



Válasz Prof. Dr. Dénes Ádám

Pál Balázs „*Ioncsatornákon és gliasejteken érvényesülő neuromodulációs mechanizmusok hatása az idegrendszeri excitabilitásra*” című MTA doktori értekezésének

bírálatára

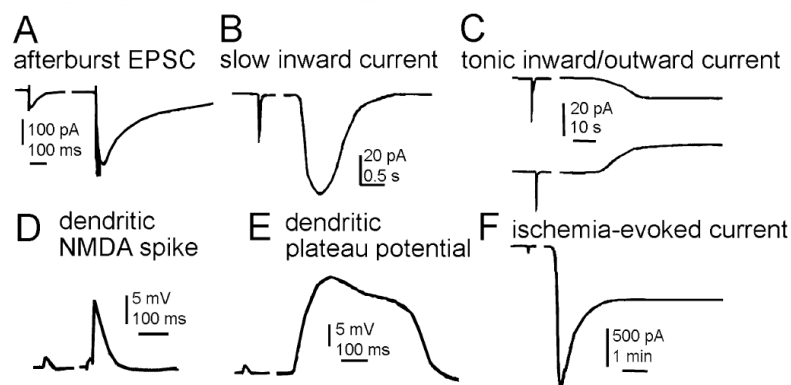
Tisztelt Prof. Dr. Dénes Ádám!

Először is szeretném megköszönni a részletes, precíz bírálatot és a kérdéseket, bírálati pontokat, amelyek segítettek nekem egy kicsit más szempontból szemlélni eddigi munkámat. Hiszem, hogy mindezek a jövőbeli kutatási irányok meghatározásához, eredményesebbé tételéhez is hozzájárulnak.

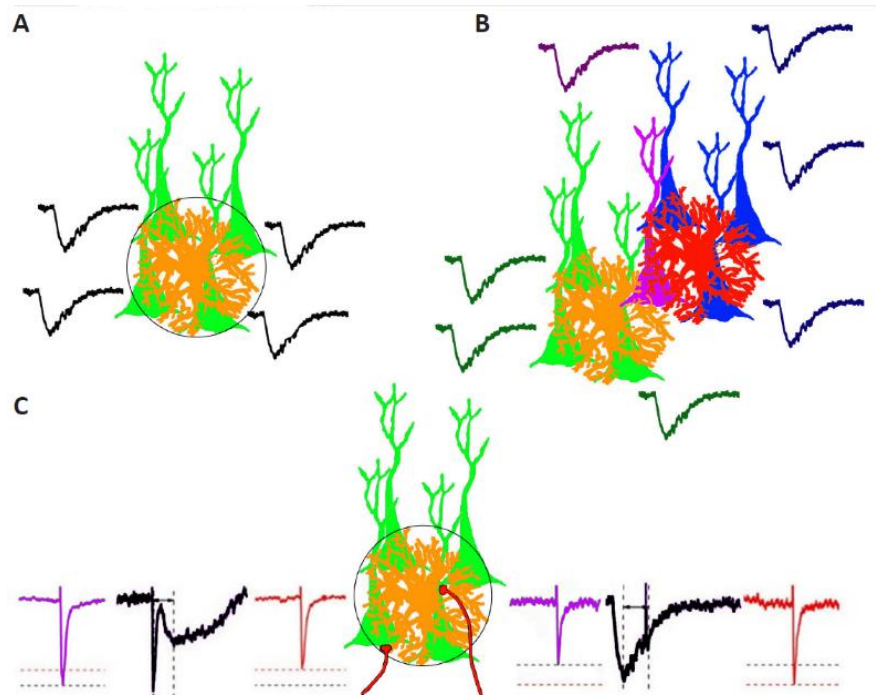
Az értekezés szerkezete, a vizsgált struktúrákon végzett tanulmányok szerteágazóak. Ennek egyrészt az az oka, hogy a PhD védésem óta, posztdokorként végzett munkámat, projektjeimet is szerettem volna megmutatni. Az egyik ilyen munkám az ANO2/TMEM16B knockout egér első elektrofiziológiai vizsgálata volt, amit Prof. Thomas Jentsch laboratóriumában (MDC/FMP, Berlin, Németország). A bemutatott, szaglóhámon végzett vizsgálatok mellett előkísérletes adatokat nyertem a retináról is. A központi idegrendszeri vonatkozásokat itt nem vizsgáltam, pedig ez is releváns volna az idegrendszeri excitabilitás szabályozásának megismeréséhez. A hippocampusban és a septum laterálisban is kimutatták, hogy ez az ioncsatorna az akcióspotenciál-tüzelést és a serkentő szinaptikus neurotranszmissziót is szabályozza (Huang és mtsai, 2012; Wang és mtsai, 2019; Lee és mtsai, 2023). A hallópálya vizsgálata a debreceni, Prof. Szücs Géza és Dr. Rusznák Zoltán által irányított laboratórium kutatási témája volt. Az én hozzájárulásom ehhez, és egyéni érdeklődésem a nagyobb témán belül a hallópálya kolinerg neuromodulációjának vizsgálata volt. A kolinerg és további más neuromodulációs hatások vizsgálatát, immár saját profilként egy olyan, ugyancsak agytörzsi struktúrán folytattam, ami számos neurológiai,

neuropszichiátriai megbetegedés esetén relevánsabb. Ez a retikuláris aktivációs rendszer és az ezen belül is fokozott figyelmet kapott struktúra, a nucleus pedunculopontinus volt. Az egyik főbb megállapításunk az volt a struktúra neuromodulációs szabályozásával kapcsolatban, hogy annak egy jelentős része asztrocita-függő. Ez vezetett arra, hogy az asztrocita-neuron kommunikáció elektrofiziológia módszerekkel tetten érhető részének általános vizsgálatával folytassam a munkámat, efelé irányítsam a laboratórium fő profilját.

