

XXXII. OTDK Biológia Szekció

A median raphe sejtjeinek glutamaterg természete, a szerotonerg rendszer új nézőpontból

Szerző: Mayer Márton

Biológia Alapszak III. évfolyam

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar

MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

Témavezető: Dr. Nyiri Gábor

MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

2014

Rövid összefoglaló

A median raphe sejtjeinek glutamaterg természete, a szerotonerg rendszer új nézőpontból

Szerző: Mayer Márton, Témavezető: Dr. Nyiri Gábor

Az előagyi neuronhálózatok modulációjában fontosak a szubkortikális monoaminerg pályarendszerek, így a középagyi median raphe régióból (MRR) felszálló szerotonerg rendszer is. Nemrégiben kiderült, hogy a MRR, a tónusos szerotonerg szabályozáson túl, az általa beidegzett hippokampális interneuronokra képes olyan 3-mas típusú vezikuláris glutamát transzportert (vGluT3) tartalmazó terminálisokkal szinaptizálni, melyek gyors glutamaterg jelátvitellel serkenthetik ezeket a GABAerg sejteket. Munkánkban azt vizsgáltuk, hogy ez a glutamaterg jelátvitel valójában mennyire jellemző az egér MRR-jának idegsejtjeire és előagyi kapcsolataira – a szerotonerg kapcsolatok mellett.

Először, fluoreszcens immunhisztokémiai kísérletekben megjelöltük a MRR-ban található szerotonin és/vagy vGluT3 tartalmú sejtpopulációt, majd azok konfokális mikroszkópos megfigyelésével és sztereológiai módszerekkel azt találtuk, hogy e neuronoknak legalább mintegy kétharmada valójában vGluT3-pozitív glutamaterg sejt. Ez után retrográd pályajelölés segítségével megmutattuk, hogy a MRR hippokampuszba, mediális septumba vagy mediális prefrontális kéregbe vetítő sejtjeinek legalább mintegy 80, 60 és 70%-a glutamaterg. Végül kettős retrográd pályajelölés segítségével megállapítottuk, hogy a MRR-ban található számos olyan neuron, melyek egyidejűleg vetítenek a hippokampuszba és a mediális prefrontális kéregbe, ezeknek is mintegy 90%-a glutamaterg sejt. Hasonlóan, a mediális septumba és a mediális prefrontális kéregbe egyidejűleg vetítő neuronok 80%-a szintén glutamaterg.

Eredményeink rámutatnak arra, hogy bár a MRR sejtjeire valóban jellemző a szerotonin tartalom, mégis – azok nagy részének kettős pozitivitása mellett – a legtöbbjük glutamaterg vetítősejt. Ezen neuronok egy része ráadásul egyidejűleg több előagyi területre is képes vetíteni, így a mag szerepet játszhat e területek gyors és hatékony szinkronizálásában. Eredményeink az eddig lassú, tónusos szabályzónak gondolt MRR-ról új képet festenek, mely sokat segíthet a MRR valódi funkciójának megértésében.

Abstract

The glutamatergic nature of neurons of the median raphe, a new aspect of the serotonergic system

Author: Márton Mayer, **Supervisor:** Dr. Gábor Nyiri

Subcortical monoaminergic pathways, like that originating from the serotonergic median raphe region (MRR), are fundamental for the modulation of forebrain neuronal networks. However, our workgroup showed recently that, beyond this serotonergic modulation, the vesicular glutamate transporter type 3 (vGluT3)-containing cells of the MRR can establish fast glutamatergic excitatory synapses on hippocampal GABAergic interneurons. We examined, whether this type of glutamatergic neurotransmission is typical in the forebrain connections of the MRR in the mouse brain.

First, using design-based stereological methods and fluorescent immunohistochemistry together with confocal microscopy, we labelled the serotonergic and/or vGluT3 positive cells of the MRR and we found that about two-thirds of the neurons are vGluT3 positive glutamatergic cells. Then, using retrograde tracing, we showed that about 80, 60 and 70% of the MRR cells projecting to the hippocampus, medial septum and medial prefrontal cortex are glutamatergic, respectively. Finally, using double retrograde tracing, we showed that there are several neurons in the MRR that innervate both the hippocampus and the medial prefrontal cortex simultaneously and about 90% of them are glutamatergic. In addition, about 80% of the cells projecting both to the medial septum and the medial prefrontal cortex are also glutamatergic.

Our results show that although the serotonin content of MRR cells is indeed typical, nevertheless, besides many of the cells being doubled positive, the vast majority of these neurons are glutamatergic projecting cells. Furthermore, because these cells can innervate more brain areas simultaneously, the MRR can precisely synchronize these brain areas. While the MRR was previously thought to be a tonic modulatory serotonergic nucleus, these observations put this nucleus into a new perspective and can help us to understand its real functions.

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS

A monoaminok szerepe az agy normál és kóros működésében

A MRR funkcionális anatómiája

A szerotonerg rendszer és a raphe magok

A dorsal raphe és a MRR elkülönítése

A MRR felszálló pályarendszere

A MRR glutamaterg sejtjei

A hippocampusz

A hippocampális formáció neuroanatómiája

A hippocampális formáció funkciója

A mediális szeptum

A mediális szeptum neuroanatómiája

A mediális szeptum funkciója

A mediális prefrontális kéreg

A mediális prefrontális kéreg neuroanatómiája

A mediális prefrontális kéreg funkciója

A hippocampusz, a mediális szeptum és a mediális prefrontális kéreg közti kapcsolatok

CÉLKITŰZÉSEK, KÉRDÉSFELVETÉSEK

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Állatok és perfúzió

Antitestek

Immunfluoreszcens festés

Sztereológiai mérés

Sztereotaxiás műtétek

Retrográd pályajelölés kiértékelése

EREDMÉNYEK

A különböző típusú vetítő idegsejtek száma és egymáshoz viszonyított aránya a MRR-ban

A MRR-ban található, különböző célterületekre vetítő idegsejtek szerotonerg és glutamaterg természete

A MRR-ban található idegsejtek egyidejűleg vetíthetnek a hippocampuszba és a mediális prefrontális kéregbe

A MRR-ban található idegsejtek egyidejűleg vetíthetnek a mediális szeptumba és a mediális prefrontális kéregbe

MEGBESZÉLÉS ÉS ÖSSZEFOGLALÁS

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

IRODALOMJEGYZÉK

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

BEVEZETÉS

Dolgozatomban a median raphe régió (a továbbiakban MRR) sejtjeinek előagyi kapcsolataival foglalkozom. Először átfogóan ismertetem a monoaminok, illetve a szerotonerg rendszer szerepét az agy működésében, majd áttekintést nyújtok az egyik legfőbb szerotonerg mag, a MRR szerkezetéről és funkciójáról. Ezt követően összefoglalom a MRR három általunk vizsgált célterületének, a hippocampusznak, a mediális szeptumnak és a mediális prefrontális kéregnek a funkcióját és anatómiai felépítését, valamint röviden bemutatom, hogyan kapcsolódnak egymással ezek a területek. Mivel vizsgálatainkat egereken végeztük el, ezek a fejezetek elsősorban az egér-, illetve a patkányagy sajátosságait emelik ki. Emellett azonban kitérek az egyes pályarendszerek és területek szerepére az emberi agyban is, annak normál és kóros működésében egyaránt. Ezt követően a módszertani áttekintés után ismertetem az eredményeinket, végül a megbeszélésben áttekintem azok jelentőségét.

A monoaminok szerepe az agy normál és kóros működésében

A kérgi hálózatok szabályozásában igen fontos szerepet töltenek be a különböző agytörzsi monoaminerg magcsoportok. Az ezekből kiinduló pályarendszerek diffúzan idegzik be az agykérget és egy lassú, tónusos modulációt biztosítanak. Az ún. „triaminerg” reguláció elsősorban szerotonin (5-HT), dopamin és noradrenalin parakrin szekrécióján keresztül valósul meg, melyek főként másodlagos hírvivőket aktiváló metabotróp receptorokhoz kötődnek. Régóta ismert, hogy a monoaminerg rendszerek nélkülözhetetlenek több magas szintű agyi funkció normális működéséhez, hiszen befolyásolják a tanulási és memóriafolyamatokat, az alvás-ébrenlét ciklust, valamint kihatással vannak a hangulati életre, érzelmekre. Jól ismert az is, hogy ennél fogva szoros kapcsolatban állnak több különböző neuropszichiátriai betegséggel, úgy mint az affektív kórképek – depresszió, szorongás, pánikbetegségek – vagy a skizofrénia egyes elemei. Ezen kórképek kialakulásához részben a három említett monoamin szintjének és arányának kóros változása vezet, így a különböző gyógyszer-hatóanyagok is elsősorban ezt befolyásolják. Különösen fontos kiemelni a szerotonerg rendszert. Az affektív kórképek jelenleg is egyik leghatékonyabb terápiáját a szerotonin szintjére ható gyógyszerek jelentik, melyek képesek valamilyen módon szabályozni, megváltoztatni a szerotonerg jelátvitelt; ezek közül is a legfontosabbak a szelektív szerotonin-visszavételt gátló vegyületek (SSRI-k).

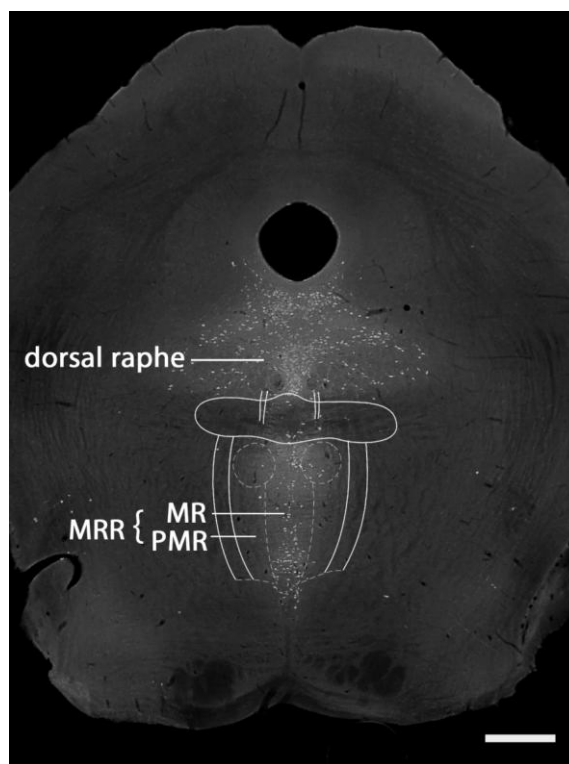
A MRR funkcionális anatómiája

A szerotonerg rendszer és a raphe magok

A szerotonerg rendszer igen kiterjedt, a teljes központi idegrendszert behálózó pályarendszerrel rendelkezik, mely az agytörzs középvonalában elhelyezkedő szerotonintartalmú idegsejt csoportokból indul ki. Kilenc ilyen sejtcsoportot különböztetnek meg: B1-9 (Dahlström & Fuxe 1964). Ezek nagyrészt, bár nem teljes egészében, a raphe magokban találhatók, ugyanakkor a raphe magcsoport sem kizárólag szerotonintartalmú sejtekből áll. Megkülönböztetünk fel- és leszálló szerotonerg pályarendszert. Utóbbit a kaudálisabban elhelyezkedő B1-4 csoportok alkotják, melyek részben a raphe magnus, raphe obscurus és raphe pallidus magokban találhatók és az agytörzsbe, gerincvelőbe vetítenek (Vertes *et al.* 1999), fontos szerepet betöltve a fájdalomérzékelésben (Zhao *et al.* 2007). A B5-9 sejtcsoportokból indul ki a felszálló, előagyi szerotonerg pályarendszer, melynek legnagyobb része a B8 csoportot tartalmazó MRR-ből és a B6-7 csoportokat magában foglaló dorsal raphe magból indul ki (Hensler 2006; 1. ábra). Mint már említettük, ez a rendszer jelentős hatást gyakorol több magas szintű agyi funkcióra, valamint a szerotonerg rendszer, illetve jelátvitel sérülése számos neuropszichiátriai betegségben megjelenik (Hensler 2006).

