

Humán agykérgi neuronhálózatok működése és szerotonerg szabályzása

Doktori értekezés

Komlósi Gergely

Témavezető:
Dr. Tamás Gábor, Ph.D., D.Sc.

Szegedi Tudományegyetem
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék
Biológia Doktori Iskola

2012

Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS	4
1.1 Az agykéregi hálózat felépítése.....	4
1.2 Az aktivitás terjedése a kéregben	7
1.3 A szerotonerg rendszer.....	10
1.4 A szerotonerg rendszer érintettsége a depresszióban és szerepe a kognitív folyamatokban.....	13
2. CÉLKITŰZÉSEK ÉS KÖZREMŰKÖDÉSEK	16
2.1 Célkítűzések	16
2.2 Közreműködések	16
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	17
3.1 Agyszelet készítés.....	17
3.2 Elektrofiziológia	17
3.3 Farmakológia.....	19
3.4 Hisztológia.....	20
3.5 Sejt azonosítás és három-dimenziós fénymikroszkópos rekonstrukció.....	20
3.6 Elektronmikroszkópia	21
4. EREDMÉNYEK.....	22
4.1 Egy sejt által kiváltott hálózati események a humán agykéregben	22
4.1.1 Piramis sejtek posztzinaptikus hatásai a humán agykéregben.....	22
4.1.2 A poliszinaptikus kapcsolatok farmakológiai jellemzése	25
4.1.3 Monoszinaptikus serkentő kapcsolatok elektrofiziológiai valamint fény- és elektronmikroszkópos vizsgálata.....	28
4.1.4 Axo-axonikus sejtek szerepe a poliszinaptikus hálózati események kialakításában	33
4.2 Egy sejt által aktivált poliszinaptikus hálózatok szabályozása fluoxetin és szerotonin által a humán agykéregben.....	35
4.2.1 Szerotonin és fluoxetin hatása a piramis sejt által kiváltott poliszinaptikus események előfordulására	35
4.2.2 A szerotonin és fluoxetin hálózati hatásának szinaptikus mechanizmusa	38
4.2.3 A szerotonin glutamáterg transzmisszióra kifejtett hatásának mechanizmusa.....	43
5. DISZKUSSZIÓ	47
5.1 Egy sejt által aktivált poliszinaptikus hálózatok a humán agykéregben.....	47
5.2 Szerotonin és fluoxetin szerepe a poliszinaptikus hálózatok szabályozásában.....	51
6. ÖSSZEFOGLALÁS	57
7. SUMMARY	61
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	65
9. IRODALOMJEGYZÉK	66

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

EPSP serkentő posztszinaptikus potenciál

IPSP gátló posztszinaptikus potenciál

pPSP poliszinaptikus posztszinaptikus potenciál

5-HT 5-hidroxi-triptamin (szerotonin)

TCA triciklikus antidepresszánsok

GABA gamma-amino-vajsav

SSRI szelektív szerotonin transzporter gátló

DIC differenciál interferencia mikroszkópia

CV variációs koefficiens

PPR páros pulzus arány

NBQX 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide

8-OH-DPAT ($\pm$)-8-Hydroxy-2-dipropylaminotetralin hydrobromide

DMSO dimetil-szulfoxid

AMPA 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl)propanoicsav

DAB 3'3'-diaminobenzidine tetrahidroklorid

7 TM 7 transzmembrán doménnel rendelkező fehérje

mRNS hírvivő ribonukleinsav

GTP guanozin-trifoszfát

1. BEVEZETÉS

1.1 Az agykéregi hálózat felépítése

Az agykéreg a legbonyolultabbnak tekintett ismert élő struktúra. A kisagytól eltekintve, agyunkat alkotó 10^{11} idegsejtből 10^{10} idegsejt az agykéregben helyezkedik el (Braitenberg and Schuz, 1991; Pakkenberg and Gundersen, 1997), a humán agykéregben található szinapszisok becsült száma pedig 10^{12} és 10^{14} között van (Mountcastle, 1997; Tang et al., 2001). Az agykéreg az alapvető érző és motoros funkciókon kívül számos magasabb rendű funkcióért felel, mint amilyen a beszéd létrehozása és megértése, a tudat és számos egyéb kognitív folyamat. Az agykéregi területek lokalizált, szelektív sérülését követő funkcióvesztéses esetek megfigyelései során már az 1900-as évek elején kialakult az a koncepció, miszerint a különféle érző, motoros és kognitív funkciókért különböző agyi területek felelnek (Shepherd, 2004). A Nissl által a 19. század végén kifejlesztett festési eljárással pedig vizsgálható lett az agykérget alkotó idegsejtek eloszlása a kéreg különböző területein. Az idegsejtek eloszlása az ember és más emlősfajok agykéregben egyaránt réteges szerveződést mutat, mely alapján az agykéreg nagy részét kitevő neokortexet alapvetően egy hatrétegű struktúrának tekintjük. Brodmann már a 20. század elején leírta, hogy ez a hatrétegű szerveződés fajspecifikus módon területi különbségeket mutat az emlősök agykéregében. Ez alapján Brodmann a humán agykérget több mint 40 citoarchitektonikailag különböző területre osztotta (Brodmann, 1909; Shepherd, 2004). Számos, a Brodmann által citoarchitektonikailag meghatározott területről kimutatták a későbbiekben, hogy azok funkcionálisan is jól körülírható régiókat alkotnak. Az agykéreg alapvető felépítése, szerveződési elve az emlősök evolúciója során nem változott és az agykéregi területek citoarchitektonikailag és funkciójuk alapján alapvetően háromféle csoportba oszthatóak: az érző, a motoros és az asszociációs kéregi területekre. A szárazföldi állatok között a főemlősök rendelkeznek a legnagyobb aggyal a testtömegükhöz viszonyítva. Az emberi agy pedig még a főemlősökön belül is a legnagyobb a testtömeghez viszonyítva (Herculano-Houzel, 2009; DeFelipe, 2011) aminek hátterében nagyrészt az agykéregi, a magasabb rendű kognitív funkciók működésében szerepet játszó asszociációs és prefrontális területek relatív súlyának növekedése áll (Shepherd, 2004). A humán és nem humán fajok között fennálló, az agykéreg felépítésére vonatkozó különbségek nemcsak az eltérő funkciójú területek relatív súlyában nyilvánulnak meg, hanem az agykérget alkotó idegsejtek sűrűségében és szinaptikus kapcsoltságokban is megmutatkozik. A humán

agykéreg egységnyi térfogatában kevesebb idegsejt található mint alacsonyabb rendű emlős fajokéban, viszont az egy idegsejtre érkező átlagos szinapszisszám, különösen a kognitív működésekben szerepet játszó területeken, magasabb mint más emlős fajokban (Cragg, 1967; DeFelipe et al., 2002; Elston, 2003). Habár a humán és nem humán fajok kognitív képességei között tapasztalt különbségeket leginkább az emberi neokortex, azon belül is, főként a prefrontális kéreg fejlettségének, egyediségének tulajdonítjuk, az anatómiai és méretbeli különbségek ellenére a humán agykérget alkotó egyedi idegsejtek és idegsejt hálózatok működéséről keveset tudunk.

Az agykéreg sejt szintű szerveződésének első szisztematikus feltérképezése Ramon y Cajal munkásságához köthető (Ramon y Cajal, 1904; Ramon y Cajal, 1911). Cajal a Camillo Golgi által kifejlesztett ezüst impregnációs festési eljárás segítségével tanulmányozta az idegsejtek morfológiáját és a kérgi hálózat felépítését humánban és más emlős fajokban. Cajal számos idegsejt típust nevezett el és jellemzett morfológiailag és számos megállapítása még ma is érvényes. Annak ellenére, hogy számos, az agykérget érintő korai anatómiai megfigyelést humán agykérgen végeztek az agykérgi sejthálózatok felépítésére és működésére vonatkozó pontosabb ismereteink túlnyomórészt más emlős fajokon, főként rágcsálókön, macskán és főemlősökön végzett kísérletekből származnak.

A kérgi idegsejtek két fő csoportba sorolhatóak: az egyik csoportot a kéreg principális sejtjei, a serkentő piramisisejtek alkotják, melyek az idegsejtek 75-85%-át teszik ki. A másik csoportot az idegsejtek 15-25%-át alkotó GABAerg interneuronok heterogén populációja alkotja, melyeket hagyományosan gátló sejteknek tekintünk (Sloper et al., 1979; Winfield et al., 1980; Kawaguchi, 1993; Somogyi et al., 1998; Markram et al., 2004).

A piramisisejtek neurotranszmittere a glutamát. Jellegzetes morfológiájúak, melyek szembetűnő közös jellemzője a tüskézett dendritfájuk és a kéreg felszíne felé merőlegesen futó vastag apikális dendritjük mely a terminális régióban elágazódásokat képez. Az apikális dendrit mellett számos dendrit ered a sejttest bazális részéről. A piramisisejtek másik szembetűnő tulajdonsága, hogy rendszerint piramis alakú sejttestük bazális területéről eredő axonjuk főága a kéreg alatt elhelyezkedő fehérállomány felé veszi az irányt mely oda kilépve más kérgi és kéreg alatti területekre jut el és azok idegsejtjeivel létesít szinaptikus kapcsolatot, míg a főágról még a kéregben leváló oldalági helyi idegsejtekkel létesítenek szinaptikus kapcsolatokat. A sejtsegregény első réteg kivételével a piramisisejtek a neokortex valamennyi rétegében megtalálhatóak, rétegre jellemző sajátos morfológiával. A különböző rétegek piramisisejtjei eltérő kérgi és kéreg alatti szinaptikus bemenetekkel rendelkeznek, valamint

axonjaik is eltérő kérgi és kéreg alatti területeket céloznak meg, ezért a kérgi információ feldolgozás eltérő fázisaiban játszanak szerepet (Douglas and Martin, 2004).

A GABAerg interneuronok kis számuk ellenére igen heterogén csoportot alkotnak. A GABAerg interneuronok elmúlt két évtizedben történő elektrofiziológiai, immunhisztokémiai és molekuláris jellemzése valamint szinaptikus kapcsolatrendszerük és in vivo aktivitásuk vizsgálata alapján számos funkcionálisan is elkülöníthető idegsejt csoportot alkotnak (DeFelipe, 1993; Freund and Buzsaki, 1996; Cauli et al., 2000; Klausberger et al., 2003; Markram et al., 2004; Rudy et al., 2011). Az egyes morfológiai, citokémiai és elektrofiziológiai osztályok jól korrelálnak egymással és így funkcionálisan is vizsgálható és jellemezhető osztályokat alkotnak (Kawaguchi and Kubota, 1993; Kawaguchi and Kubota, 1996; Kawaguchi and Kubota, 1997). Alakjuk változatos, nincs kitüntetett apikális dendritjük, axonjuk pedig jellemzően ugyanabban a kérgi régióban szinaptizál amelyben a sejttest és dendritek is találhatóak. Neurotranszmitterük a gamma-amino-vajsav (GABA), ezért hagyományosan gátló idegsejteknek tekintjük őket. Az utóbbi években kiderült azonban, hogy e sejtek kis hányadát képező axo-axonikus sejtek akár serkentő hatásúak is lehetnek (Szabadics et al., 2006). A különféle interneuron osztályok a piramissejtek felszínének eltérő régióit idegzik be szelektíven vagy preferenciálisan célozva az axon iniciális szegmentumot, a periszomatikus régiót, valamint a disztális dendriteket (Buhl et al., 1994; Halasy et al., 1996; Somogyi et al., 1998; Tamas et al., 1998), felosztva ezzel egymás között a piramissejtekben történő szinaptikus integrációs folyamatok különböző fázisának szabályozását (Miles et al., 1996). A különböző osztályokba tartozó interneuronok a rájuk érkező serkentő bemenetek eltérő dinamikájából fakadóan a preszinaptikus aktivitás különböző aspektusainak detektálására lehetnek alkalmasak (Pouille and Scanziani, 2004), a kérgi információfeldolgozás eltérő fázisaiban vehetnek részt (Klausberger et al., 2003; Somogyi and Klausberger, 2005) és eltérő módon reagálhatnak szenzoros stimulációra (Gentet et al., 2012).

A Ramon y Cajal által elnevezett kosársejtek a GABAerg sejtek közel 50%-át adják (Markram et al., 2004). A kosársejtek sima, tüskézetlen dendritű heterogén sejtpopulációt alkotnak, melyek jellemzően a piramissejtek sejttestét (szóma) és periszomatikus dendritjeit idegzik be (Somogyi et al., 1983; Kisvarday et al., 1993; Freund and Katona, 2007). Gyors membrán időállandójuknak köszönhetően, a rájuk érkező serkentő bemenetek gyorsan és viszonylag nagy precizitással kelthetnek akcióspotenciált bennük (Fricker and Miles, 2000; Galarreta and Hestrin, 2001). Egymással kölcsönös rés- és szinaptikus kapcsolatokat alkotva, a kosársejtek hatékonyan szinkronizálják egymás és milliszekundumos pontossággal időzítik

posztszinaptikus sejtjeik működését (Galarreta and Hestrin, 1999; Gibson et al., 1999; Tamas et al., 2000; Galarreta and Hestrin, 2001; Tamas et al., 2004) valamint szerepet játszanak a gamma frekvenciájú hálózati oszcillációk kialakításában (Cardin et al., 2009; Sohal et al., 2009).

Az axo-axonikus sejtek a kérgi GABAerg idegsejteknek csak kis hányadát adják és kizárólag a piramissejtek axon-iniciális szegmentumát idegzik be (Somogyi, 1977; Somogyi et al., 1982; Howard et al., 2005). Egyetlen axo-axonikus sejt körülbelül 300 piramissejt axon iniciális szegmentumát idegzi be ezért festett metszeten, a kéregre merőleges axon iniciálisokkal párhuzamosan futó axo-axonikus terminálisok, sokágú gyertyatartóra emlékeztetnek. Innen ered ezen sejtek Szentágothai János által adott elnevezése, a kandeláber sejt (Szentágothai and Arbib, 1974). Az axon iniciális szegmentumban a legalacsonyabb az akciós potenciál keletkezéséhez szükséges küszöbpotenciál (Colbert and Johnston, 1996; Stuart et al., 1997; Palmer and Stuart, 2006) ezért ezt a sejtípust sokáig a leghatékonyabb gátló sejtnak tekintették. Munkatársaim nemrégiben kimutatták, hogy az axo-axonikus sejtek képesek akcióspotenciált kiváltani piramissejtekben mivel az axonális GABA reverz potenciál a szomatikusnál számottevően depolarizáltabb értéket vehet fel (Szabadics et al., 2006). Ezzel a serkentő piramissejtek (és a 4. rétegben előforduló tüskés csillagsejtek) mellett ez az egyetlen eddig ismert kérgi GABAerg sejt amely képes serkenteni posztszinaptikus sejtjeit.

Számos egyéb, a piramissejtek proximális és disztális dendritjeit célzó GABAerg sejtípust ismerünk, melyeknek fontos szerepe van a dendritikus gátlás kialakításában ezáltal a disztális dendritszakaszok szinaptikus integrációs folyamatainak szabályozásában (Silberberg and Markram, 2007; Murayama et al., 2009).

1.2 Az aktivitás terjedése a kéregben

A kérgi információ feldolgozáshoz az aktivitás szabályozott terjedése szükséges mely az idegsejtek térben és időben összehangolt működését igényli. A kérgi információáramlást leíró modellek szerint, az aktivitás a piramissejtek között létesített serkentő szinaptikus kapcsolatok révén terjed a kéregben, és tér- és időbeli szabályozását elsősorban a működésében és szinaptikus kapcsolataiban heterogén interneuron populáció végzi. A piramissejtekre érkező serkentő szinaptikus bemenetek nagy része azok dendritikus régióján helyezkedik el, sokuk távol az akciós potenciál elsődleges keletkezési helyétől, az axon iniciális szegmentumtól. A serkentő bemenetek által lokálisan kiváltott membrán

depolarizáció a dendritikus filtráció következtében jelentős amplitúdó csökkenéssel érkezik meg a szómába (Williams and Stuart, 2002). A piramissejtekre érkező serkentő szinaptikus bemenetek hatását az akciós potenciál keletkezésére a sejt saját passzív és aktív elektromos konduktanciái mellett a piramissejtekre érkező gátló szinapszisok működése is meghatározza (Spruston et al., 1994; London et al., 2002; Pouille and Scanziani, 2004). Az interneuronok által a hálózat sejtjeire kifejtett gátlás a serkentés terjedésének irányához viszonyítva lehet feed-forward és feed-back. A feed-forward gátlás szabályozza a serkentés célsejtjeinek ingerelhetőségét (Buzsaki, 1984) és megfelelően időzíti a bennük keletkezett akciós potenciálokat (Pouille and Scanziani, 2001; Mittmann et al., 2005). A feed-back (vagy rekurrens) gátlás szabályozza a serkentés forrásának integratív tulajdonságait továbbá korlátozza ismételt esetleg túlzott aktivációját (Andersen et al., 1963; Pouille and Scanziani, 2004).

Egy agykérgi területre érkező afferensek szinaptikus célsejtjei, a kérgi idegsejtek közötti szinaptikus kapcsolatok és a kérgen belüli információ áramlás iránya sztereotip mintázatot mutatnak (Somogyi et al., 1998; Douglas and Martin, 2004). Minden egyes idegsejt több 100 esetleg több 1000 – kérgi vagy kérgen kívüli - idegsejttel áll közvetlen szinaptikus kapcsolatban. Egy átlagos agykérgi idegsejtre jellemzően 5000-30000 szinapszis érkezik - bár ez a szám bizonyos fajokban egyes agykérgi területeken akár a 60000-et is elérheti (Cragg, 1967; DeFelipe et al., 2002; Binzegger et al., 2004; Lubke and Feldmeyer, 2007). Egy átlagos kérgi idegsejt szinaptikus bemeneteinek 80-85%-a serkentő szinapszis (Douglas and Martin, 2007), melynek mindössze csak töredéke érkezik kéreg alatti területekről - mint például a szenzoros információkat szállító talamuszból -, nagy részük lokális eredetű, vagy más kérgi területekről származnak (Douglas and Martin, 2007; Oberlaender et al., 2011). Ez kifejezetten igaz a 2/3. rétegre ahol Binzegger és munkatársai macska elsődleges látókérgén végzett számításai szerint a piramissejtek serkentőbemeneteinek 70%-a más helyi 2/3. rétegi piramissejtektől származik (Binzegger et al., 2004). Az intrakortikális szinapszisok túlsúlya azt mutatja, hogy a kérgi információ feldolgozás fő meghatározója maga a rekurrens serkentő kapcsolatokban gazdag helyi kérgi hálózat (Douglas and Martin, 2007).

A kanadai pszichológus, D.O. Hebb 1949-ben publikált elméletében neurális alapokra helyezte a gondolkodásban és emlékezetben szerepet játszó mentális reprezentációk létrejöttét illetve működését (Hebb, 1949; Buzsaki, 2010). Hebb még ma is igen befolyásos elmélete szerint a különféle kognitív entitások reprezentációját az agyban az idegsejteknek olyan csoportosulásai, az úgynevezett “sejtegyüttesek” képezik, melyek tagjai erős kölcsönös

serkentő szinaptikus kapcsolatban állnak egymással és a rekurrens kapcsolatok következtében a sejtegyüttes megfelelő számú tagjának az aktivációja az egész sejtegyüttest időlegesen stabil, aktív állapotba hozza. Hebb szerint ezek a sejtegyüttesek lehetnek a kognitív reprezentációk funkcionális egységei, továbbá szekvenciális aktivációjuk lehet az alapja a különféle kognitív folyamatoknak mint az emlékezés, gondolkodás, tervezés és döntéshozatal (Hebb, 1949; Buzsaki, 2010). A Hebbi sejtegyüttesek léte napjainkban is intenzíven kutatott terület és számos kísérleti eredmény támogatja Hebb elméletét (Harris, 2005; Buzsaki, 2010). A rekurrens serkentő kapcsolatok következtében a kérgi hálózat afferenciációjától megfosztva *in vitro* is generál spontán aktivitást (Sanchez-Vives and McCormick, 2000), melynek mintázata az idegsejtek koordinált működésére utal (Tsodyks et al., 1999; Mao et al., 2001; Cossart et al., 2003). Ikegaya és munkatársai egér *in vitro* agykérgi hálózat spontán aktivitásmintázatait elemezve szinkron aktív idegsejtek precízen ismétlődő szekvenciális aktivációjáról számoltak be (Ikegaya et al., 2004). MacLean és munkatársai kimutatták, hogy az *in vitro* talamikus stimuláció által kiváltott agykérgi aktivitásmintázat lényegében nem különbözik a kéregben spontán is lejátszódó aktivitásmintázattól (MacLean et al., 2005). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a kérgi aktivitás mintázata elsősorban a kéreg saját belső szerkezetéből fakad, és hogy a szenzoros bemenet hiányában is fennálló spontán aktivitás nem véletlenszerűen, hanem funkcionálisan kapcsolt sejtek, sejtegyüttesek között terjedhet szelektíven megerősödött szinaptikus útvonalakon keresztül.

Számos *in vivo* és *in vitro* vizsgálat alátámasztja, hogy az agykérgi hálózat képes komplex, sztereotip aktivitásmintázatok létrehozására de a szinaptikus kapcsolatok szintjén nem teljesen tisztázott a mechanizmus ami lehetővé teszi az aktivitás meghatározott szinaptikus útvonalakon történő terjedését. Rágcsálókban végzett *in vivo* vizsgálatok kimutatták, hogy már egyetlen kérgi piramissejt aktivációja is képes kiváltani bajusz szőr mozgást valamint befolyással lenni az állat viselkedésére (Brecht et al., 2004; Houweling and Brecht, 2008). A piramissejtek által kiváltott lokális monoszinaptikus serkentés 1-2 ms-os latenciával követi a piramissejt akciós potenciálját a kéregben. Az aktivitás hosszabb idejű fennmaradásához, poliszinaptikus neuron-láncok aktivációja kell. A kiváltott hatás mindkét vizsgálat esetén több száz milliszekundummal követte a piramissejtek aktivitását, de a mechanizmus ami egy sejt aktivitását viselkedési mintázattá transzformálja, nem ismert. A hálózati aktivitás megfelelő mintázat szerinti terjedéséhez serkentő és gátló feed-forward és feed-back kapcsolatok együttes összjátéka szükséges (Lorente de No, 1938; Buzsaki, 1984; Cobb et al., 1995; Miles et al., 1996; Fitzsimonds et al., 1997; Pouille and Scanziani, 2004; Mittmann et al., 2005). A kérgi szinaptikus kapcsolatok eddigi vizsgálata azonban azt mutatja,

hogy a piramissejtek közötti serkentő kapcsolatok nagyon gyengék (Song et al., 2005). Egyetlen piramissejt többnyire csak küszöb alatti monoszínaptikus EPSP-ket, alkalmanként legfeljebb, interneuronok aktivációján keresztül, diszínaptikus IPSP-ket képes kiváltani posztzínaptikus piramissejtekben (Miles, 1990; Galarreta and Hestrin, 2001; Mori et al., 2004; Pouille and Scanziani, 2004; Silberberg and Markram, 2007). A gyenge serkentő kapcsolatok alapján az általánosan elfogadott elképzelés, hogy több tíz piramissejt kellőképpen szinkronizált konvergens bemenete szükséges ahhoz, hogy a posztzínaptikus piramissejtben akciós potenciált váltsanak ki és a szinkron tüzelő piramissejtek szekvenciális aktivációja szükséges az információ terjedéséhez a kéregben (Abeles, 1991; Diesmann et al., 1999; London et al., 2002).

1.3 A szerotonerg rendszer

Az agykéreg működésében a glutamaterg és GABAerg sejtek mellett számos más neurotranszmitter rendszer is szerepet játszik. Közülük a szerotonerg az első neurotranszmitter rendszer, ami az egyedfejlődés során kifejlődik (Levitt and Rakic, 1982). A szerotonerg rendszernek fontos szerepe van a későbbi neurogenesisben, az idegsejtek differenciációjában és az idegsejt-hálózatok kifejlődésében (Kirkwood, 2000; Azmitia, 2001; Daubert and Condrón, 2010). A szerotonin számos alapvető fiziológiai folyamatban betöltött szerepe mellett a viselkedést is befolyásolja. Szerepet játszik az alvás-ébrenlét ciklus szabályozásában, stresszben, tanulásban, kognitív és emocionális folyamatokban (Portas et al., 2000; Maier and Watkins, 2005; Cools et al., 2008; Robbins and Arnsten, 2009). Számos pszichiátriai betegség - mint a depresszió, szorongásos zavarok, skizofrénia, Alzheimer-kór - hátterében pedig részben a szerotonerg rendszer működési zavarát vélik húzódní (Lucki, 1998; Meltzer et al., 1998; Jones and Blackburn, 2002; Nestler et al., 2002).

A szerotonint 1948-ban írták le először egy ér összehúzóaszt kiváltó anyagnaként, amint azt neve is mutatja (Rapport et al., 1948). Az 1950-es évek elején vált ismertté, hogy a hallucinogén D-lizergsav-dietilamid szerotonin receptoron keresztül fejtí ki tudatmódosító hatását (Shaw and Woolley, 1956), valamint az, hogy a szerotonin egy endogén neurotranszmitter a központi idegrendszerben (Brodie et al., 1955; Brodie and Shore, 1957). A szerotonin bioszintézis prekursora az esszenciális aminosav L-triptofán, melynek hozzáférhetősége az agy számára érzékenyen befolyásolja a szerotonerg transzmissziót (Schaechter and Wurtman, 1990). Az L-triptofánból a triptofán-hidroxiláz (Walther et al., 2003; Zhang et al., 2004) enzim által először 5-hidroxitriptofán, majd abból az aminosav

dekarboxiláz enzim által szerotonin keletkezik. A szerotonin biokémiai degradációját a monoamin-oxidáz-A végzi. A monoamin-oxidáz-A majd egy aldehyd dehidrogenáz enzim segítségével 5-hidroxi-indolsavvá alakul, ami a vizelettel ürül ki a szervezetből.

A központi idegrendszerben a szerotonin forrásai a triptofán-hidroxiláz pozitív idegsejtek melyek az agytörzs területén 9 magba csoportosulnak, melyek együttesen alkotják a szerotonerg Raphe-magcsoportot (Dahlstroem and Fuxe, 1964; Joh et al., 1975; Hornung, 2003). Az itt elhelyezkedő szerotonerg idegsejtek axonjai a központi idegrendszer nagy részét beidegzik beleértve a teljes agykérgi régiót (Waterhouse et al., 1986; Wilson and Molliver, 1991). A szerotonerg neuronok az éberségi állapot függvényében 0,5-2,5 Hz-en tüzelnek. Legaktívabbak éber állapotban, míg REM alvás alatt teljesen inaktívak. A szerotonerg rendszer egyik legjobban vizsgált célterülete a prefrontális kéreg (Andrade, 2011), mely számos magasabb rendű kognitív tevékenységben és az érzelmi folyamatok szabályozásában játszik szerepet (Quirk and Beer, 2006). Számos állatfajon végzett vizsgálat azt mutatja, hogy a szerotonerg axonterminálisoknak csak egy része alkot klasszikus szinapszist poszt-szinaptikus struktúrákkal (Seguela et al., 1989). Makákó prefrontális kérgén végzett vizsgálat azt mutatja, hogy a szerotonerg axonterminálisoknak mindössze egy negyede képez klasszikus szinapszist (Smiley and Goldman-Rakic, 1996). Ezért feltételezik, hogy a klasszikus szinaptikus transzmisszió mellett nagyjából részben térfogati transzmisszióval jut el a szerotonin a receptoraihoz (Descarries et al., 1975; Bunin and Wightman, 1999; Verge and Calas, 2000), ebből pedig következik, hogy az extraszinaptikus szerotonin koncentráció változása a fő meghatározója a szerotonerg szignalizációnak. Az extracelluláris szerotonin koncentráció hatékony szabályozói a szerotonin transzporterek, amik a szerotonint az extracelluláris térből az axonterminálisokba juttatják, az 1-3 nM-os tartományban tartva az alapállapotú extracelluláris szerotonin koncentrációt (Gobert et al., 1998). A szerotonerg axonterminálisokból egyetlen akciós potenciál hatására felszabaduló szerotonin, a lokális extracelluláris szerotonin koncentrációt 50-100 nM-ra növeli és a szerotonerg rostok intenzív ingerlésével ez az érték akár 500-800 nM-ra is emelkedhet (Bunin and Wightman, 1998).