A Bevezetés bírálatában említett, az extraszinaptikus áramok sajátosságait bemutató ábrát alább pótolom.



1.ábra. Az extraszinaptikus glutamát felszabadulás által keltett neuronális áramok/potenciálváltozások vázlatos rajza. Az első bemutatott áram/potenciál minden panel esetében az EPSC/EPSP; összehasonlítás végett. A. Burst tüzelés utáni EPSC. B. Lassú inward áram (SIC). C. Tónusos befelé/kifelé irányuló áram. D. Dendritikus NMDA tüske. E. Dendritikus platópotenciál. F. Ischaemiás áram (ld. Pál, 2018).



2.ábra. A SIC-ek lehetséges szerepei. A. Az egy asztrocita-doménen belüli neuronok szinkronizációja (sárga: asztrocita, szaggatott kör: asztrocita domén, zöld: a doménen belüli neuronok, fekete görbék: SIC-ek). B. Egy neuron tartozhat több asztrocita doménhez is (lila: két doménhez tartozó neuron, sárga, piros: asztrociták, kék, zöld: csak az egyik asztrocita doménhez tartozó neuronok, zöld/kék görbék: csak az egyik doménhez tartozó neuronok által produkált SIC-ek; lila: mindkét doménhez tartozó neuronok által produkált SIC). C. A SIC-ek létrehozhatnak időzítésfüggő szinaptikus plaszticitást (sárga: asztrocita, zöld: neuron, piros: szinaptikus bemenet, lila görbék: EPSC a SIC előtt, piros görbék: EPSC a SIC után, fekete görbék: SIC-ek és EPSC-k, eltérő időzítéssel; Pál, 2024).

A mikroszkópia és a hisztológiai technikák részletesebb leírását ott alkalmaztam, ahol a laboratórium saját méréseit mutattam be. Több más esetben kollaborációs partnereink hozzájárulása volt az immunhisztokémia (Dr. Szücs Péter, DE ÁOK Anatómiai Intézet; Dr. Guillermo Spitzmaul, Bahia Blanca, Argentína). A szövegben említettem a hozzájárulásukat és csak a kísérletek alapvető megértéséhez szükséges mértékben mutattam be a protokollokat.

Egyetértek a Bírálóval az optogenetikai asztrocita aktiváció és a CB1 receptor mediált hatások neurokémiai fenotípust bemutató vizsgálatokkal kapcsolatban. Ezt bizonyos tanulmányokban megtettük (Kőszeghy és mtsai, 2015; Kovács és Pál, 2017), míg más



tanulmányban nem (Kovács és mtsai, 2017). Itt az eredeti cikkben a korábbi munkákra hivatkoztunk (ld. fent). Ennek a technikai oka az volt, hogy egy eredetileg nagyobb tanulmányt két külön kéziratra „vágunk” az első bírálói javaslatoknak megfelelően (Kószeghy és mtsai, 2015; Kovács és mtsai, 2017), majd az utóbbit néhány további méréssel egészítettük ki.

A PPN asztrociták *in vivo* kemo- és optogenetikai aktivációjával végzett kísérletek folyamatban vannak. Itt azt találtuk, hogy a szenzoros kapuzást, motoros szabályozást és a cirkadián ritmust kisebb mértékben, de kimutathatóan és szignifikánsan érinti a PPN asztrocitáinak stimulációja.

A Bíráló kérdéseire az alábbiakban kívánok válaszolni.

- 1. A jelölt a bevezetésben említi, hogy a Gq kapcsolt muszkarinos acetilkolin receptorok aktivációja mellett más G protein kapcsolt receptorok (mint a P2Y purinerg, a GPR55 kannabinoid, az 5HTC2 szerotoninerg, az 1-es típusú angiotenzin vagy a 2-es típusú bradikinin receptorok) is képesek az M-áramot gátolni. Az agyi parenchymában a P2Y12 és P2Y13 receptorok kifejezetten a mikroglia sejteken fejeződnek ki. Elképzelhető, hogy a mikroglia, amely modulálja a neuronális excitabilitást szerepet játszhat az M-áram szabályozásában is? Amennyiben ezt korábban nem vizsgálták agyszeleteken vagy in vivo, érdemes lenne ilyen témájú kísérleteket végezni.***

Direkt megfigyelések nincsenek az irodalomban a mikroglia M-áramának és a purinerg receptorok aktivációjának összefüggéseiről, de a kevés rendelkezésre álló adat alapján elképzelhető, hogy ez egy fontos szabályozó útvonal. A mikroglia rendelkezik M-árammal, aminek ismert funkcionális jelentősége is van. Patkány primer mikroglia tenyészetben leírták az M-áram jelenlétét mind morfológiai, mind funkcionális módszerekkel. Az M-áram farmakológiai gátlása a nyugvó mikroglia migrációs kapacitását gátolta (Vay és mtsai, 2020).



