

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Kolinerg moduláció vizsgálata patkány nucleus cochlearis óriássejtjein
és astrocytáin**

Pap Pál



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2010

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Kolinerg moduláció vizsgálata patkány nucleus cochlearis óriássejtjein
és astrocytáin**

Pap Pál

Témavezető: Dr. Szűcs Géza



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

Témavezető:

Prof. Dr. Szűcs Géza, az MTA doktora

Debreceni Egyetem, Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola, Élettan és neurobiológia program

A szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Gergely Pál, akadémikus

A szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Kiss Tibor, az MTA doktora

Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora

A védési bizottság elnöke:

Prof. Dr. Gergely Pál, akadémikus

Opponensek:

Dr. Czirják Gábor, Ph.D.

Dr. Tóth Attila, Ph.D.

A védési bizottság tagjai:

Dr. Kiss Tibor, az MTA doktora

Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora

Az értekezés védésének helye és ideje:

2010. december 7., kedd, 13:30, DE OEC I.sz. Belgyógyászati Klinika tanterme.

Bevezetés, célkitűzések

A nucleus cochlearis (CN) a hallási információ feldolgozásának első agytörzsi szintű állomása. Korábbi eredmények bizonyították, hogy a kolinerg moduláció a CN-ben erősítő szerepet tölt be, bár ennek a mechanizmusnak a celluláris folyamatai máig sem ismertek. A jelen értekezésben bemutatott kísérletes munka laboratóriumunk azon törekvéséhez csatlakozik, hogy új információkat nyerjünk a patkány CN felépítéséről és működéséről. Fő céлом ezen belül a mag kolinerg modulációjával összefüggő jelenségek tanulmányozása volt.

A munka első részében a mag dorsalis részéből (DCN) készített túlélő szelet preparátumokon patch-clamp technika alkalmazásával az óriássejtek elektrofiziológiai sajátosságait tanulmányoztam. A kísérletek során az alábbi feladatok kívántam megoldani.

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

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

3. Az óriássejteken a DCN felszíni és mély rétegei felől végzett elektromos ingerléssel kiváltott gátló és serkentő posztzinaptikus áramok vizsgálata, valamint a CCh posztzinaptikus áramokra gyakorolt hatásának elemzése.

4. A CCh alkalmazás esetleges posztzinaptikus következményeinek felderítése.

Az elmúlt évtizedekben kimutatták, hogy a neuronok közti kémiai szinapszisok működésében az astrocyták aktív harmadik résztvevőként szerepelnek és befolyásolhatják a neuronok közti ingerületátvitelt. Ezért egy-egy agyterület működésének vizsgálatakor a neuronok mellett fontos az ott jelenlévő astrocyták tanulmányozása is. A munka második részében a CN-ből készített primer astrocytatenyészetekben a kolinerg moduláció mechanizmusát CCh 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. CCh alkalmazásával kiváltott citoplazmatikus kalcium-tranziensek kinetikai sajátságainak és farmakológiai befolyásolhatóságának elemzése.

Irodalmi áttekintés

A CN és az óriássejtek rövid bemutatása

A CN a hallási információ agytörzsi szintű feldolgozásának első állomása. A CN két fő részre, a dorsalis és ventralis (VCN) magra osztható. A jelen munkában bemutatásra kerülő elektrofiziológiai kísérletek a DCN-ben található óriássejtek kolinerg modulációjával foglalkoznak. Az óriássejtek sejttestjük mintegy 50 μm -es átmérőjével valóban nagy sejtek, ugyancsak nagy sejtmaggal és sejtmagvacskával. Az óriássejtek dendritfája szerteágazó, egyetlen sejt arborizációja a CN 500-600 μm széles területét is képes lefedni, behálózhatják mind a VCN, mind a DCN rétegeit. Ezen speciális elrendezés eredményeként az óriássejtek nagymennyiségű információt fogadnak az akusztikus rostok felől, és ezáltal képesek az érkező akusztikus bemenetek integrálására. Az óriássejtek hallóideg felőli, illetve az aVCN irányából történő ingerlését követő változások elemzéséből úgy tűnik, hogy ezek a sejtek közvetlen serkentő bemenetet kapnak a nervus acusticustól (NA) valamint a VCN neuronjai irányából. Számos adat utal arra, hogy emellett kolinerg neuronok által biztosított moduláció is jelen van a CN-ben, és fontos szerepet játszik a magban található idegsejtek aktivitásának a beállításában.

