

Glutamáterg komponens a raphe-hippocampalis kapcsolatban

Tézisfüzet

Dr. Domonkos Andor

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Varga Viktor, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Dobolyi Árpád, az MTA doktora, tudományos tanácsadó
Dr. Lőrincz László Magor, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Majorossy Kálmán, CSc., professor emeritus
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Hájos Norbert, az MTA doktora,
tudományos tanácsadó
Dr. Zelles Tibor, Ph.D., habilitált egyetemi
docens

Budapest
2017

Bevezetés

Az agytörzs raphe-magjaiban találjuk a szerotonin (5-HT)-tartalmú sejteket, ám az itteni vetítő sejtek egy jelentős hányada nem szerotoninerg. Mind a szerotoninerg, mind a nem-szerotoninerg vetítő raphe-sejtek nagy részében kimutatták a vezikuláris glutamáttranszporter harmadik izoformáját (VGluT3). Ezek alapján feltételezzük, hogy a raphe-magok projekcióiban a szerotonin mellett glutamáterg komponens is jelen van. Hagyományosan a raphe-magokat lokalizációjuk alapján csoportosítjuk, a középagyhoz a nucleus raphe dorsalis (DR), a nucleus raphe medianus (MR), a nucleus linearis caudalis és a B9-es sejtcsoport tartozik, míg a nyúltvelőben találjuk a caudalis raphe-magokat (nucleus raphe magnus, nucleus raphe obscurus, nucleus raphe pallidus). A szerotonintermelő sejtek szerveződésének megértését nagyban segítette, hogy lehetővé vált a raphe-magok sejtes összetételének, valamint projekcióinak a szerotoninerg vonal kiindulási rhomboméráinak azonosítása alapján történő csoportosítása. A DR szerotoninerg sejtjei az első, legrostralisabb rhombomérából származnak, a MR az első három rhombomérából vegyesen. A caudalis raphe-magok az ötödik vagy annál caudalisabb rhombomérából differenciálódnak, és a gerincvelőbe leszálló pályákat képeznek. Mivel a különböző szelvényekből fejlődő neuronok között jelentős génexpressziós különbségeket találtak, ezek között a funkcionális eltérések is jelentősek, példaképpen a második rhombomérából eredő sejtekre depolarizáltabb nyugalmi membránpotenciál jellemző, mint a MR más rhombomérából odavándorló sejtjeire. Azonos rhombomérából differenciálódó sejtek esetében is lehet expressziós különbség egyes kulcsfontosságú – például metabotrop és ionotrop receptorokat, egyéb ioncsatornákat és a szinaptikus jelátvitelben részt vevő proteinek kódoló – gének aktivitásában. A második rhombomérából származó sejtekre – csoportszinten – jónéhány gén nagyon variábilis expressziója jellemző. Ezek közé a gének közé tartozik a VGluT3 génje is, amely alapján két alcsoportra továbboszthatók ezek a sejtek. A VGluT3-at nagymértékben termelő neuronokra a szerotoninerg fenotípus alig jellemző, a másik alcsoportban pedig a szerotonin szintézisét végző triptofán-hidroxiláz génjének magas aktivitása alacsony VGluT3-expresszióval társul.

A raphe-magok innervációs preferenciája is különböző. DR, MR és a B9-hez tartozó sejtek felszálló pályákat adnak, azaz a középagy és az előagy területeit innerválják. Az agykéregbe vetítő raphe-rostok morfológiailag különböznek, a MR rostjain jellegzetes vastag varikozitásokat találunk, a DR rostjai pedig vékonyak, nagyon apró, ám sűrűn elhelyezkedő, esetleg orsószerűen kissé megvastagodó varikozitásokkal. Beidegzési preferenciájuk szintén különbözik, a DR szerotoninerg sejtjeinek rostjai erőteljesen innerválják többek között a neocortex felszínes rétegeit, a striatumot, a hypothalamust, a basolateralis amygdalát. A DR

