

Szakmai zárójelentés

Korábban végzett neurofiziológiai és farmakológiai kutatások eredményei arra utaltak, hogy a kolinerg és GABAerg neuronok nagy mennyiségű tartalmazó bazális előagyi állomány (BFC) innervációjában igen jelentős szerepet játszanak a glutamát ingerület-közvetítő anyagot (transzmittert) tartalmazó idegrostok, melyek mind agykérgi, mind kéregalatti eredőhelyekről kiindulva érkeznek a BFC különböző szubdivízióihoz. Az utóbbi évektől ismert vezikuláris glutamát transzporterek (VGluT) 1-es és 2-es típusainak morfológiai feltüntetése a glutamáterg axonvégzódések specifikus azonosítására alkalmasak azáltal, hogy ezen transzporter fehérjék specifikusan és kizárólag a glutamáterg axonvégzódésekben halmozódnak fel. Az ellenük termeltetett antitestek immuncitokémiai felhasználásával, a reakció-termék eltérő megjelenítésével lehetőség van a glutamáterg axonok, axonvégzódések és alkalmas körülmények között (tartós kolchicin-kezelés) perikaryonok szelektív kimutatására fény-, és elektronmikroszkópos kísérleti anyagokban. Kettős vagy többes immunjelöléssel feltárhatjuk a glutamáterg axonvégzódések szinaptikus kapcsolatait nem glutamáterg célsejtek neuronális kompartmentjein. Ilyen immuncitokémiai módszerek alkalmazásával történő vizsgálatainkat kiterjesztettük a BFC egyes szubdivízióinak területeire. Vizsgáltuk a mediális szeptum (MS)-diagonális köteg (DB) [MSDB]; a ventral pallidum (VP)- substantia innominata (SI) és a capsula interna (CI)- nucleus basalis (nb) territoriumait. EM-os vizsgálatainkkal adatokat szolgáltatunk a létesített szinaptikus kapcsolat finomszerkezetére, valamint ezek megjelenésének eltérő kompartmenteken (sejttest, proximális dendrit, dendritörzs, dendrit-tüske) való gyakoriságára.

Eredményeink az alábbiak: immunfluoreszcens jelölésekkel végzett kísérleti anyagokon glutamáterg idegrosthálózat változó sűrűségű előfordulását tártuk fel az MSDB-állományban, a MS és a diagonális köteg vertikális ága (vDB) területén. VGluT2-pozitív, pontszerű képletek nagy mennyisége halmozódott fel a rostok közötti területeken, nagyrészt szoros érintkező kapcsolatban állt kolin acetiltranszferáz (CHAT) immunfluoro-jelölt kolinerg vagy parvalbumin ((PV) jelölt GABAerg sejtek sejt felszínével vagy ritkán, dendrit-szerű nyúlványokkal. Ezen fénymikroszkópos megfigyelések nem teszik lehetővé a szinaptikus kapcsolat biztos megítélését. EM-os megfigyeléseink feltárták, hogy VGluT2-immunarány plusz ChAT-DAB kettős immunfestett anyagokon nagy számban fordulnak elő VGluT2-jelölt axonvégzódések, valamint kolinerg (ChAT-pozitív), illetve GABAerg (PV-pozitív) neuron-elemek (sejttest, dendrit) (2.). Kimutattuk, hogy kettősen-immun-jelölt anyagokon nagy számban vannak axonvégzódések, melyek szinaptikus kapcsolatban vannak immun-negatív neuronok különböző kompartmentjeivel. A szinaptikus kapcsolatok kizárólag az aszimmetrikus-GrayI-típusú finomszerkezetet mutatták. Az ezüst-tel érzékenyített arany-szemcsék a végzódésekben halmozódtak, legnagyobb részben a szinaptikus vezikulák halmazai felett. A VGluT2-pozitív végzódések szinaptikus kapcsolatainak sejt kompartmenteken való eloszlásában nem észleltünk specifikus szelektivitást, arra utalva, hogy glutamát-immunpozitív végzódések az adott anyagterületben jelenlévő, eltérő neurokémiai sejtekkel képezhetnek szinaptikus kapcsolatot. Ezen túlmenően ChAT+VGluT2-immunjelölt anyagokon kisebb számban észleltünk VGluT2-pozitív axonvégzódéseket, melyek aszimmetrikus típusú szinaptikus kapcsolatokat létesítettek ChAT-pozitív (kolinerg) sejtek dendrit-elemein (4.). Ezek leggyakrabban a disztális dendritörzseken, ritkábban vékony dendrit-ágakon és dendrit-tüskéken fordultak elő. Megfigyeltük aszimmetrikus szinaptikus kapcsolatok jelenlétét a VGluT2 plusz PV kettősjelölt metszeteinken a GABAerg (PV-pozitív) sejteken (10.). A glutamáterg szinapszisok ez esetben leggyakrabban a sejtek proximális dendrit szakaszain, kisebb számban a perikaryon membrán-felületén fordultak elő. Végeztünk vizsgálatokat kettős-jelölt anyagok alternatív metszetein (ChAT, illetve PV immunfestett) a glutamáterg szinapszisok kolinerg, illetve GABAerg sejteken való

előfordulási gyakoriságának becslésére (6.) . Ezek mért egységfelületein a glutamáterg szinapszisok kolinerg , illetve GABAerg sejteken való előfordulására kapott adataink azt mutatták, hogy a GABAerg neuronok glutamáterg innervációja legalább kétszer intenzívebb, mint a kolinergké.

