

OTKA nyilvántartási szám: **T 037459****ZÁRÓJELENTÉS****A KUTATÁSI TÉMA  
SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉSE**

Témavezető neve: ..... Dr. Lendvai Balázs .....  
A téma címe: ..... **Preszinaptikus moduláció megfigyelése 2-foton képalkotással** .....  
A kutatás időtartama: 2002-2005

**1. Dendrittüskék motilitásának farmakológiai modulációja.**

Az korszerű képalkotó eljárások alkalmazása újszerű farmakológiai megközelítést vitt a csoport kutatásaiba, amely számos teljesen új, meglepő megfigyeléssel gazdagította a tudományterületet a receptorok, ioncsatornák működéséről, kölcsönhatásairól. A két-foton mikroszkóp megfelelő beállításait megtalálva olyan térbeli feloldást értünk el, ami lehetővé tette a vizsgálatát a sejtek dendritjein lévő apró kitüremkedéseknek, a dendrit tüskék a morfológiájának követését órákon keresztül - annak részleteiben is. A perfundáló oldathoz vinpocetint (Cavinton) tettünk, amelytől, mint kognitív működéseket fokozó anyagtól, várható volt, hogy befolyásolja a tüskék morfológiai dinamikáját. Eredményeink rámutattak a vinpocetin hatásmódjának egy teljesen új, eddig ismeretlen aspektusára: a tüske mozgékonyágát, struktúra-átrendezési képességét serkentő hatásra. A vinpocetin hatásában feltűnő volt, hogy a már létező tüskék fején kis nyúlványok, spinulák jelentek meg, amelyek a szinaptikus és a nem-szinaptikus receptív felszín növelését szolgálták. Ezzel a felülettel arányos a külső információ fogadására alkalmas receptorok, ioncsatornák, és más membrán alkotórészek mennyisége. Elképzeléseik szerint ezeket a vinpocetin által okozott gyors változásokat az idegsejt struktúrájában a vinpocetin a citoskeletonra gyakorolt hatásán keresztül fejt ki. Így talán könnyebben értelmezhetővé válik az, hogy a vinpocetin hatását számos különböző receptoron, ioncsatornán kimutatták: a felszínre gyakorolt hatás ezek számát, így az általuk mediált funkció hatékonyságát is befolyásolja.

**2. Nikotin preszinaptikus hatásai optikai eszközökkel megfigyelve**

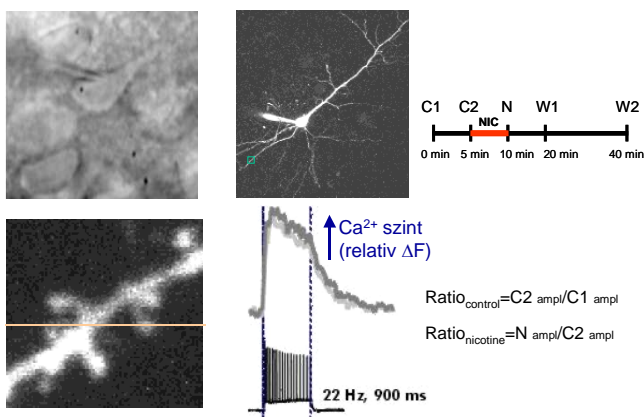
A nikotin dendritekben tapasztalható kiváltott kalcium válaszokat moduláló hatásáért preszinaptikus nikotin receptorok is okolhatóak. Kísérleteket végeztünk, hogy erre a jelenségre direkt bizonyítékokat találjunk. A feltöltött sejteken anatómiai jellegzetességeik alapján (eredés, tüskék, varikozitások, átmérő változása) megkerestük az axonok transzmitter felszabadítási helyeit, a varikozitásokat. Akciós potenciál sorozatokkal lokális kalcium emelkedéseket detektáltunk feltöltött CA1 piramissejtek axon varikozitásaiban. 120-140  $\mu\text{m}$  távolságig tudtuk követni ezeket nyúlványokat, ezt követően a töltődése ezeknek a vékony (1  $\mu\text{m}$  alatti) nyúlványoknak gátat szabott a távolabbi méréseknek. Előzetes eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a nikotin adása az axon varikozitások kalcium regulációját képes befolyásolni: 1  $\mu\text{M}$  nikotin egy 35-40 %-os serkentést okozott a terminálisok egy részében. Ez arra utal, hogy nikotin alkalmazásával a glutamát felszabadulás fokozható ezekből a boutonokból, hiszen a kalcium szint növekedése és a release között már régóta igazolt a kapcsolat. A kísérletek folytatásaképpen meg fogjuk vizsgálni az axon varikozitások heterogenitását is a nikotin reguláció szempontjából. A mérhető távolságon belül meg fogjuk vizsgálni a nikotin hatások szomától való távolság-függését is.