A dorsal raphe és a MRR elkülönítése

A dorsal raphe és a MRR igen eltérő tulajdonságokat mutatnak anatómiai, fiziológiai és funkcionális vonatkozásban egyaránt. Mindkét mag vetít előagyi



1. ábra: Szerotonin immunhisztokémiai megjelölése egér középagyi metszetén. A jelölés mintázata világosan elkülöníti a median raphe régiót (MRR) és a dorsal raphe magot. Látható, hogy a MRR középvonalban elhelyezkedő median raphe (MR) alrégiója tartalmazza a szerotonerg sejtek legnagyobb részét, míg az ezt körülvevő paramedian raphe (PMR) alrégió más sejtípusoknak ad helyet.
Skála: 500 µm.

területekre, azonban az innen eredő szerotonerg pályák különböző funkcionális feladatot látnak el (Hensler 2006). Anatómiai szempontból a legszembetűnőbb különbség a két mag rostjainak felépítése: míg a dorsal raphe diffúzan elágazó rostjai vékonyak és apró, az axontól alig elkülöníthető varikoztásokat létesít, addig a MRR vastag, kevésbé elágazó rostjai nagy terminális boutonokban végződnek, gyakran teljesen körülölelve a megcélzott sejteket. Ez a különbség anterográd pályajelöléssel és szerotonin megjelölésével is jól látható (Kosofsky & Molliver 1987; Freund *et al.* 1990). A MRR rostjai, például a hippocampusban, képesek valódi szinapszisok kialakítására, gyakran kosarakat képezve a célsejtek körül (Freund *et al.* 1990). Ezt újabb ultrastrukturális és fiziológiai eredmények is alátámasztják (Varga *et al.* 2009). Megvizsgálva a mediális szeptumot is, hasonló eredményeket találtak a MRR által kialakított szeptális kapcsolatokról is (Leranth & Vertes 1999).

Ezenkívül különbözik a két mag rostjainak molekuláris összetétele is. A MRR-ból eredő rostok sejtmembránján nem található meg a szerotonin visszavételére szolgáló szerotonin transzporter fehérje (SERT), aminek következtében a MRR rostjai közvetlenül nem érzékenyek a SERT-re ható amfetamin származékok neurotoxikus hatására (Mamounas *et al.* 1991). További különbségek mutatkoznak a két mag neuronjainak tüzelési mintázatában és receptor összetételében (Hensler 2006). A fent leírt anatómiai és fiziológiai különbségek a dorsal raphe és a MRR között számos funkcionális eltérést eredményeznek.

A MRR felszálló pályarendszere

A MRR anatómiailag felosztható egy a középvonalban elhelyezkedő median raphe (MR) és az azt körülölelő paramedian raphe (PMR). Az elkülönítés alapja eredetileg minden bizonnyal az volt, hogy a MR ad helyet a régióra olyannyira jellemző szerotonerg sejteknek, míg a PMR elsősorban GABAerg sejteket tartalmaz.

A MRR előagyi pályarendszerét számos tanulmányban vizsgálták, különböző anterográd pályajelölő módszerekkel (Vertes *et al.* 1999). A MRR felszálló rostjai a mediális előagyi köteghez csatlakoznak a hipotalamusz kaudális részén és így utaznak a köztiagyon keresztül a bazális előagyba, majd innen válnak le különböző irányokba célterületeik beidegzésére. A MRR az általunk vizsgált előagyi területekre nagyszámú vetítő rostot küld, melyek topográfiai elrendeződése a következő:

(1) A hippocampális formációt elérő rostok nagyobb része a fimbria-fornixon keresztül érkezik a MRR-ból (Vertes *et al.* 1999). A MRR, kiváltképp annak rostrális része, a hippocampális formáció minden területét beidegzi, különös tekintettel a dorzális hippocampális formációra. A gyrus dentatusban főként a szemcsesejtek rétege körül találunk

MRR eredetű terminálisokat, míg a hippocampusz CA régióiban a MRR-ból érkező axonok különösen gazdagon ágaznak el a stratum (str.) radiatum és lacunosum-moleculare rétegek határán, ám elkerülik a piramissejtek rétegét. A hippocampuszban, valamint a gyrus dentatusban a MRR-ból eredő terminálisok szelektív módon a kolecisztokinin peptidet (Somogyi *et al.* 2004) vagy calbindin (Freund *et al.* 1990; Halasy *et al.* 1992), illetve calretinin (Acsády *et al.* 1993) kalcium kötő fehérjét tartalmazó interneuronokkal képeznek szinapszisokat, miközben elkerülik az interneuronoknak egy másik kalciumkötő fehérjét, parvalbumint tartalmazó csoportját (Freund *et al.* 1990; Halasy *et al.* 1992). Mivel ezek a calbindint, calretinint, illetve kolecisztokinint tartalmazó sejtek kifejezik az 5-HT₃ receptort (Morales & Bloom 1997), amely az egyetlen ionotróp szerotonin receptor, a MRR ezeken az interneuronokon keresztül képes a piramissejtek hatékony gátlására (Ropert & Guy 1991) és ezáltal a hippocampális hálózati aktivitás modulációjára.

(2) A mediális szeptumot, illetve a Broca-féle diagonális köteget szintén beidegzik a MRR rostjai (Leranth & Vertes 1999) és ott is elsősorban GABAerg, például parvalbumin vagy calbindin tartalmú idegsejteket céloznak (Leranth & Vertes 1999; Aznar *et al.* 2004).

(3) Általánosságban az agykéregre sokkal inkább jellemző a dorsal rapheból eredő diffúz bemenet, azonban bizonyos területeken az I-III. és VI. rétegekben is találhatók MRR eredetű terminálisok. MRR bemenet dominál azonban a kéreg rosztrális területein, így a mediális prefrontális kéregben is (Vertes *et al.* 1999). Az entorhinális kéreg pedig mind a dorsal raphe, mind a MRR részéről kap beidegzést (Köhler *et al.* 1980). Az agykéregben is kimutatták, hogy a kolecisztokinint, illetve calretinint tartalmazó interneuronok kifejezik az 5-HT₃ receptort (Morales & Bloom 1997). Ezek a sejtek főként a II-III. rétegben találhatók meg, mely rétegek erőteljes MRR bemenetet kapnak. Azonban közvetlen bizonyíték még nincs arra, hogy ezen a területen, hasonlóan a hippocampuszhoz, ezek az interneuronok MRR-ból érkező terminálisokkal létesítenének szinapszisokat.

A MRR glutamaterg sejtjei

Láttuk, hogy a MRR sejtjeinek igen nagy hányada tartalmaz szerotonint, ezenkívül különböző előagyi területeken a MRR-ból eredő terminálisok és a szerotonin megfestése igen hasonló jelölési mintázatot eredményez (Freund *et al.* 1990). Ebből kifolyólag a MRR-t sokáig alapvetően szerotonerg magnak tartották, melynek előagyi terminálisaiból kizárólag szerotonin szabadul fel. Azonban már korábban is leírtak szerotoninra negatív vetítő sejteket a MRR-ban (Köhler & Steinbusch 1982), majd később megerősítést nyert, hogy ezek egy része valóban nem szerotonerg vetítő sejt (Acsády *et al.* 1996; Aznar *et al.* 2004).

A vezikuláris glutamát transzporterek egy új, 3-as típusának (vGluT3) leírása a MRR-ban (Fremeau *et al.* 2002; Gras *et al.* 2002) egészen új elgondolásokat vetett fel e mag funkciójáról. A vezikuláris glutamát transzporterek a serkentő glutamaterg jelátvitel fontos elemei, hiszen a glutamátot a szinaptikus vezikulákba transzportálják. Eltérően az 1-es és 2-es típusoktól, a vGluT3-at jellemző módon olyan sejtekben írták le, amelyek tartalmazznak egy másik, a glutamáttól teljesen eltérő neurotranszmittert is. A vGluT3 kolokalizál számos monoamin, illetve szerotonin rendszerre jellemző molekulával is úgy, mint a 2-es típusú vezikuláris monoamin transzporter (VMAT2), szerotonin transzporter (SERT), szerotonin (Gras *et al.* 2002; Somogyi *et al.* 2004; Shutoh *et al.* 2008; Jackson *et al.* 2009; Amilhon *et al.* 2010) de leírták kolinerg (Gras *et al.* 2002) és GABAerg (Fremeau *et al.* 2002; Somogyi *et al.* 2004) sejtekben is. A MRR esetében a sejteknek három populációja különíthető el a szerotonin, illetve a vGluT3 tartalom szerint: bizonyos sejtek csak szerotonint vagy csak vGluT3-at tartalmazznak, illetve vannak, amelyek mindkét molekulát tartalmazzák (Shutoh *et al.* 2008; Jackson *et al.* 2009).

Patkányban mutatták meg elsőként, hogy a MRR-ból a hippocampusba vagy a mediális szeptumba vetítő nem szerotonerg sejteknek jelentős hányada tartalmaz vGluT3-at (Jackson *et al.* 2009), így első ízben merült fel, hogy a MRR részben glutamaterg vetítő pályákat küld az előagyba. Ezt követően kutatócsoportunk közvetlen anatómiai, *in vitro* és *in vivo* fiziológiai módszerekkel ténylegesen megmutatta, hogy patkányban a MRR képes a szerotonin mellett glutamát transzmisszióján keresztül bizonyos hippocampális interneuronok serkentésére és ezáltal a piramissejtek áttételes gátlására (Varga *et al.* 2009). Ez a felfedezés bizonyította elsőként, hogy a MRR képes egy gyors és precíz, részben glutamaterg jelátvitelen keresztül hatást gyakorolni a hippocampális hálózati aktivitásra, megkérdőjelezve a MRR-nak addig tulajdonított lassú, csupán neuromodulátoros szerepet. Munkatársaimnak nemrég sikerült bizonyítani, hogy ez egérben is így lehet, mivel az NMDA típusú glutamát receptorok jelenlétét is kimutatták a MRR által adott szinapszisokban, nemcsak a hippocampusban, de a mediális szeptumban és a mediális prefrontális kéregben is (Szőnyi *et al.* 2014), ezzel anatómiai bizonyítékot szolgáltatva arra, hogy a MRR által adott glutamaterg bement általános lehet, tehát több előagy területen is megvalósulhat. A glutamát szerepének jelentőségét mutatja, hogy a vGluT3^{-/-} null mutáns egerek a szorongásos viselkedés jeleit mutatják, valamint ezen állatok vizsgálatával kiderült, hogy a szerotonin vezikuláris transzportja során a vGluT3 együttműködik a VMAT2-vel, így az előbbi fehérje segíti a szerotonerg jelátvitelt a hippocampusban (Amilhon *et al.* 2010).

A hippocampus

A hippocampális formáció egy olyan összetett agyi struktúra, amely kulcsszerepet játszik bizonyos tanulási és memóriafolyamatokban, ezenkívül működési zavara számos neurológiai betegségben megjelenik. Ebből kifolyólag több tanulmányban vizsgálták normál és kóros működését és napjainkban is ez az egyik legkutatottabb agyterület.

A hippocampális formáció neuroanatómiája

A hippocampális formáció egy kétoldali, C alakban megnyúlt, összetett agyi struktúra, mely több agyterületet is magában foglal, ezek a következők: gyrus dentatus, hippocampus (CA1-3), subiculum, presubiculum és parasubiculum, valamint néhány forrás szerint az entorhinális kéreg is ide sorolható.

A hippocampális formáció három nagy rostköteggel rendelkezik, melyek a külső és belső kapcsolatokat biztosítják: (1) a fimbria-fornix kötegen keresztül érkezik az információ a különböző bazális előagyi és agytörzsi területekről (így többek közt a mediális szeptumból és a MRR-ből is); (2) a kommisszurális kötegek kapcsolják össze a két félteke hippocampális formációit; (3) az anguláris köteg az entorhinális kérget köti össze a hippocampális formáció más területeivel.

Más kérgi területekhez képest a hippocampális formáció igen egyedi neuroanatómiai felépítést mutat. Az említett területek szigorúan egyirányú, serkentő kapcsolatban állnak egymással és egy belső kört alakítanak ki. A hippocampális formáció agykérgi bemenetének nagy részét az entorhinális kéreg fogadja, mely vetít a hippocampusba és a gyrus dentatusba. Hasonlóképpen, a gyrus dentatus az ún. moharostokon keresztül vetít a hippocampus CA3 területére, az pedig az ún. Schaffer kollaterálisok segítségével a CA1 területre. Az utóbbi terület vetít a subiculumba, az pedig a pre- és parasubiculumba. A kört a CA1 terület és a subiculum zárják be, amelyek visszavetítenek az entorhinális kéregbe.

A hippocampális formációt alkotó agyterületek maguk is komplex felépítésűek, sejtszerkezetük nem mutatja a klasszikus kérgi, sokrétegű elrendeződést (kivéve az entorhinális kérget). Mindegyik területen megkülönböztetünk lokális gátló szinapszisokat adó interneuronokat és vetítő, serkentő hatású ún. fősejteket. A gyrus dentatus fősejtjei a kisebb méretű szemcsesejtek a str. granulosum rétegben, míg a CA régiók fősejtjei a piramissejtek a str. pyramidale rétegben, melyek bazális és apikális dendritjei különböző lokális és kívülről eredő szinapszisokat fogadnak, így a fősejtek feladata a beérkező nagy mennyiségű, heterogén információ integrálása és továbbküldése. A piramissejtek rétege felett található a vastagabb

str. radiatum, afelett pedig a str. lacunosum-moleculare, bennük a piramissejtek disztális apikális dendritjeivel. Mint említettem, az utóbbi két réteg határára igen gazdag MRR afferentáció érkezik.

