt hozott létre a CCh, ezekben az esetekben a külső Ca^{2+} elvonása sem a tranziensek nagyságában, sem időtartamukban nem okozott szignifikáns változást. A külső Ca^{2+} -koncentráció csökkentése a kilenc, plátó-szerű tranzienssel válaszoló sejt esetében sem módosította szignifikánsan a tranziensek amplitúdóját, ugyanakkor jelentősen lecsökkentette azok időtartamát. A tranziensek időtartamát a csúcserték 10%-ának megfelelő szintnél mértük, amely paramétert azért vezettük be, mert alkalmasnak tűnt a plátó-fázis kvantitatív jellemzésére annak meglehetősen heterogén megjelenése ellenére is. A kilenc astrocytán kapott eredmények szerint a Ca^{2+} -elvonás az eredeti érték $56,4 \pm 5,8\%$ -ára csökkentette a tranziensek időtartamát ($p < 0,02$), a normál Ca^{2+} -tartalmú oldatra történő visszatérést követően pedig ez az időtartam a kezdeti érték $76,4 \pm 8,7\%$ -ára nőtt (a megmaradt eltérés statisztikailag nem volt szignifikáns).

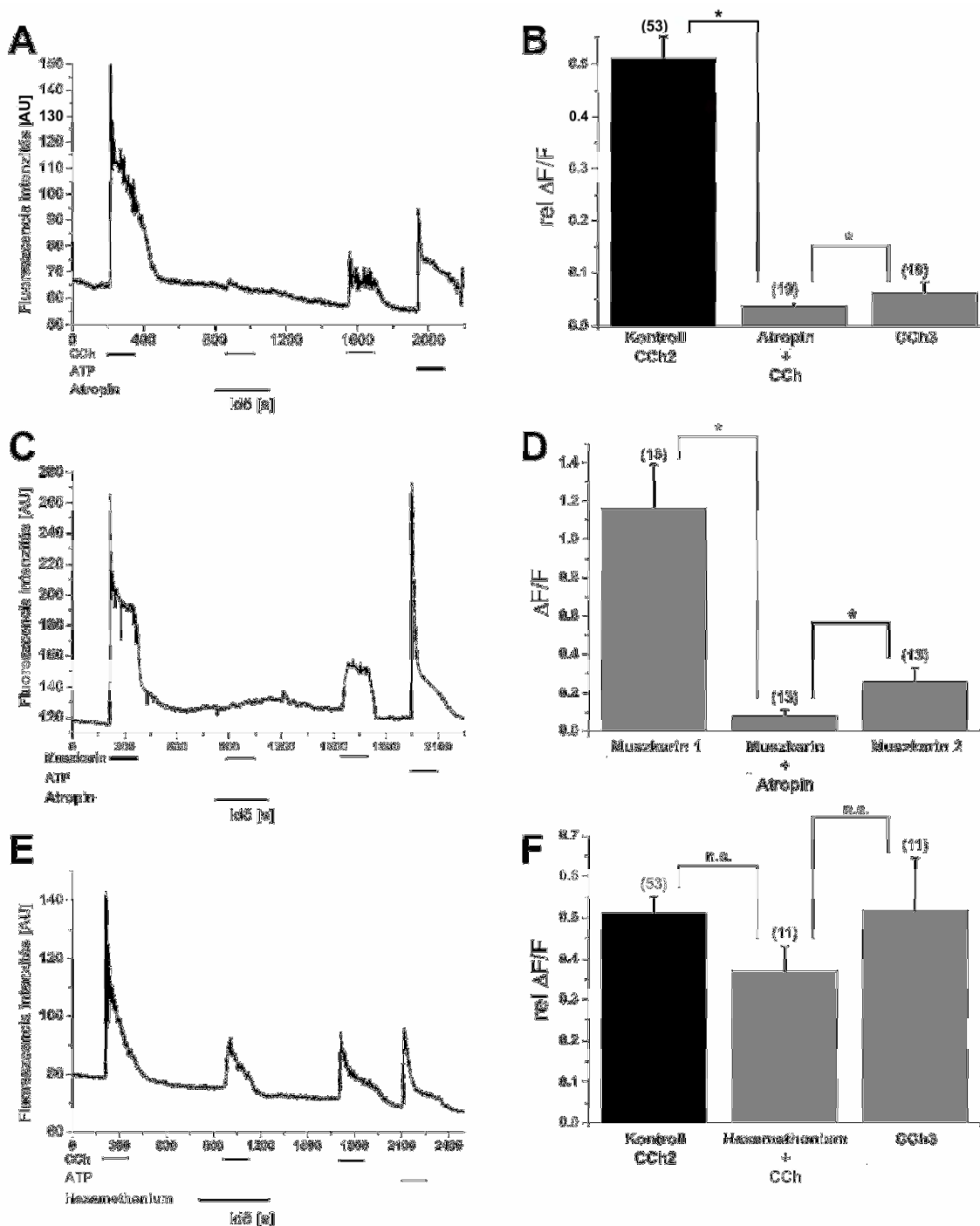


20. ábra: A külső Ca^{2+} -koncentráció csökkentésének hatása CCh-lal kiváltott Ca^{2+} -tranziensekre

Az ábrán két különböző astrocyta (1. és 2. rész) 1 mmol/l CCh hatására kialakuló Ca^{2+} -tranziensei láthatók kontroll oldatban (2 mmol/l Ca^{2+}), alacsony Ca^{2+} -tartalmú (0,2 mmol/l) extracelluláris közegben, majd ismét kontroll oldatban. A kísérletek végén 0,1 mmol/l ATP adására is sor került. Az egyes szerek alkalmazásának és a külső Ca^{2+} -elvonásának az időtartamát az ábra alján látható vízszintes vonalak jelzik.

Az astrocytákra gyakorolt CCh hatás mechanizmusa

Számos kísérletet végeztünk annak meghatározására, hogy milyen támadásponton keresztül váltja ki a külsőleg alkalmazott CCh az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növekedését. A 21. ábra foglalja össze ezen kísérletek eredményeinek egy részét. Látható, hogy 10 $\mu\text{mol/l}$ (Catlin és mtsai., 2000) atropinnal történő előkezelés gyakorlatilag teljesen meggátolja az 1 mmol/l CCh által kontroll körülmények között kiváltott Ca^{2+} -tranziens kialakulását (21. ábra A része). Az atropin gátló hatásának jellemzésekor figyelembe kellett vennünk azt a tényt, hogy a CCh ismételt alkalmazásakor eleve kisebb Ca^{2+} -tranziens kialakulása várható (lásd 18. ábra). A problémát a relatív $\Delta F/F$ értékek alkalmazásával oldottuk meg. Ennek során kiszámoltuk a második tranziensek első tranziensre normált relatív nagyságát mind a 18. ábrán bemutatott kontroll esetben, mind a jelen kísérletekben (atropin jelenlétében). Atropin jelenlétében a CCh által kiváltott második Ca^{2+} -tranziens



21. ábra: A CCh hatásért felelős kolinerg receptorok típusának meghatározása

Az ábra A és B részén 10 $\mu\text{mol/l}$ atropinnak az 1 mmol/l CCh-lal kiváltott hatása látható egy jellemző kísérletben (A), illetve az összes hasonló mérés statisztikai feldolgozásaként (B). Az A részen az ábra alján látható vonalak jelölik a szerek alkalmazásának időtartamát. A B ábrarészen CCh-lal kiváltott Ca^{2+} -tranziensek átlagos amplitúdóit tüntettük fel, relatív

fluoreszcenciaintenzitás-változások formájában (a részletes magyarázatot lásd a szövegben). A C és D részen 10 $\mu\text{mol/l}$ muszkarin adásával kiváltott Ca^{2+} -tranziensek, és azok atropinnal való gátlhatósága figyelhető meg. Az ábrarészek szerkezete ugyanaz, mint az A és B részeké, azzal a különbséggel, hogy itt a fluoreszcenciaintenzitás-változásokat tüntettük fel. Az E és F ábrarészek 0,1 mmol/l hexamethoniumnak az 1 mmol/l CCh alkalmazásával kiváltott Ca^{2+} -jelekre gyakorolt hatása figyelhető meg, a két rész szerkezete ugyanaz, mint az A és B részeké. Az oszlopdiagramokon az oszlopok felett zárójelben az esetszámot tüntettük fel. *: $p < 0,05$; ns: nem szignifikáns.

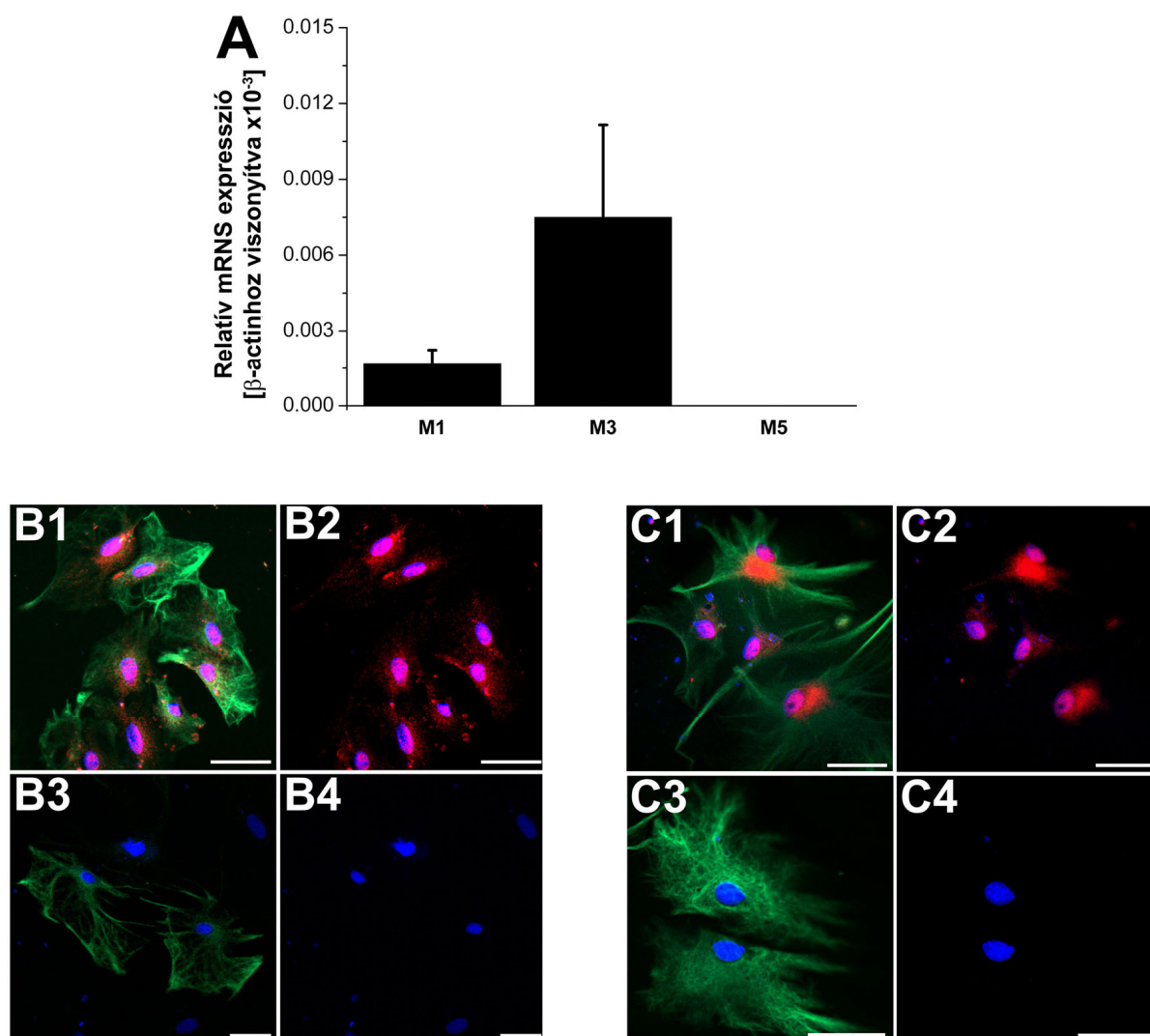
szignifikánsan kisebb, mint a kontroll körülmények között mért második tranziens ($\Delta F/F_{\text{relAtropin}} = 0,04 \pm 0,01$; $\Delta F/F_{\text{relCCh2}} = 0,51 \pm 0,04$; $p < 0,05$), (21. ábra B része). Megfigyeltük továbbá, hogy az atropin kimosása után a harmadik tranziens nagyobb, mint az atropin jelenlétében kapott második ($\Delta F/F_{\text{relAtropin}} = 0,04 \pm 0,01$; $\Delta F/F_{\text{relCCh3}} = 0,06 \pm 0,02$; $p < 0,05$), (21. ábra B része).

