

A ventromedialis előagy amygdaloid bemeneteinek vizsgálata házityúk korai életszakaszában

Doktori tézisek

dr. Hanics János

**Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományok Doktori Iskola**



Témavezető:

Dr. Csillag András, az MTA doktora,
egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Kozák Lajos Rudolf, Ph.D.,
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**

BEVEZETÉS

Az emlősök és madarak több mint 200 millió éves különutas fejlődése ellenére, telencephalicus területeikben, a basalis ganglionok szintjén magas fokú hasonlóság mutatkozik. A házityúk ivadécai (fészekhagyó fajként) kifejlett idegrendszerük révén kiváló alanyai a korai adaptív tanulással (appetitív és averzív) és motivációval kapcsolatos viselkedési modelleknek. Az idegrendszerük tanulmányozásával lehetővé válik az emlősökben is alapvető, tanulással kapcsolatos folyamatok megértése.

A nucleus accumbens (Ac), a bed nucleus of stria terminalis pars lateralis (BSTL), és a kiterjesztett (extended) amygdala (EA) további komponensei, mint a ventrobasalis előagy magcsoportjai, kiemelt szerepet játszanak a jutalmazás és büntetés érzelmi kontextusaival kapcsolatos viselkedési válaszok szabályozásában. Ezek a régiók erősen kapcsolódnak az amygdala komplexével, amely a viselkedések emocionális komponenseit meghatározó területként ismert. Az ezzel kapcsolatos kutatások nagy része az emlős fajokra koncentrál. Munkánk során azonban házityúk ventrobasalis előagyi területén található, hasonló szerepű rendszerének feltárását tűztük ki célként.

A madár ventrobasalis előagyi területeinek (EA, BSTL, Ac és az MSt – medialis striatum) bemenő idegi kapcsolatai többek között az arcopalliumból származnak, amelynek nagy részét a madár amygdalaként tartják számon. Ennek megfelelően, a madár arcopallio-striatalis (MSt, Ac) projekció az emlős amygdalo-striatalis (amygdalo-accumbens) kapcsolatnak felel meg. Korábbi munkákban megfigyelték, hogy az arcopallium felől érkező afferensek aszimmetrikus axospinosus szinapszissal végződnek az MSt területén, hasonlóan az emlősök rendszeréhez. Azonban a szinapszissok L-Glutamát tartamát vizsgálva, azok serkentő morfológiája ellenére nem mindig mutattak pozitivitást, ezért az arcopallium felől érkező afferensek egy részénél egy másik serkentő neurotranszmitter jelenlétét feltételezték. Az MSt régióban végzett elektronmikroszkópos immuncitokémiai vizsgálatok az L-Aszpartát (Asp) és L-Glutamát (Glu) együttes jelenlétét igazolták a serkentő axodendritikus és axospinosus axonvégzésekben, ezek forrása azonban feltáratlan maradt. Ennek folytatásaként, jelen munkánkban pályajelölés valamint fénymikroszkópos és ultrastrukturális immuncitokémia együttes alkalmazásával az arcopallium forrás-régióiból érkező bemenetek pontosabb kémiai természetét vizsgáltuk meg. A ventrobasalis előagy területeinek (Ac, EA, BSTL) arcopallialis bemeneteit biztosító forrás-régiók ('amygdaloid arcopallium') pontosabb feltérképezése

céljából in vivo fluoreszcens anterográd és retrográd pályajelöléssel kombinált immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk.

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.

MÓDSZEREK

Kísérleti állatok

A ventromedialis előagy elektronmikroszkópos vizsgálataihoz huszonöt, különböző nemű csirkét (*házityúk* - *Gallus gallus domesticus*, *Hunnia broiler*) és harminckét hím albínó patkányt (*Wistar* CrI-S.NET Wi Br) vontunk be. Az arcopalliofugalis pálya pontosabb feltérképezése kapcsán végzett vizsgálatainkhoz további harminc csirkét használtunk fel.

Műtétek

Altatás. A műtéti altatást intramuszkulárisan adott ketamin és xylazin keverékével végeztük.