A muszkarinerg kolinerg receptorok

A muszkarinerg kolinerg receptorok (mAChR) a metabotróp receptorok családjába tartoznak, öt altípusukat különböztetjük meg (a továbbiakban M1-M5 formában hivatkozunk rájuk). Az M1, M3 és M5 receptorok G-proteineken keresztül aktiválni képesek a foszfolipáz-C (PLC) - inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP₃) útvonalat, mely az intracelluláris kalcium-koncentráció növekedését eredményezi. A szervezetben általában, és ezen belül a központi idegrendszerben is, valamennyi mAChR altípus sajátos expressziós mintázatot mutat, és számos kolinerg hatás mediációjában vesz részt.

Az idegrendszerben található gliasejtek áttekintése, az astrocyták szerkezeti és funkcionális sajátosságai

Az utóbbi évtizedekben beigazolódott, hogy a gliasejtek képesek befolyásolni a neuronok közötti szinaptikus transzmissziót. A gliasejteknek két fő csoportja különíthető el, a perifériás és a centrális glia. A centrális glia egyik alcsoportja a makroglia, ennek a csoportnak a tagjait astrocyta sejteknek is nevezzük. Az astrocyták képezik a gliasejtek legáltalánosabban előforduló és legösszetettebb funkcióval rendelkező csoportját. Az astrocyták idegrendszerben betöltött funkciói közé tartozik az, hogy intermedier filamentumaik révén (pl. Glial Fibrillary Acidic Protein; GFAP) támasztják a neuronális elemeket, nyúlványaik mintegy burkot képeznek a szinapszisok körül, segítenek a neurotranszmitterek és a kálium-ionok extracelluláris térből történő eltávolításában, ami igen fontos az idegsejtek működési feltételeinek biztosításában.

A legutóbbi évtizedekben kimutatták, hogy az astrocyták felszínükön több neurotranszmitter (pl. glutamát, katekolaminok, GABA, ATP és ACh) receptorát is expresszálják. A főként metabotróp receptorok közül több az intracelluláris kalcium-koncentráció befolyásolásán keresztül fejti ki hatását. Arról is beszámoltak, hogy az astrocyták maguk is szabadítanak fel transzmitterként működő anyagokat, pl. glutamátot,

TNF α -t és ATP-t. Ezek az anyagok, amelyeket újabban gliotranszmittereknek neveznek, hathatnak a neuronok közötti kémiai neurotranszmisszióra. Mindennek eredményeként a két neuron által képzett kémiai szinapszis felépítése egy harmadik résztvevővel, nevezetesen a nyúlványával a szinapszist beburkoló astrocytával bővül ki, ezért újabban ezt a szerkezetet „tripartite”, azaz háromsztatú szinapszisként is nevezik.

Anyagok és módszerek

Túlélő szeletpreparátum készítése

A kísérletekhez 10-14 napos ($n = 193$) Wistar patkányokat használtunk. Az állat dekapitálása után a fejet jéghideg alacsony Na^+ -tartalmú mesterséges cerebroszpinális folyadékba helyeztük és a nagyagyat valamint a kisagy eltávolítottuk, a megmaradt agytörzsből követően vibrotóm segítségével 200 μm vastag sagittális szeleteket készítettünk. A szeleteket a kísérletek kezdetéig (minimum 1 órán át) pihentettük az inkubációs kamrában, amelyik 37 °C-os, 95% O_2 és 5% CO_2 gázkeverékkel átbuborékolatott normál Na^+ -tartalmú mesterséges cerebroszpinális folyadékot (aCSF) tartalmazott.

Patch-clamp mérések és az adatok feldolgozása

A szeleteket a mérőedénybe helyeztük és a kísérlet alatt folyamatosan oxigenált aCSF oldattal perfundáltuk. A pipettába kerülő belső oldat 8 mmol/l biocitint tartalmazott. A vizsgált neuronok akcióspotenciál-tüzelésének kivédésére egyes kísérletekben a gyors, feszültségfüggő Na^+ -csatornákat blokkoló QX314-kloridot alkalmaztunk. Az elektrofiziológiai méréseket a patch-clamp technika teljes-sejtes elrendezésében végeztük (néhány kísérletben áram-clamp elrendezést is alkalmaztunk). 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 elektromos ingerlőhöz csatlakoztatott monopoláris elektróda segítségével

hoztuk létre. Az ingerlő impulzusok frekvenciáját 50 Hz-re állítottuk, az amplitudójukat pedig olyan értéken tartottuk, amely éppen képes volt kiváltani PSC-eket („minimális stimulálás”).