caudalisan elhelyezkedő sejtjeire, amelyek a B6 sejtcsoportot alkotják, jellemző a limbikus rendszer innervációja. A MR szerotoninergerg sejtjeinek axonjai jóval behatároltabb célterületeket preferálnak, sűrű rostfelhőt képeznek például a medialis prefrontalis kéregben, a perirhinalis kéregben, valamint a limbikus rendszerben, így a hippocampusban, a nucleus septalis medialisban, a Broca-féle diagonális kötegben vagy a Gudden-féle tegmentalis magokban. A VGluT3 a hippocampust, a nucleus septalis medialis és a medialis prefrontalis kérget innerváló raphe-rostok többségében jelen van, továbbá kimutatták a ventralis tegmentalis areába, substantia nigrába vagy a hypothalamus egyes magcsoportjaiba vetítő raphe-sejtekben is. A VGluT3-expresszáló sejtek efferenseiről alkotott képhez hozzátartozik, hogy lokális vagy távoli terminálisaik nem mindegyikében jelenik meg a VGluT3. A MR-ban és a DR-ban a szerotoninergerg neuronok és az ezekkel részben átfedő VGluT3-expresszáló sejtek mellett jelentős számban előfordulnak az előbbiektől elkülönülő γ -aminovajsav (GABA)-ürítő neuronok, amelyek innerválják és szabályozzák a lokális szerotoninergerg sejteket, de egyesek projektálnak is például a prefrontális kéregbe vagy a nucleus accumbensbe, továbbá kisebb számban dopaminerg sejtek is találhatóak.

A MR és a DR afferenseiben is eltéréseket találunk. A MR – ellentétben a DR-val – jelentős beidegzést kap a nucleus septalis medialisból, a Broca-féle diagonális kötegből. A hypothalamus némely régiójából szintén több afferenst kap, mint a DR. Ugyanakkor az amygdala, a nucleus interstitialis striae terminalis, a striatum vagy a bazális előagy – amelyek a DR jelentős afferenciáját adják – nyúlványai alig érik el a MR-t. További különbség a két raphe-mag között, hogy a MR-t jelentős bemenetét adja a habenula lateralis, a habenula medialis, továbbá a nucleus interpeduncularis. A két raphe-mag eltérő kapcsolatainak következménye az eltérő funkcionalitásuk. A DR szerotoninergerg sejtjeinek aktivitását a jutalomra hosszan kitartó, türelmes várakozással, illetve várható büntetés elkerülésével hozzák összefüggésbe, tehát a DR segíthet a pillanatnyi és egy jövőbeni helyzet közötti ellentmondást áthidalni. Ez a tulajdonsága összefügghet a döntések jövőbeni következményeinek szerotoninhiányt kísérő nehézkes belátásával, a szerotoninhiányhoz szintén kapcsolódó kilátástalansággal, küzdelem feladásával és magával a depresszióval. Ezzel szemben a MR (illetve a DR caudalis régiójának) efferensei a limbikus rendszert vagy az azzal szoros funkcionális kapcsolatban álló agyterületeket szabályozzák, ennél fogva a tájékozódásban, eseménymemóriában kitüntetett jelentőségű hippocampus neuronhálózatát modulálják. A limbikus rendszer átkapcsolójaként is felfogható habenula medialis, illetve a szorongásos, averzív reakciók szervezésében szerepet játszó habenula lateralis közvetlenül vagy a nucleus interpeduncularison keresztül befolyásolhatja a MR hippocampust szabályozó neuromodulációját, szabályozva akár az averzív memóriatartalmak rögzülését és

hozzájárulva szorongásos viselkedés kialakulásához. Ha a MR a hippocampus információfeldolgozásába hatékonyan képes beavatkozni, a kapcsolatuknak megbízható időzítésű jelátvitellel kell működnie. Ebben kulcsszerepet tölthet be a VGluT3, amely hatékony glutamáterg transzmissziót biztosíthat.

A hippocampus hálózatába történő hatékony beavatkozásnak másik biztosítéka a kalbindintartalmú interneuronokkal, kolecisztokinintartalmú kosársejtekkel és egyes interneuron-specifikus interneuronokkal létesített szelektív szinaptikus kapcsolat, amelyet a vastag, főleg MR-eredetű raphe-rostok képeznek. Vélhetően főként a vékony rostokból volumen transzmisszióval felszabaduló szerotonin viszont a neuronhálózat többi tagját is közvetlenül elérheti. A szerotonin hatása egyrészt a principális sejtek erőteljes hiperpolarizálása következtében a gyenge serkentő bemenetek kiszűrése, másrészt az erősebb bemenetek fokozása a lassú utóhiperpolarizáció gátlása következtében. A szerotonin erőteljesebben gátolja a distalisabb dendritszakaszokra érkező laterális perforáns pályának, mint a dendritek középső szakaszára érkező medialis perforáns pályának a bemenetét, ezzel modulálja az entorhinalis kéregből beérkező információ tartalmát. Változatos metabotrop receptorain keresztül előtérbe hozhatja az aktuális térbeli helyzet hozzákapcsolását az újonnan megerősödő hippocampalis kapcsolatokhoz. A moduláció megfelelő időbeli felbontását és a zajszűrés erősítését részben az ionotrop 5-HT₃ receptorok által aktivált kolecisztokinintartalmú kosársejtek és interneuronszelektív interneuronok biztosíthatják. E szinaptikus kapcsolatban esetlegesen jelen lévő glutamáterg transzmisszió (kotranszmisszió) jelentősen fokozhatja a moduláció lehetőségeit a hálózati aktivitás befolyásolására.