**3.  $\text{Ca}^{2+}$  dinamika farmakológiai modulációja a hippocampusz piramissejt dendritekben****3.1. Nikotin receptorok hatása a visszaterjedő akciós potenciálok által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensekre dendrit tüskékben**

Kísérleteinkben a nikotinnak a dendritek integrációs tulajdonságaira kifejtett hatásainak megismerését tűztük ki célul hippocampus CA1 régiójában elhelyezkedő piramissejtekben. A korábbi aktivitás rövid-távú memória nyomainak kialakításában minden bizonnyal részt vesznek a visszaterjedő akciós potenciálok által megvalósított "jelentések", amelyek a szóma felől hordozzák az információt a szinaptikus és nem-szinaptikus bemenetek számára. A visszaterjedő szignálok és a szinaptikus bemenetek között fellépő

interakciót, amely úgy tűnik jól összhangban van a celluláris szintű memória elképzelésekkel (long term potentiation és depression), más munkacsoportok igazolták nemrégiben két-foton kísérletekben. Az irodalomban uralkodó nézet szerint a nikotin receptorok a hippocampusban elsődlegesen az interneuronokat aktiválják, a piramis sejteken megfigyelhető válaszok indirektek. Ugyanakkor, elektron mikroszkópos tanulmányok szerint a piramis sejt dendritekben, és ezeknek szinte mindegyik excitátoros szinapszisában megtalálhatóak a nikotin receptorok. A jelen vizsgálatokban arra vállalkoztunk, hogy ezt a látszólagos ellentmondást feloldjuk. A hipotézisünk az, hogy a nikotin receptorok elsősorban modulátoros hatással rendelkeznek a dendritekben, és hatásaik serkentőek és gátlóak lehetnek, így a feloldásukra csak a receptort aktiváció mikrodoménjaiban van lehetőség. Hippocampus CA1 piramis sejtet Oregon Green BAPTA-1 (100  $\mu\text{M}$ ) festékkel töltöttünk fel egy patch elektródon keresztül. Akciós potenciál sorozatokkal (16 Hz, 900 ms)  $\text{Ca}^{2+}$  tranzienseket figyeltünk meg a tüskékben és a kapcsolódó dendritszakaszokban (1. ábra). Az akciós potenciálokat szómába injektált árammal váltottuk ki. Ez az igen nagy mértékű stimuláció változó nagyságú  $\text{Ca}^{2+}$  tranzienseket váltott ki a dendritfa különböző részein. Az amplitúdó megoszlásának az oka feltehetően a visszaterjedő akciós potenciál sorozatok gyengülése a felelős a dendritekben kifele haladva.

Egy 10 perces kontroll periódust követően, nikotint (1  $\mu\text{M}$ ) adtunk a perfúziós oldathoz, melyet 5 percig fenntartottunk. Az alacsony koncentráció és megfelelő időbeni lefutás alkalmas egy olyan modell felállítására, amely a dohányosok vérében kialakuló szinteket jól modellezi. Nikotin adása nem befolyásolta az akciós potenciál sorozatokban a belső frekvenciát. Sejtenként egy dendritet és egy tüskét vizsgáltunk. A válaszokat 5 és 10 perccel a nikotin perfúzió megkezdése után rögzítettük (1. ábra). A drog perfúzióját egy hosszabb kimosási szakasz követte, ez alatt a nikotin adásának kezdetét követő 20. percen egy kontroll mérést végeztünk. A nikotin hatások közéás csak azokat az eseteket soroltuk, ahol a nikotin perfúziót követően a hatás kimosható volt. Néhány esetben megfigyelhető volt, hogy az összetartozó dendrit-tüske párokban a nikotin moduláló hatása, melyet az akciós potenciál sorozatok által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensekre fejtett ki, nem volt összhangban egymással a két kompartmentben. Más esetekben az ellenkező kimenetel is előfordult: hatás a dendritben és hatástalanság a tüskében. Az akciós potenciál-kiváltotta dendritikus  $\text{Ca}^{2+}$  válaszok serkentése mögött gyaníthatóan a lokális posztszinaptikus (ill. extraszinaptikus) nikotin receptor hatás állt, de elképzelhető a preszinaptikus glutamát felszabadulás serkentése révén megvalósuló indirekt hatás.



**1. ábra.** Kísérlet menete és kísérleti protokollunk a piramis sejt nikotinikus modulációjának vizsgálata során. (balra fent) IR-DIC kép. A sejteket fluorescens festékkel töltöttük fel. (fent, középen) A sejt háromdimenziós képe egy képbe sűrítve. (balra lent) Egy bazális dendriten kiválasztottunk dendritet, tüskéket, és line scan módban mértük a fluoreszcencia változását. (középen lent) A korrelált membrán potenciál változás és  $\text{Ca}^{2+}$  jel. (jobbaldalt) A kísérleti protokollunk, és az analízishez használt kalkuláció.

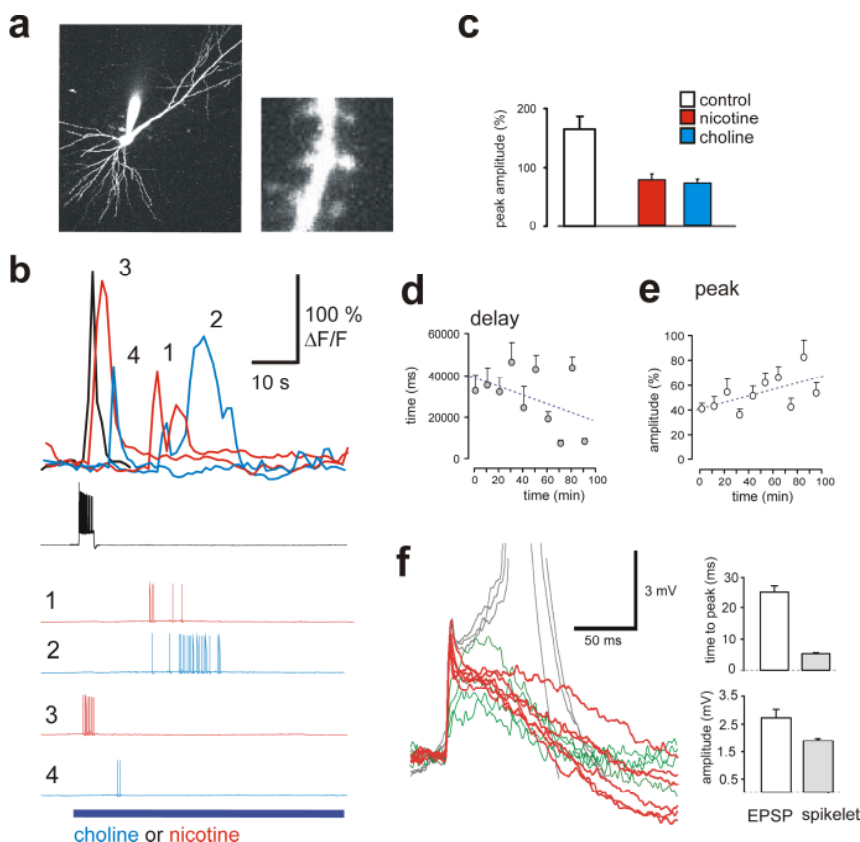
Meglepő módon a nikotin adása a hatást mutató esetek mintegy felében az akciós potenciál-által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  jel csökkenését idézte elő, amely előfordult mind a dendritekben mind a tüskékben. Ez is többféle módon magyarázható: vagy egy indirekt hatás gátló bemeneteken található nikotin receptorok révén, vagy egy lokális receptor deszenzitizációjával. A tüskékben előforduló nikotin-kiváltotta serkentés ill. gátlás

minden esetben kimosható volt. Az dendritekben keletkező ellentétes előjelű hatások a szómán könnyen elképzelhető, hogy kioltják egymást, ami megmagyarázhatja a patch clamp kísérletekben tapasztalt hatástalanságát a nikotinnak. A 2003. év folyamán azt vizsgáltuk, hogy ezt a kettős hatást milyen mechanizmussal éri el a nikotin. Feltételezhető, hogy a hatások egy része azoktól az axon terminálisoktól származik, amelyek az általunk vizsgált dendrit szakaszt, tüskéket beidegezték. Ezért egy szinaptikus koktéllal, amely CNQX-et, AP-5 és bicucullint tartalmazott, a gyors szinaptikus transzmisszió hatását kikapcsoltuk a rendszerünkéből. Eredményeink azt mutatták, hogy a blokádnak a serkentő komponens távolította el a nikotin- okozta modulációból.

### 3.2. Dendritikus regeneratív jelenségek a nikotin receptor stimulációt követően

A piramis sejtek dendritjeiben folyó  $Ca^{2+}$  dinamika vizsgálatakor egy érdekes jelenségre lettünk figyelmesek: amikor nikotin agonistákat nagyobb koncentrációban fecskendeztünk a sejtekre, az elektromos elvezetésben számos akciós potenciál jelent meg, e mellett azonban a kis amplitúdójú jelek alaposabb analizésekor kiderült, hogy az EPSP-től és az akciós potenciáloktól is eltérő jelalakú rendelkező depolarizációk is megjelentek. Mivel a felfutási idő ezekben a jelekben ( $5,3 \pm 0,3$  ms,  $n=29$ ) az akciós potenciálhoz közelebb esett ( $1,5 \pm 0,06$  ms,  $n=25$ ), mint az EPSP-hez ( $25 \pm 1,8$  ms,  $n=18$ ), minden valószínűség szerint egy a dendritben keletkezett, de az akciós potenciálhoz hasonlóan regeneratív esemény, ún. dendritikus spike (D-spike) volt a nikotin által kiváltott depolarizáció. Ezekben a kísérletekben az AMPA, NMDA és  $GABA_A$  receptorok szelektív gátlószerei is jelen voltak, így a szinaptikus bemenetek szerepe kizárható volt, a jelek posztzinaptikusan a dendritekben keletkeztek.

A nikotin-kiváltotta D-spike-okat az akciós potenciálokkal és az EPSP-vel egy léptékben ábrázolva kitűnik a jelek egyedi karakterisztikája: a D-spike felfutása rendkívül gyors, a lecsengését viszont szemmel láthatóan más tényezők határozzák meg, mint az akciós potenciált (2. ábra). A leszálló ágban a gyors esést egy sokkal lassabb lecsengés követi (2. ábra).



**2. ábra.** Nikotin receptor-által beindított dendritikus akciós potenciál-szerű jelenségek a piramis sejtekben. (a) Feltöltött CA1 piramis sejt 2-foton mikroszkópos képe. (b) Nikotin receptor agonisták (nikotin vagy kolin) nyomás adagolása akciós potenciál sorozatokat és ezekhez kapcsolódó  $Ca^{2+}$  emelkedést hozott létre.

*Kontrollként a szómába történő áraminjekcióval kiváltott 20 akciós potenciál (fekete görbe) által kiváltott  $Ca^{2+}$  emelkedést használtuk. Az ábrán 4 egymást követő drogadas hatását látjuk (1-4) (c) A nikotin receptor agonisták által kiváltott  $Ca^{2+}$  jelek átlagos amplitúdói a kontrollhoz viszonyítva. (d) A sorozatban egymás után adagolt nikotin és kolin egyre gyorsabban megjelenő elektromos és optikai választ hozott létre, a jelek látenciája csökkent. (e) A nikotin receptor agonisták által kiváltott  $Ca^{2+}$  jelek amplitúdója viszont növekedést mutat, amennyiben egymás után alkalmazzuk őket. (f) D-spike (piros görbék) EPSP (zöld görbék) és akciós potenciálok (fekete) három különböző sejtből. Jobboldalt: a fontosabb paraméterek átlagai valamennyi sejt alapján: felfutási idő (felül) és amplitúdó (alul).*

#### **4. Az aktiválás kompartmentjei interneuron dendritekben**

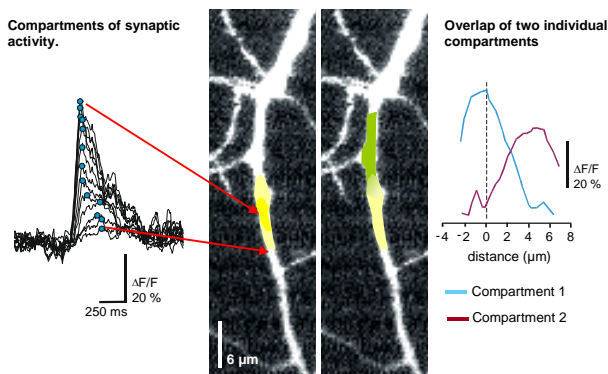
A különböző neurális jelek képesek viszonylag nagyobb (több száz mikrométeres) távolságokat megtenni a dendritekben, és így a távolabbi szinapszisok működéséről is értesül a sejttest, ahol a sejt a kimenetet generálja akciós potenciálok formájában. Kimutattuk, hogy ezen akciós potenciálok terjedése egyedi jellegzetességekkel bír az interneuronokban: szemben a piramissejtekkel, a dendriteken a távoli szinapszisok felé haladva egyre nagyobb méretűek lesznek az akciós potenciálok által kiváltott  $Ca^{2+}$  jelek. Mivel ismert volt korábbi tanulmányokból, hogy a visszaterjedő akciós potenciálok interakcióba lépve az aktív szinaptikus bemenetekkel a koincidencia érzékelésében játszanak fontos szerepet, illetve a sejt szintű tanulási modellekben az egyszerre fellépő visszaterjedő jelek és szinaptikus válaszok, szupralineárisan összegződhetnek, ami a piramissejtekben az ún. long-term potentiation-ban (tartós potenciózás) kulcsszerepet játszik. Ezért első lépésben megvizsgáltuk a szinaptikus  $Ca^{2+}$  válaszokat az interneuron dendritekben. Igazoltuk, hogy az extracelluláris stimuláló elektróddal valóban az adott dendritszakaszt beidegző axonokat aktiváltuk: megjelentek a szinaptikus átvitelre jellemző sikerek (success) és sikertelen átvitelek (failure), és a glutamáterg transzmisszió gátlásával (CNQX, AP5) kimutattuk, hogy serkentő, glutamátot használó rostok alakítják ki ezeket a szinaptikus jeleket.

A hippocampus CA1 régiójának str. radiatumában elhelyezkedő interneuronokban vizsgáltuk a szinaptikus ingerlés és a visszaterjedő akciós potenciálok hatását. A piramissejtekkel összehasonlítva ezekben a sejtekben a visszaterjedő akciós potenciál-által kiváltott  $Ca^{2+}$  válaszok lefutása elnyújtottabb volt: mind a felfutás, mind a lecsengés nagyobb időkonstanssal rendelkezett. A sejteket 1, 5, illetve 18-22 akciós potenciált tartalmazó sorozatokkal ingerelve, a dendritekben a sejttesttől a növekvő távolság függvényében emelkedő amplitúdójú  $Ca^{2+}$  tranzienseket kaptunk. Ennek oka minden bizonnyal a dendritek átmérőjének csökkenése disztális irányban, hiszen az amplitúdó ( $\Delta F/F$ ) és az átmérő fordítottan volt arányos.

A bemenetek folyamatos keresése során mintegy 30 mért sejt közül  $n=4$  sejtben sikerült lokális  $Ca^{2+}$  tranzienseket generálni néhány mikrométeres távolság alatt lecsengő válaszokat. A lokális jelleg csak a szinaptikus stimulációra vonatkozott, a visszaterjedő akciós potenciál kiváltotta válaszok már nem mutattak ilyen lokalitást. Sikerült két egymás mellett elhelyezkedő bemenethez tartozó dendrit szakaszt egy vonalba fektetni. A kísérlet során ugyanazon stimulátorelektrod pozíció mellett a jobb és bal bemenethez tartozó dendritszakasz (kompartment) felváltva lépett működésbe. A két  $Ca^{2+}$  kompartment térben részlegesen szeparálódott, ezen kívül eltérő átlagos amplitúdóval és időbeli lecsengéssel válaszoltak, és a méretük is eltért, amit a térbeli lecsengés gyorsaságán keresztül mértünk. A kompartmentek maximális választ adó pontjához képest mért távolság függvényében a maximumok a növekvő távolság függvényében egyre később jelentek meg. Adatokat kaptunk arra is hogy a szinaptikus stimuláció és a visszaterjedő akciós potenciálok szupralineáris módon összegződnek a dendrit tuskékban, míg a szublineáris vagy lineáris a szummáció a dendritekben magukban. A következő kísérletekben a nikotin jól ismert serkentő hatását, mely az interneuronokban mérhető, a különböző kompartmentekhez kössük.

Ezeket a szinaptikus ingerléssel kiváltott  $Ca^{2+}$  tranzienseket elemezve, azt fedeztük fel, hogy a  $Ca^{2+}$  válasz nemcsak az illető szinapszisknak megfelelő helyen jön létre, hanem a  $Ca^{2+}$  emelkedések egymással átfedő kompartmenteket hoznak létre (3. ábra). Ezek a kompartmentek a tuskéket nem tartalmazó interneuron dendritekben egy külön szerveződési szintet, a szignál integráció egy eddig kevésbé feltárt lépcsőjét hozzák létre. Megvizsgáltuk, hogy a szimultán alkalmazott szinaptikus ingerlés és visszaterjedő akciós potenciált

kiváltása milyen jellegű összegzést okozott az interneuronok dendritikus  $\text{Ca}^{2+}$  szintjében. Kísérleteink nem mutattak ki szupralineáris összegzést.



**3. ábra.** A hippocampális interneuronok dendritjeiben mérhető alapvető  $\text{Ca}^{2+}$  mozgások elemzése. (baloldalt) A vizsgált dendrit szakaszokban a szinaptikus ingerléssel kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  jelek kompartmentekbe rendeződtek: a jelamplitúdó folyamatosan csökkent a kompartment széleihez közeledve. (középen) A vizsgált dendrit szakasz, egy (sárga), ill. két (sárga, zöld) kompartmentek aktivációja során. (jobbra) A két átfedő kompartmentben mérhető  $\text{Ca}^{2+}$  válasz csúcs amplitúdók megoszlása.

A piramis sejtekkel összehasonlítva, az interneuronokban a visszaterjedő akciós potenciál-által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  válaszok lefutása elnyújtottabb volt: mind a felfutás, mind a lecsengés nagyobb időkonstanssal rendelkezett. Különböző  $\text{Ca}^{2+}$  kötő kapacitásokat feltételezve bizonyítottuk, hogy az interneuron dendritekben ilyen jellegű a piramis sejteket mintegy 3-szor meghaladó  $\text{Ca}^{2+}$  kötő kapacitás mellett valósulhatnak meg, ami egybeesik azzal, hogy az interneuronokban a  $\text{Ca}^{2+}$  kötő fehérjék magasabb szintjét mutatták ki korábban. Ezt az anyagot a Journal of Neuroscience-ban publikáltuk.

#### 4. Nem-szinaptikus nikotin receptor funkciók: intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ válaszok.

A nem-szinaptikus receptor működéseken belül a kevésbé ismert és megértett direkt nikotin receptor funkciókra fókuszáltunk. A nikotin receptorok elsősorban a szinapszisokon kívül helyezkednek el, ugyanakkor gyors ún. ionsatorna típusú receptorok, ami meglepő egy viszonylag lassú típusú jel – a nem-szinaptikus üzenetek ilyenek – fogadására specializálódott rendszer esetében. A kolinerg varikozitások azonban a receptorokhoz igen közel helyezkedhetnek el, és képesek egy gyorsabb transzmitter odaérési időt biztosítani, ami nem éri el a gyors szinaptikus transzmisszió sebességét, de a nem-szinaptikus kölcsönhatásokon belül egy egyedi variációt hoz létre, gyors nem-szinaptikus potenciált.

Ebben a munkában egy a kognitív funkciókban érintett agyterületen (hippokampusz) vizsgáltuk meg a nikotin receptor ingerlését követő funkcionális változásokat a stratum radiatum interneuronokban, amelyek a központi idegrendszeren belül talán az egyik nikotin receptorokat legerősebben expresszáló sejt típus. A direkt nikotin receptor hatások itt mérhetőek meg a legnagyobb biztonsággal. Továbbá az interneuronok nikotin receptorai minden bizonnyal nemcsak a más ingerek modulálásában, hanem direkt módon a sejt aktiválásban is fontos szerepet játszanak. Kísérleteinkben ezért a nikotin receptorok aktiválását acetilkolinra a sejtekre történő nyomás adagolásával értük el, ami másodperces nagyságrendű drog odaérést eredményezett és a deszenzitizáció bekövetkezésétől nem kellett tartani. A perfundáló oldatba atropint helyeztünk, így zártuk ki a muszkarin receptorok részvételét a válaszokban és biztosítottuk a nikotin receptor-mediált hatásokat. A fluorescens Oregon Green BAPTA-1 festékkel feltöltött interneuronokon a nyúlványok könnyen meghatározhatóak voltak 2-foton mikroszkópia segítségével. Az acetilkolint (ACh) egy a sejtől 100-150  $\mu\text{m}$  távolságban elhelyezett pipettából adagoltuk. Az 5 másodperces ACh adagok ismételt és igen nagymértékű  $\text{Ca}^{2+}$  emelkedést eredményeztek a sejttestben. A masszív  $\text{Ca}^{2+}$  válaszok a dendritekben is jelen voltak. A  $\text{Ca}^{2+}$  emelkedések 90-95 %-ért a nikotinikus stimulációt követő depolarizáció és az akciós potenciál sorozatok tüzelése tehető felelőssé.

Akciós potenciálok megjelenése nélkül (pl. a sejt hiperpolarizációjakor) is mérhető válaszokat kaptunk, azonban ez csak az ábrán látható válasz 5-10 %-nak felelt meg. Ezek az eredmények megmutatták az interneuronok nikotin receptorainak képességeit: a jelentős  $\text{Ca}^{2+}$  emelkedés számos sejten belüli kaszkád reakciót, más intracelluláris jelátviteli utakat indíthat be, és ezzel a sejtek működését a nikotin receptorok jelentős mértékben tudják alakítani.

## **5. Nem-szinaptikus receptor funkciók: alfa2-adrenerg receptorok és a intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ válaszok.**

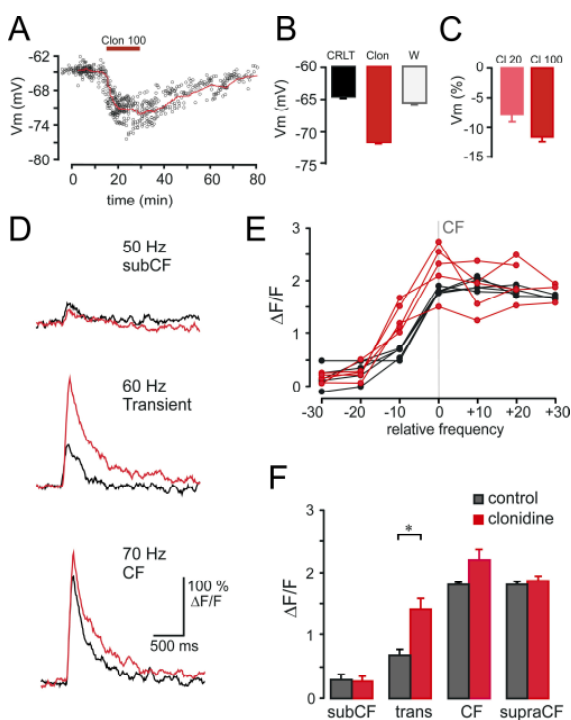
Az OTKA pályázat utolsó évében érdeklődésünk a monaminerg preszinaptikus működések tanulmányozása felé fordult: munkánkat a agykérgi piramisisejtek dendritikus  $\text{Ca}^{2+}$  dinamikájának adrenerg modulációjának tanulmányozására koncentráltunk. Korábban a nikotin receptor ingerléssel kapott dendritikus spike-ok megjelenését regisztráltuk hippokampusz piramisisejteken. A preszinaptikus modulációt áttételes módon az egyedi tüskék megfigyelésével vizsgáltuk a piramisisejteken.

Ebben a kísérletsorozatban az motivált minket, hogy megismerjük egy szintén nemszinaptikus de a nikotin receptornál lassabban és tónusosan aktiválódó receptor, az alfa2-adrenoceptorok posztszinaptikus működését. Mivel az a morfológiai vizsgálatokból jól ismert, hogy a monoamin-tartalmú boutonok túlnyomórészt (75 %) nem alkotnak szinapszist más sejtekkel, hanem az extracelluláris térbe ürítik a transzmittereket, így a noradrenalint is, levonható az a biztonságos következtetés, hogy ezek nemszinaptikusan kommunikálnak a megfelelő receptorokkal felszerelt célsejtjeikkel. Ebből adódik, bár ezt direkt módon nem mutatták ki elektron mikroszkópos vizsgálatokkal, hogy az alfa2-adrenerg receptorok elsősorban nemszinaptikus lokalizációjúak. Ebben a tekintetben a preszinaptikus receptorokhoz hasonlítanak. Hogy jobban megérthessük a működését a nemszinaptikus modulációnak, a piramisisejteket akciós potenciál sorozatok képzésére serkentettük egy szomatikus áraminjekció segítségével, és tanulmányoztuk a dendritekben kialakuló kalcium válaszokat. Az alfa2-adrenerg receptorokat egy alfa2 agonista, a klonidin 12 perces perfúziójával stimuláltuk. Ezzel modelleztük a kéregben felszabaduló és hullámként megjelenő noradrenalinnak speciálisan az alfa2-receptorokon megvalósuló hatását. Külön érdekesség ezen az agyi területen, hogy az alfa2-adrenoceptorok nemcsak preszinaptikusan az axonon helyezkednek el, hanem nagy számban megtalálhatóak a piramisisejtek dendritjein is posztszinaptikus (vagy pontosabban dendritikus lokalizációban).

A piramisisejteket egy patch pipettán keresztül Oregon Green BAPTA-1 festékkel töltöttük fel, majd az apikális dendriten kiválasztottunk szakaszokat, amelyekre vonalat fektetve mértük a kalcium jeleket az ún. line-scan módban mértük. Megállapítottuk, hogy az alacsonyabb frekvenciájú akciós potenciál sorozatok által kiváltott dendritikus kalcium tranziensek a szomától kifele haladva csökkenő amplitúdóval rendelkeznek. Ez megfelel az irodalomból már korábban ismert adatokkal. Azonban a nagyobb frekvenciájú ingerek egyáltalán nem mutatták ezt a csökkenést, sőt egy amplitúdó növekedést figyeltünk meg a szomától 500-800 mikrométer távolságban, a bifurkációhoz közeli helyen. A fő bifurkáció az apikális dendritnek az a része amelynél az addig egyenes futású dendrit szétágazik, és egy koronát, ún. tuftot formál. Általában a tuft régió a layer 1-re, tehát az agyfelszínhez közeli helyre tehető. Az eredményeket részletesen megvizsgálva kitűnt, hogy az akciós potenciál sorozatok frekvenciáját növelve, egy bizonyos frekvencia felett (kritikus frekvencia) ezen a dendritszakaszon hirtelen ugrás következett be a kiváltott kalcium válasz amplitúdójában. Ez nagyon emlékeztetett a dendritikus akciós potenciálok megjelenésére, amelyet számos korábbi irodalmi adat támaszt alá, elsősorban elektrofiziológiai mérések dendritikus patch elvezetésekben. A két-foton mikroszkópia különösen alkalmas ezeknek a jeleknek a kimutatására: egyrészt mai ismereteink szerint a dendritikus akciós potenciálok az 5. rétegbeli piramisisejteken kalcium spike-oknak felelnek meg, tehát elsődlegesen a feszültségfüggő kalcium csatornákon bejutó kalcium hozza létre az elektromos potenciálváltozást. Másrészt, lehetőség van olyan dendritek vizsgálatára, amely a patch elvezetés számára elérhetetlen: a tuft régió, másodlagos dendritek, dendrittüskék. Sikertült arra is adatokat szerezni, hogy a mélyebb 5. rétegbeli piramisisejteknél, ahol a tuft régió 1-1.2 mikrométerre volt a sejttesttől, a dendritikus spike-ok egyértelműen megjelennek (minden vagy semmi alapon képződnek a küszöbfrekvencia felett) de az amplitúdójuk kisebb, mutatva azt hogy a kalcium dinamika megváltozik

ebben a régióban, tehát erre nézve valóban egy külön kompartmentet alkot. Ennek oka lehet a felület/térfogat arány változása, és/vagy a kalcium csatornák eltérő denzitása vagy milyensége. A fentiek eldöntésére további kísérletek elvégzése szükséges.