A gátló PSC-eket (IPSC) 10 $\mu\text{mol/l}$ NBQX és 50 $\mu\text{mol/l}$ D-AP5 jelenlétében (azaz a glutamáterg neurotransmisszió kiiktatása után) vizsgálhattuk. A serkentő PSC-k (EPSC) kiváltása 1 $\mu\text{mol/l}$ sztrichnin és 10 $\mu\text{mol/l}$ bicucullin kombinált alkalmazása mellett történt. Az adatelemzés során kiszámoltuk az úgynevezett „paired-pulse ratio”-t (PPR), amit a második és az első PSC-k amplitúdóinak hányadosa adott meg. A CCh preszinaptikus hatásának igazolása érdekében, kiszámoltuk a PSC-k csúsamplitúdóinak variációs koefficiensét (CV; $\text{CV} = \text{SD}/\text{átlag}$). Az alkalmazott anyag hatásának preszinaptikus jellegét az $1/\text{CV}^2$ érték szignifikáns csökkenése jelezte.

Neuronok biocitin jelölése

A patch-clamp mérések alatt a vizsgált sejtek feltöltődtek a pipettaoldatban levő biocitinnel. Az elektrofiziológiai kísérleteket követően a szeleteket 4% paraformaldehidet tartalmazó foszfát pufferben (PB) fixáltuk. A fixált szeleteket Triton-X 100 tartalmú, foszfát-pufferelt sóoldatban (PBS) permeabilizáltuk, majd streptavidinnel konjugáltatott Alexa 488-cal jelöltük, végül a biocitin fluoreszcenciát Zeiss LSM 510 konfokális lézer-scanning mikroszkóp segítségével vizsgáltuk és rögzítettük.

Primer astrocytatenyészet készítése

A sejttenyészet indításához 7-9 napos Wistar patkányokat használtunk. A dekapitálást követően a fejet steril, jéghideg preparáló oldatba (DS) helyeztük. A CN feltárása után azt csipesz segítségével leválasztottuk, és DS oldatot tartalmazó sterilizált üvegsőbe helyeztük. A tenyészet indításához általában 3-4 kísérleti állat CN-ait használtunk fel. A magokat tripszin tartalmú DS oldatban inkubáltuk. A tápoldat úgynevezett „Minimum Essential Medium” (MEM) volt, amelyik 10% főtális

marhaszérumot (FBS) tartalmazott. A tripszinnel emésztett szövetdarabokat 10% FBS tartalmú tápoldatban 3-szor trituráltuk, egyre kisebb átmérőjű, polírozott hegygel rendelkező Pasteur-pipettákkal. A szuszpenzió 0,5 ml-es mennyiségeit 24-lyukú tenyésztőedény alján elhelyezkedő fedőlemezekre rétegeztük. A tápoldatot először a tenyészet elkészítésének másnapján, majd ezt követően 2 naponta cseréltük.

Immunitokémia

Immunitokémiai jelöléseknél 7-10 napos, 70-80%-os konfluencia szintet elérő astrocytatenyészeteket alkalmaztunk. A fedőlemezeket nedveskamrába téve PBS oldattal mostuk, ezt követte a fixálás, majd a permeabilizálás Triton-X 100-tartalmú PBS oldatban. Az aspecifikus kötőhelyek blokkolása után alkalmaztuk a primer antitesteket, majd a következő napon a felesleges primer ellenanyagot mosással eltávolítottuk és a szekunder antitesttel inkubáltuk a mintákat, végül DAPI-val fedtük le a lemezeket. Az M1 és M3 receptorok ellen termeltett primer antitestek specifitásának vizsgálata érdekében kontroll kísérleteket végeztünk, melyekben a fedőlemezeket a megfelelő blokkoló peptiddel előinkubáltuk. Az immunreakciók vizsgálatához általában fluoreszcens mikroszkópot, néhány esetben konfokális lézer-scanning mikroszkópot alkalmaztunk.

Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérése

A mérés elve

Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérésére a Fluo-4 fluoreszcens Ca^{2+} -indikátor acetoximetil-észter formáját alkalmaztuk. A Fluo-4 festék azon Ca^{2+} -indikátorok közé tartozik, melyek emissziója Ca^{2+} hatására a teljes spektrumban fokozódik, azaz nem alkalmas úgynevezett „ratiometric” mérésekhez (a festék excitációs és emissziós maximuma 494 és 515 nm). Kísérleteink során nem tettünk erőfeszítést sem az intracelluláris festékkoncentráció meghatározására, sem kalibráció elvégzésére, ezért csak a Ca^{2+} -

koncentrációval arányos fluoreszcenciaintenzitás értékeit adjuk meg, úgynevezett „önkéntes egységek”-ben (arbitrary unit; AU).