A MR-nak a hippocampus hálózatára kifejtett fő hatásának az információkódoláshoz kapcsolódó, tájékozódásban és eseménymemóriában kitüntetett jelentőségű theta-oszcilláció deszinkronizációját, gátlását tartották. Az éber állatokkal végzett kísérletek azonban ellentmondásos eredményeket szolgáltatottak, ennek oka egyrészt az lehetett, hogy nem mindig ugyanazt a behatárolt területet stimulálták, másrészt pedig nem különítették el az I-es (helyzetváltozást kísérő, kolinerg jelátviteltől független, továbbá uretán-altatásban nem kiváltható) és II-es típusú (szensoros aktivációhoz kapcsolódó, kolinerg jelátviteltől függő, alacsonyabb frekvenciás) theta-aktivitást. Uretán-altatásban a II-es típusú thetához hasonló, az éber állapothoz képest alacsonyabb frekvenciájú, kolinerg jelátviteltől függő theta alakul ki, ez és a II-es típus közti különbséget nem definiálták egyértelműen. Az I-es és II-es típusú theta-aktivitásra eltérő hatása van a raphe-stimulálásnak. A DR, valamint a MR középső-dorsalis régiójának ingerlésének hatása a szerotoninerg sejtek épségétől függ, és az I-es típusú theta-oszcillációt erősíti, az uretán-altatás alatt észlelhető theta-aktivitást pedig gátolja. A MR ventralis régiójának ingerlése, ahol több a nem-szerotoninerg sejt, ez utóbbi

típusú theta-hullámokat segíti. Kialakult egy modell, amely szerint a raphe-magok szerotoninerg projekciója a navigációhoz kapcsolódó, I-es típusú theta-aktivitást erősítené, a kolinergerg transzmissziótól függő theta-hullámokat pedig gátolná. A navigációt támogató szerotoninerg moduláció ötlete mellett szól annak sejtszintű hippocampalis hatása is, hiszen a medialis entorhinalis kéregből érkező, térbeli pozícióval összefüggő információ fogadását segíti. A raphe-magok nem-szerotoninerg, feltételezetten glutamáterg efferensei pedig a II-es típusú, uretán-altatásban is kimutatható, kolinergerg jelátviteltől függő és a szenzoros aktivációhoz köthető theta-hullámokat segítenék. Ezt a képet árnyalja, hogy az elektromos stimulálás nem szorítkozik csak a szerotoninerg vagy csak a glutamáterg (esetleg más) sejtpopulációra, továbbá, a szerotoninerg sejtek farmakológiai manipulációja – akár irtása – kihat a bennük termelődő VGluT3-függő glutamáterg komponensre is.

