

**A LOKÁLIS NEURONHÁLÓZAT SZEREPE A STRESSZVÁLASZ
ÉS A HYPOTHALAMUS-HYPOPHYSIS-
MELLÉKVESEKÉREG GÁTLÓ SZABÁLYOZÁSÁBAN**

DR. BALI BALÁZS

Témavezető:

Dr. Kovács Krisztina, az MTA doktora

Semmelweis Egyetem, Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola
Iskolavezető: Dr. Réthelyi Miklós, az MTA Doktora
Programvezető: Dr. Liposits Zsolt, az MTA Doktora

Magyar Tudományos Akadémia
Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet
Molekuláris Neuroendokrinológia Laboratórium

Budapest, 2005

BEVEZETÉS

Összehangolt központi idegrendszeri folyamatok sokasága teszi lehetővé, hogy adaptív módon válaszoljunk testünk belső vagy külső környezetéből érkező kihívásokra. Bár a különféle stresszorok eltérő szenzoros és feldolgozó rendszereket mozgósítanak az agyban, minden esetben elérik a stresszválasz „végső közös útját” jelentő hypophyseotrop neuronokat a hypothalamus paraventricularis magjában (PVN). Ez a sejtcsoport szabályozott módon corticotropin-releasing hormont (CRH) és arginin-vazopresszint (AVP) juttat az agyalapi mirigy portális keringésébe, ezzel fokozva az adenohypophysis ACTH-elválasztását és végső soron a mellékvesekéreg glükokortikoid-felszabadulását. A glükokortikoidok negatív feedback hatása a hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg (HPA) tengely egyik legfontosabb önszabályozó tényezője, amely hypothalamikus és extrahypothalamikus összetevőket egyaránt tartalmaz. Az extrahypothalamikus feedback a limbikus rendszeren keresztül valósul meg: a kortikoszteroid-receptorok expressziója a PVN neuroszekréción sejtjei mellett a limbikus rendszer bizonyos struktúráira (hippocampus, septum laterale, amygdala) jellemző.

A PVN kiterjedt afferens összeköttetései biztosítják, hogy a humorális, a szomato- és visceroszenzoros, valamint a magasan feldolgozott emocionális és kognitív információk egyaránt eljutnak a neuroszekréción CRH-sejtekhez. A mag afferens szabályozásának megértéséhez fontos az ún. “peri-PVN” modell: a nucleus paraventricularist közvetlenül határoló sejtzegény zóna olyan – elsősorban GABAerg – interneuronokat tartalmaz, amelyek távoli bemeneteket fogadnak és egyidejűleg a mag parvocellularis neuronjaira vetülnek. A különböző agyterületekről befutó rostok részben közvetlenül innerválják a parvocellularis neuronokat, részben indirekt módon, a perinuclearis GABAerg hálózaton átkapcsolva érik el a PVN neuroszekréción sejtjeit. A CRH-neuronok közvetlen serkentő bemenetet kapnak az agytörzsi visceroszenzoros rendszer, a középagyi szomatoszenzoros központok, valamint a circumventricularis szervek felől. Ezzel szemben az intrahypothalamikus és limbikus eredetű axonok jellemzően a peri-PVN területet célozzák. A lokális hálózat GABAerg elemeit felértékeli az a tény, hogy a limbikus projekciók neurokémiai fenotípusa és hatása a parvocellularis rendszerre nem azonos előjelű. A ventralis subiculum és az infralimbikus kéreg gátolja a HPA-tengely stressz által kiváltott aktivációját. Mindkét régió projekciós neuronjai döntően serkentő glutamáterg sejtek, amelyek hatását az intrahypothalamikus GABAerg interneuron-hálózat fordítja át a parvocellularis neuronokat elérő gátlássá. Hasonló módon magyarázható az a tény, hogy a medialis és a centralis amygdala principalis sejtjei jellemzően GABAerg fenotípusúak, azonban mindkét régió serkenti a HPA-tengely működését. A PVN neuronhálózati szabályozásában tehát a lokális GABAerg neuronpopulációnak kitüntetett szerepe van.

A hypothalamust és azon belül a PVN parvocellularis neuroszekréción sejtjeit különösen gazdag GABAerg innerváció jellemzi: az ultrastrukturális vizsgálatok szerint a CRH-neuronokon végződő szinapszisok közel 50%-a GABAerg. A neuroanatómiai és elektrofiziológiai eredmények alapján a PVN GABAerg bemenetét elsősorban

intrahypothalamikus gátlósejtek adják, amelyek elszórtan találhatóak az anterior hypothalamikus területen, az anterior perifornicalis régióban és a peri-PVN zónában. A lokális GABAerg interneuronok mellett a nucleus interstitialis striae terminalis gátlósejtjei is hozzájárulnak a mag gátló afferenciájához. Az élettani és farmakológiai vizsgálatok szerint a GABAerg jelátvitel befolyásolása a PVN-ben erőteljes HPA-válaszhoz vezet. Továbbá ismert, hogy a HPA-tengely alapszintű működése tónusos GABAerg gátlás alatt van, amelyet feltehetően a külső bemenetek által “meghajtott” lokális GABAerg hálózat biztosít. Az irodalom következetesen hangsúlyozza az intrahypothalamikus interneuron-hálózat fontosságát a limbikus hatások közvetítésében (pl. a HPA tónusos gátlásában), azonban keveset tudunk arról, hogy ez a neuronpopuláció önmagában hogyan befolyásolja a PVN neuroszekréciós működését. A vizsgálataink megkezdésekor nem ismertük, hogy a lokális GABAerg bemenet milyen módon szabályozza a CRH és AVP génexpresszióját, illetve, hogy milyen intrinsic GABAerg mechanizmusok működnek stressz során.