Az atropin gátló hatása arra utalt, hogy a CCh hatásért mAChR-ok tehetők felelőssé. Ezt a feltevést támasztották alá a muszkarinnal kapott eredmények is, amennyiben 10 $\mu\text{mol/l}$ -os koncentrációban (Hösli és mtsai., 2001) plátó-típusú Ca^{2+} -tranzienst hozott létre, atropinnal gátlható módon ($\Delta F/F_{\text{Muszkarin1}} = 1,16 \pm 0,22$; $\Delta F/F_{\text{Atropin}} = 0,08 \pm 0,03$; $p < 0,05$), (21. ábra C és D részei). Az atropin hatása ebben az esetben is reverzibilisnek bizonyult ($\Delta F/F_{\text{Atropin}} = 0,08 \pm 0,03$; $\Delta F/F_{\text{Muszkarin2}} = 0,26 \pm 0,07$; $p < 0,05$), (21. ábra C és D részei). A kísérlet végén alkalmazott ATP segítségével a sejtek állapotának ellenőrzésére is sor került (21. ábra C része).

Egyes irodalmi adatok szerint a CCh 1 mmol/l-es koncentrációban már a nikotinerg acetilkolin-receptorokat is stimulálhatja (Militante és mtsai, 2008). Bármennyire egyértelműen mutatattak is adataink a mAChR-ok szerepére, szükségesnek láttuk megvizsgálni egy nikotinerg-receptor-gátlónak az 1 mmol/l CCh-lal kiváltott Ca^{2+} -tranziensekre gyakorolt hatását (21. ábra E és F részei). Eredményeink jól bizonyítják, hogy a hexamethonium még 0,1 mmol/l-es koncentrációban (Buisson és Bertrand, 1998) sem csökkentette szignifikánsan a CCh által kiváltott Ca^{2+} -koncentráció emelkedést ($\Delta F/F_{\text{relCCh2}} = 0,51 \pm 0,04$; $\Delta F/F_{\text{relHexamethonium}} = 0,37 \pm 0,06$; $p > 0,05$), erősítve a mAChR-ok érintettségére vonatkozó elképzelésünk helyességét (21. ábra F része).

Az elképzelés további alátámasztása céljából kísérleteket végeztünk a mAChR-ok kimutatására mRNS és fehérje szintjén. A mAChR altípusok közül háromhoz (M1, M3 és M5) kapcsolódnak intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növekedést kiváltó jelátviteli útvonalak (összefoglaló áttekintés végett lásd, van Koppen és Kaiser, 2003), ezért először ezen altípusok

mRNS szintű jelenlétét tanulmányoztuk a Q-PCR technika segítségével. Az M1-et kisebb, az M3-at pedig nagyobb mennyiségben sikerült kimutatni (22. ábra A része), addig az M5

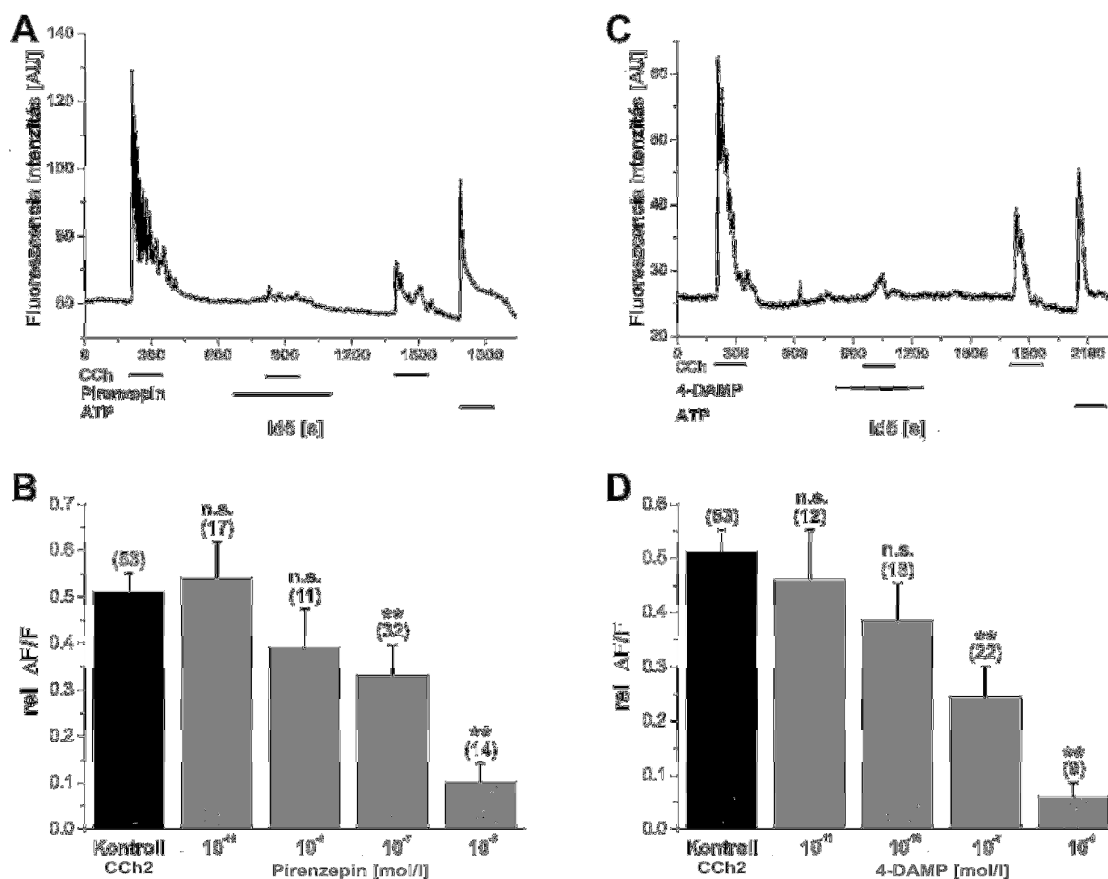


22. ábra: mChR-ok kimutatása mRNS- és fehérje szinten astrocytákon

Az ábra A része az M1, M3 és M5 relatív mRNS mennyiségét ábrázolja. Mindegyik oszlop három mintán végzett mérés eredményének átlaga, az egyes mintákat 5-7 darab (7-9 napos) patkányból izoláltuk. A B1-B4 ábrarészekon látható konfokális mikroszkópos felvételek az M1-specifikus immunjelölések eredményeit mutatják. A B1 képen a piros szín jelöli az M1-specifikus, a zöld a GFAP-specifikus jelölődést, a kék pedig a DAPI-val festett sejtmagokat. Az értékelés megkönnyítése céljából a B2 rész csak az M1-pozitivitást és a sejtmagjelölést mutatja. A B3 és a B4 ábrarészek a B1 és B2 részeknek megfelelő prediszorbciós kontroll kísérleteket mutatják be. A C1-C4 részek az M3-specifikus immunjelöléses kísérletek eredményeit ábrázolják. Az egyes részek szerkezete megegyezik B jelzésű képek felépítésével, azzal az eltéréssel, hogy a piros szín itt M3-specifikus jelölődést jelent. A lépték minden esetben 50 μ m-nek felel meg.

teljesen hiányzott az astrocytákból. Ezen adatokra alapozva immuncitokémiai kísérleteinkben vizsgáltuk az M1 és M3 receptorfehérjék expresszióját (22. ábra B és C részei). Az összesen megvizsgált 226 sejt közül 33 (14,6%) bizonyult M1-pozitívnak illetve az összesen jelölt 480 sejt közül 128 (26,6%) mutatott M3-pozitivitást. Ezek az eredmények tehát alátámasztják a feltevést, hogy az M1 és M3 altípusok jelen vannak a CN-ből izolált astrocyták sejtmembránjában.

Az M1 és M3 altípusok jelenlétének igazolása után azok funkcionális jelentőségét is vizsgálni kívántuk a CCh-indukált Ca^{2+} -tranziensek létrehozásában. Erre a célra altípus-specifikus gátlószereket (pirenzepin, 4-DAMP) alkalmaztunk. Amint azt a 23. ábrán bemutatott tipikus kísérletek (A és C rész) valamint a statisztikai összefoglalók (B és D rész) szemléltetik mindkét vizsgált receptor-antagonista dózisfüggő módon gátolta a CCh hatását. Az M1-specifikus pirenzepin 1 $\mu\text{mol/l}$ -es koncentrációban gyakorlatilag teljesen kivédte a CCh hatását ($\Delta F/F_{\text{CCh1}} = 3,00$; $\Delta F/F_{\text{Pirenzepin}} = 0,06$) (23. ábra A része), míg az M3-specifikus 4-DAMP 100 nmol/l -es koncentrációban fejtette ki ugyanezt a hatást ($\Delta F/F_{\text{CCh1}} = 1,75$; $\Delta F/F_{\text{4-DAMP}} = 0,23$) (23. ábra C része). Mindkét gátlószer hatása reverzibilisnek bizonyult, és a kísérletek végén adott ATP igazolta a sejtek megőrzött életképességét. A pirenzepin 0,1 nmol/l -es koncentrációban még hatástalan ($\Delta F/F_{\text{relPirenzepin}} = 0,54 \pm 0,07$; $\Delta F/F_{\text{relCCh2}} = 0,51 \pm 0,04$; $p > 0,05$) a koncentráció emelésével egyre nagyobb mértékben gátolta a CCh-lal kiváltott Ca^{2+} -tranzienseket, de hatása csak 100 nmol/l -től vált statisztikailag szignifikánssá ($\Delta F/F_{\text{relPirenzepin}} = 0,33 \pm 0,06$; $\Delta F/F_{\text{relCCh2}} = 0,51 \pm 0,04$; $p < 0,01$), (23. ábra B része). A 4-DAMP-re vonatkozó adatok egyértelműen bizonyítják, hogy ez a gátlószer már 0,1 nmol/l koncentrációban is mutatott hatást ($\Delta F/F_{\text{rel4-DAMP}} = 0,38 \pm 0,07$; $\Delta F/F_{\text{relCCh2}} = 0,51 \pm 0,04$; $p > 0,05$), ennek mértéke a koncentráció emelésével nőtt, de csak 100 nmol/l -nél vált statisztikailag szignifikánssá ($\Delta F/F_{\text{rel4-DAMP}} = 0,25 \pm 0,06$; $\Delta F/F_{\text{relCCh2}} = 0,51 \pm 0,04$; $p < 0,01$), (23. ábra D része). Megjegyzendő, hogy a gátló hatást ebben az esetben is a relatív fluoreszcenciaintenzitás-változások számolásával és a kontroll második tranziensekhez való hasonlításával számszerűsítettük.



23. ábra: M1- és M3-specifikus antagonisták hatása a CCh által kiváltott Ca²⁺-tranziensekre

Az ábra A és B részei az M1-specifikus gátlószer, a pirenzepin hatását mutatják. Az A ábrarész egy tipikus kísérlet eredményét szemlélteti. A mérés során kontroll oldatban, 1 μmol/l pirenzepin jelenlétében, és annak kimosását követően alkalmaztunk 1 mmol/l CCh-t, végül 0,1 mmol/l ATP-t adtunk (a kezelések időtartama az X-tengely alatt vízszintes vonalakkal jelölve). A B ábrarész a pirenzepinnel végzett mérések eredményének összefoglalását tartalmazza, az oszlopok a második CCh alkalmazás alatti Ca²⁺-tranziensek relatív nagyságát jelölik kontroll esetben (fekete oszlop), illetve különböző pirenzepinkoncentrációk jelenlétében (szürke oszlopok, a pirenzepin koncentrációt az oszlopok alatt tüntettük fel). A C és D ábrarészek szerkezete megegyezik az A és B részekével, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben a 4-DAMP hatásának bemutatása történik (a C részen alkalmazott 4-DAMP koncentráció 100 nmol/l). Az oszlopok felett zárójelben az esetszámokat tüntettük fel. **: p < 0,01; ns: nem szignifikáns.