A purinerg receptorok, a mikroglia és az M-áram indirekt összefüggéseiről is ismert adat. Hippocampalis *in vitro* neuroinflammáció modellben a mikroglia aktiváció és a következményes ATP felszabadulás az asztrocitákra P2Y1 receptoron keresztül hat. Az asztrocitákból glutamát szabadul fel, ami neuronális mGluR5 aktiváción keresztül gátolja a hippocampalis piramissejtek M-áramát, és fokozza azok excitabilitását (Tzour és mtsai, 2017). Ezzel a közleménnyel kapcsolatban szeretném megjegyezni, hogy több eltérő projektemet is érint azáltal, hogy összekapcsolja az M-áramon keresztüli neuromodulációt az extraszinaptikus glutamáttal.

2. A bevezetésben szó esik az asztrociták által szabályozott fázisos és tónusos áramokról, amelyek számos agyterületen megfigyelhetők. Az idézett irodalom jelentős része ugyanakkor jóval a modern kemogenetikus / optogenetikus módszerek és kondicionális KO egér modellek elterjedése előtti kutatásokból származik, miközben még jelenleg is komoly kihívást okoz az asztrociták élettani folyamatainak szelektív farmakológiai modulációja. Érdekelne a jelölt véleménye, hogy a korábban alkalmazott módszerek közül melyek voltak alkalmasak asztrocita-specifikus hatások igazolására és mennyiben módosult a korábbi szemlélet a fent említett új módszerek megjelenését követően.

A kemo-/optogenetika és más transzgén technikák elterjedése előtt az asztrocita funkciók szelektív manipulálása farmakológiai módszerekkel (pl. nagyrészt asztrocita aktiváció ATP-vel vagy t-ACPD-vel, asztrocita gátlás fluorocitráttal és –acetáttal, neuronok gátlása TTX alkalmazásával, vezikula felszabadulás gátlása bafilomycin A1-gyel, glutamát transzporter gátlása) vagy mechanikai módszerekkel (hipoozmotikus mérőoldat, egyetlen asztrocita mechanikai ingerlése) került kivitelezésre. A nagyobb és precizitásra törekvő tanulmányok ezeket a módszereket kalcium képképzéssel kombinálva használták (Fellin és mtsai, 2004; Angulo és mtsai, 2004; Kozlov és mtsai, 2006; Shigetomi és mtsai, 2008; Nie és mtsai, 2010; ld. Pál, 2024). A transzgén technikák előtti valószínűleg még szelektivebb asztrocita stimuláció volt az egyetlen asztrocita mikroperfúziója NP-EGTÁ-val és az ezt követő kalcium uncaging,



vagy szintén egyetlen sejtet célzó mikroperfúzió IP₃-mal vagy BAPTÁ-val (Tian és mtsai, 2005; Parri és mtsai, 2010).

Az opto- és kemogenetika látszólag egy csapásra oldotta meg a szelektivitási problémákat, de valójában ez még mindig nem teljesült. Először, az általánosan használt cre-lox rendszerek és a GFAP promoter használata bizonyos törzseknél (B6.Cg-Tg(Gfap-cre)^{73.12Mvs/J}) azzal jár, hogy neuronális cre expresszió van bizonyos agyterületeken (nagy részt a gyrus dentatusban és a zona subventricularisban, de hippocampalis piramissejteken és cerebellaris szemcsesejteken, valamint sporadikusan a közepagyban; Garcia és mtsai, 2004). Másodsor, a prototípusos channelrhodopsin-2 egy olyan kationcsatorna, amelyen keresztül a sejtől K⁺ lép ki és H⁺ a sejt belsejébe (pl. Nagel és mtsai, 2005). Az előbbi a neuronok környezetében megemeli az extracelluláris K⁺ koncentrációt és ezáltal műtermékként neuronális depolarizációt okoz (Octeau és mtsai, 2019). A sejtbe történő nettó kation beáramlás sejtduzzadáshoz vezet. A halorhodopsin, ami a neuronális excitabilitás ugyancsak prototípusos gátló hatású optogenetikai aktuátora, asztrociták gátlására nem elterjedt (mindössze egyetlen tanulmányban szerepel eddig; Kc és mtsai, 2023). A G-protein kapcsolt opto- és kemogenetikai aktuátorok (OptoXR, melanopsin, hM3D) a fiziológiához közelebb asztrocita stimulációt tesznek lehetővé, ugyanakkor, figyelemre méltó módon az asztrocitákon jelen levő hM4D stimulációja a neuroinflammatorikus választ gátolja (Mederos és mtsai, 2019; Adamsky és mtsai, 2018; Kim és mtsai, 2021). Továbbá, az asztrociták egységes populációként kezelése és tömeges aktivációja egyre kevésbé tekinthető a fiziológias körülményeket modellező módszernek, mivel számos, markerek alapján és funkcionálisan is elkülönülő asztrocita alpopuláció ismert (De Cegila és mtsai, 2023; pl. Huber és mtsai, 2024). Az asztrociták aktivációja ugyancsak messze nem egységes, nem lehet azt mechanisztikusan egy G-proteinnel ki-bekapcsolhatónak tekinteni (pl. Huber és mtsai, 2024).

A fentiek alapján, továbbra is több módszer kombinációjából lehet pontosabb következtetéseket levonni. Ugyanakkor a valószínűleg legszelektívebb módszer az asztrociták fiziológias (és kórtani) funkcióinak megértésére azok (vagy aktivációjuk következményeinek) szelektív megfigyelése, funkcióik megváltoztatásának szándéka nélkül. Erre lehetőséget nyújtanak genetikailag kódolt kalcium- és glutamát indikátorok (mint pl. a GCaMP és iGluSnFr fehérjék, pl. Zhang és Looger, 2024; Liang és mtsai, 2015).