CÉLKITŰZÉSEK

- A. A paraventricularis régió intrinsic GABAerg működésének vizsgálata *in vitro* organotipikus hypothalamus szelettenyészetben az alábbi szempontok szerint:
 - A1. alkalmas-e az organotipikus szelettenyészet mint modell a parvocellularis CRH-neuronok szabályozási kérdéseinek vizsgálatára?
 - A2. kimutatható ebben a rendszerben a PVN tónusos GABAerg gátlása?
 - A3. hogyan befolyásolja a GABAerg neurotranszmisszió a CRH és az AVP bazális expresszióját *in vitro*?

- B. A PVN GABAerg bemenetének a HPA szabályozásában betöltött szerepét éber, szabadon mozgó patkányon kívántuk vizsgálni. Kérdéseink a következők voltak:
 - B1. milyen transzkripció, sejtaktivációs és szekréciós következménnyel jár a GABAerg tónus felfüggesztése a paraventricularis régióban?
 - B2. hogyan szabályozza a bazális CRH és AVP génexpressziót a PVN GABAerg bemenete *in vivo*?

- C. A GABAerg rendszer stresszválaszban betöltött szerepét két további kísérleti modellben kívántuk vizsgálni.
 - C1. azonosítani kívántuk a stressz által aktivált központi idegrendszeri GABAerg neuronokat a GAD65-eGFP génmódosított egértörzsnél
 - C2. meghatározni, hogy a GABAerg transzmisszió farmakológiai befolyásolása milyen hatással van a PVN stressz által okozott neuronális aktivációjára

ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok

Az *in vivo* vizsgálatokat felnőtt, hím Wistar patkányokon (Toxi-Coop), valamint felnőtt, hím Tg(GAD65_3e/gfp3.3)#15 génmódosított, ill. C6CBA és C6CBAF2 vad típusú egereken (MTA KOKI Orvosi Géntechnológiai Részleg) végeztük. Az *in vitro* szelettenyészetet 6-7 napos korú, hím Wistar patkányok (Toxi-Coop) hypothalamusából preparáltuk. A laboratóriumi állatok tartása és a velük való bánásmód megfelelt a magyar (243/1998-as Állatvédelmi Törvény) és az európai (86/609 EEC) előírásoknak. A kísérleteinket az MTA KOKI Állatkísérleti Etikai Bizottsága, valamint a Budapest Fővárosi Állat-és Élelmiszerellenőrző Állomás Etikai Tanácsa hagyta jóvá (eng.sz.: 25-14-12/1999).

In vivo vizsgálatok

- **Mikroinjekció.** Mély anesztéziában sztereotaxiás agycélzással vezetőkanült ültettünk a PVN fölé, amelyet a kísérlet napján meghosszabbítottunk, majd a Parada-féle távbeadási módszerrel fémkapillárist vezetünk le a megfelelő mélységi pozícióba. Ezen keresztül injektáltunk a 0,5 µl térfogatban 25 pmol bicuculline methiodide-ot szabadon mozgó patkányok PVN-jébe. Az *in vivo* kísérleteket minden esetben azonos napszakban – reggel 8 és 9 között – kezdtük, hogy elkerüljük a diurnális ingadozásból adódó hibát.
- **Stressz.** Stresszorként rövid éterinhalációt használtunk, amely során az állatokat 5 percre egy étergőzzel telített, zárt üvegedénybe helyeztük. Az éterexpozíció után az állatok visszakerültek a ketrecükbe, ahol a kísérlet végéig – patkányoknál a stresszt követő 120. perc, egereknél 10., ill. 90. perc – tartózkodtak.
- **Vérvétel és hormonmérés.** Patkányoknál a mikroinjekció időpontjához képest -10., 0., 5., 10., 20., 30., 60., 90. és 120. percnél vena jugularis kanülön keresztül levett sorozatmintákból, egereknél a stresszt követő 10. percen gyors dekapitulálás után a törzsből nyert egyedi mintákból határoztuk meg a plazma ACTH-szintjét direkt radioimmúnassay segítségével. Az egyes méréseken belüli és közötti variancia 4,7 illetve 7 %-os volt.
- **Mikrodialízis.** A saját készítésű mikrodialízis szondát mély anesztéziában sztereotaxiás agycélzással ültettük be a PVN mellé. Az anyagbeadás a kísérlet teljes ideje alatt (10 + 120 perc) folyamatosan történt; a vegyületek koncentrációja a dializáló folyadékban 100 µM muscimol és 1,2 mM chlórdiazepoxid volt. A vegyületek feloldására és kontroll oldatként mesterséges cerebrospinalis folyadékot (ACSF) használtunk.
- **Intrakardiális perfúzió.** Az állatokat a kísérlet végén túlaltattuk, majd szobahőmérsékletű fiziológiás sóoldattal és 0°C-os 4 %-os paraformaldehid oldattal perfúziósan fixáltuk. Az eltávolított agyakat 10 %-os szacharózos paraformaldehid oldatban posztfixáltuk, majd cukros kálium-foszfát pufferbe tettük.