Megbeszélés

Kolinerg neuromoduláció patkánya DCN óriás neuronjain

Kísérleteink során rámutattunk arra, hogy a kolinerg bemenetek elektromos ingerlése depolarizálja az óriássejteket, és növeli azok aktivitását; továbbá egyértelműen bizonyítottuk, hogy a CN-ban megfigyelt kolinerg moduláció hatása mind pre-, mind posztzinaptikus mechanizmusok révén érvényesül és M2, M3 valamint M4 receptorokon keresztül valósul meg.

A CN-ban zajló kolinerg moduláció

A CN-ban végződő kolinerg rostok jelenléte már régóta ismert. Az első tanulmányok az acetilkolin-észteráz jelenlétét bizonyították a magban (Godfrey és mtsai., 1977; Godfrey és Matschinsky, 1981), majd később a kolin-acetil-transzferázt és a vezikuláris kolin-transzportert is kimutatták (Yao és Godfrey, 1999). Miután a DCN-ban igazolták muszkarinerg acetilkolin-receptorok jelenlétét, indokolt volt feltételezni, hogy azok jelentős szerepet töltenek be a magban zajló kolinerg folyamatokban (Happe és Morley, 1998). Az acetilkolin-receptorok denzitása eltérő a DCN különböző rétegeiben: legnagyobb a szemcsesejtek rétegében, kisebb a piramis-neuronok rétegében, és a legkisebb a mély rétegben (Jin és Godfrey, 2006). A szemcsesejtes rétegben nagy mennyiségben mutatták ki az M2 receptorokat, mind pre-, mind posztzinaptikus elhelyezkedésben (Yao és mtsai., 1996). Az M2 receptorok mellett az M4 és az M3 receptorok lehetséges funkcionális jelentőségét is leírták (Chen és mtsai., 1994a; 1994b; 1995; 1999).

Eredményeink nemcsak megerősítik a fent bemutatott adatokat, hanem rámutatnak arra is, hogy a muszkarinerg receptor altípusok funkciói között különbségek vannak. Fontos megemlíteni, hogy jóllehet nikotinerg kolinerg receptorok is kimutathatóak a CN-ban (Happe és Morley, 1998; Yao és Godfrey, 1999), ezek számottevő részvételét az óriássejtek modulálásában kizárhattuk, mivel a jelen munka során az általános muszkarinerg gátlószer, az atropin, minden megfigyelt kolinerg hatást teljesen kivédett.

A különböző muszkarinerg receptor altípusok szerepének vizsgálatára altípus-specifikus gátlószereket alkalmaztunk. Noha a Q-PCR technikával végzett kísérletek utaltak M5-specifikus mRNS jelenlétére is, az M5 receptorokra specifikus gátlószer(ek) hiánya miatt (Grillner és mtsai., 2000; Basile és mtsai., 2002) csak az M1-M4 altípusok jelentőségét

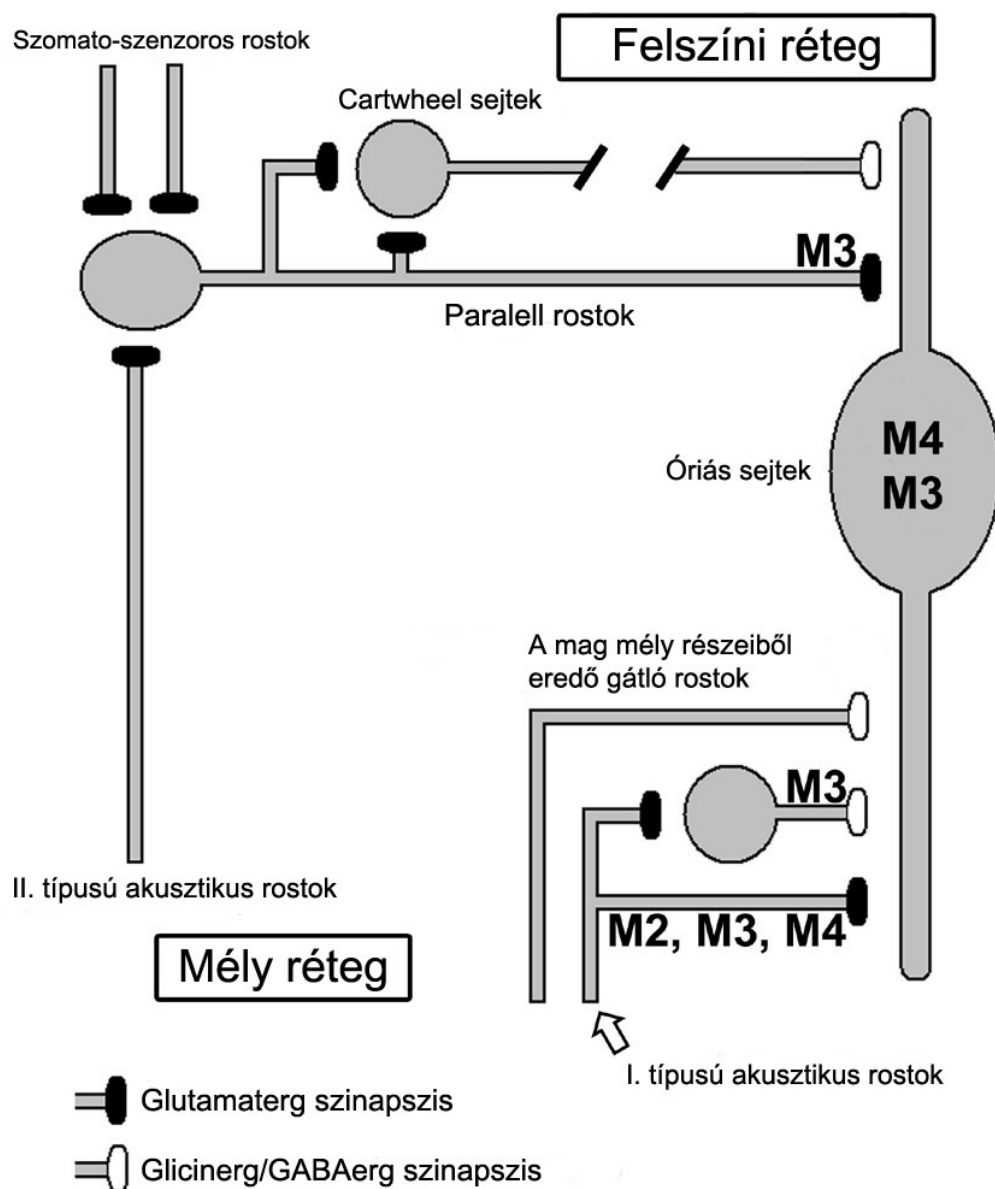
vizsgálhattuk, farmakológiai és funkcionális módszerek segítségével. Funkcionális méréseink alapján megállapíthattuk, hogy a CN mély rétege felől érkező gátló, és a felszíni réteg felől érkező serkentő neurotranszmisszió befolyásolásában elsősorban az M3 receptorok játszanak fontos szerepet, ugyanakkor a mély réteg felőli serkentő bemenetek befolyásolásában az M2, M3 és M4 receptorok egyaránt fontos szereppel bírnak.

A kolinerg moduláció szinaptikus transzmisszióra kifejtett, preszinaptikus támadáspontú hatása mellett kimutattuk, hogy CCh alkalmazása az óriássejtek depolarizációját is létrehozza. Ez a hatás posztzinaptikus, az óriássejteken jelenlévő K^+ -csatornák gátlása révén valósul meg; elsősorban az M4, kisebb mértékben az M3 receptorokon keresztül. A kísérletek során a CCh-érzékeny K^+ -áram két összetevőjét azonosítottuk: egy *gyors, átmeneti komponenst*, melyet az A-típusú áramra gyakorolt gátló muszkarinerg hatás okozhatott, és egy *lassú komponenst*, mely a KCNQ csatornák zárása révén jöhetett létre (Kharkovets és mtsai., 2000; Ellis és mtsai., 2007). Kinetikai sajátosságai és muszkarinerg érzékenysége alapján a lassú komponenst M-típusú áramként azonosítottuk (Brown és Adams, 1980; Bernardo és Prince, 1982). Függetlenül az említett csatornák pontos azonosításától, a K^+ -konduktancia csökkenése a neuronok ingerlékenységének és tüzelési aktivitásának növekedéséhez vezethet (Nowak és Macdonald, 1983).

A CCh hatás célpontjait képező neuronhálózatok: a kolinerg moduláció funkcionális jelentősége

A DCN óriássejteken mind az akusztikus rostok, mind a szemcsesejtek felől érkező parallel rostok képeznek serkentő, glutamaterg bemeneteket (Davis és mtsai., 1996). A parallel és akusztikus rostok ugyanakkor gátló interneuronokon is végződnek (a parallel rostok a cartwheel-sejteken, az akusztikus rostok pedig a tuberculoventralis sejteken). Ez az elrendezés lehetőséget ad az úgynevezett „feed-forward” gátló körök kialakítására (Oertel és Wu, 1989; Goldin és Oertel, 1996; 1997; Waller és mtsai., 1996; Gardner és mtsai., 1999; Oertel és Young, 2004), melyek idő- és aktivitás-függő módon állíthatják be az óriássejtek aktivitását.

A DCN felépítéséből következik, hogy amikor az elektródát a felszíni rétegbe helyeztük, az óriássejteken EPSC-k csak a parallel rostokon keresztül jöhettek létre (24. ábra). Kísérleti adataink szerint ezen rostok kolinerg befolyásolása teljesen megszüntette a kontroll körülmények között megfigyelhető STD-t, jelezve, hogy a kolinerg moduláció csökkenti a glutamát tartalmú neurotranszmitter-vezikulumok felszabadulási valószínűségét. Ezt a következtetést a CV érték csökkenése is alátámasztotta.



24. ábra: Feltételezett kolinerg modulációs hatások a DCN-ban

A parallel rostok a szemcsesejtektől erednek, amelyek a ganglion spirale sejtekből eredő vékony, 2-es típusú akusztikus rostok, valamint szomato-szenzoros rostok révén kapnak glutamaterg bemeneteket. Az 1-es típusú akusztikus rostok vastagabbak és nagyobb számúak, ezek ugyancsak serkentő, glutamaterg szinapszisokat képeznek az óriássejteknek a DCN mély rétegében található, szeretágazó dendritfájával, valamint egyes gátló interneuronok sejttestjeivel. Bővebb magyarázat a szövegben. A gátló szinapszisok esetében nem különítettük el a glicinerg és GABAerg végződéseket.

A kolinerg moduláció hasonló szerepéről számoltak be a hippocampus estén is, ahol a muszkarinerg receptorok aktiválása a CA1 neuronokon végződő Shaffer-kollaterálisokon csökkentette a neurotranszmitter-felszabadulás valószínűségét a glutamaterg szinapszisok egy részében (de Sevilla és mtsai., 2002; de Sevilla és Buno, 2003). Ezen túlmenően, a különböző muszkarinerg receptor altípusok számos egyéb agyterületen is fontos szerepet tölthetnek be az EPSCk modulációjában (Hsu és mtsai., 1995; Bellingham és Berger, 1996; Zhang és Warren, 2002; Bosch és Schimd, 2006; Zhang és mtsai., 2007).

A felszíni réteg felől történő elektromos ingerlés aktiválta a parallel rost – carthwheel-sejt útvonalat, ezáltal fokozódott az utóbbi neuronok óriássejtekre gyakorolt gátló hatása. Minthogy a kolinerg moduláció sem a PPR értékét, sem a kiváltott IPSCk nagyságát nem változtatta meg, nem valószínű, hogy a cartwheel-sejtek a kolinerg hatások közvetlen célpontjai lennének. Hasonló következtetést vontak le egyes *in vivo* kísérletek eredményei alapján is (Chen és mtsai., 1994b).