Eredményeink feltárták olyan axonvégződés előfordulását, melyek együttesen tartalmaztak VGluT2-immunarány plusz ChAT-immunjelölést a MSvDB állományban (8). Az ilyen ChAT pozitívást is mutató glutamáterg végződések alkalomszerűen aszimmetrikus kapcsolatot képeztek kolinerg neuronok dendritjeivel. A BFC caudális állományában lokalizált VP-SI- és CI-subdivízióban a glutamáterg innerváció denzitásában és a glutamáterg szinapszisok eloszlási jellemzőiben az MSDB-vel összehasonlítva jelentős eltérést nem tapasztaltunk (13.). Kivételként megemlíjtük egyrészt a capsula internában talált olyan kettős-jelölt axonvégződést, melyben VGluT2-immunarány+CR-DAB immunjelölés együttes előfordulását láttuk, amely végződés aszimmetrikus szinapszist képezett immuncitokémiai jelölődéssel nem azonosított dendritörzs felszínén. Ezen szinaptikus szerkezet morfofunkcionális értelmezése további – részletes – vizsgálatokat igényel. Másrészt a capsula interna állományában EM-os metszeteken kimutattuk VGluT2-immunarány-jelölt axonvégződések gyakori előfordulását és ezek aszimmetrikus típusú szinaptikus kapcsolatait vezikuláris acetilkolin transzporter (VChT)-DAB immunjelölt (kolinerg) dendrit felszínén. Ezen glutamáterg szinaptikus kapcsolatok forrásának feltárásához is további kutatások szükségesek.

Ismeretes, hogy a BFC különböző sejtpopulációiban lokalizált neuronok projekciói az agykéreg különböző területeit gazdagon innerválják. Ezen belül legkevésbé ismert az entorhinális kéreg basalo-entorhino-corticalis projekciós rendszere, különös tekintettel az ebben a rendszerben résztvevő projekciós neuronok neurokémiai jellegére. Vizsgálatokat végeztünk ennek tanulmányozására (13). A kolinerg neuronoknak az entorhinocorticalis projekciókban való részvételét fluorogold (FG) és ChAT immunfluorescens vizsgálatának kombinálásával is tanulmányoztuk. A FG EC-be történő beadása után kimutattuk a retrográd transzport eredményeként FG-pozitív sejtek és a ChAT-immunfluorescens-pozitív sejtek nagymértékű szuperpozícióját a nucleus basalis, valamint a capsula interna szubdivíziókban. E sejtek számolásával a következő eredményekhez jutottunk: a nucleus basalis sejtpopulációjában a ChAT-pozitív sejtek 26 %-a FG jelölést, az összes FG-jelölt sejt 37 %-a ChAT fluorescenciát mutatott, míg a capsula interna területén a ChAT-pozitív sejtek 40 %-a volt FG-jelölt, az összes FG-jelölt sejtnek pedig 43 %-a mutatott ChAT immunreaktivitást. Eredményeink elsőként tárták fel a BFC kolinerg sejtpopulációjának jelentős szerepét az EC innervációjában. Első lépésben nem specifikus retrográd jelölő anyagokat – kolloid arannyal konjugált wheat germ agglutinin (WGAgold)-t injiciáltunk az entorhinális kortex laterális területébe, majd ezt követően vizsgáltuk a capsula interna területén retrográd transzport által jelölt sejtek előfordulását és neurokémiai jellegét. Ennek feltárására ChAT-, PV-, CR- és CB immunfestést végeztünk a fénymikroszkópos metszeteken. Az eredmények feltárták, hogy a capsula interna sejtpopulációjában a kolinerg, GABAerg és CR-tartalmú sejtek vetítenek az EC-hez. Legnagyobb arányban a kolinerg, kisebb mértékben a CR-immunpozitív-, legkevésbé a GABAerg sejtek játszanak szerepet a basalo-entorhinocortico-fugális projekció rendszerben. E vizsgálatokkal összefüggő második közelítésünkben vizsgálni kívántuk glutamáterg projekciók előfordulását az előbb jellemzett rendszerben. E célból [³H]D-aszpartát-ot, a glutamáterg projekciók specifikus jelölésére szolgáló retrográd jelölő anyagot injiciáltunk az EC laterális területébe. Ezt követő autoradiográfiai eljárással vizsgáltuk a BFC különböző szubregióiban esetlegesen előforduló retrográd úton jelölt sejtek lokalizációját és neurokémiai (ChAT, CR- és CB-DAB immunjelölt) jellegüket. Eredményeink feltárták, hogy a BFC egyes régióiban az EC-hez vetítő kolinerg és CR-tartalmú neuronok egy kisebb populációja glutamáterg transzmittert is tartalmaz. A retrográd transzport által [³H]D-aszpartát jelölt sejtek