In vitro vizsgálatok

- **Organotipikus hypothalamus szelettenyészet.** 6-7 napos korú patkányok hypothalamusából szövetdaraboló készülékkel 400 µm vastag coronalis síkú szeleteket készítettünk. A PVN-t tartalmazó szeleteket egy tenyésztőmembránra vittük át, amelyet a tenyésztőtáp-levegő fázishatáron tartottunk fent 37°C-os és 5 % CO₂-ot tartalmazó termosztátban. A tenyésztés első 10-12 napja szérumos tápoldatban történt, amelyet a kísérletek előtt két nappal szérummentesre cseréltük.
- **Tápok és kezelések.** A szérumos tenyésztőoldat Basal Medium Eagle, Hanks' Balanced Salt Solution és hőinaktivált lósavó keveréke volt, amelyet glükózzal, L-glutaminnal és streptomycin-penicillin oldattal egészítettünk ki. Szérummentes tápként és kontroll oldatként Basal Medium Eagle oldatot használtunk glükózos és L-glutaminos dúsítással. A kezelések 3 órás időtartalmúak voltak, melyeket az alábbi vegyületekkel végeztük: 50 µM bicuculline methiodide, 500 nM corticosterone-HBC, 10 nM dexamethasone, 10 µM forskolin, 50 mM kálium-klorid, 1 µM tetrodotoxin.
- **Hormonmérés.** A táp kortikoszteron-szintjét direkt radioimmúnassay segítségével határoztuk meg. A mérés érzékenysége 1 pmol/ml; a mérésen belüli és közötti variancia 7 és 24 % volt.

Szövettani módszerek

- **Metszés és szövettárolás.** A patkányagyakból 30 µm, az egéragyakból 20 µm vastag sorozatmetszeteket készítettünk Reichert-típusú fagyasztó számkamikrotómon. A metszés, a -20°C-on fagyálló folyadékban történő szövettárolás és a későbbi szövettani feldolgozás ribonukleázmentes körülmények között történt.
- **Fénymikroszkópos és fluoreszcens immuncitokémia.** Az immuncitokémiai reakciókat standard avidin-biotin-peroxidáz módszerrel végeztük. Elsődleges antitestként nyúlban termelt poliklonális anti-c-Fos (1:20000), ill. monoklonális anti-MAP-2 (1:1000) antitestet, másodlagos antitestként biotinnal konjugált specifikus antiszérumot használtunk. Kromogénként 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid szerepelt, a reakció erősségét nikkkel-ammónium-szulfáttal intenzifikáltuk. A c-Fos protein immunfluoreszcens kimutatásánál másodlagos antitestként Alexa 594 fluoreszcens festékekkel konjugált savót használtunk. A szérumok penetrációjának növelése érdekében a savókat Triton-X 100 tartalmú kálium-foszfát-pufferben vettük fel. Az együtt értékelendő szövetek immuncitokémiai reakcióját azonos körülmények között, ugyanabban az osztott inkubálótálcában végeztük.
- **Elektronmikroszkópos immuncitokémia.** A szeletpreparátum elektronmikroszkópos vizsgálatát Dr. Miklós Ildikó végezte. A tenyészeteket magas koncentrációjú glutáraldehides paraformaldehid-oldattal fixáltuk, majd dehidráció és Durcupan ACM gyantába ágyazás után utramikrotómmal 50 nm vastagságú sorozatmetszeteket készítettünk. A metszeteket formval hártárával bevont nikkkel gridre úsztattunk, és ezen a felületen történt az immuncitokémia. Primer antitestként a GABA-glutáraldehid-BSA konjugátum ellen nyúlban termelt ellenanyagot (1:2000; Dr. Somogyi Pétertől),

másodlagos antitestként kolloidális arannyal megjelölt kecske eredetű nyúl elleni antitestet használtuk. A kontrasztózás telített uranil-acetátos és ólom-citrátos oldattal történt.

- ***In situ* hibridizációs hisztokémia és autoradiográfia.** Az AVP hnRNS ribopróbát Dr. T.G. Sherman (Georgetown University), a CRH mRNS próbát Dr. K. Mayo (Northwestern University), a GAD67 mRNS próbát Dr. A.J. Tobin (UCLA), a GAD65 mRNS próbát Dr. Szabó Gábor (MTA KOKI) által konstruált plazmidról írtuk át. Az adott RNS szekvenciát felismerő próbákat ³⁵S-UTP-vel jelöltük meg. A hibridizációs jelet röntgenfilmen, majd NTB-3 autoradiográfiás emulzióval tettük láthatóvá. Az emulzióba mártott tárgylemezeket a CRH, a GAD65 és a GAD67 mRNS esetében 5-7 napig, az AVP hnRNS esetében 2-3 hétig exponáltuk. Ezt követte az előhívás D-19-es hívóoldatban, majd a háttérfestés Nissl-szerint és a fedés.
- **Kombinált immuncitokémia és *in situ* hibridizáció.** A c-Fos protein és GAD67 mRNS együttes kimutatásakor az immuncitokémiai reakció történt az első lépésben, ezt követte az *in situ* hibridizáció. Az immuncitokémiai reakció menete a fent leírt módon történt, azzal a lényegi különbséggel, hogy a szöveti RNS-ek megőrzésének érdekében 1.) nem kezeltük H₂O₂-dal a szöveteket, 2.) normál szérum helyett tisztított borjú szérum albumint alkalmaztunk, 3.) az RNáz aktivitás gátlására heparint adtunk az inkubáló oldatokhoz és 4.) a reakciót nikkel intenzifikáció nélkül hívtuk elő.