A szerotoninnak több mint 14 receptora ismert az központi idegrendszerben többségük a G-fehérje kapcsolt 7 TM receptorok családjába tartozik. Kifejeződésük agyterület- és sejtspecifikus mintázatot mutat, és számos jelátviteli út működését befolyásolják (Hoyer et al., 1994; Barnes and Sharp, 1999; Hoyer et al., 2002; Lambe et al., 2011). Közülük az 5-HT_{1A} és 5-HT_{2A} receptorok a neokortex és azon belül is a prefrontális kéreg leggyakoribb szerotonin receptorai patkányban (Santana et al., 2004; Puig et al., 2010) főemlősökben (Jakab and Goldman-Rakic, 2000; DeFelipe et al., 2001; de Almeida and Mengod, 2007; de Almeida and

Mengod, 2008) és emberben (Hoyer et al., 1986; Hoyer et al., 1986; DeFelipe et al., 2001; de Almeida and Mengod, 2007; de Almeida and Mengod, 2008) egyaránt. A szerotonin kéregben kiváltott sejt és hálózatszintű mechanizmusairól többnyire állatkísérletekből van információnk humán adatok korlátozottak. A 5-HT_{1A} és 5-HT_{2A} receptorok mind fehérje mind mRNS szinten kimutathatóak piramissejtek és interneuronok bizonyos populációiban egyaránt a neokortex számos területén. A 5-HT_{1A} receptor pertussis toxin érzékeny GTP kötő fehérjén keresztül számos intracelluláris effektor mechanizmust befolyásol (Andrade et al., 1986; De Vivo and Maayani, 1986; Dumuis et al., 1988; Fargin et al., 1991). Kálium-csatornák közvetlen szabályozásán keresztül megnöveli a sejtmembrán kálium konduktanciáját (Andrade et al., 1986; Schmitz et al., 1998) mely a piramissejtek és interneuronok hiperpolarizációjához (Andrade and Nicoll, 1987; Foehring et al., 2002; Xiang and Prince, 2003), vagy a transzmitter felszabadulás csökkenésén keresztül a glutamáterg transzmisszió csökkenéséhez vezet (Schmitz et al., 1998) patkány agykéregben. A 5-HT_{1A} receptor aktiváció in vitro ugyancsak csökkenti a piramissejtek (Zhong and Yan, 2011) ingerelhetőségét továbbá in vivo csökkenti piramissejtek és interneuronok aktivitását patkány prefrontális kéregben (Amargos-Bosch et al., 2004; Puig et al., 2010).

A 5-HT_{2A} receptor pozitívan kapcsolt a foszfolipáz-C útvonalhoz és aktivációja az inozitol-foszfát és a kalcium ionok intracelluláris felhalmozódásához vezet (Pritchett et al., 1988; Barnes and Sharp, 1999). A 5-HT_{2A} aktiváció a piramissejtek és interneuronok depolarizációjához vezet a kálium-csatornák zárásán keresztül az agykéreg számos területén (Araneda and Andrade, 1991; Marek and Aghajanian, 1994; Aghajanian and Marek, 1997; Foehring et al., 2002). In vitro növeli az idegsejtek ingerelhetőségét (Zhong and Yan, 2011) in vivo pedig az interneuronok és piramissejtek (Amargos-Bosch et al., 2004; Puig et al., 2010) aktivitását fokozza.

A szerotonin funkcionális hatását humán kérgi neuronokon csak nagyon korlátozott számban vizsgálták meg eddig (McCormick and Williamson, 1989; Newberry et al., 1999). Patkány agykérgében leírtakkal összhangban szerotonin 5-HT_{1A} receptor aktiváción keresztül hiperpolarizálja, a 5-HT_{2A} receptor aktiváción keresztül pedig depolarizálja a humán piramissejteket (Newberry et al., 1999). Nem humán fajokon végzett kísérletek bizonyítják hogy a szerotonin számos agyterületen befolyásolja a glutamáterg transzmissziót, bár ezen vizsgálatok szinte kivétel nélkül a fiziológias extraszinaptikus szerotonin koncentrációnál nagyságrendekkel magasabb koncentrációban vizsgálták a szerotonin hatását (Ciranna, 2006). A szerotoninnak a szinaptikus transzmissziót és hálózati aktivitást befolyásoló hatása a humán agykéregben azonban még nem ismert.

1.4 A szerotonerg rendszer érintettsége a depresszióban és szerepe a kognitív folyamatokban

A pszichiátriai betegségek nagy része hangulati és kognitív zavarokkal társul (Roth et al., 2004; Lewis and Moghaddam, 2006; Castaneda et al., 2008). A szerotonerg rendszer kiemelt célpontja ezen tünetek javítását célzó gyógyszereknek valamint fontos szerepet tulajdonítanak neki ezen betegségek kialakulásában (Jones and Blackburn, 2002; Roth et al., 2004; Castren, 2005). A szerotonerg rendszer pszichiátriai betegségekben való érintettsége először a 60-as években az első antidepresszánsok hatásmechanizmusának vizsgálatakor vetődött fel. A legelső antidepresszáns tulajdonsággal említett gyógyszerek az iproniazid és az imipramin voltak melyek hatását az 50-es évek második felében írták le először (Kuhn, 1958). A 60-as évek elejére az az elképzelés alakult ki, hogy az imipramin és a hozzá hasonló triciklikus antidepresszánsok (TCA) hatásukat az adrenerg sejtek monoamin visszavételének gátlásán keresztül fejtik ki. Bár az imipramin szerotonin visszavétel gátló hatását már az 50-es évek végén kimutatták vérlemezékben a figyelem mégis csak azután irányult a szerotoninra, miután Carlsson és munkatársai 1968-ban kimutatták, hogy a központi idegrendszeri szerotonin visszavétel is blokkolható imipraminnal (Carlsson et al., 1968). A szerotonin visszavétel gátlók blokkolják az idegsejtek membránjában elhelyezkedő szerotonin transzporterek működését, melyeknek a feladata, hogy az agyi extracelluláris térből a sejtekbe transzportálják a szerotonint (Hiemke and Hartter, 2000). A transzporterek inaktivációja az extracelluláris tér szerotonin koncentrációjának növekedéséhez vezet (Fuller, 1994). A TCA-k azonban nem voltak specifikusak a monoamin visszavétel gátlására, hanem affinitással rendelkeztek számos más receptor iránt és emiatt számos nem kívánt mellékhatással bírtak. Ebből kifolyólag megindult a gyógyszertervezés a szelektíven a monoamin transzportot gátló molekulák irányába.

Az első szelektív szerotonin visszavétel gátló (SSRI) kifejlesztésére (Zimeldine) az 1970-es évek elején került kifejlesztésre amit még néhány másik követett a 70-es 80-as években. A fluoxetin (Prozac) és más SSRI-ok felfedezése radikálisan megváltoztatta depresszív betegségek kezelését (Wong et al., 1974; Wong et al., 1995). Mivel az SSRI-ok a TCA-kal szemben jóval kisebb affinitást mutatnak más transzporterek és receptorok iránt emiatt alkalmazásuk jóval kevesebb mellékhatással járt, ennek következtében terápiás használatuk gyorsan elterjedt (Jones and Blackburn, 2002; Milane et al., 2006). Mivel a korai antidepresszánsok a szerotonerg és noradrenerg rendszer transzportereinek működését

befolyásolták kézenfekvő volt azt feltételezni, hogy ezen transzmitter rendszerek megváltozott működése áll a betegségek hátterében. Innen ered a depresszió monoaminerg hipotézise amely az elégtelen agyi szerotonin koncentrációt teszi felelőssé a depresszió és tüneteinek kialakulásáért és amely szerint a szerotonin transzporter blokkolók az extracelluláris szerotonin koncentráció megemelésével állítják helyre az agy működését (Maes M., 1995; Manji et al., 2001; Castren, 2005). A monoaminerg hipotézist támogatja számos kísérlet melyben az agyi extracelluláris szerotonin koncentráció változásának hatását vizsgálták a depresszió tüneteinek kezelésében. Az agyi szerotonin szint drasztikus csökkentése a triptofán-hidroxiláz gátló para-klorofenilalanin alkalmazásával megakadályozta az imipramin terápiás antidepresszáns hatását (Shopsin et al., 1975). Egy kevésbé drasztikus és biztonságosabb módszer az akut triptofán deplécia, aminek lényege, hogy a triptofán bevitel megvonásával csökkenthető a szérumban és az agyban mérhető szerotonin koncentráció, mivel az L-triptofán a szerotonin szintézis prekursora (Carpenter et al., 1998). Az akut triptofán deplécia az érzelem feldolgozás depresszióra emlékeztető tüneteit eredményezte egészséges emberekben és akut SSRI kezelés pedig ezzel ellenkező hatást vált ki (Harmer, 2008). További vizsgálatok ezzel összhangban kimutatták, hogy akut triptofán deplécia egészséges emberekben a hangulat és memória funkciók romlását valamint megnövekedett agressziót, antidepresszáns kezelésben részesült depressziós páciensekben pedig a tünetek rosszabbodását eredményezte (Delgado et al., 1991; Bell et al., 2001; Riedel et al., 2002; Wang et al., 2009).

A csökkent szerotonerg transzmisszió szerepét a depresszióban genetikai vizsgálatok is alátámasztják. A szerotonin transzporter két allélja közül a "rövid" allél alacsonyabb transzkripció hatásfokkal bír mint a "hosszú" allél. Így a "rövid" alléllal rendelkező sejtek szerotonin transzporter expressziója valamint a szerotonin visszavétel hatásfoka esetükben alacsonyabb mint a "hosszú" alléllal rendelkező sejteké (Lesch et al., 1996). Genetikai vizsgálatok kimutatták, hogy az egy vagy két "rövid" szerotonin transzporter alléllal rendelkező egyének hajlamosabbak a depresszióra az életük során őket ért stresszes körülmények függvényében, mint a "hosszú" alléllal rendelkező homozigóta személyek (Caspi et al., 2003).

A szerotonerg rendszer, így az SSRI-ok is, a hangulat befolyásolása mellett a kognitív képességekre is hatással vannak (Schmitt et al., 2006). Nem-humán fajokban végzett vizsgálatok szerint a kognitív flexibilitás - egy prefrontális kéreghez köthető folyamat-, romlott ha csökkentették a prefrontális szerotonin szintet (Clarke et al., 2004), viszont javult, ha flouxetinnel blokkolták a szerotonin transzporter rendszert, fokozva ezáltal a kérgi

szeroenerg transzmissziót (Brigman et al., 2010). Klinikai kísérletek kimutatták továbbá, hogy a szeroenerg transzmisszió változása embereknél is számos kognitív folyamatra hatással van (Schmitt et al., 2006; Schweighofer et al., 2008). Canli és munkatársai egészséges embereket vizsgálva azt találták, hogy a kognitív feladatok végzése közben mérhető agyi aktivitás intenzitása különbséget mutat a szeroenin transzporter különböző alléljait hordozó egyének között (Canli et al., 2005). Akut triptofán depléción a depresszióban megfigyelhető teljesítményromláshoz vezetett a prefrontális kéreghez köthető érzelem felismerést, diszkriminációt és flexibilitást mérő kognitív feladatokban (Murphy et al., 2002). Krónikus fluoxetin kezelés hatására pedig depressziós pacienseknél a memória teljesítményének növekedéséről számoltak be különféle kognitív feladatokban (Richardson et al., 1994; Levkovitz et al., 2002; Schmitt et al., 2006).

Bár az SSRI-ok jellemzően néhány hetes krónikus alkalmazás után fejtik ki antidepresszáns hatásukat, azonban az érzelmi információk feldolgozását már akutan is befolyásolhatják (Harmer et al., 2003; Cools et al., 2008; Harmer, 2008). Az SSRI-ok akut és krónikus hatása sok tekintetben különbözik egymástól, de feltételezhető hogy korai hatásuk szerepet játszik késői krónikus hatásuk kifejlődésében (Castren, 2005; Harmer, 2008).

2. CÉLKITŰZÉSEK ÉS KÖZREMŰKÖDÉSEK

2.1 Célkitűzések

Azonosított sejtek közötti szinaptikus kapcsolatok elektrofiziológiai valamint fény-és elektronmikroszkópos vizsgálata ismereteink szerint még nem történt meg humán agykéregben. Disszertációm a humán agykérgi neuron-hálózatok szinaptikus szerveződésével és működésével foglalkozik a következő kérdésekre keresve a választ:

1. Milyen szinaptikus hatással bírnak a piramissejtek humán agykéregben a lokális neuronhálózatra?
2. Hogyan befolyásolja a humán agykérgi hálózati működést fiziológiás koncentrációjú szerotonin?
3. Hogyan befolyásolja a humán agykérgi hálózati működést a terápiás koncentrációjú fluoxetin?

2.2 Közreműködések

A 4.1. fejezet elektrofiziológiai kísérletek tervezését, kivitelezését és kiértékelését Dr. Molnár Gábor, Dr. Oláh Szabolcs, Dr. Szabadics János, Dr. Füle Miklós és Dr. Tamás Gábor végezték. A 4.1 fejezet 3 dimenziós fénymikroszkópos rekonstrukcióit Tóth Éva (3. és 8. ábrák) valamint én (5., 6. és 7. ábrák) végeztük. A 4.1 fejezet elektronmikroszkópos vizsgálatait én végeztem.

A 4.2. fejezet elektrofiziológiai kísérletek tervezését Dr. Molnár Gábor, Dr. Oláh Szabolcs, Dr. Tamás Gábor és én végeztük. Az elektrofiziológiai kísérletek nagy részét én végeztem, a kísérletekhez hozzájárultak még: Rózsa Márton, Dr. Oláh Szabolcs, Dr. Molnár Gábor és Dr. Füle Miklós. A 4.2 fejezet teljes kiértékelését én végeztem, a humán páciensekre vonatkozó adatok kivételével. A humán páciensekre vonatkozó adatokkal kapcsolatos kiértékelést Dr. Tamás Gábor végezte.

A humán mintákat Dr. Barzó Pál biztosította számunkra. A hisztológiai munkákat Tóth Éva végezte.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Agyszelet készítés

Minden vizsgálat a Helsinki Nyilatkozat értelmében és a Szegedi Tudomány Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével történt. A humán neokortikális szeletek olyan, szubkortikális tumorban szenvedő betegek akut biopsziás szöveteiből készültek, akiknél a tumor sebészeti megközelítéshez szükségszerű volt eltávolítani a bal vagy jobb oldali frontális, parietális vagy temporális kérgi területek egy részét. A betegek (18-73 év) a műtét előtt a szövetminták ilyen jellegű kutatásra való felhasználását írásban engedélyezték.

A műtétek a Szegedi Tudományegyetem Idegsebészeti Klinikáján történtek. Anesztézia indukálása midazolam (0,03mg/kg) és fentanil (1-2 µg/kg) intravénás adásával valamint intravénás bolusban adott propofollal (1-2 mg/kg) történt. Az endotracheális intubáció könnyítésére a páciensek 0,5 mg/kg rocuroniumot kaptak. Az intubáció 120 másodperccel ezt követően történt és a páciens O_2 és N_2O 1:2 arányú elegyével lélegeztették. Az anesztézia megfelelő szinten tartása szevofluránnal történt.

A sebészileg eltávolított szövetblokkokat a műtőben azonnal jéghideg (3-6 °C) magas szacharóz tartalmú mesterséges agy-gerincvelő folyadékba helyeztük. Az oldat összetétele mM-ban kifejezve a következő volt: 85 NaCl, 2,5 KCl, 1,25 NaH_2PO_4 , 25 $NaHCO_3$, 0,5 $CaCl_2$, 4 $MgSO_4$, 25 d(+)-glükóz, 75 szacharóz, 95% O_2 -t és 5% CO_2 -t tartalmazó gázeleggyel telítve. A szövetblokkból vibráló pengéjű mikrotómmal (Microm HM 650 V) 320 µm vastag szeleteket metszettünk. A szeleteket a metszés során használt mesterséges agy-gerincvelői folyadékba helyeztük majd 1 órán keresztül 30 °C-on inkubáltuk. Az inkubáció során a magas szacharóz tartalmú folyadékot fokozatosan lecseréltük a következő összetételű szobahőmérsékletű alacsony kalcium tartalmú mesterséges agy-gerincvelői folyadékra: 130 NaCl, 3,5 KCl, 1 NaH_2PO_4 , 24 $NaHCO_3$, 1 $CaCl_2$, 3 $MgSO_4$, 10 d(+)-glükóz, 95% O_2 -t és 5% CO_2 -t tartalmazó gázeleggyel telítve. A szeleteket további felhasználásukig ebben az oldatban tároltuk.

3.2 Elektrofiziológia

Az elektrofiziológiai vizsgálatokhoz a szeleteket 36 °C-os elvezető kamrába helyeztük, amelyen keresztül mesterséges agy-gerincvelői folyadékot áramoltattunk 2-3

ml/perc sebességgel. Az elektrofiziológiai elvezetés során használt mesterséges agygerincvelői folyadék annyiban különbözött a tároláshoz használt oldattól, hogy az 3 mM CaCl_2 -ot és 1,5 mM MgSO_4 -ot tartalmazott. Az elektrofiziológiai elvezetéseket whole cell patch clamp technikával végeztük egyszerre legfeljebb négy II/III. rétegbeli idegsejtből. A sejteket infravörös differenciál interferencia kontraszt (DIC) videomikroszkópia (Zeiss Axioskop FS mikroszkóp, Hamamatsu C2400 CCD kamera, Luigs & Neumann Infrapatch SM1 manipulátor rendszer illetve Olympus BX61WI mikroszkóp, PCO CCD kamera, Luigs & Neumann Infrapatch SM5 manipulátor rendszer) segítségével vizualizáltuk 60-130 μm -re a szelet felszínétől 40x-es vízimmerziós objektívvel. A piramissejtekből történő elvezetéshez háromszög/piramis alakú sejteket kerestünk, melyek vastag apikális dendritje jól kivehető volt a szeletben. Interneuronok célzott keresésekor az előbbiektől különböző, főként kisebb kerek, hosszúkas sejteket kerestünk, melyeknél nem volt apikális dendrit jelenlétére utaló jel.

A mikropipettákat (4-6 MOhm) alacsony kloridion tartalmú intracelluláris oldattal töltöttük meg (pH 7,25, 300 mOsm) hogy a GABAerg és glutamáterg események könnyen elkülöníthetők legyenek. Az elvezetésekhez a következő összetételű intracelluláris oldatot használtuk: 126 mM K-glükonát, 4 mM KCl, 4 mM ATP-Mg, 0,3 mM GTP- Na_2 , 10 mM HEPES, 10 mM keratin-foszfát és 8 mM biocitin. Az elektrofiziológiai elvezetéseket áramzár üzemmódban végeztük (HEKA EPC 9/2, HEKA EPC 10 patch-clamp erősítők), a mért elektromos jeleket 8 kHz-en szűrtük, 16 kHz-en digitalizáltuk és PULSE illetve PatchMaster szoftverek (HEKA, Lambrech/Pfalz, Németország) segítségével mértük és analizáltuk.

A sejtek passzív elektromos tulajdonságait és tüzelési mintázatukat a bevett gyakorlat szerint a sejtek nyugalmi membrán potenciálján mértük áramzár üzemmódban 2 másodpercenként 800 ms-os négyszögimpulzust injektálva a sejtbe. A négyszögimpulzusok -100 pA-tól kezdődtek és 20 pA-el növekedtek minden egyes ismétléskor. Szinaptikus kapcsolatok vizsgálata során a preszinaptikus sejteket rövid 2-8 ms-os, 900 pA-es áraminjekcióval stimuláltuk, hogy akciós potenciált váltsunk ki bennük. A kapcsolatok rövid távú szinaptikus plaszticitásának jellemzésre a legtöbb esetben páros pulzus protokollt alkalmaztunk, melynek során a preszinaptikus sejtben 7-15 másodpercenként két akciós potenciált váltottunk ki egymástól 60 ms távolságra. Serkentő posztzinaptikus potenciálos (EPSP) vizsgálata során a posztzinaptikus sejtet nyugalmi membránpotenciál értéken tartottuk. Gátló posztzinaptikus potenciálokat (IPSP) is tartalmazó kapcsolat esetén a posztzinaptikus sejt membránpotenciálját -40 mV és -50 mV közötti értéken tartottuk. A monoszinaptikus EPSP-k és IPSP-k amplitúdóját a posztzinaptikus válasz maximuma és az áraminjekció előtt mért membránpotenciál érték különbségével adtuk meg. A szinaptikus

események latenciája a preszinaptikus sejtben keltett akciós potenciál maximumától a posztzinaptikus sejtben detektált szinaptikus esemény kezdetéig (EPSP, IPSP) eltelt idő. A páros pulzus arány (PPR) a páros pulzus protokoll során kiváltott második (EPSP2) és első EPSP amplitúdók (EPSP1) átlagainak a hányadosa: $PPR = EPSP2/EPSP1$. Az EPSP amplitúdók variációs koefficiense (CV) az EPSP amplitúdó szórásának (SD) és átlagának a hányadosa. Transzmissziós hibának tekintettük azt, amikor a preszinaptikus sejtben kiváltott akciós potenciál nem váltott ki posztzinaptikus potenciált. A sejtek bemenő ellenállását a hiperpolarizáló áramra adott maximális feszültségválaszból számoltuk ki. A reobázikus áramot 2-5 pA-enként növelt 800 ms-ig tartó depolarizáló áramlépcsővel határoztuk meg.

Az egyes kísérletekre vonatkozó adatokat 20-100 mérés értékének az átlagával és szórásával (SD) határoztuk meg. Valamennyi értéknek az átlagát és szórását (SD) adtuk meg, feltüntetve a kiértékelésbe belevett kísérletek számát (n) és az eredmények szignifikancia szintjét. Szignifikánsnak tekintettünk egy eredményt, $p < 0,05$ esetén. Statisztikai eljárásaként Wilcoxon-féle előjeles rangpróbát, páros-t tesztet, Mann-Whitney U-tesztet és Kolmogorov-Smirnov tesztet használtunk (SPSS 15.0, IBM, USA). Ha másképp nem jelezzük, az elektrofiziológiai felvételeket mint 20-100 mérés átlagát vagy mint 10 egymásra helyezett mérést ábrázolunk. Utóbbi esetben az egyes görbék preszinaptikus akciós potenciál előtti alapvonalát az áttekinthetőség kedvéért közös értékre hoztuk.

3.3 Farmakológia

Valamennyi farmakont az elvezető oldatban feloldva extracellulárisan alkalmaztunk a szövegben jelzett koncentrációk szerint és a farmakon mentes elvezető oldattal megegyező módon juttattuk be az elvezető kamrába. Kísérleteinkben a következő farmakonokat használtuk: szerotonin-hidroklorid (5-HT), alfa-metil-szerotonin maleát (Sigma); 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX), gabazine, fluoxetin, buspiron, ($\pm$)-7-Hydroxy-2-dipropylaminotetralin hydrobromide (8-OH-DPAT), 2-metil-szerotonin (2-metil-5-HT), 5-Propoxy-3-(1,2,3,6-tetrahydro-4-pyridinyl)-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine hydrochloride (CP94253) és 1-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-1-piperidinyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (AM251) (Tocris). Szerotonin és AM251 oldatokat közvetlenül a kísérletek előtt készítettük el. Az AM251-et 0,0002 % végkoncentrációjú dimetil-szulfoxiddal (DMSO) vittük vizes oldatba. A többi farmakont frissen vagy $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolt törzsoldatokból készítettük. A farmakonokat tartalmazó elvezető

oldatot 10-15 percig áramoltattuk az elvezető kamrán át a kísérletek során, hatásuk kiértékelése pedig az 5. perc utáni időszakra korlátozódott.

3.4 Hisztológia

A hisztológiai eljárás célja az elektrofiziológiai elvezetések során biocitinnel feltöltött idegsejtek fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokra történő előkészítése volt. Az elektrofiziológiai kísérleteket követően a szeleteket két Millipore szűrőpapír közé helyeztük a deformáció elkerülése végett, majd 12 órán keresztül fixáltuk 4 % pararformaldehidet, 1,25 % glutáraldehidet és 15 % pikrinsavat tartalmazó 0,1 M foszfát-pufferoldatban (pH: 7,4). A fixáló-oldatot 0,1 M foszfát-pufferrel történő többszöri átmosással eltávolítottuk a szeletekről, ezt követően a szeleteket 10 %-os majd 20 %-os szacharózt tartalmazó 0,1 M foszfát-pufferbe helyeztük, hogy védjük az ezt követező fagyasztás során a membránok szerkezetét. A szeleteket zárt eppendorf csőben néhány másodpercre folyékony nitrogénbe helyezve fagyasztottuk, majd ezt követően 10%-os zselatinba ágyasztuk, végül jéghideg foszfát-pufferben 70 µm-es szeletekre metszettük Leica VT 1000S mikrotómmal. A metszeteket ezt követően tris-bufferben oldott (1:100, pH 7,4) avidin-biotin-tormaperoxidáz komplexben (ABC, Vector Labs) inkubáltuk 4 °C-on egy éjszakán át. Az enzimreakcióhoz kromogénként 0,05%-os 3'3-diaminobenzidine tetrahidrokloridot (DAB), oxidánsként pedig 0,01 %-os H₂O₂-ot használtunk. A reakció végeztével a DAB sötétbarna csapadékként csapódott ki a biocitint tartalmazó sejtekben. A metszeteket 0,1 M-os foszfát-pufferben feloldott 1%-os OsO₄-dal utófixáltuk, majd desztillált vizes mosás után 1 %-os uranil-acetáttal kezeltük hogy későbbi esetleges elektronmikroszkópos vizsgálatokra is alkalmasak legyenek. Ezt követően a szeleteket felszálló alkoholsorral dehidráltuk, végül epoxigyantába (Durcupan, Fluka) tettük és tárgylemezre helyeztük (Buhl et al., 1994; Tamas et al., 1997; Tamas et al., 2000).

3.5 Sejt azonosítás és három-dimenziós fénymikroszkópos rekonstrukció

A hisztológiai eljárás során láthatóvá vált sejteket az elektrofiziológiai elvezetés során a sejtek egymáshoz viszonyított elhelyezkedéséről készített sematikus diagram alapján azonosítottuk és határoztuk meg sejttípusukat. Piramissejtek azonosítása vastag apikális dendritjük és tüskézett apikális és bazális dendritjeik, továbbá az axonnak a szóma bazális részéről történő eredése alapján történt. Axo-axonikus sejtek azonosítása vertikális sorokban, füzérszerűen elhelyezkedő axonterminálisaik – az angol nyelvű szakirodalomban “cartridge”-

nak nevezett anatómiai képlet - alapján történt. Kosársejteknek tekintettük azokat az interneuronokat, melyek axonterminálisai a fénymikroszkópos megbízhatóság szintjén szinaptikus kapcsolat jelenlétét lehetővé tevő közelségbe kerültek más sejtek vagy autaptikus módon önmaguk szómájával, illetve periszomatikus régióival. Minden egyéb, ebbe a három csoportba biztonsággal nem sorolható (és nem glia) sejtet az interneuronok általános csoportjába soroltunk. A biocitinnel feltöltött sejtek három-dimenziós rekonstrukcióját a Neurolucida rendszer (MicroBrightField, Colchester, USA) és BX-60F (Olympus, Tokyo, Japan) fénymikroszkóp segítségével végeztük 100x-os olajimmerziós objektívvel. A rekonstrukciók során rekonstruáltuk a sejtek sejttestét, dendritfáját és axonját továbbá a sejtek teljes terjedelmében meghatároztuk a lehetséges szinapszisok helyét. Két sejt között akkor feltételeztünk szinapszist, ha az egyik sejt axonterminálisa a másik sejt dendritjével, sejttestével vagy axon-iniciális szegmentumával érintkezett és fénymikroszkóppal a két struktúrát elkülöníteni nem lehetett. A szinapszisok posztzinaptikus szómától való távolságát Neuroexplorer (MicroBrightField, Colchester, USA) programmal mértük. A fénymikroszkópos vizsgálatok során azonosított lehetséges szinapszisokról digitális fényképeket készítettünk majd a vizsgált területet kivágtuk és átglyasztuk epoxigyanta blokkba további elektronmikroszkópos vizsgálatok céljából.

