

## **Kutatási zárójelentés OTKA K 73219**

Kutatóprogramunk három alapvető témakörre terjedt ki:

1. Az L-aszpartát lehetséges szerepe a striatum szabályozó mechanizmusában,
2. A subpallium magcsoportjainak szerkezete és kapcsolatrendszere, különös tekintettel a madár nucleus accumbensre,
3. Viselkedési válaszok a striatum/nucl. accumbens excitatórikus aminosav szintjeivel korreláltn. Neuroaktív ágensek szerepe.

A beszámolóban sorjában ezeket a témákat érintjük, összegezve a megvalósult kutatási eredményeket (az ide vágó *in extenso* közlemények feltüntetésével), valamint kitérünk azokra a pontokra, ahol a terv nem, vagy nem teljesen valósult meg. A beszámolót kiegészítjük az eredeti tervben nem szereplő, de időközben megvalósult kutatásokkal.

### **1. Az L-aszpartát lehetséges szerepe a striatum szabályozó mechanizmusában**

Korábbi, a pályázatban foglaltakat részben megalapozó munkánkban (Ádám és Csillag, 2006) leírtuk az L-aszpartát (Asp) előfordulását a csirke arcopalliumban (amygdala-ekvivalens régió), valamint elektronmikroszkópos immucitokémia segítségével kimutattuk az Asp jelenlétét a striatum ill. nucl. accumbens excitatórikus (aszimmetrikus szinapszissal bíró, kerek, üres vezikulákat tartalmazó) axonterminálisaiban. Hasonló terminálisok tartalmaztak L-glutamátot (Glu) is, részben kolokalizálva az Asp-tal. A Glu és a dopaminerg bemenet együtthatását a striatum projekciós neuronjaira (közepes tüskés neuronok) madárban összefoglalóan tanulmányoztuk, megállapítva a Glu valamint a dopaminoceptív neuronokra jellemző messenger molekula, a DARPP-32 korrelált előfordulását a csirke striatumában (Csillag et al., 2008). Az Asp jelenléte, szelektív és meglehetősen kiterjedt előfordulása a csirke striatumában arra utalt, hogy jelentős és a Glu-tól részben eltérő szereppel rendelkezhet.

A tervezett programmal összhangban folytattuk az Asp szelektív neurális pályákban és szinapszisaiban történő kimutatását. Patkányban a basolateralis amygdalába juttatott anterográd pályajelölő anyagokkal (HRP, BDA) azonosítottuk a nucl. accumbensben megjelenő projekciókat és szinapszisaikat, amelyekben az Asp immuno-elektronmikroszkópia segítségével kimutatható volt. Hasonlóan, csirkéken is pályajelölő anyagot juttattunk az amygdala-ekvivalens területre, és az accumbensbe (ill. med. striatumba) projiciáló jelzett axonterminálisok ugyancsak Asp-immunreaktívoknak bizonyultak. A madárban az Asp szelektív jelenléte még kifejezettebbnek tűnik mint az emlősben (ennek kvantitatív elemzésére később kerülhet sor), míg mindkét fajon egyértelmű az Asp és a Glu morfológiailag azonos elemekben való előfordulása (részben kolokalizációja).

Elsőként írtunk le tehát madárban (emlős homológián alapuló egybevetéssel) olyan pályarendszert, amely Asp-ot szelektíven tartalmaz. A munka egyes részeit kongresszusi absztraktban közöltük, majd az első teljes közleményt 2011 végén benyújtottuk, jelenleg átdolgozott formában újra-elbírálás alatt áll a Cell and Tissue Research c. folyóiratnál.

Az Asp hatásmechanizmusának elemzésében fontos új elem a csirke nucleus accumbens tartalmazó túlélő agyszeleteken végzett elektrofiziológia. Ehhez Intézetünkben Dr Gerber Gábor és munkatársa, Balázs Dávid, nyújtottak segítséget. Kiválasztott neuronokon (medium spiny) patch clamp elektród segítségével vizsgáltuk a szuperfúziós közegbe juttatott Asp és Glu membránra gyakorolt hatását. Az eddigi eredmények (amelyekből kongresszusi absztrakt is készült) azt mutatják, hogy mindkét aminosav kb. azonos mértékű, koncentrációfüggő membránáram-választ (depolarizáció) generál, és ezen változások gátolhatók mind az NMDA receptorokra ható AP4, mind pedig az AMPA/kainát receptorokra ható CNQX segítségével. Ez arra utal, hogy – ellentétben egyes irodalmi adatokkal – az Asp mindkét ionotróp Glu receptoron kifejtheti hatását. További fontos megfigyelés volt, hogy a két excitatórikus aminosav együttesen adva nem additív, hanem potencírozó hatású, ami arra mutat, hogy vagy részben különböző receptor-kötőhelyeket vesznek igénybe, vagy pedig egymás transzportját befolyásolhatják ilyen módon. Legutóbbi eredményeink az utóbbi magyarázatot támasztják alá, mivel TBOA (Glu-transzporter-gátló) jelenlétében a potencírozó hatás elmarad. Az eredményeket - az utóbbi kiegészítéssel - in extenso közlemény formájában ismételten benyújtottuk a Brain Research c. folyóirathoz. Miután az előző bírálat e kiegészítő kísérletek elvégzését tette az elfogadás feltételévé, várható a közlemény mielőbbi elfogadása. A munka eredményeit rövidebb formában a 2012. év októberében sorra kerülő amerikai SFN kongresszusra is benyújtottuk. Elsőként sikerült tehát madár striatumban, túlélő agyszeleten az Asp direkt posztzinaptikus hatásait igazolni, és a glutamáterg mechanizmusokkal együttesen elemezni.