Csakúgy, mint azt a felszíni réteg ingerlése esetén láttuk, a DCN mély rétegének elektromos ingerlése is létrehozhatott mind gátló, mind serkentő válaszokat az óriássejteken. Az anatómiai viszonyok következtében az EPSCk ilyenkor az 1-es típusú akusztikus rostok ingerlésének következményei lehetnek. Mivel a kolinerg stimuláció az így kiváltott EPSCk-nek mind az amplitúdóját, mind a PPR értékét megváltoztatta, arra a következtetésre jutottunk, hogy a kolinerg hatás preszinaptikusan befolyásolhatja az óriássejtek és az akusztikus rostok között zajló glutamaterg neurotranszmissziót.

A DCN mély rétege felől kiváltott EPSCk-kel ellentétben az innen kiváltott IPSCk pontos eredetének magyarázata jóval nehezebb. A rendelkezésre álló információk alapján ezek a gátló bemenetek eredhetnek a tuberculoventralis neuronoktól (Oertel és Young, 2004), a T-típusú stellate-sejtektől (Fujino és Oertel, 2001; Oertel és Young, 2004) vagy mindkettőtől. A mély réteg ingerlése révén kiváltott IPSCk rövid távú plaszticitása lényegesen különbözött a felszíni réteg felől kiváltottakétól. Pontosabban, a mély réteg ingerlésével kiváltott IPSCk egyáltalán nem mutattak rövid távú plaszticitást, míg a felszíni ingerléssel kapott IPSCk esetében kifejezett STD-t figyeltünk meg. Ez a különbség azt sugallja, hogy az óriássejteken végződő különböző eredetű gátló szinapszisok neurotranszmitter-felszabadulási valószínűségük tekintetében markánsan eltérnek egymástól. Mivel a felszabadulási valószínűség magasabb a kifejezett STD-t produkáló sejtekben, mint az STD-t csak kismértékben vagy egyáltalán nem mutató neuronokon (Oleskevich és mtsai., 2000; Thomson, 2000; Price és mtsai., 2005), indokolt feltételezni, hogy a release valószínűségek különbözőek a cartwheel-sejtek, illetve a tuberculoventralis és/vagy T-

stellate-sejtek esetében. A rövidtávú plaszticitás eltérő sajátságai mellett a felszíni és a mély réteg felőli ingerléssel kiváltott IPSCk jelentősen különböztek CCh érzékenységükben is.

Mindezek alapján tehát úgy tűnik, hogy a kolinerg stimuláció megnöveli az óriássejtek aktivitását, és így erősítő mechanizmusként szolgálhat akcióspotenciál-tüzelésük idejének meghosszabbításával. Fontos hangsúlyozni, hogy mivel az óriássejtek akcióspotenciál-tüzelését ugyanúgy lehetett befolyásolni kolinerg ingerléssel, mint az acetilkolin-észteráz enzim gátlása révén, az agytörzsből készített túlélő szeletpreparátumokon tapasztalt kolinerg moduláló hatást feltételezhetően endogén acetilkolin-felszabadulással is el lehet érni.

Összefoglalva, az óriássejtek megemelkedett aktivitása pre- és postszinaptikus folyamatok révén egyaránt kialakulhat (a lehetséges mechanizmusok sematikus vázát a 24. ábra mutatja be). Az utóbbi lehetőség azt jelenti, hogy az M4 és M3 receptorokon kialakuló kolinerg hatás a jelenlévő K^+ -áramok (például az M-típusú áram) nagyságát csökkenti, ami a neuronok depolarizációjához vezet. A serkentő szinapszisokat érintő kolinerg moduláció preszinaptikus mechanizmusok révén alakul ki, és a neurotranszmitter-felszabadulás valószínűségének csökkenését jelenti. Ennek a hatásnak komoly következményei lehetnek repetitív ingerek szinaptikus átvitele esetén (Thomson, 2000), ugyanis a kolinerg ingerlés a posztszinaptikus akcióspotenciál-sorozatokat a beérkező ingerület kezdetétől annak későbbi fázisa felé tolhatja, megváltoztatva ezáltal az óriássejtek jelfeldolgozó működését és aktivitási mintázatát. Míg a parallel rostok felől kiváltott EPSCk kolinerg modulációja kizárólag M3 receptorokon keresztül valósul meg, addig az akusztikus rostok és az óriássejtek között zajló serkentő szinaptikus transzmisszió esetében az M2, M3 és M4 receptorok kombinált szerepe nyert bizonyítást.

A kolinerg neuromoduláció fontos az óriássejteket elérő egyes gátló hatások befolyásolásában is. Míg a cartwheel-sejtek felől eredő gátló bemenetek esetén a kolinerg hatás nem bizonyult hatékonynak, addig a mély réteg felől érkező gátló bemenetekre erőteljes gátlást gyakorolt. A mély réteg felől érkező inhibitorikus szinapszisok M3 receptoron keresztül történő kolinerg gátlása fokozhatja és elnyújthatja az óriássejtek aktivitását.

Funkcionális szempontból vizsgálva a hallórendszer kolinerg modulációja fiziológias és patológias körülmények között egyaránt fontos lehet. Egy *in vivo* tanulmány például arról számolt be, hogy az atropin képes volt csökkenteni az akusztikus kiváltott potenciálokat (Askhenazi és mtsai., 1999), ami arra enged következtetni, hogy a hallórendszer nyugalomban is rendelkezik egy tónusos kolinerg stimulációval. A DCN-ban is megfigyelték a kolinerg moduláció erősítő szerepét, főként cochlearis károsodást vagy nagy intenzitású zajterhelést követően (Jin és mtsai., 2005; 2006; Jin és Godfrey, 2006; Kaltenbach és Zhang, 2007). A

VCN kolinerg modulációjáról is beszámoltak; a cochlea egyoldali károsodása esetén az ellenoldali hanginger fokozta a VCN ingerületét (Bledsoe és mtsai., 2009). Az elképzelések szerint ezeket a modulációs mechanizmusokat (egyebek között) az olivo-cochlearis köteg kollaterálisai közvetítik, amelyek féloldali sérülés esetén, ellenoldali hanginger jelentkezésekor egy későn kialakuló ingerületet okoznak. Jóllehet a jelenséget már egyértelműen bizonyították, máig tisztázatlanok a résztvevő struktúrák ingerlékenységének növekedését előidéző sejtszintű mechanizmusok. A jelen munkában bemutatott kísérleti eredményekre alapozva azt gondoljuk, hogy a kolinerg moduláció számos lehetséges támadásponttal rendelkezik mind pre-, mind poszt-szinaptikusan. Feltételezzük továbbá, hogy az óriássejtek kolinerg modulációja részét képezheti annak a rendszernek, amelyik a CN különböző sejtjeinek az érzékenységet hozzáigazítja a hanginger erősségéhez, és az ellenoldali hangterhelés szintjéhez.

Kolinerg ingerléssel kiváltott intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációváltozások CN-ből izolált primer astrocytatenyészetekben

Kísérleteink ezen részében elsőként írtuk le, hogy a CN-ből izolált, primer tenyészetben fenntartott astrocyták CCh alkalmazására intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növekedéssel reagálnak. Megállapítottuk, hogy a vizsgált sejteknek 36%-a reagált a kolinerg stimulusra, ugyanakkor a CCh-pozitív esetekben jelentős különbségeket figyeltünk meg a Ca^{2+} -tranziensek időbeli lezajlásában. Megállapítottuk továbbá, hogy a CCh-ra reagáló astrocyták egy részében a Ca^{2+} -tranziens lassú komponense az extracelluláris térből belépő Ca^{2+} -tól függ. Kimutattuk, hogy a kolinerg válasz az M1 és az M3 receptorokon keresztül valósul meg.

A nucleus cochlearis astrocytáinak kolinerg receptorai

Mióta felismerték, hogy a gliasejtek befolyásolhatják a neuronok közötti szinaptikus jelátvitelt, azóta ezen sejtek tanulmányozása a neurofiziológia területén is egyre nagyobb érdeklődést kelt. Habár a gliasejtek számos csoportját különítik el (Kettenman és Ransom, 1995), a szinaptikus áttevődésben és a neuronális jelfeldolgozásban elsősorban az astrocyáknak tulajdonítanak fontos szerepet. Maguk az astrocyták sem alkotnak azonban homogén populációt, amit jól jelez, hogy számos kísérlet történt funkcionális és/vagy morfológiai tulajdonságaik alapján történő felosztásukra (Kimmelberg és mtsai., 2000; összefoglaló áttekintés végeztől lásd, Kimmelberg, 2004; Nishiyama és mtsai., 2005; Agulhon és

mtsai., 2008). A szerzők általában egyetértenek abban, hogy az astrocyták (függetlenül alakjuktól és funkciójuktól) expresszálnak GFAP-t, melyet így joggal tartanak astrocyta-specifikus markernek (Kimelberg és mtsai., 2000; Nishiyama és mtsai., 2005). Jelen munka során két, morfológiailag különböző astrocyta-féleséget figyeltünk meg. A sejtek nagyobbik részét tartalmazó csoport tagjai hosszú, vékony nyúlványokkal voltak jellemezhetőek, míg a másik csoportba tartozó sejtek kevesebb, rövidebb és vastagabb nyúlvánnyal rendelkeztek. Ezek a morfológiai jegyek, ha kis mértékben is, de hasonlóságot mutattak a különböző astrocyta alcsoportokban korábban leírtakhoz. Mivel azonban a CCh alkalmazása során adott válaszaikban a két csoport tagjai nem mutattak észrevehető különbséget, nem tettünk kísérletet a csoportok további jellemzésére, és a Ca^{2+} -tranziensek elemzésekor valamennyi astrocytát egységes csoportként kezeltük. Fontos megjegyezni ugyanakkor, hogy a vizsgált sejtpopulációk tagjai kivétel nélkül erősen GFAP-pozitívnak bizonyultak, alátámasztva azt, hogy a CCh-ra érzéketlen sejtek előfordulása nem magyarázható a közöttük esetlegesen megtalálható, nem astrocyta típusú sejtekkel.

Mint közismert, az ACh egy az emlősök idegrendszerében igen általánosan előforduló neurotranszmitter. Nem meglepő tehát, hogy a különböző agyterületeken található (vagy onnan izolált) astrocytákon végzett kísérletek során kimutatták mind a muszkarinerg (Porter és McCarthy, 1997; összefoglaló áttekintés végett lás., Verkhatsky és mtsai., 1998, Catlin és mtsai., 2000), mind a nikotinerg (Oikawa és mtsai., 2005; Xiu és mtsai., 2005) ACh-receptorok jelenlétét. Mint ahogy azt korábban láttuk, az ACh szerepe bizonyított tény a CN-an zajló jelfeldolgozás modulálásában (Chen és mtsai., 1994a; 1994b; 1998; Zhang és Kaltenbach, 2000; Fujino és Oertel, 2001; Oertel és Fujino, 2001), ezért az sem meglepő, hogy beszámoltak az ACh receptor jelenlétéről ebben a magban is. Adatok vannak arra vonatkozóan, hogy nikotinerg receptorok találhatók patkány CN-ban (Happe és Morley, 1998), valamint arra, hogy muszkarinerg receptorok vannak patkány (Chen és mtsai., 1995; Yao és Godfrey, 1995; Yao és mtsai., 1996), valamint tengerimalac (Safieddine és mtsai., 1996) CN-ban. Az idézett vizsgálatok fehérje és/vagy mRNS szinten írták le az M1-M4 muszkarinerg és az $\alpha 7$ nikotinerg receptor altípusokat, de a CN egészében, nem téve különbséget a neuronokon, illetve a gliasejteken való előfordulás között. Ebből következően az általunk végzett munka az első, amikor a CN-ból önmagukban (neuronok nélkül) izolált astrocytákon került bizonyításra mRNS és fehérje szinten az M1 és M3 receptor altípusok jelenléte, valamint mRNS szinten az M5 receptorok jelenlétének hiánya.