A mérés kivitelezése, a nyert adatok feldolgozása

A mikroszkóp tárgyasztalán egy kisebb kád foglal helyet, melyben az inkubáló oldat (HaCSF) egy perfúziós rendszer segítségével folyamatosan áramoltatható. Ebbe a kádba helyeztük a fedőlemezeket, szobahőmérsékleten. 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 fluoreszcenciaintenzitás meghatározására. A szoftver az előzőleg meghatározott ROI-k átlagos fluoreszcenciaintenzitás értékeit adta meg. A Ca^{2+} -tranziensek feldolgozásakor először kiszámoltuk a háttér fluoreszcenciaintenzitás (F_h) nagyságát a sejtet nem tartalmazó ROI-ban, a Ca^{2+} -tranziens kiváltását megelőző 10 s alatt kapott értékek átlagaként. Ezt követően a sejteket tartalmazó egyes ROI-k nyugalmi fluoreszcenciaintenzitás értékeit (F_{ny}) állapítottuk meg. A fluoreszcencia tranziensekcsúcsértékét (F_{max}) és annak helyét a legnagyobb átlagot adó 3 mérési pont határozta meg. A fluoreszcenciaintenzitás-változás amplitúdóját ($\Delta F/F$) ezen adatok birtokában a

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

összefüggés segítségével számoltuk. Ugyanazon astrocytán egymást követően kiváltott Ca^{2+} -tranziensek nagyságának a relatív fluoreszcenciaintenzitás-változás ($\Delta F/F_{rel}$) értékét a

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

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).

Kvantitatív „real-time” PCR (Q-PCR)

A Q-PCR kísérletek egy részében az RNS mintát 3-80 napos patkányok CN-aiból izoláltuk, ilyenkor a teljes RNS kivonására Trizol-reagenst használtunk. A kísérletek másik részében a teljes RNS-t RNeasy Plus Mini Kit segítségével konfluens astrocytatenyészetekből izoláltuk. Az RNS mennyiségének és tisztaságának meghatározását Nano-Drop 1000 spektrofotométer segítségével végeztük. A reverz transzkripciót megelőzően DNÁz emésztést alkalmaztunk. A teljes RNS 1 µg-jából kiindulva AMV reverz-transzkriptázt és random primert felhasználva állítottunk elő cDNS-t. A Q-PCR kivitelezése az ABI PRISM 7000 Sequence Detection System készülék segítségével történt, az 5' nukleáz módszer felhasználásával. A PCR amplifikáció TaqMan primerek és próbák alkalmazásával történt. Belső kontrollként β -aktin szolgált, így az egyes mAChR mRNS-ek expressziójának relatív mennyiségét erre normálva fejeztük ki a Δ CT módszer segítségével.

Vegyszerek, statisztika

Az eredmények átlag \pm SEM formában 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, így a sejtek egyértelmű azonosítása érdekében az elektrofiziológiai mérések alatt biocitinnel töltöttük fel őket (így egy szeletben csak egy sejten végeztünk mérést). A sejtek morfológiáját konfokális felvételek alapján állapítottuk meg. Az óriássejtek azonosításánál a következő kritériumokat vettük figyelembe: nagy szómaátmérő (30-50 µm), poligonális sejttest, mely négy vagy több

dendritörzset bocsájt ki a DCN minden rétege irányába, ugyanakkor a felszíni rétegben különösen gazdagon elágazó nyúlványrendszert képez. 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 ± 2 mV-nak adódott. A vizsgált sejtek közül három külső elektromos ingerlés hiányában is akcióspotenciálokat generált.

50 $\mu\text{mol/l}$ CCh alkalmazását követően az óriássejtek nyugalmi membránpotenciálja csökkent, ezzel egyidejűleg minden vizsgált sejt magas frekvenciájú akcióspotenciál-tüzelést produkált. Eredményeink azt igazolták, hogy a CCh okozta depolarizáció csak részben felelős az óriássejtek megemelkedett aktivitásáért. A DCN óriássejtjein érvényesülő kolinerg modulációs hatás jelenlétét és élettani szerepét neostigmin alkalmazásával is megvizsgáltuk. A neostigmin (50 $\mu\text{mol/l}$) alkalmazása depolarizálta a vizsgált sejteket ($n = 5$) és rajtuk akcióspotenciál tüzelést váltott ki.