A kolinergerg moduláció a figyelemfelkeltő, fájdalmas vagy különleges jelentőségű szenzoros ingerek hippocampalis feldolgozásában alapvető szerepet játszik, és bár alig áll rendelkezésre adat a II-es típusú theta-oszcillációk alatti hippocampalis hálózati tevékenység részleteiről, ez a hullámtevékenység potenciálisan kísérheti a jelentős szenzoros ingerület hippocampalis hálózatba érkezését. A raphe-efferensek glutamáterg komponensének pedig lehet szerepe ennek a hullámtevékenységnek a fenntartásában, illetve a szerotoninerg gátló hatások ellensúlyozásában. A szenzoros aktivitáshoz kapcsolódó hálózati theta-tevékenység potenciális modulációján kívül azonban a raphe-efferensek VGluT3-tartalmú terminálisai a szenzoros kódolást a hálózat ideiglenes, de időben nagyon pontos finomhangolásával is szabályozhatják. Ez lehetőséget teremtene a pozíciófüggő és a különös jelentőséggel bíró szenzoros információk kódolásának hippocampalis összekapcsolására. Ehhez viszont az szükséges, hogy a raphe-eredetű VGluT3-expresszáló pályák valóban nagyon gyors, időben fókuszált jelátvitelre legyenek képesek. A MR theta-aktivitásra gyakorolt szabályozásának vizsgálata során véleményem szerint először ezt a lehetőséget érdemes tisztázni. Ehhez némi támpontot nyújt, hogy a MR alacsony frekvenciás (0,5 Hz), illetve theta-frekvenciás elektromos stimulálása átállítja a hippocampalis theta-hullámok fázisát, tehát ez is arra utal, hogy a MR képes beleavatkozni a hippocampus hálózatának folyamataiba egy theta-ciklusnyi (mintegy 200 ms) időnél precízebben is. A szerotoninerg rendszeren belül a glutamáterg komponens szerepe még továbbra is kérdéses, azonban egyes glicinerg, GABAerg vagy kolinergerg neuronok esetében nyilvánvaló a VGluT3 funkcionális jelentősége. A VGluT3 fokozhatja egyrészt a másik transzmitter tárolását vezikuláris szinergia révén, illetve glutamáterg jelátvitelt is biztosíthat. Okkal feltételezhetjük, hogy a raphe-rostokban is lehetővé teszi a glutamáterg szignalizációt és funkcionális alapot teremt egy gyors és hatékony szubkortikális modulációnak.

Célkitűzések

Doktori munkám során a szerotoninerger rendszer glutamáterg komponensét vizsgáltam *in vivo* elektrofiziológiai kísérletekkel. Első kísérletsorozatomban célja volt kideríteni, hogy mennyiben térnek el a VGluT3-at expresszáló MR-sejteknek (méréseim során a célterületet kiterjesztettük a nucleus raphe paramedianusra is, a kettőt median raphe régióként – MRR – nevezem a továbbiakban) alapvető elektrofiziológiai tulajdonságai a többi raphe-sejtétől, hiszen feltételeztük, hogy a glutamáterg (ko)transzmisszióra képes sejtek másként működnek, mint amelyek erre nem képesek. *Specifikus kérdéseink:* **1)** A MRR VGluT3-expresszáló sejtjeinek tüzelési frekvenciája vagy variabilitása különbözik-e a szerotonintartalmú sejtektől? **2)** A MRR VGluT3-expresszáló, illetve szerotoninerger sejtjeinek tüzelése függ-e a hippocampus állapotától, illetve a szenzoros ingerléstől? **3)** A MRR VGluT3-expresszáló és szerotonintartalmú sejtjeinek kisülései kapcsolódnak-e a hippocampus, illetve a prefrontális kéreg hullámtevékenységének fázisához?

A második kísérletsorozatban vizsgáltam, hogy a MRR efferenseinek egyik jelentős célterületére, a hippocampusra milyen sejt szintű hatással lehet a szerotoninerger rendszerben sokáig rejtőzködő glutamáterg komponens. A specifikus hatást elsősorban interneuronok esetében kerestük, amelyekkel a raphe-rostok szinapszisokat képeznek. Feltételeztük, hogy a glutamáterg jelátvitel gyors serkentést okozhat. *Specifikus kérdéseink:* **1)** Mik a jellemzői a hippocampus interneuronjainak a MRR elektromos ingerlésével kiváltott gyors serkentésének? Mennyire megbízhatóan váltja ki a stimulálás ezt a választ, és milyen a lecsengése? **2)** Függ-e az interneuronok reakciója a glutamáterg receptoroktól? Az AMPA-típusú glutamát receptoroknak az elvezetett sejtre lokalizálódó farmakológiai blokádját megváltoztatja-e a válasz karakterisztikáját? Mi az ionotrop 5-HT₃-receptor szerepe a hatásban? **3)** Az interneuronok válasza összefüggésben van-e azok neurokémiai vagy elektrofiziológiai tulajdonságaival?