- 3. *Az elvégzett kemogenetikai kísérletek során az hM3D receptort clozapine N-oxid (CNO) segítségével aktiválták. Ismert, hogy a CNO spontán hidrolízise miatt beadását clozapine felszabadulás kíséri, amely a megfigyelések szerint zavarhatja mind az in vivo, mind az in vitro kísérletek értelmezését. A jelölt a kolinerg rendszert kiemelten vizsgálta, mely esetben ez a probléma mindenképpen komoly megfontolást igényel. Tapasztaltak CNO hatást a kontroll mérések során hM3D receptort nem kifejező sejtekben? Próbáltak esetleg más, kevésbé bomlékony hM3D agonistákat a CNO mellett?***

A CNO és az abból felszabaduló clozapine valóban befolyásol bizonyos in vivo paramétereket, potenciálisan torzítva a kapott eredményeket. Kísérleteinkben éppen ezért kontroll csoportként olyan állatokat használunk, amelyeket ugyanúgy operálunk és kezelünk CNO-val, mint a vizsgált fő populációt. A kontroll csoportban azonban ugyanazon promoter alatt kizárólag a fluoreszcens jelölő molekulát (esetünkben mCherry-t) fejeztetünk ki kemogenetikai aktuátor nélkül. Számunkra a legzavaróbb „mellékhatás” az akusztikus startle reflex CNO/clozapine általi gátlása DREADD nélkül is (MacLaren és mtsai, 2016). Éppen ezért, a PnC neuronok kemogenetikai stimulációja során látott startle amplitúdó növekedést valószínűleg valamennyire alulbecsültük. Ezt a gyanút a releváns cikk diszkussziójában megjelenítettük (Maamrah és mtsai, 2023).

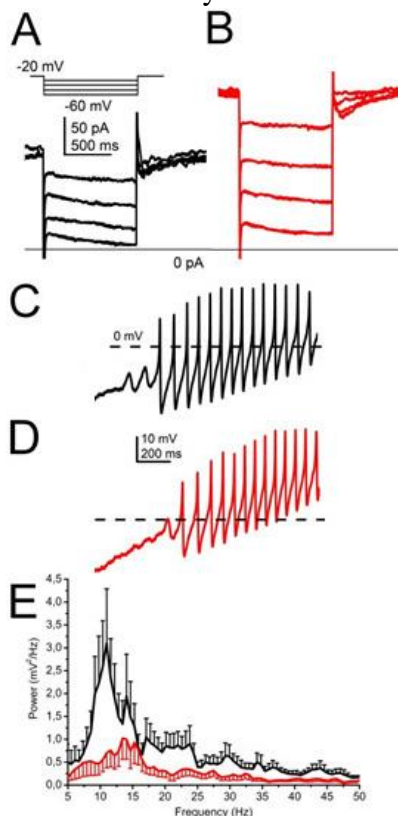
- 4. *Az M-áramról a jelölt leírja, hogy a kolinerg sejtek jellemzője és GABAerg neuronokban nem fordul elő, miközben a glutamaterg sejteknek csak kis százalékában figyelhető meg. Az M-áram gátlószerének, az XE991-nek hatására a kolinerg neuronok tüzelési frekvenciája megnövekedett. Emellett, a magas küszöbű membránpotenciál-oszcilláció is kolinerg neuronokban fordult elő, és glutamaterg sejtekben csak egy, acetilkolin kotranszmitterrel rendelkező kis alpopulációban figyelték meg. Ezen összehasonlítások háttérében alapvetően a különböző***



sejtpopulációk eltérő ioncsatornái, morfológiai jellemzői és számos sejtélettani különbség is sejthető. Vannak funkcionális vizsgálatok arra, hogy az M-áram kialakulása és a magas küszöbű membránpotenciál-oszcilláció mennyiben igényli az acetilkolin jelenlétét, vagy meghatározó szerepét a kolinerg sejtek fenotípusának kialakításában? Vizsgálták esetleg, hogy kolin acetiltransferáz (ChAT) KO egerekben hogyan változik meg a KCNQ alegységek eloszlása és a csatorna működése?