Sztereotaxiás beadási műtéteket Kopf sztereotaxiás készülékben végeztük, amelyhez Kopf mikroinjekciós egységet csatlakoztattunk és az egységbe 1 μ l ösztérfogató (0,01 μ l beosztású, egyenes tűvéggel és 0,45 mm külső tűátmérővel rendelkező) Hamilton fecskendőt illesztettünk.

Anterográd pályakövetés (BDA és HRP). Csirkékben az unilaterálisan célzott terület a dorsalis arcopallium [ADo] volt. Meghatározott koordinátái a csőrbe fogó 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 anterográd pályakövetést biztosító, 10 kDa molekulatömegű biotinilált dextrán amint (BDA) injektáltunk. Patkányokban az unilaterálisan célzott terület a basolateralis amygdala [BLA] volt. Meghatározott koordinátái a felső állkapocs 3,5 mm-es sülyesztett 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, a másik csoport tormaperoxidázt (HRP - horseradish peroxidase) kapott.

Fluoreszcens retrográd pályakövetés csirkében. Állatonként unilaterálisan, kettős vagy szimpla beadások történtek. Két különböző, közvetlenül fluoreszcensen jelölt retrográd pályajelölő anyagot, Alexa Fluor® 488 (vagy 594) konjugált koleratoxin béta alegységet (CTb), illetve Fast Blue-t (FB) injektáltunk a ventromedialis előagy területeibe (BSTL-Ac-MSt). A kettős beadások során CTb-t adtunk első lépésben a BSTL-Ac régióiba. A terület általunk meghatározott koordinátái (a csőrbe fogó 10,0 mm-es sülyesztett 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 laterálisabb területbe (medialis striatum – MSt

területére) az előző koordináták AP és DV irányú értékeinek megőrzésével. A szimpla CTb beadásokat a BSTL-Ac koordinátáknak megfelelően végeztük.

Fluoreszcens anterográd pályakövetés csirkékben. Az állatoknak anterográd pályakövetést biztosító Alexa Fluor® 594 konjugált 10 kDa molekulásúlyú dextrans (D594) injektáltunk az arcopallium dorsolateralis (APir), dorsalis (ADo) és hilaris (AHil) területeibe. A területek meghatározott koordinátái (a csőrbefogó 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.

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 órás túlélés után mély altatásban transzkardiális perfúziót végeztünk. Az agyakat egy éjszakán át 4°C-on utófixáltuk. Ezt követően 70 µm vastag coronalis metszeteket készítettünk.

Fluoreszcens tracers pályakövetések kísérleti állatainak perfúziója retrográd pályakövetésnél 4 napos, anterográd pályakövetésnél 7 napos túlélést követően történt meg. Az eltávolított agyakat 4 °C-on 2 napos (krioprotektív) kezelésnek vetettük alá. Ezután 70 µm vastagságú coronalis sorozatmetszeteket készítettünk.

A metszetek feldolgozása, immunhisztokémia

BDA és HRP tracerek előhívása. A BDA tartalmú metszeteket HRP-konjugált avidin-biotin komplex (ABC) oldatával kezeltük. Az ABC kezelt és tracerként HRP-t tartalmazó metszeteket (FM és TEM vizsgálatot is lehetővé tévő kromogén és elektronenz csapadékot adó) HRP enzimreakciónak vetettük alá. Szubsztrátként a 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid pufferelt oldatát (DAB) használtuk. *A fénymikroszkópos (FM) vizsgálatra* szánt metszeteket zselatinnal bevont tárgylemezre vettük fel, és száradás után DePeX anyaggal lefedtük.

A transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálatra kiválasztott mintákat (ventralis striatum/nucleus accumbens régiókat tartalmazóan) OsO₄ fixálás követően Durcupan műgyantába ágyaztuk. Ultramikrotómmal ultravékony metszeteket készítettünk, amelyeket Formvar-hordozóhátrtyás nikkell rácstra (grid) vettünk fel.