Módszerek

Kísérleteimet a MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetének Agykéreg Kutatócsoportjában végeztem. A kísérletes beavatkozásokat a munkahelyi állatkísérleti etikai bizottság és a Budapest Fővárosi Állat-és Élelmiszerellenőrző Állomás engedélyezte. A kísérletek tervezése és kivitelezése során minden erőfeszítést megtettünk a részt vevő állatok esetleges fájdalmának, szenvedésének csökkentésére, illetve a lehető legkevesebb egyedet használtuk fel. Mind a MRR sejtjeinek elektrofiziológiai jellemzése, mind a raphe-hippocampalis rostok interneuronokra gyakorolt hatásának vizsgálata során felnőtt hím Wistar patkányokkal dolgoztunk. Mindkét kísérletsorozatban az állatokat 0,007

ml/testsúlygramm dóziszú, 20%-os uretán-oldat intraperitoneális injekciójával altattuk el, majd azokat sztereotaxiás célzókészülékbe fogtuk be, és a koponyatetőt az *in vivo* elektrofiziológiai kísérlethez feltártuk. Az állatok testhőmérsékletét a kísérletek alatt homeotermikus fűtőpaddal 37 Celsius-fokon tartottuk.

A MRR-sejtek aktivitásának juxtacelluláris regisztrálása mellett a hippocampus és a prefrontalis kéreg lokális mezőpotenciálját (LFP) is követtem. A 2–10 perces kontroll és a fél percig tartó farokcsípés általi szenzoros stimuláció alatti felvételeket követően a MRR-sejtet Neurobiotin jelölőanyaggal feltöltöttem, majd az agyat fixáltam a sejt későbbi neurokémiai azonosítása céljából. A 166 sejtjelöléses kísérletből 78 állat esetében találtunk jelölt sejtet. Azokat a kísérleteket, amelyekben egyértelműen nem sikerült azonosítani a jelölt sejtet, vagy ahol a sejtjelölés a MRR-n kívül esett, az adatelemzésből kizártuk. Az így maradt 60 MRR-neuronból csak azokkal dolgoztunk tovább, amelyeknek a neurokémiai azonosítása is egyértelműen megtörtént, így összesen 23 MRR-sejt adatait dolgoztam fel. Az egyértelműen azonosított, 5-HT- és VGluT3-tartalom szerint négy csoportba osztott sejtek elektrofiziológiai tulajdonságait összehasonlítottam. Spike2 szoftver segítségével, manuális ellenőrzés mellett detektáltam az azonosított sejtek akciós potenciáljait. Ezután az adatokat MATLAB környezetbe exportáltam, és minden további analízist ott végeztem a saját magam által írt programok segítségével. Meghatároztam az akciós potenciálok átlagos hosszát, a tüzelési frekvenciát és variabilitást a hippocampalis theta- és nem-theta-állapotok függvényében, illetve a szenzoros ingerlés hatására. A szenzoros stimulálásra adott tüzelési választ az átmeneti és a tartós változást megragadó paraméterekkel is jellemzetem. Ezenkívül a ritmikus tüzelés jeleit, továbbá a hippocampalis és a prefrontalis kérgi lassú és theta-frekvenciás hullámok fázisához kapcsolódó tüzelést kerestem. A neurokémiai csoportok különbségeit egyszempontos nemparaméteres Kruskal-Wallis ANOVA segítségével kerestem, a páronkénti szignifikáns eltéréseket Wilcoxon-féle előjeles rangpróbával határoztam meg. Egy adott csoportnak két állapot közötti összehasonlítását előjel-teszttel végeztem.

A raphe-hippocampalis rostok interneuronokra gyakorolt hatásának vizsgálata során a hippocampalis neuronok tüzelését regisztráltuk juxtacelluláris elektródával, miközben elektromosan stimuláltuk a MRR-t. LFP-elvezetéssel a hippocampus hálózati aktivitását nyomon követtük. Kísérleteink jelentős részében farmakológiai tesztekkel vizsgáltuk a regisztrált hatás kialakításáért felelősnek tartott AMPA-típusú glutamát-receptorok (az antagonisták lokális iontoforézise), illetve az 5-HT₃ szerotoninreceptorok (az antagonisták szisztémás injekciója) szerepét. Az elvezetett neuronokat későbbi neurokémiai azonosítás céljából jelölőanyaggal feltöltöttük. Az analízist MATLAB környezetben végeztük a saját