3.6 Elektronmikroszkópia

A kivágott metszetből ultramikrotómmal (RMC MTXL, Boeckler Instruments, Tucson, Arizona) 70 nm-es sorozatmetszeteket készítettünk, melyeket hártásított (Formvar, TAAB) egylyukú réz gridekre emeltünk. Az ultravékony metszeteket Tecnai-12 (Fei) elektronmikroszkóppal vizsgáltuk 43000-szeres nagyításig. A szinapszisokat a fénymikroszkópos fotók segítségével a szinapszishoz a metszetben való pozíciója alapján azonosítottuk és jellemzően 26500x-os és 43000x-es nagyítású digitális képet készítettünk róluk. A fénymikroszkópban azonosított közelfekvéseket a következő kritériumok együttes teljesülése esetén azonosítottuk szinapszishoz: (1) szinaptikus vezikulák felhalmozódása a preszinaptikus terminálisban; (2) a pre- és posztzinaptikus membránfelszínek lefutása párhuzamos a szinapszis területén és (3) a köztük lévő szinaptikus rés szélesebb (mintegy 16-25 nm széles) mint a sejtek közti extracelluláris tér. A biocitinnel feltöltött sejtekhez tartozó struktúrákban a kicsapódott és elektronmikroszkópban sötét képet adó DAB sokszor megnehezítette a preszinaptikus vezikulák vizsgálatát, ilyenkor a másik két feltétel teljesülése esetén igazoltnak tekintettük a szinaptikus kapcsolat létét.

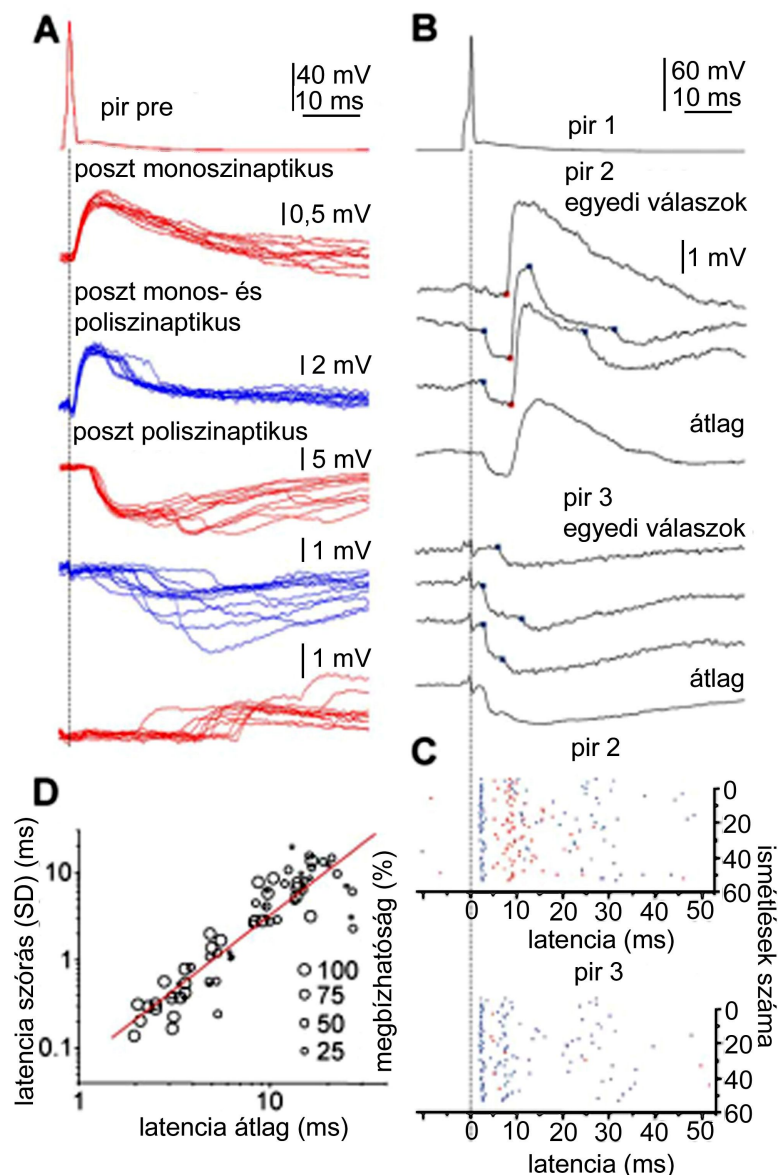
4. EREDMÉNYEK

4.1 Egy sejt által kiváltott hálózati események a humán agykéregben

Patch clamp whole cell technikával végeztünk szimultán elektrofiziológiai elvezetéseket II/III. rétegbeli idegsejt párokból, hármasokból, négyesekből (n=429 sejtcsoport) humán agykérgi szeletekben (n=383). A minták 58, 18 és 75 év közötti páciens temporális (n=30), frontális (n=22) és parietális (n=6) nem epilepsziás agykérgi területeiről származtak. Elvezetéseink során akciós potenciált váltottunk ki piramissejteken (n=681) és ezzel egyidőben monitoroztuk a velük egyidejűleg elvezetett környező piramissejteket (n=252) és interneuronokat (n=481) membránpotenciál változásait.

4.1.1 Piramissejteket posztzinaptikus hatásai a humán agykéregben

Piramissejteken (n=121) kiváltott akciós potenciál monoszinaptikus latenciájú EPSP-eket eredményezett a vele egyidőben elvezetett piramissejteken ($0,91 \pm 0,46$ ms, n=38) és interneuronokon ($0,86 \pm 0,32$ ms, n=93) (**1. A ábra**). Ezen kívül egyetlen piramissejt (n=177) egyetlen akciós potenciállal képes volt a monoszinaptikusnál hosszabb, poliszinaptikus latenciájú posztzinaptikus potenciálokat is kiváltani ($p < 0,001$, **1. A-C ábra**) más piramissejteken ($10,02 \pm 6,83$ ms, n=144) és interneuronokon ($8,54 \pm 6,19$ ms, n=82). A piramissejtekre és interneuronokra érkező poliszinaptikus posztzinaptikus potenciálok (pPSP-k) – vagy egyszerűbben poliszinaptikus események-, IPSP-eket (n=195 és n=96, értelemszerűen) és/vagy EPSP-eket (n=12 és n=5, értelemszerűen) tartalmaztak, és egyetlen sejtre akár több pPSP-ből álló összetett eseménysorozat is érkezhett (n=35, **1. A-C ábra**). A poliszinaptikus események gyakorisága megnövekedett a preszinaptikus akciós potenciált követő 37 ± 17 ms-ban, az akciós potenciál előtti 10 ms-os időintervallumhoz viszonyítva (**1. B, C ábra**). Ezen eredmények azt mutatják, hogy egyetlen piramissejt egyetlen akciós potenciálja 10-szer hosszabb latenciájú szinaptikus események kiváltására is képes akár humán agykéregben, mint azt más fajok esetében tapasztalták (Miles, 1990; Galarreta and Hestrin, 2001; Mori et al., 2004; Pouille and Scanziani, 2004; Silberberg and Markram, 2007).

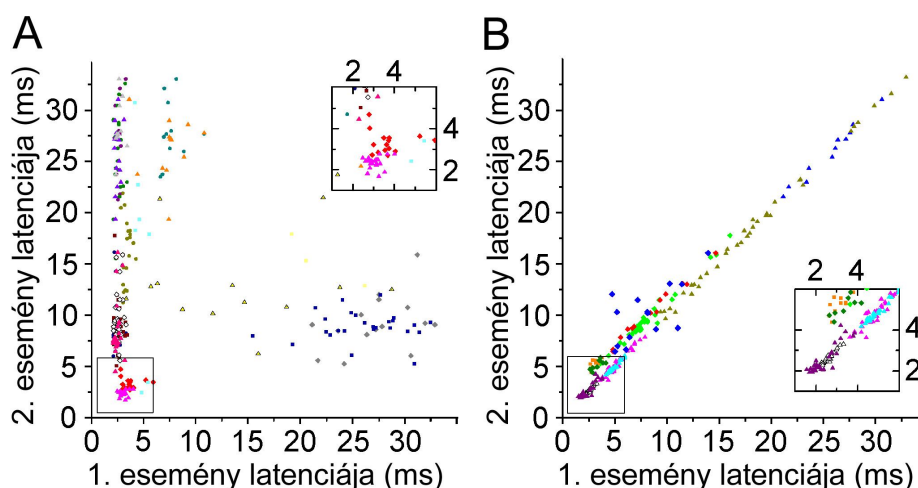


1. ábra. Piramissejt egyetlen akciós potenciálja által kiváltott posztszinaptikus események a humán agykéregben

(A) Piramissejt egyetlen akciós potenciálja (pir pre) - felülről lefelé haladva - monoszínaptikus EPSP-t, monoszínaptikus EPSP-t követő poliszínaptikus IPSP-t, poliszínaptikus IPSP-eket valamint poliszínaptikus EPSP-t váltott ki posztszinaptikus interneuronokban (kék) és piramissejtekben (piros). A preszinaptikus akciós potenciál időzítését az (A-C) paneleken szaggatott vonallal jeleztük. (B) Piramissejt egyetlen akciós potenciálja (pir 1) által kiváltott különböző poliszínaptikus eseménysorozatok két, szimultán elvezetett posztszinaptikus piramissejtben (pir 2 és pir 3). A kék pontok az IPSP-k, míg a piros pontok az EPSP-k kezdetét jelölik. (C) A (B) paneleken bemutatott két kapcsolat poliszínaptikus eseményeinek latenciáját ábrázoltuk 54 egymást követő ismétlés során. A kék pontok az IPSP-k, míg a piros pontok az EPSP-k kezdetét jelölik a preszinaptikus akciós potenciálhoz viszonyítva. (D) A poliszínaptikus posztszinaptikus potenciálok latenciájának átlaga és szórása (SD) közötti kettős logaritmusos korreláció. Az egyes poliszínaptikus eseményeket karikákkal, azok megbízhatóságát (kiválthatóságuk gyakoriságát) pedig a karikák méretével jeleztük.

Vizsgálataink nem találtak összefüggést az egy sejt által kiváltott poliszinaptikus események előfordulása és az agykérgi minta eredete között. A vizsgált páciensek 93%-ában (54/58), 383 agyszeletből 105-ben detektáltunk poliszinaptikus kapcsolatokat, és nem találtunk összefüggést a kapcsolatok előfordulása valamint a minták kérgi eredete, a páciens kora, betegsége és medikációja között. Ezen eredmények azt mutatják, hogy az egy sejt által kiváltott poliszinaptikus események gyakori előfordulása, a humán agykérgi neuron hálózatok sajátossága, amely a humán agykéreg számos területére jellemző.

A posztszinaptikus eseménysorozatok időbeli strukturáltsága az adott kapcsolatra jellemző mintázatot mutattak (**1. C ábra**). Ezen kívül, amíg az egyes poliszinaptikus események előfordulási valószínűsége - egy adott kapcsolaton belül - nem mutatott korrelációt azok latenciájával addig az események latenciája és azok szórása között dupla logaritmikus korrelációt találtunk ($R=0,90$, $p<0,001$, **1. D ábra**). Ezek alapján feltételezhető, hogy a poliszinaptikus eseménysorozatok időbeli strukturáltsága a preszinaptikus piramissejt által közvetlenül, vagy közvetve aktivált, a posztszinaptikus sejtre konvergáló neuronok meghatározott sorrendben történő aktivációjának a következménye, és a több szinaptikus áttevődést igénylő posztszinaptikus eseményeknek a latenciája, valamint latenciájának a szórása is nagyobb. Ennek a feltételezésnek további megerősítésére megvizsgáltuk, hogy találunk-e olyan ugyanarra vagy különböző sejtekre érkező egy sejt felől kiváltott poliszinaptikus eseményeket, melyek latenciája együtt változik a preszinaptikus sejt ismételt ingerlése során. Az esemény-párok egy részében az események nem mutatattak időbeli korrelációt az őket megelőző vagy utánuk következő szinaptikus eseményekkel, feltehetőleg részben a késői események latenciájának nagy szórása vagy nagyrészt különálló szinaptikus útvonalak érintettsége miatt (**2. A ábra**). Találtunk azonban olyan IPSP-IPSP ($n=7$) és IPSP-EPSP ($n=7$) szekvenciájú poliszinaptikus esemény-párokat melyek tagjainak latenciái szoros korrelációt mutattak egymással ($R>0,84$, $p<0,05$) (**2. B ábra**). Az időben korreláló poliszinaptikus események magyarázhatóak egy – legalább részben – közös szinaptikus útvonal aktivációjának eredményeként melyben a közös köztes sejtek aktivációjának időbeli variabilitása hasonló mértékben befolyásolja a vizsgált poliszinaptikus események latenciáját. Ennek megfelelően eredményeink azt mutatják, hogy egyetlen piramissejtben kiváltott akciós potenciál képes lehet meghatározott mintázat szerint aktiválni kérgi idegsejt együttesek tagjait, melyek nem feltétlenül kapnak közvetlen szinaptikus bemenetet az aktivációjukat előidéző sejtől, összhangban a Hebb által javasolt sejt-együttes hipotézissel.



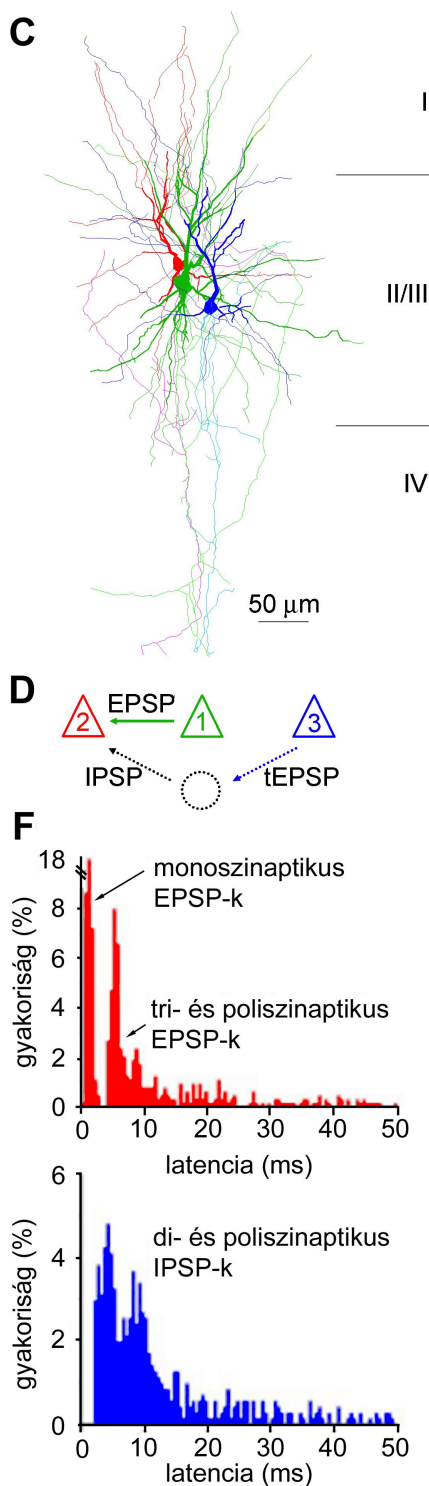
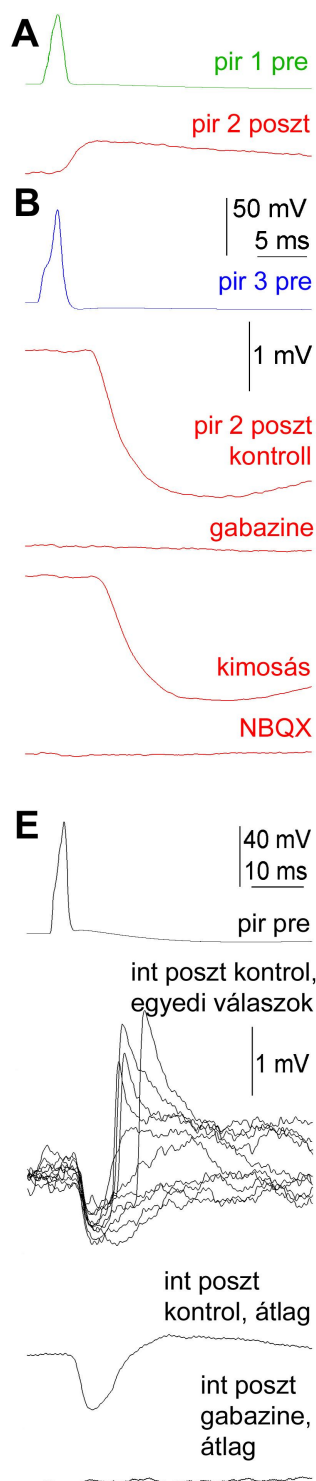
2. ábra. Piramissejt által kiváltott poliszinaptikus esemény-párok latenciáinak egymáshoz viszonyított változása

(A) Időben egymástól független poliszinaptikus események: az 1-es és 2-es esemény latenciája egymástól függetlenül változik. (B) Időben korreláló poliszinaptikus eseménypárok: az 1-es és 2-es esemény latenciája egymással összhangban változik a preszinaptikus piramissejt ismételt aktivációjára. A különböző színek, különböző kísérleteknek felelnek meg. Az ábrák jobb oldalán lévő négyzetekben a nullához közeli, négyzettel jelölt régiók láthatóak kinagyítva.

4.1.2 A poliszinaptikus kapcsolatok farmakológiai jellemzése

Farmakológiai módszerekkel vizsgáltuk, milyen szinaptikus mechanizmus húzódhat a piramissejtek által kiváltott poliszinaptikus események hátterében. Mind a GABA_A-receptor antagonistá gabazine (10 μ M, $n=5$) mind pedig az AMPA receptor antagonistá NBQX (10 μ M, $n=4$) külön-külön, vagy egymás után alkalmazva megakadályozták a poliszinaptikus IPSP-k előfordulását ($n=6$) (**3. A-D ábra**). Ez a glutamáterg és GABAerg antagonisták iránt mutatott kettős érzékenység feltételez egy hatékonyan aktiválható, minimálisan diszinaptikus idegsejt láncolatot, ahol a preszinaptikus piramissejt által aktivált GABAerg interneuron – a piramissejt akciós potenciáljához képest - diszinaptikus IPSP-t vált ki annak posztzinaptikus sejtjén, ahogy azt korábban már kimutatták más fajokban (Miles, 1990; Galarreta and Hestrin, 2001; Mori et al., 2004; Pouille and Scanziani, 2004; Silberberg and Markram, 2007). Bár az ismert, hogy egyetlen piramissejt képes diszinaptikus IPSP-eket kiváltani rácsálók kérgi hálózataiban de az nem ismert, hogy képes lenne diszinaptikusnál hosszabb latenciájú poliszinaptikus IPSP-k, különösen EPSP-k kiváltására. Mintáinkban piramissejtek képesek voltak monoszinaptikusnál hosszabb latenciájú ($11,88 \pm 8,66$ ms, $p < 0,001$) poliszinaptikus

EPSP-ket is kiváltani ($n=17$). A poliszinaptikus EPSP-k gabazine-nal ($10\text{ }\mu\text{M}$) blokkolhatóak voltak ($n=6$) (**3. E ábra**), mutatva, hogy egy GABAerg szinaptikus lépés is szükséges a poliszinaptikus serkentés megvalósulásához. Azokban a kapcsolatokban, melyekben piramissejt poliszinaptikus latenciájú EPSP-ket váltott ki, a posztszinaptikus események időbeli eloszlása azt mutatta, hogy a monoszinaptikus EPSP-ket kizárólag diszinaptikus IPSP-k követik és így a poliszinaptikus EPSP-k legkevesebb triszinaptikus latenciájúak (**3. F ábra**). Ezek alapján feltételezhető, hogy piramissejtek első lépésként GABAerg sejteket képesek aktiválni és a poliszinaptikus IPSP-k és EPSP-k ezt követő hálózati mechanizmusok eredményei.

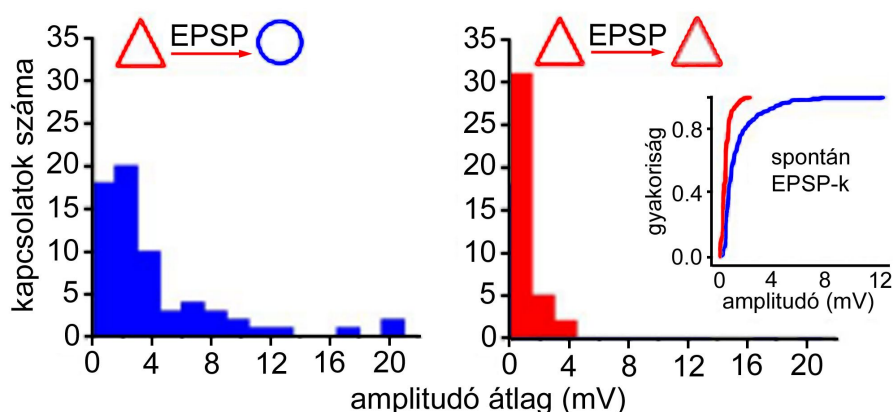


3. ábra. A piramissejt által kiváltott polyszinaptikus események farmakológiai jellemzése

(A-D) A piramissejt által kiváltott polyszinaptikus IPSP-k GABA-a és AMPA-típusú glutamáterg receptorok aktivációját igényli. (A), Monoszínaptikus serkentő kapcsolat két piramissejt között (pir 1 pre és pir 2 poszt). (B) Egy harmadik piramissejt (pir 3 pre) a monoszínaptikus EPSP-nél hosszabb latenciával érkező IPSP-t vált ki az (A) panelen is szereplő posztzínaptikus piramissejten. Az IPSP-t gabazine és NBQX is eltűntette. (C) A három piramissejt fénymikroszkópos rekonstrukciója és (D) a köztük lévő kapcsolatok sematikus ábrázolása az (A) és (B) panelnek színezésének megfelelően, feltüntetve a gátlást közvetítő potenciális interneuron (fekete kör) feltételezett helyét a hálózatban. (E, F) A polyszinaptikus EPSP-k kialakulásához GABA-a receptor közvetítette hálózati esemény szükséges. (E) Egy piramissejtben kiváltott egyetlen akciós potenciál polyszinaptikus IPSP-t és EPSP-t váltott ki egy kosársejtben (ks). Gabazine mindkét eseményt eltűntette. (F) EPSP-k és IPSP-k gyakoriságának időbeli eloszlása olyan kapcsolatokban, ahol a preszínaptikus piramissejt akciós potenciálja polyszinaptikus EPSP-t is kiváltott a posztzínaptikus sejtekben. A monoszínaptikus EPSP-eket kizárólag diszínaptikus IPSP-k követik és a polyszinaptikus EPSP-k minimálisan triszínaptikus latenciájúak.

4.1.3 Monoszinaptikus serkentő kapcsolatok elektrofiziológiai valamint fény- és elektronmikroszkópos vizsgálata

A továbbiakban serkentő monoszinaptikus kapcsolatok EPSP amplitúdóit vizsgáltuk piramisajt-piramisajt ($n=38$) és piramisajt-interneuron ($n=65$) párokban, nyugalmi membránpotenciálon tartva a posztszinaptikus piramisajtkeket (-73 ± 3 mV) és interneuronokat (-62 ± 4 mV). Az interneuronokat fénymikroszkópos azonosítás után a kosársejtek ($n=56$) és az axo-axonikus sejtek ($n=9$) csoportjába soroltuk (ld. Anyagok és Módszerek). A hasonló elektrofiziológiai tulajdonságaik és a rájuk érkező EPSP-k kinetikája alapján a két csoport adatait együtt értékeltük. A piramisajtkekre és interneuronokra érkező monoszinaptikus EPSP-k amplitúdó eloszlása szignifikáns különbséget mutatott ($p<0,001$, Kolmogorov-Smirnov teszt, **4. ábra**) a piramisajt-interneuron kapcsolatokban előforduló nagy amplitúdójú EPSP-k miatt. Hasonlóan más fajokban kapott értékekhez (Miles, 1990; Povysheva et al., 2006), az interneuronok bemenő ellenállása (134 ± 64 MOhm) nagyobb volt mint a piramisajtkeké (102 ± 51 MOhm, $p<0,042$). A kétféle sejttípus bemenő ellenállásában mutatkozó 30%-os különbség önmagában nem magyarázza a 6 mV-nál nagyobb amplitúdójú EPSP-k előfordulását a piramisajt-interneuron kapcsolatokban. Ezen kívül, az EPSP-k amplitúdója és a posztszinaptikus sejt bemenő ellenállása nem mutattak korrelációt egymással sem a piramisajtke sem az interneuronok esetében. Ugyancsak összehasonlítottuk a piramisajt-interneuron kapcsolatokban a preszinaptikus piramisajtre és a posztszinaptikus interneuronokra érkező spontán EPSP-knek a sejtek bemenő ellenállására normalizált amplitúdó eloszlását egymással. A két sejtpopulációra érkező spontán EPSP-k amplitúdó eloszlása különbözött egymástól az interneuronokra érkező magasabb amplitúdójú EPSP-k következtében ($p<0,001$, Kolmogorov-Smirnov teszt, **4. ábra**). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az interneuronokra érkező serkentő bemenetek egy része szelektíven megerősödött a humán agykéregben. A monoszinaptikusan kapcsolt piramisajt-interneuron párok egy részében ($n=14$) a piramisajtben kiváltott akciós potenciál akciós potenciált eredményezett a nyugalmi membránpotenciálról (-59 ± 3 mV) elvezetett posztszinaptikus sejtben átlagosan $46\pm 27\%$ -os gyakorisággal (**5., 7. és 8. ábrák**). Piramisajtke között ilyen jellegű monoszinaptikus kapcsolatot nem találtunk. A posztszinaptikus akciós potenciálok latenciája ($3,34\pm 1,76$ ms) megerősíti feltételezésünket, miszerint a piramisajt által kiváltott diszinaptikus IPSP-k egy köztes GABAerg interneuron aktivációja következtében alakulnak ki.

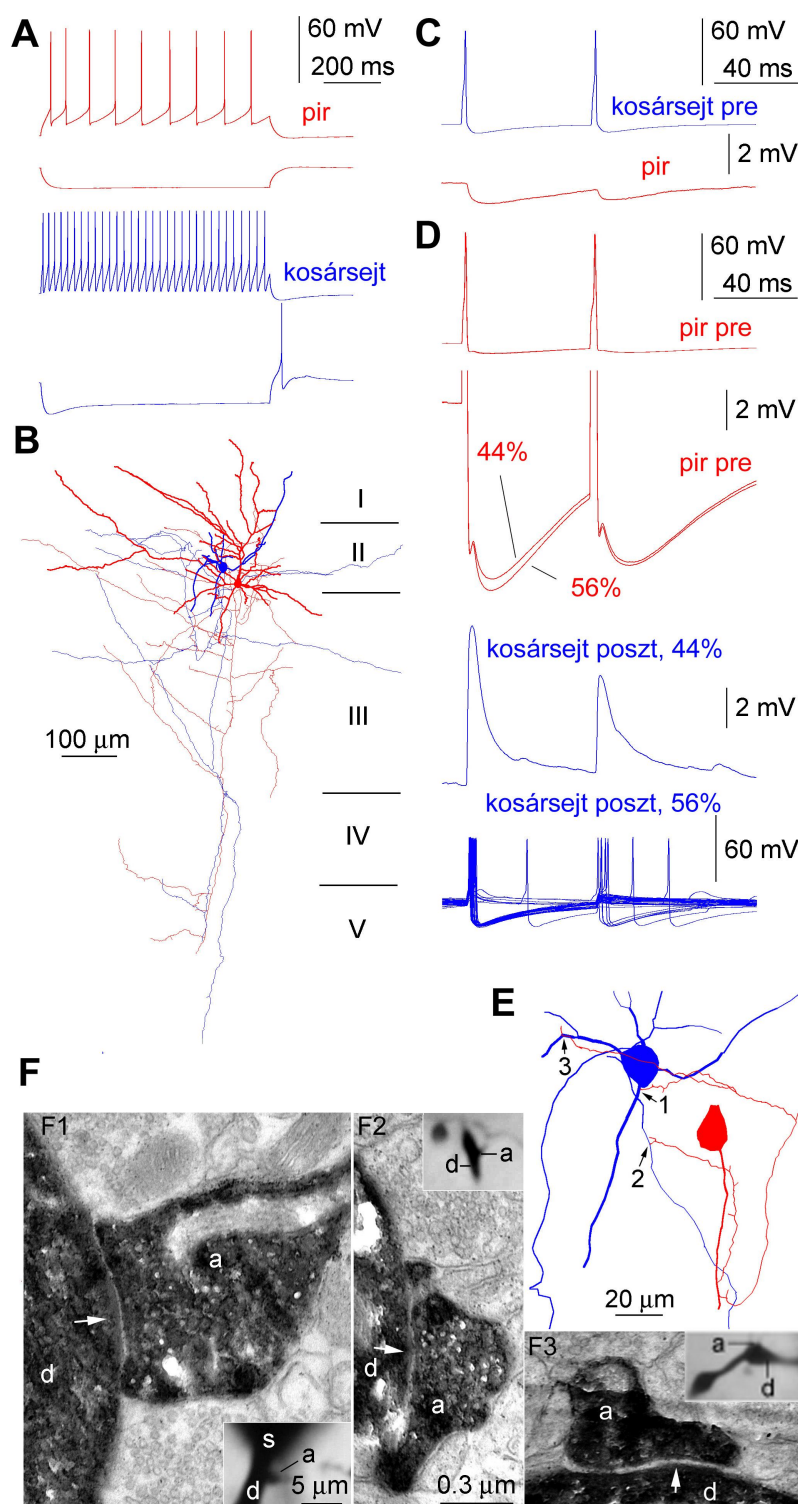


4. Ábra. A piramis sejtekre és interneuronokra érkező kiváltott és spontán EPSP-k amplitúdó eloszlása monoszinaptikus piramis sejt-interneuron illetve piramis sejt-piramis sejt kapcsolatokban.