Kvantitatív képelemzés

- **Denzitometria.** Az emulziós autoradiográfiás minták kiértékeléséhez egy Nikon Eclipse E600 mikroszkópra szerelt SPOT RT kamerával digitalizáltuk az anyagot, a mérést az NIH Image 1.59 szoftverrel végeztük. A szelettenyészetek egy csoportjánál a hibridizációs jel mennyiségi meghatározásához Fuji FLA 3000 Phosphoimager rendszert és az AIDA kiértékelő programot használtuk.
- **Sejtszámolás.** A fénymikroszkópos anyagot a fenti képrögzítő rendszerrel, a fluoreszcens mintákat az ugyanerre a mikroszkópra szerelt epifluoreszcens feltétellel digitalizáltuk. A kolokalizációs vizsgálatoknál az adott látótér eGFP fluoreszcens jelét FITC szűrővel, az Alexa 594-nel megjelölt c-Fos-pozitív sejtmagokat G-2A szűrővel olvastuk be, majd a SPOT 3.4 programmal hoztuk létre az adott látótér kettősen jelölt képét. A sejtszámoláshoz az ImageJ 1.29 programot használtuk.

Statisztikai módszerek

Az eredményket az átlag ± SEM feltüntetésével ábráztuk, a statisztikai szignifikancia megállapítása a STATISTICA 6.0 programcsomaggal történt. Két csoport esetén t-próbát, ennél több csoport esetén variancianalízist (ANOVA) használtunk. A post-hoc összehasonlításokra a Dunett-féle, illetve az „Unequal N” tesztet használtuk. Mindkét esetben a statisztikai szignifikancia határát p<0,05-nél húztuk meg.

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

Intrinsic GABAerg gátlás organotipikus hypothalamus szelettenyészetben

Az organotipikus hypothalamus szelettenyészet anatómiai jellemzése

Első lépésként beállítottuk az organotipikus szelettenyészet technikát. 12-14 napos tenyésztési idő után differenciált morfológiájú hypothalamikus neuronokat mutattunk ki a tenyészet MAP2-immunfestésével. A szelettenyészeteken a CRH mRNS-t expresszáló neuronok – az *in vivo* anatómiai viszonyokkal megegyezően – a 3. agykamra ependymája mellett kétoldalt, lepkeszárnyra emlékeztető sejtcsoportot alkottak. Az intrahypothalamikus gátló bemenetek közül a PVN-nel szomszédos perinuclearis GABAerg sejtcsoportot a szelettenyészetünk is tartalmazta. A GABAerg sejtek jelenlétét a GAD67 mRNS *in situ* hibridizációjával mutattuk ki a szeleten. A tenyészetek elektronmikroszkópos vizsgálatával a kéthetes tenyésztési idő után is jól megőrzött ultrastruktúrát találtunk; beágyazás utáni immunarany technikával GABA-immunpozitív terminálisokat mutattunk ki, amelyek szimmetrikus szinapszisokat alkottak a PVN területén. Mindezek a megfigyeléseink megerősítik a PVN GABAerg bemenetének részben lokális eredetét. A szeleten bazálisan is mérhető CRH mRNS expresszióval szemben, nem tudtunk lényeges AVP hnRNS-t kimutatni a PVN-ben *in vitro*. Annak eldöntésére, hogy ez az AVP-gén vagy a külső bemeneteitől megfosztott PVN hálózati sajátossága, egy másik parvocellularis vazopresszinerg sejtcsoportból, a nucleus suprachiasmaticusból készítettünk szelettenyészetet. Azonos *in vitro* körülmények között fenntartva a suprachiasmaticus magban folyamatos AVP hnRNS expressziót tudtunk kimutatni.

Az organotipikus hypothalamus szelettenyészet funkcionális jellemzése

A tenyésztett PVN CRH-expressziója szignifikánsan megemelkedett a 24 órás szérummegvonás ($p=0,0088$), valamint a forskolin kezelés ($p=0,0154$) hatására. A CRH mRNS stimulusra adott transzkripciós válasza mellett megvizsgáltuk a génexpresszió *in vitro* válaszkészségét a gátló hatásokra is. A kortikoszteron 70 %-kal ($p=0,0019$), a dexamethasone 87 %-kal ($p=0,0006$), a tetrodotoxin kezelés 53 %-kal ($p=0,0023$) csökkentette a PVN-ben a CRH mRNS expressziós szintjét. Mindezek az eredmények megerősítik a glükokortikoid negatív feedback lokális összetevőjét. Bár bazálisan nem tapasztaltunk AVP-expressziót a PVN területén, a tenyészetek forskolinnal történő kezelése után a parvocellularis PVN-ben megjelent az AVP hnRNS hibridizációs jele; mutatva, hogy a CRH-neuronok ebben az *in vitro* modellben is megőrzik AVP koexpresszáló képességüket. A c-fos gén indukálhatóságának megállapítására 50 mM kálium-kloriddal, illetve forskolinnal kezeltük a tenyészeteket. A paraventricularis szelettenyészeink alacsony alapszintű c-Fos-immunoreaktivitást mutattak, azonban mindkét kezelést követően nagymértékű c-Fos indukciót tapasztaltunk diffúzan a hypothalamus szövet teljes kiterjedésében.

