

A ventromedialis előagy amygdaloid bemeneteinek vizsgálata házityúk korai életszakaszában

Doktori értekezés

dr. Hanics János

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Csillag András, az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Kozák Lajos Rudolf, PhD, egyetemi adjunktus
Dr. Matesz Klára, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szirmai Imre, az MTA doktora,
professor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Halasy Katalin, az MTA doktora,
egyetemi tanár
Dr. Tretter László, az MTA doktora,
egyetemi tanár

Budapest
2016

Tartalom

1	Rövidítések jegyzéke.....	4
2	Bevezetés.....	7
2.1	A dolgozat alapvető koncepciója.....	7
2.2	Az amygdaloid komplex emlősben.....	9
2.3	Az 'extended amygdala' emlősben.....	10
2.4	A pallialis és subpallialis amygdala fogalma.....	11
2.5	Limbikus striatum (nucleus accumbens)	11
2.6	A pallialis amygdala ventromedialis előagyi projekciója emlősben	13
2.7	Madár és emlős idegrendszerének összehasonlítása.....	14
2.8	A madár pallialis amygdala területek emlősagy homológiájának kérdése.....	17
2.9	A madár ventromedialis előagy felépítése (Ac és BSTL homológ régiók), illetve a subpallialis amygdala homológ területekre utaló adatok.....	20
2.10	Az arcopallium ventromedialis előagyi bemeneteire utaló irodalmi adatok ...	22
3	Célkitűzések	24
4	Anyagok és módszerek.....	25
4.1	Kísérleti állatok.....	25
4.2	Műtétek általános leírása	26
4.3	Koordináták beállítása	27
4.4	Pályakövető anyagok (tracerek) beadása.....	27
4.5	Perfúzió és metszés.....	29
4.6	Metszetek feldolgozása, immunhisztokémia	30
4.7	Képkötés és képfeldolgozás.....	32
4.8	Kontroll vizsgálatok és mérések.....	33
5	Eredmények.....	37
5.1	Az arcopallium medialis striatumra vetülő neuronjainak serkentő jellege.....	37
5.2	A medialis striatum bemeneteinek eltérő mintázata.....	45
5.3	A madár amygdalofugalis pálya és eredéseinek meghatározása ventromedialis előagyi végződésein keresztül.....	47
5.4	A nucleus accumbens eléri arcopallialis bemenetek kapcsolati sűrűségüket tekintve különböznek.....	53
5.5	A ventromedialis előagy molekulárisan (DARPP-32) eltérő területeit az arcopalliumból érkező bemenetek egyaránt eléri.....	55

5.6	A ventromedialis előagy arcopallialis bemeneteit adó neuroncsoportok DARPP-32 negatív régiók.	58
5.7	A ventromedialis előagyba vetítő arcopalliofugalis (amygdalofugalis) pálya projekciós neuronjai nem expresszálják a calretinin, parvalbumin és calbindin kalciumköötő fehérjéket.	59
6	Megbeszélés	61
6.1	Az emlős basalis amygdala és azzal homológ madár arcopallialis területek serkentő bemenetet adnak a limbikus striatumba.	61
6.2	A madár amygdaloid arcopallium értelmezése annak ventromedialis előagyi kapcsolatain keresztül.	63
6.3	Az amygdalofugalis pálya madárban.	65
6.4	Az amygdalofugalis pálya ventromedialis előagyi végződési területei.	66
6.5	A arcopallium ventromedialis előagyba vetítő neuronjainak DARPP-32, calbindin, calretinin, parvalbumin immunhisztokémiával történő jellemzése.	67
6.6	Fejlődési és funkcionális szempontok.	68
7	Következtetések	71
8	Összefoglalás	72
9	Summary	73
10	Irodalomjegyzék	74
11	Saját publikációk jegyzéke	85
11.1	A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények:	85
11.2	Egyéb saját közlemények:	85
12	Köszönetnyilvánítás	86

1 Rövidítések jegyzéke

ac - commissura anterior

Ac - nucleus accumbens

AcC – nucl. accumbens core

ACo –arcopallium core

AcS – nucl. accumbens shell

AD - arcopallium dorsale

ADo – dorsalis arcopallium (amyg.)

AHi - amygdalohippocampalis area

AHil – hilaris arcopallialis (amyg.) régió

AI – arcopallium intermediale

AId –arcopallium intermediale dorsale

AM – arcopallium mediale

AMp – medialis arcopallium, pars parvocellularis

AOB – accessory olfactory bulb

APir - amygdalopiriform area

APL - posterolateralis arcopallium (amyg.)

APM - posteromedialis arcopallium (amyg.)

Asp – L-Aszpartát

ATn – amygdaloid taenia

AxT – axonterminális

B - nucleus basalis of Meynert

BDA – biotinilált dextrán amin

BG – basalis ganglion

BLA – basolateralis amygdaloid nucleus

BMA – basomedialis amygdaloid nucleus

BSA – marha szérum albumin

BST vagy BNST – bed nucleus of the stria terminalis (nucleus interstitialis striae terminalis)

BSTL – bed nucleus of stria terminalis, pars lateralis

ca – commissura anterior

CB – calbindin

CDL – area corticoidea dorsolateralis
CeA – centralis amygdaloid nucleus
CEA - centralis extended amygdala
CPi – cortex piriformis
CPu – nucl. caudatus/putamen
CR – calretinin
CTb – koleratoxin béta alegység
CTX – cortex
d - dendrit
D594 - Alexa Fluor® 594 konjugált 10kDa molekulatömegű dextrán
DAB – diaminobenzidin
dAFP - dorsalis amygdalofugalis pálya
DARPP-32 - dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein
DB - nucleus of diagonal band
DLM - nucleus medialis dorsolateralis thalami
DMA - nucleus dorsomedialis anterior thalami
dors –dorsalis
ds - dendrittüske
EA - extended amygdala
EA_v - extended amygdala pars ventralis
FB - Fast Blue
Glu – L-Glutamát
Hp – hippocampus
HRP – torna peroxidáz
KHL - kulcslyukcsiga hemocianin
KTN – közepes tüskés neuron
LP – lateralis pallium
LSt – lateralis striatum
LV – ventriculus lateralis
m - mitokondrium
MEA – medialis extended amygdala
med – medialis

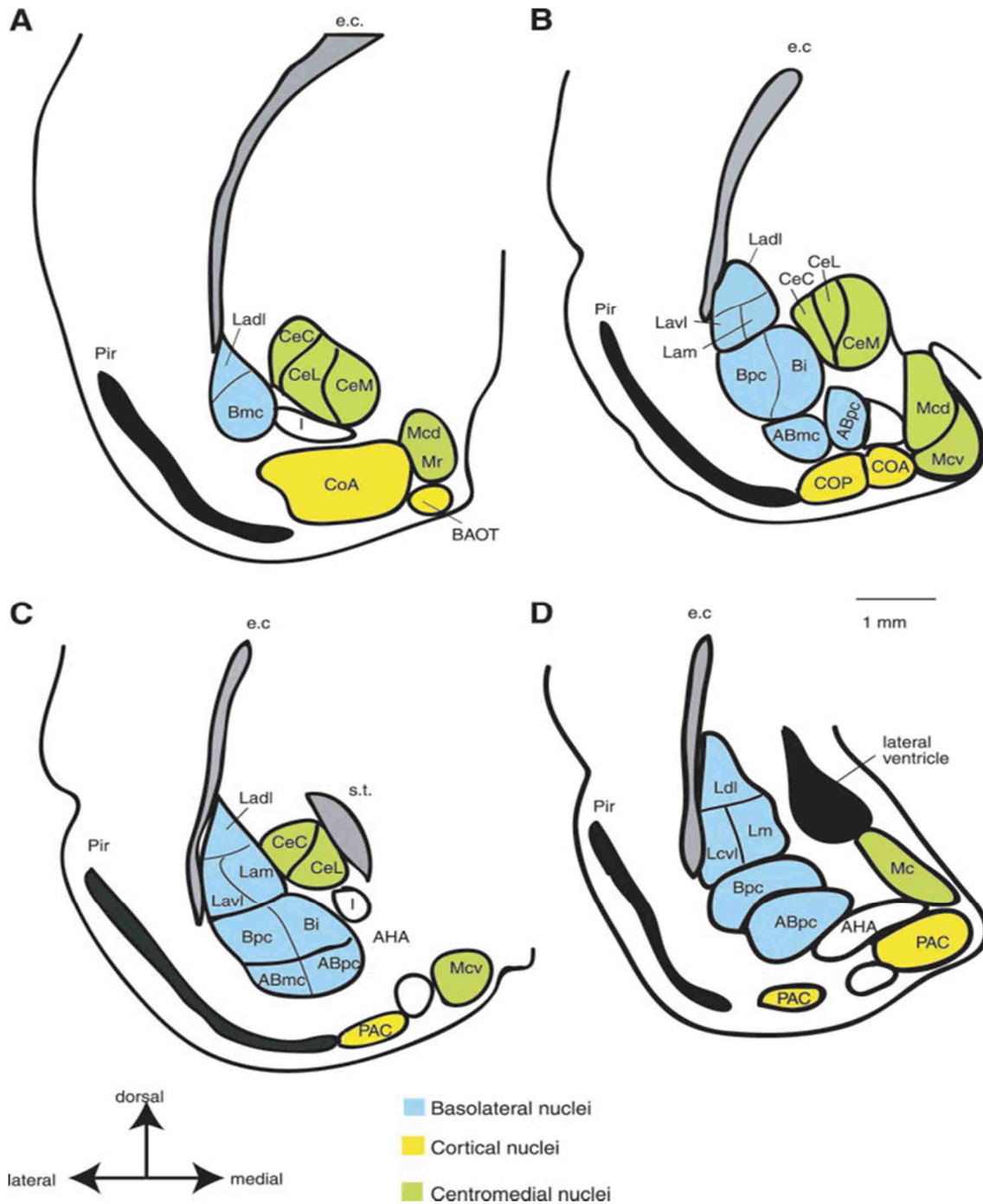
MOB – main olfactory bulb
MSN – medium spiny neuron
MSt – medialis striatum
NCL – nidopallium caudolaterale
NCVI - caudalis ventrolateralis nidopallium
NDS - normál szamár szérum
NGS – normál kecske szérum
Pir – piriform cortex (cortex piriformis)
PoA – nucleus posterior amygdalopallialis
PoAb - basalis posterior arcopallium
PoAc – arcopallium, posterior nucleus, pars compacta
PV – parvalbumin
S - septum
SP – subpallium
SpA – subpallialis amygdala
STR – striatum
SuN – subnidopallium
TEM – transzmissziós elektronmikroszkóp
TH - tirozin hidroxiláz
TnA - nucleus taeniae amygdalae
TO – tuberculum olfactorium
tsm – tractus septomesencephalicus
TuO – tuberculum olfactorium
vaf - ventralis amygdalofugalis köteg
vAFP – ventralis amygdalofugalis pálya
VL – ventriculus lateralis
VP - ventralis pallidum
VP – ventralis pallium

2 Bevezetés

A XIX. század elején Karl Friedrich Burdach a temporalis lebenyben leírt egy mandula-alakú struktúrát, amit ennek megfelelően amygdalának nevezett el. Körülbelül 100 évvel később Klüver és Bucy már klasszikusan ismert medialis temporalis lebeny léziói felvetették a terület emocionális folyamatokban nélkülözhetetlen szerepét. Később a temporalis lebeny kisebb lézióival [többek között kiemelendő Weiskrantz (1956) munkája] kimutatták, hogy a folyamat mögött, a területen belül az amygdala komplexe áll. Ezzel párhuzamosan Paul McLean bemutatta a „limbikus rendszer” koncepcióját, bevezetve a „visceralis agy” fogalmát, és rendszerébe bevonta az amygdala komplexét (Sah és mtsai 2003; Ploog 2003; Zorrilla és Koob 2013), megkerülhetetlenül beírva azt az emóciókat feldolgozó rendszerbe. Az eltelt évtizedekben a limbikus rendszert és elemeit érintő közlemények száma rendkívül nagyra nőtt és szerteágazó. Erre való tekintettel, a dolgozat bevezető részében az eredmények megértéséhez feltétlenül szükséges információkra szorítokozom, illetve a témában tágabb kitekintést biztosító, hivatkozott közleményekre utalok.

2.1 A dolgozat alapvető koncepciója

Maga az amygdala fogalom, a kezdeti léziós kísérletek után, a tudományos köztudatban a félelmi reakciókért felelős (averzív jellegű) agyterületként rögzült meg. Annak ellenére, hogy a korabeli kutatók felhívták a figyelmet arra, hogy a lézió hatására nem feltétlenül a félelemérzet múlik el, hanem az egyedek képtelenek vagy nehezen tudják megbecsülni az érzelem „színezetét”, illetve az események „értékét” (Zorrilla és Koob 2013). Természetesen a léziók nem csak magát a komplexet érintették, hanem fontos területeket fosztottak meg jelentős kapcsolatuktól, elégtelenné téve azok teljes értékű működését. Ebből következően az amygdala kapcsolatainak vizsgálata adhat válaszokat a korábban is megfigyelt eredményeket illetően. Figyelembe véve a limbikus rendszerbe épülő erős kapcsolatrendszer, a megértéshez vezető út ezen alapvető szerkezeti elemek megismerésén át vezet. Ennek egyik legalkalmasabb módszere a távoli filogenetikai kapcsolatban álló, de a központi idegrendszeri felépítésükben hasonló fajok vizsgálata, illetve azokban fellelhető alapvető közös mechanizmusok feltérképezése. Ezt alapul véve vizsgáltuk meg a házityúk (*Gallus gallus domesticus*) központi



1. ábra Patkány amygdaloid komplexe (A-D rostro-caudalis) elrendezésű metszeteken (Sah, és mtsai 2003 nyomán)

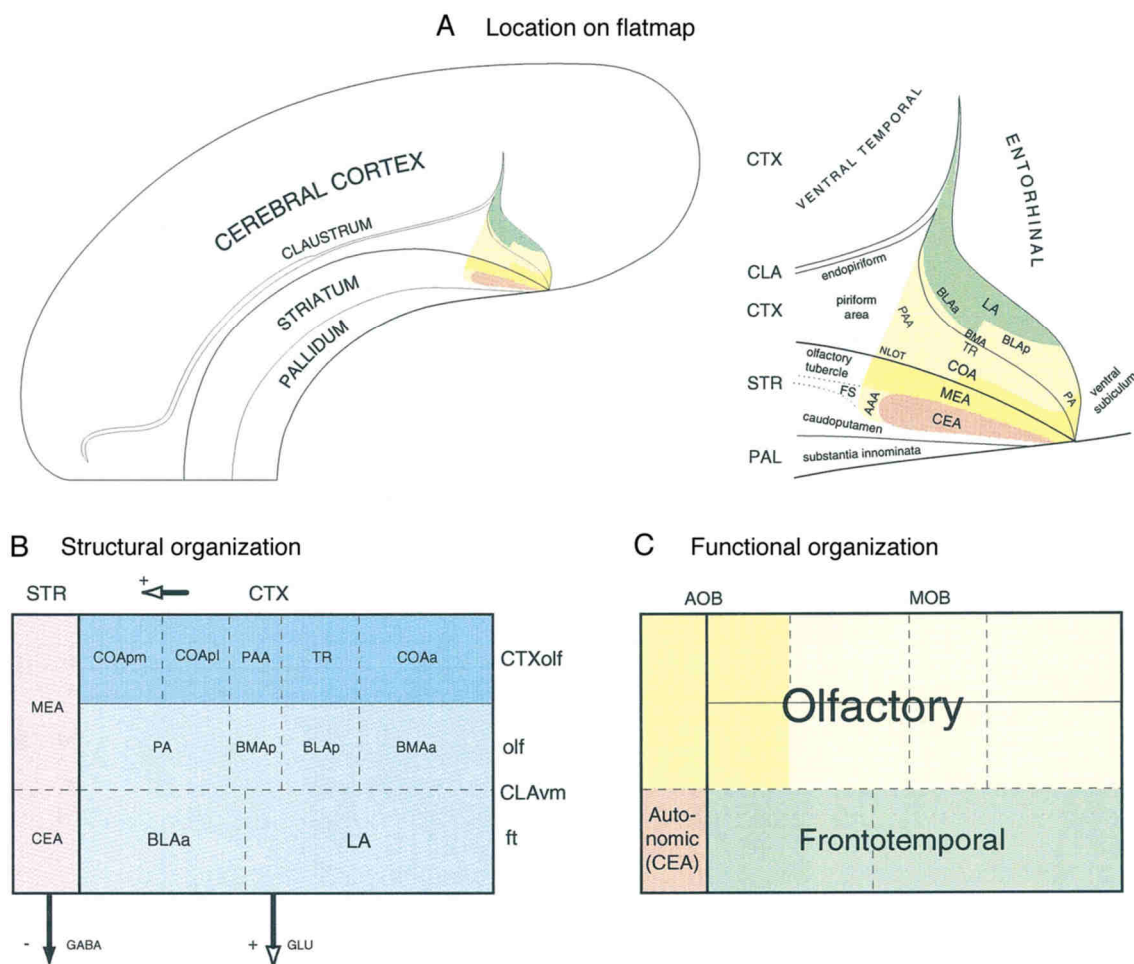
idegrendszerében található (emlőssel homológ) amygdaloid és egyéb limbikus területek eddigiekben hiányos kapcsolati viszonyait.

A megértéshez először az emlős rendszerekben leírt adatokat ismertetem, majd ennek tükrében térek át a madarakban ismert viszonyokra.

2.2 Az amygdaloid komplex emlősben

Már a kezdeti morfológiai elemzésekben kiderült, hogy az amygdala heterogén magcsoportok együttese. Az általánosan amygdala komplexként értelmezett területben, három fő magcsoportot különítenek el emlősben: basolateralis (lateralis és basalis), corticalis és centromedialis (centralis és medialis) magokat (Sah és mtsai (2003), 1. ábra).

Egyes szerzők inkább a funkcionális csoportosítást hangsúlyozzák, amely az általános magcsoportosítással lényegében közös vonásokat hordoz, azonban attól mégis eltérő felosztásban foglalja egybe a magokat. E szerint a basolateralis magok egy része a fronto-temporalis kérgi területekkel fenntartott kapcsolatuk alapján a fronto-temporalis rendszerbe, a corticalis olfactoros magokat és további basolateralis komponenseket a fő szagló rendszerbe sorolják. Míg a centromedialis magok medialis részeit a „kiegészítő”



2. ábra Az amygdaloid komplex (A) előagyai rétegekhez viszonyított elhelyezkedése lapos térkép nézetben, ill. (B) strukturális és (C) funkcionális felosztása patkányban (Swanson és Petrovich 1998 nyomán). Rövidítések: AOB – accessory olfactory bulb; CEA - centralis extended amygdala; CTX - cortex; MEA –medialis extended amygdala; MOB – main olfactory bulb; STR – striatum;

(accessory/vomeronasalis) szagló, addig azok centralis tagjait az autonóm (viscerolimbikus) rendszerhez sorolják (Swanson és Petrovich (1998), 2. ábra).

2.3 Az 'extended amygdala' emlősben

Alheid és Heimer (1988) felfigyelt arra, hogy az amygdala magok környezetében elhelyezkedő ventrobasisalis előagyi régiók (így a BNST vagy BST – bed nucleus of the stria terminalis) számos közös pontban hasonlítanak. Citoarchitektúrális és kemoarchitektúrális felépítésük közös pontokat hordoz. Projekciós (GABAerg) neuronjaik közös hypothalamicus és agytörzsi központokban végződnek és erősen kapcsolódnak az amygdala többi részéhez. Ennek alapján a centromedialis amygdala ventrobasisalis előagyi kiterjesztését javasolták, megalkotva a ('kiterjesztett') 'extended amygdala' (EA) fogalmát (Alheid 2003; Heimer és Alheid 1991; Alheid és Heimer 1988).

Az extended amygdalát (EA) funkcionális szempontok alapján tovább osztották egy centralis és egy medialis részre. A centralis EA többek között¹ a centralis amygdala magokat és a velük folytonos BSTL-t (bed nucleus of the stria terminalis lateralis részét) foglalja magába. A medialis EA többek között a medialis amygdala magokat, illetve a BST medialis részét tartalmazza (Alheid 2003). A medialis EA a nemi viselkedési reakciókban fontos (szaglási modalitásokat is feldolgozó) terület (Pereno és mtsai 2011; Martinez-Garcia és mtsai 2008). A centralis EA eddigiekben felsorolt területeit, a félelemmel és szorongással kapcsolatos viselkedéseket meghatározó területek közé sorolják (Martinez-Garcia és mtsai 2008; Walker és mtsai 2009). A centralis EA-hoz tartozó BSTL² divízió, a ventromedialis előagy területébe illeszkedő, nucleus accumbensszel (Ac) folytonos. Az EA koncepció megalkotói az Ac egy részét is a centralis EA-hoz sorolják (Heimer és mtsai 1997). Tehát a ventromedialis előagy területén az amygdala komplextől indulva egy funkcionális rendszer, a centralis EA rendszere húzódik.

¹ A basalis előagyban további területekkel is kiegészült az EA (pl. sublenticularis areák, substantia innominata vagy ventralis pallidum bizonyos részei), azonban a téma szempontjából releváns területeket említtem.

² A bed nucleus of stria terminalis alegységeinek elnevezése fajoként változó (főleg az iránykiegészítéseket tekintve, pl. lateralis, medialis, anterior, posterior stb.). Gyakori rövidítései a BNST, illetve BST. Dolgozatomban ezután a BST lateralis divíziójához sorolható BSTL, illetve azokkal homológ területekről értekezem.

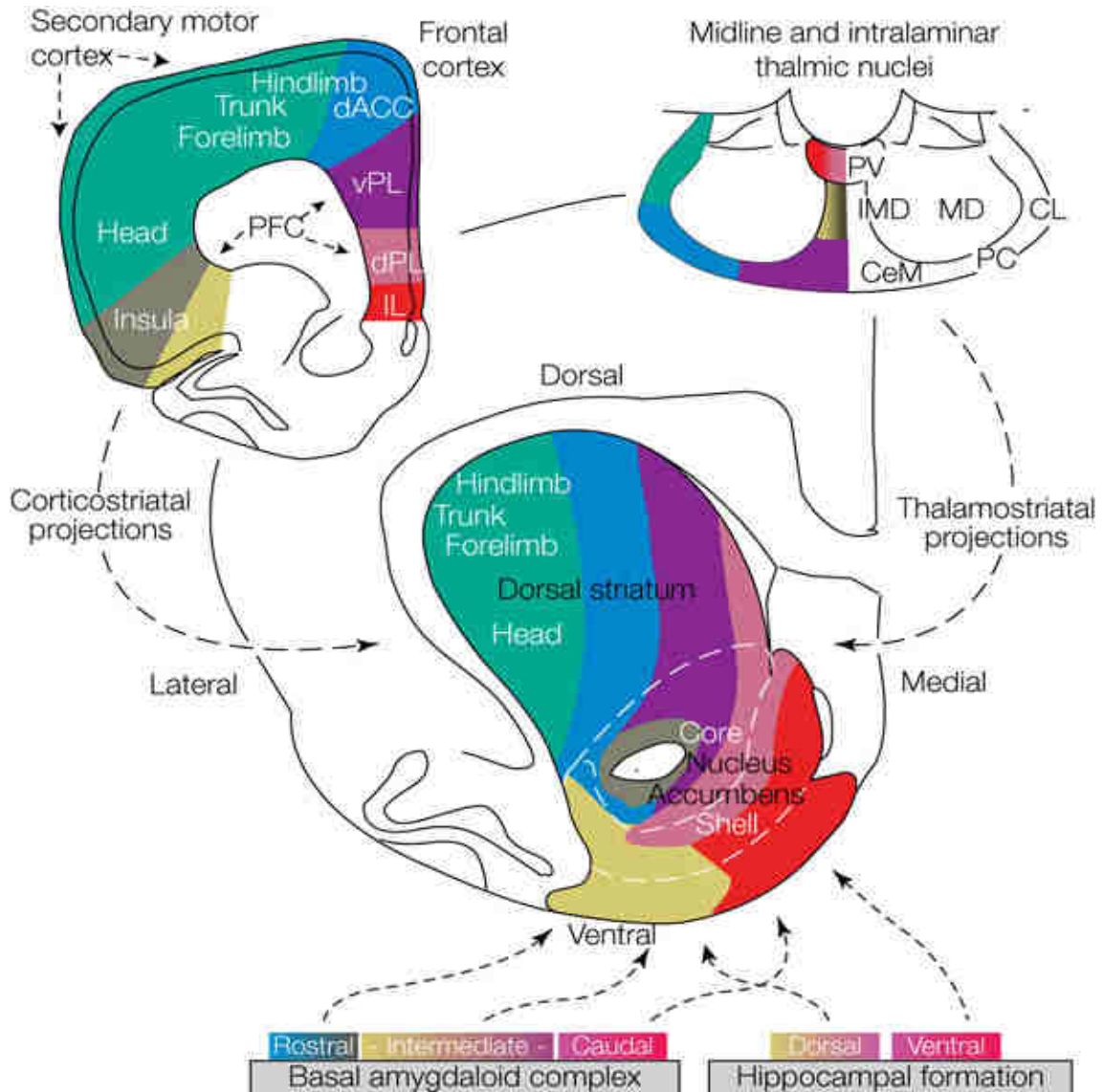
2.4 A pallialis és subpallialis amygdala fogalma

Eredetüket tekintve a basolateralis és corticalis neuronok a fejlődő előagy pallialis rétegeiből származnak, és a cortexre jellemző tulajdonsággal bírnak. A basolateralis magok területein található projekciós sejtek a pyramis sejtek jellegeit viselik, amelyek ennek megfelelően serkentő projekciókat képeznek. Az extended amygdala (centromedialis neuronok és BST) neuronjai subpallialisán fejlődő régiókból erednek és a striatum jellegeit viselik magukon, vagyis projekciós neuronjaik fő típusa a közepes tüskés (GABAerg) neuron (medium spiny neuron) és ennek megfelelően striatalis karakterrel rendelkeznek (Sah és mtsai 2003; Martinez-Garcia és mtsai 2008). Tehát fejlődési eredetükre utalva a fajok közötti összehasonlításban célszerű az extended amygdalának megfelelő területeket subpallialis amygdalának (SpA), míg a basolateralis amygdalának megfelelő területeket pallialis amygdalaként említeni.

2.5 Limbikus striatum (nucleus accumbens)

A striatum az előagy központi részében, subcorticalisan elhelyezkedő kiterjedt terület, amely a basalis ganglionok fő komponense, irodalma külön ágat képvisel³. A striatum neve főemlősökben megfigyelhető makroszkópos megjelenéséből ered. Bár folytonos sejtpopulációból áll, elsődlegesen pozicionálási szempontok szerint dorsalis és ventralis részekre osztják. Az emlősökre jellemzően a dorsalis striatum a nucleus caudatus és putamen komplexéből áll. A ventralis striatumot főleg a caudatus ventralis kiterjedésében található sejtpopuláció alkotja. A striatum fő bemeneteit a kiterjedt (serkentő) pallialis (emlősökben leginkább corticalis) kapcsolatai adják. A dorsalis striatumot leginkább a motoros kérgi bemenetek érik el és somatotopiás elrendeződés szerint végződnek (3. ábra), emiatt funkcionálisan motoros striatumként tartják számon. A ventralis striatum pallialis bemenetei a limbikus rendszer által domináltak (3. ábra), ezért azt a limbikus rendszerbe kapcsoltnak és összefoglalóan „limbikus striatumként” említi az irodalom. A ventralis striatum fő komponense a nucleus accumbens, amelynek

³ Az utóbbi években megjelenő kiemelkedő összefoglaló munkák jelentősen megkönnyítik a basalis ganglionokkal kapcsolatos irodalom részletes áttekintését. Ebben a pontban az általam megfogalmazott ismereteket Steiner és Tseng (2010) által szerkesztett és terjedelmes összefoglaló munkára való hivatkozással teszem meg.



3. ábra A patkány striatum morfológiai és funkcionális felosztása, illetve bemeneteinek sémás összefoglalása (Takahashi és mtsai (2008) nyomán).

kemoarchitekturális és kapcsolati szerkezete szerint két fő régiója van (core és shell, 3. ábra).

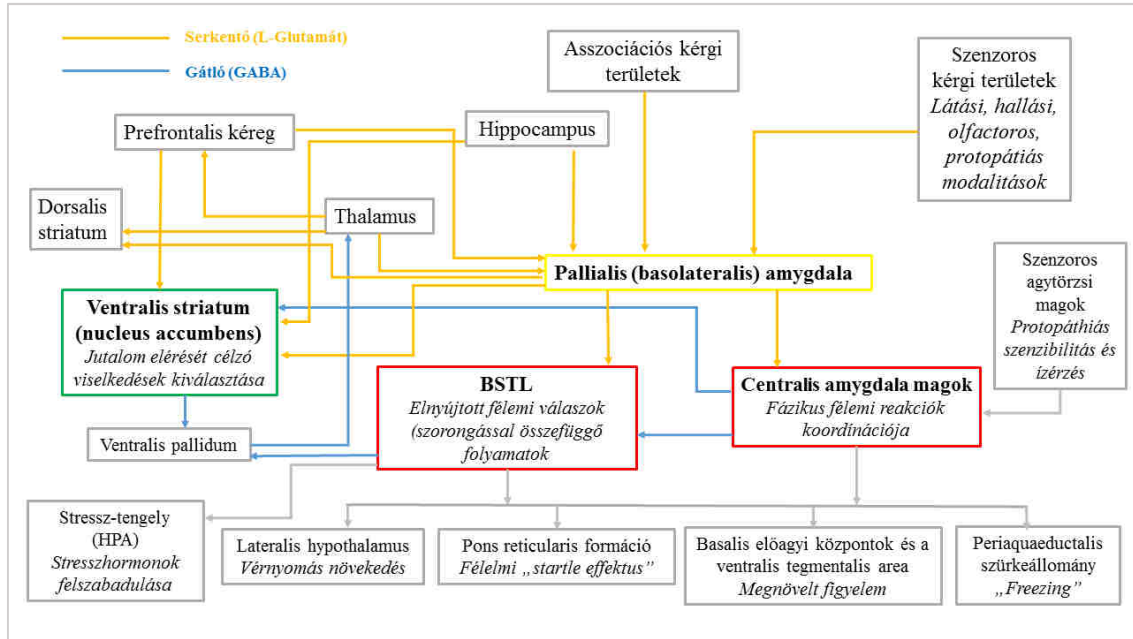
A striatum sejtjeinek 95%-át a fő projekciós GABAerg közepes tüskés neuronok (KTN, illetve MSN - medium spiny neurons), 5%-ban pedig interneuronok alkotják. A motoros részek általános funkciója a bemenetek által képviselt aktivitások szelekciója, amelyet többek között a dopaminerg rendszer bevonásával, a basalis ganglionok strukturálisan rendezett „direkt” és „indirekt” funkcionális köreiben valósul meg. A célirányos magatartás szempontjából, a basalis ganglionok (BG) összetett feladata, a

kívánt mozgások kiválasztása és a nem kívánt mozgások gátlása. A limbikus striatum az általánosan vett szelekciót összetett modalitású (amygdala, hippocampus, prefrontalis kéreg) bemenetei révén valósítja meg, illetve kimenetein keresztül közvetetten befolyásolja a motoros striatum funkcionális köreit is. Funkciója révén érvényesül a célirányos viselkedés, vagyis a jutalom követő (motivált) magatartás. Ezért gyakran a „jutalom központja”-ként tartják számon.