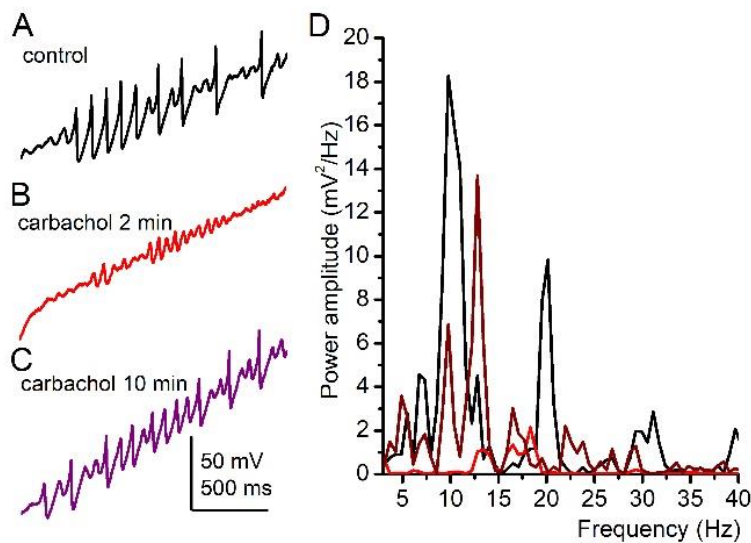
A KCNQ alegységek eloszlása a KCNQ4 alegység hiánya esetén kimutathatóan megváltozik (Bayasgalan és mtsai, 2021). Míg a KCNQ2 és KCNQ5 alegységek expressziója változatlan maradt, addig a KCNQ3 alegység expressziója mintegy 30-szoros növekedést mutatott (G. Spitzmaul laboratórium hozzájárulása a cikkünkhöz). Mindez jogosan veti fel a gyanúját annak, hogy ChAT KO egerekben is változhat a KCNQ alegységek expressziója. A full knockout egerek születéskor azonban elpusztulnak a légzésdeficit miatt (Lin és mtsai, 2024), így információt kondicionális knockout egerekből nyerhetünk. A ChAT csökkent expressziójáról a kolinerg struktúrákban azonban van információnk: ChAT-Mecp2 ^{-/-} egerekben (Rett szindróma modell, basalis előagyi kolinerg neuronok érintettek) a ChAT expresszió szignifikánsan csökkent. Ez azzal járt, hogy a neuronok akcióspotenciál-tüzelési frekvenciája jelentősen megnőtt (Zhang és mtsai, 2016). Mivel (1) előkísérletes adataink alapján a basalis előagyi kolinerg neuronoknak is van membránpotenciál-oszcillációja (ábra?) és (2) az oszcillációk gátlása a tüzelési frekvencia emelkedését okozza (Baksa és mtsai, 2019), és az M-áram túlaktivációja az oszcillációs frekvencia (és így a tüzelési frekvencia) növekedését okozza (ld. alább); így feltételezhetjük, hogy az oszcillációk optimális frekvenciájának fenntartásához szükséges az M-áram optimális aktivációja. Fontos azonban hozzátenni, hogy más kolinerg hatások (hangsúlyozva a publikációinkban csak marginálisan érintett nikotinos hatásokat) hálózati hatásokon vagy más sejtszintű hatásokon keresztül ugyancsak képesek robosztus modulációs hatásokat létrehozni.

A magas küszöbű membránpotenciál oszcillációkat kritikusan befolyásolja bármilyen, káliumcsatornákat érintő manipuláció. Az eredeti megfigyelések szerint a dendrotoxin alkalmazása gátolta az oszcillációkat (Kezunovic és mtsai, 2011). A karbakol akut alkalmazása (Kezunovic és mtsai, 2013), csakúgy, mint az általunk alkalmazott M-áram gátlószer (XE991) gátolta az oszcillációkat. Fontos megjegyezni, hogy az XE991 alkalmazása után nemcsak drasztikus amplitúdócsökkenést láttunk, hanem a megmaradó oszcilláció frekvenciája eltolódott a 15-20 Hz körüli sávból a 10-15 Hz körülire. Érdekes módon a retigabin (KCNQ csatorna nyitószér) ugyancsak csökkentette az oszcillációk amplitúdóját (bár messze nem olyan drasztikusan, mint az XE991), és az oszcillációs frekvenciát a magasabb tartományba toltta el (3. ábra).



3.ábra. Az M-áram nyitószér retigabin befolyásolja a magas küszöbű membránpotenciál-oszcillációk amplitúdóját és frekvenciáját. A-B. Reprezentatív M-áram görbék kontroll körülmények között (fekete) és retigabin jelenlétében (piros). C-D. Membránpotenciál-oszcillációk kontroll körülmények között (fekete) és retigabin jelenlétében (piros). E. Valamennyi mérés power spektrumának átlagolt görbéje (fekete: kontroll, piros: retigabin; átlag \pm SEM).

Az acetilkolin oszcillációkra gyakorolt hatására a karbakol már ismert hatásából lehet következtetni. A karbakol az oszcillációkat akut alkalmazás esetén gátolja, több tíz perces alkalmazásakor azonban magasabb frekvenciával visszatérnek az oszcillációk (Kezunovic és mtsai, 2013). Az utóbbi megállapítás egy részét (az oszcillációk visszatértét) mi is meg tudtuk előkísérletes adatokkal erősíteni (4. ábra). Ennek az időben változó hatásnak a hátterében feltehetően a kezdeti, M-áramra gyakorolt hatás után a lokális hálózati hatások állhatnak.



4.ábra. A karbakol hatása függ az alkalmazásának az időtartamától. A-C. Magas küszöbű membránpotenciál-oscillációk kontroll körülmények között (A, fekete), karbakol 2 perces alkalmazását követően (B, piros) és karbakol 10 perces alkalmazását követően (C, lila). D. Az A-C. paneleken látott reprezentatív áramgörbék

power spektruma (fekete: kontroll, piros: karbakol 2 perc után, bordó: karbakol 10 perc után).