Az interneuronok olyan GABAerg idegsejtek, amelyek nem vetítenek más agyterületre (megjegyzendő, hogy léteznek olyan helyi GABAerg neuronok is, amelyek vetítősejtek), így a többi helyi neuronra adnak gátló szinapszisokat (bár ismeretes esetenként depolarizáló hatásuk is, amely még mindig vitatott; Szabadics et al. 2006, Glickfeld et al. 2009). Noha az interneuronok a kéreg sejtjeinek csak körülbelül 10%-át teszik ki, szerepük az információ lokális feldolgozásában alapvető. Rendkívüli heterogenitást mutatnak (Freund & Buzsáki 1996), jelenleg a hippocampusban legalább 21 típusuk különíthető el olyan tulajdonságok alapján, mint a sejttest helyzete, a sejt be- és kimeneti, neurokémiai vagy elektrofiziológiai sajátosságai (Klausberger & Somogyi 2008). Tipikus képviselőik a kosár sejtek, axo-axonikus sejtek, O-LM (oriens lacunosum-moleculare) sejtek, ún. „bistratified” sejtek és IS (interneuron-selective) sejtek. A hippocampusban található interneuronok populációit elkülöníthetjük aszerint, hogy a piramissejtek mely részével kapcsolódnak. Míg például a parvalbumint vagy a kolecisztokinint tartalmazó interneuronok periszomatikusan fejtik ki gátló hatásukat, addig a calbindinra pozitív interneuronok a dendritfa apikális részét célozzák, a calretinin tartalmúak pedig tipikusan más interneuronokat (IS, interneuron-selective) idegeznek be. Mint említettem, a hippocampusban a MRR a kolecisztokinin, calbindin és calretinin tartalmú interneuronokat célozza, ezzel szemben a mediális szeptum a parvalbumint tartalmazókat. Mivel a megcélzott interneuronok különbözőek, így az említett két terület alapvetően eltérő módon szabályozza a hippocampális aktivitást (Freund *et al.* 1990).

A hippocampális formáció funkciója

A hippocampális formáció jelentőségére csaknem 60 évvel ezelőtt figyeltek fel. H. M. (Henry Molaison) epilepsziás beteget, temporális lebenyének mindkét oldali eltávolításával próbálták meg kezelni, ám a műtét után a beteg képtelen volt új információk memorizálására. Az elmúlt néhány évtized tudományos eredményei alapján két fő funkciót tulajdonítanak a hippocampális formációnak: fontos szerepet játszik az ún. deklaratív memóriában, emellett szükséges a térbeli tájékozódáshoz. Ezenkívül a hippocampális formáció más agyi funkciókban is érintett, részt vesz szenzomotoros folyamatokban, képes más kérgi területekről érkező információkat összesíteni és új formában továbbítani, valamint hatással van a hangulati életre, ez utóbbi funkciója pedig különösen fontos az affektív kórképek esetében. A

hippokampális formáció sok más hálózattal és agyi struktúrával áll kapcsolatban, ám az igen erős raphe-hippokampális bemenet jellege és szerepe még mindig nem pontosan tisztázott.

A hippokampális elektroencefalogram (EEG) számos idegsejt aktivitását tükrözi, így átfogó képet ad a terület működéséről. Több jellegzetes hippokampális szinkron aktivitási mintázatot ismerünk, melyek közül fontos kiemelni a ritmikus θ oszcillációt. Rágcsálóban a θ hullámok a környezet feltérképezésekor, az alvás REM fázisában, illetve ébredéskor figyelhetők meg. Fontos megemlíteni, hogy a MRR serkentése a hippokampális EEG deszinkronizációját eredményezi, míg gátlása elősegíti a stabil θ ritmus kialakulását (Vertes & Kocsis 1997).

A mediális szeptum

A mediális szeptum neuroanatómiája

A szeptális régió az oldalsó agykamrák között található, a bazális előagy része. Anatómiailag laterális, mediális, poszterior és ventrális részekre oszthatjuk (Swanson & Cowan 1979). A mediális szeptum, valamint a Broca-féle diagonális köteg alkotják a szeptális régió mediális részét. A mediális szeptumot a hippokampuszal a fimbria-fornix köti össze, míg az agytörzsi afferensek és efferensek a mediális előagyi kötegben haladnak.

A mediális szeptumban elkülönítünk kolinerg, GABAerg és glutamaterg sejteket. (1) A mediális szeptum igen nagy számban tartalmaz kolinerg sejteket (Mesulam *et al.* 1983). (2) A mediális szeptum GABAerg vetítő sejtjei jól elkülöníthetők az előző populációtól, legfontosabb tulajdonságuk a kolinerg sejtekkel szemben, hogy tartalmaznak parvalbumint (Freund 1989). (3) Nem olyan régen írták le a mediális szeptum sejtjeinek egy harmadik csoportját, melyek a 2-es típusú vezikuláris glutamát transzportert (vGluT2) tartalmazzák. A három említett sejtípus mindegyike vetít a hippokampuszba (Colom *et al.* 2005), így különféle módon mindhárom neurotransmitter részt vesz a különböző oszcillációk kialakításában és fenntartásában. Emellett a háromféle sejtípus egymással kapcsolódva részt vesz a mediális szeptum belső hálózatának kialakításában, melynek fontos elemei a különböző helyi GABAerg interneuronok.

A mediális szeptum funkciója

A mediális szeptum fontos szerepet játszik különböző kognitív folyamatokban. Ritmikus tüzelő sejtjei a szepto-hippokampális pályán keresztül részt vesznek a hippokampális θ oszcilláció kialakításában (Vertes & Kocsis 1997), amely fontos eleme a

tanulási és memóriafolyamatoknak. A mediális szeptum sérülése vagy ritmikus tüzelésének megzavarása a théta hullámok megszűnését eredményezi és a kognitív funkciók beszűküléséhez vezet (Vertes & Kocsis 1997; Colom 2006). Ezen felül a mediális szeptum bizonyos idegsejtjei igen korán és nagymértékben degenerálódnak az Alzheimer-kór során, amely a legsúlyosabb neurodegeneratív betegségek közé tartozik és komoly demenciával jár.

A mediális prefrontális kéreg

A mediális prefrontális kéreg neuroanatómiája

A mediális prefrontális kéreg az orbitális és laterális prefrontális kéreggel együtt alkotja a prefrontális kérget, mely az agykéreg része és a homloklebeny elülső részén található. Sejtes szerveződése a kéregre jellemző réteges felépítést mutatja, bár bizonyos prefrontális területeken egyes rétegek vékonyabbak lehetnek vagy akár hiányozhatnak is. Bár a kéreg anatómiai szerveződése réteges, funkcionálisan egyfajta vertikális, oszlopos felépítést mutat. Ezek az ún. kérgi modulok, melyek néhány ezer sejtből állnak és a kéreg funkcionális egységének tekinthetők (Szentágothai 1975). Mindegyik rétegben megtaláljuk a különféle gátló interneuronok sejttestjeit. A hippocampuszhoz hasonlóan itt is számos populációjuk különíthető el, melyek a serkentő sejtek különböző részeire adnak GABAerg szinapszisokat. A mediális prefrontális kéreg négy további, sejtes szerveződésüket tekintve eltérő részre osztható fel: mediális precentrális kéreg (vagy más néven Fr2), elülső cinguláris kéreg (A24a-b), prelimbikus kéreg (A32) és infralimbikus kéreg (A25). Emellett azonban anatómiai és viselkedési vizsgálatok alapján a mediális prefrontális kéreg felosztható egy dorzális részre – mediális precentrális, elülső cinguláris és dorzális prelimbikus kéreg – és egy ventrális részre – ventrális prelimbikus kéreg és infralimbikus kéreg (Heidbreder & Groenewegen 2003).

A mediális prefrontális kéreg funkciója

A mediális prefrontális kéreg egy filogenetikailag viszonylag fiatal, funkcionálisan igen heterogén terület, számos kognitív folyamatban játszik fontos szerepet. Hatással van az érzelmekre, érintett a figyelemmel és motivációval kapcsolatos magatartási formákban, a döntéshozatalban, így felelős a rugalmas viselkedés kialakításáért. Fontos szerepet játszik mind a rövid, mind a hosszú távú emlékezetben, a munkamemóriában, valamint az emlékek kialakulásához is szükséges (Euston *et al.* 2012). Fontos asszociatív terület, mely összeköttetésben áll más előagyi, köztiagyi és agytörzsi régiókkal. Tekintettel funkcionális sokszínűségére, a mediális prefrontális kéreg nem megfelelő működése számos neuro-

pszichiátriai betegségben megjelenik, így érintett a depressziós és szorongásos kórképekben, valamint a skizofréniában.

A hippocampusz, a mediális szeptum és a mediális prefrontális kéreg közti kapcsolatok

Mint említettük, a mediális szeptum mindhárom sejt típusa vetít a hippocampuszba. (1) Az ún. II-es típusú, vékony, apró varikozitásokban végződő szeptális rostok kolinergek és a hippocampális interneuronok mellett főként a piramissejtekre adnak depolarizáló hatású kapcsolatokat (Freund & Antal 1988; Vertes & Kocsis 1997). (2) Az I-es típusú, vastag, en passant boutonokban végződő rostok a mediális szeptum GABAerg sejtjeitől származnak és a különböző hippocampális interneuronok körül képeznek kosarakat, ezáltal ritmikus diszinhíció útján befolyásolják a piramissejtek tüzelését (Freund & Antal 1988; Freund 1989). (3) A mediális szeptum, illetve a Broca-féle diagonális köteg glutamaterg sejtjei közvetlenül a hippocampusz piramissejtjeit serkentik. A kapcsolat a két terület között kétirányú, a hippocampusz is küld vetítő rostokat a mediális szeptumba, melyek kizárólag GABAerg sejtectől erednek. Ez a beidegzés azonban nem olyan gazdag, mint a szepto-hippocampális bemenet.

A mediális szeptum és a mediális prefrontális kéreg között a kapcsolat szintén kétirányú és topografikusan szerveződik. A mediális szeptum, illetve a Broca-féle diagonális köteg laterális részei inkább a mediális prefrontális kéreg oldalsó részét célozzák, míg a mediális eredetű rostok a mediális prefrontális kéreg közepén végződnek. Ugyanakkor a mediális prefrontális kéreg ventrális része mediális, dorzális része pedig laterális irányba vetít (Heidbreder & Groenewegen 2003).

A kapcsolat a hippocampusz és a mediális prefrontális kéreg között egyirányúnak tekinthető. Miközben a ventrális CA1 területről igen gazdag hippocampális afferentációt kap a mediális prefrontális kéreg ventrális része, addig csak igen kevés mediális prefrontális rost éri el közvetlenül a hippocampuszt – noha indirekt hatása lehet, például az entorhinális területen keresztül (Heidbreder & Groenewegen 2003).

CÉLKITŰZÉSEK, KÉRDÉSFELVETÉSEK

Az előbbi fejezetekben bemutattam a MRR, illetve három célterülete, a hippokampusz, a mediális szeptum és a mediális prefrontális kéreg anatómiai felépítését, funkcióját, egymással való kapcsolódásukat, valamint röviden kitértem ezen agyterületek szerepére a különböző neurológiai betegségekből. Az elmúlt évek eredményei rámutatnak arra, hogy a MRR valódi funkciója jóval túlmutat szerotonerg modulátoros szerepén. Ennek ellenére még mindig nagyon keveset tudunk erről a részben serkentő magról, ezért célkitűzésemben három ezzel kapcsolatos nagyobb kérdéskört vizsgáltam.

(1) Egyáltalán nem ismert, hogy a MRR-ban pontosan mekkora számú és milyen neurokémiai tulajdonságú idegsejt található, így nem tudjuk azt sem, hogy milyen arányban vannak jelen a főként vetítő glutamaterg, szerotonerg, illetve az ezekre kettősen pozitív sejtek. Ezen sejtek számának ismerete nem csak azok arányának megállapítása miatt fontos, de ezen keresztül alapvető támpontot nyújt a mag vetítő sejtjei által létesített előagyi kapcsolatainak feltérképezéséhez és modellezéséhez is, valamint rámutathat a mag által létesített glutamaterg kapcsolatok jelentőségére.

Ennek megfelelően első vizsgálatunk keretében statisztikailag megalapozott, kvantitatív sztereológiai módszerek segítségével meghatároztuk a mag funkcionálisan három legfontosabb vetítő sejttypusának, a szerotonerg, glutamaterg és az ezekre kettősen pozitív idegsejteknek a számát és egymáshoz viszonyított arányát.