Postembedding EM immuncitokémia. Az elektronmikroszkópos mintaelőkészítés folyamatát L-Glutamát vagy L-Aszpartát elleni postembedding immunfestéssel egészítettük ki, amelyet kolloidális arannyal jelöltünk. Utókontrasztot követően a mintákat JEOL 100S elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

Többszörös fluoreszcens jelölések. A fluoreszcens pályajelölő anyagokat tartalmazó metszeteket DARPP-32, calbindin, calretinin és parvalbumin immunfestéseknek vetettük alá. A fluoreszcens detektáláshoz, faj-specifikus, számban termelt, (karbocianid) Cy2 vagy Cy5 jelzett szekunder antitesteket használtunk. A metszeteket zselatinnal bevont tárgylemezre húztuk, majd üveg fedőlemezzel fedtük le Surgipath Micromount lefedőszert használva.

Képkötés és képfeldolgozás

Fénymikroszkópos és epifluoreszcens képeinket digitális kamera rendszerrel ellátott epifluoreszcens mikroszkóppal készítettük. 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 (a rostokat már jól prezentáló) mozaikfelvétel csomagot készítettünk. A félteke minden harmadik (sorozatban gyűjtött, 70 µm vastagságú) metszetről készült mozaikfelvétel-csomag. A mozaikokat számítógépes képrekezelő programmal illesztettük össze. Rostro-caudalisan így 25 db metszet feldolgozására került sor.

A többszörös fluoreszcens jelet tartalmazó metszeteket Zeiss 780LSM típusú lézerkonfokális pásztázó mikroszkóp képfeldolgozó rendszerével vizsgáltuk. 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 (0,7-0,9µm) mellett készítettük.

EREDMÉNYEK

Az arcopallium medialis striatumra vetülő neuronjainak serkentő jellege.

Az emlős agyban már jól ismert amygdalo-accumbicus axonpályának megfelelő madáragyi kapcsolatokat vizsgáltuk. A kísérletek módszertani megerősítésére és az összehasonlítást biztosítandó, a homológ patkányági kapcsolat vizsgálatára is sor került. Patkányok basolateralis amygdala magjába, illetve csirkék feltételezett „amygdaloid” arcopallium részébe (dorsalis arcopallium) közvetett detektálást biztosító pályakövető anyagot (tracer) injektáltunk. Az injekciókat követő anterográdfeltöltődés következtében mindkét faj ventromedialis előagyi területein tracer tartalmú rostokat észleltünk.

Patkányokban a ventromedialis előagyon belül a nucleus accumbens (Ac) core alegységében (AcC) koncentrálódtak a tracer pozitív rostok.

A patkány adatokkal megegyezően a csirke ventromedialis előagyi területein (az AcC-t is magába foglalóan) is azonosítottunk tracer pozitív rostokat. 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 elektronenz konverziója, a szövetek postembedding L-Aszpartát (Asp) és L-Glutamát (Glu) immunfestése, illetve az immunfestések detektálását lehetővé tévő immunogold (aranyzemcsékkel konjugált szekunder ellenanyag) jelölés előzte meg. A serkentő neurotranszmitterként is számon tartott aminosavak (Asp, Glu) metabolikus jelentőségüknél fogva a vizsgált szövet számos ultrastrukturális elemében előfordultak, ezért szöveten belüli specifikus eloszlásuk (különösen pedig a terminálisokban való dúsulásuk) kvantitatív elemzést igényelt.

Csirkék AcC mintáiban megfigyelhető volt az Asp és Glu jelenléte egyéb nem tracerrel jelzett aszimmetrikus szinapsziszokat (Gray I) képező axon terminálisokban is, függetlenül azok eredetétől.

Az arcopallium területéről származó (tracert tartalmazó) axonterminalisok a területre általánosan jellemző axospinosus vagy axodendritikus végződésel és aszimmetrikus szinaptikus kapcsolatokkal rendelkeztek.

A postembedding szimpla immunfestések az esetek többségében Asp vagy Glu jelenlétét igazolták az arcopalliumból eredő axonvégződések felett.

Patkány AcC mintákon csirkéhez hasonló morfológiájú tracer-jelölt amygdalofugalis axonvégződéseket detektáltunk. Ezek axospinosus vagy

axodendritikus végződést mutattak és nagy sűrűségben tömörült, kis méretű, homogén vezikulákat tartalmazó axonterminálisai aszimmetrikus szinapsziszokat képeztek.