2.6 A pallialis amygdala ventromedialis előági projekciója emlősben

A pallialis (basolateralis) amygdala jelentős kimenettel rendelkezik a ventromedialis előági irányába (Zorrilla és Koob 2013; Alheid 2003). A területeket elérő rostok két útvonalon haladnak, amelyek a stria terminalis és ansa peduncularis kapcsolatrendszerének részei. A basolateralis amygdalában (BLA) található alterületek eltérő mértékben érik el a ventromedialis előági célterületeket (Ac, BSTL, centralis amygdala), ami egy rostro-caudalis topográfiát hordoz magában (Alheid 2003). A BLA projekciós neuronjai serkentő bemenettel végződnek a célrégiókban (McDonald 1996, 1991). A BLA által szolgáltatott jelek uni- és multi-modalitásúak, ugyanis neuronjait a feldolgozott kérgi és az alacsonyabb feldolgozottságú thalamikus bemenetek is eléri, vagyis egyazon neuron mindkét jelet megkaphatja (Sah és mtsai 2003). Valószínűsíthetően a pallialis amygdala neuronjai feldolgozás után a kontextusuknak megfelelő jelet továbbítják a ventromedialis előági központokba, ahol ennek megfelelő hatásokat váltanak ki (4. ábra). A legtöbb irodalmi adat külön foglalkozik a centralis EA területek és az Ac bemeneteivel.

Mint azt már említettem, az Ac a striatum ventralis részeként számos limbikus terület felől kap konvergens bemeneteket (prefrontalis kéreg, hippocampus, amygdala), így limbikus-motorikus kapcsoló állomásként (Mogenson és mtsai 1980), a basalis ganglionok rendszerébe szövődő kapcsolataival (4. ábra) serkenti a jutalom elérése érdekében kivitelezett mozgási minták elindítását. A kognitív (prefrontalis), tárgyfüggő (hippocampus) kontextusokon túl az emocionális komponens szállítója az amygdala (Basar és mtsai 2010).



4. ábra Információ áramlás a pallialis - centralis extended amygdala és ventralis striatum rendszerében (Walker és mtsai (2009) után módosítva)

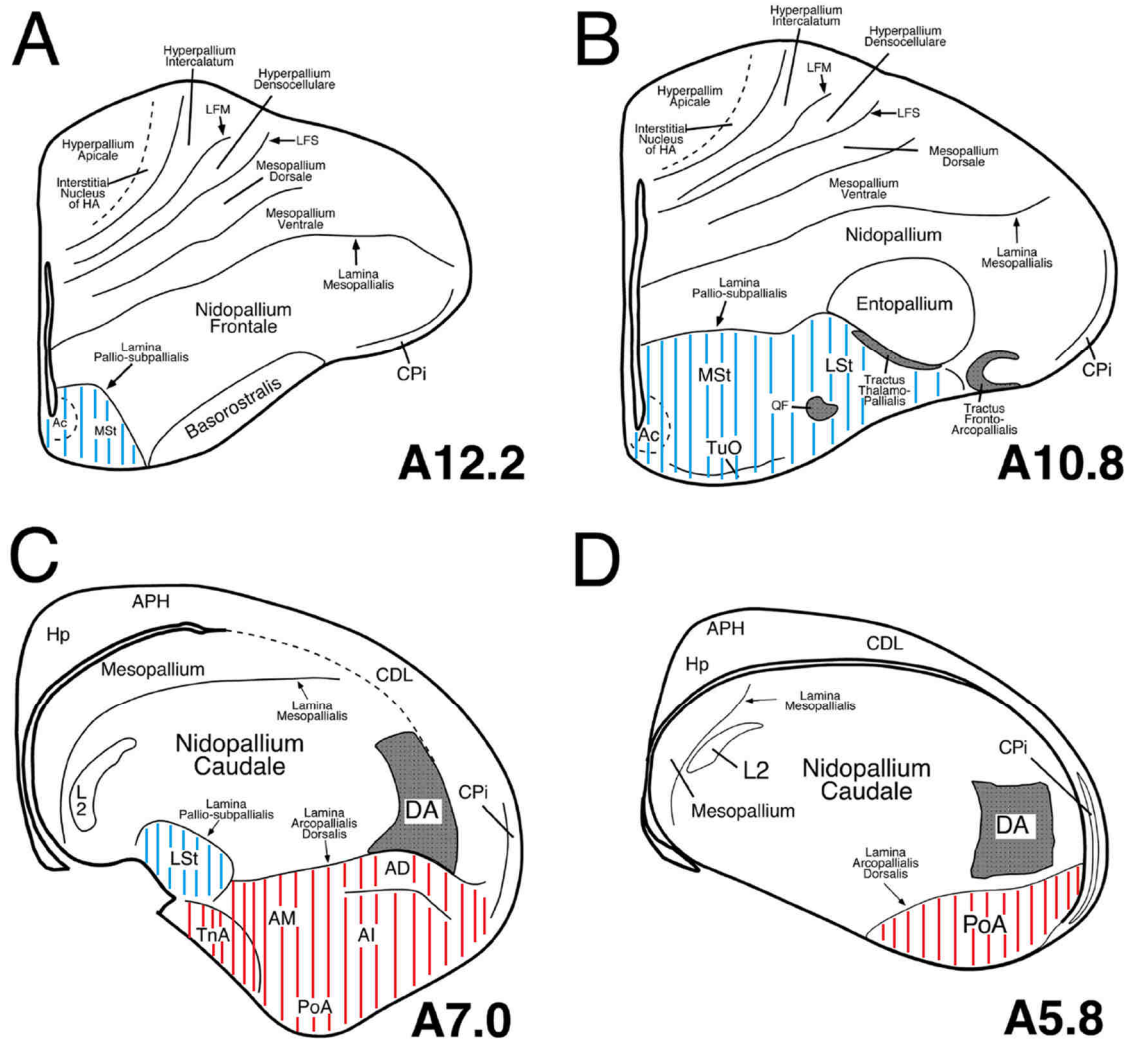
A centralis EA összetevői felé továbbított jel a félelem és a szorongás feldolgozásában fontos (4. ábra). Miközben a centralis amygdala mag a fázikus félelmi reakciók kiváltásában érintett, addig a BSTL a késői hatások, elnyújtott félelmi reakciók (szorongás) létrejöttében fontos terület (Walker és mtsai 2009).

Összegzésként a Fernando és mtsai (2013) által megfogalmazott gondolattal élék: „az amygdala őrzi az örömet és kerüli a fájdalmat”.

Látható tehát, hogy az emóciók kontextuális feldolgozásában fontos pallialis amygdala, erős kapcsolatot tart fent a ventromedialis előagy területeivel, amelynek leírása néhány nem emlős fajban is megtörtént már (Zorrilla és Koob 2013). Madarakban a továbbiakban tárgyalt okok miatt nem rendelkezünk kellő mennyiségű koherens információval.

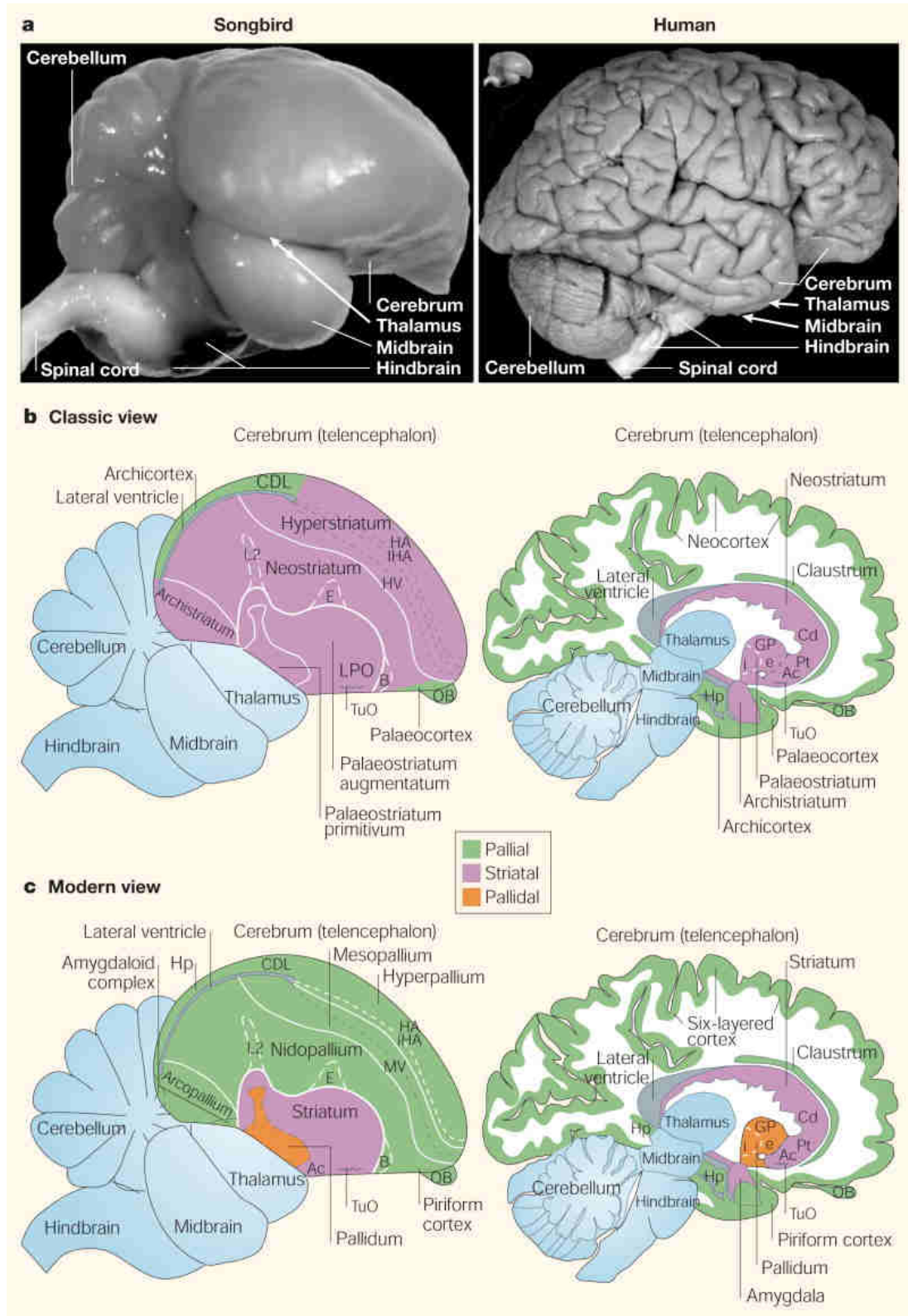
2.7 Madár és emlős idegrendszerének összehasonlítása.

Bár hosszú ideig a hüllőkkel egyetemben úgy tűnt, hogy a madár előagyban a basalis területek nagysága dominál, a korszerű idegrendszeri kutatásoknak hála mára egy jelentősen megváltozott helyzettel állunk szemben (Jarvis és mtsai 2005). Annak ellenére, hogy a hivatalos nevezéktan már több mint 10 éve aktualizálódott, a múltban megjelent



5. ábra Házityúk telencephalon coronalis metszetein (A-D rostro-caudalis irányban) feltüntetett új nevezéktan. (Kéken csíkozottan a striatum, pírosan csíkozottan az arcopallium elemei). Az ábrák jobb alsó sarkaiban szereplő számok a milliméterben mért antero-posterior távolságot jelölik Kuenzel és Masson (1988) szerint. *Rövidítések:* *Ac* – nucleus accumbens; *AD* - arcopallium dorsale; *AI* – arcopallium intermediale; *AM* – arcopallium mediale; *CDL* – area corticoidea dorsolateralis; *CPI* – cortex piriformis; *Hp* – hippocampus; *MSt* – medialis striatum; *LSt* – lateralis striatum; *PoA* – nucleus posterior amygdalopallialis; *TnA* - nucleus taeniae amygdalae; *TuO* – tuberculum olfactorium; (Reiner és mtsai (2004) nyomán).

adatok értelmezéséhez nélkülözhetetlen a korábbi szemlélet megismerése (5. és 6. ábrák). A régi szemlélet szerint a madáragy nagy része a törzsdúci rendszer szerint fejlődött. Ezért a mai értelemben vett külső pallialis köpenyzónát is striatalis elemként tartották számon. A madarak esetében az előagy külső köpenyzónája, a pallium nem rétegződött, mint az emlős cortex, hanem magcsoportokba rendeződött. Ez kapcsolati szinten nagy



6. ábra A madár agy régi (striatalis) és új (pallialis) szemlélete összehasonlítva humán agy viszonyaival (Jarvis és mtsai 2005 nyomán). (a) Énekes madár és humán agy külső kontúrjai és méretbeli különbségek. (b) A régi klasszikus nézet szerinti funkcionális területfelosztás madárban összehasonlítva a ma is aktuális humán felosztással. (c) Modern funkcionális pallialis szemléletet tükröző nevezéktan szerinti területbeosztás összehasonlítva a humán homológ területekkel.

változásokat feltételez, de amint azt bizonyították, a neuronok kémiai jelátviteli rendszere

jelentősen konzerválódott.

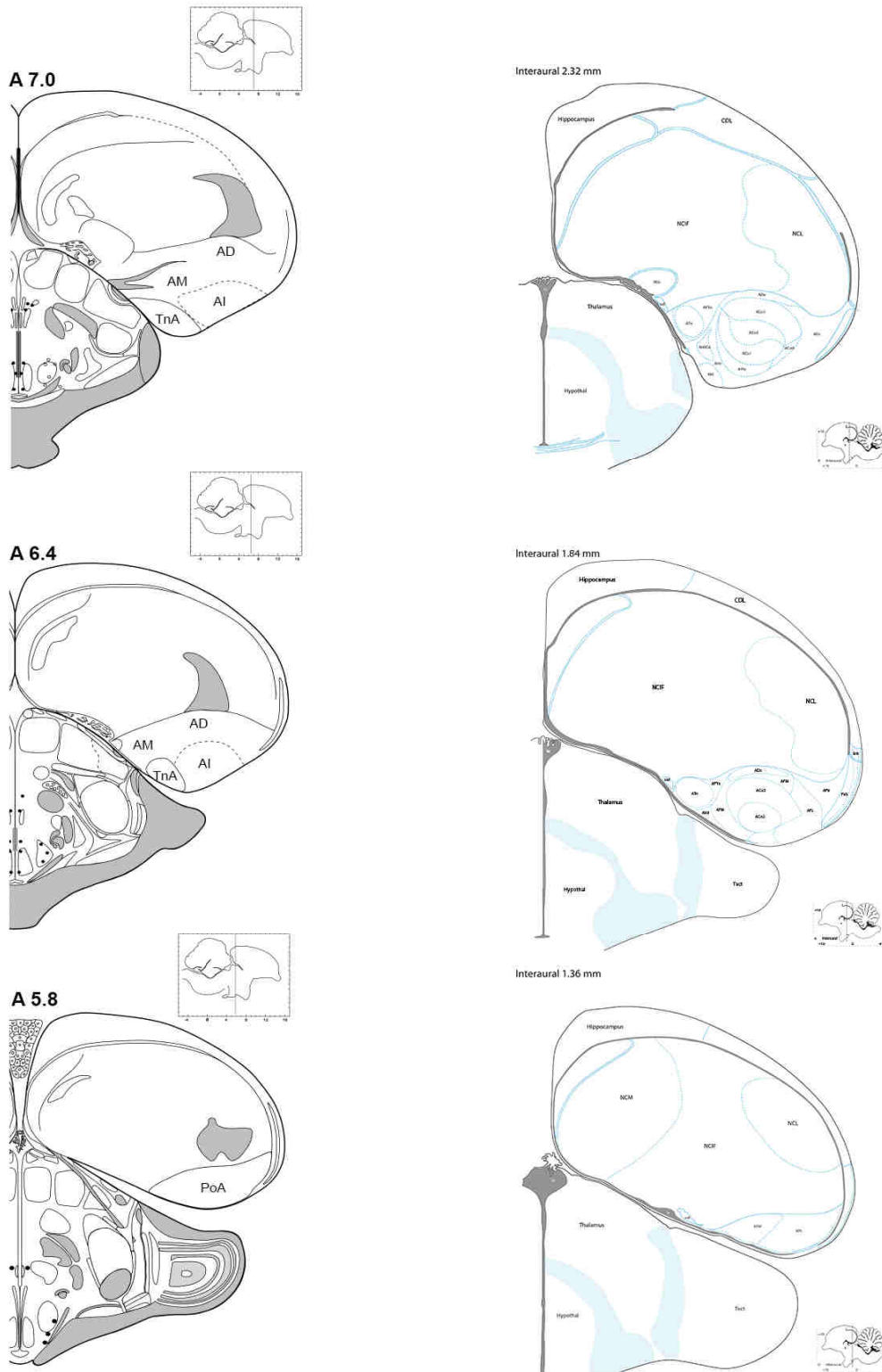
Az új elmélet a „helyükre tette” a pallium alatti subpallialis zónákban elhelyezkedő törzsdúcokat, amelyek jelentős hasonlóságot mutatnak emlős homológ területekkel. Ezek vizsgálatával feltárható hasonlóságok, alapvető idegi működések megismerését teszi lehetővé (Jarvis és mtsai 2005; Kuenzel és mtsai 2011).

Munkánk szempontjából fontos striatalis elemek a ventrobasisalis előagyban fekszenek, míg az amygdala homológ arcopallium a telencephalon caudoventralis részén található.

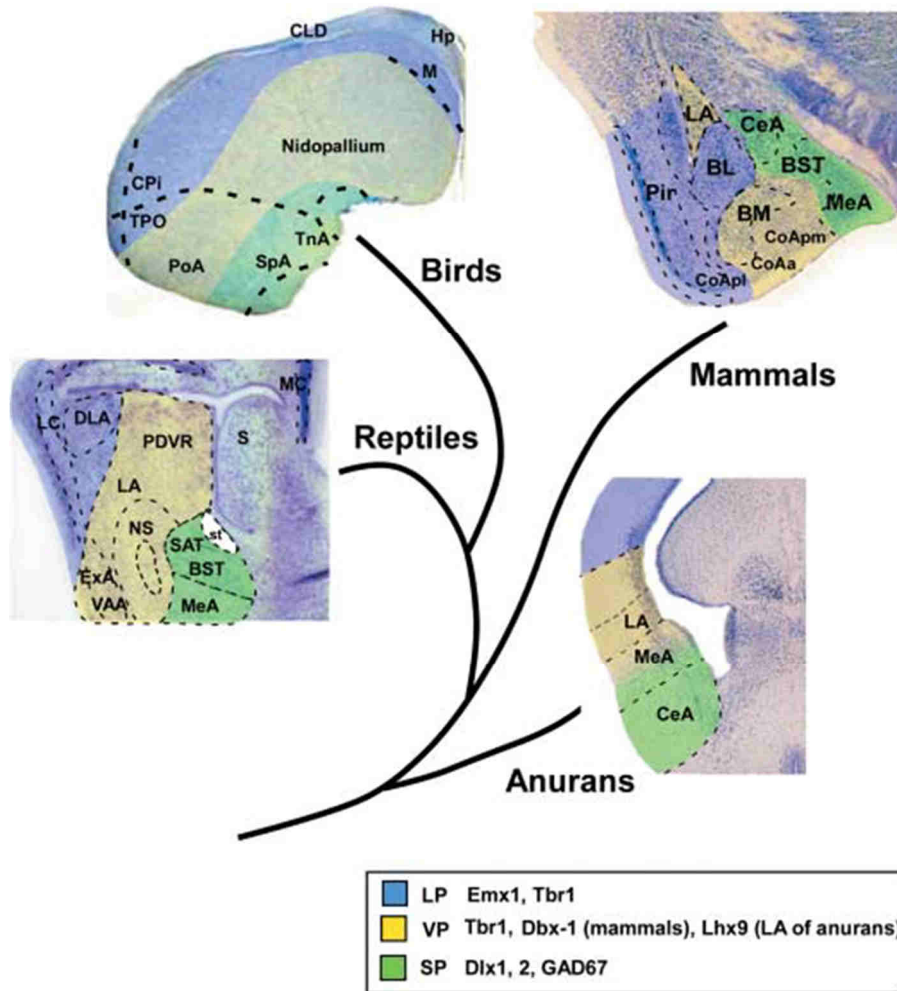
2.8 A madár pallialis amygdala területek emlősági homológiájának kérdése

Már a XX. század elején felvetették anatómiai megfontolások alapján a madár telencephalon caudoventralis területén található arcopallium (akkori felfogás és nevezéktan szerinti archistriatum) amygdaloid jellegét. Phillips (1964) vadkacsák arcopallialis területét is érintő léziós és stimulációs kísérletei, a viselkedési válaszokban bekövetkezett változások alapján rámutattak a terület addig feltételezett amygdaloid természetére. Ezt követően galambban végeztek léziós kísérleteket, ami az első jelentős kapcsolati feltérképezést is magában foglalta (Zeier és Karten 1971). Házityúkban az 1980-as években igazolták az arcopallium amygdaloid funkcióit (Phillips és Youngren 1986).

Az arcopallium általános felosztásával kapcsolatban megosztott a kutatók közössége, akik kétféleképpen közelítik a területet: (i) általános cito-, kemo-architektúra illetve kapcsolatai alapján és (ii) fejlődési szemlélet szerint. Ez a két szemléletmód a ma rendelkezésre álló házityúk (csirke) agyatlaszokban is megtalálható (Kuenzel és Masson 1988; Puelles és mtsai 2007). A 7. ábrán látható, hogy a madáragy-kutatók által széleskörűen használt Kuenzel és Masson (1988) által szerkesztett atlasz szerint az arcopallium: posterior (PoA – nucleus posterior amygdalopallialis), dorsalis (AD – arcopallium dorsale), intermedialis (AI - arcopallium intermediale), medialis (AM – arcopallium mediale), taenialis (TnA - nucleus taeniae amygdalae), illetve a 7. ábra nem prezentált rostralisabb coronalis metszeteken található anterior (AA – arcopallium anterius) területekből áll. A Kuenzel és Masson (1988) által használt felosztást az új madár nomenklatúra-fórum megegyezésén alapul. A PoA és TnA nevei sejtetik, hogy



7. ábra Házityúk caudalis telecephalon szintjei, bal oldali rostrocaudalis sorozatban Kuenzel és Masson (1988), illetve jobb oldali rostrocaudalis sorozatban Puelles és mtsai (2007) (csirke) agyatlászainak alapján.
mely magokat tekintik amygdaloid szereplőknek. A Puelles és mtsai (2007) által



8. ábra A lateralis és ventralis pallialis, ill. subpallialis területek származékai különböző fajokban az amygdalával feltételezeten homológ területeken Moreno és González (2007) szerint. *Rövidítések:* LP- lateralis pallium; VP – ventralis pallium; SP – subpallium;

szerkesztett atlaszban (7. ábra) részletesebb felbontást találunk. Érdekessége, hogy szinte minden elnevezett területben szerepel az amygdala jelző (a következetesség miatt a dolgozatomban a Puelles és mtsai (2007) által alkalmazott nevezéktanban az arcopallium jelzőt használom). Elkülönítenek egy több részre osztott központi core egységet (ACo – amygdala [arcopallium] core régió), amelyet dorsalisán (ADo – amygdala dorsalis régió), dorsolateralisan (APir – amygdalopiriform area), postrolateralisan (APL – posterolateralis amygdala [arcopallium]), posteromedialisán (APM – posteromedialis amygdala [arcopallium]) és medialisán (AHil - amygdala [arcopallium] hilaris régió) vesznek körbe. A Kuenzel és Masson (1988) szerinti TnA, Puelles és mtsai (2007) szerint az amygdalohippocampalis régió (AHi) felel meg. A két beosztás szerinti többi régiót nehéz átfedésbe hozni (talán a dorsalis terület összeegyeztethető).

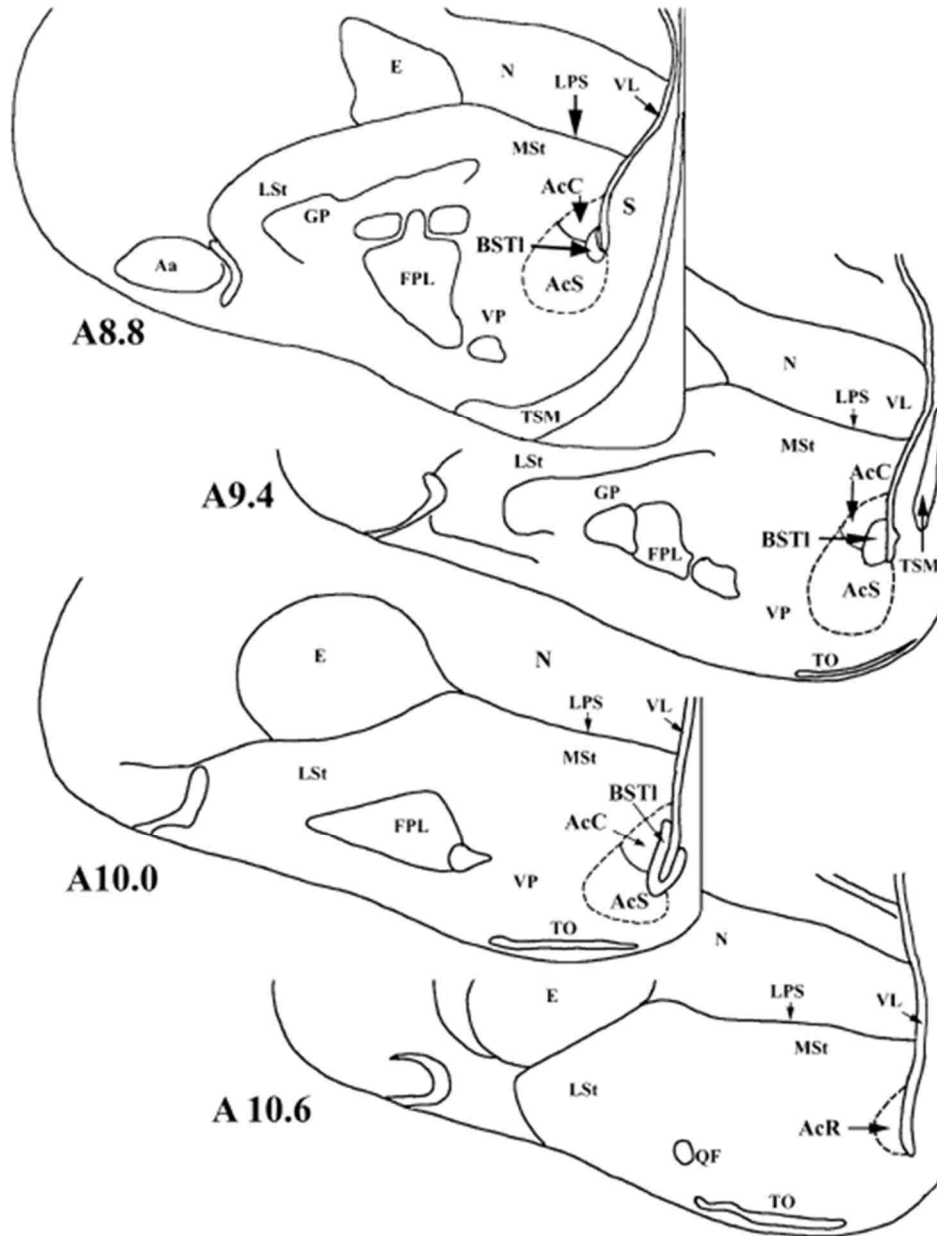
Puelles és Mtsai (2007) szerint az egész arcopallium a ventralis pallium származéka, tehát a pallialis amygdalának megfeleltethető egységek potenciális területe. Egyes munkákban a madár arcopallium területeinek eltérő fejlődési eredetét taglalják (Moreno és Gonzalez 2006, 2007). A dorsolaterális területeket a laterális pallium származékának tartják. A ventralis pallium mellett pedig a subpallialis elemek jelenlétét is feltételezik az arcopallium medialis (pl TnA) régióban (8. ábra). Látható tehát, hogy a fejlődési értelmezések is sokrétűek, hiszen Puelles és Mtsai (2007) szerint a terület nem tartalmaz subpallialis elemet.

A fenti sokrétű értelmezés kapcsán felmerül a kérdés, hogy a teljes arcopallium amygdaloidnak tekinthető-e?

2.9 A madár ventromedialis előagy felépítése (Ac és BSTL homológ régiók), illetve a subpallialis amygdala homológ területekre utaló adatok

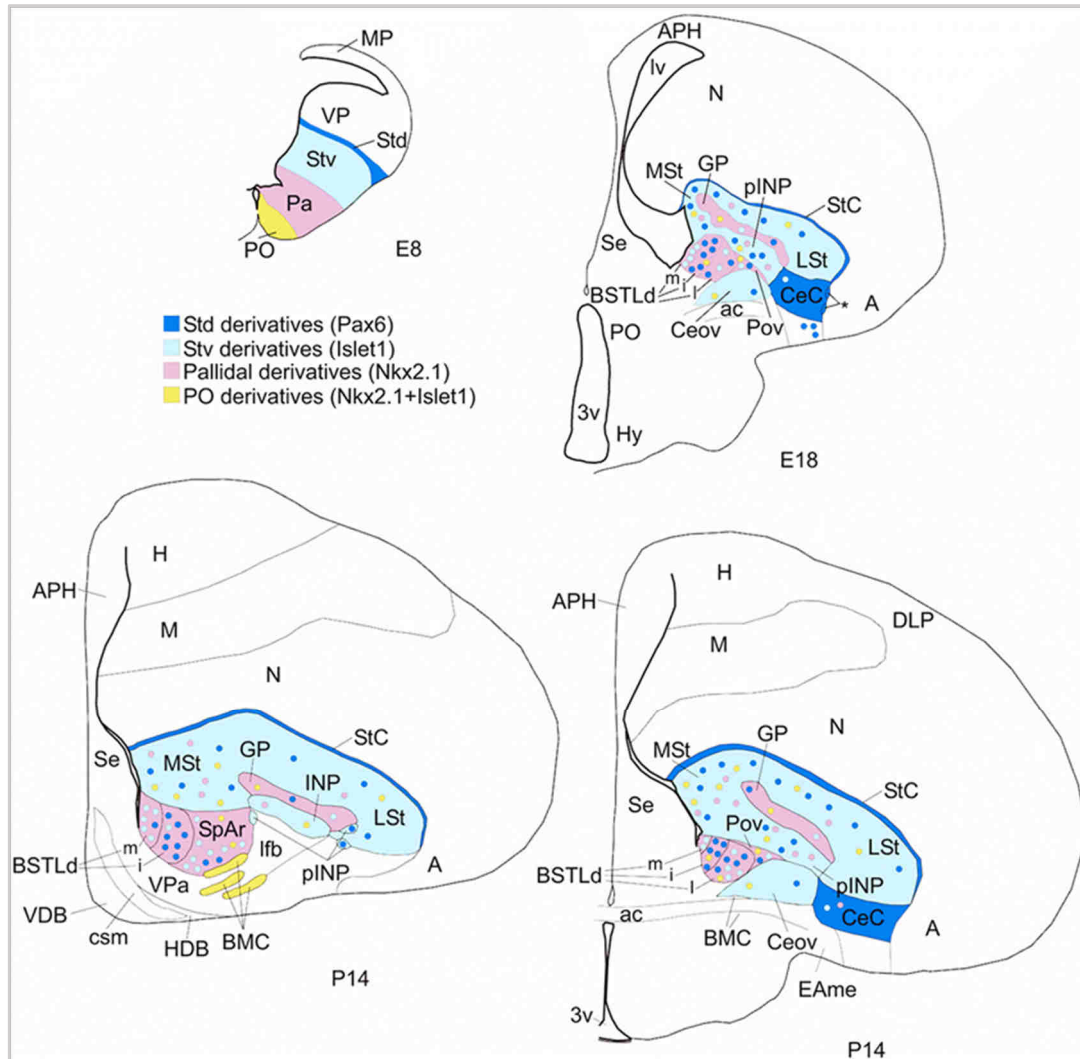
Az emlősökhöz hasonlóan a madarak törzsdúci rendszere is a „pallium” alatt helyezkedik el. A madarak striatuma az emlősben megismert dorsalis és ventralis elhelyezkedéstől kissé eltér, amit jól tükröz az általános felosztására használt laterális (LSt) és medialis striatum (MSt) elnevezés (5. ábra A, B és 9. ábra). Az MSt-re fókuszáló vizsgálatok a medialis-ventromedialis területeinek limbikus funkciókhoz kötött szerepére világítottak rá, felvetve az emlőssel homológ ventralis striatum (beleérve a nucleus accumbens) meglétét.