Az M1 és M3 receptorok jelenlétének fehérje szintű kimutatása mellett fluorimetriás mérésekkel támasztottuk alá azok funkcionális jelentőségét is. Ezen kísérletek során azt

találtuk, hogy CCh alkalmazása során a vizsgált astrocyták 36%-ában intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációnövekedés alakul ki. A CCh-stimulációra válaszoló sejtek alacsony aránya akár azt is jelezhetette, hogy a primer tenyészet sejtjeiben károsodik a Ca^{2+} -homeosztázis egy vagy több eleme; de ezt a lehetőséget a purinerg receptorokon keresztül intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációnövekedést előidéző ATP-nek, mint pozitív kontrollnak az alkalmazásával kizártuk (összefoglaló áttekintés végett lásd., Verkhratsky és mtsai., 1998; James és Butt, 2002; Fumagalli és mtsai., 2003). A CCh-pozitív astrocyták alacsony számát magyarázhatja még az egyes sejtek eltérő CCh-érzékenysége is. Ennek kizárására a kísérletek során alkalmazott CCh koncentrációt olyan magasnak választottuk (1 mmol/l), ami feltehetően valamennyi CCh-pozitív sejtben maximális választ idéz elő (Catlin és mtsai., 2000). Érdekes megemlíteni, hogy corticalis astrocytákon végzett kísérletekben 1 mmol/l CCh a vizsgált sejteknek mintegy 60%-ában idézett elő intracelluláris Ca^{2+} -tranzienst (Catlin és mtsai., 2000). A corticalis és cochlearis területekről izolált astrocytapopulációk CCh érzékenységében tapasztalt különbség okát nem ismerjük. A vizsgált lehetőségek (életkor, a tenyészet konfluencia szintje, passzázs szám) közül egyik sem adott magyarázatot a cochlearis magból izolált sejtek alacsonyabb válasz készségére. Mindezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az CN-ből izolált astrocyták CCh érzékenységében tapasztalt különbségek a sejtek *in vivo* is meglevő heterogenitását tükrözhetik. Korábbi eredmények is beszámolnak a kolinerg modulációs mechanizmus inhomogenitásáról, sejtetve, hogy a CN-ban az egyes Ach-receptor típusok nem teljesen homogén módon expresszálódnak (Chen és mtsai., 1995; Yao és Godfrey, 1995). Reálisnak tűnik tehát az a feltételezés, miszerint az M1 és M3 receptorok expressziója csak az astrocyták egy csoportjára korlátozódik.

Intracelluláris Ca^{2+} -tranziensek astrocytákban

Számos neurotranszmitterről mutatták ki, hogy képes intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növekedést előidézni astrocytákban (összefoglaló áttekintés végett lásd, Verkhratsky és mtsai., 1998, 2. táblázat). Metabotróp receptorok által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációnövekedés esetén a korai fázis létrejötte elsősorban az IP_3 -érzékeny raktárakból történő Ca^{2+} -felszabadulással magyarázható (összefoglaló áttekintés végett lásd, Verkhratsky és mtsai., 1998), bár a ryanodin-érzékeny raktárak hozzájárulása sem zárható ki teljes mértékben (Deitmer és mtsai., 1998; Fiacco és McCarthy, 2006). A Ca^{2+} -tranziensek korai szakaszát követően aktiválódhatnak a Ca^{2+} -belépést lehetővé tevő útvonalak is, kialakítva így a tranziensek második fázisát (Verkhratsky és Kettenmann, 1996). A leírtaknak megfelelően tehát a CCh által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek lezajlásának jelen munkában tapasztalt

variabilitása mind extra-, mind intracelluláris Ca^{2+} -források érintettségére utalhat. A tranziensek korai fázisa igen nagy valószínűséggel az mAChR-PLC- IP_3 útvonalon keresztül alakulhat ki (Catlin és mtsai., 2000), így az ezen komponens amplitúdójában tapasztalt eltérések az egyes sejtek intracelluláris Ca^{2+} -raktárainak eltérő Ca^{2+} -telítettségére utalnak. A még változékonyabbnak talált késői lassú komponens egyértelműen az extracelluláris térben található Ca^{2+} mennyiségtől függ, jelezve, hogy ezt a komponenst Ca^{2+} belépés okozhatta. Bár a jelen munka során nem végeztük el a Ca^{2+} belépési útvonal pontos azonosítását, a korai és késői fázis függetlensége arra utal, hogy a késői komponens kialakulásában a Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulás mechanizmus nem játszik meghatározó szerepet (Catlin és mtsai., 2000).

Korábban beszámoltak nikotinerg ACh receptorok jelenlétéről a CN-ban (Happe és Morley, 1998), és azok CCh érzékenységről is (single-channel mérésekben; Militante és mtsai., 2008). Mindezek alapján feltehető, hogy a nikotinerg receptorok funkcionális jelentőséggel bírhatnak a CN-ban. Jelen munka adatai mindazonáltal arra utalnak, hogy az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között a muszkarinerg receptorok játszanak meghatározó szerepet a CCh-aktivált intracelluláris Ca^{2+} -tranziensek kialakításában. Ezt a következtetést több érv támasztja alá. 1.) A muszkarin már $10\text{ }\mu\text{mol/l}$ koncentrációban olyan tranzienseket hozott létre, mint amilyeneket az 1 mmol/l CCh alkalmazása során tapasztaltunk. 2.) Mind atropin, mind az M1 és M3 receptorok specifikus gátlószerei teljes mértékben képesek voltak gátolni a CCh által kiváltott Ca^{2+} -tranzienseket. 3.) A $0,1\text{ mmol/l}$ koncentrációban alkalmazott hexamethonium (Buisson és Bertrand, 1998) csak igen kis mértékben gátolta a CCh által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóját. Mindezen eredmények együttesen arra utalnak, hogy az 1 mmol/l CCh által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} -tranziensek a muszkarinerg receptorok, főként az M1 és M3 altípusoknak aktiválódásának következtében jönnek létre. Hasonló következtetésre jutottak Catlin és mtsai., (2000) corticalis astrocytákon végzett kísérleteik során.

A jelen kísérletekben mind a pirenzepine, mind a 4-DAMP egyaránt dózis-függő módon gátolta a CCh által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek kialakulását. Magasabb koncentrációban ugyanakkor mindkét gátlószer teljes mértékben gátolta a CCh hatását, ami azt mutatja, hogy ezek a gátlószerek nem tehetők teljesen specifikusnak (Moriya és mtsai., 1999).

A Ca^{2+} -tranzienseknek a CCh ismételt alkalmazásakor tapasztalt amplitúdócsökkenése jelentősen megnehezítette az agonisták és antagonisták alkalmazása során kapott eredmények kvantitatív értelmezését. A jelenség magyarázatára több lehetőség is szóba jön. 1.) Mivel a Ca^{2+} -tranziensek korai fázisáért az IP_3 -érzékeny Ca^{2+} -raktárakból történő Ca^{2+} -felszabadulás tehető felelőssé, nem kizárt, hogy ezen raktárak kimerülése okozhatja az egymást követő

tranziensek amplitúdójának csökkenését. 2.) Nem zárható ki, hogy az izolált és primer tenyészetben fenntartott astrocyta sejtkultúra nem a legoptimálisabb alanya a funkcionális kísérleteknek, hiszen a sejtek már az izolálási procedúra közben is sérülhetnek, vagy a tenyésztési körülményeknek köszönhetően Ca^{2+} -homeosztázisuk módosulhat valamilyen mértékben (Agulhon és mtsai., 2008). 3.) Lehetőségként merül fel, hogy a relatíve magas CCh koncentráció a sejtek tachyphylaxisát okozza. Ez a magyarázat különösen elfogadhatónak tűnik, mivel epehólyagon korábban leírták a CCh által létrehozott, M3 receptorokon keresztül kialakuló, egymást követő kontrakciók nagyságának csökkenését (Stengel és Cohen, 2002).

A fenti értelmezési nehézségek ellenére a CCh által aktivált Ca^{2+} -tranziensek farmakológiai jellemzését el lehetett végezni úgy, hogy a különféle szerek jelenlétében kapott második tranzienseket a kontroll körülmények között kapott második tranziensekkel vetettük össze. A kapott eredmények bizonyítják, hogy a CN astrocytáinak egy része rendelkezik M1 és M3 receptorokkal, továbbá azt is, hogy ezek a receptorok funkcionális jelentőséggel is bírnak. Ebből a megállapításból következik, hogy az adott (7-9 napos) életkorban ezek a sejtek szerepet játszhatnak a CN neuronális kapcsolatainak kolinerg modulációjában. Fontos megemlíteni, hogy az említett 7-9 napos életkorban lévő patkányok hallórendszere még nem teljesen fejlődött ki, vagyis a vizsgált astrocyták jellemzői többé-kevésbé éretlen vagy köztes fejlődési állapotban lévő sejtek tulajdonságainak felelnek meg. Az tény, hogy korábban különbségekről számoltak be újszülött, illetve fiatal patkányok purinoceptorainak expressziója vonatkozásában (Amadio és mtsai., 2007), támogatja a feltevést, hogy hasonló különbségek előfordulhatnak a muszkarinerg receptorok esetében is.

Összefoglalás

Számos korábbi megfigyelés utal arra, hogy a nucleus cochlearisban (CN) működő jelfeldolgozásban kolinerg neuromodulációnak is van szerepe. Mindaddig nem vizsgálták azonban azt a kérdést, hogy ez a neuromodulátor hatás hogyan befolyásolja a neuronok közötti szinaptikus kapcsolatok működését. Tekintettel arra, hogy az utóbbi évtizedekben bebizonyosodott a gliasejtek aktív részvétele a neuronhálózatok tevékenységében, szükséges annak elemzése is, hogy a CN astrocytái célpontjai lehetnek-e a kolinerg neuromodulátor rendszernek.

A jelen értekezésben bemutatott munka során patch-clamp technika segítségével patkány CN-ből készített túlélő szeletpreparátumon vizsgáltuk a mag dorsalis részében található óriássejtekre irányuló kolinerg hatásokat. Azt találtuk, hogy az acetilkolin agonista karbakol (CCh) alkalmazása fokozta az óriássejtek spontán tüzelési aktivitását, mely hatás főként az M3 és M4 típusú muszkarinerg receptorokon keresztül érvényesült. Kimutattuk továbbá, hogy CCh jelenlétében a CN felszíni illetve mély rétege felől elektromos ingerléssel kiváltott serkentő posztzinaptikus áramok (EPSC) amplitúdója csökkent, és a rövidtávú depresszió (STD) jellege is megváltozott. A felszíni réteg felől kiváltott EPSC-k módosításáért kizárólag M3 receptorok felelősek, míg a mély réteg felől kiváltott EPSC-k modulálásában M2, M3 és M4 receptorok egyaránt szerepet játszottak. A felszíni réteg elektromos ingerlésével kiváltott gátló posztzinaptikus áramokat (IPSC) CCh adása nem befolyásolta, míg a mély réteg felől kiváltott IPSC-eket M3 receptorokon keresztül gátolta és az STD-t is befolyásolta. Az eredmények elemzése arra utalt, hogy a kolinerg modulációban mind pre-, mind posztzinaptikus muszkarinerg receptorok szerepet játszanak.

Az astrocyták kolinerg hatással szembeni érzékenységét a CN-ből készített astrocyta tenyészeteken vizsgáltuk úgy, hogy CCh adásával intracelluláris Ca^{2+} -tranzienseket váltottunk ki rajtuk, amiket fluoreszcens indikátor (Fluo-4) segítségével regisztráltunk. Kimutattuk, hogy a sejteknek 36,3%-a válaszolt a kolinerg hatásra. A válaszoló astrocyták 45%-ában a tranziens gyors időbeli lezajlást mutatott, míg 50,5%-ukban a gyors komponenst lassú, plátószerű szakasz követte. Különféle muszkarinerg agonisták (CCh, muszkarin) és antagonisták (atropin, pirenzepin, 4-DAMP, hexamethonium) alkalmazásával bizonyítottuk az M1 és M3 receptorok szerepét a tranziensek létrehozásában, és e receptorok jelenlétét mind RNS, mind fehérje szinten igazoltuk. Az eredmények egyértelműen bizonyítják a CN-ből származó astrocyták egy részének CCh-érzékenységét, aminek alapján feltételezhetjük, hogy ezek a sejtek szerepet játszanak a CN-ban zajló kolinerg moduláció mechanizmusában.

Summary

Earlier findings indicated that cholinergic modulation might influence the signal processing taking place in the cochlear nucleus (CN). It has not been studied, however, how this neuromodulatory effect influences the synaptic connections of the neurones. Considering the fact that in the last decades the active role of the glial cells in the functioning of the neuronal networks has been proven, it is necessary to address the question whether the astrocytes in the CN might be targets of the cholinergic neuromodulation.