munkacsoportunkban készített programok segítségével. Az elvezetett sejtek akciós potenciáljainak csúcsát amplitúdó alapján detektáltuk. Az azonosított hippocampalis sejtek mellett felhasználtuk azoknak a Neurobiotinnal nem jelölt, de elvezetési koordináták alapján hippocampusban lévő sejteknek az adatait is, amelyeknél az alapaktivitás regisztrálása után elektromos MRR-ingerlést végeztünk. Ez utóbbi, nem jelölt sejteket két csoportra, (feltételezett) principális sejtekre és (feltételezett) interneuronokra osztottuk akciós potenciáljaik hossza, tüzelési frekvenciájuk és komplex kisüléssorozataik alapján. Hasonlóan a MRR-sejtek elektrofiziológiai jellemzése során leírtakhoz, ebben a kísérletsorozatban is theta- és nem-theta állapotot különböztettünk meg a hippocampusban. Meghatároztuk a sejtek tüzelési frekvenciáját, a theta-modulációját, valamint a theta-oszcilláció fázisának preferenciáját. Kiszámoltuk az elvezetett sejtek elektromos stimulálásra adott válaszánaik sikerrátáját, a hatás latenciáját és időtartamát. Meghatároztuk, hogy az antagonisták adása befolyásolja-e az előbbi paramétereket. Megvizsgáltuk, hogy önmagában az antagonitáknak az elvezetett sejtek tüzelési frekvenciájára gyakorolt hatása magyarázhatja-e a MRR elektromos stimulálását követő esetleges alacsonyabb kisülésszámot. A kiváltott válasz jellemzéséhez az adatok átlagát és az átlag standard hibáját számoltuk ki, a csoportok közötti szignifikáns különbséget Mann-Whitney U-teszttel, a csoporton belüli állapotok között pedig Wilcoxon-féle rangpróbával kerestük.

Eredmények

A MRR sejteinek elektrofiziológiai jellemzése

A 23, neurokémiaailag is egyértelműen azonosított MRR sejtet négy csoportba osztottam, ennek eredményeképpen 7 VGluT3(+)/5-HT(-) neuron, 5 VGluT3(+)/5-HT(+) neuron, 4 VGluT3(-)/5-HT(+) és végül 7 VGluT3(-)/5-HT(-) neuron adatait elemeztem. A 5-HT-t nem tartalmazó sejtek – akár termeltek VGluT3-t, akár nem – jelentősen rövidebb akciós potenciálokat tüzeltek, és hippocampalis theta-állapot alatt gyorsabban tüzeltek, mint a 5-HT-tartalmú sejtek. A VGluT3(+)/5-HT(+) sejtek szignifikánsan nem különböztek a többitől, a tüzelési frekvenciájuk jellemzően az előbbi csoportok értékei közé esett. A VGluT3(-)/5-HT(+) sejtek lassabban tüzeltek theta alatt a nem-thetához képest, amivel elkülönültek a többi három csoporttól (amelyek theta alatt növelték aktivitásukat). A tüzelés variabilitásában alig találtam szignifikáns különbséget a csoportok között, bár a 5-HT-t nem tartalmazó sejtek tendenciózusan variábilisabban tüzeltek. A szerotoninerg sejtekre – függetlenül a VGluT3-expressziótól – jellemző volt az átmenetileg változó tüzelési aktivitás a szenzoros ingerlés kezdeti 1 másodpercében. Emellett a VGluT3(+)/5-HT(+) sejtekre

jellemző volt még, hogy az ingerlés további 15 másodpercében is a spontán aktivitáshoz képest nagyobb volt a kisülések intenzitása, bár a kezdeti, átmeneti növekedés mértékét ez nem érte el. A VGluT3(+)/5-HT(-) sejtek is tartósan növelték aktivitásukat a szenzoros ingerlés alatt. A VGluT3(-)/5-HT(-) sejtek viszont – különbözve a többi MRR-sejttől – nem reagáltak a szenzoros stimulálásra. A szerotonint nem tartalmazó sejtek esetében találtam fáziskapcsoltságot a hippocampus, illetve a prefrontalis kéreg lassú, 0,9–2,5 Hz közötti oszcillációjához. Az általunk elvezetett sejtek közül mindössze egyetlen VGluT3(+)/5-HT(-) és egyetlen VGluT3(-)/5-HT(+) sejt esetében találtam gyenge, 1 Hz körüli ritmicitást.