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

Az óriássejteken kiváltott IPSC-k vizsgálatához a serkentő glutamaterg szinaptikus bemeneteket NBQX és D-AP5 kombinált alkalmazásával gátoltuk. A vizsgált 162 sejt közül 146 esetben spontán IPSC-ket (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, azonban azokat egyetlen esetben sem gátolta teljesen. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az óriássejteken végződő gátló rostok főként glicinerg, és csak kisebb részük GABA-erg végződés.

A DCN felszíni, illetve mély rétegei felől elektromos ingerléssel kiváltott IPSC-sorozatok esetében különbséget állapítottuk meg. A felszíni réteg ingerlését követően kapott IPSC-k határozott rövid távú depressziót (short-term depression; STD) mutattak, szemben a mély rétegben történő ingerlést követően kialakult IPSC-vel. Utóbbiak esetében sem STD, sem rövid távú facilitáció (short-term facilitation; STF) nem volt megfigyelhető.

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, sem az IPSC-k amplitúdójában, sem a PPR értékében nem tapasztaltunk változásokat, míg a mély réteg felől történő ingerlés esetén a CCh hatására az IPSC-k amplitúdója csökkent. A CCh hatása minden esetben reverzibilisnek bizonyult.

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 azonosítására mAChR antagonistákat alkalmaztunk. Az első IPSC-kre gyakorolt CCh-gátlás mértékét úgy határoztuk meg, hogy kiszámoltuk a CCh alkalmazása előtti és alatti 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). Amennyiben a CCh és valamelyik 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-eket gátló hatását.

Mivel 10 $\mu\text{mol/l}$ atropin teljesen kivédte a CCh IPSC-kre gyakorolt gátló hatását jelezve, hogy a kolinerg modulációs hatás elsősorban mAChR-okon keresztül érvényesülhet, kísérleteket végeztünk a különböző mAChR altípusok specifikus gátlószereinek alkalmazásával is. Pirenzepin, AF-DX 116 és tropicamid nem befolyásolta jelentősen a CCh hatását. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az M1-, M2- és M4-receptorok nem érintettek az IPSC-kre gyakorolt CCh hatás létrehozásában. Ezzel szemben az M3-receptor blokkolása

4-DAMP-vel hatékonyan gátolta a CCh hatását. 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. Kimutattuk, hogy a felszíni réteg felőli ingerléssel kiváltott EPSC sorozatok esetén $50 \mu\text{mol/l}$ CCh összességében 28%-kal csökkentette az első EPSC-k nagyságát és gyakorlatilag megszüntette az STD-t. 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, kiszámoltuk az $1/CV^2$ értékeket. Az $1/CV^2$ érték CCh jelenlétében szignifikánsan csökkent ($p = 0,007037$) jelezve, hogy az EPSC-eket a CCh főként preszinaptikus mechanizmus(ok) befolyásolása révén gátolja.

A mély réteg felőli ingerléssel kiváltott EPSC sorozatok érzékenyebbek voltak CCh-ra, mint felszíni ingerléssel kiváltott társaik, ebben az esetben az első EPSC-k amplitúdója 42%-kal csökkent CCh jelenlétében. A sorozatokon belüli tagok első EPSC-re vonatkoztatott relatív amplitúdóinak meghatározása ugyanazt az eredményt adta, mint amit a felszíni ingerlés kapcsán kaptunk: a CCh jelenlétében valamennyi tag relatív amplitúdója nagyobb volt, mint kontroll körülmények között, azaz az STD jelensége megszűnt. Mivel az $1/CV^2$ értéke ebben az esetben is szignifikánsan csökkent ($p = 0,0362$), kijelenthetjük, hogy a CCh-nak a DCN mély rétege felőli ingerléssel 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 ingerlése esetén az atropin gyakorlatilag teljesen kivédte a CCh

hatását. Altípus-specifikus gátlószerek alkalmazásával kimutattuk, hogy a pirenzepin, az AF-DX 116 és a tropicamid nem befolyásolták szignifikánsan a CCh hatását, míg az M3-specifikus 4-DAMP az atropinhoz igen hasonló mértékben gátolta a CCh hatását. Ezek az eredmények tehát azt sugallják, hogy a DCN felszíni rétege felőli ingerléssel kiváltott EPSC-kre gyakorolt kolinerg modulációs hatás főként az M3 típusú mAChR-on keresztül valósul meg.

Kísérleteket végeztünk annak tanulmányozására is, hogy milyen kolinerg receptorok vesznek részt a DCN mély rétege felőli ingerléssel kiváltott EPSC-k modulációjában. Megállapítottuk, hogy a felszíni ingerlésnél tapasztaltakkal megegyező módon atropin teljesen meggátolta a CCh hatását. Pirenzepin ebben az esetben érdemlegesen nem változtatta meg a CCh hatását, míg a másik három specifikus gátlószer az atropinéhoz hasonló hatást váltott ki.