(2) A MRR ezen három vetítő sejttypusának nem feltétlenül mindegyike vetít azonban a mag minden célterületére és ahova mégis, oda sem biztosan egyforma arányban. Így szükséges megvizsgálni azt is, hogy adott területre milyen arányban vetít a három sejttypus, hiszen az egyes célterületeken megvalósuló jelátvitel típusa – szerotonerg, avagy gyors serkentő glutamaterg – alapvetően meghatározza a MRR előagyi szabályzó szerepét. Mint láttuk, a hippokampusz és a mediális szeptum a MRR ismert előagyi célterületei közé tartozik, anatómiailag és funkcionálisan egyaránt, és e területeken keresztül a mag hatékonyan képes befolyásolni az előagyi neuronhálózatok aktivitását. Az ide vetítő sejtek glutamaterg tulajdonságát eddig csak patkányban írták le (Jackson *et al.* 2009; Varga *et al.* 2009), de mindeddig ott is csak néhány aspektust vizsgáltak. Azonban egérben ezelőtt ezt még nem vizsgálták, annak ellenére, hogy számos előnyös tulajdonsága miatt (gyors egyedfejlődés, jó szaporodóképesség, génmódosítás szerteágazó lehetőségei stb.) a laboratóriumi egér egyre

szélesebb körben használt modellállat az idegtudományok területén is. Így elengedhetetlen az egér központi idegrendszerének pontos ismerete. A MRR kapcsolata a mediális prefrontális kéreggel kevésbé ismert, noha ennek az előagyi területnek a kóros működése számos olyan neuropszichiátriai betegségben megjelenik, amelyben a szerotonerg rendszer is érintett. A mediális prefrontális kéregbe vetítő sejteket ezelőtt még nem vizsgálták rágcsálóban, azok neurokémiai tulajdonsága egyáltalán nem ismert.

Második vizsgálatunkban tehát retrográd pályajelölés segítségével megvizsgáltuk a hippocampuszba, a mediális szeptumba, valamint a mediális prefrontális kéregbe vetítő sejtek szerotonerg, illetve glutamaterg természetét egérben.

(3) Mindeztidáig kevésbé vizsgálták a MRR által adott előagyi kollaterális beidegzéseket, pedig amennyiben a mag sejtei képesek egyidejűleg több előagyi terület beidegzésére, akkor glutamaterg jelátvitelén keresztül a MRR fontos szerepet játszhat ezen agyterületek gyors és pontos szinkronizálásában. Patkányban korábban kimutatták, hogy a MRR sejteinek egy része képes vetítő rostokat küldeni egyidejűleg a hippocampuszba és az entorhinális kéregbe (Köhler & Steinbusch 1982), a mediális szeptumba és az entorhinális kéregbe (Köhler *et al.* 1982), valamint a hippocampuszba és a mediális szeptumba (Acsády *et al.* 1996; McKenna & Vertes 2001). Olyan kettősen vetítő sejteket, melyek nem tartalmaztak szerotonint eddig csak a hippocampusz és az entorhinális kéreg esetében írtak le (Köhler & Steinbusch 1982). Azonban ezelőtt még nem vizsgálták a MRR kettősen vetítő sejtjeit egérben és egyáltalán nem ismert ezen sejtek glutamaterg természete még patkányban sem.

Harmadik vizsgálatunkban tehát kettős retrográd pályajelölés segítségével megvizsgáltuk a hippocampuszba és a mediális prefrontális kéregbe, valamint a mediális szeptumba és a mediális prefrontális kéregbe való kettős vetítés lehetőségét, valamint a kettősen vetítő sejteket neurokémiaailag azonosítottuk is.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Állatok és perfúzió

Minden állatkísérletet a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet (MTA KOKI) Intézeti Etikai Kódexe és a kísérleti állatok védelméről szóló hatályos magyar jogszabályok (1998. évi XXVIII. törvény, 40/2013. (II. 14.) Korm. rendelet) alapján végeztünk el, melyek összhangban vannak az Európai Parlament és a Tanács által 2010. szeptember 22-én elfogadott irányelvekkel (2010/63/EU), valamint a FELASA állatjóléti ajánlásaival. A kísérletek az MTA KOKI Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága, valamint a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal jóváhagyásával történtek.

Kettő darab vGAT-eGFP törzsbe tartozó (1-2. egér), valamint 7 darab C57BL/6J törzsbe tartozó (3-9. egér) 35-70 napos specifikus parazitamentes körülmények között tartott (SPF) hím egeret használtunk fel a kísérletek során. Az állatokat a perfúzió előtt először inhalációs úton, izofluránnal, majd intraperitoneális injekcióval beadott altató keverékkel (8,3 mg/ml ketamin, 1,7 mg/ml xilazin-hidroklorid, 0,8 mg/ml prometazin-hidroklorid 0,9%-os fiziológiás sóoldatban, 10 ml/kg testtömeg) érzéstelenítettük és helyeztük mélyaltatásba. Ezt követően az állatokat szívükön keresztül, a nagy vérkörön át megperfundáltuk, először fiziológiás sóoldattal 2 percen át, majd 4%-os paraformaldehid-oldattal 40 percen át, végül 0,1 M-os foszfátpuffer-oldattal (PB) 10 percen át.

Antitestek

A kísérletek során használt antitestekről az 1. táblázat nyújt részletes áttekintést. A szerotonin elleni antitest specificitását már korábban tesztelték (Amilhon *et al.* 2010) és mi is ahhoz hasonló jelölési mintázatot tapasztaltunk, megerősítve ezzel az antitest specificitását. A nyúlban készült vezikuláris glutamát transzporter 3 (vGluT3) elleni antitest széles körben használt, specificitását többen is leírták (Affaticati *et al.* 2011). A tengerimalacban készült vGluT3 elleni antitest specificitását vGluT3^{-/-} null mutáns egérben teszteltük (Szabadits *et al.* 2011; Szőnyi *et al.* 2014). A Fluoro-Gold (FG) és a kolera toxin B alegység (KTB) elleni antitestek nem mutattak jelölést olyan állatokban, amelyekbe nem adtuk be ezeket a pályajelölő anyagokat.

Megbizonyosodtunk róla, hogy a másodlagos antitestek nem adnak keresztreakciót az elsődleges, illetve a többi másodlagos antitesttel, valamint, hogy elsődleges antitestek nélkül nem mutatnak autofluoreszcenciát, illetve háttérfestést.

1. táblázat: A kísérletek során felhasznált elsődleges és másodlagos antitestek legfontosabb jellemzői. vGluT3: vezikuláris glutamát transzporter 3.

Mi ellen készült?	Milyen állatban készült?	Eredeti fehérje-koncentráció	Hígítás	Gyártó	Katalógus szám	Lot number
szerotonin	patkány	ismeretlen	1:500	Millipore	MAB352	2168248
vGluT3	nyúl	1 mg/ml	1:500	Synaptic Systems	135203	135203/14 135203/16 135203/23
vGluT3	tengerimalac	ismeretlen	1:1000-1:4000	Millipore	AB5421	LV1453193
Fluoro-Gold	nyúl	ismeretlen	1:1000-1:30000	Millipore	AB153	2003657
kolera toxin B alegység	egér	1000 µg/ml	1:400	Abcam	ab1003	-
kolera toxin B alegység	kecske	ismeretlen	1:20000	List Biological Laboratories	#703	#7032A7
Mivel konjugált?	Milyen állatban készült?	Mi ellen készült?	Hígítás	Gyártó	Katalógus szám	Molekula
Alexa 647	tyúk	patkány	1:500	Life Technologies	A-21472	teljes IgG
Cy3	szamár	nyúl	1:500	Jackson Immuno-research	711-165-152	teljes IgG
biotin	kecske	tengerimalac	1:200	Vector Laboratories	BA-7000	teljes IgG
DyLight 405	nem antitest		1:500	Jackson Immuno-research	016-470-084	sztreptavidin
Alexa 488	szamár	nyúl	1:500-1:1000	Life Technologies	A-21206	teljes IgG
DyLight 549	szamár	egér	1:500	Jackson Immuno-research	715-505-151	teljes IgG
Alexa 594	szamár	kecske	1:500	Life Technologies	A-11058	teljes IgG

Immunfluoreszcens festés

Az állatok perfúzióját követően az agyukat eltávolítottuk a koponyából, majd egy Leica VT1200S típusú metszőgéppel a sztereológiára szánt 2 állat (1-2. egér) esetében 60 µm vastag, míg a retrográd pályajelölővel beadott 7 állat (3-9. egér) esetében 50 µm vastag koronális metszeteket készítettünk. Ezt követően 3-szor 10 percen keresztül 0,1 M-os foszfátpuffer-oldattal (PB) mostuk ki a fixáló-oldatot a metszetekből. Ezután a metszetek fagyvédelem céljából 12 órára 10%-os, majd 2 órára 30%-os szacharóz-oldatba kerültek (PB-ban), majd a penetrációt elősegítendő folyékony nitrogénben 5-ször (sztereológiára szánt metszetek) vagy 3-szor (retrográd pályajelölőt tartalmazó metszetek) fagyasztottuk és olvasztottuk meg őket. Ezt követően a metszetek PB-ba (3-szor 10 perc), majd TBS-be (tris-buffered saline; 3-szor 10 perc), végül 1 órára TBS-ben feloldott 1%-os humán szérum albumin-oldatba (Sigma-Aldrich) kerültek, elfedve ezzel a nem specifikus epitópokat. A sztereológiára szánt metszetek esetében ez az oldat még 0,1% Triton™ X-100-at (Sigma-Aldrich) és 700 µg/ml Digitonint (Sigma-Aldrich) tartalmazott, valamint az elsődleges és másodlagos antitestek mellé is került 0,03% Triton™ X-100, elősegítve ezzel a penetrációt a vastagabb metszetekbe is. Ezek után 48-96 órára a metszeteket az elsődleges antitestek oldatában inkubáltuk, TBS-ben feloldva. Az antitestek alkalmazott koncentrációiról az 1. táblázat nyújt részletes áttekintést. A sztereológiára szánt metszeteket anti-szerotonin (patkány) és anti-vezikuláris glutamát transzporter 3 (anti-vGluT3; nyúl) antitestek oldatában inkubáltuk. A retrográd pályajelölőt tartalmazó metszetekre a 3-5. egerek esetében anti-Fluoro-Gold (anti-FG; nyúl; előzetesen natív metszeteken kimerítve 1:1000-ben 1 órán keresztül), anti-kolera toxin B alegység (anti-KTB; egér), anti-szerotonin (patkány) és anti-vGluT3 (tengerimalac) került, míg a 6-9. egerek esetében anti-FG (nyúl; kimerítve) és anti-KTB (kecske).

6-szor 10 percen keresztül TBS-es mosás után 24 órára rákerültek a metszetekre a másodlagos antitestek. A sztereológiára szánt metszetek esetében Alexa 647-konjugált tyúokban készült anti-patkány (szerotonin jelölés az infravörös emissziós tartományban) és Cy3-konjugált szamár-anti-nyúl (vGluT3 jelölés pirosban). A retrográd pályajelölőt tartalmazó metszetekre a 3-5. egerek esetében Alexa 488-konjugált szamár-anti-nyúl (FG jelölés zöldben), DyLight 549-konjugált szamár-anti-egér (KTB jelölés pirosban), Alexa 647-konjugált tyúk-anti-patkány (szerotonin jelölés infravörösben) és biotinnal konjugált kecske-anti-tengerimalac, míg a 6-9. egerek esetében Alexa 488-konjugált szamár-anti-nyúl (FG jelölés zöldben) és Alexa 594-konjugált szamár-anti-kecske (KTB jelölés pirosban).

A sztereológiára szánt metszeteket a másodlagos antitesteket követően, TBS-es mosás után (3-szor 10 perc) 2 órán keresztül DAPI-oldatban inkubáltuk (1:10000), mely festék kék színben fluoreszkál és a DNS-hez kötődve megfesti a sejtmagokat. A retrográd pályajelölőt tartalmazó metszetekre a 3-5. egerek esetében a másodlagos antitesteket követően, TBS-es mosás után (6-szor 10 perc) rákerült egy harmadlagos, DyLight 405-konjugált sztreptavidint tartalmazó oldat 5 órára (vGluT3 jelölés kékben). Újabb TBS-es (10 perc) és PB-os (2-szer 10 perc) mosások után mindegyik metszetet tárgylemezekre húztuk fel és Aquamount-tal (BDH Chemicals Ltd) fedtük le.

Megjegyzendő, hogy a fluoreszcencia konfokális detektálása digitálisan történik egy monokróm intenzitási skálán, így a dokumentáció szempontjából valójában lényegtelen a másodlagos antitestek „színe”. Dolgozatomban képei így szükségszerűen álszínezetűek.