5. *Az asztrocita modulációs hatások vizsgálata során a jelölt megállapította, hogy a PPN neuronok membránpotenciáljára gyakorolt kannabinoid hatás asztrocita aktiváció következménye. Itt ugyanakkor számos vizsgálat korrelatív marad, miközben az asztrocita-specifikus optogenetikai stimulációs kísérletekből nem világos, mi pontosan a CB1 hatás helye. Támogató megfigyelés, hogy a CB1 knockout egér asztrocitáin a kalcium hullámok frekvencianövekedése elmarad, de ebben a modellben nem különül el az asztrocita CB1 hatás a neuronális CB1 hatásoktól. Lenne esetleg értelme egy GFAP-ChR2 / CB1 KO egérvonal, vagy egy asztrocita-specifikus (kondicionális) CB1 KO egér létrehozásának további funkcionális vizsgálatok elvégzése érdekében?*

A vizsgálatok végzésekor nem álltak rendelkezésünkre az említett transzgén/kondicionális knockout állatok. Egyetértve a Bírálóval, ezen egérvonalak használata szolgáltathatta volna a legerősebb bizonyítékot az asztrocitán keresztüli közvetlen CB1 receptor hatásra. Bár a meglévő adatok egyike sem mutatja be egymagában minden kétséget kizáróan az asztrocitákon keresztüli CB1 receptor hatást, mindegyik esetben egy irányba mutatnak az



eredmények. Az érveim ennek alátámasztására az alábbiak: (1) Immunhisztokémiai vizsgálatok kimutatták az asztrocitákon a CB1 receptor jelenlétét (2) CB1KO egereken az asztrociták kalciumhullám-frekvenciáját nem növelte a CB1 receptor agonista. (3) TTX jelenlétében a CB1 receptor agonista szignifikánsan növelte az asztrociták kalciumhullámainak frekvenciáját. (4) thapsigargin előinkubációval is teljesen megszűnt a CB1 receptor agonistára adott válasz. (5) A neuronok stimulációja a vad típusú állatban a szomszédos asztrociták kalciumhullámainak frekvenciáját növelik, a CB1 knockout állatban ez a kalciumhullám-frekvencia növekedés elmarad. (6) Az asztrociták szelektív optogenetikai ingerlése hasonló hatást váltott ki, mint a CB1 receptor agonista (bizonyos különbségekkel, ami a ChR2 sajátjaiból fakad, ld. fent).

6. A jelölt felveti, hogy a humán szeletpreparátumokon végzett mérések során a slow inward current (SIC) kisebb amplitúdójához hozzájárulhattak a minta szállítási körülményei, mert a hasonlóan szállított egér minták esetében közel szignifikáns amplitúdó csökkenés volt látható. Van információ arra, hogy milyen időfüggő változásokat mutatnak az asztrociták (morfológia, membránpotenciál, réskapcsolatok működése, stb) a szeletpreparátumokban az idő előre haladtával és milyen postmortem és inkubációs időn belül tekinthető megfelelőnek az asztrociták állapota a mérések kivitelezéséhez? Ezen felül a mikroglia sejtekről ismert, hogy érzékenyen reagálnak a szeletpreparáció okozta szöveti sérülésre és már rövid időn belül nagymértékű fenotípus változáson mennek át. Szerepet játszhat az asztrocita-mikroglia interakciók révén a mikroglialis transzformáció az asztrocita hatások időfüggő változásaiban a szeletek inkubációja során?

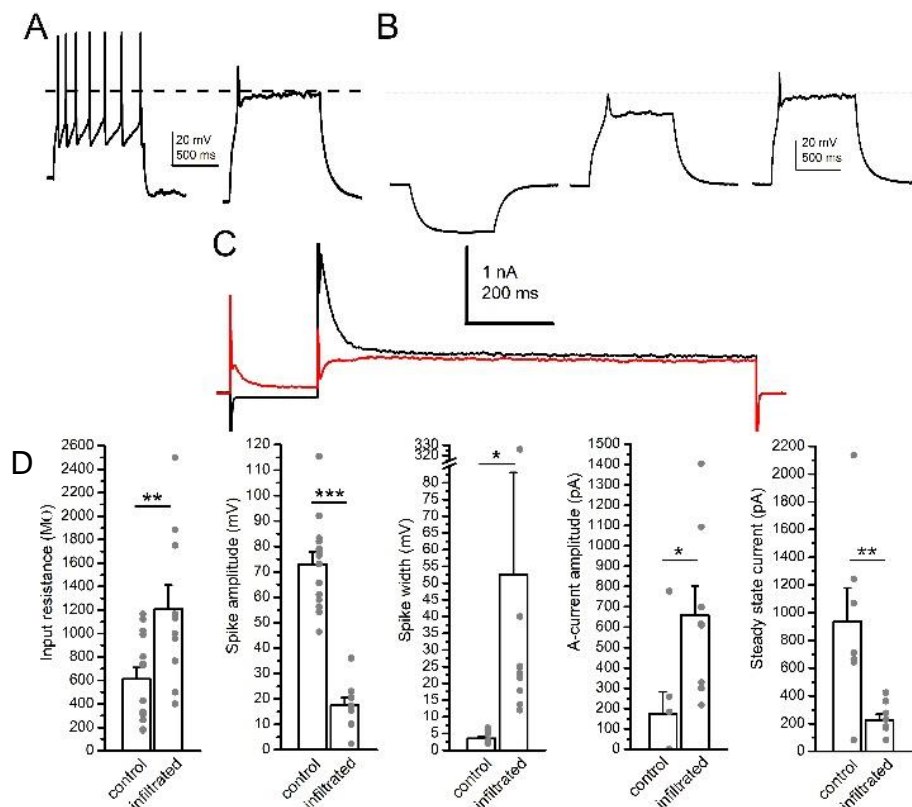
A SIC-ek amplitúdóját esetleg érinthették a szállítási körülmények, mert közel-szignifikáns amplitúdó csökkenést tapasztaltunk hasonló körülményeknek kitett egér szeleteken. Amit viszont emellett a megfigyelés mellett ugyancsak fontosnak tartok kiemelni, hogy a többi paraméter (frekvencia, rise time, decay tau, töltésmozgás) nem változott a szállítási körülmények miatt. Feltételezzük, hogy ha van ilyen „szállítási” amplitúdó csökkenés, az



inkább a neuronális oldalra hathat. Ezt az elméletet alátámasztja az a tapasztalat, hogy ha egy rossz vitalitású szeletben a neuronok pusztulásnak indulnak, a gliasejtek száma nem változik lényegesen. Elképzelhető, hogy a neuronok sérülése tónusos extraszinaptikus glutamát felszabadulással jár, és ez részleges NMDA receptor deszenzitizációt/inaktivációt okoz (Vyklícky, 1993; Kovács és Pál, 2017).