Posztszinaptikus 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 valósul meg. A kísérletek során azonban azt is megfigyeltük, hogy az óriássejtek tartóárama CCh hatására csökkent, ami arra utalt, hogy a kolinerg ingerlésnek posztszinaptikus következménye is lehet. Ezért a következőkben olyan méréseket végeztünk, amelyek alkalmasak lehetnek 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, ahol 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 $\mu\text{mol/l}$ strychnin, 10 $\mu\text{mol/l}$ NBQX és 50 $\mu\text{mol/l}$ D-AP5 együttes alkalmazásával. 50 $\mu\text{mol/l}$ CCh a kifelé irányuló tartóáram kifejezett és folyamatos csökkenését okozta. 10 $\mu\text{mol/l}$ atropin jelenlétében a CCh jóval kisebb hatást gyakorolt a tartóáramra jelezve, hogy ez a hatás valószínűleg mAChR-o(ko)n keresztül valósul meg. Megfigyeltük továbbá, hogy a jólismert, univerzális K^+ -csatornagátló tetraetil-ammónium ion (TEA^+) 10 mmol/l -es koncentrációban ugyanolyan hatást gyakorolt a tartóáramra, mint a CCh. CCh és TEA^+ együttes alkalmazása esetén további csökkenést már nem tapasztaltunk. Ezek a megfigyelések azt bizonyítják, hogy a -40 mV-os membránpotenciál-értéken tartott óriássejtek tartó áramának CCh hatására kialakuló csökkenése nagy valószínűséggel egy K^+ -konduktancia csökkenésének következménye.

Annak meghatározása érdekében, hogy mely mAChR altípusok vehetnek részt a CCh által kiváltott tartóáram csökkenésben, a korábban is használt altípus-specifikus mAChR gátlószereket alkalmaztuk. Az M4-specifikus tropicamid és az atropin a CCh-indukált tartóáram csökkenését csaknem teljesen kivédte. Az M3 blokkoló 4-DAMP kevésbé bizonyult hatékonyan. 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. A következőkben ezért megvizsgáltuk a kolinerg agonista CCh-nak az óriássejtek feszültségfüggő K^+ -áramaira gyakorolt hatását. A feszültség-clamp mérésekben a neuronok membránpotenciálját -60 mV-on tartottuk, és innen alkalmaztunk 400 ms időtartalmú feszültséglépcsőket a -100 mV és $+40$ mV közötti feszültségtartományban, 10 mV-os lépcsőkben. 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.

Megállapítottuk, hogy a CCh K^+ -áramokra kifejtett hatását atropin és tropicamid teljesen kivédte, ami arra utal, hogy a kolinerg modulációs hatás 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. A jelen munka során nem volt célunk a CCh-érzékeny áramkomponens pontosabb azonosítása.

A funkcionális eredményeket alátámasztó Q-PCR adatok

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. Q-PCR technika segítségével különböző korú (3-80 nap) patkányokból izolált CN mintákon meghatároztuk az egyes mAChR altípusok mRNS-ének relatív mennyiségét. 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 kisebb mennyiségben, míg az M5 mRNS-ének mennyisége alig érte el a kimutathatóság szintjét. Azt is megfigyeltük, hogy a 15 napos és ennél idősebb patkányok esetén az M3 és M2 mRNS mennyisége szignifikánsan nagyobb, mint a többi altípus mRNS-ének mennyisége. Megállapítottuk 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 sem volt számottevő.

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

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

Kísérleteinket CN-ből készített primer astrocytatenyészeteken hajtottuk végre. 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. Erre a célra a ma is legelfogadottabb astrocyta-specifikus markernek, a GFAP-nek immuncitokémiai kimutatását választottuk. Valamennyi kísérletünk alapján a sejtek több mint 90%-a bizonyult GFAP-pozitívnak. Az is megfigyelhető volt ugyanakkor, 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 csoportja szétterülő sejttesttel, és néhány rövid nyúlvánnyal jellemezhető. Ez a kettősség a tenyésztés során a passzálásokat követően is megmaradt.

A kolinerg moduláció tanulmányozására astrocytákon végzett kísérletek tervezésekor a megfelelő CCh-koncentráció kiválasztásához előkísérletekben az agonista különböző dózisait alkalmaztuk. Bár a CCh-ra adott válaszok igen variábilisnak bizonyultak, megállapíthattuk, 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. Ennek alapján a CCh-pozitív sejtek biztos kolinerg ingerlésére az egy nagyságrenddel nagyobb 1 mmol/l -es koncentrációt alkalmaztuk.