Sejtaktivációs és transzkripciós válasz a GABA_A-receptor antagonistá hatására in vitro

A 3 órás bicuculline methiodide kezelést követően jelentős c-Fos indukciót tapasztaltunk, amely – szemben a kálium-klorid és a forskolin hatásával – elsősorban a paraventricularis magra korlátozódott. Az antagonistá hatására aktiválódott sejtek elhelyezkedése megegyezett a PVN CRH mRNS-t expresszáló medialis parvocellularis dorsalis almagjával. Eredményeink jelzik, hogy a c-Fos nem csupán az excitátoros hatásokra aktiválódó celluláris marker, hanem alkalmas a gátlás alól “kiszabaduló” sejtek és diszinhíbiós jelenségek kimutatására is. A szérumentes kontroll tenyészetekkel összehasonlítva az antagonistával kezelt csoportban a CRH mRNS szintje 61 %-kal ($p=0,0156$) emelkedett meg a PVN-ben. A bicuculline kezelés transzkripciós hatása nagyságában megegyezett a pozitív kontrollként alkalmazott forskolin után tapasztalt CRH mRNS hibridizációs jelintenzitással ($p=0,9503$). Szérumentes körülmények között az AVP hnRNS *in situ* hibridizációs jele a parvocellularis PVN-ben a mérési küszöb környékén volt. Ugyanakkor mind a bicuculline, mind a forskolin kezelés hatására erőteljes AVP hnRNS expresszió megjelenését figyeltük meg a PVN CRH-t expresszáló parvocellularis régiójában. A GABA_A-receptor antagonistá után kialakuló celluláris (c-Fos) és transzkripciós (CRH, AVP) aktiváció valószínűsíti, hogy a parvocellularis neuronok lokális eredetű (<200-300 μm) GABAerg afferensei önmagukban – a távoli bemenetek nélkül is - képesek létrehozni GABAerg gátló tónust a PVN-ben.

Centrális GABAerg tónus a hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg rendszerben

Neuronális aktiváció szabadon mozgó patkány hypothalamusában a GABA_A-antagonista intra-PVN mikroinjekcióját követően

A bicuculline methiodide mikroinjekcióját nagymértékű c-Fos-indukció követte a beadást követően 120 perccel. Intenzív festődést tapasztaltunk a perifornicalis területen és a subparaventricularis zónában, továbbá a nucleus dorsomedialis és a lateralis hypothalamus területén. A GABA_A-antagonista által kiváltott c-Fos-ir minden esetben kisebb mértékű volt magában a PVN-ben, mint a maggal közvetlenül szomszédos területeken. A paraventricularis magon belül a c-Fos-ir nem mutatott sem magnocellularis, sem parvocellularis preferenciát. A parvocellularis területen c-Fos pozitív sejtmagokat figyeltünk meg mind a medialis parvocellularis (hypophyseotrop), mind a ventralis és dorsalis parvocellularis (autonóm) almagokban. Annak vizsgálatára, hogy a PVN körüli sejtaktiváció érinti-e a perinuclearis GABAerg sejteket, kombinált c-Fos immuncitokémiát és GAD67 mRNS *in situ* hibridizációt végeztünk a két marker kolokalizációjának a kimutatására. A kettősen jelölt mintáinkon a GABA_A-antagonista által előidézett c-Fos-ir megtalálható volt a GAD67 mRNS pozitív sejtekben, a c-Fos-indukció azonban a régió jelöletlen, nem-GABAerg profiljaira volt jellemző. Ismert, hogy glutamáterg bemenete is

jelentős részben lokális eredetű, és nem nem kizárt, hogy a bicuculline-mikroinjekció hatására aktiválódott peri-PVN sejtek egy része glutamáterg fenotípusú, és a GABA_A-antagonista hatásában a glutamáterg transzmisszió fokozódása is szerepet játszik.

Transzkripció és szekréciós válasz a GABA_A-antagonista lokális beadása után

A bicuculline beadását követően 83 %-os ($p=0,0189$) AVP-expresszió emelkedést tapasztaltunk injektált oldali PVN parvocellularis részében, változatlan magnocellularis AVP hnRNS szint mellett. A GABA_A-antagonista intra-PVN mikroinjekciója után ugyanakkor nem észleltünk mérhető változást a PVN CRH mRNS expressziójában a kontrollhoz képest ($p=0,2647$). Mindez összhangban áll azokkal az elgondolásokkal, amelyek szerint a hypophyseotrop CRH-neuronokban a CRH a HPA-tengely alaptónusát állítja be, és a parvocellularis AVP biztosítja az ACTH szekretagóg „koktél” specificitását és érzékenységét mind a serkentő, mind a gátló szignálokra. A GABA_A-antagonista szekréciós hatásának vizsgálatára a mikroinjekcióval párhuzamosan meghatároztuk a plazma ACTH-szintjét. A bicuculline beadása után a plazma ACTH-koncentráció gyorsan és tranziens módon megemelkedett. A mikroinjekció előtti $13,6 \pm 2,2$ fmol/ml alapszintről 5 percen belül elérte a $256,6 \pm 43,0$ fmol/ml-es csúcserőtet. Ez a szekréciós válasz nagyságában összevethető az akut stressz által okozott ACTH-emelkedéssel. Ismert, hogy a glutamáterg vagy noradrenerg transzmisszió befolyásolása önmagában csak kismértékű HPA-választ vált ki. Az akut stressz során tapasztalható HPA-aktivációhoz a PVN glutamáterg/katekolaminerg bemenete mellett tehát más serkentő hatások is szükségesek, az egyik ilyen mechanizmus lehet a GABAerg tónus lecsökkentése a magban. A PVN katekolaminerg, neuropeptid Y és angiotenzin II afferenseiről már kimutatták, hogy preszinaptikusan képesek lecsökkenteni a GABA felszabadulását, és ilyen módon aktiválni a parvocellularis neuronokat.