Az elmúlt évek nagy előrelépése volt, hogy számos madárfaj ventromedialis területén átértékelték az Ac és vele határos BSTL régiók elhelyezkedését (Balint és Csillag 2007). Ebben segített a kemoarchitekturális, kapcsolati, illetve fejlődési aspektusok áttekintése. A területek immuncitokémiai elkülönítésének egyik szempontja DARPP-32 szignálfehérje jelenléte az Ac és MSt területén, illetve hiányzó vagy gyenge jel a BSTL területén. Jelen állás szerint egy végleges kép van kialakulóban. Az Ac a medialis striatum (MSt) ventromedialis területén fekszik és az oldalkamra alsó csücskénél elhelyezkedő BSTL-t kívülről övezi (9. ábra). Rostrocaudalis viszonyuk az emlősökéhez hasonló.



9. ábra Házityúk ventromedialis előagyai régiójában fellelhető Ac, BSTL és MSt viszonyai (Bálint és Csillag (2007) nyomán). *Kiemelt rövidítések:* AcC – nucl. accumbens core; AcS – nucl. accumbens shell; BSTL – bed nucleus of the stria terminalis pars lateralis; LSt – lateralis striatum; MSt – medialis striatum; VP – ventralis pallidum;

A BSTL caudalis végénél olyan subpallialis sejtcsoportok vannak, amelyek az arcopallium medialis határáig folyamatos zónát képeznek, így megfeleltethetők a centralis amygdala (extended amygdala) részének (10. ábra), vagyis a subpallialis amygdalának, amit a régió genetikai markereivel igazoltak (Vicario és mtsai 2015).



10. ábra A subpallialis centralis extended amygdala fejlődési markerekkel bizonyíthatóan csirkében is jelen van. Ceov és CeC az emlős centralis amygdala magokkal homológ területek, amelyek a BSTL területétől az arcopalliumig (A) húzódnak. (Vicario és mtsai (2014) nyomán)

2.10 Az arcopallium ventromedialis előagy bemeneteire utaló irodalmi adatok

Házityúkbán az arcopallium kapcsolatait áttekintő pályakövetési vizsgálatot Davies és mtsai (1997) végeztek. Eredményeik alapján a dorsalis arcopallium mutatott bemenetet a ventromedialis előagy területeire. Csillag és mtsai (1997) elektronmikroszkópos szinten, a ventralis arcopallium irányából vizsgálták az előagy bemeneteket. Serkentő morfológiájú és L-Glu immunpozitív végződéseket találtak olyan arcopallialis végzésekkel együtt, amelyek nem mutattak L-Glu immunpozitivitást. Munkájuk alapján felmerült egy másik serkentő neurotranszmitter (L-Asp?) jelenlétének a lehetősége.

A felsorolt vizsgálatok felvetik azt a kérdést, hogy az arcopallium mely részei és milyen karakterrel vesznek részt a ventromedialis előagy kapcsolatrendszerében.

3 Célkitűzések

- Házityúk ventromedialis előagyi régióiba érkező „amygdaloid” (arcopallialis) serkentő bemeneteinek és szinaptikus mintázatának leírása anterográd pályakövetés és postembedding immunogold jelölés alkalmazásával.
- Az arcopallium ventromedialis előagyi régiókba vetítő forrás-neuronjainak (amygdaloid arcopallium) feltérképezése fluoreszcensen jelölt retrográd pályakövető anyagok segítségével.
- Az arcopalliumból a ventromedialis előagyba tartó axonok útvonalának (pálya) feltérképezése összehasonlító retrográd és anterográd pályakövetéses vizsgálatok alkalmazásával.
- A ventromedialis előagy régióiba érkező arcopallialis bemenetek végződési területei, az alrégiók (nucleus accumbenshez tartozó, ill. a kiterjesztett amygdala részeit alkotó területek) leírása.
- Az arcopallium ventromedialis előagyi bemeneteit adó neuronjainak kémiai neuroanatómiai jellemzése: a potenciális dopaminoceptív neuronok DARPP-32 szignálfehérje-tartalma, illetve kalciumkötő fehérjék (calbindin, calretinin, parvalbumin) expressziója alapján, retrográd pályakövetés és immunhisztokémia egyidejű alkalmazásával.

4 Anyagok és módszerek

4.1 Kísérleti állatok

A kísérleti állatként használt *Gallus gallus domesticus* hivatalos magyar neve *házityúk*. Sajnos jelen esetben félreértésre ad okot, hogy az általános vélekedésben a házityúk kifejezés alatt a felnőtt és ivarérett tojó egyed honosodott meg. Mivel kísérleteinknél ivaréretlen fiatal állatokat használtunk, ezért a továbbiakban a házityúk korai életszakaszára vonatkozó *csirke* elnevezéssel is élünk.

Állatok száma. Kísérleteinkbe bevont csirkék és patkányok egyedeinek felét előkísérletekben használtuk fel a sztereotaxiás koordináták beállításához, a pályakövetések és immunfestések optimalizálásához. A ventromedialis előagy elektronmikroszkópos vizsgálataihoz huszonöt (érkezésükkor 25-40 g testtömegű, 1-2 napos) különböző nemű csirkét (*Gallus gallus domesticus*, *Hunnia broiler*) és harminckét 290-340 g testtömeg tartományba eső hím albínó patkányt (*Wistar Crl-S.NET Wi Br*) vontunk be. Az arcopalliofugalis pálya pontosabb feltérképezése kapcsán végzett vizsgálatainkhoz további harminc csirkére volt szükségünk. A csirkék a Bábolna céghálózat keltetőiből, míg a Wistar patkányok a Semmelweis Egyetem Központi Állatházának a tenyészetéből származtak. Az állatokat megérkezésük után a kísérletek végéig 12 órás sötét/világos ciklust biztosító helyiségekben tartottuk, szükségleteiknek megfelelő táplálás és folyadékbiztosítás mellett.

Kísérleteinket, beleértve a sztereotaxiás műtéteket és transzkardiális perfúziókat, a Semmelweis Egyetem Állatvédelmi Szabályzatával, illetve „A kísérleti és egyéb tudományos célokra felhasznált gerinces állatok védelméről” szóló Európai Egyezményvel (Protocols: ETS No. 170, ETS No.123) összhangban, a 22.1/3453/003/2009 és a XIV-I-001/2269-4/2012 ügyiratszámú *állatkísérleti engedélyek* birtokában végeztük.

Az állatok életkora és testtömege. A kísérlet ideje alatt a csirkék esetében testtömeg gyarapodásuk 100 g-ot meghaladó volt és nagy szórást mutatott. Ezért paraméterként a csirke agyatlaszokban (ld. (Kuenzel és Masson 1988; Puellas és mtsai 2007) rögzített (hetes felbontású) életkort használtuk. A csirke koponya műtétek az 1 hetes életkor végén történtek. A meghatározott túlélési idő a műtét során beadott anyagoktól függően 2-7 nap volt, ami így a 2-ik élethetük elejére, illetve végére esett. Patkány koponya műtéteknél

Paxinos és Watson (2005) által javasolt 300 g körüli testtömeg érték (mint rögzített paraméter) jelentette az ideális sztereotaxiás állapotot. A patkányok életkorát illetően, az egyedek ezt a testtömeget kb. a hatodik élethetükben érték el. A perfúzió pedig – a csirkékhez hasonlóan - a műtét során beadott anyag tulajdonságaitól függően 2-7 napos túlélést követően történt meg.

4.2 Műtétek általános leírása

Altatás. A műtéti altatást intramuszkulárisan adott ketamin és xylazin keverékével végeztük. Csirkék esetén 34-50 mg/ttkg ketamin és 4-7 mg/ttkg xylazin, patkányok esetében 50-60 mg/ttkg ketamin és 10-15 mg/ttkg xylazin adagokat használtunk. A csirkéket a műtétek alatt, állandó hőmérsékletet biztosító (39-41⁰C tartományban állított) Supertech melegítő padon tartottuk.

Sztereotaxiás beadási műtétek folyamata. A célzott koponya műtéteket Kopf sztereotaxiás készülékben végeztük. A készülékhez Kopf mikroinjekciós egységet csatlakoztattunk és az egységbe 1 µl ösztérfogatú (0,01 µl beosztású, egyenes tűvéggel és 0,45 mm külső tűátmérővel rendelkező) Hamilton fecskendővel illesztettünk. Az állatok koponyáját három ponton rögzítettük: a két hallójáratnál és a felső állkapocsnál (kávánál). A felső állkapocs rögzítőt (csőrbefogót) csirkék esetében 5,0 illetve 10,0 mm-rel, patkányok esetében 3,5 mm-rel a nulla pozíció alá süllyesztettük. Az állatok fejtető bőrén (előkészítés és fertőtlenítés végeztével) mediansagittalis metszést ejtettünk és megfelelő feltárás mellett, láthatóvá tettük a sagittalis és coronalis varratokat, illetve a bregma területére eső kereszteződésüket. Ezt a pontot használtuk az antero-posterior (AP) koordináták kiinduló pontjaként. 1 hetes csirkében pedig a bregma területén még meglévő kutacs középpontja szolgált kiindulási pontként (referencia pontként egy itt található érgombolyag is használható). A medio-lateralis (ML) nulla pontként (középvonal) a sagittalis varrat vagy fiatal csirkékben a vérrel telt és így látható sinus sagittalis superior szolgált. A megfelelő AP és ML koordinátákkal megállapított behatolási pontnál a koponyacsontot átfúrtuk kb. 1-2 mm átmérőjű nyílás kialakításával a dura mater felszínéig. Ezután beállítottuk a dorso-ventralis (DV) irány nulla pontját a duralis felszín szintjében, majd steril injekciós tűheggyel két egymást keresztező metszést ejtettünk rajta. A Hamilton hegyét ezután a megfelelő ventralis koordináta szintje alá vittük 0,01 mm-rel, majd visszahúztuk a pontos magasságba, ezáltal kavernát képezve a beadandó

anyag számára. Az anyagokat 0,04-0,2 µl közötti térfogatban, egyenletes sebességgel 5-15 perc alatt adtuk be (csökkentve a szűrőcsatorna visszatöltődését). A Hamilton fecskendő az anyagok beadásának befejezését követő 10-15-ik percben távolítottuk el. A koponyacsont nyílását Gelasponnal tömítettük, majd a fejbőr széleit varratokkal összeillesztettük. Csirkék esetében a sebragasztás a vékony fejbőr miatt célravezetőbb volt.

4.3 Koordináták beállítása

A kísérleteinkben megcélzott agyterületek referencia koordinátáit az általunk alkalmazott keretek között próba-beadások végrehajtásával pontosítottuk. A próbaműtétek során a célzott területekbe metilénkéket adtuk be. Az állatokat ezután közvetlenül transzkardiálisan perfundáltuk. A frissen fixált agyakat azonnali metszéssel elemeztük a beadások módosítása végett.

A referencia koordinátákat a rendelkezésre álló csirke és patkány agyatlaszok felhasználásával nyertük. Csirke agy esetében Kuenzel és Masson (1988), illetve Puelles és mtsai (2007) összeállításában. Patkány agy esetében Paxinos és Watson (2005) munkájából. Patkányok esetében, a koponya alakjának kisebb szórása és a felső állkapocs következetes rögzítése miatt, a referencia koordináták a valóságot jól közelítették. Csirkék esetében, viszont, eltéréseket tapasztaltunk. A feltárt okok mögött az atlasz készítésénél használt sztereotaxiás készülékek eltérő beállítási paramétereit (pl. fej dőlésszöge), a fajtára (*Hunnia broiler*) jellemző gyors növekedés következtében kialakult koponyaméret-változások, illetve a csőrbefogó (fogak hiányában) helyzeti pontatlansága. Az eltérések miatt a metszetek atlaszok szerinti antero-posterior pozicionálását regionális elemzés alapján végeztük.

Az állatok kisebb csoportban érkeztek. Minden csoport esetében a kísérleti anyag beadását beállító műtét előzte meg. A próbaműtétek által jelentősen csökkenthető volt a későbbi sikertelen kísérletek aránya és ezáltal a felhasznált állatok száma.

4.4 Pályakövető anyagok (tracerek) beadása

Anterográd pályakövetés (BDA és HRP). Csirkékben az unilaterálisan célzott terület a dorsalis arcopallium [ADo Puelles és mtsai (2007), AId Kuenzel és Masson (1988) szerint] volt. Meghatározott koordinátái a csőrbefogó 5,0 mm-es sülyesztett pozíciójában: 6,2 mm a középvonaltól, 1,7 mm rostrálisan a bregmától, 4,2 mm ventrálisan a dura

szintjétől. A területbe másodlagos jelölést lehetővé tevő és anterográdf pályakövetést biztosító, 10 kDa molekulatömegű biotinizált dextransz (BDA; Molecular Probes, Eugene, OR) injektáltunk (0,1 µl térfogatban, 10% koncentrációban, steril desztillált vízben oldva). Patkányokban az unilaterálisan célzott terület a basolateralis amygdala [BLA Paxinos és Watson (2005)] volt. Meghatározott koordinátái a felső állkapocs 3,5 mm-es süllyesztett helyzetében: 2,0-3,0 mm a bregmától, 4,6-5,0 mm a középvonaltól, 7,8 mm a dura felszínétől. A patkányokat két csoportra osztottuk pályakövető anyag szerint. Az egyik csoport a csirkékhez hasonlóan BDA-t kapott (0,2 µl térfogatban, 10% koncentrációban, steril desztillált vízben oldva). A másik csoport tormaperoxidázt (HRP - horseradish peroxidase; Sigma) kapott 0,3 µl térfogatban. A HRP-t 30%-os töménységben oldottuk. Oldószerként dimetil-szulfoxid (DMSO, Sigma) 10%-os steril desztillált vizes oldatát használtuk. A DMSO alkalmazása a HRP sejtekbe történő felvételét segítő tulajdonságai miatt történt (Bolam 1992). Megjegyzendő, hogy a HRP gyenge anterográdf axonális transzportját kihasználó vizsgálat irodalmi ritkaság. Retrográdf axonális transzportja szimpla pályakövetési szempontból jóval előnyösebb. Hagyományosan ezért is tekintenek rá retrográdf tracerként. Azonban tiszta enzimeként a vezikuláris transzport során homogén eloszlást mutat, ellentétben más tracerek biotinizált csoportjaihoz kapcsolt állapottal. Ebből következően enzimhisztokémiai reakciók során homogénebb elektron-denz csapadék képezhető. Ezt a tulajdonságot immunogold technikával kombinálva előnyös detektálási feltételek biztosíthatók (ld. eredmények fejezetben), az anterográdfan jelölt rostok számának csökkenése mellett is.

Fluoreszcens retrográdf pályakövetés csirkében. A célzott területek jobb és bal oldali szimmetrikus jelenléte miatt, kísérleteinket mindkét előagyi féltekét érintően elvégeztük. Állatonként unilaterálisan, kettős vagy szimpla beadások történtek. Két különböző, közvetlenül fluoreszcensen jelölt retrográdf pályakövető anyagot, Alexa Fluor® 488 (vagy 594) konjugált koleratoxin béta alegységet (CTb; Molecular Probes, Eugene, OR; 1%, PBS-ben oldva), illetve Fast Blue-t (FB; Polysciences, Warrington, PA; 5 %, steril desztillált vízben oldva) injektáltunk a ventromedialis előagyi területeibe (BSTL-Ac-MSt). A tracereket 0,04 µl-es térfogatokban alkalmaztuk. A kettős beadások során a CTb-t injektáltuk első lépésben a BSTL-Ac régióiba. A terület általunk meghatározott koordinátái (a csőrbefogó 10,0 mm-es süllyesztett pozíciója mellett) a következők voltak: 4,30-4,40 mm rostrálisan a bregmától, 0,79-0,82 mm a középvonaltól, 5,57-6,07 mm a

dura felszíne alatt. Húsz perc elteltével, második lépésben következett a FB beadása 0,5 mm-rel lateralisabb területbe (medialis striatum – MSt területére) az előző koordináták AP és DV irányú értékeinek megőrzésével. Az eltérő anyagokat két különböző Hamilton fecskendővel adtuk be. A szimpla CTb beadásokat a BSTL-Ac koordinátáknak megfelelően végeztük.

Fluoreszcens anterográd pályakövetés. Csirkékben anterográd pályakövetést biztosító Alexa Fluor® 594 konjugált 10 kDa molekulásúlyú dextránt (D594; Molecular Probes, Eugene, OR; 10% koncentrációban, steril desztillált vízben oldva) injektáltunk az arcopallium dorsolateralis (APir), dorsalis (ADo) és hilaris (AHil) területeibe. A területek meghatározott koordinátái (a csörbefogó 10,0 mm-es süllyesztett pozíciója mellett) a következők voltak: APir 1,50 mm rostralisán a bregmától, 6,74 mm a középvonaltól, 3,55 mm a dura felszíne alatt; ADo 1,50 mm rostralisán a bregmától, 5,50 mm a középvonaltól, 5,00 mm a dura felszíne alatt; AHil 1,50 mm rostralisán a bregmától, 4,60 mm a középvonaltól, 6,00 mm a dura felszíne alatt.

4.5 Perfúzió és metszés

BDA és HRP pályakövetés kísérleti állatainak perfúziója. BDA beadást követően csirkéknél 10 napos, patkányoknál BDA esetében 3 hetes, illetve HRP esetében 48 óras túlélés után mély altatásban (altató adagokat ld. a műtétek részénél) transzkardiális perfúziót végeztünk. Állatonként először 100 ml fiziológiás sóoldattal (0,9% NaCl), ezt követően pedig 500 ml fixáló oldattal [4% formaldehid, 0,5-1% glutáraldehid és 0,1 M foszfát puffer (PB), pH 7,4]. A koponyából történt eltávolításuk után, az agyakat egy éjszakán át 4°C-on postfixáltuk (4% formaldehid, 0,1 M PB, pH 7,4). Ezt követően Leica vibratóm készülékkel (0,1 M PB oldatban kezelve) 70 µm vastag coronalis metszeteket készítettünk.

Fluoreszcens tracers pályakövetések kísérleti állatainak perfúziója. Retrográd pályakövetésnél 4 napos, anterográd pályakövetésnél 7 napos túlélést követően mély altatásban (altató adagokat ld. a műtétek részénél) transzkardiális perfúziót végeztünk. Állatonként először 50 ml fiziológiás sóoldat (0,9% NaCl), ezt követően pedig 250-300 ml fixáló oldat [4% formaldehid és 0,1 M PB, pH 7,4] használatával. Az agyakat koponyából történt eltávolításuk után egy éjszakán át 4°C-on postfixáltuk (4% formaldehid, 0,1 M PB, pH 7,4). Ezt 4°C-on 2 napos (krioprotektáns) 30% szacharóz (pH

7,4 PB-ben oldva) kezelés követte. Ezután Leica fagyasztó mikrotómmal 70 μm vastagságú coronalis sorozat metszeteket készítettünk. Az így készült metszeteket a következő lépésig 4 °C-on 0,1% nátrium azid tartalmú PB oldatban tároltuk.

4.6 Metszetek feldolgozása, immunhisztokémia

BDA és HRP tracerek előhívása. A glutáraldehid-fixált metszeteket krioprotekciós kezelésnek vetettük alá (10%, 20%, 30% pufferelt szacharóz oldatok felszálló sorával kezelve). A szöveti penetráció elősegítése végett a metszeteken gyorsfagyasztást végeztünk (folyékony nitrogénnel). Ezt és a további lépéseket a megfelelő pufferrel történő mosási lépés követte. A BDA tartalmú metszeteket HRP-konjugált avidin-biotin komplex (ABC, Vectastain PK-4000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 1:100-as hígítású oldatával kezeltük. Az ABC kezelt és tracerként HRP-t tartalmazó metszeteken (FM és TEM vizsgálatot is lehetővé tevő kromogén és elektrondenz csapadékot adó) HRP enzimreakciónak vetettük alá. Szubsztrátként a 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid pufferelt oldatát (DAB, 60 mg /100 ml 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0) használtunk. A reakciót 1% H₂O₂ oldattal aktiváltuk és fénymikroszkóp alatt ellenőriztük a festődés előrehaladtát, majd az optimális intenzitás elérésekor, mosási lépésekkel (1x pH 8,0 Tris, 3x pH 7,4 PB) leállítottuk.

A *fénymikroszkópos (FM)* vizsgálatra szánt metszeteket zselatinnal bevont tárgylemezre vettük fel. A megszáradt metszeteket alkoholos dehidratáló és xilolos kezelést követően fedőlemezzel borítottuk, DePeX (Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) fedőanyagot használva. Néhány metszet esetében kiegészítő Nissl festést végeztünk.

A *transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM)* vizsgálatra kiválasztott metszetekből a későbbi tájékozódást elősegítően trapéz alakzatban kivágtuk a ventralis striatumot/nucleus accumbenst tartalmazó régiókat. Az így kivett mintákat 45 percig 1%-os OsO₄ pufferelt oldatában inkubáltuk (0,1 PB, pH 7,4). Etanolos dehidratációt (felszálló alkohol sor) és propilén-oxid kezelést követően a mintákat Durcupan műgyantába (Fluka) ágyasztuk. Reichert ultramikrotómmal ultravékony (60-80 nm vastagságú) metszeteket készítettünk, amelyeket Formvar-hordozóhártyás nikkel rácstra (grid) vettünk fel.

Postembedding EM immuncitokémia. Néhány állat mintájában (5 db csirke és 4 db patkány) az elektronmikroszkópos mintaelőkészítés folyamatát L-Glutamát (anti-Glu)

vagy L-Aszpartát (anti-Asp) ellenes immunfestéssel egészítettük ki. A festési eljárást Somogyi és Hodgson (1985) által kidolgozott koloidális arany módszer szerint végeztük. Az inkubációkat a metszeteket tartalmazó gridek megfelelő oldatokból képzett cseppeken történő elhelyezésével végeztük. A metszeteket 6 percig 1%-os perjódosavas kezelésnek tettük ki, amit 7 perces 1%-os nátrium-metaperjodát kezeléssel folytattunk (beágyazó szer kimaratása és epitóp feltárás céljából). A nem specifikus immunreaktivitás gátlása végett a mintákat 30 percig (szobahőmérsékleten) 1% ovalbumint tartalmazó PBS (phosphate-buffered saline) oldattal kezeltük. A blokkolást követően a metszeteket szobahőmérsékleten 2 órán át Asp (poliklonális nyúl; Sigma; 1:7000 hígításban) vagy Glu (monoklonális egér; Swant; 1:1500 hígításban) ellenes primer ellenanyagokat és 1% normál kecske szérumot (NGS) tartalmazó PBS oldattal inkubáltuk. Mosási lépéseket követően 20 perces, szobahőmérsékleten végzett koloidális arany szemcsével konjugált szekunder ellenanyaggal történő kezelés következett. Az egér antitestek ellen termelt kecske IgG-k 10 nm (British Biocell; 1:20 hígításban), a nyúl antitestek ellen termelt kecske IgG-k 15 nm (British Biocell; 1:25 hígításban) nagyságú koloidális arany szemcsével voltak konjugálva. A szekunder ellenanyagokat 1% BSA-t (marha szérum albumin) és 0,5% Tween-20-t tartalmazó Tris-HCl pufferben (0,05 M, pH 7,4) oldottuk. A szekunder inkubálást követően a metszeteket bidesztillált vízben háromszor átmostuk, majd uranil acetát és ólom citrát oldataival utókontrasztoltuk.

Fluoreszcens tracereket tartalmazó metszeteket egyik sorozatát PB-ben történő mosás után, bidesztillált vízből zselatinnal bevont tárgylemezre húztuk. Rövid száradási idő elteltével a metszeteket fedőlemezzel borítottuk glicerin-PBS 1:1 arányú keverékét vagy Surgipath Micromount (Leica Biosystems) lefedőszert használva.

Többszörös fluoreszcens jelölések esetében a tárolt metszeteket PB oldattal többször átmostuk, majd 5% normál szamár szérumot (NDS; Jackson) és 0,3% Triton X-100-t (Sigma) tartalmazó PB oldatban szobahőmérsékleten 2 órán át blokkoltunk. Ezt követően a metszeteket 72 órán át 4 °C-on elsődleges ellenanyagokkal inkubáltuk (Hemmings Jr és mtsai 1987; Yamamoto és mtsai 2012; Tomassy és mtsai 2014; Thomsen és mtsai 2010) (ld. 1. táblázat), amelyeket 0,1% NDS és 0,3% Triton X-100 tartalmú PB oldatban hígítottunk. Többszörös PB-ben történő mosást követően, a metszeteket 24 órán át 4 °C-on faj-specifikus, számban termelt, (karbocianid) Cy2 vagy Cy5 jelzett szekunder antitestek (Jackson) 1:500 hígítású oldatában (PB) inkubáltuk. A metszeteket zselatinnal

bevont tárgylemezre húztuk, majd üveg fedőlemezzel fedtük le Surgipath Micromount lefedőszert használva.

1. táblázat *A többszörös immunfluoreszcens jelölésnél használt markerek*

Marker	Forrás	Donor faj	Hígítás	Referencia
DARPP-32	H.C. Hemmings	Egér, mk ^a	1:2000	Hemmings Jr és mtsai, 1987
Calbindin D28k	Synaptic Systems	Tengerimalac, pk ^b	1:1000	Yamamoto és mtsai, 2012
Calretinin	Synaptic Systems	Tengerimalac, pk ^b	1:1000	Tomassy és mtsai, 2014
Parvalbumin	Sigma	Egér, mk ^a	1:2000	Thomsen és mtsai, 2010

^amonoklonális antitest, ^bpoliklonális antitest

4.7 Képkötés és képfeldolgozás

Fénymikroszkópos és epifluoreszcens képeinket digitális kamera rendszerrel ellátott Olympus BX-51 epifluoreszcens mikroszkóp 1,25x, 4x, 10x, 20x és 40x nagyítású tárgylencséivel készítettük. A felvételeket Viewfinder Lite és Studio Lite programok segítségével, tiff formátumban rögzítettük.

Az egyszerű epifluoreszcens felvételeken túl, az arcopalliofugalis pálya rostrocaudalis lefutásának bemutatására (egy kiválasztott minta esetében), a beadás által érintett telencephalon teljes basalis területét lefedő, közepes nagyítású (rostokat már jól prezentáló) mozaikfelvétel csomagot készítettünk. A féltéke minden harmadik (sorozatban gyűjtött, 70 µm vastagságú) metszetéről készült mozaikfelvétel-csomag. A mozaikokat IrfanView számítógépes képkezelő program 'Panoráma' opciójával először sorokba rendeztük (egyesítettük), majd a sorokat függőlegesen összeillesztettük. Rostrocaudalisán így 25 db metszet feldolgozására került sor.

A többszörös fluoreszcens jelet tartalmazó metszeteket Zeiss 780LSM típusú lézerkonfokális pásztázó mikroszkóp képfeldolgozó rendszerével vizsgáltuk. A képek 10x, 20x, vagy 63x nagyítású tárgylencse használatával készültek. A mikroszkóp ZEN szoftverének számos lehetőségei között, lehetővé vált az agyszeletek területi áttekintést biztosító összeállításainak elkészítése. Így a többszörös jelöléseket tartalmazó anyagok

áttekintő képei 10x nagyítású tárgylencse alatt, a ZEN program 'auto-tile-and-stitch' funkciójával készültek. A legnagyobb felbontású felvételeinket minimális optikai szeletvastagság rögzítése (0,7-0,9 μ m) mellett készítettük. A fluoreszcens festékek emissziós spektrumain belül a következő tartományokból detektáltunk: Alexa Fluor 488 (490-550 nm), Cy2 (505-530 nm), Alexa Fluor 594 (560-610 nm), és Cy5 (650-720 nm).

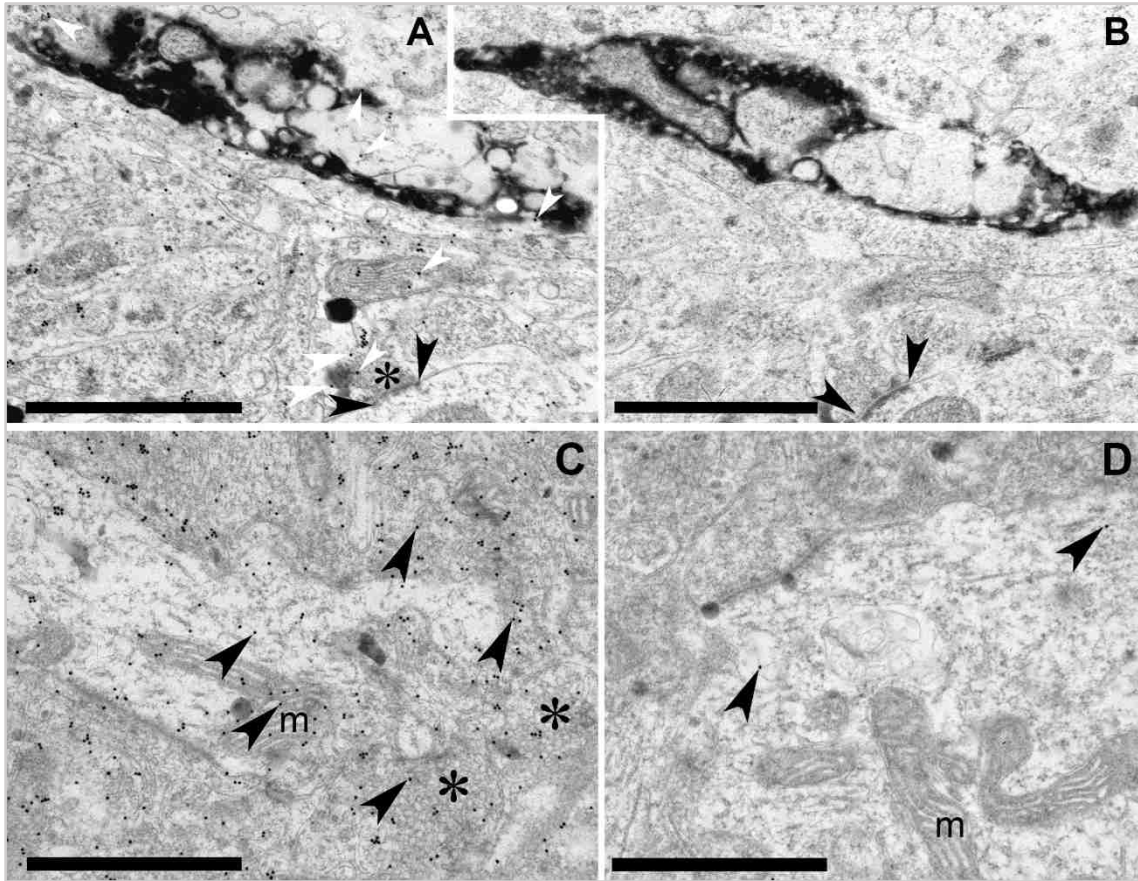
Elektronmikroszkópos felvételeinket digitális kamerával és szoftverrel ellátott JEOL 100S elektronmikroszkóp segítségével készítettük, amelyeket tiff formátumban rögzítettük.