száma lényegesen alacsonyabb volt minden szubdivízióban, mint a WGAgold által aspecifikusan jelölteké. A [³H]D-aszpartát-jelölt sejtek előfordulása a capsula interna állományában volt legnagyobb, míg ezeket legkisebb számban a MSvDB szubdivízióban figyeltük meg. A BFC vizsgált szubdivízióinak legnagyobb részében CR-immunpozitív sejtek tartalmaztak autoradiográfias jelölést, míg a vDB állományában a [³H]D-aszpartát-jelölt sejtek kizárólag ChAT-immunjelöltnek bizonyultak.

Ismert a szexuál-szteroidok hatása a központi idegrendszerben végbemenő számos idegműködés modulálásában. Felvetődik, hogy ezen szteroidok modulációs mechanizmusaiban szerepet játszanak-e glutamáterg ingerületi hatások. Ennek tanulmányozására vizsgáltuk glutamáterg neuronok androgén receptorral való morfológiai összefüggését. Paralel kísérletekben feltérképeztük a VGluT2-ir és androgén-receptor ir sejtek eloszlását a szeptum, hypothalamus és a BFC capsula interna területén. Több régióban megfigyeltük a VGluT2-ir (citoplazma-jelölődés) és az androgén-receptor-ir (sejtmagra korlátozó jelölődés) sejtek nagy denzitású szuperpozícióját (5). VGluT2 plusz androgén-receptor kettős immunjelölt metszeteken, egymást követő nikkell-intenzifikált DAB- önálló DAB immunfestéssel vizsgáltuk a kétféle antigén ugyanazon sejtben való együttes előfordulását. A két antigén kolokalizációját mutató sejteket találtunk a hypothalamus egyes magjaiban (nucleus [n] ventromedialis; n. arcuatus; n. premamillaris) és a BFC capsula interna állományában. Eredményeink feltárták, hogy jelentős számú régióban vannak androgén-receptort is tartalmazó glutamáterg idegsejtek. Első morfológiai észleletként értékelhető megfigyelésünk arra utal, hogy szexuálhormonok központi idegrendszeri hatásainak közvetítésében glutamáterg neuronok résztvesznek. Vizsgáltuk a növekedési hormon elválasztására közvetlenül ható neurohormonokat termelő idegsejtek glutamáterg innervációját. Eredményeink feltárták, hogy glutamáterg idegrostok végződnek GHRH neuronokon a nucleus arcuatusban és somatostatint tartalmazó idegsejteken a nucleus periventricularis anteriorban (1.). Leleteink közvetlen neuromorfológiai adatok annak alátámasztására, hogy a glutamát ilyen hatását közvetlenül GHRH-t és somatostatint termelő idegsejtekre fejt ki (9.). Kimutattuk a nucleus suprachiasmaticus (SCN) állományában a VGluT2-tartalmú axonvégzések nagyszámú előfordulását. EM-os vizsgálataink eredményei feltárták a VGluT2-ir glutamáterg axonvégzések szinaptikus kapcsolatait VIP-, AVP-, és GAD-ir neuronok membránfelszínén (7.). Kimutattuk specifikus neurokémiai markereket nem tartalmazó VGluT2-ir neuronok jelenlétét, közvetlenül igazolva glutamáterg neuronok kis számban való előfordulását patkány SCN-ban (10.). A glutamáterg neuronrendszer idegi kapcsolatainak vizsgálata során kimutattuk a nucleus ventromedialis hypothalami (VM) glutamáterg beidegzésében szerepet játszó afferens kapcsolatok eredő sejtjeinek intra- és extra-hypothalamikus eredési helyét (12.). A [³H]D-aszpartát VM-ba történt beadását követő retrográd axonális transzport eredményének autoradiográfias megjelenítése szelektíven feltárta a glutamáterg afferensek kiindulási helyeit. Intra-hypothalamikus helyekként azonosítottuk: a VM, preoptikus area, nucleus paraventricularis, area hypothalamica anterior, nucleus premamillaris ventralis helyeit, míg extra-hypothalamikus agyállományban: a bed nucleus strae terminalis, a lateralis szeptum és az amygdala egyes magjai képezték a glutamáterg afferensek eredési helyeit.