Stressz által okozott GABAerg aktiváció a központi idegrendszerben

A GAD65-eGFP génmódosított egértörzs hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg rendszerének és stresszválaszának jellemzése

A vad típusú kontroll egerek hypothalamikus GAD65 mRNS expressziójával megegyezően, a transzgenikus egérvonalnál eGFP-pozitív sejteket a legnagyobb számban az area preoptica-ban, az anterior és lateralis hypothalamikus területen találtuk. Alacsonyabb szintű volt az eGFP kifejeződése a nucleus dorsomedialis hypothalami és a perifornicalis területen. A paraventricularis régió eGFP-fluoreszcenciája megfelelt az *in situ* hibridizációval kimutatott GAD65 mRNS expressziós mintázatának: jelentős eGFP-expresszió volt megfigyelhető a peri-PVN területen; magában a PVN-ben sem GAD65 mRNS-t expresszió, sem eGFP-fluoreszcencia nem volt megfigyelhető. A GAD65-eGFP egértörzs stresszreaktivitását éterbelélegzéses modellben vizsgáltuk. Az éterstressz által kiváltott c-Fos-indukció területi eloszlása megegyezett a transzgenikus és a vad típusú

csoport között. A PVN c-Fos-immunreaktivására a stressznek szignifikáns hatása volt ($p=0,0049$), a genetikai háttér ugyanakkor nem befolyásolta sem a bazális, sem a stressz-indukálta c-Fos-t ($p=0,7030$). Az ACTH-szintre szignifikáns hatása volt a stressznek ($p=0,0015$), míg a genotípusnak nem hatott sem a bazális, sem a stressz-indukálta ACTH-szekrécióra ($p=0,9018$).

Stressz-indukálta c-Fos és eGFP kolokalizációja a GAD65-eGFP transzgenikus egértörzs központi idegrendszerében

Az éter belélegzését követően jelentős c-Fos-indukciót tapasztaltunk a PVN parvocellularis részében, a piriformis kéregben, a középvonali thalamusmagokban, a septum laterale-ban, a nucleus interstitialis striae terminalisban és az anterior hypothalamikus területen. A legmagasabb c-Fos-ir-t a PVN-ben ($110,5 \pm 6,5$ sejt/terület) és a piriformis cortexben ($81,8 \pm 2,5$ sejt/terület) találtunk. A vizsgált régiók közül az eGFP-expresszió a PVN subparaventricularis zónájában ($56,9 \pm 2,2$ sejt/terület) és az anterior hypothalamikus területen ($48,1 \pm 5,4$ sejt/terület) volt a legmagasabb. A legnagyobb c-Fos/eGFP kolokalizációs arányt a septum laterale-ban tapasztaltunk, ahol a c-Fos-pozitív sejtek $21,0 \pm 8,3$ %-a, az eGFP-pozitív sejtpopuláció $14,0 \pm 4,2$ %-a volt kettősen jelölt. Jelentős c-Fos/eGFP kolokalizációt mutatott még a nucleus interstitialis striae terminalis, anterior hypothalamikus area és a PVN subparaventricularis zónája. A fenti területekről ismert, hogy a PVN gátló bemenetét adják, valamint az előagyi bemenetek átkapcsoló struktúrái a PVN felé. Eredményeink alapján a stressz lokális és extrahypothalamikus GABAerg neuroncsoportokat aktivál, amelyek – a glükortikoidok negatív visszacsatolásával párhuzamosan – feltehetően részt vesznek a stresszválasz befejezésében.

GABA_A-agonisták hatása a PVN stressz által okozott c-Fos indukciójára

A GABA_A-receptorok kompetitív agonistáját (muscimol), ill. egy benzodiazepin-receptor agonistát (chlordiazepoxid) mikroinjektáltunk az éterstressznek kitett patkányok paraventricularis régiójába, a sejtaktivációt c-Fos immuncitokémiával mutattuk ki. A vegyületek közül a muscimol hatása szignifikánsnak bizonyult: 62 %-kal ($p<0,05$) csökkentette a PVN stressz-indukálta c-Fos-ir sejtmagjainak a számát. Kísérletünkben a lokálisan beadott benzodiazepin ugyanakkor nem befolyásolta a stressz-indukálta c-Fos-indukciót. A klasszikus benzodiazepinekről ismert, hogy alacsony dózisban gátolják, magasabb dózistartományban aktiválják a HPA-t és maguk is c-Fos-t indukálnak a PVN-ben. Az irodalmi adatok alapján a CRH-sejteken a GABA_A-alegységek közül az $\alpha 2$ -, míg a GABAerg afferensein az $\alpha 1$ -alegység által közvetített hatás dominál. Elképzelhető, hogy az általunk használt nem-szelektív benzodiazepin-ligand egyaránt aktiválta GABA_A-receptorokat a peri-PVN régió GABAerg sejtein és a parvocellularis neuronokon, és e két hatás eredőjeként nem tapasztaltuk c-Fos-választ. Továbbá nem zárható ki, hogy a benzodiazepinek anxiolitikus hatásai mellett a neuroendokrin hatásokhoz is szükségesek a magasabbrendű (kérgi) területek.