A különböző módszerekkel készült, végül tiff formátumban kódolt képeket Adobe Photoshop képszerkesztő programmal dolgoztuk fel.

4.8 Kontroll vizsgálatok és mérések

A postembedding immunjelölések elsődleges és másodlagos antitestjeinek specifikus kötődését több ellenőrző lépés igazolta [i-iv]. Leírásomban ezt külön szeretném hangsúlyozni, hiszen az L-Aszpartát (L-Asp) és L-Glutamát (L-Glu) aminosavak kis endogén (metabolikus folyamatokban és fehérjék alkotóelemeiként is résztvevő) molekulák, amelyek szerkezetükből adódóan epitópként szinte jelentéktelen eltérést mutatnak. Azonban az antitest gyártói (Sigma és Swant) összetett eljárásaiban ennek a különbségnek a kihangsúlyozására lehetőség nyílt.

[i] A monoklonális anti-L-Glutamát antitestet glutáraldehid-kapcsolt L-Glutamát-BSA konjugátum ellen termelték. A gyártó (Swant) az L-Glu-BSA konjugátumokhoz erősen kötődő és az Asp-BSA-ra jelentéktelen kötődést mutató antitesteket, az őket termelő klónok (hibridóma sejtek) szelekciójával érte el. A poliklonális anti-L-Aszpartát antiszérumot nyúlban termelték, tisztított L-Asp és KLH (keyhole limpet hemocyanin = kulcslyukcsiga hemocianin) konjugálásával. A gyártó leírásából külön kiemelendő, hogy az antitest L-Glu és BSA ellen nem mutatott immunreaktivitást.



11. ábra Transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek (A-B) csirke és (C-D) patkány nucleus accumbens core régiójából, postembedding immunogold festést követően. Csirke (A-B) nucleus accumbens core régiójában elektronenz csapadékot (tracer jelölést - BDA) tartalmazó axontágulatról készült metszéspár felvételei. L-Aszpartát (L-Asp) ellenes elsődleges (A) immunfestést követően csapadékot tartalmazó axontágulatban, illetve egy aszimmetrikus szinapszis (*fekete nyílhegyek*) axonterminálásában (*csillag*) és környezeti ultrastruktúrában (pl. mitokondriumban) arany szemcse (15 nm) halmozódás figyelhető meg (*fehér nyílhegyek*). Az elsődleges immunjelölés nélküli (kontroll, B) metszéspáron, immunogold festést követően az előzőekben pozitív axonterminális (*fekete nyílhegyek*) nem mutat jelölést, hasonlóan a csapadék tartalmú axontágulathoz. Patkány mintákon (C-D) az L-Asp immunjelölést követő immunogold festés (C) jelentős szemcsehalmozódást (*fekete nyílhegyek*) mutatott a szöveti struktúrák fölött, kiemelten a vezikula felhők (*csillagok*) és mitokondriumok (*m*) esetében. Az elsődleges jelölés hiányában (kontroll, D) az arany szemcsék száma a szövetek fölött elhanyagolható szintre (*fekete nyílhegyek*) csökkent. Kiemelendő, hogy a mitokondriumok (*m*) fölött teljes mértékben hiányoztak az arany szemcsék. *Lépték:* 1 μ m.

[*ii*] Laborunk korábbi munkái során, mindkét antitestre vonatkozóan (Adam és Csillag 2006) megtörtént a kontroll immunspecifititás vizsgálat, amelyben a próba „szendvics minta” az általunk is alkalmazott fixálási beállításokkal készült [Ottersen és mtsai (1992) által kidolgozott módszer szerint].

[iii] A szekunder antitestek feldolgozott mintáinkra vonatkozó kötődési tulajdonságait külön megvizsgáltuk. Kontroll metszeteken a postembedding immunfestésnél leírt eljárást végeztük el, azonban a primer antiszérumokat NGS-el (normál kecske szérum) helyettesítettük. Az eredményeink igazolták kísérleti körülményeink között a szekunder antitestek specifikus kötődését (11. ábra). Külön igazoltuk annak tényét, hogy a kísérleteinkben használt kolloidális arany szemcsék nem kötődnek a tracer azonosításához használt DAB csapadékhoz, egy esetleges álpozitív eredményt okozva (1. ábra, A-B).

[iv] Az L-Asp és L-Glu immunjelölések kémiai kötődési szempontjain túl, az aminosavak ultrastrukturális elemekben mutatott általános halmozódása további módszertani megoldásokat igényelt. Az L-Asp és L-Glu molekulák idegszövetben nemcsak neurotranszmitterként lokalizálódó halmazban, de az általános metabolizmus szempontjából is fontos lépésekben vesznek részt. A két halmaz között pedig számtalan átmeneti állomás létezik. Ennek következtében az immunjelölések a teljes szövet felett fellelhetők (ld. 11. ábra). Azonban az átlagos területi eloszlásra tekintettel egyes területek halmozódást mutatnak, ami az állatonként vett minták statisztikai elemzése nélkül nem értelmezhető. Ezt figyelembe véve, minden vizsgált állatból származó mintán statisztikai vizsgálatot végeztünk az L-Asp és L-Glu eloszlását illetően. Mintánként 10 db véletlenszerűen kiválasztott területről ($270 - 600 \mu\text{m}^2$) digitális TEM felvételeket készítettünk. A felvételekből képszerkesztő program segítségével 3 szöveti elemet emeltünk ki: mitokondriumokat (beleértve az axonok mitokondriumait is), axonális profilokat (szinaptikus vezikulákat tartalmazó axonvégződéseket vagy megvastagodásokat, a szinaptikus végződés azonosíthatóságától függetlenül), illetve a „maradvány területeket”. A „maradvány területekben” maradtak a dendritek, gliális elemek és a neuropil további nem azonosítható elemei. Azonban nem tartoztak ide a hajszalerek, illetve a sejttetek. A három egységnek megfelelően kiemelt területeket az eredeti képekkel azonos méretű homogén háttérre illesztettük. Ezáltal lehetővé vált a területek nagyságának kivonatolt mérése a NIH ImageJ nyílt forrású szoftverével. A területek nagyságának meghatározása után, a szemcsék számának meghatározását végeztük el. A nagyobb szemcsék esetében (15 nm), az ImageJ programban beállítható küszöbszintekkel lehetővé vált a szemcsék automatizált azonosítása, amit vizuális korrekcióval egészítettünk ki. A kisebb szemcsék mérete (10 nm) az automatizált

detektálást nem tette lehetővé, ezért a számolást manuálisan végeztük el. Az eloszlásokat egységnyi területre eső szemcseszámában határoztuk meg. A szövetet nem tartalmazó, vagyis üres területek (Durcupan) felett (pl. erek lumenében) észlelt szemcsék egységnyi területre eső számát „valódi háttérértékként” definiáltuk. A szemcsék területek fölötti száma normál eloszlást mutatott. Ennek megfelelően a szöveti elemek fölötti szemcse eloszlást *páros t-próbában* hasonlítottuk össze a “maradvány területekével”, illetve *egymintás t-próbában* minden értéket a „valódi háttérérték” függvényében vizsgáltunk meg. A szemcsék eloszlásának mennyiségi értékeit és a páros összehasonlítások eredményeit a 2. táblázatban foglaltuk össze. A táblázatból kiolvasható, hogy a mitokondriumok és az axonális területek fölötti szemcsesűrűség meghaladta a „maradvány területek” fölötti értékeket.

2. táblázat *Kolloidális arany szemcsék eloszlásának mennyiségi elemzése*

Minták származása [szemcsék jelentése]	Mitokondriumok területe szemcse/ μm^2	Axonok területe szemcse/ μm^2	Maradvány terület szemcse/ μm^2	Háttér szemcse/ μm^2
Patkány [Asp]	13.63 \pm 1.20***	10.78 \pm 0.78***	6.10 \pm 0.30	0.37
Patkány [Glu]	4.69 \pm 0.89*	2.62 \pm 0.46 (NS)	1.95 \pm 0.24	0.55
Csirke [Asp]	27.60 \pm 2.12***	20.34 \pm 2.30*	12.36 \pm 0.59	1.84
Csirke [Glu]	3.61 \pm 0.74**	2.44 \pm 0.44**	1.63 \pm 0.30	0.55

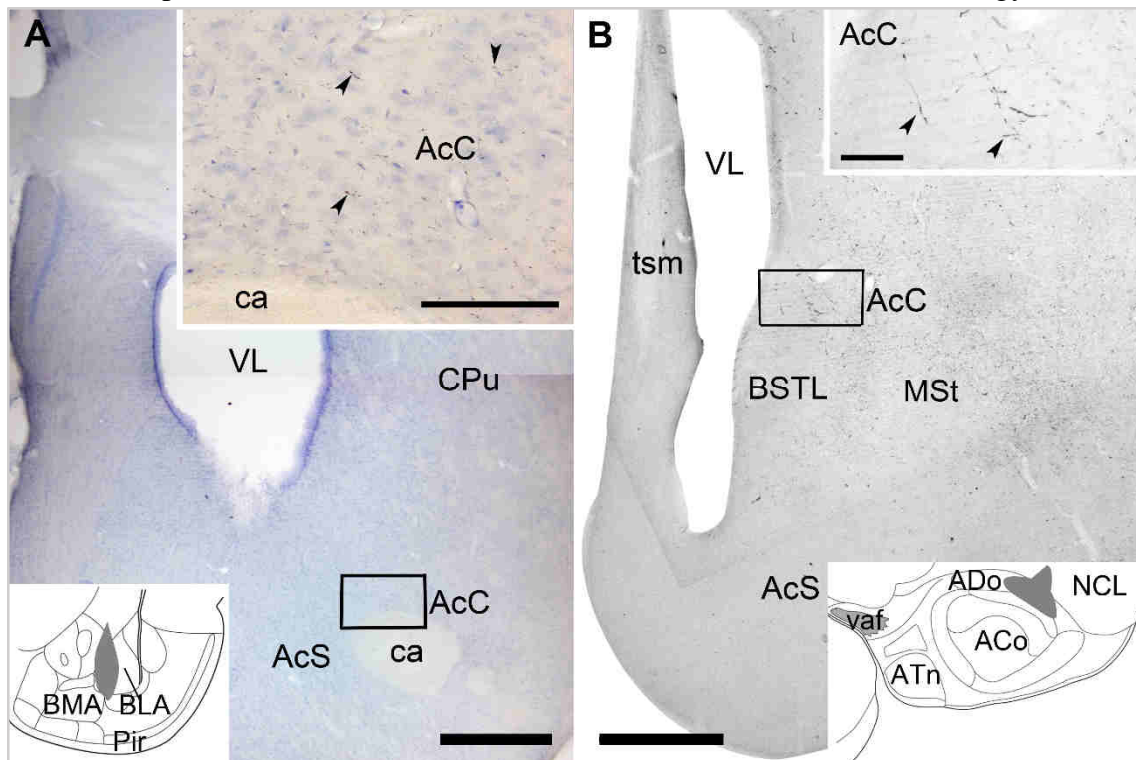
Az adatok átlag \pm S.E.M. formában vannak kifejezve (n=10, nem átfedő TEM mező, amely postembedding immunjelölt L-Aszpartátra és L-Glutamátra). A csillagok a szignifikáns különbségeket jelölik a maradvány területekhez viszonyítva (páros t-próba *p<0.01; **p<0.005; ***p<0.001; NS: nem szignifikáns p=0.22). A szemcsék száma minden szöveti elem fölött szignifikánsan különbözött a háttér értéktől. (egymintás t-próba: t>3.57; df=9; p<0.01).

A „maradvány területek” szemcsesűrűségi értékeiből becsült, 99%-os megbízhatósági tartomány (konfidencia-intervallum) felső határértékét használtuk a rostok Asp és Glu pozitivitásának mércéjeként. Az így kapott érték alá eső ’immunogold pozitív’ rostokat negatív, míg fölé eső eseteket pozitívnak tekintettük, a jelzett serkentő neurotranszmitterek vonatkozásában.

5 Eredmények

5.1 Az arcopallium medialis striatumra vetülő neuronjainak serkentő jellege.

Célkitűzéseink első pontja szerint az emlős agyban már jól ismert amygdalo-accumbicus axonpályának megfelelő madáragyi kapcsolatokat vizsgáltuk. Tekintettel az emlős agyban feltárt adatok bőségére - a lépések módszertani megerősítését célozva és párhuzamos összehasonlítást biztosítva - fontosnak tartottuk egy kontroll



12. ábra Patkány (A) és csirke (B) agyának rostralis szintjeiből készült coronalis metszetek fénymikroszkópos felvételei, HRP (A) és BDA (B) beadást követően. Az ábrák (A-B) alsó részeibe illesztett atlasz rajzokon a pályakövető anyagok beadási helyét és átlagos kiterjedését (szürkén jelölt területek a BLA és ADo területén) szemléltetjük. (A-B) Jobb felső fehér keretekben a coronalis metszetek AcC régiójából (fekete keretek) kinagyított részletek, amelyekben jól láthatóak az anterográd módon jelölt rostok (nyílhegyek). Patkány (A) esetében Nissl felülfestés is történt, míg a csirke (B) anyagában egyedül a tracer azonosításhoz szükséges enzimhisztokémiai reakció csapadéka van jelen.

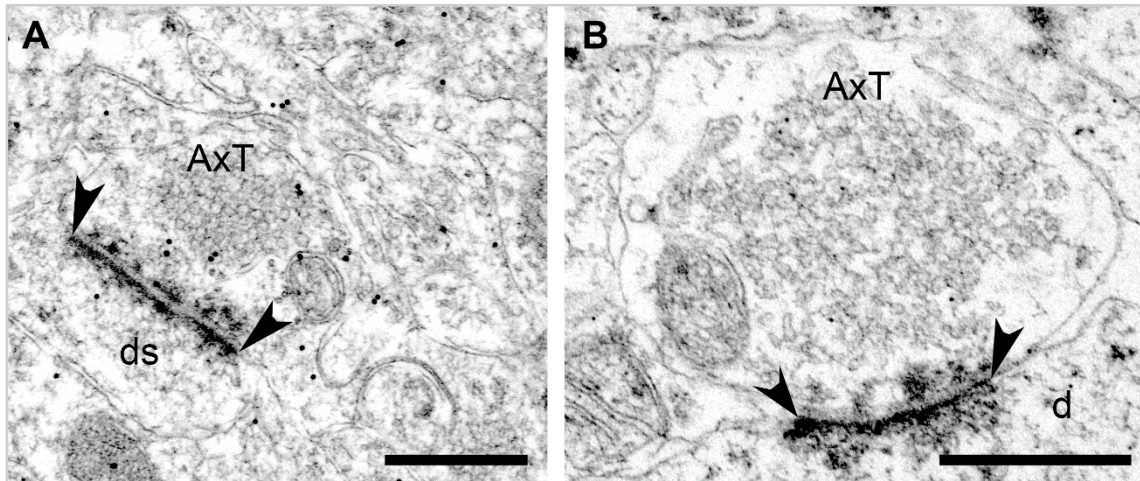
Rövidítések: AcC – nucl. accumbens core; AcS – nucl. accumbens shell; BMA – basomedialis amygdaloid nucleus; BLA – basolateralis amygdaloid nucleus; ca – commissura anterior; CeA – centralis amygdaloid nucleus; CPu – nucl. caudatus/putamen; Pir – piriform cortex; VL – ventriculus lateralis; ADo – dorsalis arcopallium; ACo – arcopallium core; BSTL – bed nucleus of stria terminalis, pars lateralis; MSt – medialis striatum; NCL – nidopallium caudolaterale; vaf – ventralis amygdalofugalis tractus; ATn – amygdaloid taenia; tsm – tractus septomesencephalicus. Lépték: 0,5 mm vagy 0,1 mm (beillesztett képek esetében).

emlősfaj bevonását kísérletünkbe. A bevezetésben ismertetett irodalmi adatok alapján (Wistar) patkányok basolateralis amygdala (BLA) magjába, illetve csirkék feltételezett „amygdaloid” arcopallium részébe (dorsalis arcopallium – ADo) közvetett detektálást biztosító pályakövető anyagot (tracer) injektáltunk (12. ábra A-B). Az injekciókat követő anterográdfeltöltődés következtében mindkét faj ventromedialis előagyi területein tracer tartalmú rostokat észleltünk (12. ábra A-B).

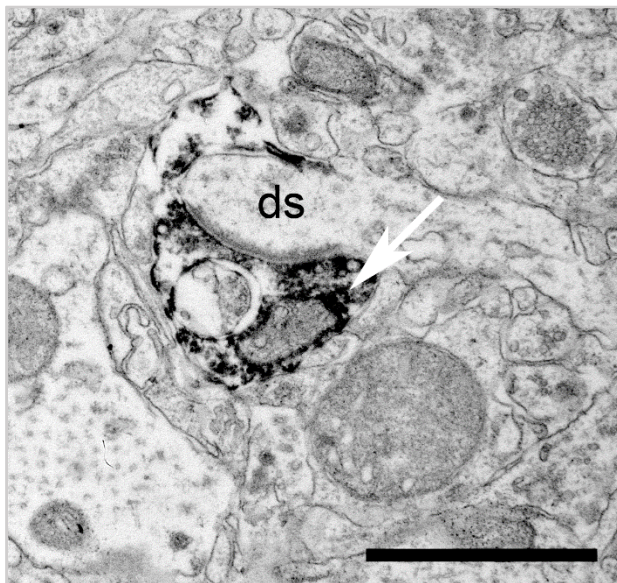
Patkányokban a ventromedialis előagyon belül a nucleus accumbens (Ac) core alegységében (AcC) koncentráálódtak a tracer pozitív rostok (12. ábra A).

A patkány adatokkal megegyezően a csirke ventromedialis előagyi területein (az AcC-t is magába foglalóan) azonosítottunk tracer pozitív rostokat (12. ábra B). Mindkét faj esetében az AcC régiójában a tracerrel feltöltött rostokat és a környező szöveti elemeket transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálatnak vetettük alá. A TEM vizsgálatot a tracerek enzimhisztokémiai elektrondenz konverziója, a szövetek postembedding L-Aszpartát (Asp) és L-Glutamát (Glu) immunfestése, illetve az immunfestések detektálását lehetővé tevő szekunder immunogold (arany konjugált szekunder) jelölés előzte meg. A serkentő neurotransmitterként is számon tartott aminosavak (Asp, Glu) metabolikus jelentőségüknél fogva a vizsgált szövet számos ultrastrukturális elemében előfordultak (pl. mitokondriumokban), ezért szöveten belüli specifikus eloszlásuk külön módszertani elemzést igényelt, amelyet a módszerek fejezet utolsó részében tárgyalok.

Csirkék AcC mintáiban megfigyelhető volt az Asp és Glu jelenléte egyéb nem tracer jelzett aszimmetrikus szinapszisokat (Gray I) képező axon terminalisokban, függetlenül azok eredetétől (13. ábra).



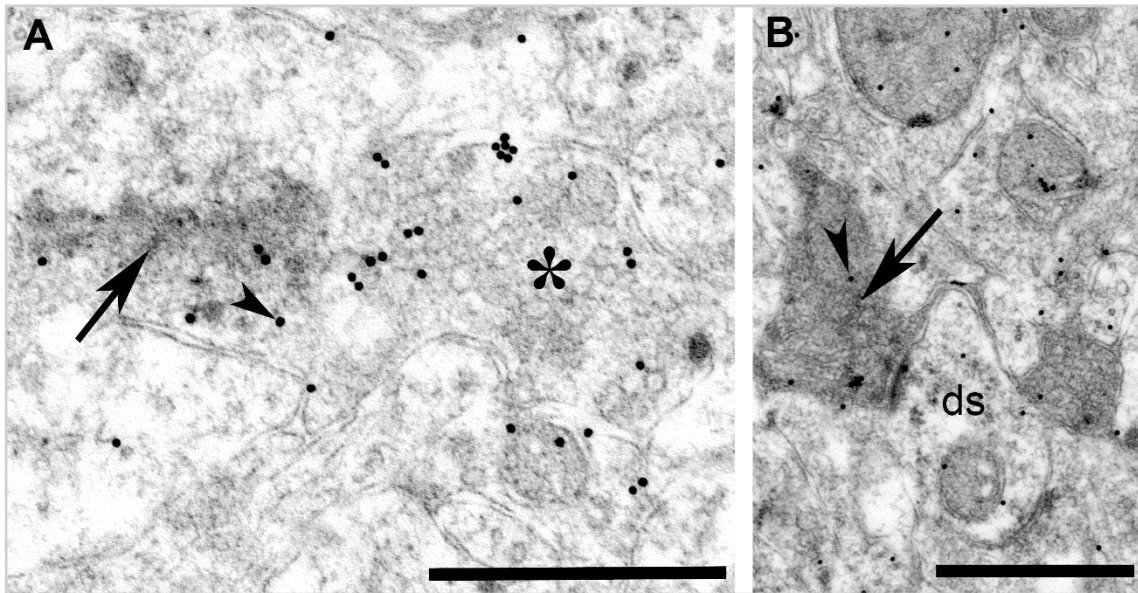
13. ábra Transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek csirke nucleus accumbens core régiójából, postembedding (A) L-Aszpartát (Asp) és (B) L-Glutamát (Glu) immunfestést és immunogold jelölést követően. (A-B) Az axon terminalisok (AxT) fölött jelentős számú arany szemcsé (Asp=15nm; Glu=10nm szemcseméret) halmozódás figyelhető meg. Az AxT-ok a dendrittüskén (ds), illetve a dendriten (d) aszimmetrikus kapcsolatot létesítenek (nyílhegyek). *Lépték:* 0,5 μ m.



14. ábra Csirke nucleus accumbens core régiójából készült transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel, a dorsalis arcopalliumba történt anterográd tracer beadást követően. Tracer (BDA) tartalmú (nyíl) axon végződés, amely axospinosus (ds=dendrittüske) aszimmetrikus szinapszist képez. *Lépték:* 0,5 μ m.

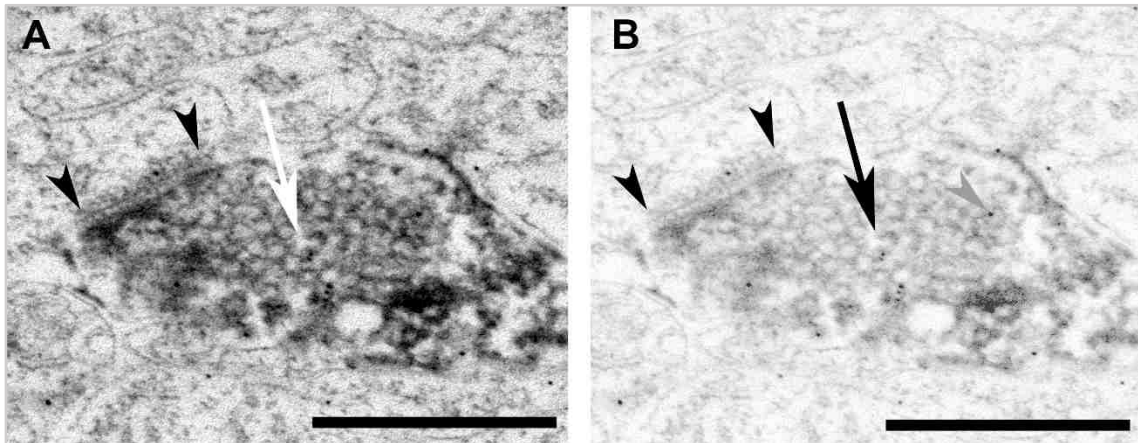
Az arcopallium területéről származó (tracert tartalmazó) axonterminalisok a területre általánosan jellemző axospinosus vagy axodendritikus végződéssel és aszimmetrikus kapcsolati (Gray I) felépítéssel rendelkeztek (14. ábra). Így tehát az arcopalliumból eredő axonok végződései serkentő jelleget mutattak.

A postembedding szimpla immunfestések az esetek többségében Asp vagy Glu jelenlétét igazolták az arcopalliumból eredő axonvégződések felett (15. és 16. ábrák). Az Asp előfordulásának vizsgálata során azonban kimutattunk olyan eseteket, amelyekben a tracer-jelölt, serkentő morfológiát mutató végződések arany szemcsékben gazdag

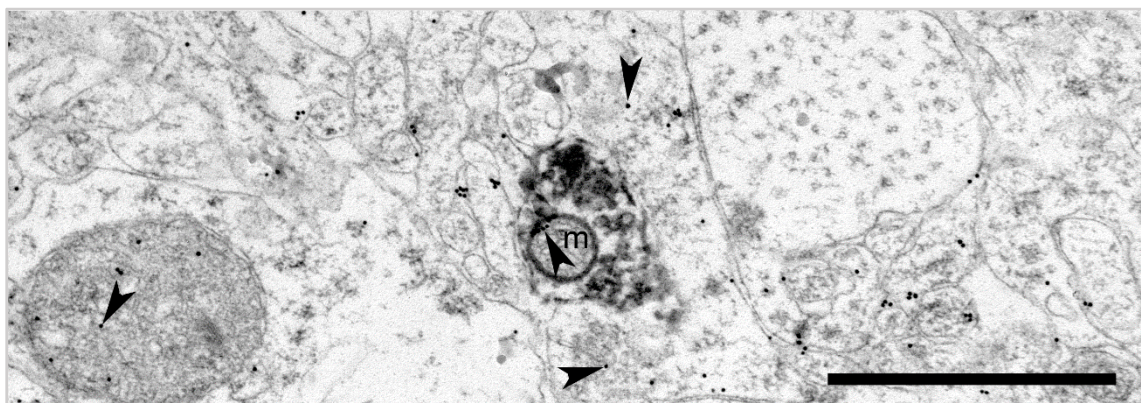


15. ábra Csirke nucleus accumbens core régiójából készült transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek (A-B), a dorsalis arcopalliumba történt anterográd tracer (BDA) beadást, illetve postembedding L-Aszpartát (Asp) immunfestést és immunogold jelölést követően. (A) Tracer jelölt (nyíl - elektronenz csapadék) és vele szomszédosan tracer mentes (csillag) Asp immunpozitív axonterminális. Az aranyzemcsék (nyílhegy) a vezikulumok fölött halmozódnak. (B) Tracer tartalmú (nyíl) axon végződés, amely axospinosus (ds=dendrittüske) aszimmetrikus szinapszist képez és egyben Asp immunpozitív (nyílhegy - 15 nm-es aranyzemcsék). Lépték: 0,5 μ m.

környezettel (pl. mitokondriumokkal) övezve Asp immunjelöléstől mentesek voltak (17. ábra). Ez erősen abba az irányba mutatott, hogy az adott végződés serkentő neurotransmitter tartalmában más, tehát jelen estünkben (17. ábra) egy tisztán glutamáterg szinaptikus végződést láttunk. A Glu esetében nem tudtunk kimutatni teljesen negatív végződést, vagyis tisztán aszpartáterg szinapszist. Itt azonban megemlítendő, hogy a Glu detektálására használt kisebb aranyzemcsé mérete (10 nm) közel esett az elektronenz csapadék egyes esetekben tapasztalható szemcsézettségének mérettartományához, így az azonosítási folyamatot nehezítette. A kisméretű szemcsék elektronenz csapadék feletti vizsgálata, akkor volt biztosan célravezető, ha a csapadékképződés homogén formában jelent meg (16. ábra). Ebben az esetben a digitálisan készített felvételeinkből lehetővé vált a háttér zajmentes kivonása, ami elősegítette az aranyzemcsék akadály nélküli azonosítását (ld. képpárok a 16. ábrán).



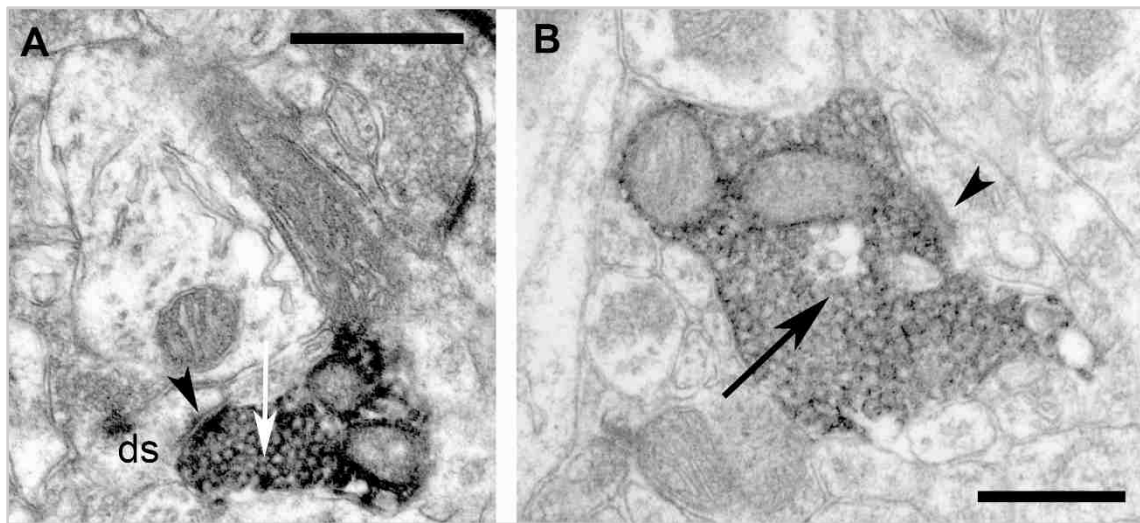
16. ábra Csirke nucleus accumbens core régiójából készült transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel (A-B), a dorsalis arcopalliumba történt anterográd tracer (BDA) beadást, illetve postembedding L-Glutamát (Glu) immunfestést és immunogold jelölést követően. Ugyanazon felvétel (A) eredeti és (B) háttérkivonással módosított változatain, egy tracer tartalmú [fehér (A) és fekete (B) nyíl] axonvégződés látható, amely axospinosus aszimmetrikus szinapszist képez (fekete nyílhegyek). Az axonvégződés Glu immunpozitivitását (B) a vezikulumok fölötti kolloidális arany szemcsék (szürke nyílhegy 10 nm arany szemcse) halmozódása bizonyítja. Lépték: 0,5 μ m.