Patkányban a tracer jelölt rostvégzódések között az egyértelműen Asp-al jelöltek száma tendenciájában alacsonyabb volt, mint a Glu tartalmú amygdalofugalis axonvégzódések száma.

A medialis striatum bemeneteinek eltérő mintázata.

Ahhoz, hogy csirkében pontosabban azonosítani tudjuk azon neuroncsoportokat ("amygdaloid arcopallium"), amelyek a ventromedialis előagy bemeneteit biztosítják az arcopallium irányából, kialakítva ezáltal az amygdalo-subpallialis (beleértve az amygdalostriatalis) pályát, szimultán kettős retrográd pályajelölést végeztünk. Két különböző, közvetlenül fluoreszcensen jelölő, retrográd pályakövető anyagot, CTb-t, illetve FB-t unilaterálisan injektáltunk a medialis striatum (MSt) medialis és ennek közvetlen szomszédságában elhelyezkedő laterálisabb alegységébe. Ezt követően mindkét oldali arcopalliumot megvizsgáltuk mindkét pályakövető anyaggal kapcsolatban. A beadásokkal ellentétes oldalon nem detektáltunk retrográdan jelzett sejteket. Az ipsilaterális arcopalliumot teljes rostrocaudalis kiterjedésében elemezve, annak perem részein figyeltünk meg jelentős CTb visszatöltődéseket. Különösen nagy sűrűségben találtunk jelölt perikaryonokat az arcopallium dorsolaterális részén, illetve caudalis irányban egy ventral felé is kiterjedő területen. Az ezzel egyidőben alkalmazott, laterálisabb MSt területet megcélzó FB beadás nem, vagy elenyésző mértékű visszatöltődést eredményezett a teljes ipsilaterális arcopalliumon belül.

Eltérően az arcopalliumban leírt mintázattól, a szintén ventromedialis előagyi bemenetet adó dorsalis thalamicus területeket vizsgálva (az előzőkkel azonos egyedekben), mindkét jelölő anyaggal közel azonos erősségű visszatöltődés mutatkozott ipsilaterálisan. Miközben a CTb-jelölt perikaryonok a medialisabb nucleus dorsomedialis anterior thalami, addig az FB-jelölt perikaryonok az ettől laterálisabban elhelyezkedő nucleus medialis dorsolaterális thalami területén dúsultak, kevés átfedéssel a régiók között.

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

A madár amygdalofugalis pálya és eredéseinek meghatározása ventromedialis előági végződésein keresztül.

A pálya feltételezett végződési területeibe, azaz a ventromedialis előági területekbe (BSTL, Ac, MSt) retrográd jelölés céljából CTb-t adtunk. Számos visszatöltődött axon jelent meg egy jól behatárolható struktúrában a ventralis amygdalofugalis (vaf) kötegben. Kiemelkedően sok CTb-jelölt perikaryont figyeltünk meg az arcopallium egy dorsolateralis ék alakú területén, amelyet amygdalopiriform area-ként (APir) azonosítottunk. 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. Különös figyelmet érdemel a csekély számú vagy teljesen hiányzó visszatöltődő perikaryon az arcopallium amygdalo-hippocampalis (AHi), taenialis (ATn) és legfőképpen a core (ACo) részében. A beadásokhoz közelebbi rostralis agyterületeket vizsgálva az extended amygdala (EA) régiói mutattak jelentősebb számú retrográdan jelölt sejtet.

A pálya retrográd vizsgálatából kapott eredményeink megerősítése céljából, továbbá a rostralisabb területek előzőekben okozott elfedettsége miatt (ld. retrográd injekciók helyét), vizsgálatunkat anterográd pályakövetést biztosító 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. Anterográd beadásaink igazolták a pálya alkotásában részt vevő rostok sűrű jelenlétét a vaf és a BSTL területén, az ipsilateralis féltekében. 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. Az így készült szeletek elemzésével megmutattuk, hogy az APir-ből kiinduló D594 pozitív axonok két fő útvonalat követnek dorsalisán és ventralisan.