A piramis sejtek (piros háromszög) által az interneuronokban (kék karika) kiváltott monoszinaptikus EPSP-k amplitúdói (kék) jóval nagyobb értékeket is elértek (baloldali panel), mint a piramis sejtekben kiváltott monoszinaptikus EPSP-k amplitúdói (piros, jobboldali panel). A jobboldali panelbe illesztett kis ábrán látható, hogy az interneuronokra (kék) és piramis sejtekre (piros) érkező spontán EPSP-k amplitúdó eloszlása is hasonló képet mutat.

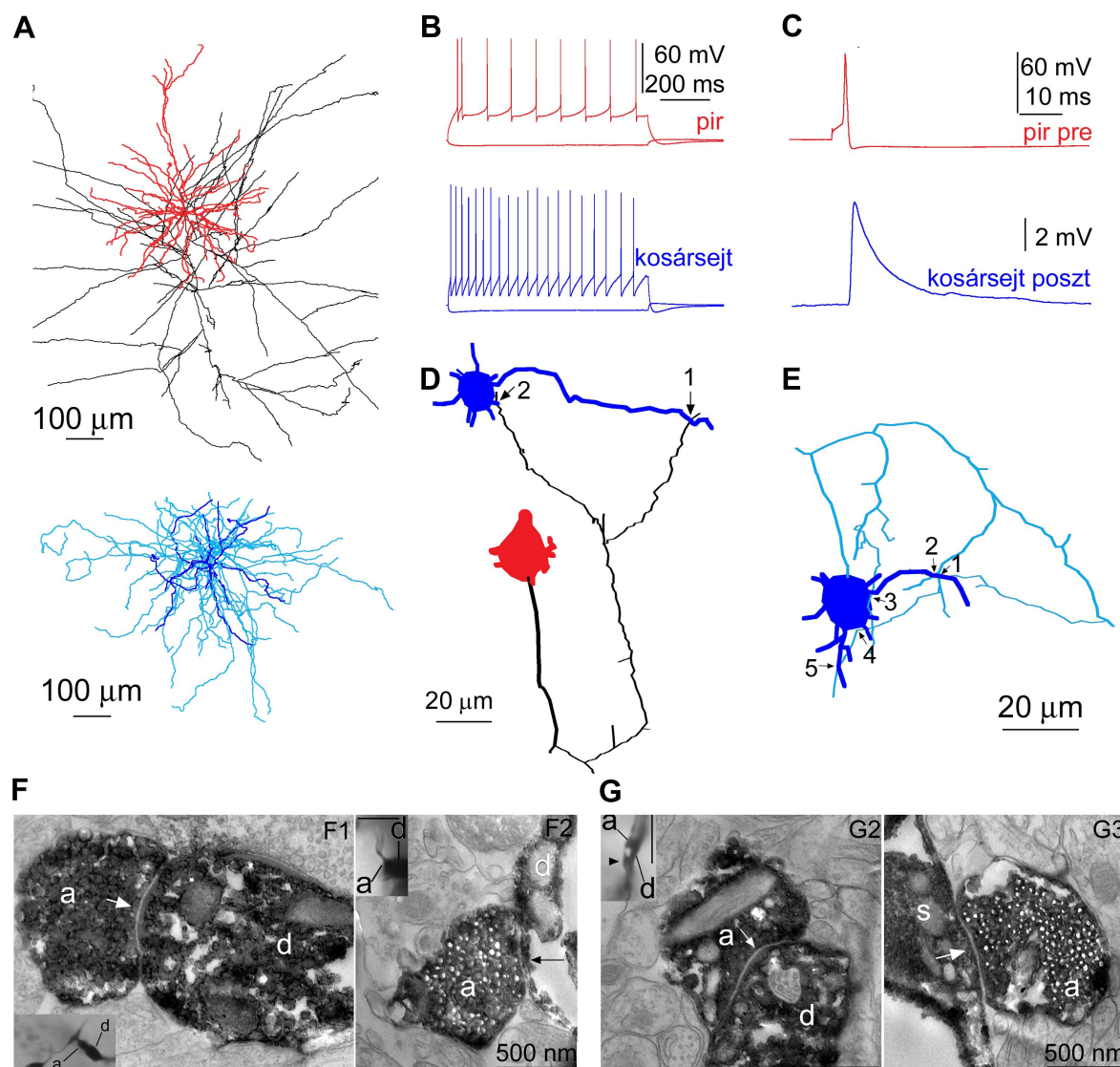
Fénymikroszkóposan rekonstruáltunk három monoszinaptikusan kapcsolt piramis sejt-interneuron párt, melyekben a preszinaptikus piramis sejt nagy amplitúdójú EPSP-t, esetenként posztzinaptikus akciós potenciált váltott ki az interneuronokban. Annak eldöntésére, hogy a nagy amplitúdójú EPSP-k előfordulása esetleg a piramis sejt által az interneuronon létesített szinapszisok megnövekedett számának tulajdonítható-e be, korrelált fény és elektronmikroszkópia segítségével meghatároztuk a piramis sejt axonja által a posztzinaptikus interneuronon létesített szinapszisok számát, mindhárom kapcsolat esetén. Az 5. ábrán bemutatott piramis sejt-kosársejt kapcsolatban, a piramis sejt az esetek 56%-ában akciós potenciált, a fennmaradó 44%-ban $8,2 \pm 1,9$ mV amplitúdójú EPSP-t váltott ki a posztzinaptikus kosársejtben. A piramis sejt 3 darab elektronmikroszkóposan igazolt szinapszist létesített a kosársejt dendritjén (5. ábra). Egy másik piramis sejt-kosársejt kapcsolatban, a piramis sejt $6,6 \pm 0,9$ mV-os EPSP-t váltott ki a posztzinaptikus kosársejtben. A piramis sejt 2 darab elektronmikroszkóposan igazolt szinapszist létesített a kosársejt dendritjén (6. ábra). Végül egy harmadik piramis sejt-interneuron kapcsolatban a piramis sejt az esetek 74%-ában akciós potenciált, a fennmaradó 26%-ban $11,2 \pm 3,3$ mV amplitúdójú EPSP-t váltott ki a posztzinaptikus interneuronban. A hatás 6 darab, elektronmikroszkóposan igazolt szinapszison keresztül valósult meg (7. ábra). Az anatómiai eredmények azt mutatják,

hogy piramis sejtek felől az interneuronokra érkező erős, esetenként posztszinaptikus akciós potenciált is kiváltó serkentés kevés szinapszison keresztül is megvalósulhat.



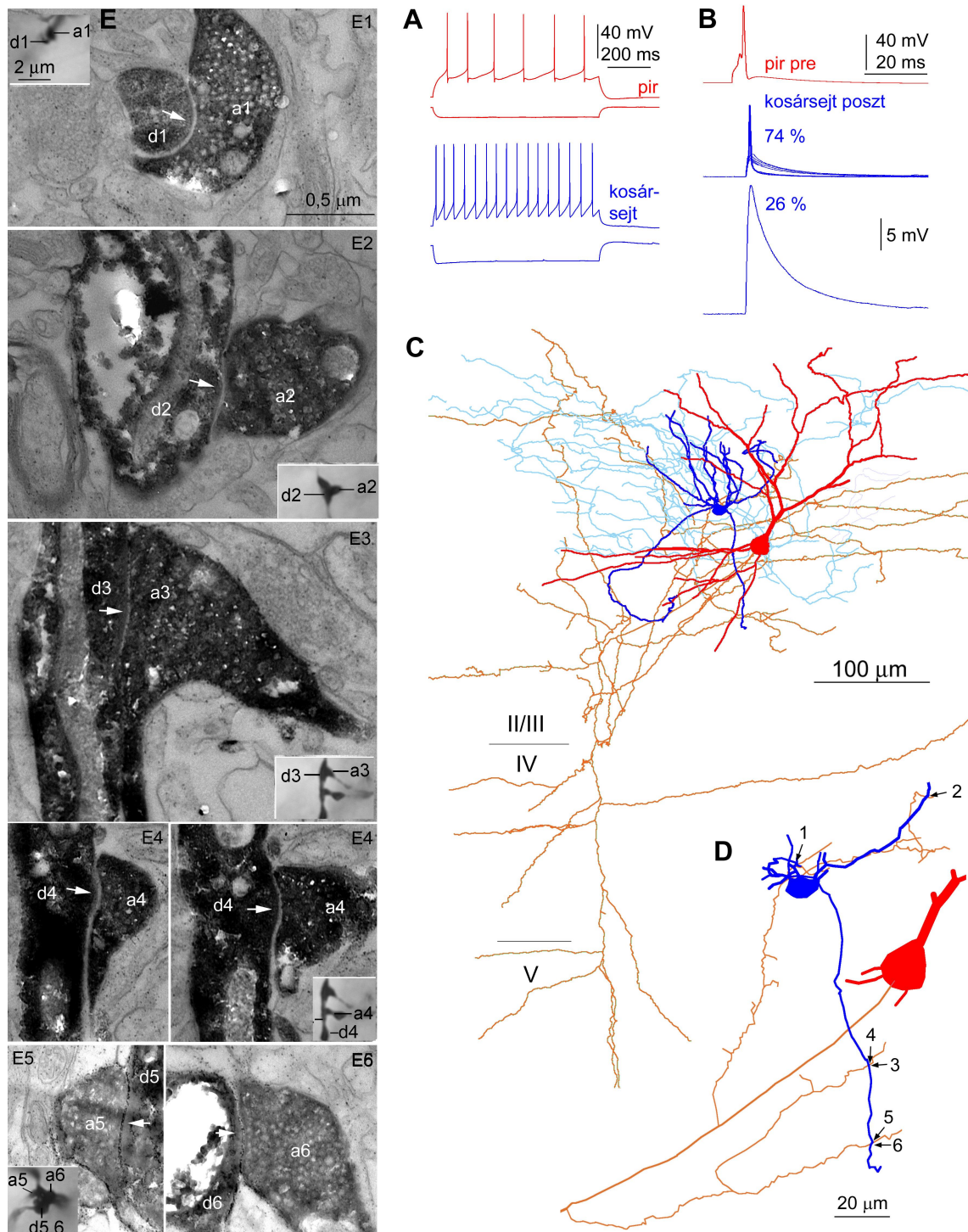
5. Ábra. Piramis sejt egyetlen akciós potenciálja képes akciós potenciált kiváltani kosársejtben kevés számú szinapszison keresztül

(A) A piramis sejt (pir, piros) és kosársejt (kék) tüzelési mintázata és hiperpolarizáló áraminjekcióra adott feszültség válaszuk. (B) A piramis sejt (piros) és kosársejt (kék) fénymikroszkópos rekonstrukciója. Vastagabb vonallal ábrázolva a dendriteket, vékonyabban az axonokat. (C) A kosársejtben kiváltott akciós potenciál monoszinaptikus IPSP-t váltott ki a piramis sejtben. (D) A piramis sejt akciós potenciálja monoszinaptikus EPSP-t váltott ki a kosársejtben, mely az esetek 56%-ában akciós potenciált eredményezett. A kosársejt tüzelése esetén, a piramis sejtre érkező monoszinaptikus IPSP negatívabbá tette a piramis sejt akciós potenciáljának utóhiperpolarizációs szakaszát. (E) A preszinaptikus piramis sejt axonja (piros) három elektronmikroszkóposan is igazolt (F) szinapszt létesített az interneuron dendritjén (kék). (F1-F3) Korrelált fénymikroszkópos és elektronmikroszkópos azonosítása a három szinapszison (nyíl), az (E) panel számozásának megfelelően. S: szinapsz, d: dendrit, a: axonterminális.



6. ábra. Nagy amplitúdójú EPSP-k kiváltása kevés számú szinapszison keresztül egy piramissejt-kosársejt kapcsolatban

(A) A piramissejt (dendrit: piros, axon: fekete) és a kosársejt (dendrit: s.kék, axon: v.kék) fény mikroszkópos rekonstrukciója. (B) A piramissejt (pir) és kosársejt tüzelési mintázata és hiperpolarizáló áraminjekcióra a adott feszültség válaszuk. (C) A piramissejt nagy amplitúdójú monoszynaptikus EPSP-t váltott ki a kosársejtben. (D) A preszinaptikus piramissejt axonja kettő elektronmikroszkóposan is igazolt (F) szinapszist létesített az interneuron dendritjén. (E) A kosársejt axonja öt elektronmikroszkóposan is igazolt (G) autapszist létesített saját szómáján és proximális dendritjein. (F) Korrelált fény- és elektronmikroszkópos azonosítása a két szinapszishoz (nyíl) a piramissejt-kosársejt kapcsolatban a (D) panel számozásának megfelelően, valamint (G) egy szomatikus és egy dendritikus autapszis (nyíl) elektronmikroszkópos képei az (E) panel számozásának megfelelően. s: szóma, d: dendrit, a: axonterminális. Kis fénymikroszkópos képek léptéke: 2,5 μm .

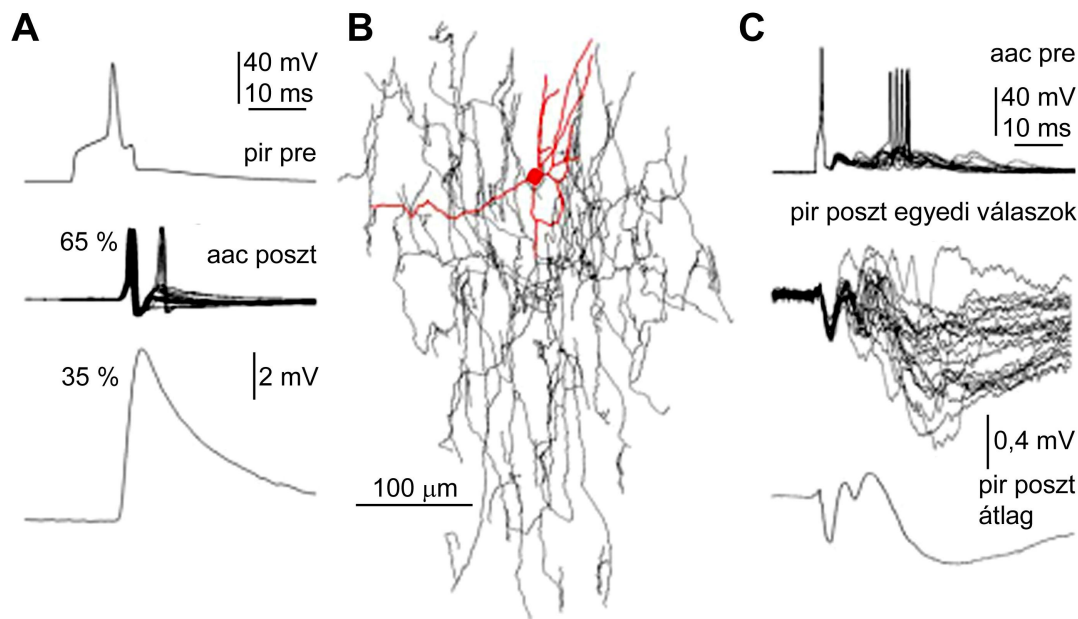


7. ábra Piramisajt egyetlen akciós potenciálja által kiváltott küszöb feletti válasz interneuronban

A) A piramisajt (pir, piros) és kosárisejt (kék) tüzelési mintázata és hiperpolarizáló áraminjekcióra adott feszültség válaszuk. (B) A piramisajt akciós potenciálja monoszínaptikus EPSP-t váltott ki a kosárisejtben, mely az esetek 74%-ában akciós potenciált eredményezett a kosárisejtben. (C) A piramisajt (dendrit: piros, axon: narancs) és kosárisejt (dendrit: kék, axon: cián) fénymikroszkópos rekonstrukciója. (D) A preszínaptikus piramisajt axonja hat elektronmikroszkóposan is igazolt (E) szinapszist létesített az interneuron dendritjén. (E1-E6) Korrelált fény- és elektronmikroszkópos azonosítása a hat szinapszishoz (nyíl), az (E) panel számozásának megfelelően. d: dendrit, a: axonterminális.

4.1.4 Axo-axonikus sejtek szerepe a poliszinaptikus hálózati események kialakításában

A gátló interneuronok piramissejtek általi aktivációja megmagyarázza a piramissejt által kiváltott diszinaptikus IPSP-k előfordulását, de nem szolgál magyarázatul a gabazine-érzékeny tri-, illetve poliszinaptikus EPSP-k kialakulásának mechanizmusára vonatkozólag. Mindazonáltal, posztzinaptikus akciós potenciált nem csak a piramissejt-kosársejt kapcsolatok 20%-ában találtunk (n=11, **5. ábra**), hanem a piramissejt-axo-axonikus párok 33%-ában is (n=3, **8. A, B ábra**).

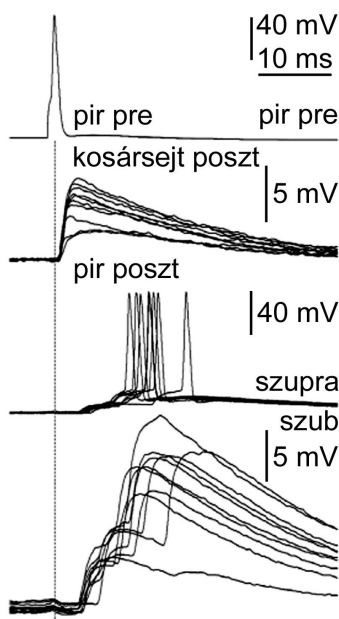


8. ábra. Az axo-axonikus sejt szerepe a piramissejt által kiváltott poliszinaptikus eseményekben

(A) Piramissejt (pir pre) akciós potenciálja 65%-os gyakorisággal akciós potenciált, az esetek 35%-ában pedig nagy amplitúdójú EPSP-t váltott ki a posztzinaptikus axo-axonikus sejtben (aac poszt). Az axo-axonikus sejtben monoszinaptikus latenciával kiváltott akciós potenciált esetenként további, feltehetően triszinaptikus EPSP által kiváltott akciós potenciál követte. (B) Az axo-axonikus sejt fénymikroszkópos rekonstrukciója (dendrit: piros, axon: fekete). (C) Egy másik axo-axonikus sejt egyetlen akciós potenciálja (aac pre) monoszinaptikus IPSP - diszinaptikus EPSP - poliszinaptikus IPSP/EPSP szekvenciájú eseménysorozatot váltott ki egy posztzinaptikus piramissejtben (pir poszt). Megjegyzendő, hogy az elvezetés során használt alacsony kloridion koncentrációjú intracelluláris oldat következtében, a GABAerg válaszok mind hiperpolarizálóak voltak. Az axo-axonikus sejt által keltett hálózati aktivitás és rekurrens serkentés di- és poliszinaptikus EPSP-ket, alkalmanként poliszinaptikus latenciájú akciós potenciált váltott ki az axo-axonikus sejtben.

Míg a kosársejtek hiperpolarizálják posztzinaptikus célsejtjeiket, addig az axo-axonikus sejtek képesek depolarizálni a posztzinaptikus piramissejteket esetenként akciós potenciált kiváltani bennük (Szabadics et al., 2006; Khirug et al., 2008; Woodruff et al.,

2009). Az axon iniciális szegmentumot célzó sejtek serkentő hatását a neokortexen kívül az amigdalában is kimutatták (Szabadics et al., 2006; Woodruff et al., 2006). Ezek alapján az akciós potenciál „terjedése” piramissejtről axo-axonikus sejtre, majd onnan egy következő piramissejtre megfelelő magyarázatául szolgálhat a piramissejt által kiváltott gabazine-érzékeny tri- vagy polyszinaptikus EPSP-k előfordulására. Az aktivitás GABAerg komponens által mediált terjedését a kérgi hálózatban az is alátámasztja, hogy míg a piramissejtekre érkező monoszínaptikus serkentés nem elegendően nagy a piramissejtek aktivációjához, addig a konvergens piramissejtek – feltételezhetően axo-axonikus sejt által kiváltott - szinkron aktivációjának következtében a piramissejtekre érkező polyszinaptikus EPSP-k képesek posztoszínaptikus akciós potenciálokat kiváltani (n=4, **9. ábra**). Mindazonáltal, a mintáinkban elvezetett összes humán axo-axonikus sejt (n=9) egyetlen akciós potenciálja egy monoszínaptikus latenciájú IPSP-t követő diszínaptikus latenciájú EPSP-ből és esetenként azt követő triszínaptikus latenciájú IPSP-ből álló eseménysorozatot váltott ki (**8. C ábra**).

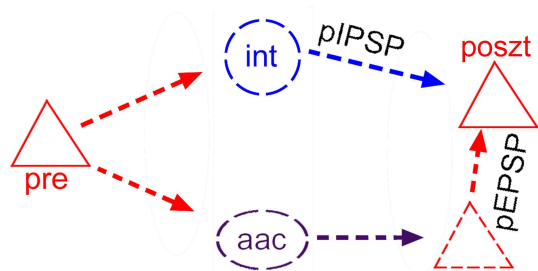


9. ábra. Poliszínaptikus küszöb feletti események piramissejt-piramissejt kapcsolatban

Piramissejt egyetlen akciós potenciálja monoszínaptikus EPSP-t váltott ki egy posztoszínaptikus kosársejtben és polyszinaptikus EPSP-ket egy vele egyidőben elvezetett piramissejtben (szub). A polyszinaptikus EPSP-k szummációja, alkalmanként akciós potenciál keletkezéséhez vezetett a piramissejtben (szupra).

4.2 Egy sejt által aktivált poliszinaptikus hálózatok szabályozása fluoxetin és szerotonin által a humán agykéregben

Patch clamp whole cell technikával végeztünk szimultán elektrofiziológiai elvezetések II/III. rétegbeli idegsejt párokból, hármasokból, négyesekből humán prefrontális kérgi eredetű nem-patológiás akut agyszeletekben. A minták 26 férfi és 24 női páciensből származtak melyeknek átlagos életkora 48 ± 16 valamint 53 ± 17 év volt. A tanulmány 84 agyszelet 200 sejtjének vizsgálatán alapul. Vizsgálataink alapkérdése az volt, hogyan hat a terápiás koncentrációban adott fluoxetin ($10 \mu\text{M}$) és a fiziológiás koncentrációjú szerotonin a piramis sejtek által aktivált kérgi neuronhálózatok működésére (**10. ábra**).



10.ábra. A piramis sejtek által kiváltott poliszinaptikus események kialakulásáért felelős lehetséges hálózat.

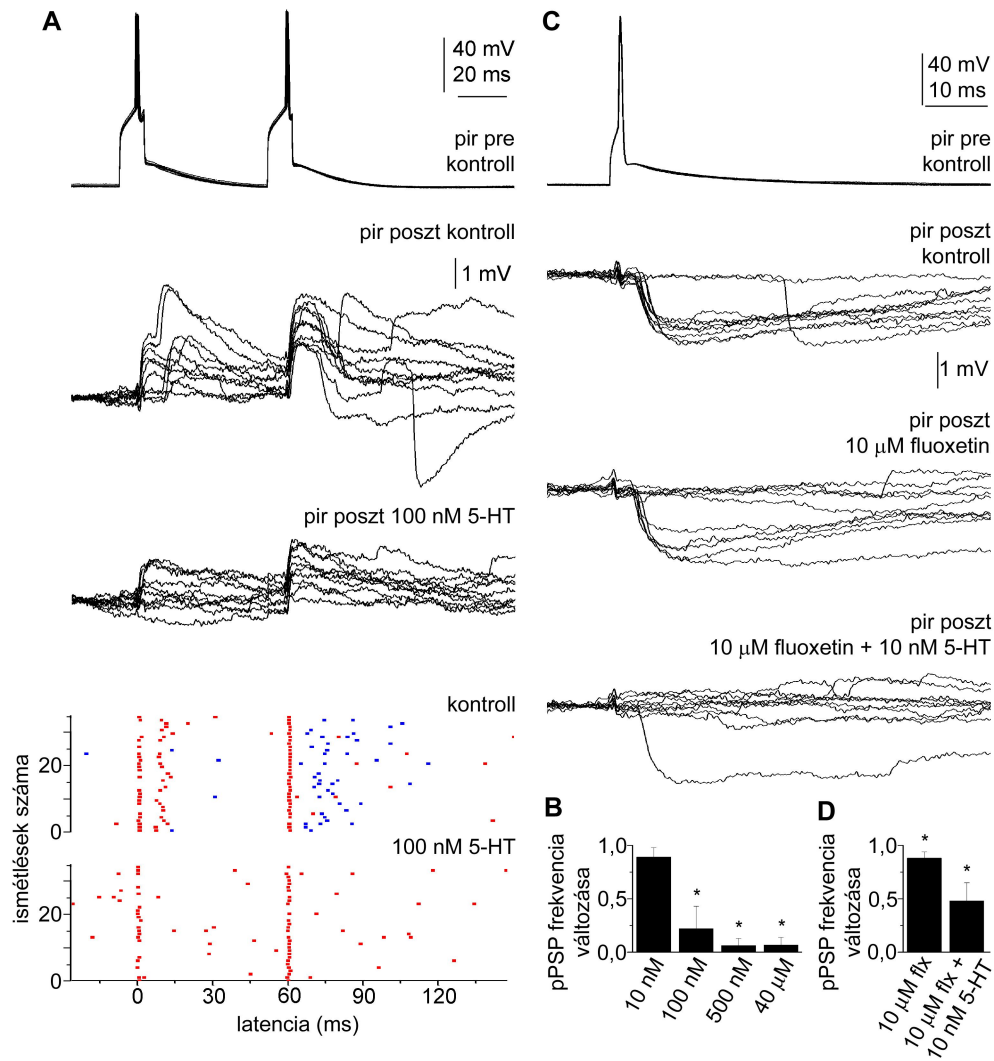
A preszinaptikus piramis sejt (pre) által a posztzinaptikus sejtben (poszt) kiváltott poliszinaptikus IPSP-k és EPSP-k kialakulás mögött egyaránt az erős piramis sejt-interneuron kapcsolatok húzódnak. A poliszinaptikus események kialakításáért potenciálisan felelős kapcsolatokat és sejteket szaggatott vonallal jelöltük. int: interneuron, aac: axo-axonikus sejt, pir: piramis sejt.

4.2.1 Szerotonin és fluoxetin hatása a piramis sejt által kiváltott poliszinaptikus események előfordulására

Elvezetéseink során piramis sejtben kiváltott egyetlen akciós potenciál hatására keletkező poliszinaptikus serkentő és/vagy gátló posztzinaptikus potenciálokot kerestünk környező idegsejtben és vizsgáltuk, hogyan változik a poliszinaptikus események átlagos frekvenciája az akciós potenciált követő 60 ms-os időablakban szerotonin hatására. A poliszinaptikus események szerotonin érzékenységének meghatározása céljából, a szerotonint széles koncentráció tartományban alkalmaztuk ($10 \text{ nM} - 40 \mu\text{M}$) fiziológiásan releváns koncentráció értékeket választva (10 nM , 100 nM és 500 nM), ugyanakkor annak érdekében, hogy eredményeinket korábbi tanulmányok eredményeivel is összevethessük, a szerotonin hatását a fiziológiásnál magasabb koncentrációban ($40 \mu\text{M}$) is megvizsgáltuk (**11. A, B ábra**). 10 nM -os szerotonin alkalmazása önmagában nem okozott szignifikáns változást a poliszinaptikus események frekvenciájában ($22,4 \pm 7,6 \text{ Hz}$ szerotonin alkalmazása előtt és

20,2±6,1 Hz szerotoninban, n=6, p=0,13). 100 nM 5-HT szerotonin azonban a poliszinaptikus események frekvenciáját a kiindulási szint 22±21%-ára, 33,5±16,6 Hz-ről 7,4±6,9 Hz-re csökkentette (n=7, p<0,01). 500 nM-os és 40 µM-os szerotonin alkalmazása teljesen eltüntette a piramissejt által kiváltott poliszinaptikus eseményeket, értelemszerűen 31,5±21,9 Hz-ről 1,1±1,22 Hz-re (n=5, átlagosan a kontrol érték 6,23±6,72%-ára, p<0,03) és 27,5±18 Hz-ről 2,6±2,8 Hz-re (n=3, átlagosan a kontrol érték 6,6±7,15%-ára) csökkentve a poliszinaptikus események gyakoriságát (**11. A, B ábra**).