In the work presented here, the cholinergic effects targeting the giant cells in the dorsal part of the CN were investigated in slice preparations using the patch-clamp technique. It was found that the application of the acetylcholine agonist carbachol (CCh) increased the firing activity of the giant cells. This effect was mediated by the M3 and M4 type muscarinic receptors. Moreover, it was shown that in the presence of CCh the amplitude of the excitatory postsynaptic currents (EPSCs) evoked by electrical stimulation of either the superficial or the deep layer of the CN decreased and the character of the short-term depression (STD) was modified, too. The effect on the EPSCs evoked by superficial stimulation was mediated solely by M3 receptors while M2, M3 and M4 receptors were responsible for influencing the EPSCs following deep layer stimulation. Inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) evoked by superficial stimulation were not modified by CCh but the amplitude of the IPSCs evoked by deep layer stimulation was decreased via M3 receptors and the STD was also changed. Evaluation of the findings revealed that both pre- and postsynaptic muscarinic receptors might play roles in the cholinergic modulation.

Sensitivity of the astrocytes towards cholinergic modulation was investigated on astrocyte cell cultures prepared from the CN. Ca^{2+} transients were evoked by CCh application and recorded using the fluorescent indicator dye Fluo-4. It was shown that 36.3 % of the cells responded to the cholinergic stimulation. 45 % of the CCh-sensitive astrocytes produced transients possessing fast time-course while in 50.5 % of the CCh-sensitive cells the fast component was followed by a slow, plateau-like phase. The role of the M1 and M3 receptors in evoking the Ca^{2+} transients was proven by applying muscarinic agonists (CCh, muscarine) and antagonists (atropine, pirenzepine, 4-DAMP, hexamethonium) and the presence of these receptors was shown at both RNA and protein levels. The results unequivocally indicate the CCh-sensitivity of a population of the astrocytes in the CN. It can be assumed, consequently, that these cells may play some roles in mediating cholinergic modulation of the CN.

Irodalomjegyzék

Hivatkozott közlemények jegyzéke

- Agulhon C., Petravicz J., McMullen A.B., Sweger E.J., Minton S.K., Taves S.R., Casper K.B., Fiocco T.A., McCarthy K.D. (2008) What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron* 59 (6): 932–946.
- Alibardi L. (1999) Fine structure, synaptology and immunocytochemistry of large neurons in the rat dorsal cochlear nucleus connected to the inferior colliculus. *J. Hirnforsch.* 39: 429–439.
- Amadio S., Vacca F., Martorana A., Sancesario G., Volonte C. (2007) P2Y1 receptors switches to neurons from glia in juvenile versus neonatal rat cerebellar cortex. *BMC Dev. Biol.* 7: 77.
- Araque A., Carmignoto G., Haydon P.G. (2001) Dynamic signaling between neurons and glia. *Annu. Rev. Physiol.* 63: 795–813.
- Araque A., Martin E.D., Perea G., Arellano J. I., Buno W. (2002) Synaptically-released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J. Neurosci.* 22: 2443–2450.
- Araque A., Parpura V., Sanzgiri R.P., Haydon P.G. (1998) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 10: 2129–2142.
- Arcuino G., Lin J.H., Takano T., Liu C., Jiang L., Gao Q., Kang J., Nedergaard M. (2002) Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 9840–9845.
- Ashkenazi A., Freeman S. & Argov Z. (1999) Effects of cholinergic blockers on auditory brain-stem evoked potentials in rats. *J. Neurol. Sci.* 164: 124–128.
- Basile A.S., Fedorova I., Zapata A., Liu X., Shippenberg T., Duttaroy A., Yamada M. & Wess J. (2002) Deletion of the M5 muscarinic acetylcholine receptor attenuates morphine reinforcement and withdrawal but not morphine analgesia. *PNAS* 99: 11452–11457.
- Beattie E.C., Stellwagen D., Morishita W., Bresnahan J.C., Ha B.K., Von Zastrow M., Beattie M.S., Malenka R.C. (2002) Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science* 295: 2282–2285.
- Bellingham M.C. & Berger A.J. (1996) Presynaptic depression of excitatory synaptic inputs to rat hypoglossal motoneurons by muscarinic M2 receptors. *J. Neurophysiol.* 76: 3758–3770.
- Bernardo L.S. & Prince D.A. (1982) Ionic mechanisms of cholinergic excitation in mammalian hippocampal pyramidal cells. *Brain Res.* 249: 333–344.
- Bledsoe S.C. Jr, Koehler S., Tucci D.L., Zhou J., Prell C.L. & Shore S.E. (2009) Ventral cochlear nucleus responses to contralateral sound are mediated by commissural and olivocochlear pathways. *J. Neurophysiol.* 102(2): 886–900.

- Bosch D. & Schmid S. (2006) Activation of muscarinic cholinergic receptors inhibits giant neurones in the caudal pontine reticular nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 24: 1967–1975.
- Brawer J.R., Morest D.K., Kane E.C. (1974) The neuronal architecture of the cochlear nucleus of the cat. *J. Comp. Neurol.* 155: 251–300.
- Brown D.A. & Adams P.R. (1980) Muscarinic suppression of a novel voltagesensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature* 283: 673–676.
- Buisson B., Bertrand D. (1998) Open-channel blockers at the human $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol. Pharmacol.* 53 (3): 555–563.
- Carmignoto G. (2000) Reciprocal communication systems between astrocytes and neurons. *Prog. Neurobiol.* 62: 561–581.
- Castonguay A., Levesque S., Robitaille R. (2001) Glial cells as active partners in synaptic functions. *Prog. Brain. Res.* 132: 227–240.
- Catlin M.C., Kavanagh T.J., Costa L.G. (2000) Muscarinic receptor-induced calcium responses in astroglia. *Cytometry* 41 (2): 123–132.
- Caulfield M.P. (1993) Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. *Pharmacology and Therapeutics* 58: 319–379.
- Chen K., Waller H.J. & Godfrey D.A. (1994a) Cholinergic modulation of spontaneous activity in rat dorsal cochlear nucleus. *Hearing Res* 77: 168–176.
- Chen K., Waller H.J. & Godfrey D.A. (1994b) Glutamate antagonists affect cholinergic activation of bursting neurons in rat dorsal cochlear nucleus. *Abstr. Assoc. Res. Otolaryngol.* 17: 12.
- Chen K., Waller H.J. & Godfrey D.A. (1995) Muscarinic receptor subtypes in rat dorsal cochlear nucleus. *Hearing Res.* 89: 137–145.
- Chen K., Waller H.J., Godfrey D.A. 1998. Effects of endogenous acetylcholine on spontaneous activity in rat dorsal cochlear nucleus slices. *Brain Res.* 783 (2): 219–226.
- Chen K., Waller H.J., Godfrey T.G. & Godfrey D.A. (1999) Glutamatergic transmission of neuronal responses to carbachol in the rat dorsal cochlear nucleus slices. *Neuroscience* 90: 1043–1049.
- D'Ambrosio R., Wenzel J., Schwartzkroin P.A., McKhann G.M., Janigro D. (1998) Functional Specialization and Topographic Segregation of Hippocampal Astrocytes. *The Journal of Neuroscience* 18 (12): 4425–4438.
- Davis K.A., Miller R.L. & Youn, E.D. (1996) Effects of somatosensory and parallel-fiber stimulation on neurons in dorsal cochlear nucleus. *J. Neurophysiol.* 76: 3012–3024.
- de Sevilla D.F. & Buno W. (2003) Presynaptic inhibition of Schaffer collateral synapses by stimulation of hippocampal cholinergic afferent fibres. *Eur. J. Neurosci.* 17: 555–558.
- de Sevilla D.F., Cabezas C., Oshima de Prada A.N., Sa´nchez-Jime´nez A. & Buno W. (2002) Selective muscarinic regulation of functional glutamatergic Schaffer collateral synapses in rat CA1 pyramidal neurons. *J. Physiol.* 545: 51–63.

- Deitmer J.W., Verkhratsky A.J., Lohr C. (1998) Calcium signalling in glial cells. *Cell Calcium* 24 (5–6): 405–416.
- Ellis L.D., Krahe R., Bourque C.W., Dunn R.J. & Chacron M.J. (2007) Muscarinic receptors control frequency tuning through the downregulation of an A-type potassium current. *J. Neurophysiol.* 98: 1526–1537.
- Faber D.S. & Korn H. (1991) Applicability of the coefficient of variation method for analyzing synaptic plasticity. *Biophys. J.* 60: 1288–1294.
- Fiacco A.T., McCarthy K.D. (2004) Intracellular Astrocyte Calcium Waves In Situ Increase the Frequency of Spontaneous AMPA Receptor Currents in CA1 Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 24(3): 722–732.
- Fiacco T.A., McCarthy K.D., (2006) Astrocyte calcium elevations: properties, propagation, and effects on brain signaling. *Glia* 54 (7): 676–690.
- Fonyó A. (1999) Az orvosi élettan tankönyve. Budapest: Medicina Könyvkiadó Rt.
- Fujino K. & Oertel D. (2001) Cholinergic modulation of stellate cells in the mammalian ventral cochlear nucleus. *J. Neurosci.* 21: 7372–7383.
- Fumagalli M., Brambilla R., D'Ambrosi N., Volonte C., Matteoli M., Verderio C., Abbracchio M.P. (2003) Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: role of P2X and P2Y receptors. *Glia* 43 (3): 218–230.
- Gardner S.M., Trussell L.O. & Oertel D. (1999) Time course and permeation of synaptic AMPA receptors in cochlear nuclear neurons correlate with input. *J. Neurosci.* 19: 8721–8729.
- Gerber D.J., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R., Huang S.Y., Caron M.G., Tonegawa S. (2001) Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission and response to amphetamine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 15312–15317.
- Godfrey D.A. & Matschinsky F.M. (1981) Quantitative distribution of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in the rat cochlear nucleus. *J. Histochem Cytochem* 29: 720–730.
- Godfrey D.A., Williams A.D. & Matschinsky F.M. (1977) Quantitative histochemical mapping of enzymes of the cholinergic system in the cat cochlear nucleus. *J. Histochem Cytochem* 25: 397–416.
- Golding N.L. & Oertel D.A. (1996) Context-dependent synaptic action of glycinergic and GABAergic inputs in the dorsal cochlear nucleus. *J. Neurosci.* 16: 2208–2219.
- Golding N.L. & Oertel D.A. (1997) Physiological identification of the targets of cartwheel cells in the dorsal cochlear nucleus. *J. Neurophysiol.* 78: 248–260.
- Gomez J., Shannon H., Kostenis E., Felder C., Zhang L., Brodtkin J., Grinberg A., Sheng H., Wess J. (1999) Pronounced pharmacologic deficit in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1692–1697.

- Grillner P., Beretta N., Bernardi G., Svensson T.H. & Mercuri N.B. (2000) Muscarinic receptors depress GABAergic synaptic transmission in rat midbrain dopamine neurons. *Neuroscience* 96: 299–307.
- Hamilton S.E., Nathanson N.M. (2001) The M1 receptor is required for muscarinic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in murine cerebral cortical neurons. *Journal of Biological Chemistry* 276: 15850-15853.
- Happe H.K., Morley B.J. (1998) Nicotinic acetylcholine receptors in rat cochlear nucleus: [125I]-alpha-bungarotoxin receptor autoradiography and in situ hybridization of alpha 7 nAChR subunit mRNA. *J. Comp. Neurol.* 397 (2): 163-80.
- Harrison J.M., Irving R. (1965) The anterior ventral cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* 124: 15-42.
- Harrison J.M., Irving R. (1966) The organization of the posterior ventral cochlear nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 126: 391-401.
- Haydon P.G. (2001) Glia: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 185–193.
- Hösli E., Jurasin K., Ruhl W., Luthy R., Hösli L., (2001) Colocalization of androgen, estrogen and cholinergic receptors on cultured astrocytes of rat central nervous system. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19 (1): 11–19.
- Hsu K.S., Huang C.C. & Gean P.W. (1995) Muscarinic depression of excitatory synaptic transmission mediated by the presynaptic M3 receptors in the rat neostriatum. *Neurosci. Lett.* 197: 141–144.
- Hurd L.B., Feldman M.L. (1994) Purkinje-like cells in rat cochlear nucleus. *Hear. Res.* 72: 143-158.
- Irie T., Fukui I. & Ohmori H. (2006) Activation of GIRK channels by muscarinic receptors and group II metabotropic glutamate receptors suppresses Golgi cell activity in the cochlear nucleus of mice. *J. Neurophysiol* 96: 2633-2644.
- Jabs R., Paterson I.A., Walz W. (1997) Qualitative analysis of membrane currents in glial cells from normal and gliotic tissue in situ. *Neuroscience* 81: 847–860.
- James G., Butt A.M., (2002) P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca²⁺ signalling in glial cell pathology in the central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* 447 (2–3): 247–260.
- Jin Y.-M. & Godfrey D.A. (2006) Effects of cochlear ablation on muscarinic acetylcholine receptor binding in the rat cochlear nucleus. *J. Neurosci Res.* 83: 157-166.
- Jin Y.-M., Godfrey D.A. & Sun Y. (2005) Effects of cochlear ablation on choline acetyltransferase activity in the rat cochlear nucleus and superior olive. *J. Neurosci Res.* 81: 91-101.
- Jin Y.-M., Godfrey D.A., Wang J. & Kaltenbach J.A. (2006) Effects of intense tone exposure on choline acetyltransferase activity in the hamster cochlear nucleus. *Hear. Res.* 216-217: 168-175.