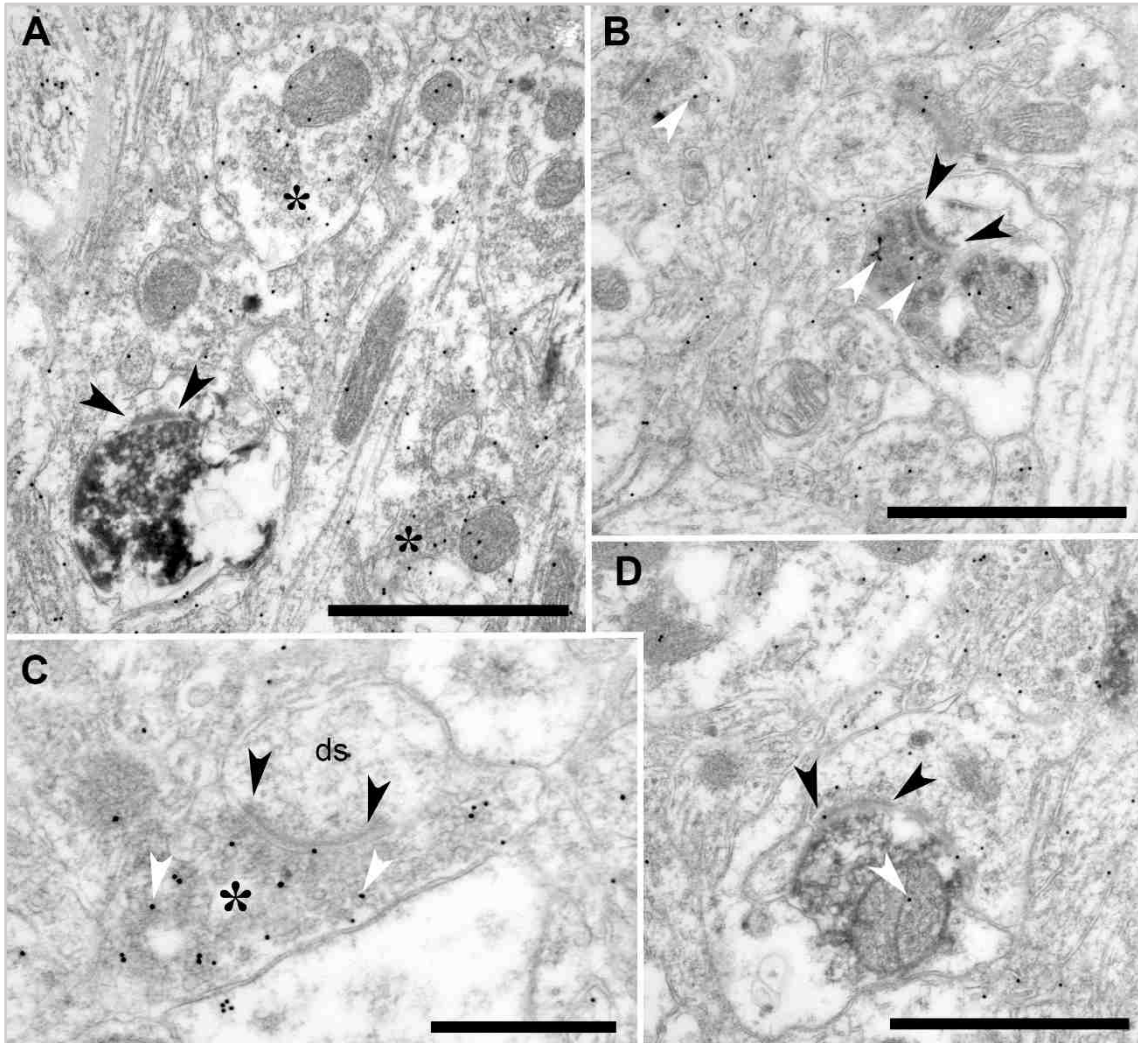
17. ábra Csirke nucleus accumbens core régiójából készült transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel, a dorsalis arcopalliumba történt anterográd tracer (BDA) beadást, illetve postembedding L-Aszpartát (Asp) immunfestést és immunogold jelölést követően. Tracer-jelölt axon, amely nem mutat Asp immunpozitivitást. A környezeti szöveti elemek a mitokondriumokkal (m) egyetemben Asp immunjelzést tartalmaznak (fekete nyílhegyek). Lépték: 1 μ m.

Patkány AcC mintákon csirkéhez hasonló morfológiájú tracer-jelölt amygdalofugalis axonvégződéseket detektáltunk (18. ábra). Ezek axospinosus vagy axodendritikus végződést mutattak és nagy sűrűségben tömörült, kisméretű, homogén vezikulákat tartalmazó axonterminálisaik aszimmetrikus szinapszisokat (Gray I) képeztek (18. ábra).

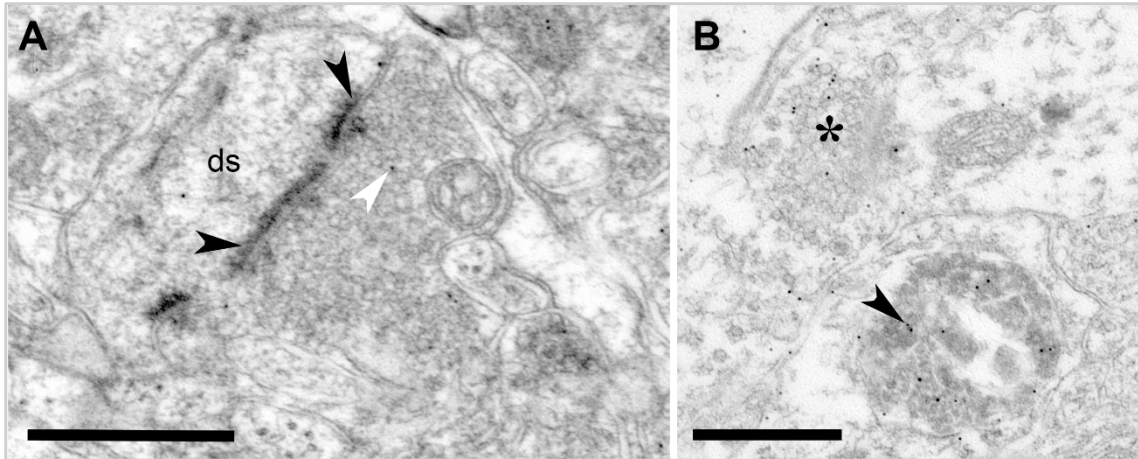
Patkányban a tracer jelölt rostvégzésekben az Asp jelenlétére utaló arany szemcsék száma tendenciózusan alacsonyabb volt (19. ábra A, B, D), mint a környezetükben található mitokondriumok esetében és tracer negatív végzések esetében (19. ábra C). A minták amygdalofugalis axon végzésekének Glu tartalma viszont jóval bőségesebb jelet mutatott (20. ábra).



18. ábra Patkány nucleus accumbens core régiójából készült transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek, basolateralis amygdalába történt anterográd tracer (BDA) beadást (A-B) követően. (A-B) Tracer jelölt (*nyíl*) axonvégzések, amelyek axospinosus (*ds*=dendrittüske) aszimmetrikus szinapszist (*nyílhegy*) képeznek. *Lépték:* 0,5 μ m



19. ábra Patkány nucleus accumbens core régiójából készült transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek, basolateralis amygdalába történt HRP beadást, illetve postembedding L-Aszpartát (Asp) immunfestést és immunogold jelölést követően. (A) Tracer-jelölt axon végződés, amely axospinosus aszimmetrikus szinapszist (*nyílhegyek*) képez és Asp immunjelöléstől mentes, ellentétben a két szomszédos (*csillagok*) terminállal. (B) Tracer-jelölt axon végződés, amely axospinosus aszimmetrikus szinapszist (*fekete nyílhegyek*) képez és Asp immunjelölést tartalmaz (*fehér nyílhegyek* – 15nm-es aranyzemcsék). (C) Asp jelölést halmozó, tracer-mentes axon végződés (*csillag*), amely axospinosus (*ds*=dendrittüske) aszimmetrikus szinapszist (*fekete nyílhegyek*) alkot. (D) Tracer-jelölt axon végződés, amely axospinosus aszimmetrikus szinapszist (*fekete nyílhegyek*) formál, azonban Asp immunjelölése a környező elemekhez mérten csekély. A végződésben Asp tartalmú (*fehér nyílhegy*) mitokondrium is megfigyelhető. *Lépték:* 0,5 μ m.



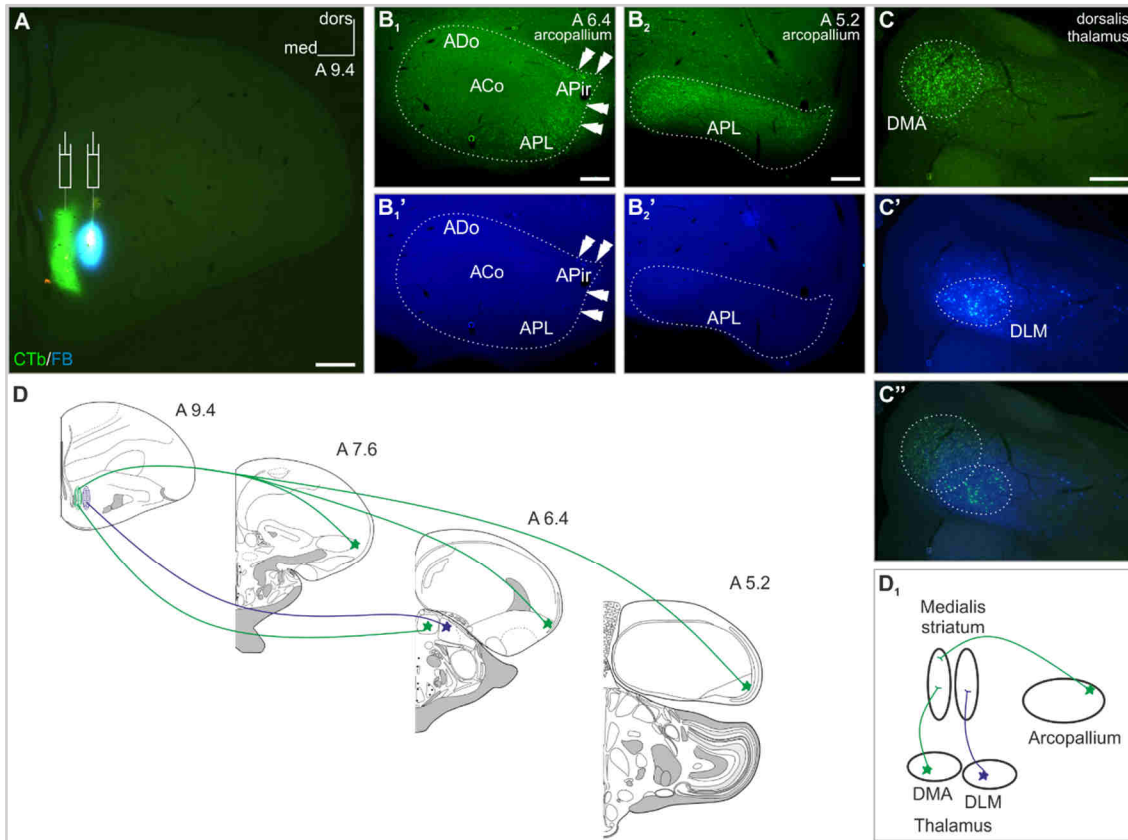
20. ábra Patkány nucleus accumbens core régiójából készült transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek, basolateralis amygdalába történt HRP beadást, illetve postembedding L-Glutamát (Glu) immunfestést és immunogold jelölést követően. **(A)** Tracer-mentes axon végződés, amely axospinosus (*ds*=dendrittüske) aszimmetrikus szinapszist (*fekete nyílhegyek*) formál és Glu immunpozitivitást mutat (*fehér nyílhegy*). **(B)** Tracer-jelölt axon tágulat, amely jelentős mennyiségű Glu jelenlétére utaló aranyzemcsét (*fekete nyílhegy*) halmoz, illetve egy tracer-mentes axonterminális (*csillag*), amely hasonlóan gazdag Glu jelzésében. *Lépték:* 0,5 μ m.

5.2 A medialis striatum bemeneteinek eltérő mintázata.

Ahhoz, hogy csirkében pontosabban azonosítani tudjuk azon neuroncsoportokat ("amygdaloid arcopallium"), amelyek a ventromedialis előagy bemeneteit biztosítják az arcopallialis területek irányából, kialakítva ezáltal az amygdalo-subpallialis (beleértve az amygdalostriatalis) pályát, szimultán kettős retrográd pályajelölést végeztünk. A módszer legalkalmasabb eszközeiként két különböző, közvetlenül fluoreszcensen jelölő, retrográd pályakövető anyagot, Alexa Fluor® 488 konjugált koleratoxin béta alegységet (CTb), illetve Fast Blue-t (FB) unilateralisan injektáltunk a medialis striatum (MSt) medialis és ennek közvetlen szomszédságában elhelyezkedő lateralisabb alegységébe (21. ábra A). Ezt követően mindkét oldali arcopalliumot megvizsgáltuk mindkét pályakövető anyaggal kapcsolatban. A beadásokkal ellentétes oldalon nem detektáltunk retrográdan jelzett sejteket. Az ipszilateralis arcopalliumot teljes rostrocaudalis kiterjedésében elemezve, annak perem részein figyeltünk meg jelentős CTb visszatöltődéseket. Különösen nagy sűrűségben találtunk jelölt perikaryonokat az arcopallium dorsolateralis részén (21. ábra B₁), illetve caudalis irányban egy ventral felé is kiterjedő területen (21. ábra B₂). Ezzel egyidőben alkalmazott, lateralisabb MSt területet megcélzó FB beadás nem, vagy elenyésző mértékű visszatöltődést eredményezett a teljes ipszilateralis arcopalliumon belül (21. ábra B₁', B₂').

Eltérően az arcopalliumban leírt mintázattól, a szintén ventromedialis előagyi bemenetet adó dorsalis thalamicus területeket vizsgálva (az előzőkkel azonos egyedekben), mindkét jelölő anyag szempontjából közel azonos erősségű visszatöltődés mutatkozott ipszilateralisán. Miközben a CTb-jelölt perikaryonok a medialisabb nucleus dorsomedialis anterior thalami (DMA), addig az FB-jelölt perikaryonok az ettől lateralisabban elhelyezkedő nucleus medialis dorsolateralis thalami (DLM) területén dúsultak, kevés átfedéssel a régiók között (21. ábra C-C'').

Tehát a kettős retrográd beadások által világosan nyomon követhető és azonosítható volt - a thalamus és az arcopallium vonatkozásában - az MSt medialis és lateralis területeit elérő neuronok eloszlásában fellelhető mintázati eltérés (21. ábra D-D1). Kiemelendő, hogy az MSt medialis részébe jelentős arcopallialis bemenet irányul, ellentétben annak lateralis részével. Thalamicus megfigyelésünk igazolta és egyben megerősítette az arcopalliumban észlelt és leírt eltérések megalapozottságát.



21. ábra A medialis striatum bemeneteinek eltérő mintázata. Alexa Fluor® 488 (zöld) konjugált koleratoxin beta alegység (CTb) és (kék) Fast Blue (FB), mint direkt fluoreszcensen jelölt retrográd pályakövető anyagok, egyidejű beadásainak (jelzések A) injekciós helyei, a medialis striatum (MSt) medialis és lateralis részében. Az arcopallium és a thalamus magvak határait fehér pontozott vonalak jelölik. (B₁, B₂) CTb-feltöltött (CTb⁺) sejttestek (nyílhegyek) az arcopallium dorsalis (ADo) és posterolaterális (APL) alegységeiben, illetve különösen nagy számban az arcopallium laterális régiójában az amygdalopiriform area (APir) területén (Puelles és mtsai 2007). (B₁', B₂') Az arcopallium (az előzőkkel azonos metszetekben) nem mutat FB-feltöltött (FB⁺) sejttesteket. (C-C'') A dorsalis thalamusból eredő striatalis projekció medio-laterális topológiát mutat: a CTb⁺ perikaryonok a medialisabb nucleus dorsomedialis anterior thalamiban (DMA), míg az FB⁺ perikaryonok az ettől laterálisabban elhelyezkedő nucleus medialis dorsolateralis thalamiban (DLM) dúsulnak, kevés átfedéssel a régiók között. (D, D₁) Vázlat az MSt arcopallialis és thalamicus bemeneteinek eltérő jellegéről (a coronalis vázlatok a http://www.avianbrain.org/nomen/Chicken_Atlas.html ábráinak módosításával készültek). Az ábrák jobb felső sarkaiban szereplő számok a milliméterben mért antero-posterior távolságot jelölik Kuenzel és Masson (1988) szerint. Rövidítések: ACo - arcopallialis core, dors - dorsalis, med – medialis; Lépték: 1 mm (A), 200 µm (B₁, B₂, C).

5.3 A madár amygdalofugalis pálya és eredéseinek meghatározása ventromedialis előagyi végződésein keresztül.

A kísérleteink első fázisában feltárt arcopallialis projekció további pontosítást és finomabb leírást igényelt. Hiszen ezidáig csak a pálya létét és annak ventromedialis előagyi konvergenciáját bizonyítottuk. Így a pontos kiindulási hely és lefutás megítéléséhez, direkt fluoreszcensen jelző anyagokkal további anterográd és retrográd pályakövetési kísérleteket végeztünk (22. ábra).

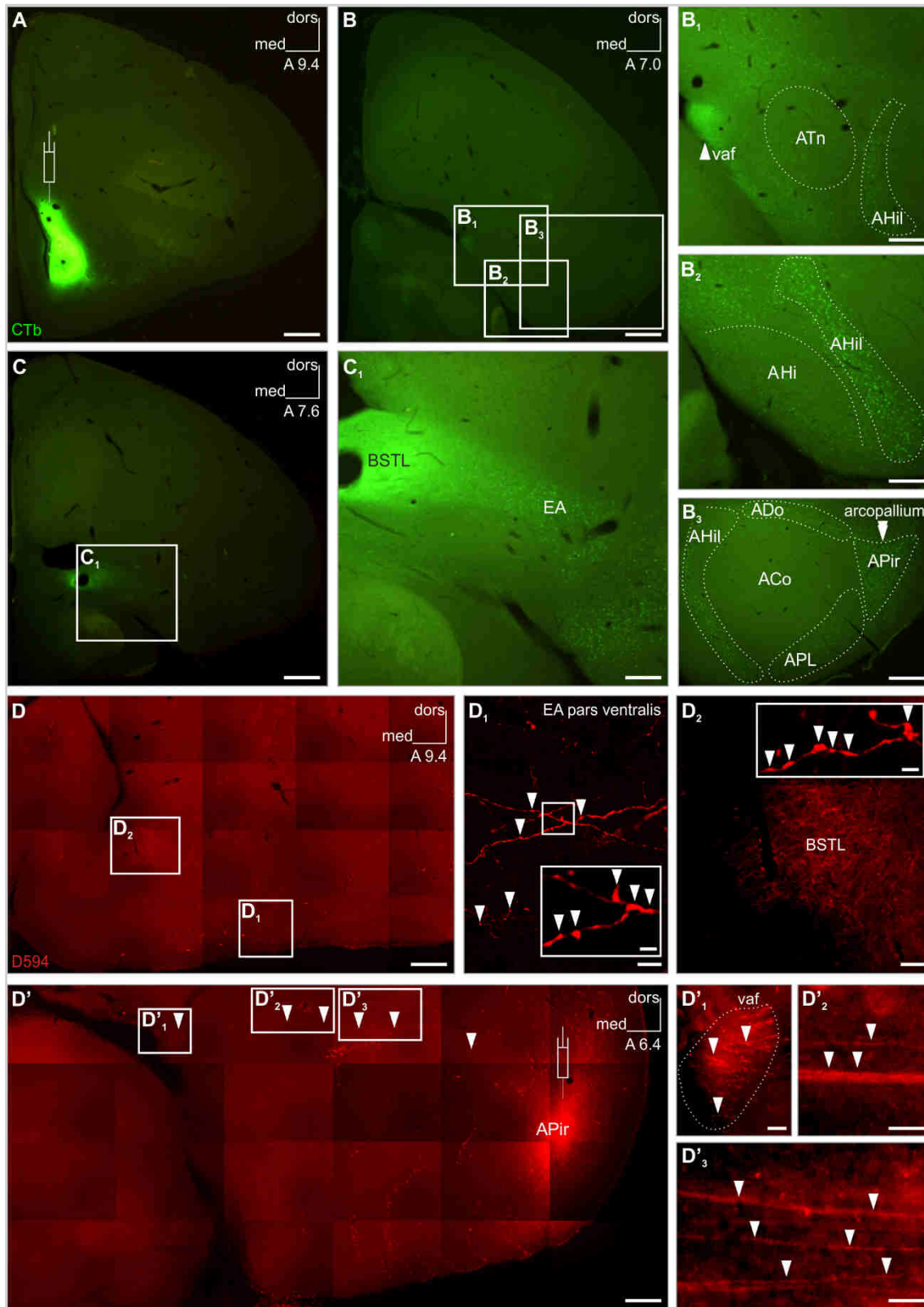
A pálya feltételezett végződési területeibe, azaz a ventromedialis előagyi területekbe (BSTL, Ac, MSt) retrográd jelölés céljával Alexa Fluor® 488 konjugált koleratoxin béta alegységet (CTb) adtunk (22. ábra A). Számos visszatöltődött axon jelent meg egy jól behatárolható struktúrában a ventralis amygdalofugalis (vaf) kötegben (22. ábra B₁). Kiemelkedően sok CTb-jelölt perikaryont figyeltünk meg az arcopallium egy dorsolateralis ék alakú területén, amelyet amygdalopiriform area-ként (APir) azonosítottunk (22. ábra B₃). Kisebb sűrűségben bár, de nem elhanyagolható mennyiségű CTb⁺ sejttestet találtunk az arcopallium más területein: a hilaris (AHil), a dorsalis (ADo) és a postero-lateralis (APL) részein (22. ábra B₂-B₃). Különös figyelmet érdemel a csekély számú vagy teljesen hiányzó visszatöltődő perikaryon az arcopallium amygdalohippocampalis (AHi), taenialis (ATn) és legfőképpen a core (ACo) részében (22. ábra B₁-B₃). A beadásokhoz közelebbi rostralis agyterületeket vizsgálva az extended amygdala (EA) régiói mutattak jelentősebb számú retrográdan jelölt sejtet (22. ábra C, C₁).

A pálya retrográd vizsgálatából kapott eredményeink megerősítése céljából, továbbá a rostralisabb területek előzőekben okozott elfedettsége miatt (ld. retrográd injekciók helyét), vizsgálatunkat anterográd pályakövetést biztosító Alexa Fluor® 594 konjugált 10kDa molekulatömegű dextrán (D594) alkalmazásával egészítettük ki. A beadás optimális helyeként, a retrográd tracer kísérleteknek megfelelően, a visszatöltődött neuronokat legnagyobb sűrűségben tartalmazó arcopallialis területet, az APir-t választottuk (22. ábra D-D₁'; 23. ábra A-F). Anterográd beadásaink igazolták a pálya alkotásában résztvevő rostok sűrű jelenlétét a vaf és a BSTL területén, az ipsilaterális féltekében (22. ábra D₂, D₁'). Az ellenoldali félteke ventromedialis régiójában nem volt anterográd jelölés. A rostok útvonalának pontos követésére, sorozatban metszett és kezelt agyszeletekről epifluoreszcens mozaikfelvételeket készítettünk. A részleteket tartalmazó közepes felbontású mozaikok összeillesztése után lehetővé vált a pálya rostrocaudalis

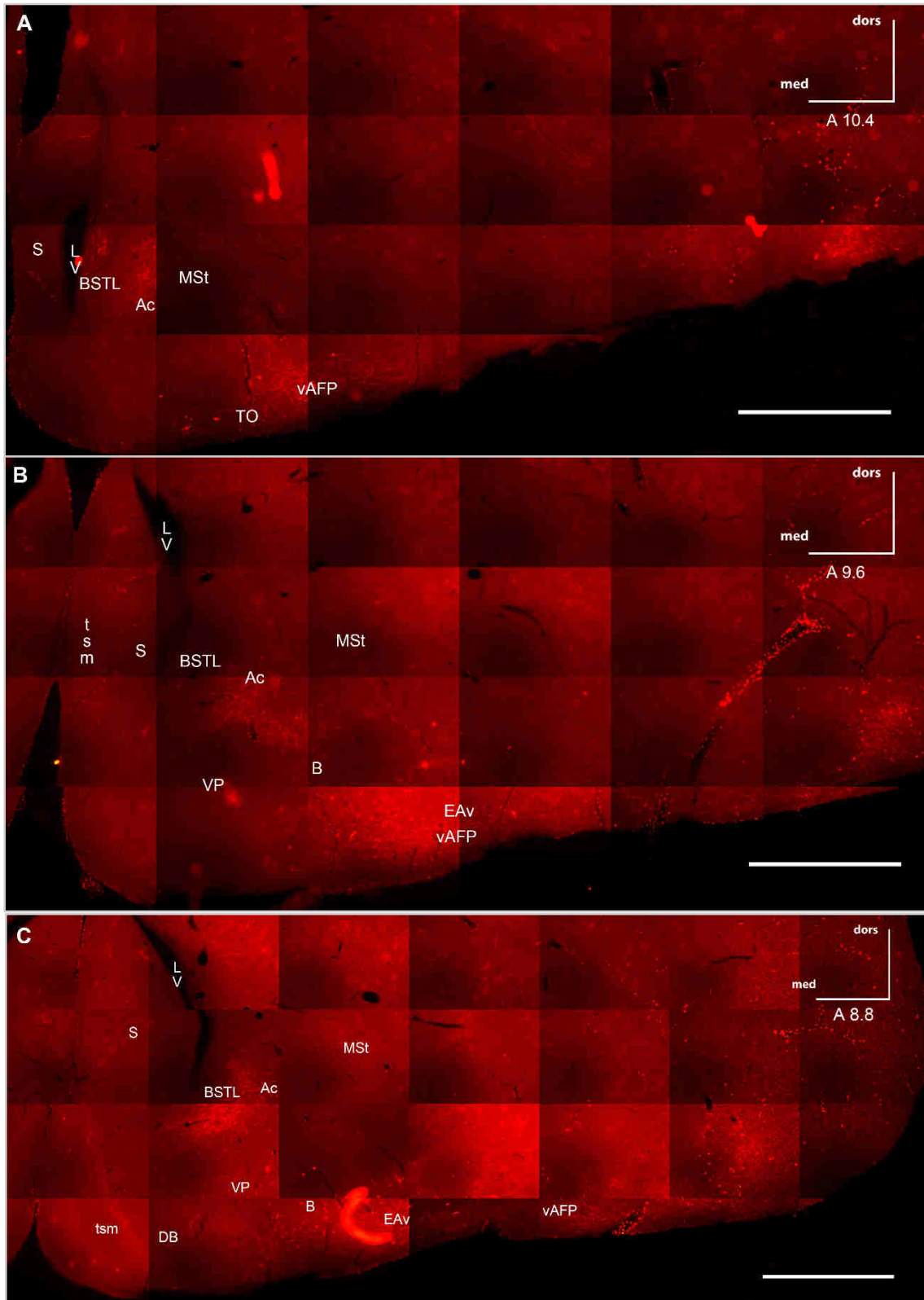
kiterjedésének anatómiai leírása (23. ábra, A-G). Az így készült szeletek elemzésével megmutattuk, hogy az APir-ból kiinduló D594 pozitív axonok két fő útvonalat követnek dorsalisán és ventralisan. [i] Az arcopallium dorsalis határán követett rostok (dorsalis amygdalofugalis pálya; 23. ábra F-G), medialis irányba húzódtak (22. ábra D', D'₂, D'₃), belesugároztak a ventralis amygdalofugalis kötegbe (vaf, 22. ábra D'₁), majd rostralisabban a BSTL területében haladtak tovább terminális végződésekké tarkítottan (22. ábra D, D₂, összehasonlításul 22. ábra A) és a BSTL-el határos medialis MSt zónákat (nucleus accumbens; 23. ábra A-D) is elérték. [ii] A ventralis útvonalon (ventralis amygdalofugalis pálya) követett axonok az EA ventrobasis részében haladtak (22. ábra D, D₁; 23. ábra A-D), és elérték a nucleus basalis és a tuberculum olfactoriumot (23. ábra A-C). Ez utóbbi axonhálózat az arcopallium rostralisabb elhelyezkedésű neuroncsoportjaiból indult.

22. ábra (KÖVETKEZŐ OLDALON) Összehasonlító retrográd és anterográd pályakövetési vizsgálat a ventromedialis előagy meghatározott területeire vetülő arcopalliofugalis pálya eredésének lefutásának meghatározása céljából. (A) A medialis juxtaventricularis zónát [bed nucleus of stria terminalis lateralis részét (BSTL), nucleus accumbens (Ac) és a medialis striatum (MSt) további kis részét] érintő Alexa Fluor® 488 konjugált koleratoxin beta alegység (CTb) beadásának (*szimbólum A*) helye. Retrográdan visszatöltődött rostok (**B**, **B₁**) a ventralis amygdalofugalis kötegben (*vaf, nyílhegy*). CTb-jelzett (CTb⁺) sejtek az arcopallium alegységeiben (**B**), kiemelve a hilaris (*AHil*) (**B₁**, **B₂**, **B₃** *pontozott határvonalak*), dorsalis (*ADo*), postero-lateralis (*APL*) és amygdalopiriform (APir) területeket, amelyek együtt az arcopallium „perem övét” alkotják (**B₃**, *pontozott határvonalak*). A dorsolateralis elhelyezkedésű, ék-alakú APir régió tartalmazza legnagyobb sűrűségben a CTb⁺ sejteket (*kettős nyílhegy B₃*). Az amygdaloid taenia (*ATn*), az amygdalo-hippocampalis area (*AHi*) és az arcopallium core (*ACo*) területén csekély, illetve nincs retrográdan jelzett sejt (**B₁-B₃**). Jóval cranialisabb szintekben (**C**, **C₁**), nagyszámú CTb⁺ neuron azonosítható szétszórva az extended amygdala (*EA*) területén. (**D-D'**) A retrográd metszetek AP szintjeinek megfelelő, nagy felbontású, sorozatban készült és összeillesztett mozaikfelvételek. (**D'**) Anterográd pályakövetést biztosító Alexa Fluor® 594 konjugált 10kDa molekulatömegű dextrán (*D594*) beadásának (**D'**, *szimbólum*) helye az APir területében. (**D'**, **D'₁'**, **D'₂'**, **D'₃'**) Latero-medialis irányban húzódó D594 jelölt (D594⁺) axonok (*nyílhegyek*) a már retrográdan azonosított kötegben a vaf-ba (**D'₁**, *pontozott határvonal és nyílhegyek*, összehasonlításul **B₁**) tömörülnek, hogy azután a BSTL és a határos Ac területén haladva végződjenek (**D₂**, *nyílhegyek* jelzik a végződéseket a BSTL területén). (**D₁**) D594⁺ axonok (*nyílhegyek*) az EA területén a ventralis subpallialis határ mentén, alternatív útvonalként. Az ábrák jobb felső sarkaiban szereplő számok a milliméterben mért antero-posterior távolságot jelölik Kuenzel és Masson (1988) szerint. *Rövidítések:* dors - dorsalis, med – medialis. *Lépték:* 1 mm (**A**, **B**, **C**), 500 µm (**D**, **D'**), 250 µm (**C₁**), 200 µm (**B₁-B₃**), 100 µm (**D₂**), 10 µm (**D₁**, **D'₂'**, **D'₃'**), 5 µm (**D'₁'**), 2 µm (beillesztett ábrák **D₁**, **D₂**).