A raphe-hippocampalis rostok interneuronokra gyakorolt hatása

A raphe-hippocampalis rostok ingerlésének hatását 52 hippocampalis sejt elvezetése során vizsgáltuk. Ezek közül 8-at Neurobiotinnal feltöltöttünk és interneuronként azonosítottunk. Négyet közülük neurokémiailag is azonosítottunk, kettő tartalmazott kolecisztokinint, egy szomatosztatint, egy pedig calbindin D28k-t. A 44 további, jelölőanyaggal fel nem töltött sejtet az elektrofiziológiai paramétereik alapján 3 (feltételezett) principális sejtre és 41 (feltételezett) interneuronra osztottuk. A MRR elektromos stimulálására az alábbi négy kategóriába eső választ detektáltuk:

- a) gyors (15 ms-nál kisebb latenciájú) aktiváció, melyet 16 sejtnél regisztráltunk,
- b) lassú (15 – 50 ms közötti latenciájú) aktiváció, ezt 7 esetben mértük,
- c) nagyon lassú (50 ms fölötti latenciájú) aktiváció, melyet 4 sejt mutatott,
- d) gátlás kezdeti aktiváció nélkül, ezt 25 sejt esetében – közöttük a principális sejteknél – igazoltuk.

Az ingerlést 15 ms-nál kisebb latenciával követő aktiválódás gyors szinaptikus serkentésre utalt, kísérleteinkben ennek tisztázására helyeztük a hangsúlyt. A gyors aktiváció átlagos latenciája $8,9 \pm 0,58$ ms, a válasz sikerrátája $65,7 \pm 5,29\%$ volt. Az aktiváció időben erősen fókuszált volt: a latenciaidők szórása $1,7 \pm 0,19$ ms. A lassú aktivációs válasz kevésbé volt fókuszált. NBQX (az AMPA-típusú glutamát receptorok szelektív antagonistája) jelentősen és reverzibilisen csökkentette a gyors aktiváció sikerrátáját, a fókuszáltságát azonban nem befolyásolta. A lassú aktivációt érdemben nem befolyásolta az NBQX. Ondansetron (az ionotrop 5-HT₃ szerotoninreceptor antagonistája) kisebb mértékben csökkentette a gyors aktiváció sikerrátáját, mint az NBQX, az aktivációt a legtöbb esetben követő gátlást viszont érdemben csökkentette. Egyik antagonista esetében sem találtunk korrelációt a sejtek alapaktivitására kifejtett hatás és az elektromos ingerlésre adott válasz sikerrátájának befolyásolása között. A gyorsan aktiválódó sejtek között theta-ritmusos és irregulárisan tüzelő sejtek is voltak, némelyek aktiválódtak, mások alig tüzeltek theta-állapot alatt.

Következtetések

Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a MRR VGluT3(+)/5-HT(-) sejtjei alapvető *in vivo* elektrofiziológiai paramétereikben különböznek a VGluT3(-)/5-HT(+) társaiktól. A glutamáterg sejtek gyorsabban tüzelnek, és a hippocampus theta-oszcillációja során növelik aktivitásukat szemben az azt csökkentő szerotoninergerg neuronokkal. A glutamáterg-szerotoninergerg transzmisszióra is képes VGluT3(+)/5-HT(+) sejtek egyik előző csoporttól sem különböztek jelentősen, a sejtek paraméterei jellemzően e két csoport középértékei közé estek. Fontos következménye munkánknak, hogy pusztán elektrofiziológiai paraméterek alapján, illetve a gyakran használt akciós potenciálok hossza alapján nem lehet egyértelműen elkülöníteni a MRR-neuronokat egymástól. Jelenleg egyébként a rekombinázt-rendszereken alapuló állattörzsekkel sem vizsgálhatjuk szelektíven az egyes MRR-populációkat, hiszen átfedés van közöttük. Érdekes tény, hogy a glutamáterg-szerotoninergerg jelátvitelre képes sejtek mintegy átmeneti (a csak szerotoninergerg és csak glutamáterg sejtek között) tüzelési mintázatokat mutattak, ennek oka lehet akár az is, hogy a MRR sejtek transzmissziós fenotípusa változik, és e populáció képviseli az éppen átalakuló neuronokat. Ilyen transzmissziós fenotípusváltást már több idegsejt típus esetében dokumentáltak. Szenzoros ingerlésre mind a négy sejt populáció eltérő választ adott, ami jelzi, hogy eltérő módon vehetnek részt a szenzoros tartalmak feldolgozásának szabályozásában. A DR szerotoninergerg sejtjeit is változatos szenzoros bemenet éri el, aminek következtében az ingerek számtalan aspektusára reagálhatnak. Ebbe a rendszerbe kapcsolódhatnak be a MRR neuronjai is. Az eltérő aktivitású, és különbözőképpen ingerelhető szerotoninergerg és nem-szerotoninergerg populációk egymásra hatva szabályozhatják a hippocampalis információfeldolgozást, az általunk leírt alapvető fiziológiai tulajdonságaik keretét adnak a szerotoninergerg és glutamáterg komponens egymásra épülő, ám egymástól el is különülő modulációnak. A közepes-gyenge vagy akár hiányzó fáziskapcsoltság ellenére a VGluT3-tartalmú sejtek – amelyek között az eddigi adatok fényében nagyrészt vetítő sejtek lehetnek – időnként fellépő gyorsabb tüzelése arra enged következtetni, hogy ezek a sejtek a hálózatszintű moduláció mellett (esetleg helyett) részt vehetnek a célterület csupán néhány sejtjét érintő glutamáterg finomhangolásban. Ennek a lehetőségnek feltétele egy erőteljes, megbízható jelátvitel, amelyet a doktori munkám második részében bemutatott kísérletsorozatban teszteltünk.