- Kaltenbach J.A. & Zhang J. (2007) Intense sound-induced plasticity in the dorsal cochlear nucleus of the rats: evidence for cholinergic receptor upregulation. *Hear. Res.* 226: 232-243.
- Kettenman H., Ransom B.R. (1995) *Neuroglia*. New York: Oxford Univ. Press.
- Kharkovets T., Hardelin J.P., Safieddine S., Schweizer M., El-Amraoui A., Petit C. & Jentsch T.J. (2000) KCNQ4, a K⁺ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97: 4333–4338.
- Kimelberg H.K. (2004) The problem of astrocyte identity. *Neurochemistry International* 45: 191–202.
- Kimelberg H.K., Schools G.P., Cai Z., Zhou M. (2000) Freshly isolated astrocyte (FIA) preparations: a useful single cell system for studying astrocyte properties. *J. Neurosci. Res.* 61 (6): 577–587.
- Kristjan R. Jessen (2004) Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 1861–1867.
- Levey A.I., Kitt C.A., Simonds W.F., Price D.L., Brann M.R. (1991) Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *Journal of Neuroscience* 11: 3218-3226.
- Liu Y., Wu Y., Lee J.C., Xue H., Pevny L.H., Kaprielian Z., Rao M.S. (2002) Oligodendrocyte and astrocyte development in rodents: an in situ and immunohistological analysis during embryonic development. *Glia* 40: 25–43.
- Matsui M., Motomura D., Karasawa H., Fujikawa T., Jiang J., Komiya Y., Takahashi S., Taketo M. (2000) Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9579-9584.
- Militante J., Ma B.W., Akk G., Steinbach J.H. (2008) Activation and block of the adult muscle-type nicotinic receptor by physostigmine: single-channel studies. *Mol. Pharmacol.* 74 (3): 764–776.
- Moore J.K., Osen K.K. (1979) The cochlear nuclei in man. *Am. J. Anat.* 154: 393-418.
- Moriya H., Takagi Y., Nakanishi T., Hayashi M., Tani T., Hirotsu I. (1999) Affinity profiles of various muscarinic antagonists for cloned human muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) subtypes and mAChRs in rat heart and submandibular gland. *Life Sci.* 64 (25): 2351–2358.
- Nishiyama A., Yang Z., Butt A. (2005) Astrocytes and NG2-glia: what's in a name? *J. Anat.* 207 (6): 687–693.
- Nowak L.M. & Macdonald R.L. (1983) Ionic mechanism of muscarinic cholinergic depolarization of mouse spinal cord neurons in cell culture. *J. Neurophysiol.* 49: 792–803.
- Oertel D. & Wu S.H. (1989) Morphology and physiology of cells in slice preparations of the dorsal cochlear nucleus of mice. *J. Comp. Neurol.* 283: 228–247.

- Oertel D. & Young E.D. (2004) What's a cerebellar circuit doing in the auditory system? *Trends Neurosci.* 27: 104–110.
- Oertel D., Fujino K. (2001) Role of biophysical specialization in cholinergic modulation in neurons of the ventral cochlear nuclei. *Audiol. Neurotol.* 6 (4): 161–166.
- Oikawa H., Nakamichi N., Kambe Y., Ogura M., Yoneda Y. (2005) An increase in intracellular free calcium ions by nicotinic acetylcholine receptors in a single cultured rat cortical astrocyte. *J. Neurosci. Res.* 79 (4): 535–544.
- Oleskevich S., Clements J. & Walmsley B. (2000) Release probability modulates short-term plasticity at a rat giant terminal. *J. Physiol.* 524: 513–523.
- Osen K.K. (1969) Cytoarchitecture of the cochlear nuclei in the cat. *J. Comp. Neurol.* 136: 453–484.
- Osen K.K. (1972) Projection of the cochlear nuclei on the inferior colliculus in the cat. *J. Comp. Neurol.* 144: 355–372.
- Osen K.K., Mugnaini E., Dahl A.L. & Christiansen A.H. (1984) Histochemical localization of acetylcholinesterase in the cochlear and superior olivary nuclei. A reappraisal with emphasis on the cochlear granule cell system. *Arch. Ital. Biol.* 122: 169–212.
- Perea G., Araque A. (2005) Synaptic regulation of the astrocyte calcium signals. *J. Neural. Transm.* 112: 127–135.
- Perea G., Araque A. (2002) Communication between astrocytes and neurons: a complex language. *J. Physiol. Paris* 96 (3–4): 199–207.
- Porter J.T., McCarthy K.D. (1996) Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J. Neurosci.* 16: 5073–5081.
- Porter J.T., McCarthy K.D. (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog. Neurobiol.* 51: 439–455.
- Price C.J., Cauli B., Kovacs E.R., Kulik A., Lambolez B., Shigemoto R. & Capogna M. (2005) Neurogliaform neurons form a novel inhibitory network in the hippocampal CA1 area. *J. Neurosci.* 25: 6775–6786.
- Privat A., Gimenez-Ribotta M., Ridet J.L. (1995) Morphology of astrocytes. In: *Neuroglia*, edited by H. Kettenmann and B. R. Ransom. New York: Oxford Univ. Press 3–22.
- Rakic P. (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* 145: 61–84.
- Rhode W.S., Smith P.H., Oertel D. (1983) Physiological response properties of cells labeled intracellularly with horseradish peroxidase in cat dorsal cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* 213: 426–447.
- Rusznák Z., Forsythe I.D., Brew H.M., Stanfield P.R. (1997) Membrane currents influencing action potential latency in granule neurons of the rat cochlear nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 9: 2348–2358.
- Rümenapp U., Asmus M., Schlabowski H., Woznicki M., Han L., Jakobs K.H., Fahimi-Vahid M., Michalek C., Wieland T., Schmidt M. (2001) The M3 muscarinic receptor

- expressed in HEK-293 cells signals to phospholipase D via G12 but not Gq-type G proteins. Regulators of G protein as tools to dissect pertussis toxin-resistant G proteins in receptor-effector coupling. *Journal of Biological Chemistry* 276: 2474-2479.
- Ryugo D.K. & Willard F.H. (1985) The dorsal cochlear nucleus of the mouse: a light microscopic analysis of neurons that project to the inferior colliculus. *J. Comp. Neurol.* 242: 381-396.
- Ryugo D.K., Willard F.H., Fekete D.M. (1981) Differential afferent projections to the inferior colliculus from the cochlear nucleus in the albino mouse. *Brain Res.* 210: 342-349.
- Safieddine S., Bartolami S., Wenthold R.J., Eybalin M. (1996) Pre- and postsynaptic M3 muscarinic receptor mRNAs in the rodent peripheral auditory system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 40 (1): 127-135.
- Schmechel D.E. és Rakic P. (1979) A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: Morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat. Embryol.* 156: 115-152.
- Seifert G., Steinhauser C. (1995) Glial cells in the mouse hippocampus express AMPA receptors with an intermediate calcium permeability. *Eur. J. Neurosci.* 7: 1872-1881.
- Shao, Y., McCarthy, K.D. (1995) Receptor-mediated calcium signals in astroglia: multiple receptors, common stores and all-or-nothing responses. *Cell Calcium* 17 (3): 187-196.
- Shelton M.K., McCarthy K.D. (1999) Mature hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors in situ. *Glia* 26: 1-11.
- Shelton M.K., McCarthy K.D. (2000) Hippocampal astrocytes exhibit Ca²⁺-elevating muscarinic cholinergic and histaminergic receptors in situ. *J. Neurochem.* 74: 555-563.
- Sherriff F.E. & Henderson Z. (1994) Cholinergic neurons in the ventral trapezoid nucleus project to the cochlear nuclei in the rat. *Neuroscience* 58: 627-633.
- Shibata T., Yamada K., Watanabe M., Ikenaka K., Wada K., Tanaka K., Inoue Y. (1997) Glutamate Transporter GLAST Is Expressed in the RadialGlia-Astrocyte Lineage of Developing Mouse Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience* 17 (23): 9212-9219.
- Spatz W.B. (1997) Differences between guinea pig and rat in the dorsal cochlear nucleus: expression of calcium-binding proteins by cartwheel and Purkinje-like cells. *Hear. Res.* 107: 136-146.
- Stengel P.W., Cohen M.L. (2002) Muscarinic receptor knockout mice. role of muscarinic acetylcholine receptors M(2), M(3), and M(4) in carbamylcholineinduced gallbladder contractility. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301 (2): 643-650.
- Stengel P.W., Gomeza J., Wess J., Cohen M.L. (2000) M2 and M4 receptor knockout mice: muscarinic receptor function in cardiac and smooth muscle in vitro. *Journal of Pharmacol. Experiment Therapeutics* 292: 877-885.
- Sumner C.J., Tucci D.L., Shore S.E. (2005) Responses of ventral cochlear nucleus neurons to contralateral sound after conductive hearing loss. *J. Neurophysiol.* 94: 4234-4243.

- Szücs G. és Rusznák Z. (2002) Cellular regulatory mechanisms influencing the activity of the cochlear nucleus: a review. *Acta Physiol. Hung.* 89(4): 375-414.
- Takahashi A., Camacho P., Lechleiter J.D., Herman B. (1999) Measurement of intracellular calcium. *Phys. Rev.* 79 (4): 1089–1125.
- Thomson A.M. (2000) Facilitation, augmentation and potentiation at central synapses. *Trends Neurosci.* 23: 305–312.
- van Koppen C.J., Kaiser B. (2003) Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol. Ther.* 98 (2): 197–220.
- Verkhratsky A., Kettenmann H. (1996) Calcium signalling in glial cells. *Trends Neurosci.* 19 (8): 346–352.
- Verkhratsky A., Orkand R.K., Kettenmann H. (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol. Rev.* 78: 99–141.
- Vígh B. (2002) Idegszövet. In: Röhlich P. (2002) Szövettan. Semmelweis Egyetem Képzéskutató, Oktatástechnológiai és Dokumentációs Központ, Budapest, 164-181.
- Volterra A., Bezzi P. (2002) Release of transmitters from glial cells. In: Volterra A., Magistretti P.J., Haydon P.G. The tripartite synapse: glia in synaptic transmission. Oxford University Press, New York, 164–184.
- Waller H.J., Godfrey D.A. & Chen K. (1996) Effects of parallel fiber stimulation on neurons of rat dorsal cochlear nucleus. *Hear. Res.* 98: 169–179.
- Walz W. (2000) Controversy surrounding the existence of discrete functional classes of astrocytes in adult gray matter. *Glia* 31: 95–103.
- Webster D.B., Trune D.R. (1982) Cochlear nuclear complex of mice. *Am. J. Anat.* 163: 103-130.
- Wu S.H., Oertel D. (1984) Intracellular injection with horseradish peroxidase of physiologically characterized stellate and bushy cells in slices of mouse anteroventral cochlear nucleus. *J. Neurosci.* 4: 1577-1588.
- Xiu J., Nordberg A., Zhang J.T., Guan Z.Z. (2005) Expression of nicotinic receptors on primary cultures of rat astrocytes and up-regulation of the alpha7, alpha4 and beta2 subunits in response to nanomolar concentrations of the beta-amyloid peptide (1–42). *Neurochem. Int.* 47 (4): 281–290.
- Yamada M., Lamping K.G., Duttaroy A., Zhang W., Cui Y., Bymaster F.P., McKinzie D.L., Felder C.C., Deng C.X., Faraci F.M., Wess J. (2001) Cholinergic dilation of cerebral blood vessels is abolished in M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 14096-14101.
- Yao W. & Godfrey D.A. (1999) Immunolocalization of alpha4 and alpha7 subunits of nicotinic receptor in rat cochlear nucleus. *Hear. Res.* 128: 97–102.
- Yao W., Godfrey D.A. & Levey A.I.J. (1996) Immunolocalization of muscarinic acetylcholine subtype 2 receptors in rat cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* 373: 27–40.