22. ábra (FELIRAT AZ ELŐZŐ OLDALON)

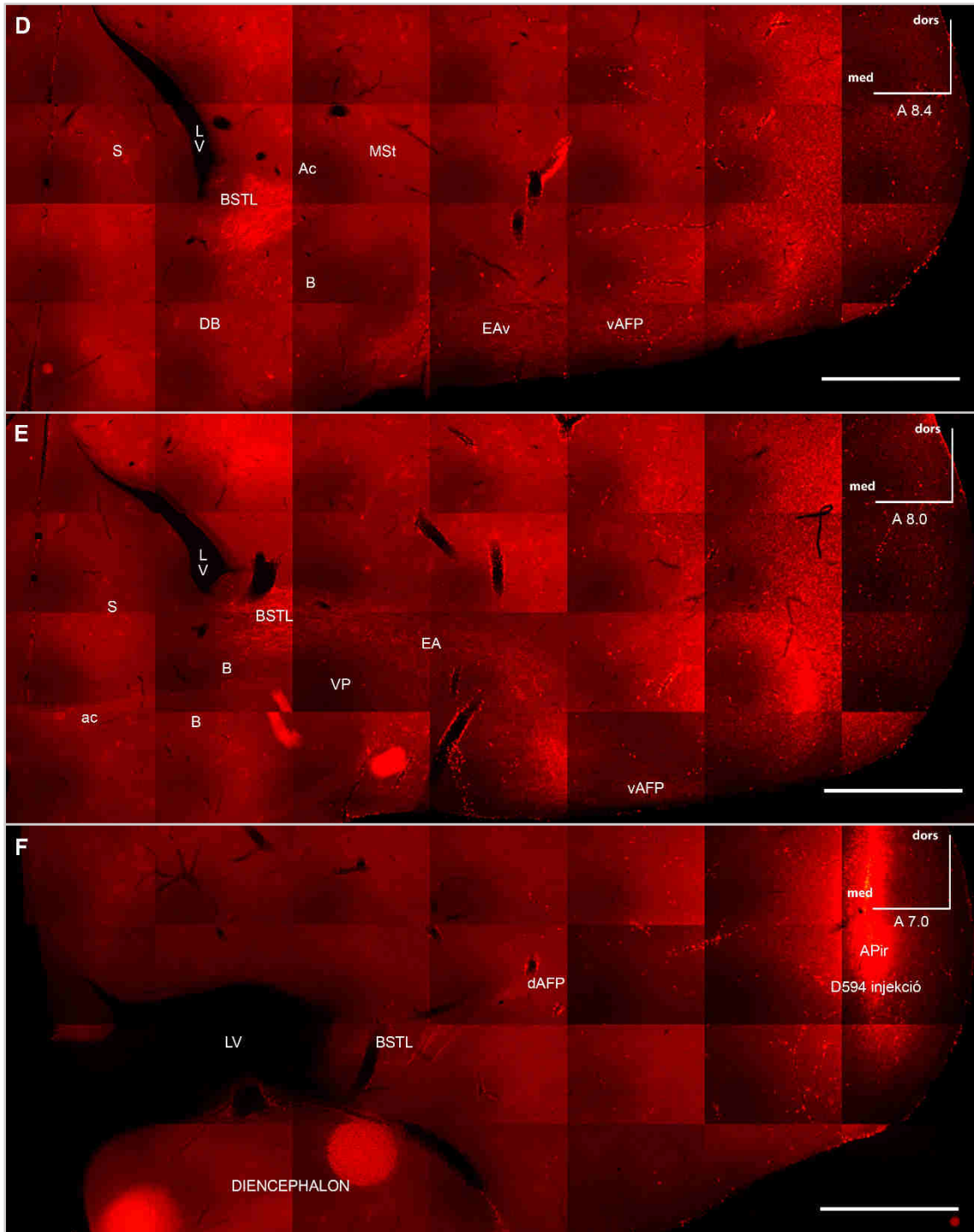


23. ábra (A-C, KÖVETKEZŐ OLDALON FOLYTATÓDIK, felírat a G ábra után)



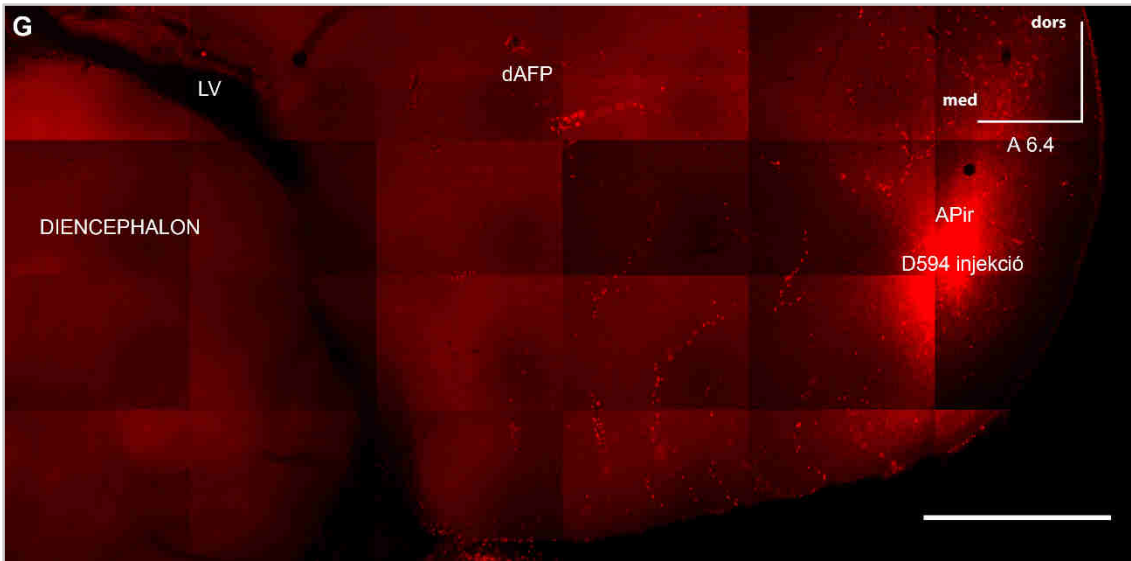
A KÖVETKEZŐ OLDALON FOLYTATÓDIK

23. ábra (D-F, TOVÁBBI RÉSZEK AZ ELŐZŐ [A-C] ÉS KÖVETKEZŐ [G] OLDALON, felírat a G ábra után)



A KÖVETKEZŐ OLDALON FOLYTATÓDIK

23. ábra (G, TOVÁBBI RÉSZEK [A-C ÉS D-F] AZ ELŐZŐ KÉT OLDALON)



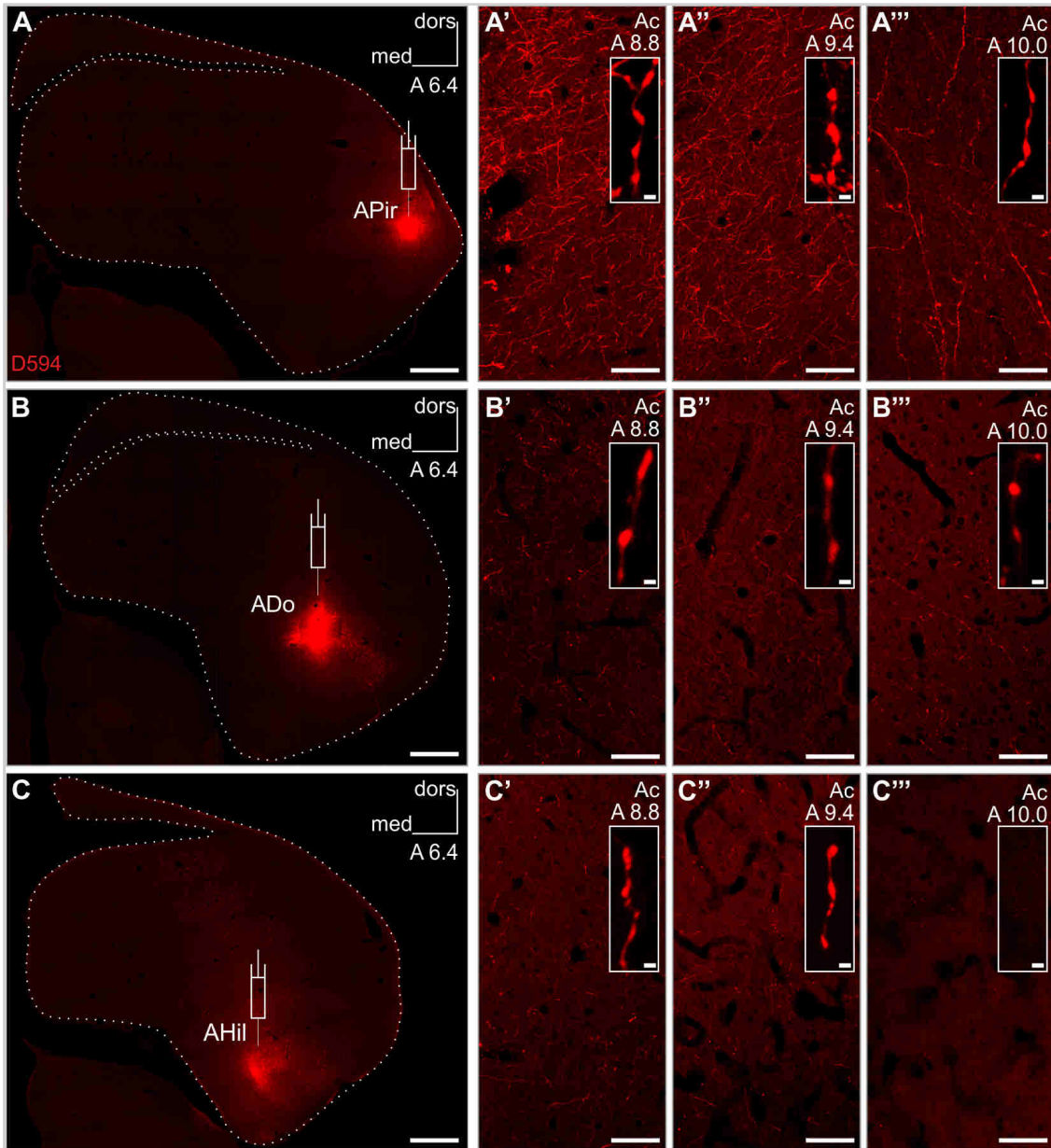
23. ábra Epifluoreszcens, közepes felbontású mozaikfelvételekből összeállított coronalis sorozatmetszetek a jobb oldali telencephalon ventralis részéről. Az arcopallium APir területére injektált D594 következtében anterográdan feltöltődött rostok vonulata nyomon követhető a csirkeagy A10.4 - A6.4 (Kuenzel és Masson (1988) közötti rostrocaudalis szintjeinek ventralis részein (A- G). Az APir-ból (F-G) kiinduló D594 pozitív axonok két fő zónát/útvonalat követnek: (i) az arcopallium dorsalis határán (*dAFP* - dorsalis amygdalofugalis pálya; F-G) medialis irányba húzódva (vaf kötegen keresztül) a BSTL területében haladnak tovább terminális végződésekkal tarkítottan és BSTL-el határos medialis MSt zónákat (nucleus accumbens) is elérve végződnek (A-F); vagy (ii) ventralis útvonalakon (*vAFP* – ventralis amygdalofugalis pálya) az extended amygdala (*EA*) ventrobasalis részében haladnak (A-E), átszöve a nucleus basalist (*B*) és a tuberculum olfactoriumot (*TO*). Ez utóbbi axonhálózat az arcopallium rostralisabb elhelyezkedésű neuroncsoportjaiból indul ki (E). **Rövidítések:** *ac* - commissura anterior, *Ac* - nucleus accumbens, *APir* - amygdalopiriform area, *B* - nucleus basalis, *BSTL* - bed nucleus of stria terminalis pars lateralis, *DB* - nucleus of diagonal band, *D594* - Alexa Fluor® 594 konjugált 10 kDa molekulatömegű dextrán, *EA*v - extended amygdala pars ventralis, *LV* – ventriculus lateralis, *MSt* - medial striatum, *S* - septum, *tsm* - tractus septomesencephalicus, *VP* - ventral pallidum, *dors* - dorsalis, *med* – medialis. **Lépték:** 1 mm.

5.4 A nucleus accumbens eléri arcopallialis bemenetek kapcsolati sűrűségüket tekintve különböznek.

A BSTL-t illetve az MSt medialis részeként az Ac területeit együttesen érintő retrográd beadások jelentős számú perikaryont töltöttek fel az arcopallium dorsolateralis ék alakú területén. Ugyanazon kísérleteinkben jelentősen kevesebb jelölt sejtet találtunk az arcopallium más (pl. AHil, ADo) perem területein, miközben annak középső „core” része teljesen kimaradt a forrásrégiók sorából (22. ábra B₃). Azonban az arcopallialis forrásneuron-csoport axon végfácskáinak sűrűségi mintázata a célrégiókra (BSTL, Ac) vetítve jelentősen eltérő lehet, így ezt tisztázandó, további lépéseket tettünk.

Az arcopallium „perem”/„öv” területeinek eddigiekben kimutatott kiindulási egységeit külön megcélözva, anterográd jelzőanyagot (D594) injektáltunk az arcopallium dorsolateralis (APir), dorsalis (ADo) és medialis hilaris (AHil) egységeibe (24. ábra A, B, C). A pályakövetési módszer korlátait ismerve, csupán kvalitatív becslésbe bocsátkoztunk. A pontosabb eredmények érdekében, a detektálási folyamat során egységesített eljárást alkalmaztunk (a beadási és a végződési területeket lézerkonfokális és digitális technológia révén azonos paraméterek mellett dokumentáltuk). A beadások eredményeként megjelölt rostok a korábbi retrográd beadási helyek pontosságát is megerősítették. Az MSt medialis, BSTL-el határos zónája - azaz Ac régiója - mutatott jelentős eltérést a rostsűrűséget tekintve. Ennek figyelembe vételével, arcopallialis beadásonként az Ac három kiemelt szintjéből (rostralis, középső és caudalis) minimális optikai szeletvastagság mellett, lézerkonfokális felvételeket készítettünk. Az azonos régiókból készült felvételeket (végződési célterületként) beadásonként csoportosítottuk, egymás mellé rendeztük, biztosítva azok kvalitatív összehasonlíthatóságát (24. ábra A'-A''', B'-B''', C'-C'''). Az APir területének D594 beadásai sűrű rosthálózatot mutattak az Ac mindhárom szintjében (24. ábra A-A'''). Ettől eltérően, az ADo (24. ábra B) és az AHil (24. ábra C) területeket érintő beadásaink jóval kisebb rostsűrűséget eredményeztek a célrégióban (24. ábra B'-B''' és C'-C'''). Összességében az Ac régiók caudo-rostralis irányban egyre gyengülő bemenetet kapnak, ahogy az arcopalliumban latero-medialis irányban haladunk a beadási területekkel. Így a hilaris régió idegsejtjeinek nyúlványai a rostralis Ac területeit már nem érték el (24. ábra C''').

24. ábra (FELÍRAT A KÖVETKEZŐ OLDALON)

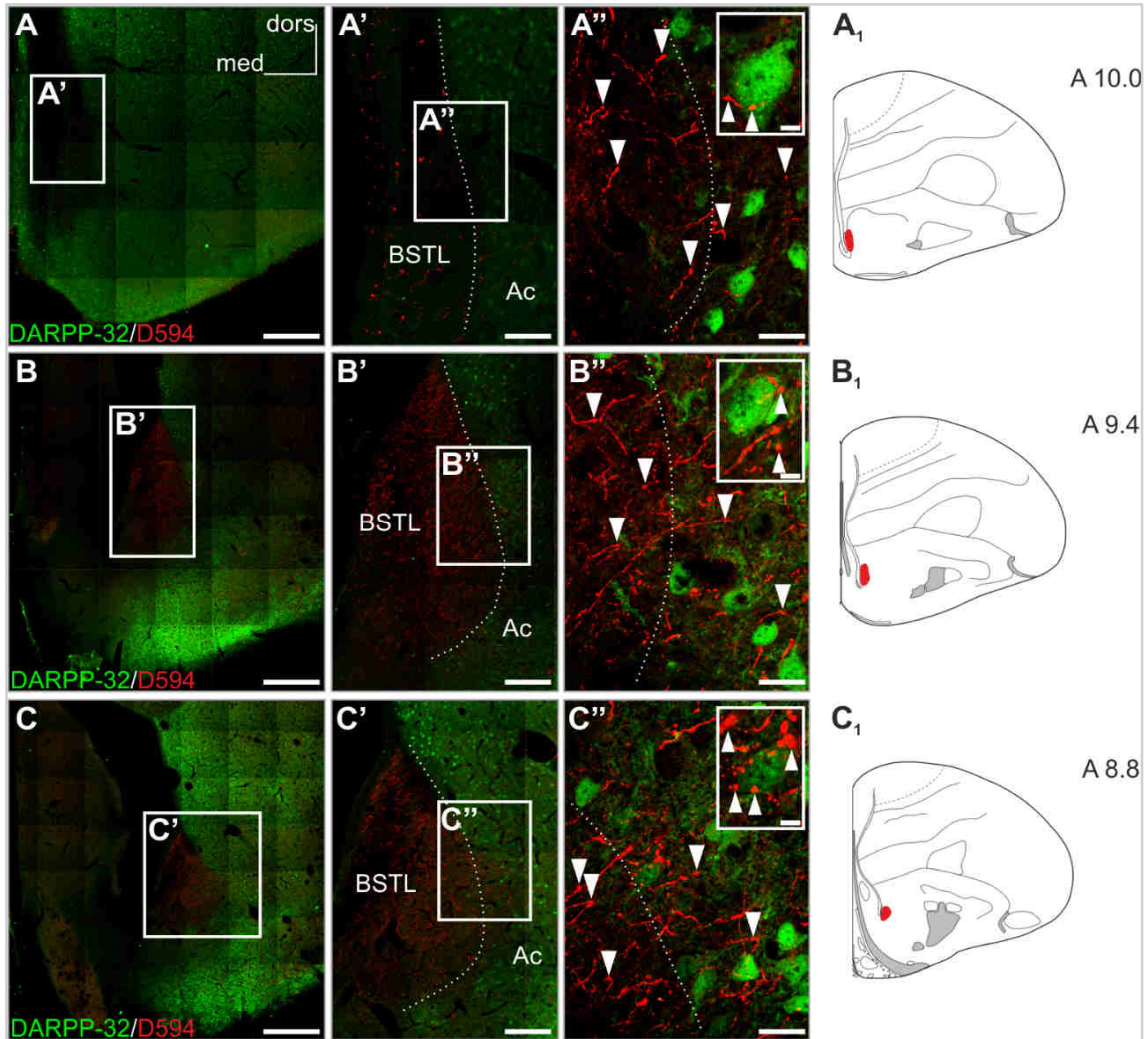


24. ábra (ELŐZŐ OLDALON) **A nucleus accumbensst elérő arcopallialis bemenetek kapcsolati sűrűségüket tekintve különböznek. (A-A'')** Az amygdalopiriform area (APir) területébe adott D594 nagy sűrűségben jelöl rostokat az nucleus accumbens (*Ac*) rostro-caudalis szintjeiben (A10.0-A8.8). A beillesztett ábrákon a területekből készített nagy nagyítású felvételekkel mutatjuk be az axontágulatok meglétét. **(B-B'')** A D594-t a dorsalis arcopallium (*ADo*) területébe injektálva kevesebb axont jelöl az *Ac* rostro-caudalis szintjeiben, különösen a rostralisabb területet (A10.0) vizsgálva. A beillesztett ábrákon a területekből készített nagy nagyítású felvételekkel mutatjuk be az axontágulatok meglétét. **(C-C'')** A medialis arcopallium hilaris alegységébe (*AHil*) adott D594 által okozott anterográd jelzés leginkább a caudalis szintben (A8.8) számottevő, míg a középső szintben (A9.4) gyenge, rostralisan (A10.0) pedig hiányzik. A beillesztett ábrákon a területekből készített nagy nagyítású felvételekkel mutatjuk be az axontágulatok meglétét, kivéve a legrostralisabb területet, ahol nem találhatóak rostok. **(A, B, C)** A megfelelő szimbólumok és feliratok a beadási helyeket jelzik. A beadási helyekre optimalizált felvételek miatt gyenge agykontúrok pontozott vonalakkal vannak jelölve. **(A-C'')** Az ábrák jobb felső sarkaiban szereplő számok a milliméterben mért antero-posterior távolságot jelölik Kuenzel és Masson (1988) szerint. *Rövidítések:* D594 - Alexa Fluor® 594 konjugált 10 kDa molekulatömegű dextrans, *dors* - dorsalis, *med* – medialis. *Lépték:* 1 mm **(A, B, C)**, 70 μ m **(A'-A'', B'-B'', C'-C'')**, 2 μ m (a beillesztett ábrák esetében).

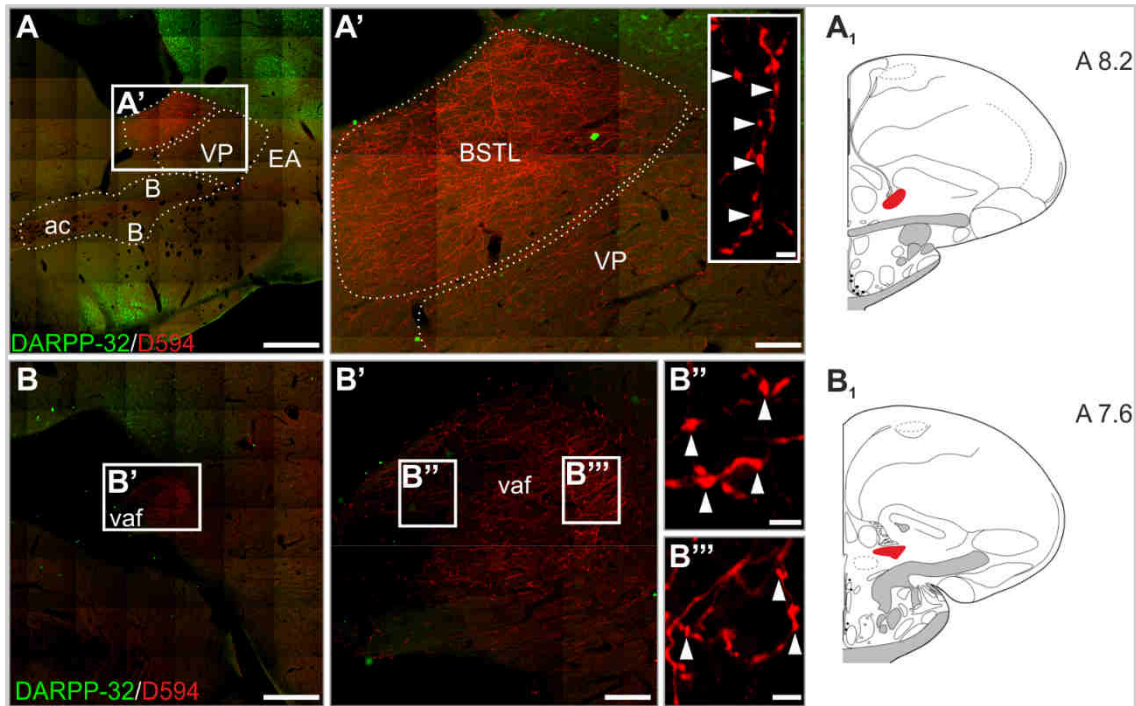
5.5 A ventromedialis előagy molekulárisan (DARPP-32) eltérő területeit az arcopalliumból érkező bemenetek egyaránt eléri.

A ventromedialis előagy medialis és lateralis alegységeinek elkülönítésére kiválóan alkalmas a DARPP-32 (dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein) molekula, amelynek jelenléte, illetve hiánya jelentős működésbeli különbözősége utal az adott neuronok és az általuk benépesített agyterületek szempontjából. Azt feltételeztük, hogy a régiók által mutatott molekuláris különbség azok arcopallialis bemeneteiben is tükröződik. Ennek igazolására DARPP-32 immunhisztokémiával kombinált anterográd pályakövetési kísérletet végeztünk. Az arcopallium APir területére (mint a jelentős számú projekciós neuron forrása) Alexa Fluor® 594 konjugált 10kDa molekulatömegű dextrans (D594) injektáltunk. A projekciós jeleket tartalmazó ventromedialis juxtaventricularis előagy területek (a BSTL-t és *Ac*-t magába foglalóan) sorozatmetszetein, DARPP-32 fehérje elleni immunhisztokémiát végeztünk (25. és 26. ábrák). A DARPP-32 immunreakció jól elkülönítette a ventromedialis előagy medialis és lateralis területeit (25. ábra A-C'') a rostralis sorozatmetszetek szintjében (A10.0 - A8.8). Az arcopallialis

axonok többsége a DARPP-32 negatív régióban végződött, amely álláspontunk szerint itt



25. ábra A ventromedialis előagy alrégióinak arcopallialis bemenet (piros) és DARPP-32 fehérje (zöld) szerinti jellemzése. (A-C₁) Az arcopallium amygdalopiriform area (APir) alegységébe injektált D594 által megjelölt (pálya) rostok (D594⁺) a ventromedialis előagy juxtaventricularis DARPP-32 mentes területében haladnak. A területet lateralisán DARPP-32⁺ sejtek zónája övezi. Különböző rostro-caudalis szintekben (**A**, **A₁**, **B**, **B₁**, **C**, **C₁**), a D594⁺ axonok két jól elkülöníthető területben (*BSTL* vs *Ac* a *pontozott vonal* a határt jelöli **A'-A''**, **B'-B''**, **C'-C''**) végződésekre jellemző morfológiát mutatnak. Sűrű terminális hálózatot találtunk a DARPP-32 mentes csepp-formájú kamra közeli régióban, amely a bed nucleus of stria terminalis pars lateralisnak (*BSTL*) felel meg, illetve kevésbé sűrű terminális rosthálózatot a környező DARPP-32⁺ sejtmezőben, amely a nucleus accumbens (*Ac*) által képviselt terület (*nyílhegyek az A''*, **B''**, **C''** tracer tartalmú axonokat jelölnek). Rövidítések: *D594* - Alexa Fluor® 594 konjugált 10 kDa molekulatömegű dextrán, *dors* - dorsalis, *DARPP-32* - dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, *med* – medialis. Lépték: 1 mm (**A**, **B**, **C**), 50 µm (**A'**, **B'**, **C'**), 20 µm (**A''**, **B''**, **C''**), 5 µm (beillesztett ábrák **A''**, **B''**, **C''**).



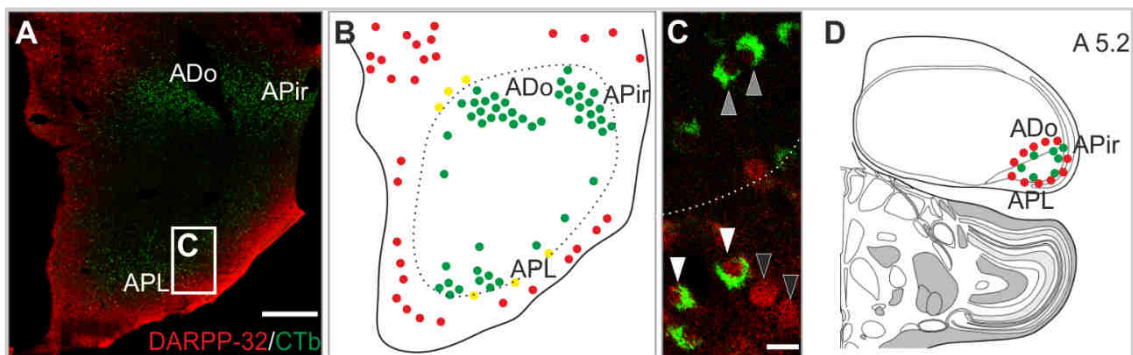
26. ábra A ventromedialis előagy caudalis területeinek arcopallialis bemenet (piros) és DARPP-32 fehérje (zöld) szerinti jellemzése. (A-B''') Az arcopallium amygdalopiriform area (APir) alegységébe injektált D594 által megjelölt rostok (D594⁺) a commissura anterior (*ac*) szintjében is jelentős számban halmozódnak (A, A', A1). A ventromedialis előagy ezen caudalis D594⁺ rostgazdag területeit a BSTL és a vele határos subpallialis régiók: ventralis pallidum (VP), extended amygdala (EA) és a Meynert-féle nucleus basalis (B) alkotják (a nucleus accumbens ezen caudalis területen már nem fellelhető). (B-B''') A még caudalisabb szinteken az anterográdan jelölt axonok a ventralis amygdalofugalis kötegben (*vaf*, B-B', nagytva B''-B''') tömörülnek. Rövidítések: D594 - Alexa Fluor® 594 konjugált 10 kDa molekulatömegű dextrán, *dors* - dorsalis, DARPP-32 - dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, *med* – medialis. Lépték: 1 mm (A, B), 50 µm (A', B'), 2 µm (B'', B''')

a BSTL területének felel meg. (25. ábra A', A'', B', B'', C', C''). Kisebb sűrűségben ugyan, de jelentős mennyiségben találtunk axonokat és végződési mezőket az előbbivel közvetlenül határos DARPP-32 pozitív neuronokat tartalmazó zónában, amely az Ac neuroncsoportjainak felel meg (25. ábra A', A'', B', B'', C', C'').

A jóval caudalisabb, Ac területeket már elhagyó metszetszintekben (A8.2 - A7.6) nagy mennyiségű axonvégződést észleltünk a BSTL területén (26. ábra A, A'). Szintén jelentős számú jelölődött axon mutatkozott az „extended amygdala” (EA), ventralis pallidum (VP) és a Meynert-féle nucleus basalis (B) területeiben (26. ábra A, A'), illetve a ventralis amygdalofugalis köteg területében tömörülve (26. ábra B-B''').