A nucleus accumbens eléré arcopallialis bemenetek kapcsolati sűrűségüket tekintve különböznek.

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. A pályakövetési módszer korlátait ismerve, csupán kvalitatív becslésbe bocsátkoztunk. A beadások eredményeként megjelölt rostok a korábbi retrográd beadási helyek pontosságát is

megegerősítették. 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 egymás mellé rendeztük, biztosítva azok kvalitatív összehasonlíthatóságát. Az APir területének D594 beadásai sűrű rosthálózatot mutattak az Ac mindhárom szintjében. Ettől eltérően, az ADo és az AHil területeket érintő beadásaink jóval kisebb rostsűrűséget eredményeztek a cél régióban. 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.

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

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 különbsőségre utal az adott neuronok és az általuk benépesített agyterületek szempontjából. Azt feltételeztük, hogy a régiók által mutatott molekuláris különbség azok arcopallialis bemeneteiben is tükröződhet. Ennek igazolására DARPP-32 immunhisztokémiával kombinált anterográdfolyakövetési kísérletet végeztünk. Az arcopallium APir területére (mint legjelentősebb projekciósneuron-forrás) D594-t injektáltunk. A projekciós jeleket tartalmazó ventromedialis juxtaventricularis előagy területek (a BSTL-t és Ac-t beleértve) sorozatmetszetein, DARPP-32 elleni immunhisztokémiát végeztünk. A DARPP-32 immunreakció jól elkülönítette a ventromedialis előagy medialis és lateralis területeit a rostralis sorozatmetszetek szintjében. Az arcopallialis axonok többsége a DARPP-32 negatív régióban végződött, amely álláspontunk szerint itt a BSTL területének felel meg. 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.

A jóval caudalisabb, Ac területeket már elhagyó metszet-szintekben nagy mennyiségű axonvégződést észleltünk a BSTL területén. Szintén jelentős számú jelölt axon mutatkozott az „extended amygdala” (EA), ventralis pallidum (VP) és a Meynert-féle nucleus basalis (B) területeiben.

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 visszatöltődést mutattak az arcopallialis forrásneuronok megjelölésével. Így az arcopallium azon régiói is jól kirajzolódtak, melyek egy DARPP-32 jelben szegény terület peremén helyezkedtek el, a DARPP-32 immunpozitív területek közvetlen szomszédjaiként. Azaz az arcopallium jelentős központi területét is beleértve, néhány szórványosan fellelhető sejtől eltekintve, hiányzott a DARPP-32 fehérje. Következésképpen azonosítottunk egy olyan pályát, amely kiindulásában és végződésében jelentős számában a DARPP-32 fehérje jelátviteli útját nélkülözve funkcionál.

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 módszernek mutatkoztak a klasszikus kalciumkötő fehérjék - a parvalbumin, calbindin és calretinin. A teljes arcopallialis neuronpopuláció figyelembe vételével, a calretinin-pozitív neuronok jelenléte szórványosnak bizonyult, míg parvalbumin és calbindin esetében jelentősebb számú pozitivitás volt megfigyelhető az arcopallium területein. A forrás-neuronok retrográd pályajelölését a vizsgált kalciumkötő fehérjék elleni immunfestéssel kombinálva, kimutattuk, hogy az arcopallium ventromedialis előagyba vetítő neuronjaiban nem fejeződnek ki a calretinin, parvalbumin és calbindin fehérjék.

KÖVETKEZTETÉSEK

- Házityúk előági kapcsolati rendszerében jelen van az emlős amygdalo-accumbikus pályával homológ kapcsolat. Emlős fajokhoz hasonlóan, a pályát képviselő axonok aszimmetrikus morfológiájú, axospinosus és axodendritikus szinapszissal 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 előági 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 előági területekkel. Feltárt előági 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 előági útvonalon haladnak. Az egyik, az emlős stria terminalisszal homológ pálya, az arcopallium dorsalis határa mentén a vaf útján közelíti meg a ventromedialis előági területeket. A másik, az emlős ansa peduncularisszal homológ pálya az arcopallium ventralis részén halad és további basalis előági 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 sejtheik döntő többsége nem expresszálja a DARPP-32-t.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

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.

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.