ÖSSZEFOGLALÁS

1.) Beállítottuk az organotipikus hypothalamus szelettenyészet technikát és jellemeztük a PVN CRH-neuronjait *in vitro*. Kimutattuk, hogy a szelettenyészet alkalmas a PVN lokális szabályozási mechanizmusainak vizsgálatára.

2.) A szelettenyészetben a CRH-gén serkentő és gátló hatásokra adott transzkripciós válasza jó egyezést mutatott az *in vivo* megfigyelésekkel. *In vitro* is kimutattuk a stimulus által kiváltott parvocellularis AVP-expressziót. A szelettenyészetben nyert eredményeink egyben megerősítik a glükokortikoid negatív feedback lokális összetevőjének a létezését.

3.) Organotipikus szelettenyészetben kimutattuk, hogy a távoli bemeneteitől megfosztott PVN-ben a parvocellularis CRH és AVP expressziója tónusos GABAerg gátlás alatt van, amelyet a lokális GABAerg afferensek hoznak létre.

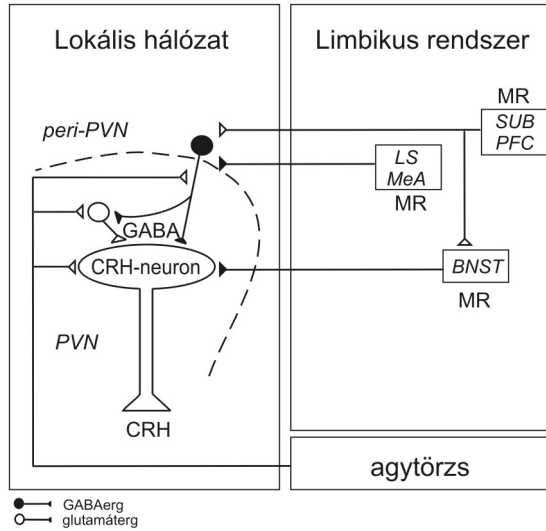
4.) *In vivo*, a lokális GABAerg tónus a felfüggesztése jelentős sejtaktivációt okoz a PVN-ben és a maggal szomszédos peri-PVN régióban, valamint fokozza a parvocellularis AVP transzkripciót és aktiválja a HPA-tengelyt. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a GABAerg tónus lecsökkentése a magban – más bemenetekkel együttműködve – hozzájárul a parvocellularis rendszer stressz által okozott aktivációjához.

5.) A GAD65-eGFP génmódosított egérmodellen kimutattuk, hogy stressz során GABAerg neuronok aktiválódnak a hypothalamusban és a limbikus rendszerben. Éterstressz által mozgósított GABAerg sejteket a legnagyobb arányban a lateralis septumban, a nucleus interstitialis striae terminalisban, az anterior hypothalamikus területen és a PVN sub-paraventricularis zónájában találtunk. Ezekről a GABAerg sejtcsoportokról ismert, hogy a PVN gátló bemenetét adják és a limbikus bemenetek átkapcsoló struktúrái a mag felé, ezáltal részt vehetnek a stresszválasz befejezésében.

6.) Kimutattuk, hogy stressz során a GABA_A-receptorok aktivációja képes lecsökkenteni a a PVN parvocellularis rendszerének aktivációs szintjét.

Eredményeink alapján a PVN lokális GABAerg bemenete számos olyan neuronhálózati és funkcionális sajátossággal bír, amelyek alkalmassá teszik, hogy CRH-neuroszekréció egyik lényeges meghatározója legyen. Hipotézisiünk szerint a GABAerg tónus lecsökkentése a PVN-ben hatékonyan járulhat hozzá a stresszválasz beindításához, míg a stressz által aktivált lokális és extrahypothalamikus GABAerg neuroncsoportok – a glükokortikoid negatív feedbackkel párhuzamosan – részt vesznek a centrális stresszválasz befejezésében.

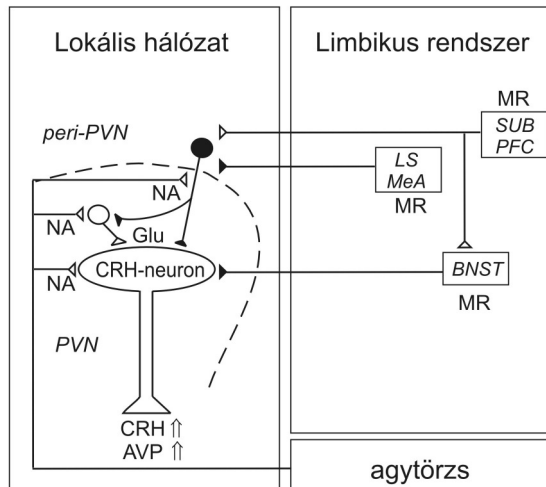
A STRESSZMENTES



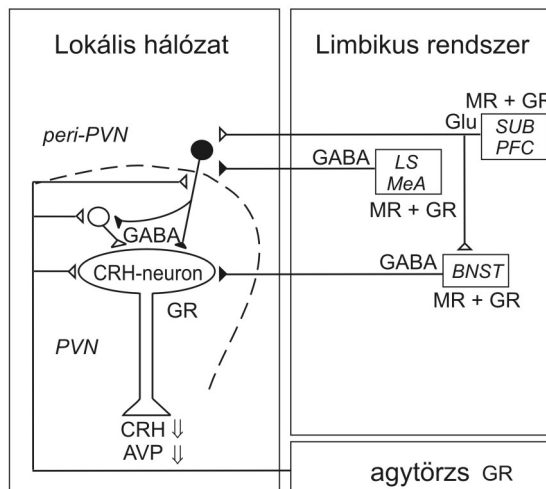
A PVN lokális neuronhálózatának modellje a neuroszekréciós CRH-rendszer alacsony és magas aktivitású állapotaiban.