Csillag A, Bálint E, Ádám ÁS, Zachar G: *The organization of the basal ganglia in the domestic chick (Gallus domesticus): Anatomical localisation of DARPP-32 in relation to glutamate*, Brain Res. Bull. 76, 183-191, 2008

Hanics J, Bálint E, Milanovich D, Ádám Á, Zachar G, Csillag A: *Amygdalofugal axon terminals immunoreactive for L-aspartate and L-glutamate in the nucleus accumbens of rats and domestic chickens*, Submitted to Cell and Tissue Research

Balázs D, Csillag A, Gerber G: *Effects of L-aspartate and its interaction with L-glutamate on single neurons in striatal slice preparation from chicken brain*, Submitted to Brain Research

## **2. A subpallium magcsoportjainak szerkezete és kapcsolatrendszere, különös tekintettel a madár nucleus accumbensre**

A házicsirke nucleus accumbens korábban igazolt szubdivízióinak (Bálint és Csillag, 2007) szelektív projekcióit tovább vizsgáltuk anterográd pályajelölés segítségével. Nagy számú állat feldolgozásával megállapítottuk az accumbens shell, core, valamint a rostralis pólus kapcsolatrendszerét. A munkát előbb kongresszusi absztrakt formájában ismertettük, majd egyes alsó agytörzsi projekciók (nucleus tractus solitarii, nucleus parabrachialis) retrográd pályajelöléssel történő megerősítése után in extenso közlemény formájában elfogadásra került (Bálint et al., 2011). A csirke nucleus accumbens szubdivíziók projekciói átfedést mutatnak a telencephalonban és a diencephalonban, míg az agytörzsben a projekciós területek szétválnak. Az ismertebb, és az emlős viszonyokhoz jórészt hasonló projekciók mellett új, sajátos projekciók voltak kimutathatók, főleg az alsó agytörzsben. Jelenleg azoknak a projekciós neuronoknak kémiai természetét vizsgáljuk, amelyek az accumbensből az említett alsó agytörzsi magokra vetítenek: ehhez a substance P, enkephalin, valamint neurotensin kimutatását végezzük, kettős fluoreszcens immunhisztokémia és retrográd pályajelölés (Fast Blue) kombinációjával. Az eddigi eredmények arra utalnak, hogy az alsó agytörzs felé irányuló projekciók jelentős részben neurotensint tartalmaznak. A folyamatban levő kvantitatív feldolgozást követően az eredményeket közleményhez készítjük elő. A madár accumbens pontosabb lokalizációjára és szubdivízióira vonatkozó eredeti megfigyeléseink a szakirodalomban alapvető jelentőségűek, amit az is alátámaszt, hogy helyt kaptak egy, a subpalliummal foglalkozó új nemzetközi review cikkben is (Kuenzel et al. 2011).

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

Bálint E, Mezey Sz, Csillag A: *Efferent connections of nucleus accumbens subdivisions of the domestic chicken (Gallus domesticus): An anterograde pathway tracing study*, J. Comp. Neurol. 519, 2922-2953, 2011

### *A házicsirke septum kapcsolatai és stressz-reakciókban betöltött szerepe*

Korábbi, a septumra vonatkozó munkánk folytatásaként leírtuk a csirke septum afferens kapcsolatrendszerét, a septalis szubdivíziók szerint. Megállapítottuk, hogy - az alapvető hasonlóságok mellett - az emlős septumhoz képest jelentős eltérések tapasztalhatók (Montagnese et al, 2008), amelyek bizonyos adaptív és életmódbeli eltérésekkel függhetnek össze. Radiofrekvenciás septalis léziókat követően megállapítottuk, hogyan változnak a madarak stressz-reakciói (distress call, motoros válaszok) társ hiányában ill. külső fenyegető

inger hatására. A septum léziója csökkenti az izolációs szorongással összefüggő viselkedési reakciókat, de a ragadozó hatására mutatott félelmi reakciókra nem hat. csökkenti a szorongási reakciókat. Az eredményeket kongresszusi absztraktban tettük közzé.