Már a kísérletek elején egyértelművé vált, hogy a vizsgált astrocytáknak csak kis hányada reagál 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 vagy pedig az astrocytáknak valóban csak egy kisebb populációja érzékeny a kolinerg hatásra, ellenőrző kísérletet végeztünk. Több korábbi közlemény is beszámolt arról, hogy az astrocyták igen érzékenyek ATP-re, ezért kísérleteinkben az ATP-t kívántuk pozitív kontrollként alkalmazni. Összességében 660 vizsgált sejtől 611 (92%) válaszolt Ca^{2+} -koncentráció növekedéssel 0,1 mmol/l ATP alkalmazására. Mindezek alapján nagy valószínűséggel kijelenthető, hogy az astrocytáknak valóban csak kisebb hányada tekinthető CCh-érzékenynek.

A CCh-érzékeny astrocyták alacsony előfordulásának magyarázatát keresve megvizsgáltuk, hogy kimutatható-e korreláció a CCh-ra reagáló sejtek aránya és a tenyészetek konfluenciszintje, passzázs-száma vagy a kísérleti állatok életkora között, de egyik esetben sem találtunk 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 előbbieket közül 38,8%, míg az utóbbiakból 27,6% reagált Ca^{2+} -tranzienst 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+} -tranzienst kolinerg ingerlésre.

Tekintettel arra, hogy további kísérleteinkben a CCh hatás farmakológiai befolyásolását terveztünk, a kapott hatások értelmezéséhez meg kellett vizsgálnunk, hogy mennyire állandóak az ismételt CCh kezeléssel kiváltott Ca^{2+} -koncentrációváltozások. Adataink szerint a második CCh adással kiváltott tranziensek csúcserőértéke 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 Ca^{2+} -raktáraik kiürülését tükrözi-e. A kérdés vizsgálatára ismét az ATP-t alkalmaztuk, és kimutattuk, hogy a CCh alkalmazásokat követő ATP kezelés olyan Ca^{2+} -tranzienst eredményez, amelyek amplitúdója gyakorlatilag megegyezik az első CCh alkalmazáskor kapott tranziensével.

A CCh-nal kiváltott Ca^{2+} -tranzienst időbeli lezajlásának vizsgálata

Az astrocytákon CCh-nal létrehozott Ca^{2+} -tranzienst időbeli lezajlása meglehetősen heterogénnek bizonyult. Egyes Ca^{2+} -tranzienst esetében a megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció már a CCh alkalmazás közben visszaállt a nyugalmi szintre (a továbbiakban „gyors” tranziens). Ezzel szemben a más Ca^{2+} -tranzienst esetében a gyors

csúcst követően másodlagos Ca^{2+} -koncentrációnövekedés volt megfigyelhető, ami plátó kialakulását eredményezte (innenről „plátó-szerű” tranziens). 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 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 tranziens, 112 astrocyta (50,5%) pedig plátó típusú választ. A fennmaradó 10 sejt (4,5%) csak lassú tranziens vagy Ca^{2+} -oszcillációt tapasztaltunk. Ezen utóbbi jelalakok előfordulása annyira ritka volt, hogy jelen munka keretein belül eltekintettünk szisztematikus vizsgálatuktól.

A Ca^{2+} -tranziensek heterogén időbeli lefutása arra utalt, hogy a CCh-indukálta 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-indukálta Ca^{2+} -tranzienseket. 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. A nyugalmi citoplazmatikus Ca^{2+} -szint a Ca^{2+} -elvonás hatására csökkent, a CCh-nal 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 a CCh hatására kialakuló Ca^{2+} -tranziens jelentősen kiszélesedett, jelezve egy lassú komponens megjelenését. A vizsgált sejtek közül ötben a CCh gyors Ca^{2+} -tranziens

hozott létre, 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.

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 az astrocytákban. Kimutattuk, hogy $10 \mu\text{mol/l}$ atropinnal történő előkezelés gyakorlatilag teljesen meggátolja az 1 mmol/l CCh által kiváltott Ca^{2+} -tranziens kialakulását. Az atropin gátló hatásának jellemzésekor figyelembe kellett vennünk azt a tényt, hogy a CCh ismételt alkalmazásakor eleve kisebb Ca^{2+} -tranziens kialakulása várható. A problémát a relatív $\Delta F/F$ értékek alkalmazásával oldottuk meg. Ennek során kiszámoltuk a második tranziensek első tranziensre normált nagyságát mind a kontroll esetben, mind atropin jelenlétében. Azt találtuk, hogy atropin jelenlétében a CCh által kiváltott második Ca^{2+} -tranziens szignifikánsan kisebb, mint a kontroll körülmények között kapott második tranziens. A hatás reverzibilisnek bizonyult.