A) A peri-PVN régió GABAerg interneuronjai alapszinten tónusosan gátolják a hypophyseotrop CRH-sejteket. B) A stresszválasz kezdeti szakaszában a stresszor által mozgósított serkentő bemenetek részben közvetlenül aktiválják a CRH-neuronokat, részben a lokális neuronhálózat glutamaterg és GABAerg sejtjein végződve indirekt módon szabályozzák a kissejtes neuroszekréciós működést. Eredényeink és az irodalmi adatok alapján a PVN GABAerg gátló tónusának lecsökkentése jelentősen hozzájárulhat a mag stressz által okozott aktivációjához. C) A stresszválasz befejező szakaszában megemelkedik a glükokortikoidok plazmaszintje, ami az MR mellett a PVN és a limbikus területek GR-rendszereit is mozgósítja. A szteroid negatív feedbackkel párhuzamosan GABAerg neuronok aktiválódnak olyan hypothalamikus (peri-PVN) és limbikus (BNST, LS) régiókban, amelyek a PVN-be vetülnek.

B STRESSZ - iniciáció



C STRESSZ - termináció



Rövidítések: AVP: arginin-vazopresszin, BNST: nucleus interstitialis striae terminalis, CRH: corticotropin-releasing hormon, Glu: glutamát, GR: glükokortikoid receptor, LS: septum laterale, MeA: medialis amygdala, MR: mineralokortikoid receptor, NA: noradrenalin, PFC: prefrontalis cortex, PVN: nucleus paraventricularis hypothalami, SUB: subiculum

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt hálával tartozom témavezetőmnek, **Dr. Kovács Krisztinának**, aki lehetőséget adott, hogy a munkacsoportjában dolgozhassam, és akinek szakmai és emberi támogatása, lelkesedése és a munka során mindvégig segítő biztatása nagymértékben hozzájárult az eredmények megszületéséhez. Szerencsésnek érzem magam, hogy az általa megteremtett baráti légkörben ismerhettem meg a tudományos gondolkodás alapjait és a kísérletes kutatómunka mindennapjait. Az itt eltöltött évek igényességre, önálló problémamegoldásra és az új ötletek iránti nyitottságra neveltek. Köszönet érte.

Diákkörös hallgatóként a kezdeti nehézségeken való túllépésben, valamint az idegtudomány számos elméleti és gyakorlati kérdésének megismerésében **Dr. Ábrahám István** segített, akinek ezúton is szeretnék köszönetet mondani.

Köszönettel tartozom továbbá közvetlen kollégáimnak, így **Bosca Zoltánnak**, **Darida Miklósnak**, **Dénes Ádámnak**, **Földes Annának**, **Dr. Gerencsér Andreának**, **Jelencsics Kírának**, **Ladjánszky Veronikának**, **Dr. Miklós Ildikónak**, **Pintér Ottónak**, **Dr. Szalay Katalinnak**, **Szalay Orsolyának**, **Szegő Évának**, **Tökési Viktóriának**, akik munkájukkal, javaslataikkal és érdeklődésükkel segítettek.

Szeretnék köszönetet mondani az **MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet** minden munkatársának, akik intellektuálisan stimuláló és baráti légkört hoznak az intézet falai közé. Külön szeretnék köszönetet mondani az **Állatház** és a **Szövettenyésztő Laboratórium** munkatársainak, akik mindenkor önzetlenül és magas színvonalon segítettek a munkámat. Az értekezés alapját képező kísérletek a **Howard Hughes Medical Institute**, az **OTKA** és a **Semmelweis Egyetem Doktori Iskolájának** az anyagi támogatásával készültek.

Végül, s nem utolsósorban köszönettel tartozom **szüleimnek** és **barátaimnak**, akik érdeklődésükkel és támogatásukkal biztosították, hogy nyugodt körülmények között foglalkozhassam a munkámmal.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Bali B., Kovács K.J.

GABAergic Control of Neuropeptide Gene Expression in Parvocellular Neurons of the Hypothalamic Paraventricular Nucleus.

European Journal of Neuroscience 2003, 18: 1518-1526

Bali B., Erdélyi F., Szabó G., Kovács K.J.

Visualization of stress-responsive brain circuits in the GAD65-EGFP transgenic mice.

Neuroscience Letters 2005, 380: 60-65

Kovács K.J., Miklós I.H., **Bali B.**

GABAergic Mechanisms Constraining the Activity of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis. *Stress: Current Neuroendocrine and Genetic Approaches,*

Annals of the New York Academy of Sciences 2004, 1018:466-476

Más témában megjelent könyvfejezet:

Kovács K.J., Miklós I.H., **Bali B.**

Psychological and Physiological Stressors.

In Techniques in the Behavioural and Neural Sciences. Handbook on Stress, Immunology and Behaviour 2005, Vol.15, 775-792, Amsterdam: Elsevier