Szttereológiai mérés

A különböző neurokémiai tulajdonságú idegsejtek számának meghatározása a MRR-ban sztereológiai módszerek segítségével történt. A sztereológia olyan statisztikailag megalapozott, elfogulatlan, kvantitatív módszer, amely alkalmas arra, hogy kellő pontossággal és torzítatlanul becsüljük meg egy 3 dimenziós struktúra (pl. egy szerv vagy agytörzsi mag) vagy annak bizonyos elemeinek valamilyen kvantitatív, geometriai paraméterét (sejtszám, nyúlvány hosszúsága, felület, térfogat), miközben a méréseinket az adott struktúra megbontásával, annak metszetein kell, hogy elvégezzük. Miután mérettől és alaktól függően az egyébként különböző objektumok hasonló formában jelenhetnek meg a metszeten és fordítva, így a metszeteken látott információ félrevezető a teljes struktúrára nézve, tehát az adott paraméter becslése torzított lesz, vagyis nagy lesz a becslés hibája. Erre a problémára jelent megoldást a sztereológia. A módszer különböző formáiról, azok pontos matematikai háttéréről, alkalmazási területeiről, előnyeiről számos közlemény ad részletes áttekintést (West *et al.* 1991; Schmitz & Hof 2005; Boyce *et al.* 2010; Tschanz *et al.* 2014).

Az általunk alkalmazott sztereológiai módszer az ún. optikai frakcionátor (angolul optical fractionator), amely alkalmas valamilyen objektum számának meghatározására egy adott struktúrában. A technika azon alapszik, hogy a *teljes* struktúrából úgy veszünk mintát, hogy pontosan ismerjük, hogy az a minta a teljes struktúra *mekkora hányadát* teszi ki. Ha ebben meg tudjuk adni a vizsgált objektum *pontos számát*, akkor ebből egyszerű felszorzással következtethetünk az *összes objektum számára a teljes struktúrában*.

Esetünkben a vizsgálat a következő elvet követte. Két vGAT-eGFP törzsbe tartozó egérben (1-2. egér) a MRR-t három lépésben mintavételeztük és osztottuk kisebb vizsgált

térfogatokra. (1) Szisztematikus véletlen mintavételezéssel a *teljes* MRR-ból készült összes szöveti metszetnek kiválasztottuk minden második metszetét azaz a felét. Ez az ún. metszet hányados (*ssf*), amely esetünkben tehát $\frac{1}{2}$. (2) A következő lépésben mindegyik kiválasztott metszet területének csak egy bizonyos hányadát vizsgáltuk, egy a metszetre virtuálisan ráhelyezett $80\text{ }\mu\text{m}$ oldalhosszúságú négyzetháló minden négyzetéből csak egy $15\text{ }\mu\text{m}$ oldalhosszúságú négyzetet. Ez az ún. területi hányados (*asf*), amely így tehát $15^2/80^2$. (3) Az utolsó lépésben ezeken a kisebb területeken a metszet teljes vastagságából csak $15\text{ }\mu\text{m}$ -t vizsgáltunk. Így módon megkapjuk az ún. mérő kockákat, melyek jelen esetben $15\text{ }\mu\text{m}$ oldalhosszúságú kockák. A mérő kocka virtuálisan a metszetben található és lehetővé teszi, hogy mindegyik objektum egyenlő valószínűséggel kerüljön bele a mintába, mérettől, alaktól és térbeli elrendeződéstől függetlenül, így válik a mérés elfogulatlanná, amely a sztereológiai módszerek leglényegesebb jellemzője. A mérést a metszetenkénti számoló keret és további – itt nem részletezett – szabály alkalmazásával lehet elvégezni úgy, hogy lényegében megszámláljuk az adott mérőkockában található sejteket, majd ezek számát megszorozzuk a fent leírt 3 hányados reciprokával:

$$N = Q \cdot \frac{t}{h} \cdot \frac{1}{asf} \cdot \frac{1}{ssf}$$

ahol N az összes sejt száma egy adott struktúrában, Q a mérő kockákban megszámlált összes sejt száma, t a metszetek feldolgozás után mért átlagos vastagsága, h a mérőkocka magassága, *asf* a területi frakció és *ssf* a metszet frakció. A fentiek alapján méréseinkre a következőképpen írható fel az egyenlet, melynek segítségével az eredmények megadásánál meghatároztuk a különböző sejtek a számát a teljes MR-ban (t a két állatban $25,7\text{ }\mu\text{m}$ és $27,1\text{ }\mu\text{m}$ volt):

$$N = Q \cdot \frac{t}{15} \cdot \frac{1}{15^2/80^2} \cdot \frac{1}{1/2}$$

A mérés menete a gyakorlatban az alábbiak szerint történt. Mint láttuk, a fluoreszcens immunhisztokémiai festés során kiemelt figyelmet fordítottunk az antitestek penetrációjára, hogy a fluoreszcens jelölés a metszet teljes vastagságában megfelelő legyen. A képalkotás egy Nikon A1R konfokális mikroszkóp segítségével történt, 20-szoros nagyításon $1\text{ }\mu\text{m}$ -ként készítettünk konfokális képeket a metszetek teljes vastagságában, a kék (sejtmag jelölés), a piros (vGluT3 jelölés) és az infravörös (szerotonin jelölés) emissziós tartományokban. Ezek után a sztereológiai méréseket ezeken a konfokális képsorozatokon végeztük el. A sejtek megszámlálása egy erre a célra kifejlesztett sztereológiai program, a Stereo Investigator (MBF Bioscience) segítségével történt. A program képes szisztematikus véletlen módon virtuálisan belehelyezni a konfokális képsorozatokra a fent említett mérő kockákat,

megjeleníti a számoló kereteket, valamint számos nyers és származtatott adatot szolgáltat egy-egy metszet méréséből. A sejtek megszámlálása a DAPI-val megjelölt sejtmagok alapján történt, mivel azok alakjukból és méretükből adódóan sokkal alkalmasabbak a számoló keretben való detektálásra, mint a bonyolult nyúlványokkal rendelkező sejtestek. A megszámlolt sejtek neurokémiai azonosítása a konfokális képsorozatokon a NIS-Elements program segítségével történt. Jelen esetben csak a MRR MR részén végeztük el a méréseket, mivel definíció szerint a szerotonerg, illetve glutamaterg sejtek a MR-ban helyezkednek el, melyet éppen emiatt választanak külön a PMR-tól.

Sztereotaxiás műtétek

7 darab C57BL/6J törzsbe tartozó 35-70 napos hím egeret (3-9.) először inhalációs úton, izofluránnal, majd intraperitoneális injekcióval beadott altató keverékkel (8,3 mg/ml ketamin, 1,7 mg/ml xilazin-hidroklorid fiziológiás sóoldatban, 10 ml/kg testtömeg) érzéstelenítettünk és helyeztünk mélyaltatásba, ezt követően pedig sztereotaxiás készülékbe fogtuk be az állatokat. Először 2%-os Fluoro-Gold típusú retrográd pályajelölő anyagot (FG; Fluorochrome) adtunk be a mediális prefrontális kéregbe. Ezek közül 3 egér esetében (3. és 6-7. egér) a FG-ot csak a bal agyféltekébe adtuk be a következő koordináták szerint: 1,8 mm anterior irányban a bregmától, 0,3 mm laterális irányban a középvonaltól és 2,7 mm ventrális irányban a bregma és a lambda által meghatározott nulla szinttől. Ezekben az esetekben a FG beadását követően 0,5%-os kolera toxin B alegység típusú retrográd pályajelölő anyagot (KTB; List Biological Laboratories) adtunk be 3 helyre a hippocampusba a bal agyféltekében a következő koordináták szerint: 2,5 mm, 2,8 mm, 3,2 mm poszterior irányban a bregmától, 1,6 mm, 1,6 mm, 1,7 mm laterális irányban a középvonaltól és 2,1 mm, 2,1 mm, 2,2 mm ventrális irányban a nulla szinttől. Négy egér esetében (4-5. és 8-9. egér) a FG-ot mindkét oldali agyféltekébe beadtuk a mediális prefrontális kéregbe a fent említett koordináták szerint, majd ezt követően a KTB-et a mediális szeptumba adtuk be a következő koordináták szerint: 1,0 mm anterior irányban a bregmától, középvonalban és 4,1 mm ventrális irányban a nulla szinttől. A koordinátákat erre alkalmas sztereotaxiás atlasz segítségével határoztuk meg (Paxinos & Franklin, 4. kiadás). A beadásokat Recording Nanoject II precíziós mikorinjektor pumpával végeztük el (Drummond Scientific Company), 28-36 µm belső átmérőjű boroszilikát alapú üvegapillárisokkal (Drummond Scientific Company). Egy-egy beadás alkalmával 15-20 nl FG-ot és 20-25 nl KTB-et adtunk be. Közvetlenül a beadás előtt a mikropipetta hegyét a meghatározott koordinátákhoz képest 100 µm-rel lejjebb majd vissza állítottuk, elegendő helyet csinálva ezzel a beadóanyag számára.

Közvetlenül a beadás után a mikropipetta hegyét mozdulatlanul hagytuk 5 percig a meghatározott koordinátákon, majd még 10 percig 100 μm -rel feljebb, hogy elősegítsük a beadóanyag kiáramlását, megakadályozva ezzel annak visszaáramlását a pipetta nyomán. A beavatkozás után az állatok folyadékpótlási célból 0,5 ml fiziológiás sóoldatot, valamint gyulladáscsökkentés és fájdalomcsillapítás céljából 0.05 mg/kg meloxicámot (Metacam, Boehringer Ingelheim) kaptak intraperitoneálisan, majd a perfúzió előtti 8-14 napos túlélési időre külön ketrecekbe helyeztük el őket.

Retrográd pályajelölés kiértékelése

A pályajelölő anyagok beadási helyeit 50 μm vastag metszetekből, egy Zeiss Axioplan 2 fluoreszcens mikroszkóp segítségével rekonstruáltuk, hogy megtudjuk, az adott agyterület mekkora hányadát árasztotta el a pályajelölő anyag. Minden egyes metszetről készült képet ráillesztettünk a neki megfelelő metszetre a sztereotaxiás atlaszban (Paxinos & Franklin, 4. kiadás), majd Fiji/ImageJ program segítségével meghatároztuk az elárasztott és a teljes agyterület arányát: teljes agyterületnek tekintettük a hippocampus esetében a CA1-3-mat és a gyrus dentatust, a mediális szeptum esetében a mediális szeptális területet és a Broca-féle diagonalis köteget, a mediális prefrontális kéreg esetében az elülső cinguláris kérget (A24a-b), a prelimbikus kérget (A32) és az infralimbikus kérget (A25). A felhasznált állatokban az egyes helyekre beadott pályajelölő anyagok nem csorogtak ki ezekről a területekről.

Egy állat esetében, amelybe a két pályajelölő anyagot a hippocampusba és a mediális prefrontális kéregbe adtuk be (3. egér), valamint 2 állat esetében, amelyekbe a két pályajelölő anyagot a mediális szeptumba és a mediális prefrontális kéregbe adtuk be (4-5. egér), négyes fluoreszcens festést végeztünk el a kétféle pályajelölő anyagon kívül szerotoninra és vGluT3-ra is. A képalkotás egy Nikon A1R konfokális mikroszkóppal történt, 2 μm -enként készítettünk konfokális képet mind a négy gerjesztési tartományban. A retrográd módon visszajelölődött (FG- vagy KTB-pozitív) sejtek megszámlálása, majd ezek neurokémiai azonosítása (szerotonin- vagy vGluT3-pozitív) a NIS-Elements program segítségével történt. Hogy csökkentsük a sejtek eltérő méretéből származó torzítást, az egyes sejtípusok arányaira elvégeztük az Abercrombie-féle korrekciót (Abercrombie 1946).

Két-két állat esetében, amelyekbe a két pályajelölő anyagot a hippocampusba és a mediális prefrontális kéregbe (6-7. egér), illetve a mediális szeptumba és a mediális prefrontális kéregbe adtuk be (8-9. egér), kettős fluoreszcens festést végeztünk el a kétféle pályajelölő anyagokra. Az 50 μm vastag, MRR-t tartalmazó középagyi metszetekről a képalkotás egy Olympus FluoView 300 konfokális mikroszkóp segítségével történt; minden

egy-
metszet
esetében
5 µm-enként
készítettünk
konfokális
képet
mindkét
gerjesztési
tartományban.
A visszajelölődött
sejtek
megszámlálása
Adobe Photoshop
program
segítségével
történt.

Mindegyik kísérletben a MRR-n belül külön vizsgáltuk a MR és a PMR területeket, a határok megállapítása sztereotaxiás atlással (Paxinos & Franklin, 4. kiadás) történt. A mérések során nem találtunk eltéréseket a sejtek arányaiban a két terület között, leszámítva, hogy a MR-ban jóval nagyobb volt az általunk vizsgált sejtípusok sűrűsége.