Montagnese CM, Zachar G, Bálint E, Csillag A: *Afferent Connections of Septal Nuclei of the Domestic Chick (Gallus domesticus). A Retrograde Pathway Tracing Study* J. Comp. Neurol., 511, 109-150, 2008

#### *Postnatalis neurogenesis vizsgálata házicsirkében*

Új, a munkatervben eredetileg nem szereplő kísérlet volt a neurogenesis vizsgálata, Mezey Szilviával együttműködve (aki saját OTKA pályázatában fő témaként foglalkozik a posztnatalis neurogenézissel). A NeuN valamint a doublecortin (Fox3) kimutatása alapján, 2 napos, 8 napos és 14 hetes csirkék vizsgálatával megállapítottuk, hogy jelentős számban képződnek posztembrionálisan is új neuronok a telencephalonban és a kisagyban, míg a subtencephalonban ez a folyamat hamarabb befejeződik. Az újonnan képződő sejtek többségükben elhagyják a paraventrikuláris zónát, azonban legalább a 7. posztembrionális napig maradnak ott olyan sejtek, amelyek helyben érnek meg. A proliferáló sejtek mind rostralis, mind lateralis migrációban részt vesznek. Az eredményeket kongresszusi absztraktban tettük közzé, majd a munkát in extenso közleményben elfogadták (Mезey et al, 2012). A posztembrionális neurogenesis befolyásolására tett kísérletként, etanol per os alkalmazással, megfelelő dózisban adva, gátolja a nucl. accumbens és a hippocampus új sejtjeinek képződését. Az eredményeket kongresszusi absztraktban tettük közzé. Ezt a kísérleti vonalat a későbbiekben is folytatni kívánjuk neuroaktív ill. pszichoaktív drogok tesztelése érdekében (l. alább a 3. pontban is).

Mезey Sz, Krivokuca D, Bálint E, Adorján A, Zachar G, Csillag A: *Postnatal changes in the distribution and density of neuronal nuclei and doublecortin antigens in domestic chicks (Gallus domesticus)*, J. Comp. Neurol. 520, 100-116., 2012

### **3. Viselkedési válaszok a striatum/nucl. accumbens excitatórikus aminosav szintjeivel korreláltak. Neuroaktív ágensek szerepe.**

2010 folyamán befejeződött a szabadon mozgó és viselkedő csirkéken végezhető in vivo mikrodialízis rendszer kiépítése. A SE Gyógyszerhatástani Intézetével (Prof. Szökő Éva) létesített kollaboráció révén hozzáférést kaptunk az ott működő kapilláris elektroforézis laboratóriumhoz. Az in vivo mintavétel, valamint az L-glutamát (Glu) és L-aszpartát (Asp) detektálásához szükséges feltételek optimalizálása 2010 áprilisában lezárult. A két aminosav

párhuzamos és szelektív detektálásának új módszeréről, és annak biológiai rendszerben történő alkalmazásáról metodikai közlemény készült (Wagner et al. 2011). Ezután a két aminosav extracelluláris felszabadulását vizsgáltuk, részben magas  $K^+$ -mal kiváltva, részben stressz hatására. Megállapítottuk, hogy az Glu és Asp hasonló nagyságrendben, bár a kezdeti szinthez képest eltérő mértékben szabadul fel a nucleus accumbens területén magas  $K^+$  hatására, valamint (lassúbb emelkedéssel és kisebb amplitudóval) enyhe stressz hatására, majd a tetőzés után hamar visszatér a kezdeti érték közelébe. Bizonyítottuk a folyamat  $Ca^{2+}$  – függését (a Glu esetében) valamint TTX függését (mindkét excitatórikus aminosav esetében), tehát a felszabadulás mechanizmusa - legalábbis jelentős részben - szinaptikus eredetű. A fent leírt kétféle megközelítésen túl (morfológiai és elektrofiziológiai), amelyek a transzmitter jelenlétét valamint posztzinaptikus hatását igazolták, újabb független módszer (in vivo mikrodialízis) segítségével mutattuk ki az Asp Glu-tól elkülöníthető release mechanizmusát a madár striatum/accumbens területén. A munka e részéről kongresszusi absztrakt készült, majd in extenso közlemény formájában közlésre elfogadva, megjelenés alatt áll (Zachar et al., 2012). A partner laboratóriummal együtt kidolgoztunk egy eljárást az említett aminosavak L és D enantiomerjeinek analitikai elkülönítésére, szelektív hatások tanulmányozása céljából. Agyszövet homogenizátumból kinyert mintákban már sikerült elkülönítve mérni az egyes enantiomereket. Jelenleg e munka metodikai részéből, illetve az L- és D-Asp valamint L- és D-Glu sejtproliferációs zónákban végzett kvantitatív méréseiből származó eredmények publikációra történő előkészítése zajlik. A továbbiakban a módszert ki kívánjuk terjeszteni mikrodialízis mintákra is.