Elsőként írtunk le egy glutamáterg, időben fókuszált, erős serkentő kapcsolatot a raphe-rostok és a hippocampus egyes interneuronjai között. Az általam bemutatott adatokat nagy mértékben kiegészítik és alátámasztják a kutatásban részt vevő szerzőtársaim eredményei. *In vivo* elektromos ingerléses kísérleteink pályaspecificitását igazolták Losonczy Attila

hippocampalis szeletekben végzett, optogenetikán alapuló kísérletei. Borhegyi Zsolt kimutatta az aktivált interneuronokra érkező preszinaptikus raphe-rostokban a VGluT3-at, illetve a szerotonint, Nyíri Gábor pedig igazolta, hogy a raphe-terminálisok posztszinaptikus oldalán glutamát receptor expresszálódik. Ezekkel a kísérletekkel elsőként bizonyítottuk a MRR rostjaiból a VGluT3-függő glutamát felszabadulást és a glutamát erg posztszinaptikus hatást. Lényegesnek tartom még hozzátenni, hogy az interneuronokon kívül piramissejtek aktivitását is regisztráltuk (Losonczy Attila is hasonlóképpen az agyszeletekben). A raphe-rostok ingerlése a piramissejteket gátolta, ami igazolta, hogy a MRR efferensei interneuronok közvetítésével szabályozni tudják a hippocampus principális sejtjeinek működését. A VGluT3-expresszáló MRR-sejtek elektrofiziológiai jellemzése során kiderítettük, hogy a szerotonintartalmuktól függetlenül erőteljesen és tartósan aktiválódnak szenzoros ingerlés alatt. Ezek a sejtek gyorsabb tüzelésükből fakadóan gyorsabb jelátvitelre is képesek lehetnek, mint a lassú, tisztán szerotoninerg társaik. A potenciálisan gyorsabb jelátvitelhez a második kísérletsorozatunkból származó bizonyítékok alapján ténylegesen gyors, nagy hatásfokú glutamát erg serkentés társul. Ez összhangban van az eredeti feltételezésünkkel, miszerint a MRR glutamát erg efferensei fájdalmas vagy különös jelentőséggel bíró szenzoros ingerület hatására aktiválódhatnak, és szabályozhatják a hippocampalis információfeldolgozást. A gyors glutamát erg pálya megteremti a lehetőségét a precíz, theta-periódusokon belüli modulációnak, és az interneuronok aktiválásán keresztül markáns hatást gyakorolhat a piramissejtekre. Munkánk képviseli tehát az első lépést a szubkortikális modulátoros rendszerek egy új típusú, erőteljes hatást kifejtő komponensének jellemzésében. A következőkben indokoltak olyan kísérletek, amelyekben a glutamát erg komponens manipulálásával – lehetőség szerint specifikus, reverzibilis gátlásával – megvizsgáljuk, miképpen változik a kísérleti állatok tanulása, főként a helyhez, pozícióhoz kötött társítások során.

Saját publikációk jegyzéke

Domonkos A, Nikitidou Ledri L, Laszlovszky T, Cserep C, Borhegyi Z, Papp E, Nyíri G, Freund TF, Varga V. (2016) Divergent in vivo activity of non-serotonergic and serotonergic VGluT3-neurons in the median raphe region. *J Physiol*, 594: 3775-90.

Varga V, Losonczy A, Zemelman BV, Borhegyi Z, Nyíri G, Domonkos A, Hangya B, Holderith N, Magee JC, Freund TF. (2009) Fast synaptic subcortical control of hippocampal circuits. *Science*, 326: 449-53.