EREDMÉNYEK

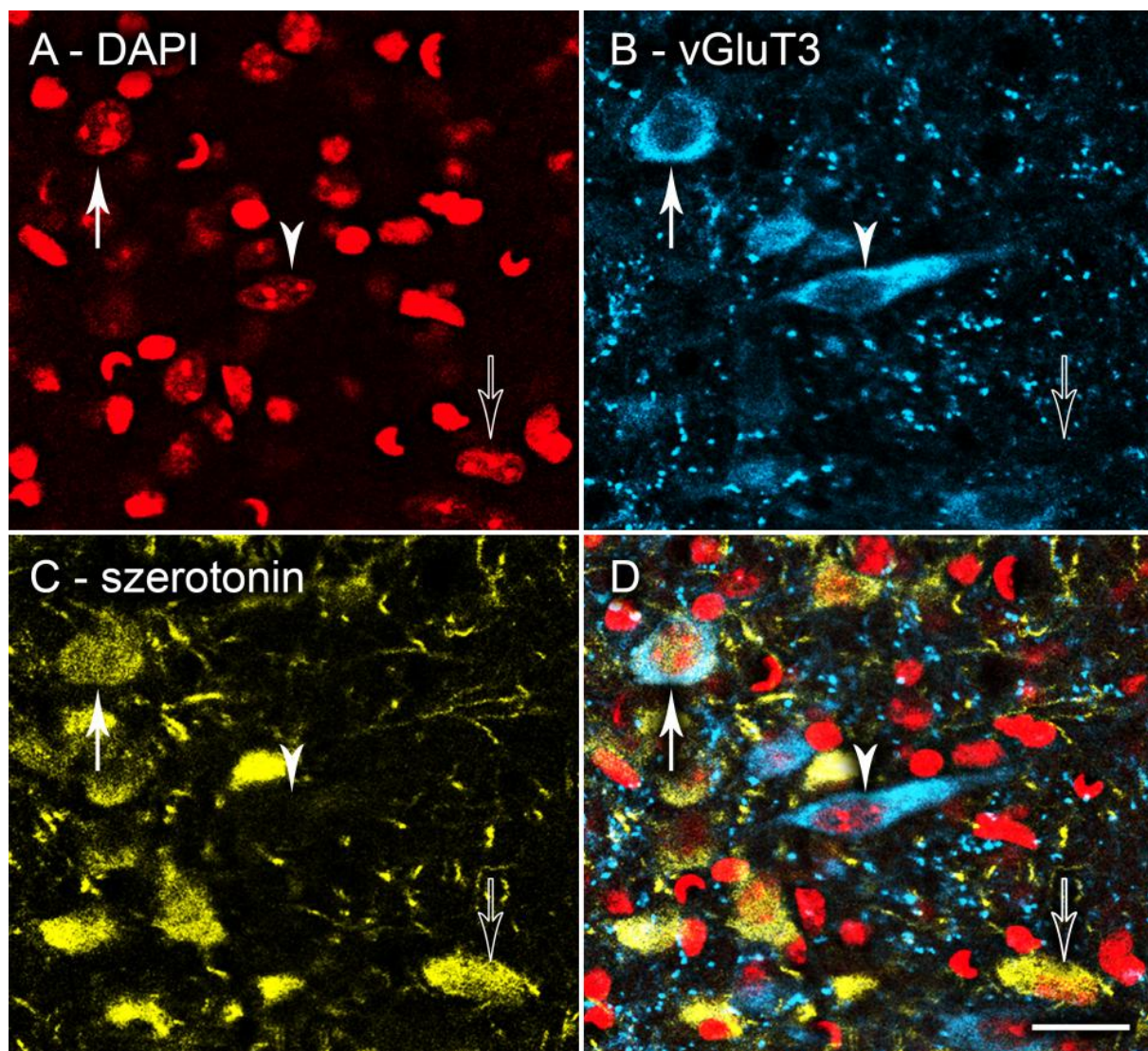
A három vetítő idegsejtípus száma és egymáshoz viszonyított aránya a MRR-ban

Kvantitatív sztereológiai módszerek segítségével, két egér adatai alapján azt találtuk, hogy a MR-ban átlagosan körülbelül 4900 vetítő idegsejt található, valamint, hogy ezen sejteknek körülbelül 80%-a tartalmaz vGluT3-at (szerotoninnal vagy anélkül), míg 20%-a csak szerotonint (vGluT3 nélkül; 2. ábra). Megállapíthatjuk tehát, hogy a MRR három fő vetítő sejtípusának legnagyobb része alkalmas glutamaterg jelátvitel létrehozására. Az eredményekről a 2. táblázat nyújt részletes áttekintést.

A MRR-ban található, különböző célterületekre vetítő idegsejtek szerotonerg és glutamaterg természete

Miután meghatároztuk a három fő vetítő sejtípus számát és arányát a MRR-ban, megvizsgáltuk, hogy a vGluT3 tartalom mennyire jellemző a különböző előagyi területekre vetítő sejtek esetében, hiszen a három sejtípus nem feltétlenül vetít a mag minden célterületére egyforma arányban. Fontos tehát látnunk, hogy MRR mely célterületein valósulhat meg jelentős mértékben a gyors serkentő glutamaterg jelátvitel. A MRR MR és PMR alrégióit külön vizsgáltuk, ám a három neurokémiaileg különböző sejt arányát tekintve nem találtunk különbséget, így az adatokat a teljes MRR-ra vonatkoztatva tüntetjük fel.

A hippokampusz és a mediális szeptum esetében patkányon már korábban is végeztek hasonló vizsgálatokat (Jackson *et al.* 2009), így a hippokampusz esetében 1 (3. egér), míg a mediális szeptum esetében 2 egéren (4-5. egér) végeztük el a méréseinket, melyek eredményei lényegében megegyeznek az említett kísérletével: a hippokampuszból visszajelölődött sejtek 80%-a volt pozitív vGluT3-ra, míg 8%-a csak szerotoninra (3. ábra);



2. ábra: DAPI, vezikuláris glutamát transzporter 3 (vGluT3) és szerotonin jelölés a median rapheban (MR). A sztereológiai mérés során a DAPI-val egyértelműen megjelölt sejtmagokat (A) számoltuk meg a mérő kockákban, majd ezeket a sejteket vGluT3 (B), illetve szerotonin (C) tartalom szerint osztályoztuk. A tele nyíllal megjelölt sejt kettősen pozitív, míg a nyílhegygel megjelölt csak vGluT3-ra, az üres nyíllal megjelölt pedig csak szerotoninra pozitív. A kettősen negatív sejtmagok gliasejtek, esetleg más neurokémiai tulajdonságú idegsejtek. A D ábra egyszerre mutatja a háromféle jelölést. Skála: 20 μ m.

ugyanezek az értékek a mediális szeptumból visszajelölődött sejtek esetében átlagosan körülbelül 61%, illetve 12% (4. ábra). A MRR-ból a mediális prefrontális kéregbe vetítő sejtek neurokémiai tulajdonságait eddig még nem vizsgálták. Három állat (3-5. egér) adatai alapján azt találtuk, hogy a mediális prefrontális kéregből visszajelölődött sejteknek átlagosan körülbelül 71%-a tartalmaz vGluT3-at, míg 16%-a csak szerotonint (3-4. ábra). Az

eredményekről a 3. táblázat nyújt részletes áttekintést. Megállapíthatjuk tehát, hogy a MRR-ból az említett előagyi célterületekre vetítő idegsejteknek jelentős hányada tartalmaz glutamaterg ingerületátvitelre alkalmas vGluT3-at.

2. táblázat: A sztereológiai mérés eredményei. A táblázatban feltüntettük az egyes állatokban a mintavételezési helyek számát és az ezekben megszámlolt összes sejt, illetve a három fő vetítő idegsejttípus (szerotonerg és/vagy glutamaterg sejtek) mintavételezési számát (Q). Ezekből az adatokból az optikai frakcionátor módszer segítségével megtudhatjuk ezeknek a sejteknek a számát (N) a median rapheban (MR). Feltüntettük a három vetítő sejttípus egymáshoz viszonyított arányát is. vGluT3: vezikuláris glutamát transzporter 3, 5-HT: szerotonin.

Állat	1. egér		2. egér	
Mintavételezési helyek száma	128		141	
Az összes mintavételezett sejt (DAPI-val jelölt sejtmagok) száma (Q)	210		217	
Mintavételezett sejtek száma (Q) a vGluT3+ és 5-HT+ kettősen pozitív sejttípusból	12		8	
Mintavételezett sejtek száma (Q) a csak vGluT3+ sejttípusból	29		29	
Mintavételezett sejtek száma (Q) a csak 5-HT+ sejttípusból	13		7	
Az összes sejt száma a MR-ban (N)	20470		22291	
Az összes vetítő sejt száma a MR-ban (N)	5264		4520	
vGluT3+ és 5-HT+ sejtek száma a MR-ban (N)	1170	22%	822	18%
Csak vGluT3+ sejtek száma és aránya a MR-ban (N)	2827	54%	2979	66%
Csak 5-HT+ sejtek száma a MR-ban (N)	1267	24%	719	16%

A MRR-ban található idegsejtek egyidejűleg vetíthetnek a hippokampuszba és a mediális prefrontális kéregbe

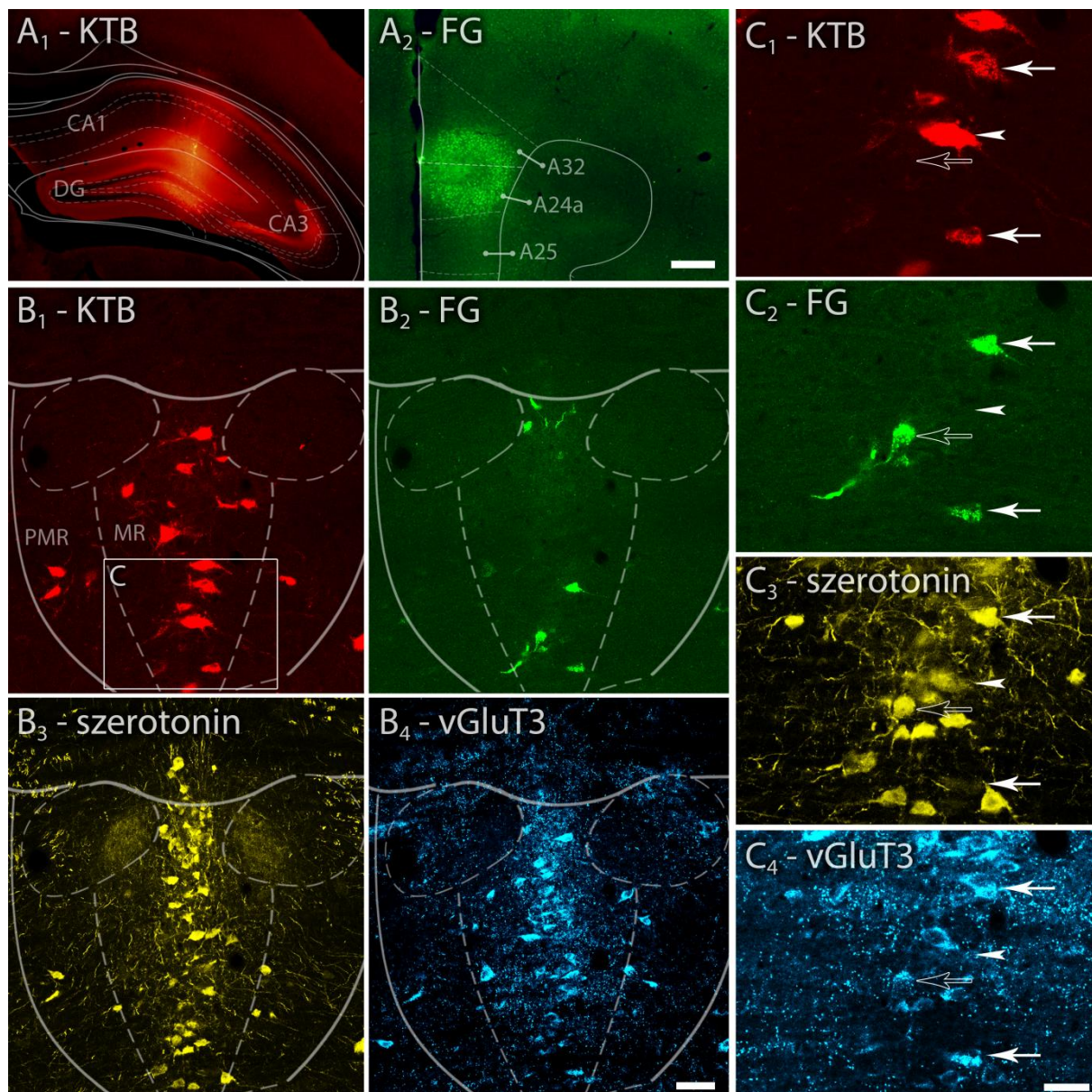
Amennyiben a MRR glutamaterg sejtjei képesek lehetnek kollaterálisok segítségével egyidejűleg több előagyi terület beidegzésére, úgy a MRR ezen agyterületek