Wagner Z, Tábi T, Zachar G, Csillag A, Szökő É: *Comparison of quantitative performance of three fluorescence labels in CE/LIF analysis of aspartate and glutamate in brain microdialysate*, Electrophoresis 32, 2816-22, 2011

Zachar G, Wagner Z, Tábi T, Bálint E, Szökő É, Csillag A: *Differential changes of extracellular aspartate and glutamate in the striatum of domestic chicken evoked by high potassium or distress: an in vivo microdialysis study*, Neurochem. Res., 2012 in press, (DOI: 10.1007/s11064-012-0783-4)

### *Pszichoaktív drogok hatása a memória kialakulására és előhívására a passzív elkerüléssel tanulási modellben*

Az irodalomban jelenleg általánosan elfogadottá vált madár modellek alkalmazása a tanulás és memória-rögzülés vizsgálatára, jelesül a háziszárnyas passzív elhárító tanulási tesztje, mint a korai adaptív tanulás jól tanulmányozható, egyszerű példája (Gibbs et al., 2008). Ezt a modellt laboratóriumunk is rendszeresen alkalmazta a múltban is, és ebbe a vonalba illeszkedett az a vizsgálatunk is, amelynek során fiatal csirkéken kimutattuk a CB1

cannabinoid antagonist hatású gyógyszer-molekula, a rimonabant memóriára gyakorolt hatását. Az irodalmi adatok erősen megoszlottak a cannabinoidok emlékezetre kifejtett hatásait illetően. A témában megjelent munkánk (Ádám et al. 2008) azt igazolta, hogy az adott körülmények között a rimonabant az emléknem előhívásának fázisában fejt ki gátló hatását. Az egyszerű, jól interpretálható kísérleti körülmények elősegítették a kérdés viszonylag egyértelmű megválaszolását, ill. a meglévő ellentmondások egy részének feloldását. A kísérlet a memóriára ható pszichoaktív drogok további tanulmányozásához kínálhat újabb utakat és lehetőségeket.

Ádám ÁS, Csillag A: *The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant dose-dependently inhibits memory recall in the passive avoidance task in domestic chicks (Gallus domesticus)*, Brain Res. Bull. 76, 272-274., 2008

Gibbs ME, Gibbs C, Csillag A, Matsushima T, Rogers L, Rostas J: *Brain mechanisms, cognition and behaviour in birds (Editorial)*, Brain Res. Bull. 76, 167-169, 2008

Több, az eredeti programban szerepelt kísérleti még nem valósult meg, ill. jelenleg folyamatban van (utóbbiakról már említést tettünk ezért itt nem részletezzük). Nem került még sor a striatum/accumbens egyéb (nem amygdalofugalis) bemenő pályáinak (pl. pallium, NTS eredetű projekciók) részletes elemzésére az Asp-tartalom vonatkozásában, valamint az Asp-tartalmú neuronok egyéb transzmitterekkel történő kolokalizációs vizsgálatára. Az ok jórészt a korrelált morfológiai analízisek rendkívüli idő- és munkaigényessége, különösen elektronmikroszkópos szinten. Nem jutott idő az Asp neuronok kiváltott (pl. dopaminerg stimulánsokkal) expressziójának vizsgálatára, itt a közben sikeresen kifejlesztett mikrodialízis technika gyorsabb eredményt kínál. Ugyanezen okból, és mert a mikrodialízis módszer optimalizálása a vártnál lassabban valósult meg, későbbre maradt az Asp/Glu-release dopaminerg ágensekkel történő befolyásolásának vizsgálata is. Ugyanakkor néhány, az eredeti programban nem szereplő témában (pl. neurogenesis vizsgálatok) sikerrel előreléptünk.

Az elért eredmények jó alapot teremtettek a munkacsoport továbblépésére számos, a program során felvetett kérdésben. Jelentős módszertani előrelépések valósultak meg (in vivo mikrodialízis technika meghonosítása intézetünkben, agyszeleten végzett patch clamp elektrofiziológia rutin alkalmazása), melyek a klasszikus fény- és elektronmikroszkópos morfológiai és citokémiai módszerekkel kombinálva a basalis ganglionok mikrostruktúrájának, és az állati viselkedésben betöltött szerepüknek korszerű, több támadáspontú vizsgálatát teszik lehetővé.