Ezután megvizsgáltuk, hogy vajon a terápiás koncentrációban alkalmazott fluoxetin (Bolo et al., 2000) befolyásolja-e a poliszinaptikus események gyakoriságát. Piramissejtek egyetlen akciós potenciálja által kiváltott poliszinaptikus posztzinaptikus potenciálok átlagos frekvenciája az akciós potenciált követő 60 ms-os időablakban 21,6±3,4 Hz (n=9) volt melyet 10 µM fluoxetin a kiindulási érték 88±6%-ára, 19,0±2,6 Hz-re csökkentett (p<0,03; **11. C, D ábra**). Mivel az agykérgi minta kivétele illetve a szelet készítési procedúra során a prefrontális kéregbe érkező szerotonin rostokat elvágtuk, így a szeletben jelen lévő szerotonin koncentráció feltehetően alacsonyabb lett az intakt agykéregben mérhetőnél. Emiatt az agykéregben fiziológiásan mérhető bazális szerotonin szinthez közel eső (Malagie et al., 1995; Gobert et al., 1998), a poliszinaptikus események gyakoriságát önmagában nem befolyásoló koncentrációban adtunk szerotonint (10 nM) a fluoxetint is tartalmazó extracelluláris oldathoz a fluoxetin hatásának tesztelése után. Fluoxetin (10 µM) és 5-HT (10 nM) együttes alkalmazása tovább csökkentette a poliszinaptikus posztzinaptikus potenciálok átlagos frekvenciáját 10,4±3,3 Hz-re, a kiindulási szint 48±17 %-ára (p<0,01; **11. C, D ábra**).



11. ábra. Szerotonin és fluoxetin hatása a piramissejt által kiváltott poliszinaptikus hálózati eseményekre

(A) Szerotonin hatása piramissejt által keltett poliszinaptikus EPSP-k és IPSP-k gyakoriságára. A preszinaptikus piramissejtben (pir pre) kiváltott két, egymástól 60 ms-ra helyezett akciós potenciál egymástól eltérő szekvenciájú (monoEPSP – poliEPSP illetve monoEPSP – poliIPSP) eseménysorozatokat váltottak ki a posztzinaptikus piramissejtben (pir poszt). 100 nM 5-HT eltüntette a poliszinaptikus eseményeket. Alsó panel: a fenti kísérlet, pirossal az EPSP-k, késsel az IPSP-k preszinaptikus akciós potenciálhoz viszonyított kezdetét jelölve szerotonin alkalmazása előtt (felső) és közben (alsó). (B) Piramissejt által kiváltott poliszinaptikus posztzinaptikus potenciálok (pPSP) frekvenciájának átlagos változása különböző 5-HT koncentrációk mellett, a 5-HT alkalmazása előtti értékre normalizálva. (C) Fluoxetin, majd fluoxetin és 10 nM 5-HT együttes hatása piramissejt (pir pre) által kiváltott poliszinaptikus IPSP-k előfordulására egy másik piramissejtben (pir poszt). (D) Piramissejt által kiváltott poliszinaptikus posztzinaptikus potenciálok (pPSP) frekvenciájának átlagos változása fluoxetin illetve fluoxetin és 10 nM 5-HT együttes alkalmazásakor az alkalmazásuk előtti értékre normalizálva. (B, D) * $p < 0,05$.

4.2.2 A szerotonin és fluoxetin hálózati hatásának szinaptikus mechanizmusa

Az általunk, a humán agykéregben leírt, piramissejt által kiváltott poliszinaptikus események kialakulásában mind a glutamáterg mind pedig a GABAerg transzmisszió szerepet játszik és a szinaptikusan aktivált GABAerg sejtek közvetíthetik a piramissejt serkentő és gátló poliszinaptikus hatását egyaránt (Szabadics et al., 2006; Molnar et al., 2008). Míg a poliszinaptikus gátlás számos interneuron felől érkezhethet közvetlenül, addig a poliszinaptikus serkentés kialakításában az axo-axonikus sejteknek tulajdonítunk szerepet (**10. ábra**). A **12.A ábra** mutatja, hogy a szerotonin és a fluoxetin számos ponton befolyásolhatja a gátló és serkentő poliszinaptikus események kialakulásában potenciálisan szerepet játszó mikrohálózat működését.

A legegyszerűbben tesztelhető magyarázat a poliszinaptikus események előfordulásának csökkenésére, hogy a szerotonin az interneuronok ingerelhetőségét csökkenti, ezáltal ugyanaz a serkentő bemenet kisebb hatékonysággal fogja aktiválni a poliszinaptikus lánc interneuronját. Ennek eldöntésére GABAerg interneuronokból vezettünk el és vizsgáltuk a szerotonin hatását számos, az ingerelhetőségüket befolyásoló paraméterre. Mivel a főbb interneuron osztályok elektrofiziológiai osztályozása még nem történt meg humánban, az általunk elvezetett interneuronokat a fénymikroszkópos vizsgálatok alapján kosársejteknek, axo-axonikus sejteknek vagy “egyéb interneuronok”-nak azonosítottuk (ld. Anyagok és módszerek). Mivel semelyik ezt követő vizsgálat eredményeiben nem találtunk különbséget az egyes interneuron csoportok között, ezért az adatokat valamennyi esetben együtt értékeltük, és az adatok bemutatása során külön feltüntetjük a minták elemszáma mellett a mintában azonosított kosár- és axo-axonikus sejtek számát. Mintáinkban 100 nM 5-HT $3,24 \pm 2,1$ mV-tal depolarizálta a GABAerg interneuronokat ($n=15$, közülük 8 db kosársejt, $p<0,001$; **12. B ábra**) de nem okozott változást sem a reobázikus áram nagyságában sem pedig az akciós potenciál keletkezésnek küszöbpotenciál értékében. Így elvethetjük annak lehetőségét, hogy a poliszinaptikus események gyakorisága a GABAerg sejtek csökkent ingerelhetőségének a következtében esik le szerotonin hatására. A szerotonin egy másik lehetséges támadáspontja a GABAerg szinaptikus transzmisszió (**12.A ábra**). A gátló GABAerg transzmisszió keresztül közvetlenül csökkenthető a poliszinaptikus IPSP-k gyakorisága, míg a serkentő axo-axonikus sejtről piramissejtre irányuló transzmisszió keresztül a poliszinaptikus EPSP-k gyakorisága. Előbbi eldöntésére monoszinaptikusan kapcsolt interneuron–piramissejt párokból (közülük 5 db kosársejt–piramissejt kapcsolatból) vezettünk el és vizsgáltuk a piramissejtekre érkező IPSP amplitúdó változását 100 nM 5-HT

hatására. Az IPSP-k amplitúdója szerotonin jelenlétében nem változott, értékük átlagosan $-2,23 \pm 1,0$ mV volt szerotonin alkalmazása előtt és $-2,42 \pm 0,9$ mV 100 nM szerotonin jelenlétében ($n=6$, $p=0,13$; **12. C, G ábra**).

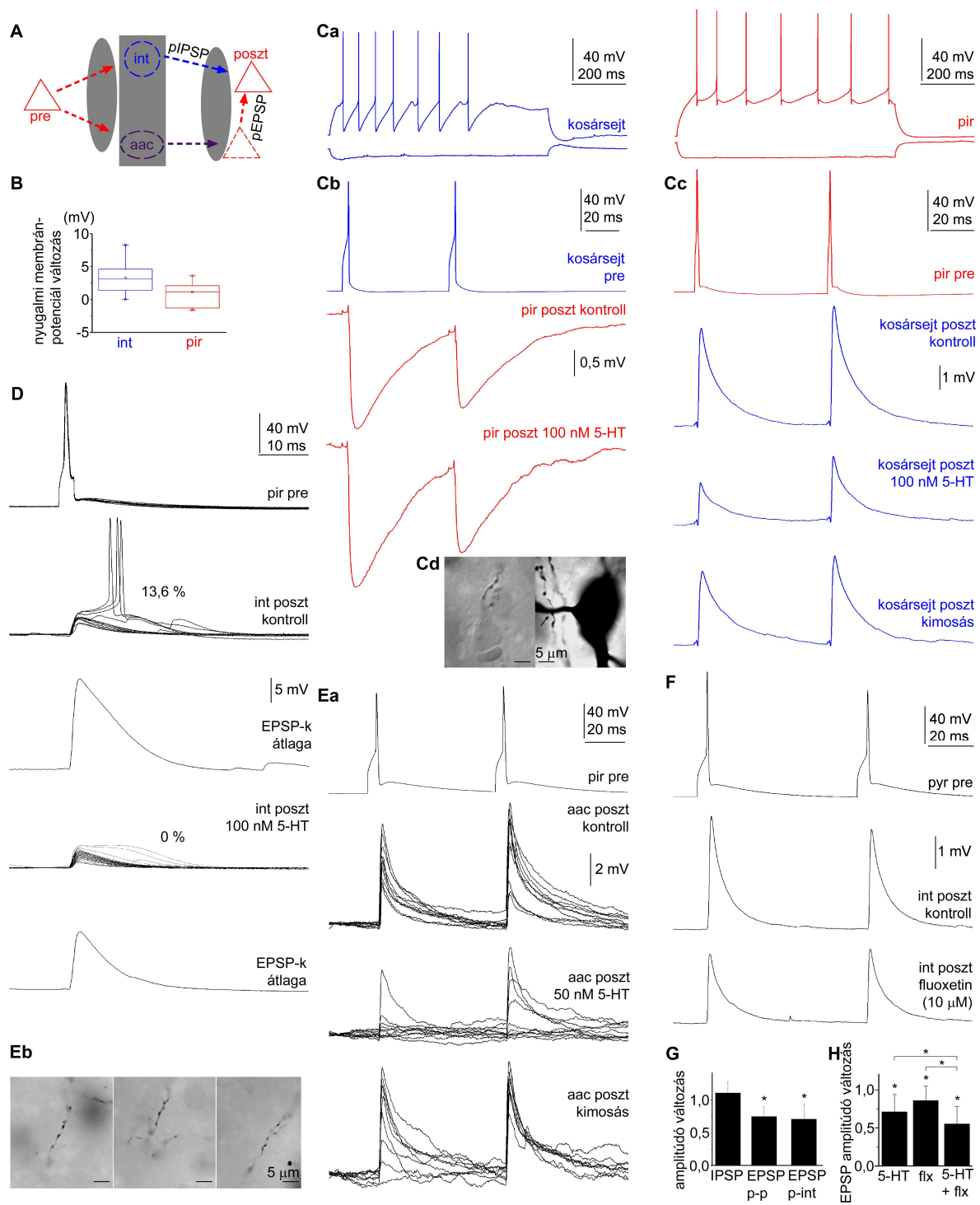
A kérgi neuronhálózatok GABAerg komponensein kívül, a glutamáterg piramis sejtek is célpontjai lehetnek a szerotonin hatásának (**12. A ábra**). Mintáinkban a szerotonin a piramis sejtek többségét (8-ból 6-ot) $2,0 \pm 1,0$ mV-tal depolarizálta míg a kisebb hányadát (8-ból 2-t) $1,5 \pm 0,2$ mV-tal hiperpolarizálta (**12. B ábra**). Ezután a piramis sejtek felől kiváltott monoszínaptikus EPSP-k amplitúdó változását teszteltük 50 nM és 100 nM szerotonin hatására, amely koncentrációk megfelelnek az szerotonerg rostban kiváltott egy illetve két akciós potenciál hatására bekövetkező lokális szerotonin koncentráció növekedésnek (Bunin and Wightman, 1998). Mivel nem találtunk különbséget a kétféle szerotonin koncentráció által okozott eredmények között, az adatokat egy csoportban értékeltük. Az EPSP-k amplitúdója szerotonin (50-100 nM) hatására a piramis sejt-piramis sejt kapcsolatokban $1,56 \pm 1,09$ mV-ról $1,27 \pm 1,09$ mV-ra, a kontroll érték 75 %-ára ($n=6$, $p<0,03$), míg a piramis sejt-interneuron kapcsolatokban $4,34 \pm 2,52$ mV-ról $3,15 \pm 2,53$ mV-ra, a kontroll érték 71 %-ára ($n=12$, $p<0,01$; 1 db piramis sejt-axo-axonikus sejt és 9 db piramis sejt-kosársejt kapcsolat) csökkentek (**12. C-E és G ábrák**). Mindazonáltal, két piramis sejt-interneuron kapcsolatban ahol a posztoszínaptikus EPSP-k 13,6%-os és 83,6%-os valószínűséggel akciós potenciált váltottak ki a posztoszínaptikus interneuronokban, szerotonin eltüntette a küszöb feletti eseményeket és egyben csökkentette a küszöb alatti EPSP-k amplitúdóját is (**12. D ábra**).

Annak eldöntésére, hogy a serkentő szinaptikus működésben beállt változás a szerotonin pre- vagy posztoszínaptikus hatásához köthető-e, megvizsgáltuk a serkentő monoszínaptikus kapcsolatok számos további paraméterét. Mivel a következő paraméterek nem mutattak különbséget a piramis sejt-piramis sejt és a piramis sejt-interneuron kapcsolatok között, ezért az adatokat egy csoportban értékeltük. A transzmissziós hiba valószínűsége – annak a valószínűsége, hogy a preszinaptikus akciós potenciál nem vált ki EPSP-t a posztoszínaptikus sejtben -, $3,68 \pm 8,07$ -ről $11,38 \pm 17,03$ %-ra nőtt meg szerotoninban (50-100 nM, $n=19$, $p<0,02$) jelezve, hogy az akciós potenciálra bekövetkező transzmitter felszabadulás valószínűsége a piramis sejtek axonterminálisaiból szerotonin hatására lecsökkent (**12. E ábra**). Az EPSP amplitúdók páros pulzus aránya szerotonin hatására átlagosan $15,1 \pm 23,1$ %kal, $0,94 \pm 0,18$ -ről $1,04 \pm 0,19$ -re nőtt meg ($n=14$, $p<0,04$) továbbá az EPSP amplitúdók variációs koefficiense szerotonin hatására $0,20 \pm 0,11$ -ről $0,38 \pm 0,38$ -re nőtt meg ($n=16$, $p<0,02$). Végül szerotonin nem befolyásolta a posztoszínaptikus sejt nyugalmi

membránpotenciálon mért bemenő ellenállását ami $189,4 \pm 170,37$ volt szerotonin alkalmazása előtt és $188,7 \pm 171,15$ szerotonin alkalmazása után ($n=10$, $p<0,959$). Ezen eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a 5-HT a glutamaterg szinapszisok preszinaptikus oldalán hatnak humán prefrontális kéregben, hasonló módon mint azt patkány entorhinális kérgében leírták (Schmitz et al., 1998).

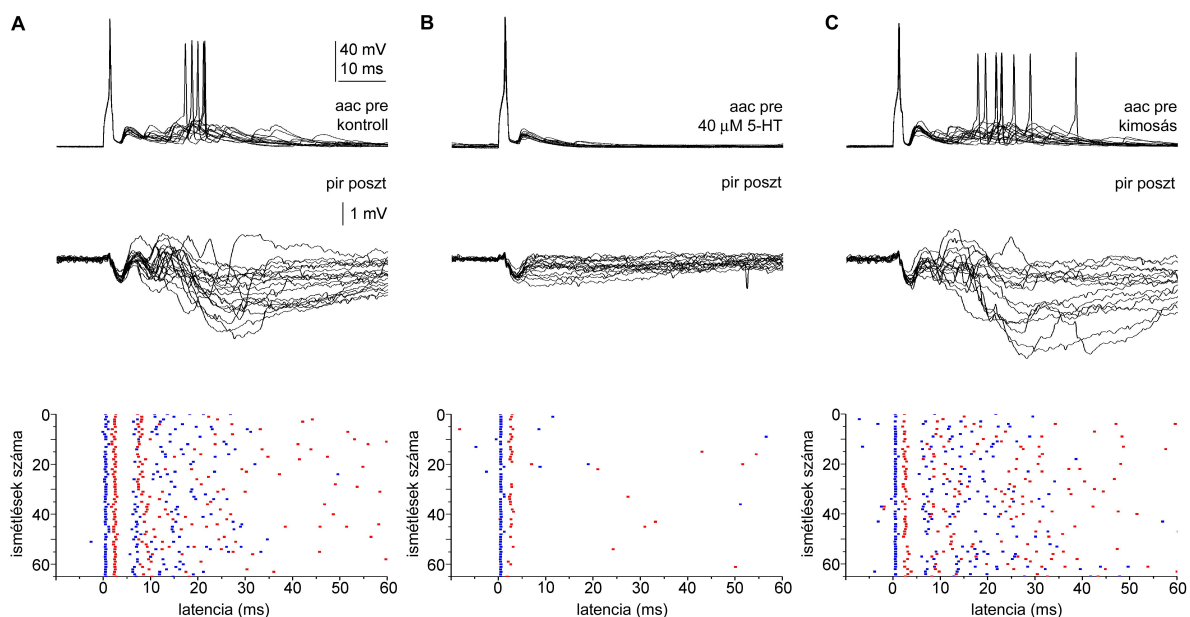
Ezt követően megvizsgáltuk, hogyan hat a fluoxetin a piramissejt felől interneuronokra érkező monoszínaptikus EPSP-k amplitúdójára (posztoszínaptikus interneuronok: 1 db axo-axonikus sejt, 2 db kosársejt és 12 db egyéb interneuron). Fluoxetin ($10 \mu\text{M}$) a kezdeti érték 86 ± 2 %-ára, $5,49 \pm 4,55$ mV-ról $4,45 \pm 3,22$ mV-ra csökkentette az EPSP-k amplitúdóját ($n=15$, 1 db piramissejt-axo-axonikus sejt és 2 db piramissejt kosársejt kapcsolat; $p<0,02$). Fluoxetin ($10 \mu\text{M}$) és 5-HT (50 vagy 100 nM) együttes alkalmazása a kontrol érték $55,2$ %-ára, $5,46 \pm 3,91$ mV-ról $3,50 \pm 3,48$ mV-ra, csökkentette az EPSP-k amplitúdóját ($n=7$, $p<0,01$) amely szignifikánsan nagyobb mértékű csökkenést okozott az EPSP amplitúdókban mint a 5-HT ($p<0,01$) vagy fluoxetin ($p<0,01$) külön-külön alkalmazva (**12. F, H ábrák**). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a szerotonin és a fluoxetin a helyi piramissejtek által létesített glutamaterg szinapszisok működésének befolyásolásával hatnak a humán kérgi feed-forward hálózatok működésére.

A piramissejteken kívül a GABAerg axo-axonikus sejtek is képesek egyetlen akciós potenciállal lokális neuron-hálózatokat aktiválni és monoszínaptikus IPSP-ből, diszínaptikus EPSP-ből és poliszínaptikus IPSP/EPSP-ből álló eseménysorozatokat kiváltani a velük egyidőben elvezetett neuronokban (Szabadics et al., 2006; Molnar et al., 2008). Míg a piramissejtek által kiváltott poliszínaptikus IPSP-k és EPSP-k előfordulása egyformán voltak érzékenyek a szerotoninra addig az axo-axonikus sejt által keltett poliszínaptikus események közül a diszínaptikus EPSP-k gyakorisága még magas ($40 \mu\text{M}$) koncentrációjú szerotoninban is alig változott, viszont a későbbi poliszínaptikus események teljesen eltűntek (**13. ábra**).



12. ábra. A szerotonin és fluoxetin poliszinaptikus eseményekre kifejtett hatásának hálózati mechanizmusa

(A) A piramissejt által kiváltott poliszinaptikus eseményekért felelős feltételezett hálózat és a szerotonin lehetséges támadáspontjai a hálózat elemein (szürke részek). (B) Piramissejtek (pir) és interneuronok (int) nyugalmi membránpotenciál változásai 100 nM 5-HT hatására. (C-H) 5-HT és fluoxetin hatásának vizsgálata monoszinaptikus kapcsolatokon (C) 5-HT hatása a piramissejt-kosársejt és kosársejt-piramissejt monoszinaptikus kapcsolatokra. (Ca) Egy reciprok kapcsolt kosársejt és piramissejt tüzelési mintázata és hiperpolarizáló áraminjekcióra adott feszültség válaszuk. (Cb) A kosársejt által a piramissejtben kiváltott monoszinaptikus IPSP-k 5-HT előtt és után. (Cc) A piramissejt által a kosársejtben kiváltott EPSP-k amplitúdó változása 5-HT-ben. (Cd) DIC kép (bal) a kosársejt axonja és egy azonosítatlan szóma közötti közelfekvésről, valamint fénymikroszkópos felvétel egy, a kosársejt proximális dendritjén elhelyezett lehetséges autapsziszról (nyíl). (D) 5-HT hatása az interneuronok piramissejt felőli aktiválhatóságára. Piramissejt akciós potenciálja (pir pre) által a posztzinaptikus interneuronban (int poszt) kiváltott akciós potenciál előfordulása és a küszöb alatti EPSP-k amplitúdója 5-HT alkalmazása előtt és közben. (E) 5-HT preszinaptikus hatása glutamáterg transzmisszióra, egy piramissejt-axo-axonikus sejt kapcsolaton keresztül bemutatva. (Ea) Piramissejt (pir pre) által egy axo-axonikus sejtben (aac poszt) kiváltott EPSP amplitúdójának reverzibilis csökkenése 5-HT hatására. 5-HT hatására reverzibilisen megnövekedett a transzmissziós hibák gyakorisága valamint a páros-pulzus arány, ami preszinaptikus változásra utal. (Eb) Fénymikroszkópos felvételek az axo-axonikus sejt „cartridge”-airól. (F) Fluoxetin hatása egy piramissejt-interneuron kapcsolatra. (G) Szerotonin hatására bekövetkező átlagos amplitúdó változása a monoszinaptikus IPSP-knek az interneuron-piramissejt kapcsolatokban valamint a monoszinaptikus EPSP-knek a piramissejt-piramissejt (p-p) és a piramissejt-interneuron kapcsolatokban (p-int) a 5-HT alkalmazása előtt mért amplitúdó értékekre normalizálva. (H) A monoszinaptikus kapcsolatok átlagos EPSP amplitúdó változása 5-HT és fluoxetin külön-külön valamint együttes alkalmazásának hatására, az alkalmazásuk előtt mért amplitúdó értékekre normalizálva. (G,H) * $p < 0,05$.



13. ábra. 5-HT hatása axo-axonikus sejt által kiváltott poliszinaptikus eseményekre

(A) A 7.c ábrán bemutatott. A preszinaptikus axo-axonikus sejt egyetlen akciós potenciálja di- és poliszinaptikus EPSP-ket valamint poliszinaptikus akciós potenciálokat vált ki önmagán, míg monoszinaptikus IPSP-t, diszinaptikus EPSP-t és poliszinaptikus IPSP-ket valamint EPSP-ket a posztszinaptikus piramissejten (pir poszt). (B) 5-HT eltünteti a poliszinaptikus eseményeket, azonban a monoszinaptikus IPSP-k és diszinaptikus EPSP-k gyakoriságát kevésbé befolyásolja. (C) A hatás reverzibilis. (A-C) Az alsó panelek az EPSP-k (piros) és IPSP-k (kék) preszinaptikus akciós potenciálhoz viszonyított kezdetét mutatják 65 egymást követő ismétlésen keresztül. Megjegyzendő, hogy az elvezetés során használt alacsony kloridion koncentrációjú intracelluláris oldat következtében, a GABAerg válaszok mind hiperpolarizálóak voltak.

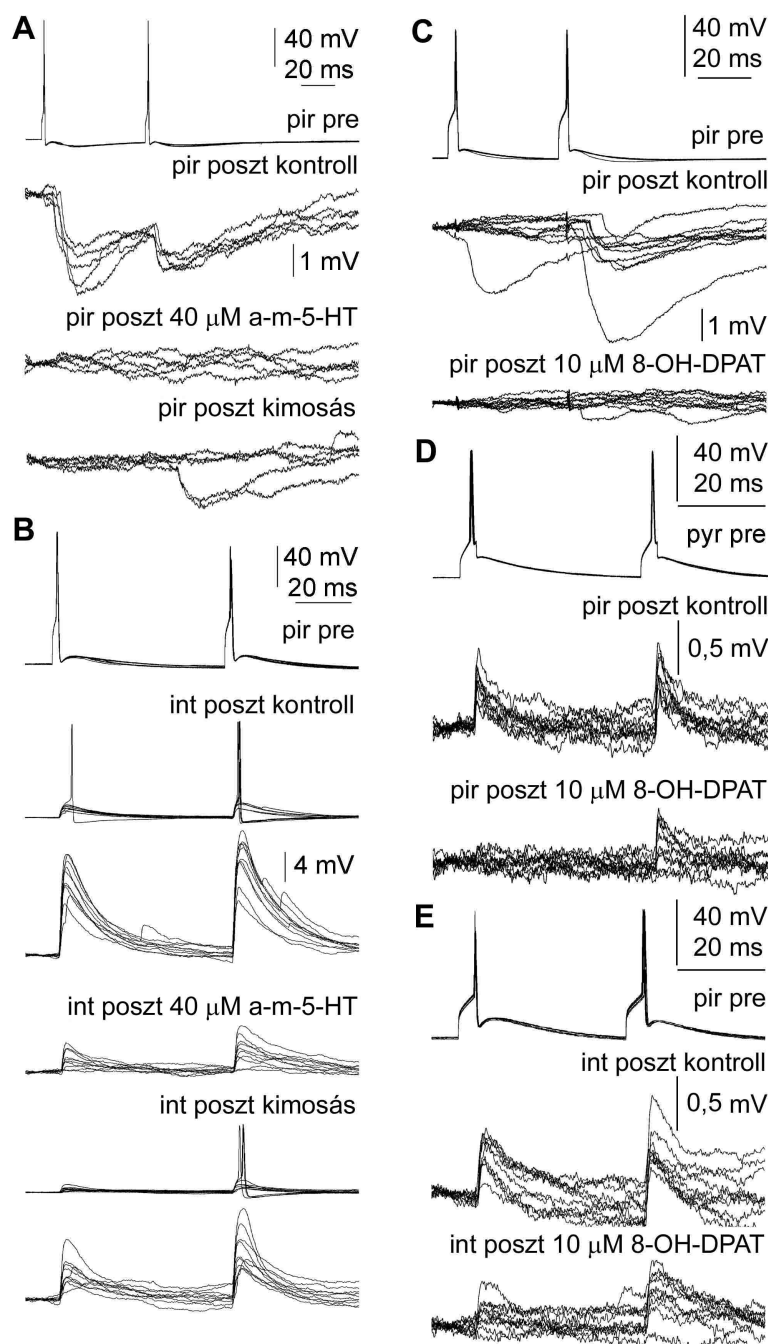
4.2.3 A szerotonin glutamáterg transzmisszióra kifejtett hatásának mechanizmusa

Megvizsgáltuk, hogy a 5-HT receptorok szelektív aktivációja hogyan befolyásolja a piramissejt vagy axo-axonikus sejt által kiváltott mono- és poliszinaptikus eseményeket. A 5-HT_{2A} receptor agonista alfa-metil-serotonin (40 μM) a szerotoninhoz hasonló módon eltüntette a piramissejtek (n=10; **14. A ábra**) és axo-axonikus sejtek (n=4; **15. ábra**) által kiváltott poliszinaptikus eseményeket meghagyva az axo-axonikus sejt által kiváltott monoszinaptikus IPSP-k és diszinaptikus EPSP-ket. Ezen kívül, alfa-metil-serotonin (40 μM) lecsökkentette a monoszinaptikus EPSP-k amplitúdóját 3,15±2,53 mV-ról 1,49±1,29 mV-ra (n=10, p<0,01; posztszinaptikus sejtek: 4 piramissejt, 1 axo-axonikus, a kosársejt, 4 interneuron **14. B ábra**). Továbbá az 5-HT-hez hasonló módon 4,8±10,8%-ról 20,4±19,85%-ra növelte (n=10, p<0,01) a transzmissziós hiba valószínűségét (**14. B ábra**), 0,94±0,33-ról

1,17±0,38-re növelte a páros pulzus arányt (n=6, p<0,04) és 0,28±0,21-ről 0,59±0,26-ra növelte az EPSP amplitúdók variációs koefficiensét (n=7, p<0,01), mutatva, hogy hatása feltehetőleg preszinaptikus eredetű. Alfa-metil-serotonin szintén lecsökkentette hat piramissejt-interneuron kapcsolatban a posztszinaptikus akciós potenciálok gyakoriságát 42,60±28,80%-ról 3,60±3,40%-ra és ezzel párhuzamosan a küszöbalatti EPSP-k amplitúdóját is (12,30±6,70 mV-ról 5,60±5,40 mV-ra, n=6, p<0,03; **14. B ábra**). Mivel patkány oliva inferiorban kimutatták, hogy a posztszinaptikus 5-HT_{2A} receptor aktiváció következtében endokannabinoid molekulák szabadulnak fel a posztszinaptikus sejtéből és retrográd módon, preszinaptikus CB1 receptorokon keresztül képesek csökkenteni a glutamáterg transzmisszió erősségét (Best and Regehr, 2008) megvizsgáltuk, hogy hasonló jellegű mechanizmus áll-e az alfa-metil-serotonin hatás hátterében. Poliszinaptikus kapcsolatokon tesztelve, a CB1-receptor antagonistá AM251 (5 µM) nem volt képes kivédeni az alfa-metil-serotonin EPSP-amplitúdó csökkentő hatását (n=3).