5.6 A ventromedialis előagy arcopallialis bemeneteit adó neuroncsoportok DARPP-32 negatív régiók.

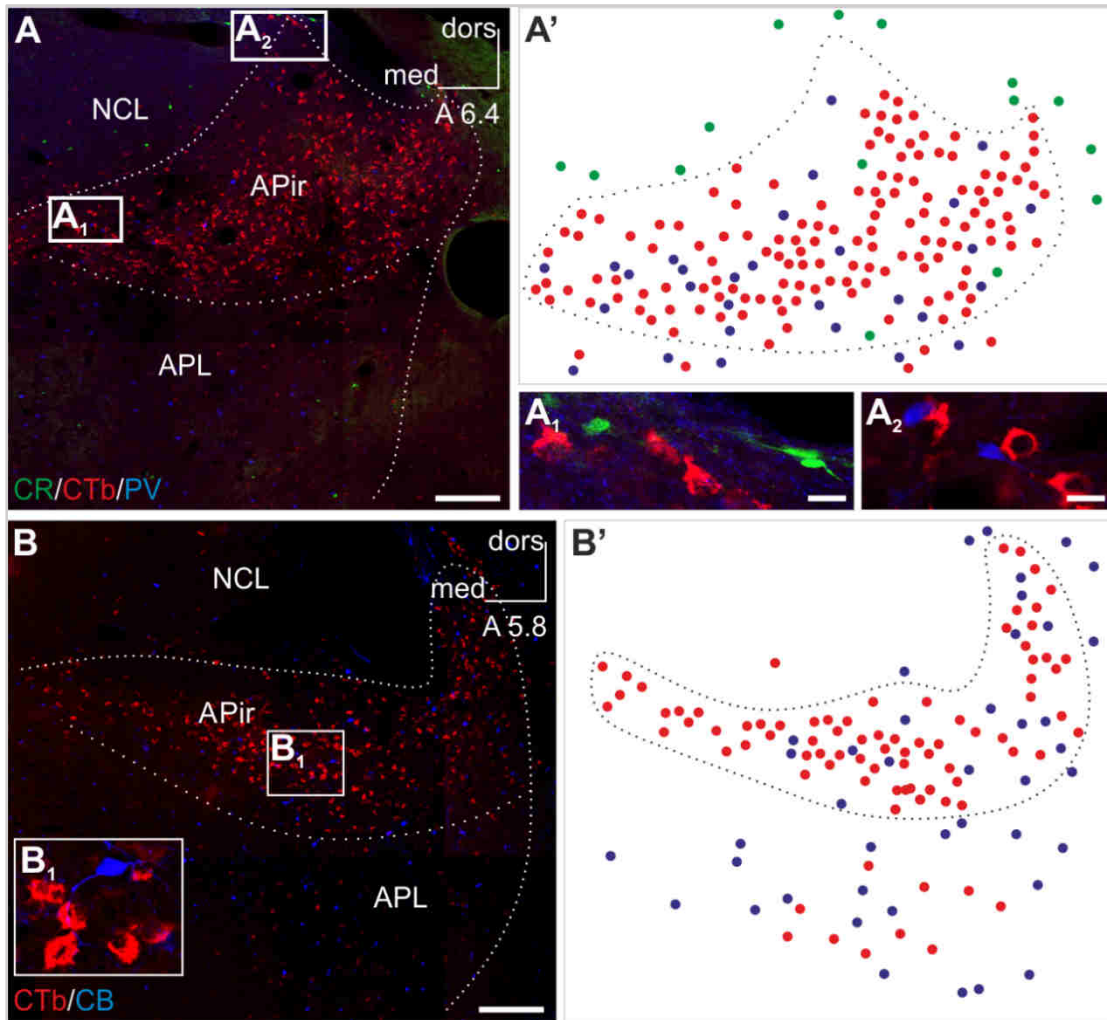
Az előző pontban tárgyalt vizsgálatunk során észleltük, hogy DARPP-32 fehérje expressziója a telencephalon caudalis arcopallialis részein elmaradt. Ennek kapcsán a DARPP-32 immunhisztokémiai vizsgálatot olyan mintákon is elvégeztük, amelyek a ventromedialis előagyi célterületek (BSTL, Ac) felől retrográd (ld. CTb) visszatöltődést mutattak az arcopallialis forrásneuronok megjelölésével. Így az arcopallium „perem” régiói jól kirajzolódtak, melyek egy DARPP-32 jelben szegény terület peremén helyezkedtek el, a DARPP-32 immunpozitív területek közvetlen szomszédjaiként (27. ábra A, D). Azaz az arcopallium jelentős központi területét is beleértve, néhány szórványosan fellelhető immunpozitív sejttől eltekintve, hiányzott a DARPP-32 fehérje (27. ábra A, B, C). Következésképpen azonosítottunk egy olyan pályát, amely kiindulásában és végződésében jelentős számában a DARPP-32 fehérje jelátviteli útját nélkülözve funkcionál.



27. ábra Az arcopallium „perem régióit” DARPP-32⁺ zónák övezik. (A, D) A ventromedialis előagy (nucl. accumbens) régióiból retrográdan jelölődött (CTb – zöld) az arcopallium „perem öve”, amelyet kívülről DARPP-32⁺ neuronok szegélyeznek. Vázlatosan ábrázolva (B), piros pontok DARPP-32⁺ sejtek elrendeződése az arcopallium körül (fekete nyílhegyek C), zöld pontok a retrográdan jelzett perikaryonok eloszlását jelzik (szürke nyílhegyek C). Egyes esetekben a határzónákban kettősen jelölt neuronok is megfigyelhetők (sárga pontok B, fehér nyílhegyek C). Rövidítések: CTb - Alexa Fluor® 488 konjugált koleratoxin beta alegység, dors - dorsalis, DARPP-32 - dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, med – medialis. Lépték: 1 mm (A), 20 µm (C)

5.7 A ventromedialis előagyba vetítő arcopalliofugalis (amygdalofugalis) pálya projekciós neuronjai nem expresszálják a calretinin, parvalbumin és calbindin kalciumkötő fehérjéket.

További vizsgálataink során a ventromedialis előagy felé rostokat küldő arcopallialis projekciós neuronok (forrás-neuronok) más fajokban is használt markerek szerinti csoportosítását céloztuk. Az irodalmi adatok tükrében alkalmas módszerek mutatkoztak a klasszikus kalciumkötő fehérjék - úgy mint a parvalbumin, calbindin és calretinin. A teljes arcopallialis neuronpopuláció figyelembe vételével, a calretinin pozitív neuronok jelenléte szórványosnak bizonyult (28. ábra A, A'), míg parvalbumin és calbindin esetében jelentősebb számú pozitivitás volt megfigyelhető az arcopallium területein (28. ábra A, A', B, B'). A forrás-neuronok retrográd pályakövetését a vizsgált kalciumkötő fehérjék elleni immunfestéssel kombinálva, kimutattuk, hogy az arcopallium ventromedialis előagyba vetítő neuronjaiban nem fejeződnék ki a calretinin (28. ábra A₁), parvalbumin (28. ábra A₂) és calbindin (28. ábra B₁) fehérjék.



28. ábra A BSTL illetve a vele határos Ac régiókra vetítő arcopallialis neuronok immunnegatívak a klasszikus kalciumkötő parvalbumin, calbindin és calretinin fehérjékre. (A, A', A₁, A₂) Az arcopallium amygdalopiriform (APir) területe jelentős számú, BSTL és Ac régiókból retrográdan visszatöltött (CTb⁺) neuront tartalmaz. Ezek a projekciós neuronok nem immunreaktívak a calretinin vagy parvalbumin kalciumkötő fehérjékre. (A') Vázlatosan szemléltetve a szimplán calretinin⁺ (zöld pontok), CTb⁺ (piros pontok) és parvalbumin⁺ (kék pontok) neuronok eloszlása. (B, B', B₁) Hasonlóan a CR és PV fehérjékhez a retrográdan jelzett neuronok immunnegatívak maradtak calbindinra is az APir caudalisabb metszetéből vett mintán. (B') Vázlatosan szemléltetve a szimplán CTb⁺ (piros pontok) és calbindin⁺ (kék pontok) neuronok eloszlása. (A, B) Az ábrák jobb felső sarkaiban szereplő számok a milliméterben mért antero-posterior távolságot jelölik Kuenzel és Masson (1988) szerint. **Rövidítések:** APL - posterolateralis amygdala, CB - calbindin, CR – calretinin, CTb - Alexa Fluor® 488 konjugált koleratoxin beta alegység, dors - dorsalis, med – medialis, NCL - caudolateralis nidopallium, PV – parvalbumin. **Lépték:** 200 μm (A, B), 10 μm (A, A₂).

6 Megbeszélés

6.1 Az emlős basalis amygdala és azzal homológ madár arcopallialis területek serkentő bemenetet adnak a limbikus striatumba.

Az emlősök és sauropsidák jó 250 millió éves különutas fejlődése ellenére, központi idegrendszerük számos hasonló jellemvonást hordoz. A hosszú távon megőrződött hasonló morfológiai és kémiai jellemzők feltárása olyan idegrendszeri elemek megismerését teszi lehetővé, amelyek kivételes alkalmazkodási tulajdonságok hordozói. Ebből a szempontból megkülönböztetett figyelmet érdemelnek az emlős és madár fajok központi idegrendszerében centrális pozíciót elfoglaló és homológ területeket képviselő törzsdúcok (Jarvis és mtsai 2005; Kuenzel és mtsai 2011; Reiner és mtsai 2004).

Emlősökben a törzsdúcok limbikus hálózatának kiemelkedő tagja a nucleus accumbens (Ac), amely kritikus szereppel bír a jutalmazás mechanizmusában, a célvezérelt viselkedési folyamatokban, illetve a drog-addikció kialakulásában (Kelley 1999). A limbikus és motoros funkcionális rendszerek összekapcsoló („limbic-motor interface”) egységeként (Groenewegen és mtsai 1996; Mogenson és mtsai 1980), az Ac jelentős serkentő bemenetet kap különböző előagyai limbikus területek felől. Főbb afferenciái a medialis prefrontalis kéregből, hippocampusból, subiculumból, illetve a basalis amygdalából érkeznek (Brog és mtsai 1993). A basalis amygdala részeként, a basolateralis amygdala (BLA) neuronjai az Ac jól ismert bemeneti forrásaként szolgálnak (McDonald 1991; Petrovich és mtsai 1996; Shinonaga és mtsai 1994), ezáltal részesei az Ac felé konvergáló afferens rendszernek (Groenewegen és mtsai 1999; Johnson és mtsai 1994). Az Ac BLA felől érkező bemenetei kritikus szerepet játszanak, a jutalom várható megjelenését jelző ingerek által kiváltott motivációs viselkedési formák kialakításában (Di Ciano és Everitt 2004; Setlow és mtsai 2002). Az amygdala „várható jutalmat” jelző ingerre aktiválódó sejtjei, az Ac neuronjainak serkentésén keresztül, elősegítik a jutalomkereső viselkedési formák megjelenését (Ambroggi és mtsai 2008). A serkentő folyamatok mögött NMDA és AMPA receptorok részvételét mutatták ki (Di Ciano és Everitt 2004, 2001). A BLA-Ac pálya szinaptikus végződéseinek morfológiai elemzésével (French és Totterdell 2003) kimutatták, hogy a serkentő jelleg mögött axospinosus és axodendritikus aszimmetrikus kapcsolatok állnak, amelyekben gyakori a

Glu jelenléte (Kozell és Meshul 2004). Jelen morfológiai munkánkban a patkány BLA-Ac pálya végződéseinek kapcsán, mások korábbi megfigyeléseivel összhangban, aszimmetrikus morfológiájú axospinosus és axodendritikus kapcsolatokat figyeltünk meg az Ac területén. A BLA eredetű axonvégződésekben Glu és Asp jelenlétét igazoltuk (Hanics és mtsai 2012), ami felveti a pálya végződéseiben az Asp szerepét és Glu-tal történő együttes felszabadulását.

Csillag és mtsai (1997) házityúknál az amygdaloid homológ régióként feltételezett arcopallium ventralis részéből kiinduló pálya végződéseit vizsgálták a medialis striatumban (MSt). A területben serkentő morfológiájú, Glu-tartalmú axonvégződések detektáltak. Azonban Glu-mentes aszimmetrikus végződések megjelenésére is felfigyeltek. Davies és mtsai (1997) az arcopallium efferens kapcsolatait vizsgálva többek között a dorsalis területek ventrobasisalis előagyi projekcióira (beleértve az MSt) hívták fel a figyelmet. Adam és Csillag (2006) házityúk MSt területén, aszimmetrikus szinapszisokkal végződő axonterminálisok esetében Asp és Glu szelektív, illetve együttes előfordulását bizonyította. Ezen munkák folytatásaként az arcopallium dorsalis területéből kiinduló MSt/Ac területén végződő kapcsolatot megvizsgálva, abban Asp és Glu tartalmú, aszimmetrikus axospinosus és axodendritikus végződések találunk (Hanics és mtsai 2012).

Patkány és házityúk nucleus accumbens területén egyaránt megfigyelhető volt az amygdaloidtól eltérő eredetű végződésekben is az Asp és Glu jelenléte. Ezen megfigyelt végződések is axospinosus vagy axodendritikus, aszimmetrikus (Gray I) morfológiájú és egységes vezikuláris szerkezetet mutató szinapszisokat alkottak (Hanics és mtsai 2012). Az Asp és Glu, mindkét általunk vizsgált faj limbikus striatumának serkentő szinapszisaiban megfigyelt általános jelenléte felveti azok együttes megjelenéséhez kötött speciális jelátviteli folyamat lehetőségét (pl. co-release).

Már a 80-as évek vizsgálataiban során felmerült, hogy endogén Asp és Glu ürül patkány corticostriatalis végződéseiből (Girault és mtsai 1986). Néhány évvel később pedig striatumból nyert szinaptoszómákon bizonyították be az endogén Asp Ca^{2+} -tól függő felszabadulását, amit D2 (nem pedig D1) receptor függően, dopaminnal gátolni tudtak (Maura és mtsai 1989).

A serkentő szinaptikus rendszerekben együttesen megjelenő Asp és Glu leírása nem új keletű. Patkány hippocampus serkentő végződéseiben is kimutatásra kerültek

(Gundersen és mtsai 1998). Az Asp jelátviteli szerepére, tekintve a Glu-tal közös receptorait (NMDA, metabotróp glutamát receptorok, AMPA – utóbbi vitatott), illetve azokon közel azonos hatásait, egy párhuzamosan létező serkentő rendszerként tekintenek, nem tulajdonítva számára különösebb szerepet. Nagyobb vitát inkább a klasszikus neurotranszmitternek történő megfelelés, azaz a vezikuláris transzport megoldatlan problémája jelentett (Naito és Ueda 1985), amit az utóbbi időkben két munkacsoportnak sikerült rendeznie (Miyaji és mtsai 2008; Miyaji és mtsai 2011; Morland és mtsai 2013). Azonban született az Asp szerepét kifejezetten megkérdőjelező munka is, a hippocampusra vonatkoztatva (Herring és mtsai 2015), ami valószínűleg további vitát generál majd. Ettől eltekintve in vivo mikrodialízis technikával elektromos vagy kémiai stimuláció után, bizonyították Asp és Glu felszabadulását a striatum prefrontalis kéregből eredő végződéseiben (Lada és mtsai 1998). Házityútkban végzett mikrodialízis kísérletek szintén bizonyítják az Asp és Glu felszabadulását az MSt területében (Zachar és mtsai 2012). Továbbá az MSt-ben az Asp és Glu egymást erősítő hatását elektrofiziológiai mérésekkel bizonyították, amit transzporter-függő folyamatként értelmeznek (Balazs és mtsai 2012).

6.2 A madár amygdaloid arcopallium értelmezése annak ventromedialis előagyi kapcsolatain keresztül.

A madár telencephalon caudalis területén ventralisan elhelyezkedő arcopallium léziós kísérletei (Phillips 1964; Phillips és Youngren 1986) fontos támpontot adtak a madár amygdaloid régiókat illetően. További vizsgálatok során sikerült általánosan megismerni az arcopallium kapcsolatainak elrendeződését (Zeier és Karten 1971; Davies és mtsai 1997). Azonban az „amygdaloid arcopalliumot” célzó finomabb kapcsolati elemzések száma csekély. Ennek elsőrendű oka a limbikus területek vitatott elhelyezkedése, különösen az amygdaloid kapcsolatok szempontjából olyan kritikus ventrobazalis (ventromedialis) régióké, mint Ac és a BSTL. Az utóbbi évek munkáiban (Balint és Csillag 2007; Balint és mtsai 2011; Husband és Shimizu 2011) újraértékelték az Ac ventrobazalis előagyi helyzetét, amely a BSTL pontosabb behatárolását is lehetővé tette. Azonban számos olyan munka született a BSTL régiót értelmezően, ami a jelenlegi tudásunk szerinti Ac területét is tartalmazta. Jelen munkánk (Hanics és mtsai 2016) segíthet ezeket utólagosan pontosabb kontextusba helyezni.

Atoji és mtsai (2006) galambokban végzett pályakövetéssel, az emlős basalis amygdala-BSTL kapcsolattal homológ, arcopallialis kapcsolatot írtak le. Vizsgálataikban világossá vált, hogy az arcopallium ebből a szempontból heterogén sejtcsoportokat tartalmaz. Jelen munkánkban, házityúk hasonló előagyi elemeinek vizsgálatával, de szélesebb értelmezésű ventrobasalis (BSTL, Ac, MSt) régió kapcsán, vizsgáltuk meg az arcopallium ezen területekre vetülő efferenseit (Hanics és mtsai 2016). Munkánkban az Ac és BSTL új alapokra helyezett értelmezése szerint jártunk el (Balint és Csillag 2007). Kísérletünkben retrográd jelzésekkel igazoltuk, hogy az arcopalliofugalis ventrobasalis előagyi bemenetek a juxtaventricularis és ahhoz közeli ventromedialis előagyba konvergálnak (BSTL, Ac). Az Ac területe felől retrográdan kimutattuk az arcopallium ide vetítő neuroncsoportjait. A galambban találtakkal (Atoji és mtsai 2006) közel egyező területi rendezettséget figyeltünk meg (Hanics és mtsai 2016). Házityúk arcopalliumában a ventrobasalis előagy felé vetítő neuronok annak perem öveiben helyezkedtek el (Hanics és mtsai 2016) és Puelles és mtsai (2007) által összeállított csirkeagy atlasz szerinti beosztásban, regionálisan jól elhelyezhetőek voltak, annak speciális nevezéktanának használatával. Az arcopallium rostralis szintjeiben egy gyűrű alakú zónaként jelent meg a jelölt neuronok populációja, amely területileg magába foglalta annak dorsalis (ADo), amygdalohippocampalis (AHi) és hilaris (AHil) régióit, Puelles és mtsai (2007) beosztásában. Ezek a területek megfeleltek az Atoji és mtsai (2006) által galambban találtakkal, úgymint az arcopallium dorsalis (AD), nucleus taeniae (TnA) és a medialis parvocellularis része (AMp). Különösen nagy számú sejtet figyeltünk meg az arcopallium dorsolateralis területén, egy ék alakú területen, amit Puelles és mtsai (2007) nyomán amygdalopiriform areaként (APir) azonosítottunk. Ez a terület szintén összevethető volt Atoji és mtsai (2006) munkájával. Azonban ők több alterületben határozták meg ezt a régiót, úgymint caudalis ventrolateralis nidopallium (NCVI), subnidopallium (SuN), illetve a posterior arcopallialis mag pars compactája (PoAc). További jelentős területként azonosítottuk a posterolateralis amygdala (APL) régióját, szintén Puelles és mtsai (2007) beosztása szerint, amit galambban basalis posterior arcopalliumként (PoAb) Atoji és mtsai (2006) azonosítottak. Kísérleteink nyomán kimutattuk, hogy az Ac és BSTL területét együttesen érintő beadásaink az előzőekben ismertetett arcopallialis elhelyezkedésű sejtpopulációkat emelték ki (Hanics és mtsai 2016). Ez utóbbi megfigyelésünk világossá teszi Atoji és mtsai (2006) által a BSTL régióra vonatkoztatott

arcopallialis bemenetek hasonlóságát. Azonban Atoji és mtsai (2006) munkájában elemzésük az extended amygdalára korlátozódott (beleértve a BSTL-t) és figyelmen kívül hagyták az Ac területét, ugyanis nem rendelkeztek még e magról elegendő információval. Mindazonáltal eredményeik összevetése megerősíti az arcopallium általunk kiemelt régióinak, mint ventrobasalis előagyi kapcsolatokat fenntartó régióknak, amygdaloid területként való osztályozását. A galambból származó adatokkal összevethetően, az arcopallium jelentős központi területe (amygdaloid core – ACo) nem küld projekciót a BSTL és Ac területeire. Ez magyarázhatja Aoki és mtsai (2006) házityútkban végzett centralis arcopallialis lézióinak hatástalanságát az impulzivitás („türelmetlenség”) tesztekben. Hasonlóan kimarad a kapcsolódó területekből a Puellas és mtsai (2007) által meghatározott amygdaloid taenial nucleus (ATn), ami a vaf-hoz viszonyított helyzete miatt nem azonos az Atoji és mtsai (2006) által leírt TnA maggal, ami a vaf-tól távolabb helyezkedik el. Fontos megemlíteni, hogy a kiterjesztett amygdala (EA) más régiókban különösen az arcopalliummal határosan, megfigyeltünk további retrográdan jelölt sejteket, bizonyítva azok BSTL és Ac kapcsolatát (Hanics és mtsai 2016).

Megemlítenéd, hogy a galamb Ac afferens kapcsolatainak elemzésekor Husband és Shimizu (2011) általános jelölődést figyelt meg az arcopallium nagy részében. Különösen szembetűnő az arcopallium központi részét is magába foglaló retrográd jelzés ugyanebben a kísérletben. Adataikat az Ac kapcsolatainak általános leírásaiként közölték és sajnos a retrográd eredmények anterográd ellenőrzése nem történt meg. Saját munkánkban az amygdaloid arcopallium előzőekben leírt forrás-neuronjai által alkotott régiókból anterográd pályajelölést is végeztünk, igazolva előzőekben kapott retrográd eredményeinket. Az APir területéről származóan igazolódott a BSTL, illetve az Ac rostrocaudalis szintjeinek jelentős projekciós bemenete. A dorsalis és medialis arcopallialis neuroncsoportok főleg a BSTL és az EA területeit, illetve az Ac caudalis részeit érték el rostjaikkal. A rostok sűrűségét az APir-ből kiindulóan találtuk a legnagyobbak, amit az a tény is magyaráz, hogy a korábbi retrográd jelzések is itt mutatták a forrás-neuronok legnagyobb sűrűségét.

6.3 Az amygdalofugalis pálya madárban.

Munkánk lehetővé tette az arcopallium amygdaloid területeiből kiinduló és a ventrobasalis előagy területét elérő rostozat lefutásának topográfiai leírását. A rostok két

útvonal mentén haladnak, amelyekről Atoji és mtsai (2006) is említést tesznek. Az egyik valószínűleg az emlős stria terminalisnak megfelelő pálya, az arcopallium dorsalis szélén haladó rostok képviselik. A másik a ventralis pallialis határ mentén haladó rosthálózat, ami valószínűleg az emlős ansa peduncularisszal egyenértékű. Módszereinknek köszönhetően a pályák rostralisabb követhetősége is lehetővé vált. A dorsalisán haladó rostok a stria terminalis topográfiai területén (thalamus-striatum kamrai határzónájában) elhelyezkedő ventralis amygdalofugalis kötegében (vaf) haladnak tovább. Ezután áthaladnak a subpallialis (extended) amygdala és a BSTL területén, jól kivehető terminális mezőkkel tarkítottan, és végül az Ac shell és core területeibe sugároznak. A dorsalis vonulatot követő rostok az arcopallium dorsalis szintjeiből származnak (Hanics és mtsai 2016). A ventralis vonulatban részt vevő rostok a rostralisabb területekből indulnak és az EA ventrobasis részén keresztül érik el a nucleus basalis és a tuberculum olfactoriumot. Arcopallialis efferenseket a ventralis pallidum, a lateralis septum és a diagonalis köteg is tartalmaz.

Anterograd vizsgálataink egybeesnek Davies és mtsai (1997) munkájával, miszerint az arcopallium nagy része ipsilaterális kapcsolatot tart fenn. A vizsgált arcopallialis területekből kiindulva nem találtunk ellenoldali projekciót (Hanics et al 2016). A korábban leírt kontralaterális projekció az arcopallium anteriorra jellemző (Davies és mtsai 1997). E terület vizsgálatainkon kívül esett.

6.4 Az amygdalofugalis pálya ventromedialis előagyi végződési területei.

A ventromedialis előagy területeinek megkülönböztetése komplex megközelítést igényel, ugyanis itt találkoznak egymással a ventralis striatum és az amygdala „kiterjesztett” régiói (extended amygdala – EA). A területek egyszerű citoarchitektonikai megközelítése nem elegendő azok elkülönítéséhez. Immunitokémiai, kapcsolati és funkcionális alapokon határozták meg a ma elfogadott elhelyezkedésüket és kiterjedésüket. Különösen a neuronális funkciókhoz köthető immunitokémiai markerek jelentős segítséget nyújtanak a citoarchitektonikailag hasonló területek elkülönítésében, illetve területi kiterjedésük meghatározásában. Ezen ismervek alapján sikerült az elmúlt évtizedben karakterizálni a ventromedialis előagy területén belül az Ac-t, illetve elkülöníteni a centralis extended amygdalához sorolt és vele határos BSTL területétől (Balint és Csillag 2007). A funkcionális markerek tekintetében, a DARPP-32

szignálfehérje jelenléte, illetve hiánya lehetőséget biztosított a két terület viszonylagos elhatárolására, vagyis a ventromedialis előagy arcopallialis projekciós területeinek felosztására. A DARPP-32 jelenléte már régóta ismert a madár agy számos területén (Durstewitz és mtsai 1998; Roberts és mtsai 2002). A dopaminoceptív neuronok fontos szignál molekulájaként tartják számon (Hemmings Jr és mtsai 1987). Korábban Reiner és mtsai (1998) szegényes DARPP-32 immunjelzésről számoltak be a BSTL területén, pontosabban az akkori felfogás szerint 'NST'-ként elnevezett magról. Megfigyeléseik a DARPP-32 mellett a terület alacsony P anyag (SP) tartalmát is kiemelik bizonyítva, hogy a mai felfogásban taglalt BSTL területről van szó. A DARPP-32 ilyen értelmű marker szerepét további munkák is vizsgálták és megerősítették (Schnabel és mtsai 1997; Balint és Csillag 2007). Ezekkel a vizsgálatokkal összhangban, a teljes striatum területén, beleértve az MSt ventromedialis zónáját képviselő Ac-t, DARPP-32 immunreaktív sejteket figyeltünk meg, ellentétben a vele határos BSTL területével, amelyet csekély DARPP-32 tartalom jellemez. Az arcopalliumba adott anterográd pályakövető anyag által megjelölt rostok, a BSTL határát átlépve elérték az Ac területét és tágulataikkal a DARPP-32 pozitív neuronok környezetét is behálózták. Kísérletünkben a DARPP-32 immunfestéssel kombinált anterográd pályakövetés bizonyította mindkét terület együttes bemeneti érintettségét (Hanics és mtsai 2016).

6.5 A arcopallium ventromedialis előagyba vetítő neuronjainak DARPP-32, calbindin, calretinin, parvalbumin immunhisztokémiával történő jellemzése.

Az arcopallialis területek DARPP-32 expresszióját vizsgálva, annak belső részei jelmentességet mutattak. A ventromedialis agyterületek felől retrográdan feltöltött „forrás-neuronok” a DARPP-32 negatív terület közvetlen peremén helyezkedtek el. Azonban néhány kivételtől eltekintve nem mutattak DARPP-32 kolokalizációt. Tehát az amygdalofugalis pálya forrás-neuronjainak területeit DARPP-32 pozitív sejtek területei övezték, jelentősebb átfedés nélkül (Hanics és mtsai 2016). A jelentős DARPP-32 immunfestést a környező caudolaterális nidopalliumban, illetve az APir területével határos piriform kéregben észleltük, aminek megfigyeléséről Schnabel és mtsai (1997) is beszámoltak korábban. Ugyanezen vizsgálatukban megemlítik, hogy nagyon erős tirozin hidroxiláz (TH) jelzés mutatkozott a dorsalis és laterodorsalis arcopallium területében, a DARPP-32 jelzegénység ellenére. Ezek a területek az általunk vizsgált ADo és APir

régiókkal azonosak. Tehát a DARPP-32 szignálfehérje hiánya nem feltétlenül jelenti a dopaminerg bemenetek hiányát, hasonlóan az előagyhoz. A ventromedialis előagy kapcsán (Schnabel és mtsai 1997) az akkor még Ac-ként számon tartott BSTL területét DARPP-32 jelben szegény és TH gazdag régióként írták le. Itt megjegyzendő, hogy az előagy területén a TH immunpozitív rostokat a dopaminerg rendszer elemeiként tartják számon (Smeets és Steinbusch 1990). A DARPP-32 szignálfehérje kapcsán leírták, hogy jelenléte nem feltétlenül jelent dopaminoceptív jelleget (Ball és mtsai 1995; Absil és mtsai 2001).

Az amygdalofugalis neuronok további jellegzetességeként, kimutattuk a calbindin, calretinin, illetve parvalbumin kalciumkötő fehérjék kifejeződésének hiányát (Hanics és mtsai 2016). A vizsgált régiókban átfedően megjelentek mindhárom fehérjét expresszáló sejtek, sokszor a forrás-neuronokkal közvetlen szomszédságában. Az emlős amygdala területeire általánosan jellemző mindhárom kalciumkötő fehérje jelenléte (Pitkanen és Kempainen 2002). A kalciumkötő fehérjék expressziója, madáragy különböző területein, számos esetben segített funkcionálisan eltérő idegsejtcsoportok elkülönítésében (Gati és mtsai 2014; Husband és Shimizu 2011; Pfeiffer és Britto 1997; Roberts és mtsai 2002; Suarez és mtsai 2006). Így az arcopallium is számos parvalbumin⁺, calbindin⁺ és calretinin⁺ neuroncsoport színhelye (Cornez és mtsai 2015; Roberts és mtsai 2002). DeFelipe (1997) az emlős neocortexre vonatkozó áttekintő munkájában, mindhárom kalciumkötő fehérjét a sima nem-piramidális interneuronokra jellemzőbbnek tartja, mint a kevés esetben pozitivitást mutató piramissejtekre. Hof és mtsai (1999) szerint a calbindin, calretinin és parvalbumin a neocortex gátló neuronjainak speciális csoportjait jellemzik. Mindezt egybevetve, a „forrás-neuronok” mindhárom kalciumkötő fehérjétől mentes volta egybecseng a jelen disszertációban szereplő korábbi munka (Hanics és mtsai 2012) eredményével, melyben kimutattuk, hogy e neuronok által képzett pályarendszer (amygdalofugalis pálya) serkentő jellegű.

6.6 Fejlődési és funkcionális szempontok.

A ventromedialis előagy amygdalofugalis bemenetének dorsalis haladási útvonala az emlős stria terminalisnak felelhet meg. E dorsalis pálya mentén, a „forrás-neuronok” területeitől indulva, caudo-rostralis irányban haladva helyezkednek el az általunk vizsgált

rendszer pallialis és subpallialis (extended) eredetű amygdala összetevői. Ez alapján területi viszonyuk és fejlődési eredetük is jól leképezhető.

A madár BSTL és Ac területét legsűrűbben behálózó dorsolateralis arcopallium és a szomszédos caudalis nidopallium területeit a lateralis pallium származékának tekintik, és az emlős, illetve hüllő basolateralis amygdala területtel homológ régióként tartják számon (Guirado és mtsai 2000; Lanuza és mtsai 1998; Martinez-Garcia és mtsai 2008; Martinez-Garcia és mtsai 2002; Redies és mtsai 2001). Vannak ettől eltérő nézetek, melyek szerint ezek a területek inkább a ventralis pallium származékai (Medina és mtsai 2004; Puelles és mtsai 2000), fenntartva annak lehetőségét, hogy a basolateralis amygdala egy része is ventralis pallium eredetű (Abellan és mtsai 2009). Ez egybeesik Moreno és Gonzalez (2006) elképzeléseivel, amely alapján az általunk (Hanics és mtsai 2016) kiemelt arcopallialis területek elhelyezkedését elemezve, azok fejlődési eredete levezethető. Eszerint az APir (caudolateralis nidopalliummal – NCL -együtt) a lateralis pallium származéka, míg az ADo, AHi és AHil területek valószínűleg a ventralis palliumból fejlődnek. A (lateralis és ventralis) pallium eredetű „forrás-neuronokon” (pallialis amygdala) kívül, a rostok haladása mentén további retrográdan jelzett sejtek csoportjait azonosítottuk. Különösen sok tracer-jelölt neuron mutatkozott az arcopalliummal medialisan folytonos és közvetlenül határos subpallialis területeken. Így gyakorlatilag a subpallialis amygdala (SpA) vagy más néven az extended amygdala (EA) sejtcsoportjait azonosítottuk. Emlős homológiával élve, valószínűleg a centralis amygdala magoknak megfelelő részéről van szó (Vicario és mtsai 2014), amelyekben szintén jelentős pallialis amygdala eredetű afferenciát mutattunk ki madárban (Hanics és mtsai 2016).