szinkronizációján keresztül képes lehet a kérgi hálózati aktivitás gyors és hatékony modulációjára. A hippocampusz és a mediális szeptum kettős beidegzését patkányban korábban már vizsgálták (McKenna & Vertes 2001), így ilyenfajta kettős visszajelölést nem végeztünk, azonban a hippocampusz-mediális prefrontális kéreg és a mediális szeptum-mediális prefrontális kéreg kettős vetítés lehetősége még ismeretlen. Három állat esetében FG-ot adtunk be a mediális prefrontális kéregbe a bal agyféltekében és KTB-et a bal oldali hippocampuszba (3. és 6-7. egér), hogy megtudjuk, a MRR sejtjei vetíthetnek-e mindkét előagyi területre. Ez a módszer több ok miatt is a kettősen vetítő neuronok számának alulbecsléséhez vezet: (1) a célterületek teljes elárasztása a pályajelölő anyagokkal nem lehetséges anélkül, hogy azok ne csorogjanak ki más szomszédos területekre, amit mindenképpen elkerültünk és (2) a MRR-ból érkező rostok nem feltétlenül hálózák be a teljes célterületet, így a pályajelölő anyagok beadási helyén sem feltétlenül találhatók meg. Figyelembe véve a módszer e jellemzőit, illetve azt, hogy a célterületek mekkora hányadát árasztottuk el a pályajelölő anyagokkal, a visszajelölődött sejtek jelentős hányada vetített mindkét célterületre: átlagosan a hippocampuszt beidegző sejteknek legalább 10%-a beidegzi a mediális prefrontális kérget is, míg a mediális prefrontális kérget beidegző sejteknek legalább 6%-a beidegzi a hippocampuszt is. Egy állat esetében a MRR-n a pályajelölő anyagok mellett szerotoninra és vGluT3-ra is immunfluoreszcens festést végeztünk el, így ezeket a kettősen vetítő sejteket neurokémiaiilag azonosítottuk is. Azt találtuk, hogy a kettősen vetítő sejteknek több mint 90%-a pozitív vGluT3-ra és ezeknek legnagyobb része szerotoninra is pozitív (3. ábra). Az eredményekről a 4. táblázat nyújt részletes áttekintést.

A MRR-ban található idegsejtek egyidejűleg vetíthetnek a mediális szeptumba és a mediális prefrontális kéregbe

Négy állat esetében FG-ot adtunk be a mediális prefrontális kéregbe mindkét agyféltekében és KTB-et a mediális szeptumba (4-5. és 8-9. egér), hogy megtudjuk, a MRR sejtjei vetíthetnek-e mindkét előagyi területre. Azt találtuk, hogy átlagosan a mediális szeptumot beidegző sejteknek legalább 9%-a beidegzi a mediális prefrontális kérget is, míg a mediális prefrontális kérget beidegző sejteknek legalább 10%-a beidegzi a hippocampuszt is.

Két állat esetében (4-5. egér) ezeket a vetítő sejteket neurokémiaiilag azonosítottuk is. Azt találtuk, hogy a kettősen vetítő sejteknek átlagosan körülbelül 80%-a pozitív vGluT3-ra és ezeknek körülbelül a harmada szerotoninra is pozitív (4. ábra). Az eredményekről az 5. táblázat nyújt részletes áttekintést.



3. ábra: A median raphe régió (MRR) hippokampuszba, illetve mediális prefrontális kéregbe vetítő idegsejtjeinek neurokémiai azonosítása. A MRR-ban található idegsejtek egyidejűleg vetíthetnek a hippokampuszba és a mediális prefrontális kéregbe. **A1-2:** A pályajelölő anyagok beadási helyei az előagyi területeken. A kolera toxin B alegység (KTB) beadási helye az egyik oldali hippokampuszban (A1), illetve a Fluoro-Gold (FG) beadási helye az egyik oldali mediális prefrontális kéregben (A2). CA1, CA3: a hippokampusz területei; DG: gyrus dentatus; A24a, A25, A32: a mediális prefrontális kéreg alrégiói. Skála: 200 μ m. **B1-4:** Konfokális mikroszkópos felvételek egyazon MRR-ról, különböző, a jelöléseknek megfelelő gerjesztési tartományokban. A piros sejtek (B1) a hippokampuszba, míg a zöld sejtek (B2) a mediális prefrontális kéregbe vetítenek. A sárga sejtek (B3) szerotonint, míg a kék sejtek (B4) vezikuláris glutamát transzporter 3-at (vGluT3) tartalmaznak. A C terület a B1 képen a C1-4 kinagyított képek helyzetét mutatja. MR: median raphe; PMR: paramedian raphe. Skála: 100 μ m. **C1-4:** Nagyobb nagyításon készült, konfokális mikroszkópos felvételek a MRR egyazon sejtcsoportjáról, a különböző gerjesztési tartományokban. A nyílhegy egy a hippokampuszba vetítő (C1), csak szerotonin tartalmú (C3) sejtet jelöl. Az üres nyíl egy a mediális prefrontális kéregbe vetítő (C2), szerotonint és vGluT3-at (C4) is tartalmazó sejtire mutat. A tele nyíllal megjelölt sejtek mindkét előagyi területre vetítenek, a felső sejt szerotonint és vGluT3-at is, míg az alsó sejt csak vGluT3-at tartalmaz. Skála: 30 μ m.

3. táblázat: A különböző előagyi területekre vetítő idegsejtek szerotonerg és glutamaterg természete a median raphe régióban (MRR). A táblázatban feltüntettük, hogy a MRR három különböző előagyi célterületéről retrográd módon visszajelölődött idegsejtek milyen arányban tartalmaznak szerotonint (5-HT), illetve vezikuláris glutamát transzporter 3-at (vGluT3).

Előagyi célterület	Állat	Vissza-jelölődött sejtek száma a MRR-ban	A különböző neurokémiai tulajdonságú visszajelölődött sejtek aránya a MRR-ban			
			vGluT3+ és 5-HT+	csak vGluT3+	csak 5-HT+	jelöletlen (vGluT3- és 5-HT-)
hippokampusz	3. egér	391	49%	31%	8%	12%
mediális szeptum	4. egér	850	19%	34%	13%	34%
	5. egér	710	22%	47%	10%	21%
mediális prefrontális kéreg	3. egér	506	32%	38%	21%	9%
	4. egér	555	24%	45%	16%	15%
	5. egér	334	29%	46%	10%	15%

4. táblázat: A hippokampuszba és a mediális prefrontális kéregbe egyidejűleg vetítő idegsejtek aránya a median raphe régióban (MRR), valamint ezen sejtek neurokémiai tulajdonságai. A táblázatban feltüntettük, hogy az előagyi célterületeknek mekkora hányadát árasztottuk el a retrográd pályajelölő anyagokkal. Ezenkívül látható a kettősen vetítő sejtek aránya, illetve azok szerotonerg és glutamaterg természete is. vGluT3: vezikuláris glutamát transzporter 3, 5-HT: szerotonin.

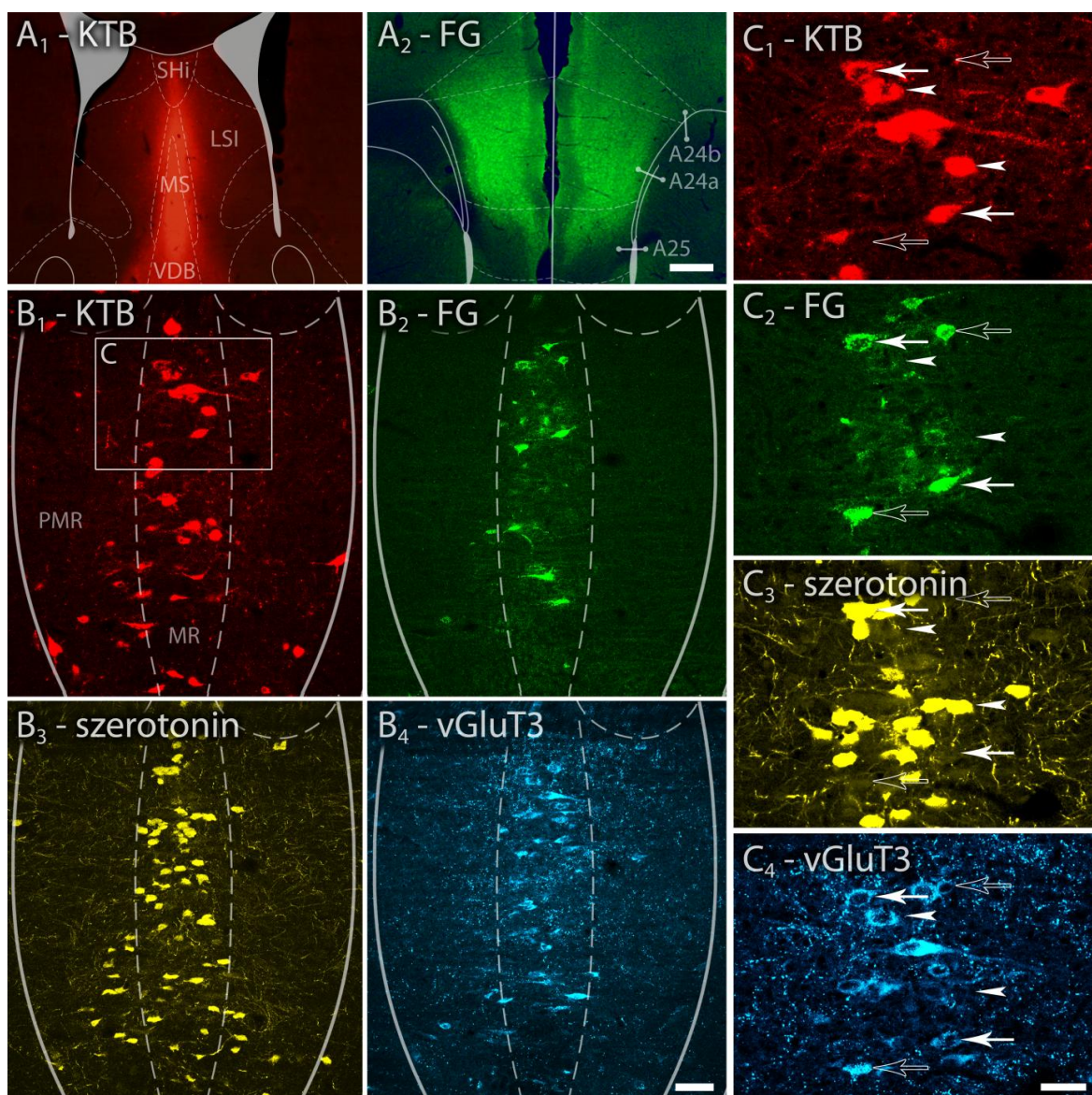
Állat		6. egér	7. egér	3. egér
A teljes bal oldali hippokampusz azon hányada, amelyet elárasztott a beadott pályajelölő anyag		11%	12%	13%
A teljes bal oldali mediális prefrontális kéreg azon hányada, amelyet elárasztott a beadott pályajelölő anyag		8%	9%	13%
A hippokampuszt beidegző sejteknek azon hányada, amely egyidejűleg beidegzi a mediális prefrontális kérget is		9/166 (5,4%)	11/96 (11,5%)	46/391 (11,9%)
A mediális prefrontális kérget beidegző sejteknek azon hányada, amely egyidejűleg beidegzi a hippokampuszt is		9/156 (5,8%)	11/304 (3,6%)	46/506 (8,7%)
A különböző neurokémiai tulajdonságú kettősen vetítő sejtek aránya az összes kettősen vetítő sejt között a MRR-ban	vGluT3+ és 5-HT+	-	-	71%
	csak vGluT3+	-	-	20%
	csak 5-HT+	-	-	9%
	jelöletlen (vGluT3- és 5-HT-)	-	-	0%

5. táblázat: A mediális szeptumba és a mediális prefrontális kéregbe egyidejűleg vetítő idegsejtek aránya a median raphe régióban (MRR), valamint ezen sejtek neurokémiai tulajdonságai. A táblázatban feltüntettük, hogy az előagyi célterületeknek mekkora hányadát árasztottuk el a retrográd pályajelölő anyagokkal. Ezenkívül látható a kettősen vetítő sejtek aránya, illetve azok szerotonerg és glutamaterg természete is. vGluT3: vezikuláris glutamát transzporter 3, 5-HT: szerotonin.