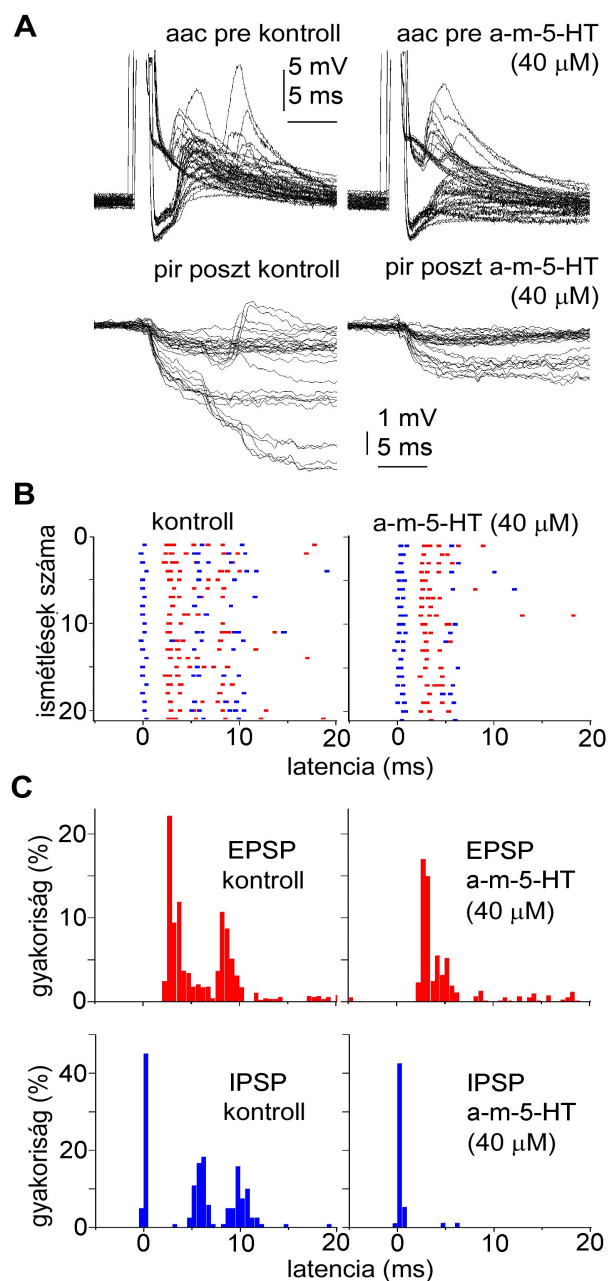
Korábbi eredmények alapján (Schmitz et al., 1998; Schmitz et al., 1998) megvizsgáltuk az 5-HT_{1A} receptorok esetleges szerepét is a piramissejt által kiváltott poliszinaptikus és monoszinaptikus eseményeken is. A 5-HT_{1A} receptor agonista 8-OH-DPAT (10 µM) eltüntette a piramissejt által kiváltott poliszinaptikus eseményeket (n=3; **14. C ábra**). Ezen kívül a 8-OH-DPAT (10 µM) csökkentette a piramissejt által kiváltott monoszinaptikus EPSP-k amplitúdóját 1,3±1,2 mV-ról 0,9±1,2 mV-ra (n=4, p<0,01) miközben a 5-HT-hez hasonló módon 5,2±6,6%-ról 26,2±32,6%-ra növelte a transzmissziós hiba valószínűségét (n=4, p<0,03), 1,11±0,20-ről 1,48±0,24-re növelte a páros pulzus arányt (n=4, p<0,05) és 0,24±0,12-ről 0,43±0,19-re növelte az EPSP amplitúdók variációs koefficiensét (n=4, p<0,05) mutatva, hogy hatása feltehetőleg preszinaptikus eredetű (**14. D és E ábrák**).

Végül, további szerotonin receptorok lehetséges szerepét is tesztelve, sem az 5-HT-3 receptor agonista 2-methyl-5-HT (80 µM, n=3) sem pedig az 5-HT_{1B} receptor agonista CP94253 (40 µM, n=2) nem okoztak változást a piramissejt által kiváltott poliszinaptikus események gyakoriságában. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a szerotonin feltehetőleg 5-HT_{1A} és 5-HT_{2A} receptorokon keresztül fejti ki hatását a glutamáterg axonon.



14. ábra. A szerotonin hatásmechanizmusának farmakológiai vizsgálata

(A) Az 5-HT_{2A} receptor agonista alfa-metil-5-HT (a-m-5-HT) eltüntette a piramissejt által kiváltott poliszinaptikus IPSP-ket egy piramissejt-piramissejt kapcsolatban. (B) Az 5-HT_{2A} receptor agonista alfa-metil-5-HT (a-m-5-HT) eltüntette a piramissejt által egy posztzinaptikus interneuronban kiváltott akciós potenciálok előfordulását, lecsökkentette a küszöb alatti EPSP-k amplitúdóját és megnövelte a transzmissziós hiba gyakoriságát. (C) Az 5-HT_{1A} receptor agonista 8-OH-DPAT eltüntette a piramissejt által kiváltott poliszinaptikus IPSP-ket egy piramissejt-piramissejt kapcsolatban. (D,E) Az 5-HT_{1A} receptor agonista 8-OH-DPAT lecsökkentette a monoszinaptikus EPSP-k amplitúdóját és megnövelte a transzmissziós hiba gyakoriságát egy (D) piramissejt-piramissejt és egy (E) piramissejt interneuron kapcsolatban.



15.ábra. Alfa-metil-serotonin hatása az axo-axonikus sejt által kiváltott posztzinaptikus eseményekre

(A) Axo-axonikus sejtek által önmagukon ($n=4$) kiváltott di- és polyszinaptikus EPSP-k (felül), valamint piramissejteken ($n=3$) kiváltott mono és polyszinaptikus IPSP-k és polyszinaptikus EPSP-k (alul) alfa-metil-5-HT (a-m-5-HT) alkalmazása előtt (bal) és közben (jobb), az egyes kapcsolatokat reprezentáló 10-10 egymásra helyezett elektrofiziológiai görbén keresztül bemutatva. (B) Az A panelen bemutatott kapcsolatokból 20-20 ismételt mérés egymásra helyezve, ahol az EPSP-knek és IPSP-knek a preszinaptikus akciós potenciálhoz viszonyított kezdetét piros illetve kék pontok mutatják, értelemszerűen. (C) Az EPSP-k és IPSP-k előfordulásának gyakorisága a preszinaptikus akciós potenciál idejéhez képest, a B panelből készítve. Az (B) és (C) ábra jól szemlélteti a GABAerg és glutamaterg szinaptikus események alternáló jellegét, valamint az axo-axonikus sejt akciós potenciálját követő monoszínaptikus IPSP-k és diszínaptikus EPSP-k rezisztenciáját alfa-metil-5-HT-ra.

5. DISZKUSSZIÓ

Ismereteink szerint, kutatócsoportunk elsőként vezetett el azonosított idegsejtek között szinaptikus kapcsolatot humán agykéregben. Egyetlen piramissejt a monoszinaptikus serkentésen kívül viszonylag nagy gyakorisággal képes serkentő és gátló poliszinaptikus események kiváltására humán agykéregben. A piramissejtek hálózati hatása a humán agykéregben egy nagyságrenddel hosszabb, mint azt más fajok vizsgálata során korábban leírták. Disszertációm ezen egy sejt által kiváltott poliszinaptikus eseményekkel, a mögöttük húzódó hálózati mechanizmussal, valamint egy antidepresszánsként alkalmazott SSRI-nak, a fluoxetin-nek és az endogén neuromodulátor szerotoninnak e poliszinaptikus eseményekre kifejtett hatásával foglalkozik.

5.1 Egy sejt által aktivált poliszinaptikus hálózatok a humány agykéregben

A poliszinaptikus eseménysorozatok kiválthatósága, farmakológiai tulajdonsága és időbeli strukturáltsága azt mutatja, hogy a sejtről-sejtre terjedő aktivitás egy sztereotip mechanizmus szerint terjed a humán kérgi neuronhálózatok szinaptikusan kapcsolt tagjai között, hasonló módon az agykéreg különböző területein. A piramissejt által kiváltott hálózati aktivitás terjedésének első két szinaptikus lépése időben jól szabályozott folyamat. A piramissejtben kiváltott elsőrendű akciós potenciál, a piramissejt-interneuron szinapszisok szelektív megerősödése révén kizárólag GABAerg interneuronokban fog másodrendű akciós potenciált kiváltani. A GABAerg axo-axonikus sejtekben keletkezett másodrendű akcióspotenciálok képesek harmadrendű akciós potenciált kiváltani további piramissejtekben. Harmadrendű akciós potenciál kizárólag piramissejtekben keletkezik mivel az axo-axonikus sejtek nem idegeznek be GABAerg interneuronokat (Freund and Buzsaki, 1996; Somogyi et al., 1998). Az axo-axonikus sejtek így képesek biztosítani az aktivitás továbbterjedését a hálózatban. Az axo-axonikus sejt másodrendű akciós potenciáljával egyidőben kosársejtekben és más, interneuronokban is keletkezhethet másodrendű akciós potenciál (Pouille and Scanziani, 2004; Silberberg and Markram, 2007), melyek ily módon diszinaptikus IPSP-ket keltenek a posztzinaptikus piramissejtekben gátolva azon piramissejtek aktivitását melyek nem kapnak elegendő mértékű vagy semekkora serkentést sem az axo-axonikus sejtektől.

Ugyanakkor a piramis sejtekre érkező hiperpolarizáló diszinaptikus IPSP-k még növelhetik is az axo-axonikus bemenetek depolarizáló hatását - amennyiben azoknál időben előbb érkeznek-, mivel távolabb helyezik a piramis sejt membránpotenciálját a viszonylag depolarizált axonális GABA reverz potenciáltól megnövelve ezzel a kimenő kloridion áram hajtóerejét (Szabadics et al., 2006; Khirug et al., 2008; Woodruff et al., 2009). Az egyidőben aktiválódó hiperpolarizáló és depolarizáló feed-forward GABAerg bemenetek egyrészt kijelölik mely neuronális láncok aktiválódnak és melyek ne, másrészt lecsökkentik a piramis sejtek spontán aktivitását, ezáltal javítják a poliszinaptikus események jel-zaj viszonyát. Ily módon az egy sejt által kiváltott hálózati aktivitásmintázat kezdeti szakaszát a glutamáterg szinapszisok működése mellett főként a piramis sejtek aktivitását szabályozó serkentő és gátló GABAerg szinapszisok konvergens és divergens viszonya határozza meg. A precízen váltakozó mono-, di- és triszinaptikus glutamáterg és GABAerg események éles-hullám szerű hálózati oszcillációra emlékeztetnek (Klausberger et al., 2003; Luczak et al., 2007). Az aktivitás későbbi terjedésében a piramis sejtekre érkező konvergens glutamáterg bemenetek szummációja valamint az IPSP-ket követő, a gátlás elmúlásával jelentkező úgynevezett „rebound” serkentés is egyre nagyobb szerepet kaphat (Cobb et al., 1995). Számos feed-forward gátló neuron-hálózat szabályozza a piramis sejtek aktivitását az agykéregben (Silberberg, 2008). A kosársejtek biztosította feed-forward gátlás már szórványos lokális serkentésre is viszonylag könnyen és gyorsan aktiválódik (Pouille and Scanziani, 2004). A kosársejtek egymással alkotott gyakori elektromos és szinaptikus kapcsolatai valamint passzív és aktív elektromos tulajdonságaik lehetővé teszik precíz, szinkronizált aktivációjukat. Konvergens, a piramis sejtek szomatikus régióját célzó szinapszisaik pedig alkalmassá teszik őket a piramis sejtek akciós potenciáljainak hatékony és precíz időzítésére. Intenzívebb piramis sejt aktivitás más, lassabban aktiválódó gátló neuronális köröket is bekapcsolhat, melyek fokozatosan átveszik a gátló funkciót a gyorsan depresszálló kosársejtektől (Silberberg, 2008), eltolva ezzel a gátlás kifejeződését a piramis sejtek szomatikus régiójáról azok disztális régióira (Pouille and Scanziani, 2004). Végül az intenzívebb hálózati aktivitás során a piramis sejtekre érkező axo-axonikus serkentés gátlásba válthat át a piramis sejtek immár depolarizáltabb membránpotenciáljánál hiperpolarizáltabb GABA reverz potenciál miatt, mely a hálózati aktivitás csökkenéséhez vezethet (Woodruff et al., 2009).

Egyetlen piramis sejt nem képes a posztzinaptikus piramis sejtben monoszinaptikusan akciós potenciált kiváltani, mivel a köztük lévő glutamáterg transzmisszió erőssége nem elegendő ehhez. Két helyi hálózati mechanizmus teszi lehetővé a piramis sejtek aktivációját.

Az egyik, az axo-axonikus sejt felől érkező depolarizáló bemenet (Szabadics et al., 2006) a másik pedig preszinaptikus piramissejtek felől érkező konvergens szinaptikus bemenetek szinkronizált aktivitása (London et al., 2002). A két mechanizmus kapcsolatát mutatja, hogy az axo-axonikus sejt számos piramissejtet képes milliszekundumos precizitással szinkron aktiválni (Szabadics et al., 2006), melyek ezáltal együttesen képesek lehetnek akciós potenciált kiváltani posztszinaptikus piramissejtekben (**9. ábra**). A poliszinaptikus EPSP-k ritka előfordulása magyarázható egyrészt az axo-axonikus sejteknek a gátló idegsejtekhez viszonyított ritka előfordulásával, másrészt azzal, hogy a piramissejteknek csak kis hányadában vált ki az axo-axonikus bemenet akciós potenciált (Szabadics et al., 2006). Ennek mindenesetre fontos szerepe lehet abban, hogy az axo-axonikus sejt aktivációja ne vezessen túlzott serkentéshez és ezáltal epileptikus aktivitáshoz. Eredményeink azt mutatják, hogy az axo-axonikus sejtnak központi szerepe lehet a szorványosan érkező lokális serkentés felerősítésében és továbbításában, másfelől nem zárható ki hogy piramissejtek szinkronizált aktivációja – kimeneteik nagyfokú konvergenciája következtében -, szintén egy hatékony mechanizmusa lehet az aktivitás továbbterjedésének a kéregben.

Eredményeink alapján nem jelenthetjük ki, hogy a piramissejt által kiváltható poliszinaptikus eseménysorozatok specifikus sajátossága lenne-e a humán agykéregnek. Azonban korábbi tanulmányok, melyben piramissejtek hatását vizsgálták főemlősök agykérgében, nem számoltak be poliszinaptikus aktivitásról (Povysheva et al., 2006). Hasonlóképpen, kutatócsoportunk patkány szomatoszenzoros és prefrontális kéregben végzett eddigi kísérletei során ($n > 4500$), II/III. rétegbeli piramissejtek a monoszinaptikus EPSP-ken kívül ($n = 724$) poliszinaptikus IPSP-eket csak szorványosan ($n = 8$), poliszinaptikus EPSP-k pedig egyáltalán nem váltottak ki. A piramissejt által keltett poliszinaptikus és monoszinaptikus események gyakoriságának az aránya patkányban 0,01, míg humánban 1,73 volt. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy a humán minták sebészi eltávolítása közben használt altatási eljárás eltért a patkánykísérletekben általunk használt altatási procedúrától. Másrészt nem zárható ki, hogy az általunk használt extracelluláris folyadékban a humán idegsejtek ingerlékenysége eltér a patkány idegsejtékétől.

A piramissejtek által kiváltott hálózati események kialakulásának kulcs feltétele humánban a szelektíven megerősödött piramissejt-interneuron kapcsolatok. A humán interneuronokra érkező nagy amplitúdójú EPSP-khez hasonló amplitúdójú EPSP-kről nem számoltak be eddig más fajokban. Az általunk anatómiailag is vizsgált piramissejt-interneuron párokban a piramissejtek kevés számú szinapszison keresztül váltottak ki nagy amplitúdójú EPSP-t, esetenként akciós potenciált a posztszinaptikus kosársejtekben. A piramissejt-

interneuron kapcsolatokra jellemző szinapszis szám hasonlóan alacsony más fajok kérgi régióiban is azonban a kapcsolatok erőssége sokkal kisebb mint humánban. Macska látókérgében végzett tanulmány például 1-7 serkentő szinapszistról számol be piramissejt-interneuron kapcsolatokban (Buhl et al., 1997). Patkány szomatoszenzoros kérgi piramissejtek 1-4 szinapszist létesítettek kosársejteken és más interneuronokon (Tamas et al., 2002; Wang et al., 2002). Patkány szomatoszenzoros és szomatomotoros kérgi területein végzett további vizsgálatok is hasonlóan alacsony szinapszis számokról számoltak be glutamáterg sejtek és interneuronok közötti kapcsolatokban (Deuchars and Thomson, 1995; Helmstaedter et al., 2008). A fenti tanulmányokban vizsgált piramissejt-interneuron kapcsolatok EPSP amplitúdói mindössze 0,5 mV - 3 mV körüliek voltak, szemben az általunk hasonló szinapszis számok mellett tapasztalt 6,6 mV - 11,2 mV-os EPSP-k amplitúdóival, ami azt mutatja, hogy az egyedi szinapszisok szintjén érdemes keresni a humánban tapasztalt megerősödött szinaptikus transzmisszió okát. Bár eredményeink nem adnak magyarázatot arra, hogy miért fordulhatnak elő humánban ilyen nagy amplitúdójú serkentő bemenetek, de azt mutatják, hogy a humán és nem humán fajok EPSP amplitúdói közötti különbség nem tulajdonítható sem a piramissejt-interneuron kapcsolatokra jellemző szinapszis szám fajok közötti különbségének, sem pedig a sejtek fajok közötti bemenő ellenállás különbségeinek (Miles, 1990; Galarreta and Hestrin, 2001; Povysheva et al., 2006; Silberberg and Markram, 2007).

Eredményeink alátámasztják a szelektíven megerősödött szinaptikus neuronláncok előfordulását a kéregben (Hebb, 1949; Abeles, 1991; Salinas and Sejnowski, 2001; Douglas and Martin, 2007; Luczak et al., 2007) továbbá kimutatják, hogy a kosársejtek mellett az axo-axonikus sejtekre is érkeznek nagy amplitúdójú glutamáterg bemenetek. A kosár és axo-axonikus sejteket célzó erős glutamáterg bemenetek kialakulásának mechanizmusa nem ismert. Ismert azonban a hosszú távú szinaptikus potencírozódás olyan formája mely intenzív hálózati aktivitás közben fejeződik ki inaktív interneuronokon (Lamsa et al., 2007). Ilyen intenzív hálózati aktivitás például a hippocampális éles hullám, az axo-axonikus sejtek pedig az éles hullámok legelején aktívak, a későbbi intenzívebb szakasz alatt viszont csendesek (Klausberger et al., 2003).

Az egy sejt által kiváltott poliszinaptikus események jelentősége nem tisztázott, de a mögöttük húzódó hálózati mechanizmus szerepet játszhat a Hebbi sejtegyüttesek létrejöttében és működésében (Hebb, 1949). Hebb sejtegyüttese lényegében egy egymással szinaptikusan összekapcsolt serkentő idegsejtek alkotta gráf. Az elmélet szerint a kölcsönös serkentő kapcsolatok teszik lehetővé, hogy a sejtegyüttes néhány tagjának aktivációja áttérjedjen a sejtegyüttes többi tagjára. Ennek egy lehetséges mechanizmusa lehet a piramissejt - axo-

axonikus sejt – piramissejt aktiváció, aminek eredményeként egyetlen piramissejt aktivációja piramissejtek egy kisebb populációjának szinkron tüzelését eredményezheti. Ugyanakkor az axo-axonikus sejt piramissejtekkel alkotott reciprok kapcsolatai biztosíthatják a serkentés lokális felerősítését (Buhl et al., 1994). E feed-forward és feed-back serkentő mechanizmusok lehetővé tehetik a sejtegyüttes tagjainak legfeljebb néhány 10 milliszekundumos időablakon belül szinkronizált aktivációját. Buzsáki elmélete szerint a sejtegyüttesek aktivációja ehhez hasonló időskálán mozoghat az azt detektáló sejt- és hálózatszintű integrációs folyamatok (membrán-időállandó, hálózati oszcillációk) időbeli tulajdonságai miatt (Buzsaki, 2010). Egy sejtegyüttest alkotó piramissejtek feltételezhetően szórványosan helyezkednek el és a szomszédos piramissejtek különböző sejtegyüttesekhez tartozhatnak. Mivel reciprok piramissejt-interneuron kapcsolatok gyakoriak és a szomszédos piramissejtek részben közös interneuronokhoz kapcsolódnak, az elsőként aktiválódó sejtegyüttes piramissejtjei elnyomják a többi aktivitását (Buzsaki, 2010). Mintáinkban a piramissejtek által a környező sejteken nagy gyakorisággal kiváltott di- és poliszinaptikus gátlás hatékony mechanizmusa lehet az egymással versengő sejtegyüttesek formációjának és szegregációjának (Buzsaki, 2010).

Összegzésképpen, a humán kérgi hálózatokban a szelektíven megerősödött piramissejt-interneuron kapcsolatok és az axo-axonikus sejtek depolarizáló hatása révén piramissejtek szórványos aktivációja képes lehet funkcionálisan kapcsolt sejtek együttes illetve szekvenciális aktivációját kiváltani, melynek szerepe lehet a magasabb rendű kérgi funkciókban szerepet játszó sejtegyüttesek működésében (Hebb, 1949; Ikegaya et al., 2004), valamint az egy sejt által kiváltott motoros és viselkedésbeli válaszok kialakításában (Brecht et al., 2004; Houweling and Brecht, 2008).

5.2 Szerotonin és fluoxetin szerepe a poliszinaptikus hálózatok szabályozásában

A szerotonerg rendszer működése intenzíven kutatott terület mivel számos, kognitív deficittel társuló pszichiátriai rendellenesség kialakulásának hátterében, úgy mint a depresszió, szorongásos zavarok, skizofrénia vagy az Alzheimer-kór esetében (Lucki, 1998; Meltzer et al., 1998; Jones and Blackburn, 2002; Castaneda et al., 2008) szerepet tulajdonítanak neki és így kedvelt molekuláris célpontja a központi idegrendszerre ható gyógyszerek tervezésének (Roth et al., 2004). Az extracelluláris 5-HT koncentrációt a szerotonin transzporterek gátlása révén megnövelő SSRI-ok (Malagie et al., 1995) antidepresszáns hatásuk mellett kedvező befolyással bírnak számos kognitív funkcióra

emberben. Azonban a szerotonin és az SSRI-ok hatása a humán kérgi hálózat működésére vonatkozólag a neuronális kapcsolatok szintjén eddig nem volt ismert.

Megvizsgáltuk hogyan és milyen mechanizmuson keresztül befolyásolja az egy sejt által kiváltott hálózati eseményeket a szerotonin, és egy széles körben, terápiásan antidepresszánsként alkalmazott SSRI, a fluoxetin. Eredményeink azt mutatják, hogy fiziológiás koncentrációjú szerotonin és terápiás koncentrációban adott fluoxetin a helyi piramis sejtek felőli glutamaterg transzmisszió gátlásán keresztül hatékonyan csökkentik az egy sejt által kiváltott poliszinaptikus események kiválthatóságát prefrontális kérgi eredetű humán mintákban. A glutamaterg transzmisszió szerotonin érzékenységét már több esetben kimutatták rágsálókban különféle agyterületeken, azonban a legtöbb vizsgálatban a fiziológiás szerotonin koncentrációkat nagyságrendekkel meghaladó szerotonin koncentrációkat alkalmazva.

A szerotonin, a poliszinaptikus eseményekre kifejtett hatásának maximumát már a nanomólos koncentrációtartományban elérte, a fiziológiásan tapasztalható extraszinaptikus koncentrációk (Bunin and Wightman, 1998) felső határához közel, szinte teljesen eltüntetve azokat. Fontos megjegyezni azonban, hogy az általunk alkalmazott 100 nM-os vagy a fölötti szerotonin koncentráció in vivo feltehetőleg csak lokálisan a másodperc tört részéig fordul elő néhány 10 mikrométerre a szerotonerg terminálistól (Bunin and Wightman, 1999) fiziológiásan emiatt feltehetőleg mérsékeltebb a szerotonin hatása. Ugyanakkor figyelembe kell venni, hogy bizonyos környezeti tényezők (Kobayashi et al., 2008) vagy farmakonok (Malagie et al., 1995) hatására a szerotonerg transzmisszió fokozódhat valamint feltételezhető, hogy a szerotonin transzporter blokádjá révén a megnövekedett szerotonin koncentráció térbeli és időbeli lecsengése megnyúlik, így hatása kifejezettebb lehet. Önmagában kevésbé hatékony, alacsony szerotonin koncentráció együttes alkalmazása fluoxetinnel meghaladta azok külön-külön kifejtett hatásának mértékét a mono- és poliszinaptikus események csökkentésében egyaránt. Ez magyarázható egyrészt azzal, hogy az in vitro szelettechnika velejárójaként a nem kérgi eredetű szerotonerg axonok elvágásával jelentősen lecsökken a spontán felszabaduló szerotonin mennyisége és ezért az önmagában adott fluoxetin kevésbé hatékony, másrészt nem zárható ki, hogy a fluoxetin a szerotonin transzporter blokkolásán kívül más mechanizmuson keresztül, a szerotoninétől eltérő útvonalakon keresztül is csökkenti a poliszinaptikus események előfordulását, ez esetben hatásuk inkább összeadódó mintsem potencírozó jellegű.

A szerotonin hatásmechanizmusának részletesebb vizsgálata kimutatta, hogy célpontja a helyi piramis sejtek felőli glutamaterg transzmisszió. Eredményeink arra utalnak, hogy a

szerootonin hatását preszinaptikusan fejt ki a piramissejtek axonján. A receptoriális mechanizmus, amin keresztül a szerootonin lecsökkentette a glutamáterg transzmissziót, részben megegyezik azzal amit patkány entorhinális kérgében írtak le, miszerint a hatást részben a gátló 5-HT_{1A} receptor közvetíti. Nincs információ arról, hogy 2/3. rétegi humán piramissejtek axonterminálisai expresszálnak-e 5-HT_{1A} receptort, de a piramissejtek axon-iniciális szegmentjének proximális része 5-HT_{1A} receptor immunreaktivitást mutat humánban (DeFelipe et al., 2001). Elképzelhető, hogy a szerootonerg rendszer a 5-HT_{1A} receptor aktiváció okozta hiperpolarizáció révén szabályozza a küszöb alatti és feletti jelek terjedését a szomatodendritikus és axonális domén között. Egy korábbi tanulmánnyal összhangban mintáinkban a piramissejtek kis hányada hiperpolarizálódott szerootonin hatására (Newberry et al., 1999). Az axon-iniciális szegmentum hiperpolarizációja megnövelheti a hajtó erőt a lokálisan depolarizáló axo-axonikus GABAerg bemenetek számára hatékonyabbá téve az axo-axonikus sejteket a piramissejtek aktivációjában szerootonin jelenlétében (Szabadics et al., 2006; Khirug et al., 2008; Woodruff et al., 2009). Mindemellett, a hagyományosan serkentőnek tekintett 5-HT_{2A} receptor aktiváció (Aghajanian and Marek, 1997) is minden tekintetben utánozta a szerootonin hatását. A 5-HT_{2A} receptoron keresztüli gátlás mechanizmusa kevésbé világos mivel ennek a receptornak az aktivációja patkány prefrontális kéregben depolarizálja a piramissejteket, azonban kéreg alatti területeken a glutamáterg transzmisszió preszinaptikus serkentését (Hasuo et al., 2002) és gátlását (Best and Regehr, 2008) is eredményezheti. Mindazonáltal, eredményeinkkel összhangban, patkány kisagyban a glutamát felszabadulás gátolható mind 5-HT_{1A} mind 5-HT₂-es receptor aktivációval (Maura et al., 1988).