A humán akut szeletpreparátumban mért asztrocitákról ilyen jellegű információ nem áll rendelkezésünkre; tudtommal csak egyetlen másik publikáció áll rendelkezésre a témában (Navarrete és mtsai, 2013), ők ezt nem vizsgálták.

Ismét egyetértve a Bírálóval, valószínűleg változást lehet a fiziológiához képest megfigyelni a mikroglia aktivációban, de feltehetően az asztrocita funkciókban is. Ennek csak az egyik oka a mintavételezés módja. A másik, talán lényegesebb ok az alapbetegség. Általában műtét során nyert peritumoralis mintákat alkalmazunk, amelyek egyes esetekben lymphocita infiltrációt mutatnak. Ezekben az esetekben a szelet elektrofiziológiai célokra egyértelműen használhatatlan; a neuronokon ilyenkor tapasztalt változások jól modellezhetőek $II-1\beta$ alkalmazásával (5. ábra).



5.ábra. A peritumorális, lymphocyta-infiltrált területen mért humán neocorticalis piramisisejtek membránsajátságai jellegzetes változásokat mutatnak. A. 100 pA amplitúdójú, 1 s hosszúságú áramimpulzussal kiváltott feszültségválaszok nem infiltrált területről (bal) és infiltrált peritumorális területről (jobb) származó piramisisejtekről (szaggatott vonal: 0 mV). B. -30, +50 és +100 pA amplitúdójú áramimpulzusokkal kiváltott feszültségválaszok infiltrált területről származó piramisisejtről. C. Reprezentatív áramgörbék infiltrált peritumorális területről származó piramisisejtről (piros: depolarizáló előimpulzus, fekete: hiperpolarizáló előimpulzus). D. Az infiltrált és nem infiltrált területekről származó mérések statisztikai összehasonlítása (oszlopok: átlag \pm SEM, szürke pontok: individuális adatok, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). A bemenő ellenállás nagyobb volt, az akcióspotenciál-sorozat helyét egyetlen, hosszú időtartamú és kis amplitúdójú tüske vette át, az A-áram amplitúdója megnőtt.



Végezetül ismételten szeretném megköszönni a Bíráló értékes idejét, amit dolgozatom áttekintésére és bírálatára szánt, értékes és érdekes tudományos problémákat előtérbe helyező kérdéseit és pozitív véleményét.

Tisztelettel,

Pál Balázs

Debrecen, 2024. 09. 03.



Irodalomjegyzék

Adamsky, A., Kol, A., Kreisel, T., Doron, A., Ozeri-Engelhard, N., Melcer, T., Refaeli, R., Horn, H., Regev, L., Groysman, M., London, M., Goshen, I. (2018). Astrocytic activation generates de novo neuronal potentiation and memory enhancement. *Cell*, 174(1), 59–71.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.002>

Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E. (2004) Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci*. 24(31):6920-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0473-04.2004.

de Ceglia R, Ledonne A, Litvin DG, Lind BL, Carriero G, Latagliata EC, Bindocci E, Di Castro MA, Savtchouk I, Vitali I, Ranjak A, Congiu M, Canonica T, Wisden W, Harris K, Mamei M, Mercuri N, Telley L, Volterra A. (2023) Specialized astrocytes mediate glutamatergic gliotransmission in the CNS. *Nature*. 622(7981):120-129. doi: 10.1038/s41586-023-06502-w.

Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G. (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron*. 43(5):729-43. doi: 10.1016/j.neuron.2004.08.011.

Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV. (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci*. 7(11):1233-41. doi: 10.1038/nn1340.



Huang WC, Xiao S, Huang F, Harfe BD, Jan YN, Jan LY. (2012) Calcium-activated chloride channels (CaCCs) regulate action potential and synaptic response in hippocampal neurons. *Neuron*. 74(1):179-92. doi: 10.1016/j.neuron.2012.01.033.

Huber, R. E., Babbitt, C., Peyton, S. R. (2024). Heterogeneity of brain extracellular matrix and astrocyte activation. *Journal of neuroscience research*, 102(5), e25356. <https://doi.org/10.1002/jnr.25356>

Kc, E., Islam, J., Kim, H. K., Park, Y. S. (2023). GFAP-NpHR mediated optogenetic inhibition of trigeminal nucleus caudalis attenuates hypersensitive behaviors and thalamic discharge attributed to infraorbital nerve constriction injury. *The Journal of Headache and Pain*, 24(1), 137. <https://doi.org/10.1186/s10194-023-01669-z>

Kim, J. H., Rahman, M. H., Lee, W. H., Suk, K. (2021). Chemogenetic stimulation of the G_i pathway in astrocytes suppresses neuroinflammation. *Pharmacology Research & Perspectives*, 9(6), e00822. <https://doi.org/10.1002/prp2.822>

Kovács, A., Pál, B. (2017). Astrocyte-dependent slow inward currents (SICs) participate in neuromodulatory mechanisms in the pedunculopontine nucleus (PPN). *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 16. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00016>

Kozlov AS, Angulo MC, Audinat E, Charpak S. (2006) Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(26):10058-63. doi: 10.1073/pnas.0603741103.