Az atropin gátló hatása arra utalt, hogy a CCh hatásért mAChR-ok tehetők felelőssé. Ezt a feltevést támasztották alá a muszkarinnal kapott eredmények is. Ez az agonista $10 \mu\text{mol/l}$ -os koncentrációban plátó-típusú Ca^{2+} -tranziens hozott létre, atropinnal gátolható módon. Az atropin hatása ebben az esetben is reverzibilisnek bizonyult.

Egyes irodalmi adatok szerint a CCh 1 mmol/l -es koncentrációban már a nikotinerger acetilkolin-receptorokat is stimulálhatja, így megvizsgáltuk a nikotinerger-receptor-gátló hexamethonium hatását is. Kimutattuk, hogy a nikotinerger antagonistá $0,1 \text{ mmol/l}$ -es koncentrációban nem csökkentette szignifikánsan a CCh által kiváltott Ca^{2+} -koncentráció emelkedést.

Kísérleteket végeztünk a mAChR-ok kimutatására mRNS és fehérje szintjén. Q-PCR és immunhisztokémiai vizsgálatokkal az M1 és M3 receptorfehérjék jelenlétét mutattuk ki. Az M1 és M3 receptor altípusok jelenlétének igazolása után funkcionális jelentőségüket is vizsgálni kívántuk a CCh-indukálta Ca^{2+} -tranziensek létrehozásában. Erre a célra altípus-specifikus gátlószereket (pirenzepin és 4-DAMP) alkalmaztunk. Mindkét vizsgált receptor-antagonista dózisfüggő módon gátolta a CCh által kiváltott ic. Ca^{2+} -koncentráció-növekedést és hatásuk reverzibilisnek bizonyult.

Megbeszélés

Kolinerg neuromoduláció patkány DCN óriás neuronjai

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

Eredményeink szerint tehát az óriássejtek CCh hatásra megemelkedett aktivitása pre- és postszinaptikus folyamatok révén egyaránt kialakulhat. Az utóbbi lehetőség azt jelenti, hogy az M3 és M4 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. Míg a parallel rostok felől kiváltott EPSCk kolinerg modulációja kizárólag M3 receptorokon keresztül valósul meg, addig az akusztikus rostok felől kiváltott EPDCK befolyásolásában az M2, M3 és M4 receptorok kombinált szerepe nyert bizonyítást.

A kolinerg neuromoduláció fontos az óriássejteket elérő egyes gátló hatások módosításában is. Míg a cartwheel-sejtek felől érkező gátló bemenetek esetén a kolinerg hatás nem bizonyult hatékonynak, addig a mély réteg felől érkező gátló szinapszisok M3

receptoron keresztül történő kolinerg gátlása fokozhatja és elnyújthatja az óriássejtek aktivitását.

A hallórendszer kolinerg modulációja fiziológias és patológiás körülmények között egyaránt fontos lehet. Egy *in vivo* tanulmány például arról számolt be, hogy a hallórendszer nyugalomban is rendelkezik egy tónusos kolinerg stimulációval. A DCN-ben is megfigyelték a kolinerg moduláció erősítő szerepét, főként cochlearis károsodást vagy nagy intenzitású zajterhelést követően. Beszámoltak a VCN kolinerg modulációjáról is, a cochlea egyoldali károsodása esetén az ellenoldali hanginger fokozta a VCN ingerületét. 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. A jelen munkában bemutatott kísérleti eredményekre alapozva azt gondoljuk, hogy a kolinerg moduláció számos lehetséges támadásponttal rendelkezik mind pre-, mind posztzinaptikusan. 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, valamint azt, hogy a CCh-pozitív esetekben jelentős különbségek figyelhetők meg a Ca^{2+} -tranziensek időbeli lezajlásában. Megállapítottuk továbbá, hogy a CCh-ra reagáló astrocyták egy részében a Ca^{2+} -tranzienst 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 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 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 a tény, hogy korábban különbségekről számoltak be újszülött, illetve fiatal patkányok purinoceptorainak expressziója vonatkozásában, támogatja a feltevést, hogy hasonló életkori különbségek előfordulhatnak a muszkarinerg receptorok esetében is.

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 poszterek

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 Lívía, **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, Rio de Janeiro, 2006.

Kummulatív IF: 10,251