Az EPSP-k amplitúdóját hatékonyan csökkentő szerootonin koncentráció nem volt hatással a GABAerg sejteknek a kimenetére sem a kosársejt-piramissejt kapcsolatokban, sem pedig az axo-axonikus sejt-piramissejt kapcsolatokban, mivel utóbbi esetben az axo-axonikus sejt által keltett diszinaptikus EPSP-k gyakorisága még magas szerootonin koncentráció mellett sem csökkent lényegesen. Ez a mechanizmus megegyezik korábbi, a patkány entorhinális kérgében leírtakkal, miszerint a szerootonin, a hálózat-csendesítő hatását hasonló módon a glutamáterg és nem pedig a GABAerg szinapszisokon keresztül fejt ki (Schmitz et al., 1998). Ettől eltérően azonban, a szerootonin csökkenti a gátló kosársejt-piramissejt kapcsolatok erejét egér szomatoszenzoros kérgében ami faj esetleg régió specifikus különbségek meglétére utal (Kruglikov and Rudy, 2008). A GABAerg populáció heterogén és a különféle sejtípusok egymástól eltérő szerootonin receptort fejeznek ki – legalábbis rágcslókban és főemlősökben -, aminek következtében a szerootonin eltérő módon befolyásolja ingerelhetőségüket (Jakab and

Goldman-Rakic, 2000; Foehring et al., 2002; Xiang and Prince, 2003). Patkányban még a parvalbumint kifejező kosársejt populáció is két alpopulációra osztható (Puig et al., 2010), melyek eltérően 1a vagy 2a receptort fejeznek ki és aktivitásukat ennek függvényében a szerotonin ellentétes módon befolyásolja. Mintáinkban azonban a kosársejtek és más GABAerg interneuronok is egyöntetűen depolarizálódtak szerotonin hatására. A szerotoninnak a kosársejtek kimenétre illetve az interneuronok intrinsic tulajdonságaira gyakorolt hatásának részleges különbözősége a korábbi, nem humán fajokon végzett vizsgálatok eredményeitől, egyrészt tulajdonítható az általunk vizsgálat alacsony mintaszámnak, másrészt jelenthetnek faj- vagy régióbeli különbségeket is. Fontos itt megemlíteni, hogy míg az egyedfejlődés során a kérgi interneuronok rágcslókban szinte kizárólag a ventrális előagy területéről erednek, addig a humán interneuronoknak csak 35 %-a ered a ventrális előagy területéről, míg 65 %-uk a dorzális előagyi eredetűek (Letinic et al., 2002), ami jelentős funkcionális különbségeket eredményezhet a rágcslók és az ember között az interneuronok és a kérgi hálózat működésére és felépítésére vonatkozólag.

Bár a szerotonin hatásában nem tett különbséget a piramissejtek felől más piramissejtekre vagy GABAerg sejtekre irányuló glutamáterg szinapszisok között, az egy sejt által kiváltott poliszinaptikus események kialakulásában minden bizonnyal az utóbbi kapcsolatnak van meghatározó szerepe, mivel a piramissejt-piramissejt kapcsolatok túl gyengék ahhoz, hogy azokban az aktivitás átterjedjen az egyik sejtről a másikra. Azonosítottunk két interneuron típust, nevezetesen az axo-axonikus sejteket és kosársejteket, melyekre érkező lokális eredetű serkentő bemenetek a szerotonerg rendszer szabályozása alatt állnak és amelyeknek fontos szerepe van a piramissejtek által kiváltott poliszinaptikus serkentés és gátlás közvetítésében. Eredményeink azt mutatják, hogy a szerotonin általánosan lecsendesíti a kérgi hálózatot, a glutamáterg transzmisszió csökkentésén keresztül. Egy patkány CA1 hippokampális régiójában végzett tanulmány szerint a szerotonin eltérően befolyásolja a piramissejtekre érkező lokális eredetű és más régiókból (pl. CA3-ból, entorhinális kéregből) érkező glutamáterg bemenetek erősségét (Mlinar et al., 2001), ezért potenciálisan érdekes lenne annak vizsgálata, hogy vajon a szerotonin egységesen, vagy eltérő módon hat-e a különféle eredetű kortiko-kortikális, talamo-kortikális és intrakortikális glutamáterg pályák működésére megváltoztatva ezzel az egyes pályák súlyát és egyes sejt típusok érintettségét a kérgi információfeldolgozásban.

A prefrontális kéregnek patkányban fontos szerepe van a félelemreakciók kontrollálásában és a stresszorok feletti kontroll megtartásában. A prefrontális kéreg kölcsönös gátló összeköttetésben áll a dorzális raphe maggal és enyhe, kezelhető stressz

esetén a prefrontális kéreg működése dominál a dorzális raphe működésével szemben (Amat et al., 2005). Erős, vagy krónikus stresszhelyzetekben ez az egyensúly felborul: a raphe működése felszabadul a prefrontális leszállítás alól és a prefrontális kéregben megnövekedett szerotonin koncentráció a prefrontális agyterület aktivitásának csökkenéséhez (Bland et al., 2003) mellyel csökkent kognitív teljesítmény társul (Cerqueira et al., 2007). A tartósan magas szerotonin szintnek és az annak következtében lecsökkent glutamáterg transzmisszióknak köze lehet a tartós stressz alatt megfigyelhető tanulási deficithez, mivel nemrégiben kimutatták, hogy az új, hippocampusz mediálta emléknymok prefrontális kéregbe történő konszolidációja sérül ha a kérgi glutamáterg transzmisszió csökken (Lesburgueres et al., 2011).

Bizonyos esetekben humán páciensekben az akut SSRI kezelés hatására átmeneti idegesség és a negatív érzelmi stimulusok iránti megnövekedett fogékonyság jelentkezik még azelőtt mielőtt az SSRI-ok kifejtették volna anxiolitikus hatásukat (Kent et al., 1998; Burghardt et al., 2004; Harmer, 2008). Továbbá a tartós, vagy intenzív stressz esetén lecsökkent prefrontális aktivitás teret enged a stresszhelyzetekben megfigyelhető ideges viselkedés és félelem reakciók kialakításában szerepet játszó más agyi struktúrák és általuk vezérelt motoros programok érvényre jutásában. Elképzelhető tehát, hogy a fluoxetin és szerotonin általunk megfigyelt hálózatszendesítő hatása a prefrontális kéregben átmenetileg csökkenti ezen terület aktivitását, hozzájárulva a prefrontális régió szabályozó erejének átmeneti csökkenéséhez és az SSRI-ok ezen igen korán jelentkező átmeneti tüneteinek kialakulásához.

Az SSRI-ok akut hatásának jelentősége leginkább a későbbi krónikus kezelés hatására bekövetkező változások kialakulásában lehet (Castren, 2005; Harmer, 2008). Egy újabb keletű elmélet szerint a depresszió hátterében nem elsődlegesen a szerotonerg rendszer működésében aktuálisan fennálló zavar áll, hanem a neuronális hálózatokban jelen levő kommunikációs probléma és az antidepresszánsok valójában ezt a kommunikációs zavart javítják a hálózatban előidézett funkcionális és strukturális változások által (Castren, 2005). A depresszió patofiziológiájában és kialakulásában a neuronális hálózatok plasztikus folyamataiban bekövetkező változások is szerepet játszhatnak. Kísérleteinkben a helyi glutamáterg transzmisszió fluoxetinnel és szerotoninnal történő csökkentése a feed-forward gátlás drasztikus kieséséhez vezetett. Mind a szerotoninnak (Kojic et al., 2000; Zhong et al., 2008) mind pedig a gátlásoldásnak (Letzkus et al., 2011) jelentős szerepe van különféle plasztikus folyamatok szabályozásában. Az egyedfejlődés korai szakaszában erősen plasztikus vizuális kéreg plaszticitása felnőtt korra jelentősen korlátozódik. Felnőtt patkányok krónikus fluoxetin

kezelése azonban képes visszaállítani a vizuális plaszticitást és elősegíteni ambliopiás állatok látási funkcióinak helyreállítását az intrakortikális gátlás csökkentése révén. (Maya Vetencourt et al., 2008). A fluoxetin akut hatása tehát megváltoztathatja a kérgi neuronhálózatok plasztikus tulajdonságait melyek további strukturális és funkcionális változást eredményezhetnek (Castren, 2005). A krónikus SSRI terápia sikerességét a hangulati zavarok kezelésében kapcsolatba hozzák az érzelmi folyamatokban történt korai változások intenzitásával. Az érzelmi feldolgozás korai változásai e szerint hozzájárulnak a későbbi krónikus hangulati és érzelmi változások kifejlődéséhez (Harmer, 2008).

A fokozott szerotonerg transzmisszió a felszabaduló szerotonin mennyiségének növelésén (például stresszben) vagy visszavételének gátlásán keresztül (SSRI kezelés hatására) befolyással bírhat a kérgi sejtegyüttesek szerveződésére és aktivációjára melynek szerepe lehet bizonyos kognitív képességek környezeti faktorok vagy antidepresszánsok okozta akut változásában. Továbbá, a feed-forward gátlás és serkentés csökkenésének hálózati plaszticitást befolyásoló hatása fontos kiindulópontja lehet a kérgi hálózatokban bekövetkező későbbi szerkezetbeli és funkcionális változásoknak melyek tartós antidepresszáns kezelés vagy krónikus stressz hatására alakulhatnak ki.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az emberi agykéreg a legbonyolultabbnak tartott élő struktúra. Az agykéreg legnagyobb részét kitevő neokortexben az idegsejtek alapvetően 6 rétegbe rendeződnek. A neokortex számos, citoarchitektonikailag és funkcionálisan is különböző területre tagolódik, melyeket alapvetően három csoportba osztjuk: érző, motoros és asszociációs agykérgi területekre. Az agykéreg alapvető felépítése, szerveződési elve az emlősök evolúciója során nem változott, azonban az asszociációs területek, különösképpen a prefrontális kéreg relatív súlya a főemlősökben már nagyobb, mint alacsonyabb rendű emlősfajokban, emberben pedig a legnagyobb. A humán és nem humán fajok közötti intelligenciabeli különbségeket leginkább az emberi neokortex, azon belül is főként, a számos kognitív funkcióért felelős prefrontális kéreg fejlettségének, egyediségének tulajdonítjuk. Hebb hipotézise szerint a mentális reprezentációk neuronális szubsztrátjai funkcionálisan kapcsolt idegsejtek alkotta sejtegyüttesek, melyek koordinált aktivitása a kognitív folyamatok alapja. Az agykérget alkotó idegsejtek működéséről, kapcsolatrendszeréről, azonban humánban kevés adat áll rendelkezésünkre. Az agykéregre vonatkozó ez irányú ismereteink túlnyomórészt rágcsálókön, macskán és főemlősökön végzett kísérletekből származnak.

Az agykéregben előforduló idegsejteket alapvetően két csoportba oszthatjuk: piramissejtekre, melyek az általuk felszabadított neurotranszmitter, a glutamát segítségével serkentik az általuk beidegzett posztszinaptikus idegsejteket biztosítva ezzel az információ idegi aktivitás formájában történő terjedését és fennmaradását az agykéregben, valamint a GABAerg interneuronokat, melyek, mint nevük is mutatja, GABA-t szabadítanak fel axonterminálisaikból és posztszinaptikus célsejtjeiket többségében gátolják szabályozva ezzel a piramissejtek működését és az aktivitás terjedését a kéregben. A piramissejtek közötti serkentő kapcsolatok azonban nagyon gyengék. Az általánosan elfogadott elképzelés szerint több tíz piramissejt szinkron aktivációja szükséges ahhoz, hogy közös posztszinaptikus piramissejtjeikben akciós potenciált váltsanak ki és szinkron tüzelő piramissejtek szekvenciális aktivációja szükséges az információ terjedéséhez a kéregben.

Kutatócsoportunk elsőként végzett szimultán elvezetéseket idegsejt párokból humán agykérgi szeletekben. Disszertációm első része az egy sejt által kiváltott szinaptikus és hálózati eseményeket vizsgálja asszociációs kérgi területekről származó humán szeletekben. Szimultán whole cell patch clamp elvezetésekkel kimutattuk, hogy egyetlen II/III. rétegi

piramisajt egyetlen akciós potenciálja is képes nagy megbízhatósággal poliszinaptikus serkentő és/vagy gátló posztzinaptikus potenciálokat tartalmazó eseménysorozatokat kiváltani környező piramisajtekben és interneuronokban. A poliszinaptikus események, az őket kiváltó preszinaptikus akciós potenciál után, akár 40 ms-mal is érkeztek még. Eredményeink azt mutatják, hogy egyetlen piramisajt egyetlen akciós potenciálja akár tízszer hosszabb latenciával is képes szinaptikus események kiváltására humán agykéregben, mint azt más fajok esetében tapasztalták. Csoportunk patkányon végzett korábbi vizsgálataival összehasonlítva a piramisajt által keltett poliszinaptikus és monoszinaptikus események gyakoriságának az aránya humánban két nagyságrenddel gyakoribb volt mint patkányban. Vizsgálataink kimutatták, hogy a piramisajt által kiváltott poliszinaptikus serkentés és gátlás hátterében a GABAerg interneuronokat célzó, szelektíven megerősödött monoszinaptikus serkentés áll, mely esetenként képes a posztzinaptikus interneuronban akciós potenciált kiváltani. Korrelált fény és elektronmikroszkópos vizsgálataink kimutatták, hogy ez az erős serkentés kevés szinapszison keresztül is megvalósulhat. Alacsonyabb rendű emlősökben már korábban leírták, hogy piramisajtek képesek diszinaptikus latenciájú gátlást kiváltani környező idegsejteken, egy köztes GABAerg interneuron aktivációján keresztül. Ezzel összhangban a monoszinaptikus piramisajt-kosársejt kapcsolatok 20%-ában a piramisajt képes volt a posztzinaptikus kosársejtben akciós potenciált kiváltani. A piramisajtek periszomatikus régióját innerváló kosársejtek így hatékony forrásai lehetnek a diszinaptikus gátlásnak. A kosársejtek mellett piramisajtek a piramisajt-axo-axonikus párok 33%-ában is képesek voltak posztzinaptikus akciós potenciált kiváltani. Míg a kosársejtek hiperpolarizálják posztzinaptikus célsejtjeiket, addig az axo-axonikus sejtek képesek depolarizálni a posztzinaptikus piramisajteket esetenként akciós potenciált kiváltani bennük, mivel az axon-iniciális szegmentum területén a GABA fordulási potenciálja a szomatikusnál számottevően depolarizáltabb értéket vehet fel. Mintáinkban elvezetett axo-axonikus sejtek egyetlen akciós potenciálja képes volt diszinaptikus EPSP-t valamint triszinaptikus IPSP-t kiváltani szimultán elvezetett idegsejteken, ezáltal valószínűsíthető forrásai lehetnek a piramisajtek által kiváltott poliszinaptikus EPSP-knek és IPSP-knek.

Vizsgálataink azt mutatják, hogy az aktivitás sztereotíp módon terjed a humán kérgi hálózatban. A piramisajtben kiváltott elsőrendű akciós potenciál kizárólag GABAerg interneuronokban vált ki másodrendű akciós potenciált. Az aktivitás továbbterjedése az axo-axonikus sejtek által biztosított, így harmadrendű akciós potenciál csak piramisajtekben keletkezik, mivel az axo-axonikus sejtek kizárólag piramisajteket innerválnak. Az aktivitás további terjedése már megvalósítható szinkron tüzelő piramisajtek segítségével is, mivel az

axo-axonikus sejt képes lehet hatékonyan szinkronizálni posztzinaptikus piramissejtjeinek aktivitását. Ez a hálózati mechanizmus és a szelektíven megerősödött kapcsolatok jelenléte a humán agykéregben alapjául szolgálhat az egymással versengő sejtegyüttesek gyors és időleges formációjának valamint szegregációjának, amiket a magasabb rendű kognitív folyamatok neurális szubsztrátjainak feltételeznek.

Disszertációm második felében megvizsgáltuk, hogyan képes befolyásolni az endogén neuromodulátor szerotonin és egy antidepresszánsként használt szelektív szerotonin visszavétel gátló (SSRI), a fluoxetin, a piramissejt által kiváltott poliszinaptikus hálózati eseményeket humán prefrontális kéregben. A depresszió szerotonerg hipotézise szerint a depresszió okozta hangulati és kognitív zavarok hátterében a szerotonerg rendszer alulműködése illetve a lecsökkent agyi szerotonin szint áll. Az SSRI-ok így a fluoxetin is, a szerotonin extracelluláris térből a sejtekbe történő visszavételének a gátlásán keresztül növeli az extracelluláris szerotonin koncentrációt. Az SSRI-ok terápiás alkalmazása ma is jelentős és számos vizsgálat számol be az SSRI-ok hangulatot és csökkent kognitív képességeket javító hatásáról valamint kognitív képességek agyi szerotoninszint csökkentése által előidézett romlásáról.

Kísérleteinkben, fiziológiás koncentrációjú szerotonin és terápiás koncentrációjú fluoxetin hatékonyan lecsökkentette a piramissejt által kiváltott poliszinaptikus események gyakoriságát. A szerotonin hálózati hatásmechanizmusának részletes vizsgálata kimutatta, hogy a szerotonin a glutamáterg transzmisszió amplitúdóját csökkentve, szabályozza le a piramissejt felől kiváltható interneuron aktivációt viszont se az IPSP-k amplitúdóját nem befolyásolja a kosársejt-piramissejt kapcsolatokban, se pedig az axo-axonikus sejt által kiváltott diszinaptikus EPSP-k gyakoriságát nem csökkenti jelentősebb mértékben. Fluoxetin szintén lecsökkentette a monoszinaptikus EPSP-k amplitúdóját a piramissejt-interneuron kapcsolatokban. A serkentő monoszinaptikus kapcsolatok számos további paraméterének (páros pulzus arány, transzmissziós hiba gyakorisága és az EPSP amplitúdó variációs koefficiense) vizsgálata azt mutatta, hogy a szerotonin feltehetően a preszinaptikus sejten keresztül fejti ki hatását. A prefrontális kéregben előforduló leggyakoribb szerotonin receptorok az 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, és 5-HT₃-as receptorok. Az 5-HT_{1A} receptoraktiváció K⁺-csatorna nyitásával hiperpolarizálja az idegsejteket patkányban. Patkány entorhinális kérgében végzett vizsgálatokkal összhangban farmakológiai vizsgálataink kimutatták, hogy az 5-HT_{1A} agonista 8-OH-DPAT, a szerotoninhoz hasonló módon, a glutamáterg transzmisszió preszinaptikus leszabályozásán keresztül csökkentette a poliszinaptikus események gyakoriságát. Mindamellet, a hagyományosan depolarizálónak tekintett 5-HT_{2A} receptor

aktiváció is minden tekintetben utánozta a szerotonin hatását. Habár az 5-HT_{2A} receptoron keresztüli gátlás mechanizmusa nem tisztázott, eredményeinkkel összhangban patkány kisagyban a glutamát felszabadulás gátolható mind 5-HT_{1A} mind 5-HT₂-es receptor aktivációval.

Bár a fluoxetin és más SSRI-ok terápiás hatásukat csak krónikus szedés mellett fejtik ki, akut hatásaik is ismertek. Mindamellet a szerotonin koncentráció krónikus stressz vagy nem kontrollálható stresszor esetén tartósan megemelkedik patkányok prefrontális kéregben gátolva annak működését és a kognitív kontrollt az állat viselkedése felett. A prefrontális kéreg csökkent glutamáterg transzmissziója tanulási deficithez vezethet, ami megfigyelhető krónikus stressz esetén. Kísérleteink ugyan nem adnak magyarázatot az SSRI-ok krónikus szedésével elérhető kognitív teljesítményjavulás mechanizmusára, de akut hatásmechanizmusuk fontos kiindulópontja lehet későbbi krónikus hatásuknak. Mind a fluoxetin, mind a szerotonin befolyásolják a neuronális hálózatok plasztikus folyamatait. A kérgi szerotoninszint változása ezért kognitív funkciókban szerepet játszó kérgi sejtegyütteseknek nem csak pillanatnyi aktivációjára lehet hatással, hanem hosszabb időskálán azok strukturális szerveződésére is, mely alapja lehet az SSRI-ok krónikus hatásának.

7. SUMMARY

The human cerebral cortex is considered to be the most elaborated living structure. Its most recent part in an evolutionary sense is the neocortex in which neurons are basically organized into six layers. Although one can discriminate multiple anatomically and functionally different areas of the neocortex, these areas can be grouped into three major cytoarchitectural divisions corresponding to sensory, motor and association areas. The prefrontal cortex a prominent part of the neocortex is considered to be essential in several higher order cognitive functions. The basic organization of the neocortex is common among rodents, carnivores and primates however the relative ratio of the prefrontal cortex tends to extent as we move from rodents toward primates and especially in human it is the biggest among primates. According to the Hebbian hypothesis a discrete, strongly interconnected group of active neurons, called the cell assembly, represents a distinct cognitive entity and serve as the neural basis of cognitive processes. However most of our knowledge about neuronal functions and interactions are derived from experiments carried out in rodents, carnivores and non-human primates. In the human cortical circuits, only single neurons were characterized, interactions between neurons were not studied.

The neocortex is built up basically by two types of neurons. The most abundant ones are the pyramidal cells which use glutamate as neurotransmitter and behave as excitatory neurons. Their sequential and coordinated activity is considered to be essential for the flow of information throughout the cortex. The other type is the group of GABAergic interneurons which release GABA from their axons and with a few exceptions exert inhibition on their postsynaptic targets therefore regulate the activity of pyramidal neurons. Excitatory connections among pyramidal neurons are very weak and it is considered that tens of simultaneously active, convergent pyramidal cells are required to excite their postsynaptic pyramidal neurons and sequential activation of synchronously active pyramidal neurons are required for effective signal propagation in the cortex.

Our group recorded the first dataset on the synaptic effect of identified human pyramidal cells on various types of postsynaptic neurons. The first part of my thesis is focusing on these pyramidal cell triggered synaptic events. Using whole cell patch clamp recording single action potential was elicited in layer II/III pyramidal neurons and their postsynaptic effects were monitored in simultaneously recorded neurons in acute human

prefrontal slices. In addition to monosynaptic postsynaptic potentials, individual action potentials in presynaptic pyramidal cells initiated long-lasting (37 ± 17 ms) sequences of events in the network lasting an order of magnitude longer than detected previously in other species. These event series were composed of specifically alternating glutamatergic and GABAergic postsynaptic potentials. Moreover, to compare the incidence of polysynaptic versus monosynaptic events in human and rat we searched for our library of recordings performed in the somatosensory and prefrontal cortex of the rat and we found that the ratio of the occurrence of single pyramidal cell triggered polysynaptic and monosynaptic events are greater by two orders of magnitude in human than in rat.

Single pyramidal cell triggered polysynaptic events required selective spike-to-spike coupling from pyramidal cells to GABAergic interneurons producing concomitant inhibitory as well as excitatory feed-forward action of GABA. Correlated light- and electron microscopy revealed that strong synaptic coupling between pyramidal cells and interneurons are not due to the elevated number of synapses and can be achieved by few synaptic contacts. Pyramidal cells were shown to elicit disynaptic IPSPs by single spikes in rodents through the activation of an inhibitory interneuron. Basket cells innervate the perisomatic region of pyramidal neurons providing fast and powerful inhibition. We also found direct spike-to-spike coupling in 20% of the pyramidal-basket cell connections. Thus basket cells are a plausible candidate mediating disynaptic inhibition of pyramidal neurons. Postsynaptic action potential was also elicited in 33% of monosynaptically coupled pyramidal-axo-axonic cell pairs. While basket cells hyperpolarize their postsynaptic pyramidal cells, axo-axonic cells were shown to be able to depolarize their postsynaptic neurons, which are exclusively pyramidal cells, due to a more positive chloride reversal potential in the axonal than in the somatic compartment. In our samples single spikes of human axo-axonic cells elicited disynaptic EPSPs and trisynaptic IPSP thus recruitment of axo-axonic cell by single spike of a pyramidal neurons is a feasible mechanism that mediate pyramidal cell triggered polysynaptic excitation and inhibition.

Our results show that activity flows in the human microcircuit in a stereotyped way. First-order spike elicited in a pyramidal neuron triggers second-order spikes exclusively in GABAergic neurons. Activation of axo-axonic cell are required to elicit third-order spikes which occur exclusively in pyramidal neurons since these cells are the sole target of axo-axonic neurons. Since axo-axonic cells innervate multiple pyramidal cells they could recruit the firing of several postsynaptic pyramidal cells in synchrony, and thus they can contribute to pyramid–pyramid spike-to-spike coupling. This network mechanism in concordance with the selectively strengthened synaptic connections in the human cortex could underlie the

formation and segregation of cell assemblies proposed to be the building block of higher order brain functions such as cognition.

In the second part of my thesis we investigated whether the endogen neuromodulator serotonin and a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), the antidepressant fluoxetine influence single cell initiated polysynaptic postsynaptic potentials in slices of the human prefrontal cortex. The monoaminergic hypothesis of depression emphasizes that the imbalance in the function of the serotonergic system is the cause of dysfunctions in mood and in cognitive capabilities observed in depressive patients, which could be reinstated by SSRIs by elevating serotonin levels. Fluoxetine, like other SSRIs inhibit the reuptake of serotonin from the extracellular space thus increase its extracellular concentration by blocking the serotonin transporter molecules. SSRIs are widely used as therapeutic agents and can exert beneficial effects on cognitive functions. On the other hand decrease in brain serotonin concentration are often accompanied with lowered cognitive performances.

In our experiments physiological concentrations of serotonin and therapeutic concentrations of fluoxetine effectively reduced the occurrence of single cell initiated polysynaptic postsynaptic potentials in slices of the human prefrontal cortex. Analysis of monosynaptic connections revealed that serotonin decrease the amplitude of excitatory transmission from pyramidal cells to its postsynaptic targets suppressing the recruitment of postsynaptic inhibitory interneurons. Additionally, we found that serotonin didn't influence inhibitory transmission from basket cells to pyramidal cells and excitatory transmission from axo-axonic cell to pyramidal cells, since axo-axonic cell triggered disynaptic EPSPs still occurred with high extracellular concentrations of serotonin. Finally, fluoxetine also decreased the amplitude of monosynaptic EPSPs.

Detailed analysis of monosynaptic excitatory connections revealed changes in failure rate of synaptic transmission, in paired pulse ratio and in the coefficient of variation of EPSP amplitude, suggesting a presynaptic effect of serotonin. The most abundant serotonin receptors in the prefrontal cortex are the 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors. Activation of 5-HT_{1A} receptors hyperpolarize neurons through opening of K⁺-channels. In agreement with previous studies achieved by extracellular stimulation in the rat entorhinal cortex, the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT fully mimicked the effect of 5-HT. 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors are considered to have opposite effects on the excitability of postsynaptic neurons. However in our experiments the 5-HT_{2A} agonist alpha-methyl-serotonin also fully mimicked the effect of 5-HT. Suppression of glutamate release with 5-HT mediated by both of these two receptor types

was shown in the cerebellum however the mechanism mediates the 5-HT_{2A} evoked suppression of glutamate release is not understood.

Fluoxetine, as other SSRIs, exerts their antidepressant action only after several weeks of treatment. However temporary increase in anxiety and threat processing was observed in some patients early in acute SSRI treatment before anxiolytic actions were seen. During chronic stress or in response to an uncontrollable stressor extracellular serotonin level in the prefrontal cortex increase suppressing its activity and the ability of the animal to come over the stressor. Decrease in prefrontal glutamatergic transmission may also lead to learning deficits as may occur in severe stress.