- Yao W., Godfrey D.A. (1995) Immunohistochemistry of muscarinic acetylcholine receptors in rat cochlear nucleus. *Hear. Res.* 89 (1–2): 76–85.
- Zhang H.M., Chen S.R. & Pan H.L. (2007) Regulation of glutamate release from primary afferents and interneurons in the spinal cord by muscarinic receptor subtypes. *J. Neurophysiol.* 97: 102–109.
- Zhang J.S., Kaltenbach J.A. (2000) Modulation of spontaneous activity by acetylcholine receptors in the rat dorsal cochlear nucleus in vivo. *Hearing Research* 140: 7–17.
- Zhang L. & Warren R.A. (2002) Muscarinic and nicotinic presynaptic modulation of EPSCs in the nucleus accumbens during postnatal development. *J. Neurophysiol.* 88: 3315–3330.
- Zhang S., Oertel D. (1993) Giant cells of the dorsal cochlear nucleus of mice: intracellular recordings in slices. *J. Neurophysiol.* 69: 1398–1408.
- Zhou M., Kimelberg H.K. (2000) Freshly isolated astrocytes from rat hippocampus show two distinct current patterns and different [K⁺] uptake capabilities. *J. Neurophysiol.* 84: 2746–2757.
- Zhou M., Kimelberg H.K. (2001) Freshly isolated hippocampal CA1 astrocytes comprise two populations differing in glutamate transporter and AMPA receptor expression. *J. Neurosci.* 21: 7901–7908.
- Zhuo L., Sun B., Zhang C.L., Fine A., Chiu S.Y., Messing A. (1997) Live astrocytes visualized by green fluorescent protein in transgenic mice. *Dev. Biol.* 187: 36–42.
- Zigmond J.M., Bloom E.F., Landis C.S., Roberts L.J., Squire R.L. (1999) *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, USA.
- Zucker R.S. & Regehr W.G. (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64: 355–405.

A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke

Közlemények

1. **Pap, P.**, Kőszeghy, Á., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2009) Heterogeneous cytoplasmic Ca^{2+} concentration changes evoked by cholinergic stimulation in primary astrocyte cultures from rat cochlear nucleus. *Hearing Research* 255: 73–83 IF: 2.177
2. Pál, B., Kőszeghy, Á., **Pap, P.**, Bakondi, G., Pocsai, K., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2009) Targets, receptors and significance of muscarinic neuromodulation on giant neurones of the rat dorsal cochlear nucleus. *European Journal of Neuroscience* 30: 769–782 IF: 3.418

Előadások és posztterek

1. **Pap Pál**, Nagy Dénes, Rusznák Zoltán, Szűcs Géza: Patkány és humán primer astrocyta tenyészetek karbakol által kiváltott kalcium-tranzienseinek vizsgálata. Magyar Élettani Társaság LXXI. Vándorgyűlés, Pécs, 2007.
2. **Pap Pál**, Nagy Dénes, Rusznák Zoltán, Szűcs Géza: Karbakollal kiváltott intracelluláris kalcium-események vizsgálata patkány nucleus cochlearisból izolált primer astrocyta tenyészetben. Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlés, Debrecen, 2008.
3. **Pap, P.**, Rusznák, Z., Szűcs, G.: Carbachol-induced calcium transients in cultured astrocytes isolated from the rat cochlear nucleus. Magyar Idegtudományi Társaság XII. Konferenciája, Budapest, 2009.
4. Pál, B., Kőszeghy, Á., **Pap, P.**, Bakondi, G., Pocsai, K., Szűcs, G., Rusznák, Z.: Targets, receptors and significance of muscarinic neuromodulation on giant neurones of the rat dorsal cochlear nucleus. Magyar Idegtudományi Társaság XII. Konferenciája, Budapest, 2009.

5. Kőszeghy Áron, Pál Balázs, **Pap Pál**, Szűcs Géza, Rusznák Zoltán: A muszkarinos kolinerg neuromoduláció célpontjai, receptorai és jelentősége patkány nucleus cochlearis dorsalis óriás-sejtjein. 39. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2009.
6. Kőszeghy Áron, Pál Balázs, **Pap Pál**, Szűcs Géza, Rusznák Zoltán: A muszkarinos kolinerg neuromoduláció funkcionális következményei patkány nucleus cochlearis dorsalisban. A Magyar Élettani Társaság LXXIII. Vándorgyűlése, Budapest, 2009.

A tézisekben fel nem használt egyéb tudományos munkák jegyzéke

Közlemények

1. Pocsai, K., Pál, B., **Pap, P.**, Bakondi, G., Kosztka, L., Rusznák, Z., Szűcs, G. (2007) Rhodamine backfilling and confocal microscopy as a tool for the unambiguous identification of neuronal cell types: a study of the neurones of the rat cochlear nucleus. Brain Res. Bull. 71(5): 529-38 IF: 2.193
2. Kőszeghy, Á., Pál, B., **Pap, P.**, Pocsai, K., Nagy, Z., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2009) Purkinje-like cells of the rat cochlear nucleus: a combined functional and morphological study. Brain Research 1297: 57-69 IF: 2.463

Közlésre elfogadott

1. Nagy, D., Kosztka, L., **Pap, P.**, Nagy, Zs., Rusznák, Z., Csernoch, L., Szűcs, G. (2010) Cytoplasmic Ca²⁺ concentration changes evoked by muscarinic cholinergic stimulation in primary and metastatic melanoma cell lines. Melanoma Research.

Előadások és poszterek

1. Rusznák, Z., Pál, B., Pór, Á., Pocsai, K., **Pap, P.**, Szűcs, G.: Voltage –gated K⁺ channel subunits expressed by the projection cells of the cochlear nucleus. Is there a unique pattern enabling their characteristic behaviour? Magyar Idegtudományi Társaság XI. Konferenciája, Pécs, 2005.
2. **Pap Pál**, Pál Balázs, Pocsai Krisztina, Rusznák Zoltán, Szűcs Géza: A nucleus cochlearis projekciós neuronjai által expresszált kv-alegységek: összefüggésbe hozható az alegységek megoszlása a jellegzetes aktivitási mintázattal? Magyar Élettani Társaság LXIX. Vándorgyűlése, Budapest, 2005.

3. **Pap Pál**, Nagy Dénes, Rusznák Zoltán, Szűcs Géza: Egy új fejlesztésű Munc13-1 specifikus monoklonális antitest alkalmazásával kapott eredményeink neuronális és nem neuronális szövetekben. Magyar Élettani Társaság LXX. Vándorgyűlése, Szeged, 2006.
4. Bakondi Gábor, Kosztka Livia, **Pap Pál**, Pocsai Krisztina, Rusznák Zoltán: Egy új fejlesztésű anti-hTASK-3 ellenes monoklonális ellenanyag alkalmazásával kapott, melanoma malignum sejteken elért eredményeink. Magyar Élettani Társaság LXX. Vándorgyűlése, Szeged, 2006.
5. Pocsai, K., Pál, B., **Pap, P.**, Szűcs, G., Rusznák, Z.: Retrograde labelling and confocal analysis of the rat cochlear nucleus. Joint Meeting of The Brazilian and British Physiological Societies, 2006. Augusztus.

Tárgyszavak

- nucleus cochlearis dorsalis / dorsal cochlear nucleus
- excitatórikus posztzinaptikus áramok, EPSCk / excitatoric postsynaptic currents, EPSCs
- inhibiórikus posztzinaptikus áramok, IPSCk / inhibitoric postsynaptic currents IPSCs
- M-áram / M-current
- muszkarinerg receptorok / muscarinic receptors
- glia / glia
- immunhisztokémia / immunochemistry
- kvantitatív polimeráz láncreakció, Q-PCR / quantitative polimerase chain reaction, Q-PCR
- Fluo-4 / Fluo-4

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném hálámat kifejezni Kovács László és Csernoch László Professzor Úrának, a DE OEC Élettani Intézet volt és jelenlegi igazgatóinak, valamint az intézet valamennyi munkatársának, amiért támogattak és segítettek munkám elvégzésében.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Szűcs Géza Professzor Úrnak munkám során nyújtott útmutatásáért és baráti támogatásáért.

Köszönettel tartozom továbbá közvetlen munkatársaimnak és szerzőtársaimnak: Rusznák Zoltánnak, Pál Baláznak, Pocsai Krisztinának, Bakondi Gábornak, Kőszeghy Áronnak, Kosztka Líviának, Dr. Varga Attilánénak és Tóth István Baláznak figyelmes és önzetlen segítségükért.

Végül de nem utolsó sorban hálával tartozom családomnak, hogy támogatásukra mindvégig számíthattam eddigi tanulmányaim során.

Függelék

Jelen munka az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA K-72812, NK-61412) támogatásával jött létre.

Rövidítések jegyzéke

ACh: acetilkolin
aCSF: artificialis cerebrospinalis folyadék
AMV: avian mieloblastoma virus
ATP: adenzin-trifoszfát
AU: önkényes egység
aVCN: nucleus cochlearis anteroventralis
CCh: karbamil-kolin (karbakol)
CN: nucleus cochlearis
CV: variációs koefficiens
DAG: diacil-glicerol
D-AP5: D-2-amino-5-foszfopentanoát
DCN: nucleus cochlearis dorsalis
DIC: differencia interferencia kontraszt
DMSO: dimetil-szulfid
EAAT2: excitatory amino acid transporter 2
EPSC: excitatórikus posztzinaptikus áram
ER: endoplazmatikus retikulum
FBS: főtális borjú szérum
GABA: γ -amino-vajsav
GFAP: glial fibrillary acidic protein
GLAST: glutamate aspartate transporter
GLT-1: glutamate transporter-1
GRP: glia restricted precursor
GTP: guanozin-trifoszfát
ICU: imaging controll unit
IP₃: inozitol-trifoszfát
IP₃R: inozitol-trifoszfát receptor
IPSC: inhibítórikus posztzinaptikus áram
M1: 1-es típusú muszkarinerg acetilkolin receptor
M2: 2-es típusú muszkarinerg acetilkolin receptor
M3: 3-as típusú muszkarinerg acetilkolin receptor

M4: 4-es típusú muszkarinerg acetilkolin receptor
 M5: 5-ös típusú muszkarinerg acetilkolin receptor
 mAChR: muszkarinerg acetilkolin receptor
 MEM: minimum essential medium
 NA: nervus acusticus
 nAChR: nikotinerg acetilkolin receptor
 NBQX: 2,3-dihidroxi-6-nitro-7szulfamoil-benzo[f]quinoxalin-2,3-dion
 NT: neurotranszmitter
 ORA: outward rectifying astrocytes
 PBS: foszfát puffer oldat
 PKC: proteinkináz-C
 PLC: foszfolipáz-C
 PLD: foszfolipáz-D
 PPR: paired-pulse ratio
 PSC: posztszinaptikus áram
 pVCN: nucleus cochlearis posteroventralis
 ROI: regoin of interest
 SD: standard deviancia
 sIPSC: spontán inhibitorikus posztszinaptikus áram
 STD: rövidtávú depresszió
 STF: rövidtávú facilitáció
 TEA⁺: tetraetilammónium-ion
 TNF α : tumornekrózis faktor- α
 TTX: tetrodotoxin
 VCN: nucleus cochlearis ventralis
 VRA: variably rectifying astrocytes
 4-DAMP: 4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidin methiodid

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai