

**Mielinhüvely károsodást követő lipid törmelék eloszlásának a
vizsgálat a központi idegrendszerben**

és

**Agykérgi neurogliaform sejthálózat által kiváltott ionotróp és
metabotróp gátló posztzinaptikus válaszok eltérő összegződése**

Doktori értekezés tézisei

Ozsvár Attila

Témavezetők:

Dr. Tamás Gábor, Ph.D., D.Sc.

egyetemi tanár

Dr. Molnár Gábor Ph.D.

tudományos főmunkatárs

Szegedi Tudományegyetem

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

Biológia Doktori Iskola



2019

Szeged

1. Bevezetés

Doktori disszertációmban kettő egymástól független kutatási témával foglalkozok:

1. Egy újonnan fejlesztett koherens anti-Stokes Raman szóródáson (CARS) alapuló mikroszkóprendszer implementálását végeztem agyszeletekre. Ezen kísérletek során a rendszer teszteléséhez a mielinhüvely degradációjának a folyamatát vizsgáltuk.
2. Neurogliaform sejtálózat által kiváltott konvergáló ionotróp és metabotróp gátló jelek integrációjának a vizsgálatával.

1.1 Demielinizáció vizsgálata koherens anti-Stokes Raman képalkotással

A központi idegrendszerben az idegsejtek axonját mielinhüvely borítja. A mielinhüvelyt az oligodendrociták alakítják ki, azzal, hogy a csupasz axon szakaszokat spirálisan körbe ölelik finom nyúlványaikkal. Az így kialakított mielinhüvely szakaszosan előforduló elektromos szigetelőréteget alkot az axon mentén, amit csupasz axonszakaszok, az ún. Ranvier-befűződések szakítanak meg. Az elektromos ingerületvezetés ez által a nem mielinizált rostokhoz képes nagy mértékben gyorsabbá válik. Egyes neurodegeneratív betegségek, mint a sclerosis multiplex (SM) során a mielinhüvely károsodik. Patomechanizmusát tekintve demielinizációs és gyulladási folyamatok mennek végbe a mielinizált területeken. Mivel a mielinhüvely elektromos szigetelőként működik az axon mentén, a betegség korai szakaszában a mielin károsodás hatására az elektromos ingerületvezetés jelentősen romlik. A betegség későbbi szakaszában a mielindegradáció következményeként neurodegenerációs folyamatok mennek végbe. Jelenleg nem ismert a kiváltó tényezői a betegségnek, azonban feltételezhető bizonyos környezeti és genetikai tényezők. A kiváltó okokhoz hasonlóan a betegség pontos patomechanizmusa sem ismert. A legelfogadottabb nézet szerint a SM egy autoimmun eredetű betegség, amely során autoreaktív T-sejtek jutnak az központi idegrendszerbe, ezt követően pedig a mikroglia és makrofágok támadják meg a mielinhüvelyt, ezzel szelektív oligodendrocita pusztulást alakul ki. Ezzel szemben a betegség kialakulásával kapcsolatban alternatív elméletek is léteznek, mivel egyes esetekben a betegség korai stádiumában a lézió megfigyelhető limfociták jelenléte nélkül is. Ennek alapján feltételezhető, hogy az oligodendrocita pusztulás az elsődleges probléma, mivel az elpusztult oligodendrocitákból származó mielin törmelék immunválaszt vált ki, amely a gyulladási folyamatokért felelős. Ezen elmélet alapján a mielintörmelék megjelenése és eloszlása az központi idegrendszerben fontos a későbbi gyulladási folyamatok kialakításában. Napjainkban azonban konkrét adatokkal nem

rendelkezünk a mielintörmelék előfordulásáról. Disszertációmban egy újonnan fejlesztett képalkotó mikroszkóprendszer használtam a demielinizációs folyamatok vizsgálatára. A mikroszkóprendszer egy nemlineáris optikai módszer, a koherens anti-Stokes Raman szóródás (CARS) elvén működik. A CARS mikroszkópiával a molekulák saját rezgési spektrumuk alapján azonosíthatóak, vagyis ez a módszer kémiai szelektivitást biztosít bizonyos molekulák vizsgálatára. A módszer előnye a többi ismert eljáráshoz képest, hogy a biológiai struktúrák vizsgálata így nem igényel sem természetes fluoreszcenciát, sem fluoreszcens jelölést. A méréseket élő szöveten lehet elvégezni, az nélkül, hogy kémiai eljárásokkal módosítanánk/károsítanánk a biológiai szerkezetet. Ebben a munkában a mikroszkóprendszerünk lipidekben előforduló CH₂-es molekulakötés vibrációjának gerjesztésével a lipid tartalmú struktúrákat vizsgálatuk.

1.2 Agykérgi neurogliaform sejthálózat által kiváltott ionotróp és metabotróp gátló posztszinaptikus válaszok eltérő összegződése

Az agy a legbonyolultabb biológiai struktúra, amelynek szerkezeti és funkcionális feltérképezésével a mai napig több tudományterület intenzíven foglalkozik. Felépítése és komplexitása alapján vitathatatlanul az evolúciós fejlődés csúcsát képezi. Az emberi agy a testtömeg mindössze 2%-át adja, de ezt a kb. 1,3 kg tömegű struktúrát megközelítőleg $8,6 \cdot 10^{10}$ idegsejt és $8,4 \cdot 10^{10}$ gliasejt alkotja, a neuronok egymás között 10^{12} - 10^{14} számú szinaptikus kapcsolatot alakítanak ki. Az agy felszínét a réteges szerkezetű agykéreg alkotja, amely rágszálókban 1-2 mm, magasabb rendű emlősökben 3 mm vastagságú. A magasabb rendű emlősökben a szövet szembetűnő jellegzetessége a tekervényezettsége, amely például rágszálók túlnyomó többségében nem figyelhető meg. A neokortex kritikus szerepet játszik a magasabb rendű kognitív funkciók kivitelezésében, úgymint a szenzoros bemenetek feldolgozása, asszociatív gondolkodás, memória, motoros parancsok kialakítása és tudat. Ezeknek a feladatoknak a végrehajtásához a neokortikális hálózat komplex működésére van szükség.

Az neocortexben lejátszódó információfeldolgozás két nagy neuron csoport által alkotott dinamikus mikrohálózat által meghatározott. Az egyik nagy csoportot a serkentő glutamaterg idegsejtek az úgynevezett principális piramissejtek alkotják. Jellemző rájuk, hogy nagy számban vannak jelen, az agykérgi idegsejtek 85-90%-át a piramissejtek alkotják. Másik nagy csoportot a gátló GABAerg interneuronok alkotják, amelyek sokkal kisebb számban, a sejtek mintegy 10-15%-át alkotják az agykéregben. Szerepük fontos az idegrendszeri jelek

áramlásának szabályzásában és az idegrendszer dinamikus hálózati szintű működésének formálásában. A hatékony jelfeldolgozás érdekében a serkentő jeleknek változatos szabályzása szükséges, amelyről az agykéregben található rendkívül diverz interneuron populáció gondoskodik.

A heterogén interneuron populáción belül a neurogliaform sejtek egy jól elkülöníthető csoportot alkotnak. Az agykéregben a gátló interneuronok teljes mennyiségének hozzávetőleg 20%-a neurogliaform sejt. Morfológiájukat tekintve 10-20 μm átmérőjű kerek szómával rendelkeznek. A szómából kiinduló multipoláris dendritek rövidek és hamar elágaznak. A sűrű axon arborizáció túlnyomóan a szomatodendritikus elhelyezkedést követi, térben szorosan egymáshoz közel helyezkednek el. Egy-egy axon nyúlvány a szómától számítva 1000 μm távolságig is elnyúlhat, azonban az axon a szóma körül $\sim 100\text{-}150$ μm távolságra koncentráldik és teljes hossza ~ 20000 μm is lehet. Az ilyen szintű axon sűrűség egyedülálló az interneuronok között. Mindazonáltal, hogy a neurogliaform sejt axonjának a térbeli kiterjedése kis területre korlátozott, a preszinaptikus bouton sűrűsége a legnagyobb az interneuronok között. Átlagosan számítva 100 μm axonszakaszon ~ 30 preszinaptikus bouton található (ez ~ 3 μm egymást követő boutonok közötti távolságot jelent). A parvalbumin pozitív kosársejtekhez viszonyítva a neurogliaform sejteken 5-6-ször sűrűbb a preszinaptikus boutonok eloszlása.

Az utóbbi évtizedekben számos tanulmányban foglalkoztak az egyes agykérgi interneuron típusok kimenetének vizsgálatával. Többszörös patch clamp elvezetésekkel sikerül azonosítani egyes interneuron csoportoktól származó gyors kinetikájú GABA_A receptor által végbemenő gátlást, azonban sokáig kérdés volt, hogy a bifázikus GABA_A és többnyire extraszinaptikusan elhelyezkedő GABA_B receptorok aktivációját mi okozhatja. Az egyes GABA_B interneuronok szigorúan meghatározott módon célozzák meg a piramissejtek egyes szubcelluláris alegységeit, ennek kapcsán feltételezhető volt, hogy a GABA_B receptor általi dendritikus gátlás is specifikus GABA_B interneuron csoportok által mehet végbe. Emellett több kutatási eredmény is azt mutatta, hogy a GABA_B receptor aktiváció megvalósulhat több interneuron együttes aktivációja, vagy egyes neuronok hosszantartó aktivációja során, és egy ilyen GABA_B receptor aktiváció során nagymennyiségű többlet GABA neurotranszmitter szivárog a szinaptikus térből az extracelluláris térbe, elérve a GABA_B receptorokat. Ezzel szemben későbbi, laborunk által folytatott kutatások kimutatták, hogy a kombinált GABA_A és GABA_B receptor aktiváció már kiváltható egyetlen interneuron, a neurogliaform sejt egyetlen akciós potenciáljával. A szinaptikus és az extraszinaptikus receptor aktiváció arra utal, hogy egyidejű szinaptikus és nem-szinaptikus jelátvitel mehet végbe. Laborunkban folyó további kutatások beigazolták,

hogy a neurogliaform sejt az ún. térfogati jelátvitel által képes GABA neurotranszmittert felszabadítani az extracelluláris térbe, amellyel nem csak a szinaptikus GABA_A receptorokat aktiválja, de megbízhatóan vált ki a posztszinaptikus sejten extraszinaptikusan elhelyezkedő GABA_B receptor aktivációt is.

A posztszinaptikusan elhelyezkedő ion csatornák nyitása és zárása két nagy receptor protein család által diktált módon mehet végbe. Az egyik nagy receptor család az úgynevezett ligandvezérelt ioncsatornák családja. Ezek az integrált transzmembrán fehérjék két funkcionális alegységgel rendelkeznek: egy extracelluláris specifikus kötőhellyel, ami az endogén ligandok, a neurotranszmitterek számára biztosít helyet a bekötésre, illetve másik alegység egy membránon keresztül ívelő transzmembrán fehérje, ami az ionáramlás számára alakít ki csatornát. A központi idegrendszerben a fő gátló ligandvezérelt ioncsatorna a GABA_A receptor. A GABA_A receptor túlnyomó részt szinaptikusan helyezkedik el, azonban egyes izoformák jelenlétét megfigyelték extraszinaptikusan is. GABA bekötést hatására a receptor konformáció változáson megy keresztül, így nyitott állapotba kerül a csatorna, amin keresztül szelektíven Cl⁻ ionok haladnak át.

Másik nagy receptor családot a metabotróp receptorok alkotják. Nevüket onnan kapták, hogy a csatorna nyitás feltétele a közvetett metabotróp jelátviteli interakciók lejátszódása. A ligandvezérelt ioncsatornákkal ellentétben ezek a receptorok nem rendelkeznek közvetlen ioncsatorna strukturális alegységgel, helyette a környezetükben elhelyezkedő csatorna proteinek G-fehérje közvetítésével aktiválják. Emiatt a metabotróp receptorokat G-fehérje-kapcsolt receptoroknak is nevezik. Strukturálisan a metabotróp fehérjék egy neurotranszmitter-kötő extracelluláris alegységet, valamint egy intracelluláris G-fehérje-kötő alegységet tartalmaznak. Neurotranszmitter bekötés hatására a szignáltranszdukció első komponensei, a heterotrimer G-fehérjék, melyek három alegységgel rendelkeznek (α , β és γ) és inaktív formában GDP-t kötnek. GABA_B aktiváció során a G-fehérje GTP-áz aktivitású alegysége GTP-t köt, amelyet konformáció változás követ. Az α -alegység disszociál a heterotrimer komplexről és további molekuláris kaszkád folyamatokban vesz részt. Időközben a dimer $\beta\gamma$ -alegység laterálisan diffundál a plazmamembrán intracelluláris oldalán. Az $\beta\gamma$ -alegység továbbá beköthet a közeli G-fehérjéhez kapcsolt befelé egyenirányító káliumcsatornához (GIRK), amelynek hatására a kálium konduktancia megváltozik. Összességében a két posztszinaptikus receptor család aktiválása merőben eltérő posztszinaptikus válaszokat képes eredményezni az idegsejtben. A ligandvezérelt ioncsatornák rendszerint gyors, néhány tíz milliszekundum alatt lejátszódó posztszinaptikus hatásokat közvetítenek. Ezzel szemben a metabotróp receptorok az

által, hogy a működésük több molekuláris kölcsönhatáshoz van rendelve, több száz milliszekundummal lassabb hatásokat eredményeznek.

A központi idegrendszerben az idegsejtekre több ezer gátló és serkentő szinaptikus bemenet érkezik, ezeknek a bemeneteknek az összegződése fogja meghatározni azt, hogy az idegsejt membránpotenciál értéke eléri-e a küszöbpotenciál értéket, hogy akcióspotenciál keletkezzen. Az agy működésének megértésének szempontjából az, hogy hogyan dolgozzák fel az idegsejtek a bementi információt és alakítják kimeneti jellé mindig is központi kérdés volt az agykutatásban. A legtöbb szinaptikus bemenet az idegsejtek dendritikus szegmensére érkezik. Az agykérgi GABAerg gátló interneuronok széleskörű, elemi funkciókat látnak el az információ áramlás térbeli és időbeli lefolyásában azáltal, hogy a principális sejtek különböző strukturális alegységeit célzottan gátolják. Fontos szerepet játszanak a sejtek tüzelésének precizitásának fokozásában, a hálózati aktivitás szinkronizálásában vagy az agykérgi hálózatokon keresztül haladó serkentés időbeli és térbeli szabályzásában. Ezen agykérgi folyamatok lejátszódása a dendriten történő gátló szinaptikus bemenetek integrációja által valósul meg.

2. Célkitűzés

A mielinhüvely károsodás a fő okozója egyes neurodegeneratív betegségeknek, úgy mint a SM, azonban a mielin degeneráció folyamatával kapcsolatos ismereteink hiányosak. Az utóbbi időben a betegség kialakulásával kapcsolatos elmélet, miszerint a betegség autoimmun eredetű megkérdőjeleződni látszódik. Egyes kutatások alapján felmerül a kérdés, hogy az immunreakciót az oligodendrociták szelektív károsodása válthatja ki. Az utóbbi elmélet alapján a degradálódott mielinhüvelyből származó lipid törmelék akkumulációja kritikus lehet a betegség progressziója során. Ebből az okból kifolyólag, a disszertációmban a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. A CARS módszer alkalmas-e az élő, festetlen agyszövet lipid tartalmú struktúrainak a vizsgálatára?
2. A CARS módszerrel alkalmas-e a mielinhüvely szelektív károsodásának nyomon követésére? Továbbá, a különböző agyterületeken felhalmozódó lipid törmelék eloszlása feltérképezhető-e a módszer segítségével?

Az agykérgi hálózatok működése során az ionotróp receptorok által összegződő posztzinaptikus válaszok törvényszerűségéről nagyszámú ismeretekkel rendelkezünk, azonban a metabotróp receptorok által közvetített posztzinaptikus válaszok integrációjáról eddigi ismereteink szerint nincs kísérletes adat. Az agykérgi interneuronok közül a neurogliaform sejt egyedi térfogati transzmisszióval hatékonyan képes aktiválni a posztzinaptikus metabotróp GABA_B illetve, az ionotróp GABA_A receptorokat.

Disszertációmban rágsáló agykéreg felsőrétegi neurogliaform sejtek által alkotott gátló kapcsolatokat vizsgálva a következő kérdésekre kerestünk a választ:

1. Az első rétegi neurogliaform sejt által kialakított gátló kapcsolatokat milyen kvantális paraméterek jellemzik?
2. A térfogati transzmisszió által mekkora a biztosított effektív jelátviteli távolság a neurogliaform sejt preszinaptikus terminálisa és posztzinaptikus GABA receptok között?
3. Első rétegi neurogliaform sejtek által alkotott hálózat strukturális elrendeződése milyen térbeli szummációs lehetőséget szolgáltat?
4. *In vivo* körülmények között megfigyelhető-e neurogliaform sejtek együttes aktivációja?
5. Konvergáló neurogliaform sejt bementek révén generált ionotróp GABA_A és GABA_B metabotróp jelek milyen integrációs tulajdonságokkal rendelkeznek?

6. Milyen mechanizmusok befolyásolják a metabotróp GABA_B jelek integrációját?

3. Módszerek

3.1 Agyszelet készítés

A kísérletek a Szegedi Tudomány Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével történtek. Fiatal felnőtt (19 és 46 nap között, (P)23.9±4.9) Wistar patkányok lettek felhasználva a kísérletek során. Az állatokat halothánál történő elaltatását követően dekapitáltuk. Az eltávolított agyból 320 µm vastag agyszeleteket készítettünk vibráló pengéjű mikrotómmal (Microm HM 650 V) a szomatoszenzoros reprezentációért felelőse agykérgi területekből. Az agyszeletek metszése jéghideg (4°C) magas szacharóz tartalmú mesterséges agy-gerincvelő folyadékban történt, aminek összetétele mM-ban kifejezve a következő volt: 75 szacharóz, 84 NaCl, 2.5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 0.5 CaCl₂, 4 MgSO₄, 25 d (+)-glükóz, a folyadék telítve volt 95% oxigénnel és 5% szén-dioxiddal. Vágást követően az agyszeletek 36°C-on inkubáltuk 30 percig, amit követően a folyadékot lecseréltük alacsony Ca²⁺ tartalmú mesterséges agy-gerincvelő folyadékra, aminek a következő az összetétele mM-ban kifejezve: 130 NaCl, 3.5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 1 CaCl₂, 3 MgSO₄, 10 d (+)-glükóz, a folyadék telítve volt 95% oxigénnel és 5% szén-dioxiddal. Az inkubációt követően 17 °C-on tartottuk az agyszeleteket az alacsony Ca²⁺ tartalmú mesterséges agy-gerincvelő folyadékban egészen a kísérlet megkezdéséig.

3.2 *In vitro* Elektrofiziológiai mérések és farmakológia

Elektrofiziológiai vizsgálatokhoz az agyszeleteket 37°C-os kamrába helyeztünk, amelyen keresztül elvezető oldatot áramoltattunk 2-4 ml/perc sebességgel. Az mérő oldat összetételét tekintve megegyezett az alacsony Ca²⁺ tartalmú mesterséges agy-gerincvelő folyadék, kivéve a 3 mM CaCl₂ és a 1.5 mM MgSO₄ koncentráció tartalmát. Az agykérgi idegsejtekről az elektromos jeleket több csatornás whole-cell patch clamp technikával vezettünk el, egyidejűleg legfeljebb három sejtről ~37°C-on elvezető kamrában, amelyen keresztül ACSF-et áramoltattuk 3-5 ml/perc sebességgel. Az kísérleteket során az idegsejteket differenciál interferencia kontraszt (DIC) videómikroszkópiával vizualizáltuk az agyszelet felszínétől számítva 60-160 µm mélységben (Zeiss Axio Examiner LSM7 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország), Guppy F-080 CCD kamera (Allied Vision, Németország)) 40x-es nagyítású víz-immersiós objektívvel (1.0 NA; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország). A mikroszkóp asztal és az mikropipetták mozgatását Luigs and Neumann Junior mikromanipulátorokkal és SM7 manipulátorrendszerrel (Luigs and Neumann, Németország) végeztük. Az elektromos jelek HEKA EPC 10 patch clamp erősítőrendszerrel (HEKA Elektronik, Németország) rögzítettük. Az elektromos jeleket 5 kHz szűrük meg és 15kHz-en digitalizáltuk Patchmaster program használatával. A mikropipetták (3-5MΩ) alacsony klorid tartalmú intracelluláris oldattal töltöttük meg (ph 7,25; 300 MΩ), annak érdekében, hogy a GABA_A és glutamaterg események elkülöníthetőek legyenek. Az intracelluláris oldat összetétele a következő volt: 126 mM K-glükonát, 4 mM KCl, 4 mM ATP-Mg, 0,3 mM GTP-Na₂, 10 mM HEPES, 10 mM keratin-foszfát és 8 mM biocytin. A sejtek passzív membrán paramétereit és tüzelési mintázatukat nyugalmi membrán potenciál értéken mértük áramzár üzemmódban, 800 ms hosszú négyszögimpulzusok beinjektálásával. A négyszögimpulzusok -100 pA-tól kezdődtek és 20 pA-el növekedtek minden egyes ismétlés során, egészen a sejt küszöbpotenciáljának

elérésig. A szinaptikus kapcsolatok vizsgálata során a preszinaptikus sejtek stimulálása rövid időtartamú küszöbáram feletti impulzussokkal történt (800 pA, 2-3 ms), legalább 60 másodperc hosszú szünetekkel. A 100Hz frekvenciájú stimulációs protokoll esetében a szünetek hosszát legalább 300 másodpercre növeltük. A posztszinaptikus sejt membránpotenciálját -50 mV-on tartottuk. Az feszültségzár elvezetések során a sorosellenállást (R_s) és a kapacitásváltozást folyamatosan monitoroztuk. Ha a kísérletek során a soros ellenállás meghaladta a 35 MOhm-t vagy a kezdő értéktől 20%-os változás volt mérhető illetve ha kompenzált R_s értéke meghaladta a 20%-ot, akkor azokat eredményeket nem használtuk fel.

Bayesian kvantális analízis (BQA) során a preszinaptikus vezikula felszabadulási valószínűséget az extracelluláris Ca^{2+} és Mg^{2+} koncentráció változtatásával idéztük elő. BQA során kettő különböző felszabadulási valószínűségi állapotban mértük amiben az Ca^{2+}/Mg^{2+} arány mM-ban a következő lehetett: 1,5 Ca^{2+} , 3 Mg^{2+} ; 2 Ca^{2+} , 2 Mg^{2+} vagy 3 Ca^{2+} , 1,5 Mg^{2+} .

A BQA elvezetések során az ACSF a következő anyagokat tartalmazta annak érdekében, hogy a mért IPSP-k spontán szinaptikus eseményektől mentesek legyenek, illetve a lehetséges plaszticitási mechanizmusokat elkerüljük: 10 μ M (2R)-Amino-5-foszfonovaleriánsav (D-AP5) (Tocris), 10 μ M 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-szulfamoil-benzo[f]quinoxalin-2,3-dion (NBQX) (Tocris). A BQA kísérletek legalább 60 perces elvezetések kivitelezését igényelték és maximálisan legfeljebb 90 percig tartottak. Az egyes preszinaptikus vezikula felszabadulási valószínűséget jellemző szegmensenként 28-tól egészen 42 IPSC-t tartalmaztak (átlag 32.75 ± 4.15). Az összes szegmens esetében ellenőriztük a hosszú távú plaszticitás lehetőségét. Méréseink során nem találtunk korrelációt az IPSC amplitúdók és az eltelt idő között (Pearson r érték a kísérletek során ($n=8$) -0,39 és 0,46 között volt mérhető, átlag -0.01 ± 0.29).

A neurogliaform sejtek konvergáló bemeneteinek a vizsgálata során az ACSF a következő farmakonokat tartalmazta: 10 μ M 6-Imino-3-(4-metoxi-fenil)-1(6H)-piridazinebutánsav-hidrobromid (gabazine/SR9553 hidrobromid) (Tocris), 10 μ M (2R)-Amino-5-foszfonovaleriánsav (D-AP5) (Tocris), 10 μ M 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-szulfamoil-benzo[f]quinoxalin-2,3-dion (NBQX) (Tocris), 10 μ M 4-etil-fenil-amino-1,2-dimetil-6-metil-amino-pirimidinium-klorid (ZD7288) (Sigma-Aldrich), 10 μ M 1-[2-[[[difenilmetilén]imino]oxi]etil]-1,2,5,6-tetrahidro-3-piridinkarbonsav-hidroklorid (NO711) (Sigma-Aldrich). A farmakonokat előkészített törzsoldatban tároltuk -20°C a kísérleteken történő felhasználásig.

3.3 Hisztológia

Az elektrofiziológiai kísérleteket követően a biocytinnel megjelölt idegsejteket tartalmazó agyszeleteket előkészítettük a fénymikroszkópos vizsgálatokra. Az agyszeleteket nitrocellulóz papír (Millipore, USA) közé helyeztük a deformáció elkerülése érdekében és 4% paraformaldehid, 15% pikrin sav és 1,25% glutaraldehid tartalmú 0,1 M foszfát puffer-oldatba ($\text{pH}=7,4$) helyeztük és tartottuk 4°C -on legalább 12 óráig. A fixáló oldatot többszöri 0,1 M foszfát puffer-oldattal történő átmosással eltávolítottuk a szeletekről. Ezt követően 10%, majd 20% szacharóz tartalmú foszfát puffer-oldatba helyeztük a szeleteket, ami megóvja a membránszerkezetet későbbi fagyasztás során. Az agyszeleteket néhány másodpercig folyékony nitrogénbe fagyasztottuk, ezt követően 10%-os zselatinba ágyasztuk és hideg foszfát puffer-oldatban újrametsztük 60 μ m vastag szeletekre (Leica VT 1000S mikrotóm). Az újrametszett szeleteket tris pufferben oldott ($\text{pH}=7,4$) avidin-biotin peroxidáz komplexben (1:100; Vector Labs) tároltuk 4°C -on egy éjszakán át. Az enzimreakcióhoz kromogénként 0,05%-os 3'3-diaminobenzidine

tetrahydrokloridot (DAB), oxidánsként pedig 0,01 %-os H₂O₂-ot használtunk. A szeleteket utófixáltuk 1% OsO₄ tartalmú 0.1 M foszfát puffer-oldatban. Többszöri desztillált vízzel történő mosást követően pedig 1%-os uranil-acetáttal kezeltük és felszálló alkoholsorral dehidratáltuk a szeleteket. Végezetül epoxigyantába (Durcupan, Sigma-Aldrich, USA) ágyasztuk és tárgylemezre helyeztük.

3.4 Koponyaműtét

Fiatal felnőtt (22-től 28 naposig (P)24,75±2,75) hím Wistar patkányokat halotán belélegeztetését követően uretán inraperitoneális (1,4 g/kg testtömeg) beadásával elaltattuk. Altatás alatt az állat testhőmérsékletét 37°C-on tartottuk melegítő pad (Supertech Instruments, Magyarország) segítségével. A műtétet megelőzően gyulladáscsökkentés és fájdalom csillapítás céljából dexametazon-nátrium-foszfát (2 mg/kg testtömeg) bőraltati, valamint carprofen (5mg/kg testtömeg) hasüregbe történő beadását végeztük. Sztereotaxiás befogó állványba (Kopf Instruments, USA) rögzítettük a bealtatott állatok fejét. Lidokain-hidroklorid helyi érzéstelenítését követően a fejtető bőrszövetét eltávolítottuk. A koponyacsont occipitalis részére fém tartórudat rögzítettünk fogászati cementtel (Sun Medical, Japán). Az elsődleges szomatoszenzoros agykérgi terület felett, 1,5 mm poszterior és 2,2 mm laterálisan a Bregmától 3 mm átmérőjű koponya ablakot fúrtunk nagysebességű fogászati fúróval (Jinme Dental, Kína). A koponya ablak területén a koponyacsontlemez eltávolítását követően a kemény agyhártyát is óvatosan eltávolítottuk. Ezt követően a nyílás 1,5% agarózzal lett feltöltve és vékony üveglemezzel fedtük le részlegesen a mozgási artefaktum limitálásának céljából. Végezetül a HEPES tartalmú ACSF elvezető oldatban tartottuk a koponya ablakot, ami a következő összetétellel rendelkezett mM-ban kifejezve: 125 NaCl, 3,5 KCl, 10 HEPES, 1 MgSO₄, 1 CaCl₂, 0,5 d (+)-glükóz, pH= 7,4.

3.5 Két-foton Ca²⁺ képalkotás *in vivo*

A koponya ablak üveglappal való lefedését megelőzően 10 mM koncentrációjú szintetikus kalcium-érzékeny fluoreszcens festéket, Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (OGB-1 AM; Thermo Fisher Scientific, USA) és 1 μM koncentrációjú asztrocitákat jelölő festéket, szulforodamin 101-t (SR101; Thermo Fisher Scientific, USA) juttattunk be az agyszövet felső rétegébe. Az OGB-1 AM bejuttassa üvegpipettán (1-2MΩ) át történő injektálással történt folyamatos két-foton mikroszkóp (Zeiss Axio Examiner LSM7 (Carl Zeiss AG, Németország)) által történő vizuális ellenőrzés alatt, 40x-es víz-immersiós objektívvel (1.0 NA; Carl Zeiss AG, Németország). Injektálást követően agarózzal és üveglemezzel lefedtük a koponya ablakot. Képalkotó kísérletek egy órát követően kezdődtek. Az első rétegi interneuronok aktivitását ipszilaterális hátsóvégtagi elektromos stimuláció (Digimeter, Egyesült Királyság, 200mA, 10ms) alatt vizsgáltuk. Az OGB-1 AM indikátort 800nm hullámhosszú femtoszekundum hosszúságú Ti:zafír lézerpulzusokkal (Mai Tai Deep See; Spectra-physics, USA) gerjesztettük. A mikroszkóp objektívje után mért lézernyaláb maximális teljesítménye 30mW volt. A hátsóvégtagi reprezentációért felelős szomatoszenzoros agykérgi területen z-stack optikai képsorozatot rögzítettünk (304 μm x304 μm x104 μm). Ebben a térfogatban elhelyezkedő interneuronok aktivitását regisztráltuk video módban (256x100 pixel) ~20Hz képfriessítési frekvencián.

A kísérlet befejeztével egyes I. rétegi interneuronokat biocytin tartalmú intracelluláris oldattal töltöttünk fel, a későbbi immunohisztokémiai visszatérképezés megkönnyítésének céljából.

3.6 Minta előkészítés immunohisztokémiához

Az *in vivo* Ca^{2+} képalkotó kísérleteket követően az állatokat mélyaltatásba helyeztük ketamine (100mg/kg) és xylazine (10mg/kg) hasüregbe történő beadásával. Mélyalvás elérését követően a mellkast felnyitottuk és a szív aortán keresztül 0,9%-os fiziológias sóoldat áramoltattunk át ~1 percig. Amint a vért sikerült kimosni a szív jobb oldali kamráján keresztül, jéghideg 4% paraformaldehid tartalmú 0,1 M foszfátpuffer fixáló-oldatot keringettünk tovább az érrendszeren ~15 percig. Ezt követően a teljes agyat kiszedtük és tovább tároltuk 4% paraformaldehid tartalmú 0,1 M foszfátpuffer oldatban. 24 óra elteltével többször 0,1 M foszfátpuffer-oldattal átmostuk a teljes agyat. A koponya ablak területén kimetszettük az agyat egy ~3x3x3mm méretű blokk formájában, amit zselatinba ágyasztunk és a pia materrel párhuzamosan 60 μm vastag szeletekre metszettünk jéghideg 0,1 M foszfátpuffer oldatban. Továbbá a szeleteket egy éjszakán keresztül 0,1 M foszfátpuffer oldatban tartottuk.

3.7 Fluoreszcens immunohisztokémia és visszatérképezés

Többszöri 0,1 M foszfát puffer-oldatban történő mosást követően a szeleteket 10%, majd 20% szacharóz tartalmú 0,1 M foszfát puffer-oldatban helyeztük. Ezt követően a biocytinnel töltött sejtek előhívásához a szeleteket 2 óráig inkubáltuk tris-pufferben (0,1M, pH= 7,4) oldott Alexa-488-streptavidin komplexben (1:400, Molecular Probes) szobahőmérsékleten. Többszöri tris-puffer oldatban történő mosást követően a szeleteket tris-pufferben oldott normális ló szérumban (10%) blokkoltuk, ezt követően 2%-os normális ló szérumot és 0,1% Triton x-100 tartalmú tris-pufferben oldott egér anti-alfa-aktinin (1:20000, Sigma-Aldrich, USA) jelenlétében inkubáltuk 6 órát szobahőmérsékleten. Többszöri tris-puffer oldattal történő mosást követően Cy3 kötött szarar anti-egér (1:500, Jackson ImmunoResearch, UK) másodlagos antitestekkel tettük láthatóvá az immunreakciót. További tris-puffer és foszfát puffer-oldattal történő mosást követően a szeleteken DAPI-festést végeztünk (4',6-diamidino-2-fenilindol, ThermoFisher Scientific, USA). Végezetül a szeleteket Vectashield (Vector Laboratories) médiumba ágyasztuk. A szeleteket LSM 880 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (Carl Zeiss AG, Németország) vizsgáltuk 40x olaj-immenziós objektívvel (1.4 NA). A konfokális mikroszkóppal készült z-stack optikai szegmentált képsorozatot manuálisan döntöttük és forgattuk, hogy megegyezzen az orientációja a két-foton optikai képsorozattal, így lehetővé téve a interneuronok immunohisztokémiai visszatérképezését. A megfelelő orientáció megtalálásához a biocytinnel megjelölt sejteket használtuk referencia pontnak.

3.8 Adatkiértékelés

Eletrofiziológiai adatok kiértékeléséhez Fitmaster (HEKA Elektronik), Origin 7.5 (OriginLab), IgorPro (Wavemetrics) programokat használtunk. BQA kísérletek kiértékeléséhez PycLamp, Numpy és SciPy programokat használtuk. Két-foton Ca^{2+} jeleket ZEN2 (Zeiss) programmal detektáltuk és regisztráltuk, a kiértékelésük egyedi készítésű MATLAB (The MathWorks) program által történt a Statistical Toolbox, Image Processing Toolbox és saját scriptek használatával.

3.9 Statisztika

Az adatokat, mint átlag \pm standard deviáció (SD) mutatjuk be. A statisztikai tesztek az egyes kísérletek körülményeivel összhangban határoztuk meg. Az eredményeket $p < 0,05$ érték esetében vettük szignifikánsnak.

3.10 MCell model konstrukció

A GABA_B receptor GIRK csatorna közötti lejátszódó kölcsönhatást MCell v3.4 (www.mcell.org) programmal modelleztük. A modell magába foglal egy piramiselt dendritikus szakaszának elektronmikroszkóppal készült sorozatmeszt 3 dimenziós rekonstrukcióját (A 3D modell szabadon letölthető a VolRoverN programcsomaggal együtt (Edwards et al. 2014)). Továbbá a dendrit körüli extracelluláris teret is modelleztük, hogy a megfelelő tortuozitási értéket reprodukáljuk. A dendriten kívüli teret 3d mátrixba rendezett kockák alkotják, oldalhosszúságuk 800x800 nm, belsejük egy 400x400 nm széles és 340 nm mély üreget tartalmaz. Ezek a kockák 32 nm távolságra vannak elrendezve egymástól és a dendrit felszínétől. Egyedi készítésű Matlab scriptek hozták létre a MDL (Model Description Language) fájlt, ami szükséges az MCell stimuláció futtatásához. MCell program szimulálta a GABA felszabadulást, GABA_B receptor és GIRK csatorna közötti lejátszódó kölcsönhatást, és az összes sztochasztikus molekuláris mozgást.

Az egyes szimulációk lefutása a következő volt: ahhoz, hogy valóságos, a biológiai receptorok és csatornák eloszláshoz nagyon hasonló eloszlást kapjunk a szimulációban, a 3D dendrit rekonstrukciónak a membrán felületén egy reakció kaszkád futott le minden szimuláció kezdetén. Ez a reakció kaszkád eredményezte a végleges receptor eloszlást. Az első iterációk során úgynevezett elsődleges részecskéket helyeztünk el a membránban. Az elsődleges részecskék másodlagos részecskékké bomlanak, amik vagy GABA_B receptor vagy GIRK csatorna csoportosulásokat alkotnak. A másodlagos részecskéből származó GIRK csatorna csoportosulások 1-től 4 csatornát tartalmaztak, amelyek a nem voltak képesek mozgásra a membránban. Ezzel szemben, a GABA_B receptor csoportosulások a membránban laterális diffúzióban tudtak terjedni. A megfelelő késleltetést és reakció időt a GABA_B receptor csoportok képződéséhez (amelyek száma 1 és 8 közötti volt) szimulált hűtés optimalizálási Matlab algoritmus használatával határoztuk meg. Az optimális értékek elérése esetén a modellünkben a GABA_B receptorok meghatározott ideig voltak képesek a laterális diffúzióra, ezt követően immobilizálódtak, így nagyon hasonló receptor-csatorna eloszlást sikerült elérnünk, mint amelyet Kulik és munkatársai publikáltak (Kulik 2006). Ezt követően történt a GABA felszabadítása az extracelluláris tér 4 különböző pontján. Összesen 1 másodpercnél megfelelő időintervallumban vizsgáltuk a reakciók lefolyását.

Mivel a szimuláció keretein belül kizárólag a GABA_B receptor és a GIRK csatorna között lejátszódó kölcsönhatásra voltunk kíváncsiak, ezért a rendszerünk nem tartalmaz GABA_A receptorokat valamint GABA amino transzportereket. Eddigi tudomásunk szerint nincs kísérletes eredményből származó információ a NGF sejt egyetlen akciós potenciálja által felszabadított vezikulákból származó GABA koncentrációra vonatkozóan, ezért a modellünkben ~ 1 mM (3750 GABA molekula) GABA neurotranszmittert szabadítottunk fel egy-egy preszinaptikus bouton pozícióban.

Egyszerre 6 MCell szimulációt futtatunk párhuzamosan szerver számítógépen (Intel(R) Core i7-4790 3.6 Ghz CPU, 32 GB RAM), 1 μ s-os idő léptékekkel. Összesen 3322 iterációt végeztünk.

3.11 Állatok cuprizon kezelése

A Szegedi Tudomány Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével történtek a kísérletek. C57BL/6 hím egerek lettek felhasználva a kísérletek során. Az állatok táplálékhoz és vízhez szabadon hozzáfértek. 8 hetes korukat elérve legalább 5 hetes cuprizon (Sigma Aldrich) kezelés kezdődött a demielinizációs folyamatok kiváltásához (Blakemore 1973; Matsushima and Morell 2001). 0.2% cuprizon tartalmú standard porított tápot kaptak a kezelés alatt az állatok. A kezelés befejeztével a 4.1 fejezetnek megfelelően agyszeletek készültek a CARS-képalkotó kísérletek céljából.

3.12 Emberi Agyszövet előkészítése

Minden vizsgálat a Helsinki Nyilatkozat értelmében és a Szegedi Tudomány Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével történt. Az emberi agyszövet 67 éves női páciensből származik, a beteg a műtét előtt a szövetminta ilyen jellegű kutatásra való felhasználását írásban engedélyezte. A műtét a Szegedi Tudományegyetem Idegsebészeti Klinikáján történt. Midazolam és fentanyl (0.03 mg/kg, 1–2 mg/kg) intravénás beadásával indukálták az altatást. Az endotracheális intubáció könnyítésére a páciens 0,5 mg/kg rocuroniumot kapott. Intubálást követően a páciens O₂ és N₂O 1:2 arányú elegyével lélegeztették. Az anesztézia megfelelő szinten tartása szevofluránnal történt. Mélyagyi benign tumor eltávolítása céljából az kapott agyminta occipitalis agykérgi területről származik. A műtéti úton eltávolított agyszövetet jéghideg szukróz tartalmú agy-gerincvelő folyadékban szállítottuk, ezt követően pedig a 4.1 fejezet alapján metszettük azzal a különbséggel, hogy 350 µm vastag szeleteket készítettünk.

3.13 Koherens anti-Stokes Raman szóródáson alapuló képalkotás

CARS képalkotó rendszer prototípusának részletes ismertetés Haluszka és munkatársai által közölt publikációban megtekinthető (Haluszka et al. 2015). A rendszerünk magába foglal egy FemtoCARS lézer egységet és egy FemtoFiber Yb-erősítőrendszert (mindkettő egyaránt R&D Ultrafast Laser Ltd., Magyarország), Axio Examiner LSM 7 MP kétfoton mikroszkópot (Carl Zeiss, Németország), 40-es víz immerziós objektívvel (Carl Zeiss, Németország) és egy MaiTai femtoszekundumos Ti:zafir lézert (Spectra-Physics, Santa Clara, USA). A LSM 7 MP mikroszkópban az egyik NDD (non-descanned detektor) elé egy 650/20 sávszűrő lett elhelyezve. Az anti-Stokes frekvencia a Ti-zafir 796 nm hullámhosszú pumpalézer és a 1028 nm-es Yb-szálerősítő rendszer Stokes pulzusok kombinálásával értük el.

3.14 Time lapse képalkotás

Z-stack optikai képsorozat felvételeket készítettünk 60 percenként 10 órán keresztül a fehér állományról. A Z-stack képsorozatok közötti lépték 0,67 µm volt, a felbontás 1024*1024 pixel. A képsorozatokból egyetlen képet készítettünk a maximális-érték projekciójuk alapján.

3.15 Fluoreszcens jelölés

Az agyszeleteket 4% PFA tartalmú 0,1 M koncentrációjú foszfátpuffer oldatban (pH = 7,4) tartottuk 4 °C-on 3 órán keresztül. Többszöri 0,1 M koncentrációjú foszfátpuffer oldattal történő mosást követően a metszeteket 10%, majd 20% szacharóz tartalmú foszfátpuffer oldatba helyeztük. Az agyszeleteket néhány másodpercig folyékony nitrogénbe fagyasztottuk, ezt követően 10%-os zselatinba ágyaztuk és hideg foszfátpuffer oldatban újrametszettük 60 µm vastag szeletekre (Leica VT 1000S mikrotóm). Az újrametszett szeleteket tris pufferben oldott (pH= 7,4) BODIPY 493/503 (1µg/ml; Thermo Fisher Scientific) jelenétében tároltuk 4°C-on egy éjszakán át. BODIPY 493/503 törzsoldat (1mg/ml) DMSO-van volt oldva. Végezetül a szeleteket Vectashield (Vector Laboratories) médiumba ágyaztuk. A BODIPY 493/503 fluoreszcens jeleket LSM 880 konfokális mikroszkóppal (Carl Zeiss, Németország) vizsgáltuk 40x víz immerziós objektívvel (Carl Zeiss, Németország).

3.16 Felvételek kiértékelése

Fluoreszcencia értékeknek a vizsgálata ZEN (Carl Zeiss, Németország) és ImageJ (NIH, USA) programmal végeztük az agyszelet felszínétől számított legalább 20 µm mélységtől. A G-arány meghatározásához a mielinizált rostok belső és külső átmérőjének az arányát számítottuk ki. Azokon a mielinizált rostokon végeztük el a mérést, amelyek egyértelmű jelét mutatták, hogy nem károsodott vagy duzzadt. Z-stack optikai felvételeket 1 µm léptékkal készítettük. Az átmérőket a mielinizált rostokra merőleges vonal mentén mért fluoreszcencia intenzitás profil alapján végeztük. Az intenzitás profil amplitúdó értékeinek 70%-ánál határoztuk meg az átmérő értékeit Igor programban készített egyedi készítésű programparancsokkal (Wavemetrics, Lake Oswego, USA). A mielin törmelék detektálásához és térfogatának vizsgálatához az elkészült Z-stack képsorozatokon egyedileg készített C++ programnyelven íródott analízáló programot használtunk. A program a mielinizált struktúrákat és mielin törmeléket elkülönítette a háttértől, adaptív küszöbölési eljárással. A felvételeken Gauss szűrőt (5*5 pixel keret) alkalmaztunk, amivel a statikus háttér zajból származó fals objektumokat elimináltuk. Továbbá a detektált pozitív objektumokat szétválasztottuk Hugh transzformáció használatával, ezzel az esetlegesen összekötött mielin törmelékeket választottuk szét. Ezt követően a mielin törmeléket mielintől a méret (0.3-2µm) és cirkularitás (0.8-1.0) alapján különítettük el. Minden feldolgozott képet ellenőriztük, az esetleges fals pozitív objektumokat manuálisan távolítottuk el. A mielin törmelék térfogata és a kvantitatív mennyisége a rekonstruált 3 dimenziós objektumok alapján lettek kiszámítva.

4. Eredmények és megbeszélés

4.1.1. Mielinhüvely károsodást követő lipid tartalmú törmelék eloszlásának vizsgálta a központi idegrendszerben CARS mikroszkópiával

A munkánkban CARS mikroszkópiás módszer használatával képesek voltunk számszerűsíteni a lipid törmelék mennyiségét és eloszlását. Két hetes kezelést követően mérhetően kevesebb törmelék van jelen a mielinizált agyterületeken, összehasonlítva a négy hetes kezelésben részesült csoportot, ahol masszív mennyiségű törmelék akkumuláció volt megfigyelhető. Az akkumulált lipid hasonlóságot mutat a korábbi előrehaladott SM betegből származó elektronmikroszkópos felvételeken bemutatott fagocitált lipid törmelékekkel. Továbbá emberi szövetbiopszián végzett immunhisztokémiai eljárással is hasonló struktúrák megfigyelhetők. A lipid törmelék megjelenése mellett rendszerünkkel a mielin vastagságát is vizsgáltuk. Ezen mérések során feltételeztük, hogy lipid törmelék megjelenésével összhangban a demielinizációs folyamatok is nyomon követhetőek a mielinhüvelyen. A munkában bemutattuk, hogy a kontroll csoporthoz viszonyítva a korai szakaszban a mielin vastagság szempontjából szignifikáns különbség nem detektálható a kergestest területén, azonban lipid törmelék jelenléte már kimutatható. A legutóbbi megfigyelések azt mutatják, hogy 40 héttel az oligodendrociták elvesztése és a demielinizáció hatására kialakuló lassan lebomló mielin ellen az immunizálódás hiányzik, amely azt sugallja, hogy az oligodendrociták pusztulásának kezdete független lehet a komplementrendszerrel. A lipid törmelék akkumuláció összhangban van a makrofág aktivációval és a gyulladás kialakulásával. Ismert, hogy a szulfatid, amely a mielinhüvely egyik fő alkotóeleme, gyulladást képes kialakítani a központi idegrendszerben, míg a lipidet felhalmozott makrofágok krónikus gyulladási folyamatokat alakíthatnak ki a gerincvelőben. Továbbá, kutatások kimutatták, hogy pusztán lipid homogenizátum agyba történő injektálásával nagy mértékű mikroglia aktivációt és gyulladást lehet kiváltani. A degradálódott mielinből származó lipid a kiváltott gyulladási folyamatok által, a demielinizáció folyamatát tovább súlyosbítja, és akadályozza a remielinizációt. Ezért eredményeink azt a nézetet erősítik meg, miszerint az oligodendrocita pusztulást követően a növekvő mennyiségű lipid akkumulációja történik, ami a későbbi gyulladást kiváltásban játszhat szerepet.

4.2.1. Egyes neurogliaform sejtek által alkotott gátló kapcsolatok strukturális és funkcionális jellemzése

Elsőként az egyes NGF sejtek által alkotott gátló kapcsolatok strukturális és funkcionális jellemzését végeztük. E célból *in vitro* két csatornás whole-cell patch clamp elvezetéseket végeztünk 1. rétegi NGF sejten és 2./3. rétegi piramissejten patkány szomatoszenzoros agykérgi preparátumokon. Funkcionális vizsgálataink által megbecsültük a NGF sejt által alkotott gátló kapcsolat kvantális paramétereit. A funkcionális tulajdonságokon túl fénymikroszkópos háromdimenziós anatómiai vizsgálatokat végeztünk a gátló kapcsolatok strukturális feltérképezéséhez. A korrelált funkcionális és strukturális vizsgálatok eredményei megerősítették a korábbi elméleteket a térfogati jelátviteli folyamatok meglétéről, illetve kísérletes vizsgálataink alapján úgy állapítottuk meg, hogy a NGF sejt preszinaptikus terminálisából felszabaduló GABA effektív hatótávolságának becsült értéke $\sim 2\mu\text{m}$.

4.2.2. Első rétegi neurogliaform sejthálózat által alkotott gátló kimenetek strukturális jellemzése

Az egyes NGF sejtek gátló kapcsolatának jellemzését követően az agykérgi felsőrétegi NGF sejtek által alkotott hálózatot tanulmányoztuk. Anatómiai vizsgálatokkal definiáltuk a rendkívül sűrű NGF sejtekre jellemző axonhálózat és az axon mentén elhelyezkedő frekventált bouton eloszlást, illetve a felsőbb rétegi agykéregben elhelyezkedő NGF sejtek eloszlását. Ezen adatok birtokában a teljes felsőrétegi NGF sejt populáció lehetséges poszt-szinaptikus egységnyi térfogatra konvergáló bemeneteit számszerűsítettük. Eredményeink arra utalnak, hogy az agykérgi felsőbb rétegekben a térfogait transzmisszió által biztosított relatív nagy effektív jelátviteli távolság figyelembe vételével, az extracelluláris tér jelentős részén ($\sim 70\%$) egyetlen NGF sejt bemenet reprezentált. Az extracelluláris tér kisebbik része ($\sim 30\%$) pedig hozzáférhető több mint kettő NGF sejt számára, ha a teljes NGF sejtpopuláció is aktív egyidőben.

4.2.3. Első rétegi neurogliaform sejt populáció összehangolt aktivációja szomatoszenzoros agykéregbe *in vivo*

A NGF sejtpopuláció *in vivo* aktivitásával kapcsolatban jelenleg ismereteink hiányosak. Nem ismert, hogy az általunk alkotott modell alapján konvergáló bemeneteknek lehetőséget biztosító összehangolt aktivitás előfordul-e az agykéregben. Ennek kiderítése érdekében *in vivo* kétfoton Ca^{2+} képző kísérleteket végeztünk, ahol a szomatoszenzoros agyterületen követtük

nyomon a felsőbb rétegi NGF sejt populáció aktivitását ipszilaterális végtag stimuláció alatt. Kísérleteink igazolták a NGF sejtek aktív részvételét az interhemiszfériális gátlási folyamatban. Szenzoros stimulálás hatására a két agyfélteke közötti kommunikációt biztosító kallózális bemenetek által a teljes NGF sejtpopuláció ~70%-ánál figyeltünk meg összehangolt aktivációt. Eddig eredményeink arra utalnak, hogy az első rétegi NGF sejtpopuláció képes egységesen, kooperatív módon ionotróp és metabotróp GABA receptorokon keresztül gátlást kifejteni a posztszinaptikus célsejteken fiziológias körülmények között.

4.2.4. Neurogliaform sejtek által kialakított konvergens IPSP-k integrációja

Az ionotróp és metabotróp receptorok által kiváltott válaszok összegződésének vizsgálatához közvetlen elektrofiziológiai vizsgálatot, szimultán három csatornás whole-cell patch clamp méréseket végeztünk kettő 1. rétegi preszinaptikus NGF sejtről és egy 2./3. rétegi posztszinaptikus piramissejtről, amelyre a konvergens bemenetek érkeztek. Méréseink a gyors, ionotróp GABA_A receptorok által közvetített posztszinaptikus potenciálok szublineáris összegződését mutatta. A lassú, metabotróp GABA_B receptorok által közvetített válaszok azonban eltérő, lineáris összegződést mutattak. Korábbi számítógépes szimulációs módszeren alapuló tanulmányok a metabotróp receptorok összegződése esetén erőteljes szupralineáris kölcsönhatást jósoltak a G-fehérje rendszeren történő jelamplifikációs hatás miatt. Annak érdekében, hogy megértsük, milyen lehetséges mechanizmusok befolyásolják a prediktált szupralineáris összegződést, farmakológiai kísérleteket végeztünk. Eredményeink arra utalnak, hogy a esetleges HCN1 csatorna aktivitás, illetve az extracelluláris GABA visszavételi mechanizmus nem befolyásolja a posztszinaptikus sejten a GABA_B jelek integrációját.

4.2.5. GABA_B receptor és GIRK csatorna szubcelluláris relatív elhelyezkedése befolyásolja az posztszinaptikus válaszok összegződését

A posztszinaptikus sejten a GABA_B receptor és a GIRK csatorna szubcelluláris kompartment függő eloszlást mutat, a dendrit túske felületén jellemzően szoros receptor-csatorna komplex kolokalizációt, míg a dendrit törzs felületén szegregáltabb elrendeződés jellemző. Következésképp további vizsgálataink arra irányultak, hogy kiderítsük a receptor-csatorna komplex elhelyezkedés hatással van-e a metabotróp jelek integrációjára. Komplex számítógépes szimulációs környezetet alkottunk, ami magába foglalt egy ultrastrukturálisan rekonstruált dendrit szakaszt, lehetséges NGF sejt általi neurotranszmitter felszabadulási helyeket és megfelelően paraméterezett extracelluláris teret. A dendrit szakasz membrán

felületére GABA_B receptor-GIRK csatorna csoportosulásokat helyeztünk kompartment-függő eloszlással. A realiztikus térbeli szimulációs közegben a részecskék sztochasztikus mozgását és köztük lejátszódó kölcsönhatásokat MCell v3.4 programmal szimuláltuk. Eredményeink arra utalnak, hogy a receptor-csatorna komplex eloszlása önmagában hatással van a jelek integrációjára: szorosan elhelyezkedés esetében szupralineáris irányba eltolódott összegződés tapasztalható, míg a távolabbi elhelyezkedés során szublineáris eltolódás figyelhető meg.

5. Tudományos közlemények listája

MTMT azonosító: 10053020

Értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Ozsvár A, Szipőcs R, Ozsvár Z, Baka J, Barzó P, Tamás G, Molnár G. (2018) Quantitative analysis of lipid debris accumulation caused by cuprizone induced myelin degradation in different CNS areas. *Brain Res Bull.*;137:277-284. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.01.003.

IF:3.44

Ozsvár, A., Komlósi, G., Oláh, G., Baka, J., Molnár, G., Tamás, G. (2019) Superficial neurogliaform cells activation leads to different summation of ionotropic and metabotropic GABA receptor mediated postsynaptic responses.

IF: -

Egyéb közlemények:

Boldog E, Bakken TE, Hodge RD, Novotny M, Aevermann BD, Baka J, Bordé S, Close JL, Diez-Fuertes F, Ding SL, Faragó N, Kocsis ÁK, Kovács B, Maltzer Z, McCarrison JM, Miller JA, Molnár G, Oláh G, **Ozsvár A**, Rózsa M, Shehata SI, Smith KA, Sunkin SM, Tran DN, Venepally P, Wall A, Puskás LG, Barzó P, Steemers FJ, Schork NJ, Scheuermann RH, Lasken RS, Lein ES, Tamás G. (2018) Transcriptomic and morphophysiological evidence for a specialized human cortical GABAergic cell type. *Nat Neurosci.*;21(9):1185-1195. doi: 10.1038/s41593-018-0205-2.

IF: 19,912

Faragó N, Kocsis ÁK, Braskó C, Lovas S, Rózsa M, Baka J, Kovács B, Mikite K, Szemenyei V, Molnár G, **Ozsvár A**, Oláh G, Piszár I, Zvara Á, Patócs A, Barzó P, Puskás LG, Tamás G. (2016) Human neuronal changes in brain edema and increased intracranial pressure. *Acta Neuropathol Commun.*;4,78. doi: 10.1186/s40478-016-0356-x.

IF:5,414