Az extended amygdala centralis részét képező subpallialis centralis amygdala magok és BSTL (Martinez-Garcia és mtsai 2008), valamint a striatum ventralis részét képező Ac, a ventromedialis előagy területein bizonyos fokú átfedést mutatnak. Az átfedés fejlődésükből is ered, ugyanis különböző fejlődési területekről (subpallialis és ventralis pallialis domainek) származó neuronok vegyes halmazai, amelyek különböző migrációs folyosókat használva (pl. stria terminalis mentén), keveredve jutnak el végső ventromedialis előagyi lokalizációjukba (Vicario és mtsai 2015).

A ventromedialis előagy tehát konvergens pallialis amygdaloid bemenetet kap, amely kontextuális információkat hordoz a félelmi reakciók feldolgozásában fontos

területek számára. A bemenet által érintett ventromedialis előagy részben a viscerolimbikus (centralis és BSTL együtt, vagyis centralis EA), részben a jutalmazással és motivációval (Ac) összefüggő központok területeit hordozza magában. A centralis amygdala a fázikus félelmi reakciók kiváltásában, míg a BSTL az elhúzódó félelmi válaszokért felelős, amelyek a szorongáshoz hasonló folyamatok részei (Duvarci és mtsai 2009; Phelps és LeDoux 2005; Walker és mtsai 2009; Walker és Davis 2008; Walker és mtsai 2003). Mindkét centralis EA terület, a pallialis amygdala bemeneti jeleinek modalitásától függően, hypothalamikus és agytörzsi központokon keresztül félelmi válaszreakciókat vált ki (Walker és mtsai 2009). A pallialis amygdala bemenetei a stria terminalis rendszerén keresztül az Ac-t is eléri. Így a pálya által egyidejűleg hordozott kontextuális információk érvényre juthatnak a jutalmazási és büntetési válaszok agyi leképzésében, illetve az ezek alapján megjelenő emléknymokban.

7 Következtetések

- Házityúk előagyi kapcsolati rendszerében jelen van az emlős amygdalo-accumbikus pályával homológ kapcsolat. Emlős fajokhoz hasonlóan, a pályát képviselő axonok aszimmetrikus morfológiájú, axospinosus és axodendritikus szinapszissokkal végződnek.
- Patkány és házityúk nucleus accumbensében végződő amygdala eredetű axonterminálisokban L-Asp és L-Glu serkentő aminosavak egyaránt dúsulnak, ami felveti a kotranszmisszió lehetőségét.
- Házityúk ventromedialis előagyi limbikus területeibe az arcopallium meghatározott neuroncsoportjai vetülnek. A kiemelt neuronok régiói az arcopallium perem részein helyezkednek el. Az arcopallium központi része nem tart fenn közvetlen kapcsolatot ezen ventromedialis előagyi területekkel. Feltárt előagyi kapcsolatuk alapján, az arcopallium általunk meghatározott „perem régiói” (jelesül APir, ADo, AHil, APL) az amygdaloid arcopallium részeit képezik.
- Az amygdaloid arcopalliumból kiinduló axonok (amygdalofugalis pályák), két előagyi útvonalon haladnak. Az egyik, az emlős stria terminalisszal homológ pálya, az arcopallium dorsalis határa mentén a vaf útján közelíti meg a ventromedialis előagyi területeket. A másik, az emlős ansa peduncularisszal homológ pálya az arcopallium ventralis részén halad és további basalis előagyi területeken (többek között VP, B, TO) végződik.
- A ventromedialis előagy egymással szomszédos területeiben (BSTL és Ac) az amygdaloid arcopallium neuronjainak végződése egyaránt megjelennek.
- Az amygdaloid arcopallium neuronjai a környező sejtekkel ellentétben nem fejezik ki a calbindin, calretinin és parvalbumin kalciumkötő fehérjéket.
- Az amygdaloid arcopallium területei DARPP-32 szignálfehérjében gazdag régiókkal szomszédosak, azonban sejteik döntő többsége nem expresszálja a DARPP-32-t.

8 Összefoglalás

A pallialis (basolateralis) amygdala ventrobasalis előagyi területekkel fenntartott kapcsolatai biztosítják a félelemmel és szorongással (averzív), illetve a jutalommal és motivációval (appetitív) összefüggő viselkedések alapjait. Ezen kapcsolatok jelentőségét kiemeli az emlős fajoktól eltérő fajokban azonosított közös tulajdonságok megléte. Ennek szándékával jelen munkánkban madár (*Gallus gallus domesticus*) központi idegrendszerében elemeztük az emlősökével homológ területek kapcsolati mintázatát. Összehasonlító elektronmikroszkópos munkánkban anterográd pályakövetés és postembedding L-Aszpartát (Asp) és L-Glutamát (Glu) immunogold módszer együttes alkalmazásával kimutattuk az emlős (*Rattus norvegicus*) amygdalo-accumbens és a homológ madár arcopallio-accumbicus kapcsolatok végződéseinek hasonlóan serkentő voltát. A ventrobasalis előagy arcopalliofugalis bemeneteinek részletes elemzésére fluoreszcens pályajelölést végeztünk. Szimultán kettős fluoreszcens retrográd jelöléssel kimutattuk, hogy a medialis striatum arcopalliofugalis bemenetei ventromedialis területekbe (Ac - nucleus accumbens; BSTL - bed nucleus of the stria terminalis pars lateralis) konvergálnak. Ezen előagyi területekbe fluoreszcens retrográdan jelölő koleratoxin béta alegységet adtunk, amely kijelölte az arcopalliofugalis pálya 'forrás-neuronjait'. A megjelölt sejtek az arcopallium peremén a hátsó, hilaris, dorsalis és dorsolateralis területeken helyezkedtek el. A kiemelt régiók a lateralis és ventralis pallium származékai, hasonlóan az emlős basolateralis amygdala komplexéhez. Eredményeink ellenőrzése céljából a 'forrás-neuronok' területeibe fluoreszcensen jelölt anterográd pályajelölő anyagot adtunk. A dorsolateralis arcopalliumból kiemelten sok axon érte el a célterületeket. Az arcopalliofugalis rostok két útvonalon (valószínűleg az emlős stria terminalisszal, illetve ansa peduncularisszal homológ pályákon) haladtak. A dorsalis pálya az ún. „centralis extended amygdala (EA)”, a BSTL, illetve a nucl. accumbens területein végződött, amelyeket DARPP-32 szignálfehérje jelenlétének immunfluoreszcens azonosítása révén különítettünk el. Az arcopalliofugalis 'forrás-neuronok' további elemzése során kimutattuk, hogy a DARPP-32 szignálfehérjét, calbindint, calretinint és parvalbumint nem expresszáló sejtekről van szó, miközben a környező régiókban és sejtekben kifejeződtek a fenti szignál- és kalciumköti fehérjék.

9 Summary

Ventrobasal forebrain affects fear, anxiety (aversive), reward and motivation (appetitive) related behaviours *via* connections with the pallial (basolateral) amygdala. The importance of these connections is highlighted by their presence and a principally similar pattern in other non-mammal species. We have analysed the connection pattern of the mammalian homologous regions in the avian (*Gallus gallus domesticus*) central nervous system. In a comparative electron microscopic study, with combination of anterograde tracing and postembedding L-Aspartate (Asp) or L-Glutamate (Glu) immunogold labelling methods, we have shown similar excitatory morphology of the terminals in the mammalian (*Rattus norvegicus*) amygdalo-accumbens and avian homologue arcopallio-accumbens pathways. For a detailed analysis of the arcopalliofugal ventrobasal forebrain connection we have conducted a fluorescent tracing approach. We have shown convergent fiber input to ventromedial regions (Ac- nucleus accumbens; BSTL – lateral part of the bed nucleus of the stria terminalis) of ventrobasal forebrain (including the MSt) from arcopallium by simultaneous double fluorescent retrograde tracing. Retrograde tracing with cholera toxin B, injected into these forebrain areas, yielded the 'source-neurons' of the arcopalliofugal pathway. The labelled neurons were located at the marginal zones, including posterior, dorsal, hilar and dorsolateral subdivisions of the arcopallium. These arcopallial regions are derivatives of the lateral and ventral pallium, like the mammalian basolateral (pallial) amygdala. Our results were verified by injections of fluorescent anterograde tracer to source-neuronal regions. The dorsolateral arcopallial region showed the most abundant projections to target areas. Arcopalliofugal fibers followed two routes (the possible avian counterparts of mammalian stria terminalis and ansa peduncularis). Fibers and terminal fields of the dorsal path were detected in the central extended amygdala (EA), BSTL and Ac, which were visualized by fluorescent immunolabelling of DARPP-32 signal protein. Our further examination on arcopalliofugal 'source-neurons' revealed the absence of DARPP-32 signal protein, calbindin, calretinin and parvalbumin expression, whilst neighboring regions and cells expressed these molecules.

10 Irodalomjegyzék

Abellan A, Legaz I, Vernier B, Retaux S, Medina L. (2009) Olfactory and amygdalar structures of the chicken ventral pallium based on the combinatorial expression patterns of LIM and other developmental regulatory genes. *J Comp Neurol*, 516: 166-86.

Absil P, Foidart A, Hemmings HC, Jr., Steinbusch HW, Ball GF, Balthazart J. (2001) Distribution of DARPP-32 immunoreactive structures in the quail brain: anatomical relationship with dopamine and aromatase. *J Chem Neuroanat*, 21: 23-39.

Adam AS, Csillag A. (2006) Differential distribution of L-aspartate- and L-glutamate-immunoreactive structures in the arcopallium and medial striatum of the domestic chick (*Gallus domesticus*). *J Comp Neurol*, 498: 266-76.

Alheid GF. (2003) Extended amygdala and basal forebrain. *Ann N Y Acad Sci*, 985: 185-205.

Alheid GF, Heimer L. (1988) New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience*, 27: 1-39.

Ambroggi F, Ishikawa A, Fields HL, Nicola SM. (2008) Basolateral amygdala neurons facilitate reward-seeking behavior by exciting nucleus accumbens neurons. *Neuron*, 59: 648-61.

Aoki N, Suzuki R, Izawa E, Csillag A, Matsushima T. (2006) Localized lesions of ventral striatum, but not arcopallium, enhanced impulsiveness in choices based on anticipated spatial proximity of food rewards in domestic chicks. *Behav Brain Res*, 168: 1-12.

Atoji Y, Saito S, Wild JM. (2006) Fiber connections of the compact division of the posterior pallial amygdala and lateral part of the bed nucleus of the stria terminalis in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol*, 499: 161-82.

- Balazs D, Csillag A, Gerber G. (2012) L-aspartate effects on single neurons and interactions with glutamate in striatal slice preparation from chicken brain. *Brain Res*, 1474: 1-7.
- Balint E, Csillag A. (2007) Nucleus accumbens subregions: hodological and immunohistochemical study in the domestic chick (*Gallus domesticus*). *Cell Tissue Res*, 327: 221-30.
- Balint E, Mezey S, Csillag A. (2011) Efferent connections of nucleus accumbens subdivisions of the domestic chicken (*Gallus domesticus*): an anterograde pathway tracing study. *J Comp Neurol*, 519: 2922-53.
- Ball GF, Casto JM, Balthazart J. (1995) Autoradiographic localization of D1-like dopamine receptors in the forebrain of male and female Japanese quail and their relationship with immunoreactive tyrosine hydroxylase. *J Chem Neuroanat*, 9: 121-33.
- Basar K, Sesia T, Groenewegen H, Steinbusch HW, Visser-Vandewalle V, Temel Y. (2010) Nucleus accumbens and impulsivity. *Prog Neurobiol*, 92: 533-57.
- Bolam JP. (1992) *Experimental Neuroanatomy - A Practical Approach* (Oxford Univ. Press).
- Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm DS. (1993) The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J Comp Neurol*, 338: 255-78.
- Cornez G, Ter Haar SM, Cornil CA, Balthazart J. (2015) Anatomically discrete sex differences in neuroplasticity in zebra finches as reflected by perineuronal nets. *PLoS One*, 10: e0123199.
- Csillag A, Szekely AD, Stewart MG. (1997) Synaptic terminals immunolabelled against glutamate in the lobus parolfactorius of domestic chicks (*Gallus domesticus*) in relation to afferents from the archistriatum. *Brain Res*, 750: 171-9.

- Davies DC, Csillag A, Szekely AD, Kabai P. (1997) Efferent connections of the domestic chick archistriatum: a phaseolus lectin anterograde tracing study. *J Comp Neurol*, 389: 679-93.
- Defelipe J. (1997) Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat*, 14: 1-19.
- Di Ciano P, Everitt BJ. (2001) Dissociable effects of antagonism of NMDA and AMPA/KA receptors in the nucleus accumbens core and shell on cocaine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology*, 25: 341-60.
- Di Ciano P, Everitt BJ. (2004) Direct interactions between the basolateral amygdala and nucleus accumbens core underlie cocaine-seeking behavior by rats. *J Neurosci*, 24: 7167-73.
- Durstewitz D, Kroner S, Hemmings HC, Jr., Gunturkun O. (1998) The dopaminergic innervation of the pigeon telencephalon: distribution of DARPP-32 and co-occurrence with glutamate decarboxylase and tyrosine hydroxylase. *Neuroscience*, 83: 763-79.
- Duvarci S, Bauer EP, Pare D. (2009) The bed nucleus of the stria terminalis mediates inter-individual variations in anxiety and fear. *J Neurosci*, 29: 10357-61.
- Fernando AB, Murray JE, Milton AL. (2013) The amygdala: securing pleasure and avoiding pain. *Front Behav Neurosci*, 7: 190.
- French SJ, Totterdell S. (2003) Individual nucleus accumbens-projection neurons receive both basolateral amygdala and ventral subicular afferents in rats. *Neuroscience*, 119: 19-31.
- Gati G, Lendvai D, Hokfelt T, Harkany T, Alpar A. (2014) Revival of calcium-binding proteins for neuromorphology: secretogin typifies distinct cell populations in the avian brain. *Brain Behav Evol*, 83: 82-92.
- Girault JA, Barbeito L, Spampinato U, Gozlan H, Glowinski J, Besson MJ. (1986) In vivo release of endogenous amino acids from the rat striatum: further evidence for a role

of glutamate and aspartate in corticostriatal neurotransmission. *J Neurochem*, 47: 98-106.

Groenewegen HJ, Mulder AB, Beijer AVJ, Wright CI, Lopes Da Silva FH, Pennartz CMA. (1999) Hippocampal and amygdaloid interactions in the nucleus accumbens. *Psychobiology*, 27: 149-64.

Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AV. (1996) The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system? *Prog Brain Res*, 107: 485-511.

Guirado S, Davila JC, Real MA, Medina L. (2000) Light and electron microscopic evidence for projections from the thalamic nucleus rotundus to targets in the basal ganglia, the dorsal ventricular ridge, and the amygdaloid complex in a lizard. *J Comp Neurol*, 424: 216-32.

Gundersen V, Chaudhry FA, Bjaalie JG, Fonnum F, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. (1998) Synaptic vesicular localization and exocytosis of L-aspartate in excitatory nerve terminals: a quantitative immunogold analysis in rat hippocampus. *J Neurosci*, 18: 6059-70.

Hanics J, Balint E, Milanovich D, Zachar G, Adam A, Csillag A. (2012) Amygdalofugal axon terminals immunoreactive for L-aspartate or L-glutamate in the nucleus accumbens of rats and domestic chickens: a comparative electron microscopic immunocytochemical study combined with anterograde pathway tracing. *Cell Tissue Res*, 350: 409-23.

Hanics J, Teleki G, Alpar A, Szekely AD, Csillag A. (2016) Multiple amygdaloid divisions of arcopallium send convergent projections to the nucleus accumbens and neighboring subpallial amygdala regions in the domestic chicken: a selective pathway tracing and reconstruction study. *Brain Struct Funct*.

Heimer L, Alheid GF. (1991) Piecing together the puzzle of basal forebrain anatomy. *Adv Exp Med Biol*, 295: 1-42.

Heimer L, Alheid GF, De Olmos JS, Groenewegen HJ, Haber SN, Harlan RE, Zahm DS. (1997) The accumbens: beyond the core-shell dichotomy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 9: 354-81.

Hemmings Jr HC, Walaas SI, Ouimet CC, Greengard P. (1987) Dopaminergic regulation of protein phosphorylation in the striatum: DARPP-32. *Trends in Neurosciences*, 10: 377-83.

Herring BE, Silm K, Edwards RH, Nicoll RA. (2015) Is Aspartate an Excitatory Neurotransmitter? *J Neurosci*, 35: 10168-71.

Hof PR, Glezer, Ii, Conde F, Flagg RA, Rubin MB, Nimchinsky EA, Vogt Weisenhorn DM. (1999) Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *J Chem Neuroanat*, 16: 77-116.

Husband SA, Shimizu T. (2011) Calcium-binding protein distributions and fiber connections of the nucleus accumbens in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol*, 519: 1371-94.

Jarvis ED, Gunturkun O, Bruce L, Csillag A, Karten H, Kuenzel W, Medina L, Paxinos G, Perkel DJ, Shimizu T, Striedter G, Wild JM, Ball GF, Dugas-Ford J, Durand SE, Hough GE, Husband S, Kubikova L, Lee DW, Mello CV, Powers A, Siang C, Smulders TV, Wada K, White SA, Yamamoto K, Yu J, Reiner A, Butler AB. (2005) Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution. *Nat Rev Neurosci*, 6: 151-9.

Johnson LR, Aylward RL, Hussain Z, Totterdell S. (1994) Input from the amygdala to the rat nucleus accumbens: its relationship with tyrosine hydroxylase immunoreactivity and identified neurons. *Neuroscience*, 61: 851-65.

Kelley AE. (1999) Neural integrative activities of nucleus accumbens subregions in relation to learning and motivation. *Psychobiology*, 27: 198-213.

Kozell LB, Meshul CK. (2004) Nerve terminal glutamate immunoreactivity in the rat nucleus accumbens and ventral tegmental area after a short withdrawal from cocaine. *Synapse*, 51: 224-32.

Kuenzel WJ, Masson M. (1988) A stereotaxic atlas of the brain of the chick (*Gallus domesticus*). Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Kuenzel WJ, Medina L, Csillag A, Perkel DJ, Reiner A. (2011) The avian subpallium: new insights into structural and functional subdivisions occupying the lateral subpallial wall and their embryological origins. *Brain Res*, 1424: 67-101.

Lada MW, Vickroy TW, Kennedy RT. (1998) Evidence for neuronal origin and metabotropic receptor-mediated regulation of extracellular glutamate and aspartate in rat striatum in vivo following electrical stimulation of the prefrontal cortex. *J Neurochem*, 70: 617-25.

Lanuza E, Belekhova M, Martinez-Marcos A, Font C, Martinez-Garcia F. (1998) Identification of the reptilian basolateral amygdala: an anatomical investigation of the afferents to the posterior dorsal ventricular ridge of the lizard *Podarcis hispanica*. *Eur J Neurosci*, 10: 3517-34.

Martinez-Garcia F, Martinez-Marcos A, Lanuza E. (2002) The pallial amygdala of amniote vertebrates: evolution of the concept, evolution of the structure. *Brain Res Bull*, 57: 463-9.

Martinez-Garcia F, Novejarque A, Lanuza E. (2008) Two interconnected functional systems in the amygdala of amniote vertebrates. *Brain Res Bull*, 75: 206-13.

Maura G, Carbone R, Raiteri M. (1989) Aspartate-releasing nerve terminals in rat striatum possess D-2 dopamine receptors mediating inhibition of release. *J Pharmacol Exp Ther*, 251: 1142-6.

Mcdonald AJ. (1991) Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. *Neuroscience*, 44: 15-33.

Mcdonald AJ. (1996) Glutamate and aspartate immunoreactive neurons of the rat basolateral amygdala: colocalization of excitatory amino acids and projections to the limbic circuit. *J Comp Neurol*, 365: 367-79.

Medina L, Legaz I, Gonzalez G, De Castro F, Rubenstein JL, Puelles L. (2004) Expression of Dbx1, Neurogenin 2, Semaphorin 5A, Cadherin 8, and Emx1 distinguish ventral and lateral pallial histogenetic divisions in the developing mouse claustramygdaloid complex. *J Comp Neurol*, 474: 504-23.

Miyaji T, Echigo N, Hiasa M, Senoh S, Omote H, Moriyama Y. (2008) Identification of a vesicular aspartate transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 11720-4.

Miyaji T, Omote H, Moriyama Y. (2011) Functional characterization of vesicular excitatory amino acid transport by human sialin. *J Neurochem*, 119: 1-5.

Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY. (1980) From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol*, 14: 69-97.

Moreno N, Gonzalez A. (2006) The common organization of the amygdaloid complex in tetrapods: new concepts based on developmental, hodological and neurochemical data in anuran amphibians. *Prog Neurobiol*, 78: 61-90.

Moreno N, Gonzalez A. (2007) Evolution of the amygdaloid complex in vertebrates, with special reference to the anamnio-amniotic transition. *J Anat*, 211: 151-63.

Morland C, Nordengen K, Larsson M, Prolo LM, Farzampour Z, Reimer RJ, Gundersen V. (2013) Vesicular uptake and exocytosis of L-aspartate is independent of sialin. *Faseb j*, 27: 1264-74.

Naito S, Ueda T. (1985) Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J Neurochem*, 44: 99-109.

Ottersen OP, Zhang N, Walberg F. (1992) Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Neuroscience*, 46: 519-34.

Paxinos G, Watson C. (2005) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press).

Pereno GL, Balaszczuk V, Beltramino CA. (2011) Detection of conspecific pheromones elicits fos expression in GABA and calcium-binding cells of the rat vomeronasal system-medial extended amygdala. *J Physiol Biochem*, 67: 71-85.

Petrovich GD, Risold PY, Swanson LW. (1996) Organization of projections from the basomedial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol*, 374: 387-420.

Pfeiffer CP, Britto LR. (1997) Distribution of calcium-binding proteins in the chick visual system. *Braz J Med Biol Res*, 30: 1315-8.

Phelps EA, Ledoux JE. (2005) Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron*, 48: 175-87.

Phillips RE. (1964) "Wildness" in the mallard duck: effects of brain lesions and stimulation on "escape behavior" and reproduction. *J Comp Neurol*, 122: 139-55.

Phillips RE, Youngren OM. (1986) Unilateral kainic acid lesions reveal dominance of right archistriatum in avian fear behavior. *Brain Res*, 377: 216-20.

Pitkanen A, Kemppainen S. (2002) Comparison of the distribution of calcium-binding proteins and intrinsic connectivity in the lateral nucleus of the rat, monkey, and human amygdala. *Pharmacol Biochem Behav*, 71: 369-77.

Ploog DW. (2003) The place of the Triune Brain in psychiatry. *Physiol Behav*, 79: 487-93.

Puelles L, Kuwana E, Puelles E, Bulfone A, Shimamura K, Keleher J, Smiga S, Rubenstein JL. (2000) Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J Comp Neurol*, 424: 409-38.

Puelles L, Martinez-De-La-Torre M, Paxinos G, Watson C, Martinez S. (2007) The chick brain in stereotaxic coordinates: an atlas correlating avian and mammalian neuroanatomy. Academic Press, San Diego.

Redies C, Medina L, Puelles L. (2001) Cadherin expression by embryonic divisions and derived gray matter structures in the telencephalon of the chicken. *J Comp Neurol*, 438: 253-85.

Reiner A, Perera M, Paullus R, Medina L. (1998) Immunohistochemical localization of DARPP32 in striatal projection neurons and striatal interneurons in pigeons. *J Chem Neuroanat*, 16: 17-33.

Reiner A, Perkel DJ, Bruce LL, Butler AB, Csillag A, Kuenzel W, Medina L, Paxinos G, Shimizu T, Striedter G, Wild M, Ball GF, Durand S, Gunturkun O, Lee DW, Mello CV, Powers A, White SA, Hough G, Kubikova L, Smulders TV, Wada K, Dugas-Ford J, Husband S, Yamamoto K, Yu J, Siang C, Jarvis ED. (2004) Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. *J Comp Neurol*, 473: 377-414.

Roberts TF, Hall WS, Brauth SE. (2002) Organization of the avian basal forebrain: chemical anatomy in the parrot (*Melopsittacus undulatus*). *J Comp Neurol*, 454: 383-408.

Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J. (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev*, 83: 803-34.

Schnabel R, Metzger M, Jiang S, Hemmings HC, Jr., Greengard P, Braun K. (1997) Localization of dopamine D1 receptors and dopaminergic neurons in the chick forebrain. *J Comp Neurol*, 388: 146-68.

Setlow B, Holland PC, Gallagher M. (2002) Disconnection of the basolateral amygdala complex and nucleus accumbens impairs appetitive pavlovian second-order conditioned responses. *Behav Neurosci*, 116: 267-75.

Shinonaga Y, Takada M, Mizuno N. (1994) Topographic organization of collateral projections from the basolateral amygdaloid nucleus to both the prefrontal cortex and nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience*, 58: 389-97.

Smeets WJ, Steinbusch HW. (1990) New insights into the reptilian catecholaminergic systems as revealed by antibodies against the neurotransmitters and their synthetic enzymes. *J Chem Neuroanat*, 3: 25-43.

- Somogyi P, Hodgson AJ. (1985) Antisera to gamma-aminobutyric acid. III. Demonstration of GABA in Golgi-impregnated neurons and in conventional electron microscopic sections of cat striate cortex. *J Histochem Cytochem*, 33: 249-57.
- Steiner H, Tseng K. (2010) *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function* (Elsevier).
- Suarez J, Davila JC, Real MA, Guirado S, Medina L. (2006) Calcium-binding proteins, neuronal nitric oxide synthase, and GABA help to distinguish different pallial areas in the developing and adult chicken. I. Hippocampal formation and hyperpallium. *J Comp Neurol*, 497: 751-71.
- Swanson LW, Petrovich GD. (1998) What is the amygdala? *Trends Neurosci*, 21: 323-31.
- Takahashi Y, Schoenbaum G, Niv Y. (2008) Silencing the critics: understanding the effects of cocaine sensitization on dorsolateral and ventral striatum in the context of an actor/critic model. *Front Neurosci*, 2: 86-99.
- Thomsen MS, Hay-Schmidt A, Hansen HH, Mikkelsen JD. (2010) Distinct neural pathways mediate alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-dependent activation of the forebrain. *Cereb Cortex*, 20: 2092-102.
- Tomassy GS, Morello N, Calcagno E, Giustetto M. (2014) Developmental abnormalities of cortical interneurons precede symptoms onset in a mouse model of Rett syndrome. *J Neurochem*, 131: 115-27.
- Vicario A, Abellan A, Desfilis E, Medina L. (2014) Genetic identification of the central nucleus and other components of the central extended amygdala in chicken during development. *Front Neuroanat*, 8: 90.
- Vicario A, Abellan A, Medina L. (2015) Embryonic Origin of the Islet1 and Pax6 Neurons of the Chicken Central Extended Amygdala Using Cell Migration Assays and Relation to Different Neuropeptide-Containing Cells. *Brain Behav Evol*, 85: 139-69.

Walker DL, Davis M. (2008) Role of the extended amygdala in short-duration versus sustained fear: a tribute to Dr. Lennart Heimer. *Brain Struct Funct*, 213: 29-42.

Walker DL, Miles LA, Davis M. (2009) Selective participation of the bed nucleus of the stria terminalis and CRF in sustained anxiety-like versus phasic fear-like responses. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 33: 1291-308.

Walker DL, Toufexis DJ, Davis M. (2003) Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *Eur J Pharmacol*, 463: 199-216.

Weiskrantz L. (1956) Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *J Comp Physiol Psychol*, 49: 381-91.

Yamamoto Y, Lee D, Kim Y, Lee B, Seo C, Kawasaki H, Kuroda S, Tanaka-Yamamoto K. (2012) Raf kinase inhibitory protein is required for cerebellar long-term synaptic depression by mediating PKC-dependent MAPK activation. *J Neurosci*, 32: 14254-64.

Zachar G, Wagner Z, Tabi T, Balint E, Szoko E, Csillag A. (2012) Differential changes of extracellular aspartate and glutamate in the striatum of domestic chicken evoked by high potassium or distress: an in vivo microdialysis study. *Neurochem Res*.

Zeier H, Karten HJ. (1971) The archistriatum of the pigeon: organization of afferent and efferent connections. *Brain Res*, 31: 313-26.

Zorrilla EP, Koob GF. (2013) Amygdalostriatal projections in the neurocircuitry for motivation: a neuroanatomical thread through the career of Ann Kelley. *Neurosci Biobehav Rev*, 37: 1932-45.

11 Saját publikációk jegyzéke

11.1 A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények:

Hanics J, Balint E, Milanovich D, Zachar G, Adam A, Csillag A. (2012) Amygdalofugal axon terminals immunoreactive for L-aspartate or L-glutamate in the nucleus accumbens of rats and domestic chickens: a comparative electron microscopic immunocytochemical study combined with anterograde pathway tracing. *Cell Tissue Res*, 350: 409-23.

Hanics J, Teleki G, Alpar A, Szekely AD, Csillag A. (2016) Multiple amygdaloid divisions of arcopallium send convergent projections to the nucleus accumbens and neighboring subpallial amygdala regions in the domestic chicken. A selective pathway tracing and reconstruction study. *Brain Struct Funct*, DOI 10.1007/s00429-016-1219-8.

11.2 Egyéb saját közlemények:

Hanics J, Barna J, Xiao J, Millan JL, Fonta C, Negyessy L. (2012) Ablation of TNAP function compromises myelination and synaptogenesis in the mouse brain. *Cell Tissue Res*, 349: 459-71.

Alpar A, Tortoriello G, Calvigioni D, Niphakis MJ, Milenkovic I, Bakker J, Cameron GA, **Hanics J**, Morris CV, Fuzik J, Kovacs GG, Cravatt BF, Parnavelas JG, Andrews WD, Hurd YL, Keimpema E, Harkany T. (2014) Endocannabinoids modulate cortical development by configuring Slit2/Robo1 signalling. *Nat Commun*, 5: 4421.

Bullmann T, Seeger G, Stieler J, **Hanics J**, Reimann K, Kretschmann TP, Hilbrich I, Holzer M, Alpar A, Arendt T. (2016) Tau phosphorylation-associated spine regression does not impair hippocampal-dependent memory in hibernating golden hamsters. *Hippocampus*, 26: 301-18.

12 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Csillag András Professzor Úrnak emberi és szakmai támogatását, iránymutatásait!

Hálával tartozom Dr. Alpár Alánnak, aki nélkül nem értem volna el ezt a mérföldkövet!

Köszönettel tartozom Dr. Székely Andreának és Dr. Altdorfer Károlynak, akikhez mindig bátran fordulhattam bármilyen nehézségért!

Köszönöm Dr. Gerber Gábor Igazgató Úrnak emberi és szakmai támogatását!

Köszönettel tartozom az Összehasonlító neurohisztológiai és neurocitokémiai laboratórium munkatársainak: Dr. Ádám Ágotának, Dr. Bálint Eszternek, Dr. Mezey Szilviának, Dr. Montagnese Catherinének, Nyámándi Piroskának, Dr. Zachar Gergelynek, Teleki Gyöngyinek, Dr. Milanovich Dánielnek!

Köszönettel tartozom a Kísérletes neuroanatómiai és fejlődésbiológiai csoport munkatársainak: Németh Andreának, Dr. Lendvai Dávidnak, Hevesi Zsófiának!

Köszönettel tartozom a Deák Szilviának és Gróti Zoltánnak!

Köszönettel tartozom az Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet minden csoportjának és munkatársának!

Köszönöm családomnak, hogy mindig mellettem állnak!

Szász Istvánné Marcsi emléke előtt tisztelgem!