Lee D, Lim H, Lee J, Ha GE, No KT, Cheong E. (2023) Intracellular loop in the brain isoforms of Anoctamin 2 channels regulates calcium-dependent activation. *Exp Neurobiol*. 32(3):133-146. doi: 10.5607/en22045.



Liang, R., Broussard, G. J., Tian, L. (2015). Imaging chemical neurotransmission with genetically encoded fluorescent sensors. *ACS Chemical Neuroscience*, 6(1), 84–93. <https://doi.org/10.1021/cn500280k>

Lin CV, Thomas CAD, Huynh TL, Wei DT, Young JN, Aivazian AS, McInnes A, Xu J, Cook SE, Vazquez J, Maselli RA. (2024) Adeno-associated virus type 9-mediated gene therapy of choline acetyltransferase-deficient mice. *Hum Gene Ther.* 35(3-4):123-131. doi: 10.1089/hum.2023.173.

MacLaren DA, Browne RW, Shaw JK, Krishnan Radhakrishnan S, Khare P, España RA, Clark, SD (2016) Clozapine n-oxide administration produces behavioral effects in Long-Evans rats: implications for designing DREADD experiments. *eNeuro* 2016; 3:ENEURO.0219-16.2016.

Nagel G, Szellas T, Kateriya S, Adeishvili N, Hegemann P, Bamberg E. Channelrhodopsins: directly light-gated cation channels. *Biochem Soc Trans.* 2005 Aug;33(Pt 4):863-6. doi: 10.1042/BST0330863. PMID: 16042615.

Navarrete M, Perea G, Maglio L, Pastor J, García de Sola R, Araque A. (2013) Astrocyte calcium signal and gliotransmission in human brain tissue. *Cereb Cortex.* 23(5):1240-6. doi: 10.1093/cercor/bhs122.

Nie H, Zhang H, Weng HR. (2010) Bidirectional neuron-glia interactions triggered by deficiency of glutamate uptake at spinal sensory synapses. *J Neurophysiol.* 104(2):713-25. doi: 10.1152/jn.00282.2010.

Octeau, J. C., Gangwani, M. R., Allam, S. L., Tran, D., Huang, S., Hoang-Trong, T. M., Golshani, P., Rumbell, T. H., Kozloski, J. R., Khakh, B. S. (2019). Transient, consequential increases in extracellular potassium ions accompany channelrhodopsin2 excitation. *Cell Reports*, 27(8), 2249–2261.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.078>



Parri HR, Gould TM, Crunelli V. (2010) Sensory and cortical activation of distinct glial cell subtypes in the somatosensory thalamus of young rats. *Eur J Neurosci.* 32(1):29-40. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07281.x.

Shigetomi E, Bowser DN, Sofroniew MV, Khakh BS. (2008) Two forms of astrocyte calcium excitability have distinct effects on NMDA receptor-mediated slow inward currents in pyramidal neurons. *J Neurosci.* 28(26):6659-63. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1717-08.2008.

Tian GF, Azmi H, Takano T, Xu Q, Peng W, Lin J, Oberheim N, Lou N, Wang X, Zielke HR, Kang J, Nedergaard M. (2005) An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med.* 2005 Sep;11(9):973-81. doi: 10.1038/nm1277.

Tzour A, Leibovich H, Barkai O, Biala Y, Lev S, Yaari Y, Binshtok AM. (2017) K_v 7/M channels as targets for lipopolysaccharide-induced inflammatory neuronal hyperexcitability. *J Physiol.* 595(3):713-738. doi: 10.1113/JP272547.

Vay SU, Flitsch LJ, Rabenstein M, Monière H, Jakovcevski I, Andjus P, Bijelic D, Blaschke S, Walter HL, Fink GR, Schroeter M, Rueger MA. (2020) The impact of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) and voltage-gated potassium KCNQ/Kv7 channels on primary microglia function. *J Neuroinflammation.* 17(1):100. doi: 10.1186/s12974-020-01779-4.

Vyklický L., Jr (1993). Calcium-mediated modulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses in cultured rat hippocampal neurones. *The Journal of Physiology*, 470, 575–600. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019876>



Wang L, Simms J, Peters CJ, Tynan-La Fontaine M, Li K, Gill TM, Jan YN, Jan LY. (2019) TMEM16B calcium-activated chloride channels regulate action potential firing in lateral septum and aggression in male mice. *J Neurosci.* 39(36):7102-7117. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3137-18.2019.

Zhang Y, Cao SX, Sun P, He HY, Yang CH, Chen XJ, Shen CJ, Wang XD, Chen Z, Berg DK, Duan S, Li XM. (2016) Loss of MeCP2 in cholinergic neurons causes part of RTT-like phenotypes via $\alpha 7$ receptor in hippocampus. *Cell Res.* 26(6):728-42. doi: 10.1038/cr.2016.48.

Zhang, Y., Looger, L. L. (2024). Fast and sensitive GCaMP calcium indicators for neuronal imaging. *The Journal of Physiology*, 602(8), 1595–1604. <https://doi.org/10.1113/JP283832>