A klonidin perfúziója meglepő módon befolyásolta a dendritikus akciós potenciálok: a klonidin jelenlétében a dendritikus akciós potenciálra jellemző magas és stabil amplitudójú jelek már a kritikus frekvencia alatti frekvencia értéken (ez általában -10 Hz-et jelentett) is megjelentek (lásd ábra). Amennyiben a frekvencia – amplitudó összefüggést vizsgáljuk, a klonidin jelenlétében mért spektrum egyértelműen balra tolódott. Ebből az a tanulság szűrhető le, hogy a felszabaduló, nemszinaptikus rendszerben működő noradrenalin a disztális dendritekben kitágítja a dendritikus akciós potenciál hatáskörét azzal hogy a spike-ok már alacsonyabb frekvencián is beindulnak. A mechanizmusa ennek a jelenségnek nem egyértelmű, hiszen az alfa2-adrenerg receptorok gátló hatásúak, a legtöbb elérhető adat szerint az adenil cikláz enzimet gátolják, ami nehezen illeszhető össze a dendritikus akciós potenciál serkentéssel. Erre vonatkozó vizsgálataink folyamatban vannak. A munkánk publikálása ezen kísérletsorozatok végére, vagyis 2006 közepére várható.



**8. ábra.** Noradrenerg hatások a dendritikus akciós potenciálok képzésére. (A) klonidin 12 perces perfúziója hiperpolarizációt vált ki a szomatikus patch elvezetésben. (B-C) A klonidin hatása kimosható és dózis-függő (átlagok – szórásértékek). (D) A klonidin (piros görbék) a kritikus frekvencia (CF) alatti (-10 Hz) ún. tranziens frekvencián dendritikus akciós potenciálok képzését segíti elő visszaterjedő akciós potenciál sorozatok hatására. (E) Kontroll (fekete) és klonidin jelenlétében mért (piros) frekvencia-kalcium jel amplitudó összefüggés. (F) A kritikus és a tranziens ill. ez alatti és feletti frekvenciákon mért átlag amplitudók összehasonlítása.

## 6. Cochleáris transzmisszió vizsgálata

A cochleáris transzmisszió vizsgálata a helyi monamin reguláció tanulmányozása miatt került be vizsgálataink fókuszába. A dopamin felszabadulását neuroprotektívnek tartják a belsőfülben. Megvizsgáltuk a dopamin felszabadulást experimentálisan előidézett ischemiás állapotban (oxigén/glukóz megvonás alatt) az in vitro tengerimalac cochlea preparátumban. Összhangban a neuroprotektív szerepről alkotott elképzelésekkel, az experimentális ischemia dopamin felszabadulást váltott ki, azonban ez csak akkor volt felismerhető, ha a D2 dopamin autoreceptorokat legátoltuk. Munkánk egyben rámutatott a D2 autoreceptorok által kifejtett gátlásra is a tengerimalac cochleában. Egy másik kísérletsorozatban a dopamin védő szerepére nyertünk további bizonyítékokat. A metabotrop glutamát receptorok közül a 2/3 csoportnak a neuroprotektív hatásáról számos munka tanúskodik az irodalomban. A mi cochlea

modellünkben a 2/3 mGluR stimulálása dopamin felszabadulást okozott amit a GABAerg sejtek gátlásán keresztül valósult meg. Tehát az egyik neuroprotektív rendszer (mGluR) hatása nem gátolja a másik szintén gátló (működést visszafogó) rendszer munkáját, mert közöttük egy GABAerg áttét van.

## **7. Összefoglaló munkák**

A nikotin receptorok működését vizsgáló kísérleteink összefoglalásául, és a felhalmozott irodalmi ismeretek rendszerezése céljából egy áttekintő reviewt készítettünk a rangos Physiological Reviews felkérésére. Ebben a munkában a nikotin receptorok működését egy új kontextusban tárgyaljuk: a nemszinaptikus hatások, tulajdonságok ismeretében próbáljuk a receptorok működésének jobb megértését elősegíteni. A két-foton mikroszkópia használatával megszerzett tudásunkat szintén egy felkért review munkában próbáltuk meg mások számára is hasznossá tenni. Itt nagy hangsúlyt kaptak olyan mérési adataink, amelyek nem egy-egy konkrét biológiai jelenség megértésére és más jelenségekkel való összehasonlítására vonatkoztak, hanem a mikroszkóp megbízható működését ellenőrző ismereteket szolgáltattak. Meggyőződésünk szerint a technikai jellegű mérési adatok is fontos szerepet játszanak a két-foton technika elterjedésében, és ezáltal új adatok megszületésében, mert a használhatósága és korlátai világosabbá válnak mindenki számára. Ezek a felkért review-k jelenleg lektorálás alatt vannak.

*Mindezek a vizsgálatok, reményeink szerint, a dendritek egy újszerű modulációs, és szignál integrációs lehetőségeit tárják fel, és közelebb visznek az idegsejtek dendritjeiben történő egyedi tanulási folyamatainak mélyebb megértéséhez.*

Budapest, 2006. 02. 28.