Állat	8. egér	9. egér	4. egér	5. egér	
A teljes mediális szeptum azon hányada, amelyet elárasztott a beadott pályajelölő anyag	16%	11%	23%	9%	
A teljes bilaterális mediális prefrontális kéreg azon hányada, amelyet elárasztott a beadott pályajelölő anyag	21%	24%	17%	21%	
A mediális szeptumot beidegző sejteknek azon hányada, amely egyidejűleg beidegzi a mediális prefrontális kérget is	23/395 (5,8%)	30/319 (9,4%)	91/850 (10,9%)	64/710 (9,2%)	
A mediális prefrontális kérget beidegző sejteknek azon hányada, amely egyidejűleg beidegzi a mediális szeptumot is	23/686 (3,4%)	30/1050 (2,9%)	91/555 (16,0%)	64/334 (18,6%)	
A különböző neurokémiai tulajdonságú kettősen vetítő sejtek aránya az összes kettősen vetítő sejt között a MRR-ban	vGluT3+ és 5-HT+	-	-	32%	37%
	csak vGluT3+	-	-	35%	55%
	csak 5-HT+	-	-	15%	5%
	jelöletlen (vGluT3- és 5-HT-)	-	-	18%	3%

MEGBESZÉLÉS ÉS ÖSSZEFOGLALÁS

Fő eredményeink tehát a következők: (1) a MRR három fő vetítő sejtípusának, a szerotonerg, glutamaterg vagy az ezekre kettősen pozitív idegsejteknek igen nagy hányada tartalmazza a glutamaterg jelátvitelhez szükséges vGluT3-at, (2) a MRR különböző előagyi célterületeire vetítő idegsejtjeinek szintén jelentős hányada glutamaterg és (3) a MRR-ban nagy számban találhatók olyan idegsejtek, melyek egyidejűleg több előagyi területre is vetítenek és ezeknek is jelentős hányada tartalmaz vGluT3-at.



4. ábra: A median raphe régió (MRR) mediális szeptumba, illetve mediális prefrontális kéregbe vetítő idegsejtjeinek neurokémiai azonosítása. A MRR-ban található idegsejtek egyidejűleg vetíthetnek a mediális szeptumba és a mediális prefrontális kéregbe. **A1-2:** A pályajelölő anyagok beadási helyei az előagyi területeken. A kolera toxin B alegység (KTB) beadási helye a mediális szeptumban (A1), illetve a Fluoro-Gold (FG) beadási helye a mediális prefrontális kéregben (A2). MS: mediális szeptum; VDB: Broca-féle diagonális köteg; SHi: szepto-hippokampális mag; LSI: laterális szeptum; A24a, A24b, A25: a mediális prefrontális kéreg alrégiói. Skála: 200 μ m. **B1-4:** Konfokális mikroszkópos felvételek egyazon MRR-ról, különböző, a jelöléseknek megfelelő gerjesztési tartományokban. A piros sejtek (B1) a mediális szeptumba, míg a zöld sejtek (B2) a mediális prefrontális kéregbe vetítenek. A sárga sejtek (B3) szerotonint, míg a kék sejtek (B4) vezikuláris glutamát transzporter 3-at (vGluT3) tartalmaznak. A C terület a B1 képen a C1-4 kinagyított képek helyzetét mutatja. MR: median raphe; PMR: paramedian raphe. Skála: 100 μ m. **C1-4:** Nagyobb nagyításon készült, konfokális mikroszkópos felvételek a MRR egyazon sejtcsoportjáról, a különböző gerjesztési tartományokban. A nyílhegyekkel megjelölt sejtek vetítenek a mediális szeptumba (C1), az alsó sejt csak szerotonint (C3), míg a felső sejt csak vGluT3-at (C4) tartalmaz. Az üres nyilakkal megjelölt sejtek vetítenek a mediális prefrontális kéregbe (C2), mindkét sejt csak vGluT3-at tartalmaz. A tele nyíllal megjelölt sejtek mindkét előagyi területre vetítenek, a felső sejt szerotonint és vGluT3-at is, míg az alsó sejt csak vGluT3-at tartalmaz. Skála: 30 μ m.

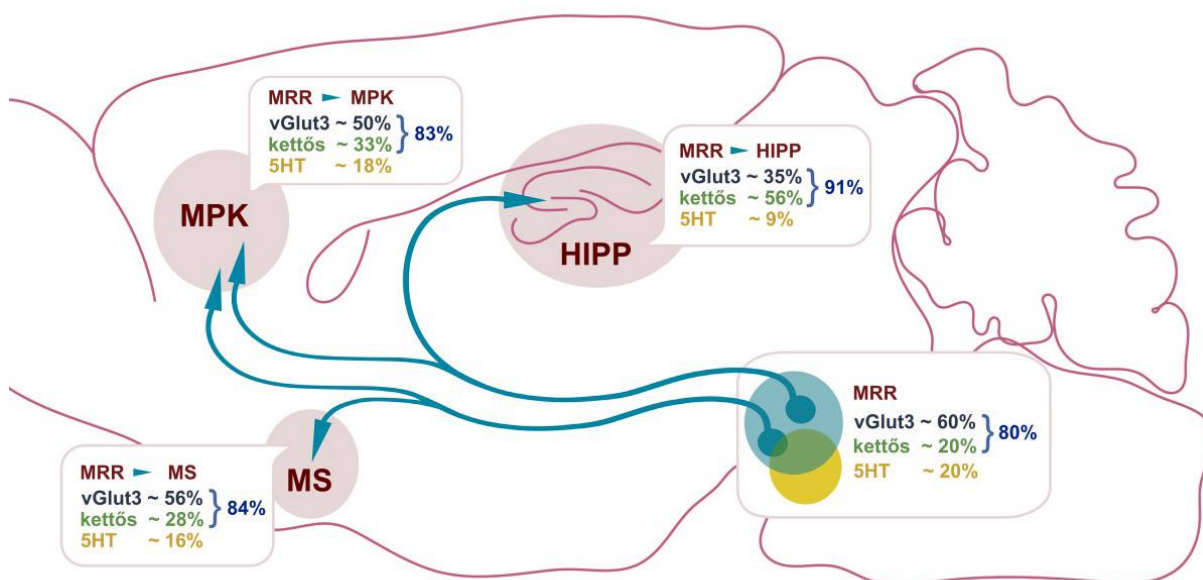
Sokáig úgy gondolták, hogy a MRR is egyike azoknak a közepagi monoaminerg magcsoportoknak, melyek fő szerepe a kérgi hálózatok lassú és tónusos modulációja, főként másodlagos hírvivőket aktiváló metabotróp receptorokon keresztül. Bár a MRR sejtjeinek igen nagy hányada tartalmaz szerotonint és emellett több előagi területen a MRR-ból eredő terminálisok és a szerotonin megfestése hasonló jelölési mintázatot eredményez (Freund *et al.* 1990), egyre inkább nyilvánvalóvá vált, hogy a MRR felszálló pályarendszerének létezik egy nem szerotonerg komponense is (Acsády *et al.* 1996; Aznar *et al.* 2004). Miután a MRR-ban is leírták a vezikuláris glutamát transzporterek 3-mas típusát (vGluT3; Freneau *et al.* 2002; Gras *et al.* 2002), kiderült, hogy a hippocampusban található vGluT3-pozitív terminálisoknak egy része szerotonin-tartalmú (Somogyi *et al.* 2004). Csak néhány évvel később mutatták meg ténylegesen, hogy a MRR-ból a hippocampusba vagy a mediális szeptumba vetítő sejteknek jelentős hányada tartalmaz vGluT3-at (Jackson *et al.* 2009), valamint bebizonyították, hogy ezek a vGluT3-pozitív sejtek képesek bizonyos hippocampusi GABAerg interneuronok glutamaterg serkentésére (Varga *et al.* 2009). Az említett vizsgálatok mindegyikét patkányon végezték el, majd egérben is kimutatták, hogy a hippocampusban, valamint a prefrontális kéregben a szerotonerg terminálisoknak mintegy fele tartalmaz vGluT3-at (Amilhon *et al.* 2010). Munkacsoportunkban korábban megmutattuk, hogy egérben a hippocampusban, a mediális szeptumban és a prefrontális kéregben a MRR által adott szinapszisok jelentős hányada tartalmaz NMDA-típusú glutamát receptorokat (Szőnyi *et al.* 2014) amely a glutamaterg transzmisszió általános meglétének fontos bizonyítéka.

Azonban ezelőtt még nem vizsgálták a MRR különböző sejtípusainak a számát kvantitatív módon. Jelen munkámban sztereológiai módszereket alkalmazva megmutattam, hogy a MRR három fő vetítő sejtípusának, a szerotonerg, glutamaterg vagy az ezekre kettősen pozitív idegsejteknek a legnagyobb része tartalmaz vGluT3-at. Ez elsősorban utal a MRR által megvalósított gyors serkentő glutamaterg transzmisszió jelentőségére, valamint új megvilágításba helyezheti a mag belső neuronális köreinek a szerveződését is. Bár a sztereológiai módszerek torzítása minimális, a megfelelő pontossághoz kellően nagy mintavételezés szükséges. Ennek megfelelően a meglévő két állat mellé további 4 állat mérése van folyamatban, amely segíti azt is, hogy az állatok közötti biológiai variabilitást jobban megértsük.

Ezt követően bebizonyítottuk, hogy a MRR-ban mind a három említett célterületre vetítő sejteknek jelentős hányada tartalmaz vGluT3-at, amely rámutat arra, hogy a

hippokampuszon kívül a mediális szeptumban és a mediális prefrontális kéregben is nagy jelentősége lehet a MRR által adott gyors és precíz glutamaterg serkentésnek.

Ezenkívül elsőként mutattuk meg, hogy egérben a MRR sejtjeinek jelentős hányada képes a hippokampusz és a mediális prefrontális kéreg, valamint a mediális szeptum és a mediális prefrontális kéreg egyidejű beidegzésére, illetve hogy ezeknek a sejteknek jelentős hányada tartalmaz vGluT3-at. Ezen eredményeink rámutatnak arra, hogy a MRR az előagyi GABAerg interneuronok serkentésével főként glutamaterg jelátvitelen keresztül fontos szerepet játszhat ezen agyterületek szinkronizálásában (5. ábra).



5. ábra: Legfontosabb eredményeim sematikus ábrázolása. A median raphe régióban (MRR) feltüntettük a szerotonerg, glutamaterg és kettősen pozitív sejtek egymáshoz viszonyított arányát, melyből kitűnik a MRR glutamaterg tulajdonságának jelentősége. Hasonló arányokat láthatunk, ha a három sejtípus egymáshoz viszonyított arányát a MRR különböző előagyi célterületeire vetítő sejtek körében tüntetjük fel. HIPP: hippokampusz; MS: mediális szeptum; MPK: mediális prefrontális kéreg; vGluT3: vezikuláris glutamát transzporter 3; 5HT: szerotonin.

Összefoglalva tehát eredményeink azt mutatják, hogy a MRR, szerotonerg modulációján túl, képes lehet egy szerteágazó és jelentős glutamaterg jelátvitel megvalósítására. Láttuk, hogy a glutamaterg jelátvitelre alkalmas sejtek száma jóval meghaladja a kizárólag szerotonerg transzmisszióra képes sejtekét a MRR-ban. Továbbá kimutattuk, hogy a glutamaterg jelátvitel túlsúlya igaz a mag különböző előagyi célterületeire is, azaz a hippokampuszon és a mediális szeptumon túl a prefrontális kéregre is, valamint, hogy glutamaterg kettősen vetítő sejteken keresztül a MRR szerepet játszhat ezen előagyi területek szinkron aktivitásának fenntartásában. Így a MRR igen hatékony és kifinomult

módon szabályozhatja a kérgi hálózati aktivitást, melyben a modulátoros lassú hatású szerotonin mellett a gyors serkentő hatású glutamát is kulcs szerep jut.

Az agykérgi, illetve más előagyi területek összehangolt aktivitása fontos eleme az emlékségi működésének, kiváltképp a tanulási és memóriefolyamatokban, döntéshozatalban. Előagyi kapcsolatrendszerük révén a különböző agytörzsi területek, így a MRR is szerepet játszik ezen kérgi neuronhálózatok szabályozásában. Azonban a MRR ezen funkciója megvalósulhat egy gyors serkentő jelátvitelen keresztül, így szerepet kaphat a hálózati aktivitás másodpercek alatt történő megváltoztatásában, ezen keresztül pedig a rugalmas viselkedés kialakításában. Ez a tény számos új kérdést vet fel és közelebb vihet bennünket a MRR, illetve a teljes szerotonerg rendszer további funkcióinak és neuropszichiátriai betegségekben betöltött szerepének megértéséhez.