Our results don't provide explanation for the mechanism by which chronic SSRIs treatment may improve cognitive functions, however, their early acute effects could also be important in the development of their subsequent chronic effects. Both fluoxetine and serotonin influence plasticity of neuronal networks. Thus changes in prefrontal serotonin level may alter not just the temporal recruitment of cell assemblies but also their plastic structural organization on a longer timescale which could serve as a basis for the chronic effects of the SSRIs.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt, szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Tamás Gábornak, hogy lehetőséget és helyet biztosított számomra kutatócsoportjában ahol magas színvonalú, kritikai szemléletű képzésben részesülhettem az elmúlt évek során.

Köszönettel tartozom munkatársaimnak, akik részt vettek disszertációm alapjául szolgáló elektrofiziológiai kísérletekben: Dr. Oláh Szabolcsnak, Dr. Molnár Gábornak, Dr. Szabadics Jánosnak, Dr. Füle Miklósnak, Rózsa Mártonnak, a hisztológiai munkákért pedig Tóth Évának. Köszönet nekik és a labor többi mostani és egykori tagjának, Boldog Eszternek, Dr. Báldi Ritának, Dr. Kocsis Ágnes Katalinnak, Lovas Sándornak, Piszár Ildikónak, Szemenyei Viktornak, Averkin Róbertnek, Baka Juditnak és Dr. Simon Annának a baráti légkörért, amit kialakítottak a laborban.

Hálás vagyok továbbá Dr. Toldi József Tanszékvezető Úrnak, Váradi Margónak és az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék valamennyi munkatársának, a támogatásukért és a barátságos légkörért.

Mély hálával tartozom Szüleimnek, Testvéreimnek és Családjaiknak, Piroskának és Gábornak a szeretetükért és támogatásukért.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Abeles M. Corticonics: neural circuits of the cerebral cortex. Cambridge: Cambridge University Press; 1991. p.
- Aghajanian G. K. and Marek G. J. Serotonin induces excitatory postsynaptic potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal cells. *Neuropharmacology* 1997; 36: 589-99.
- Amargos-Bosch M., Bortolozzi A., Puig M. V., Serrats J., Adell A., Celada P., et al. Co-expression and in vivo interaction of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 2004; 14: 281-99.
- Amat J., Baratta M. V., Paul E., Bland S. T., Watkins L. R. and Maier S. F. Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat Neurosci* 2005; 8: 365-71.
- Andersen P., Eccles J. C. and Loynning Y. Recurrent inhibition in the hippocampus with identification of the inhibitory cell and its synapses. *Nature* 1963; 198: 540-2.
- Andrade R. Serotonergic regulation of neuronal excitability in the prefrontal cortex. *Neuropharmacology* 2011; 61: 382-6.
- Andrade R. and Nicoll R. A. Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurones of the rat hippocampus recorded in vitro. *J Physiol* 1987; 394: 99-124.
- Andrade R., Malenka R. C. and Nicoll R. A. A G protein couples serotonin and GABAB receptors to the same channels in hippocampus. *Science* 1986; 234: 1261-5.
- Araneda R. and Andrade R. 5-Hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine _{1A} receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience* 1991; 40: 399-412.
- Azmitia E. C. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res Bull* 2001; 56: 413-24.
- Barnes N. M. and Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 1999; 38: 1083-152.
- Bell C., Abrams J. and Nutt D. Tryptophan depletion and its implications for psychiatry. *Br J Psychiatry* 2001; 178: 399-405.
- Best A. R. and Regehr W. G. Serotonin evokes endocannabinoid release and retrogradely suppresses excitatory synapses. *J Neurosci* 2008; 28: 6508-15.
- Binzegger T., Douglas R. J. and Martin K. A. A quantitative map of the circuit of cat primary visual cortex. *J Neurosci* 2004; 24: 8441-53.
- Bland S. T., Hargrave D., Pepin J. L., Amat J., Watkins L. R. and Maier S. F. Stressor controllability modulates stress-induced dopamine and serotonin efflux and morphine-induced serotonin efflux in the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28: 1589-96.
- Bolo N. R., Hode Y., Nedelec J. F., Laine E., Wagner G. and Macher J. P. Brain pharmacokinetics and tissue distribution in vivo of fluvoxamine and fluoxetine by fluorine magnetic resonance spectroscopy. *Neuropsychopharmacology* 2000; 23: 428-38.
- Braitenberg V. and Schuz A. Anatomy of the cortex: Statistics and geometry. Berlin: Springer; 1991. p.
- Brecht M., Schneider M., Sakmann B. and Margrie T. W. Whisker movements evoked by stimulation of single pyramidal cells in rat motor cortex. *Nature* 2004; 427: 704-10.

- Brigman J. L., Mathur P., Harvey-White J., Izquierdo A., Saksida L. M., Bussey T. J., et al. Pharmacological or genetic inactivation of the serotonin transporter improves reversal learning in mice. *Cereb Cortex* 2010; 20: 1955-63.
- Brodie B. B. and Shore P. A. A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. *Ann N Y Acad Sci* 1957; 66: 631-42.
- Brodie B. B., Pletscher A. and Shore P. A. Evidence that serotonin has a role in brain function. *Science* 1955; 122: 968.
- Brodmann K. Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. Leipzig: J. A. Barth. 1909;
- Buhl E. H., Halasy K. and Somogyi P. Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* 1994; 368: 823-828.
- Buhl E. H., Halasy K. and Somogyi P. Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* 1994; 368: 823-8.
- Buhl E. H., Han Z. S., Lorinczi Z., Stezhka V. V., Karnup S. V. and Somogyi P. Physiological properties of anatomically identified axo-axonic cells in the rat hippocampus. *J Neurophysiol* 1994; 71: 1289-307.
- Buhl E. H., Tamas G., Szilagy T., Stricker C., Paulsen O. and Somogyi P. Effect, number and location of synapses made by single pyramidal cells onto aspiny interneurons of cat visual cortex. *J Physiol* 1997; 500 (Pt 3): 689-713.
- Bunin M. A. and Wightman R. M. Quantitative evaluation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) neuronal release and uptake: an investigation of extrasynaptic transmission. *J Neurosci* 1998; 18: 4854-60.
- Bunin M. A. and Wightman R. M. Paracrine neurotransmission in the CNS: involvement of 5-HT. *Trends Neurosci* 1999; 22: 377-82.
- Burghardt N. S., Sullivan G. M., McEwen B. S., Gorman J. M. and LeDoux J. E. The selective serotonin reuptake inhibitor citalopram increases fear after acute treatment but reduces fear with chronic treatment: a comparison with tianeptine. *Biol Psychiatry* 2004; 55: 1171-8.
- Buzsaki G. Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. *Prog Neurobiol* 1984; 22: 131-53.
- Buzsaki G. Neural syntax: cell assemblies, synapse ensembles, and readers. *Neuron* 2010; 68: 362-85.
- Canli T., Omura K., Haas B. W., Fallgatter A., Constable R. T. and Lesch K. P. Beyond affect: a role for genetic variation of the serotonin transporter in neural activation during a cognitive attention task. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 12224-9.
- Cardin J. A., Carlen M., Meletis K., Knoblich U., Zhang F., Deisseroth K., et al. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 2009; 459: 663-7.
- Carlsson A., Fuxe K. and Ungerstedt U. The effect of imipramine on central 5-hydroxytryptamine neurons. *J Pharm Pharmacol* 1968; 20: 150-1.
- Carpenter L. L., Anderson G. M., Pelton G. H., Gudim J. A., Kirwin P. D., Price L. H., et al. Tryptophan depletion during continuous CSF sampling in healthy human subjects. *Neuropsychopharmacology* 1998; 19: 26-35.
- Caspi A., Sugden K., Moffitt T. E., Taylor A., Craig I. W., Harrington H., et al. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 2003; 301: 386-9.

- Castaneda A. E., Tuulio-Henriksson A., Marttunen M., Suvisaari J. and Lonnqvist J. A review on cognitive impairments in depressive and anxiety disorders with a focus on young adults. *J Affect Disord* 2008; 106: 1-27.
- Castren E. Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 241-6.
- Cauli B., Porter J. T., Tsuzuki K., Lambollez B., Rossier J., Quenet B., et al. Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 6144-9.
- Cerqueira J. J., Mailliet F., Almeida O. F., Jay T. M. and Sousa N. The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *J Neurosci* 2007; 27: 2781-7.
- Ciranna L. Serotonin as a modulator of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission: implications in physiological functions and in pathology. *Curr Neuropharmacol* 2006; 4: 101-14.
- Clarke H. F., Dalley J. W., Crofts H. S., Robbins T. W. and Roberts A. C. Cognitive inflexibility after prefrontal serotonin depletion. *Science* 2004; 304: 878-80.
- Cobb S. R., Buhl E. H., Halasy K., Paulsen O. and Somogyi P. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 1995; 378: 75-8.
- Colbert C. M. and Johnston D. Axonal action-potential initiation and Na⁺ channel densities in the soma and axon initial segment of subicular pyramidal neurons. *J Neurosci* 1996; 16: 6676-86.
- Cools R., Roberts A. C. and Robbins T. W. Serotonergic regulation of emotional and behavioural control processes. *Trends Cogn Sci* 2008; 12: 31-40.
- Cossart R., Aronov D. and Yuste R. Attractor dynamics of network UP states in the neocortex. *Nature* 2003; 423: 283-8.
- Cragg B. G. The density of synapses and neurones in the motor and visual areas of the cerebral cortex. *J Anat* 1967; 101: 639-54.
- Dahlstroem A. and Fuxe K. Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons. *Acta Physiol Scand Suppl* 1964; SUPPL 232:1-55.
- Daubert E. A. and Condron B. G. Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry. *Trends Neurosci* 2010; 33: 424-34.
- de Almeida J. and Mengod G. Quantitative analysis of glutamatergic and GABAergic neurons expressing 5-HT(2A) receptors in human and monkey prefrontal cortex. *J Neurochem* 2007; 103: 475-86.
- de Almeida J. and Mengod G. Serotonin 1A receptors in human and monkey prefrontal cortex are mainly expressed in pyramidal neurons and in a GABAergic interneuron subpopulation: implications for schizophrenia and its treatment. *J Neurochem* 2008; 107: 488-96.
- De Vivo M. and Maayani S. Characterization of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in guinea pig and rat hippocampal membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 238: 248-53.
- DeFelipe J. Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cereb Cortex* 1993; 3: 273-89.
- DeFelipe J. The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity. *Front Neuroanat* 2011; 5: 29.
- DeFelipe J., Alonso-Nanclares L. and Arellano J. I. Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *J Neurocytol* 2002; 31: 299-316.

- DeFelipe J., Arellano J. I., Gomez A., Azmitia E. C. and Munoz A. Pyramidal cell axons show a local specialization for GABA and 5-HT inputs in monkey and human cerebral cortex. *J Comp Neurol* 2001; 433: 148-55.
- Delgado P. L., Price L. H., Miller H. L., Salomon R. M., Licinio J., Krystal J. H., et al. Rapid serotonin depletion as a provocative challenge test for patients with major depression: relevance to antidepressant action and the neurobiology of depression. *Psychopharmacol Bull* 1991; 27: 321-30.
- Descarries L., Beaudet A. and Watkins K. C. Serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res* 1975; 100: 563-88.
- Deuchars J. and Thomson A. M. Innervation of burst firing spiny interneurons by pyramidal cells in deep layers of rat somatomotor cortex: paired intracellular recordings with biocytin filling. *Neuroscience* 1995; 69: 739-55.
- Diesmann M., Gewaltig M. O. and Aertsen A. Stable propagation of synchronous spiking in cortical neural networks. *Nature* 1999; 402: 529-33.
- Douglas R. J. and Martin K. A. Neuronal circuits of the neocortex. *Annu Rev Neurosci* 2004; 27: 419-51.
- Douglas R. J. and Martin K. A. Recurrent neuronal circuits in the neocortex. *Curr Biol* 2007; 17: R496-500.
- Douglas R. J. and Martin K. A. Mapping the matrix: the ways of neocortex. *Neuron* 2007; 56: 226-38.
- Dumuis A., Bouhelal R., Sebben M. and Bockaert J. A 5-HT receptor in the central nervous system, positively coupled with adenylate cyclase, is antagonized by ICS 205 930. *Eur J Pharmacol* 1988; 146: 187-8.
- Elston G. N. Cortex, cognition and the cell: new insights into the pyramidal neuron and prefrontal function. *Cereb Cortex* 2003; 13: 1124-38.
- Fargin A., Yamamoto K., Cotecchia S., Goldsmith P. K., Spiegel A. M., Lapetina E. G., et al. Dual coupling of the cloned 5-HT_{1A} receptor to both adenylyl cyclase and phospholipase C is mediated via the same Gi protein. *Cell Signal* 1991; 3: 547-57.
- Fitzsimonds R. M., Song H. J. and Poo M. M. Propagation of activity-dependent synaptic depression in simple neural networks. *Nature* 1997; 388: 439-48.
- Foehring R. C., van Brederode J. F., Kinney G. A. and Spain W. J. Serotonergic modulation of supragranular neurons in rat sensorimotor cortex. *J Neurosci* 2002; 22: 8238-50.
- Freund T. F. and Buzsaki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 1996; 6: 347-470.
- Freund T. F. and Katona I. Perisomatic inhibition. *Neuron* 2007; 56: 33-42.
- Fricker D. and Miles R. EPSP amplification and the precision of spike timing in hippocampal neurons. *Neuron* 2000; 28: 559-69.
- Fuller R. W. Uptake inhibitors increase extracellular serotonin concentration measured by brain microdialysis. *Life Sci* 1994; 55: 163-7.
- Galarreta M. and Hestrin S. A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* 1999; 402: 72-5.
- Galarreta M. and Hestrin S. Spike transmission and synchrony detection in networks of GABAergic interneurons. *Science* 2001; 292: 2295-9.
- Gentet L. J., Kremer Y., Taniguchi H., Huang Z. J., Staiger J. F. and Petersen C. C. Unique functional properties of somatostatin-expressing GABAergic neurons in mouse barrel cortex. *Nat Neurosci* 2012; 15: 607-12.
- Gibson J. R., Beierlein M. and Connors B. W. Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature* 1999; 402: 75-9.
- Gobert A., Rivet J. M., Audinot V., Newman-Tancredi A., Cistarelli L. and Millan M. J. Simultaneous quantification of serotonin, dopamine and noradrenaline levels in single

- frontal cortex dialysates of freely-moving rats reveals a complex pattern of reciprocal auto- and heteroreceptor-mediated control of release. *Neuroscience* 1998; 84: 413-29.
- Halasy K., Buhl E. H., Lorinczi Z., Tamas G. and Somogyi P. Synaptic target selectivity and input of GABAergic basket and bistratified interneurons in the CA1 area of the rat hippocampus. *Hippocampus* 1996; 6: 306-29.
- Harmer C. J. Serotonin and emotional processing: does it help explain antidepressant drug action? *Neuropharmacology* 2008; 55: 1023-8.
- Harmer C. J., Bhagwagar Z., Perrett D. I., Vollm B. A., Cowen P. J. and Goodwin G. M. Acute SSRI administration affects the processing of social cues in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28: 148-52.
- Harris K. D. Neural signatures of cell assembly organization. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 399-407.
- Hasuo H., Matsuoka T. and Akasu T. Activation of presynaptic 5-hydroxytryptamine 2A receptors facilitates excitatory synaptic transmission via protein kinase C in the dorsolateral septal nucleus. *J Neurosci* 2002; 22: 7509-17.
- Hebb D. O. The organization of behavior. New York: Wiley & Sons; 1949. p.
- Helmstaedter M., Staiger J. F., Sakmann B. and Feldmeyer D. Efficient recruitment of layer 2/3 interneurons by layer 4 input in single columns of rat somatosensory cortex. *J Neurosci* 2008; 28: 8273-84.
- Herculano-Houzel S. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci* 2009; 3: 31.
- Hiemke C. and Hartter S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Ther* 2000; 85: 11-28.
- Hornung J. P. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat* 2003; 26: 331-43.
- Houweling A. R. and Brecht M. Behavioural report of single neuron stimulation in somatosensory cortex. *Nature* 2008; 451: 65-8.
- Howard A., Tamas G. and Soltesz I. Lighting the chandelier: new vistas for axo-axonic cells. *Trends Neurosci* 2005; 28: 310-6.
- Hoyer D., Hannon J. P. and Martin G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 71: 533-54.
- Hoyer D., Pazos A., Probst A. and Palacios J. M. Serotonin receptors in the human brain. I. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT_{1A} recognition sites. Apparent absence of 5-HT_{1B} recognition sites. *Brain Res* 1986; 376: 85-96.
- Hoyer D., Pazos A., Probst A. and Palacios J. M. Serotonin receptors in the human brain. II. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT_{1C} and 5-HT₂ recognition sites. *Brain Res* 1986; 376: 97-107.
- Hoyer D., Clarke D. E., Fozard J. R., Hartig P. R., Martin G. R., Mylecharane E. J., et al. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 1994; 46: 157-203.
- Ikegaya Y., Aaron G., Cossart R., Aronov D., Lampl I., Ferster D., et al. Synfire chains and cortical songs: temporal modules of cortical activity. *Science* 2004; 304: 559-64.
- Jakab R. L. and Goldman-Rakic P. S. Segregation of serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptors in inhibitory circuits of the primate cerebral cortex. *J Comp Neurol* 2000; 417: 337-48.
- Joh T. H., Shikimi T., Pickel V. M. and Reis D. J. Brain tryptophan hydroxylase: purification of, production of antibodies to, and cellular and ultrastructural localization in serotonergic neurons of rat midbrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 3575-9.
- Jones B. J. and Blackburn T. P. The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 71: 555-68.

- Kawaguchi Y. Groupings of nonpyramidal and pyramidal cells with specific physiological and morphological characteristics in rat frontal cortex. *J Neurophysiol* 1993; 69: 416-31.
- Kawaguchi Y. and Kubota Y. Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J Neurophysiol* 1993; 70: 387-96.
- Kawaguchi Y. and Kubota Y. Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. *J Neurosci* 1996; 16: 2701-15.
- Kawaguchi Y. and Kubota Y. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 1997; 7: 476-86.
- Kent J. M., Coplan J. D. and Gorman J. M. Clinical utility of the selective serotonin reuptake inhibitors in the spectrum of anxiety. *Biol Psychiatry* 1998; 44: 812-24.
- Khirug S., Yamada J., Afzalov R., Voipio J., Khiroug L. and Kaila K. GABAergic depolarization of the axon initial segment in cortical principal neurons is caused by the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1. *J Neurosci* 2008; 28: 4635-9.
- Kirkwood A. Serotonergic control of developmental plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 1951-2.
- Kisvarday Z. F., Beaulieu C. and Eysel U. T. Network of GABAergic large basket cells in cat visual cortex (area 18): implication for lateral disinhibition. *J Comp Neurol* 1993; 327: 398-415.
- Klausberger T., Magill P. J., Marton L. F., Roberts J. D., Cobden P. M., Buzsaki G., et al. Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* 2003; 421: 844-8.
- Kobayashi K., Ikeda Y., Haneda E. and Suzuki H. Chronic fluoxetine bidirectionally modulates potentiating effects of serotonin on the hippocampal mossy fiber synaptic transmission. *J Neurosci* 2008; 28: 6272-80.
- Kojic L., Dyck R. H., Gu Q., Douglas R. M., Matsubara J. and Cynader M. S. Columnar distribution of serotonin-dependent plasticity within kitten striate cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 1841-4.
- Kruglikov I. and Rudy B. Perisomatic GABA release and thalamocortical integration onto neocortical excitatory cells are regulated by neuromodulators. *Neuron* 2008; 58: 911-24.
- Kuhn R. The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). *Am J Psychiatry* 1958; 115: 459-64.
- Lambe E. K., Fillman S. G., Webster M. J. and Shannon Weickert C. Serotonin receptor expression in human prefrontal cortex: balancing excitation and inhibition across postnatal development. *PLoS One* 2011; 6: e22799.
- Lamsa K. P., Heeroma J. H., Somogyi P., Rusakov D. A. and Kullmann D. M. Anti-Hebbian long-term potentiation in the hippocampal feedback inhibitory circuit. *Science* 2007; 315: 1262-6.
- Lesburgueres E., Gobbo O. L., Alaux-Cantin S., Hambucken A., Trifilieff P. and Bontempi B. Early tagging of cortical networks is required for the formation of enduring associative memory. *Science* 2011; 331: 924-8.
- Lesch K. P., Bengel D., Heils A., Sabol S. Z., Greenberg B. D., Petri S., et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 1996; 274: 1527-31.
- Letinic K., Zoncu R. and Rakic P. Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* 2002; 417: 645-9.

- Letzkus J. J., Wolff S. B., Meyer E. M., Tovote P., Courtin J., Herry C., et al. A disinhibitory microcircuit for associative fear learning in the auditory cortex. *Nature* 2011; 480: 331-5.
- Levitt P. and Rakic P. The time of genesis, embryonic origin and differentiation of the brain stem monoamine neurons in the rhesus monkey. *Brain Res* 1982; 256: 35-57.
- Levkovitz Y., Caftori R., Avital A. and Richter-Levin G. The SSRIs drug Fluoxetine, but not the noradrenergic tricyclic drug Desipramine, improves memory performance during acute major depression. *Brain Res Bull* 2002; 58: 345-50.
- Lewis D. A. and Moghaddam B. Cognitive dysfunction in schizophrenia: convergence of gamma-aminobutyric acid and glutamate alterations. *Arch Neurol* 2006; 63: 1372-6.
- London M., Schreiber A., Hausser M., Larkum M. E. and Segev I. The information efficacy of a synapse. *Nat Neurosci* 2002; 5: 332-40.
- Lorente de No R. Analysis of the activity of the chains of internuncial neurons. *J Neurophysiol* 1938; 1: 207-244.
- Lubke J. and Feldmeyer D. Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column: focus on barrel cortex. *Brain Struct Funct* 2007; 212: 3-17.
- Lucki I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* 1998; 44: 151-62.
- Luczak A., Bartho P., Marguet S. L., Buzsaki G. and Harris K. D. Sequential structure of neocortical spontaneous activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 347-52.
- MacLean J. N., Watson B. O., Aaron G. B. and Yuste R. Internal dynamics determine the cortical response to thalamic stimulation. *Neuron* 2005; 48: 811-23.
- Maes M. M., H.Y. The serotonergic hypothesis of depression. In: Bloom F. E. and Kupfer D. J. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. New York: Raven; 1995. p.921-932
- Maier S. F. and Watkins L. R. Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci Biobehav Rev* 2005; 29: 829-41.
- Malagie I., Trillat A. C., Jacquot C. and Gardier A. M. Effects of acute fluoxetine on extracellular serotonin levels in the raphe: an in vivo microdialysis study. *Eur J Pharmacol* 1995; 286: 213-7.
- Manji H. K., Drevets W. C. and Charney D. S. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med* 2001; 7: 541-7.
- Mao B. Q., Hamzei-Sichani F., Aronov D., Froemke R. C. and Yuste R. Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices. *Neuron* 2001; 32: 883-98.
- Marek G. J. and Aghajanian G. K. Excitation of interneurons in piriform cortex by 5-hydroxytryptamine: blockade by MDL 100,907, a highly selective 5-HT_{2A} receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 1994; 259: 137-41.
- Markram H., Toledo-Rodriguez M., Wang Y., Gupta A., Silberberg G. and Wu C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 793-807.
- Maura G., Roccatagliata E., Ulivi M. and Raiteri M. Serotonin-glutamate interaction in rat cerebellum: involvement of 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors. *Eur J Pharmacol* 1988; 145: 31-8.
- Maya Vetencourt J. F., Sale A., Viegi A., Baroncelli L., De Pasquale R., O'Leary O. F., et al. The antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex. *Science* 2008; 320: 385-8.
- McCormick D. A. and Williamson A. Convergence and divergence of neurotransmitter action in human cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 8098-102.

- Meltzer C. C., Smith G., DeKosky S. T., Pollock B. G., Mathis C. A., Moore R. Y., et al. Serotonin in aging, late-life depression, and Alzheimer's disease: the emerging role of functional imaging. *Neuropsychopharmacology* 1998; 18: 407-30.
- Milane M. S., Suchard M. A., Wong M. L. and Licinio J. Modeling of the temporal patterns of fluoxetine prescriptions and suicide rates in the United States. *PLoS Med* 2006; 3: e190.
- Miles R. Synaptic excitation of inhibitory cells by single CA3 hippocampal pyramidal cells of the guinea-pig in vitro. *J Physiol* 1990; 428: 61-77.
- Miles R., Toth K., Gulyas A. I., Hajos N. and Freund T. F. Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 1996; 16: 815-23.
- Mittmann W., Koch U. and Hausser M. Feed-forward inhibition shapes the spike output of cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* 2005; 563: 369-78.
- Mlinar B., Pugliese A. M. and Corradetti R. Selective inhibition of local excitatory synaptic transmission by serotonin through an unconventional receptor in the CA1 region of rat hippocampus. *J Physiol* 2001; 534: 141-58.
- Molnar G., Olah S., Komlosi G., Fule M., Szabadics J., Varga C., et al. Complex events initiated by individual spikes in the human cerebral cortex. *PLoS Biol* 2008; 6: e222.
- Mori M., Abegg M. H., Gahwiler B. H. and Gerber U. A frequency-dependent switch from inhibition to excitation in a hippocampal unitary circuit. *Nature* 2004; 431: 453-6.
- Mountcastle V. B. The columnar organization of the neocortex. *Brain* 1997; 120 (Pt 4): 701-22.
- Murayama M., Perez-Garci E., Nevian T., Bock T., Senn W. and Larkum M. E. Dendritic encoding of sensory stimuli controlled by deep cortical interneurons. *Nature* 2009; 457: 1137-41.
- Murphy F. C., Smith K. A., Cowen P. J., Robbins T. W. and Sahakian B. J. The effects of tryptophan depletion on cognitive and affective processing in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* 2002; 163: 42-53.
- Nestler E. J., Barrot M., DiLeone R. J., Eisch A. J., Gold S. J. and Monteggia L. M. Neurobiology of depression. *Neuron* 2002; 34: 13-25.
- Newberry N. R., Footitt D. R., Papanastassiou V. and Reynolds D. J. Actions of 5-HT on human neocortical neurones in vitro. *Brain Res* 1999; 833: 93-100.
- Oberlaender M., de Kock C. P., Bruno R. M., Ramirez A., Meyer H. S., Dercksen V. J., et al. Cell Type-Specific Three-Dimensional Structure of Thalamocortical Circuits in a Column of Rat Vibrissal Cortex. *Cereb Cortex* 2011;
- Pakkenberg B. and Gundersen H. J. Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. *J Comp Neurol* 1997; 384: 312-20.
- Palmer L. M. and Stuart G. J. Site of action potential initiation in layer 5 pyramidal neurons. *J Neurosci* 2006; 26: 1854-63.
- Portas C. M., Bjorvatn B. and Ursin R. Serotonin and the sleep/wake cycle: special emphasis on microdialysis studies. *Prog Neurobiol* 2000; 60: 13-35.
- Pouille F. and Scanziani M. Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* 2001; 293: 1159-63.
- Pouille F. and Scanziani M. Routing of spike series by dynamic circuits in the hippocampus. *Nature* 2004; 429: 717-23.
- Povysheva N. V., Gonzalez-Burgos G., Zaitsev A. V., Kroner S., Barrionuevo G., Lewis D. A., et al. Properties of excitatory synaptic responses in fast-spiking interneurons and pyramidal cells from monkey and rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 2006; 16: 541-52.

- Pritchett D. B., Bach A. W., Wozny M., Taleb O., Dal Toso R., Shih J. C., et al. Structure and functional expression of cloned rat serotonin 5HT-2 receptor. *Embo J* 1988; 7: 4135-40.
- Puig M. V., Watakabe A., Ushimaru M., Yamamori T. and Kawaguchi Y. Serotonin modulates fast-spiking interneuron and synchronous activity in the rat prefrontal cortex through 5-HT1A and 5-HT2A receptors. *J Neurosci* 2010; 30: 2211-22.
- Quirk G. J. and Beer J. S. Prefrontal involvement in the regulation of emotion: convergence of rat and human studies. *Curr Opin Neurobiol* 2006; 16: 723-7.
- Ramon y Cajal S. Textura del systema nervioso del hombre y los vertebrados. In. Madrid, Spain: Moya 1904;
- Ramon y Cajal S. Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres. Paris: Maloine 1911;
- Rapport M. M., Green A. A. and Page I. H. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem* 1948; 176: 1243-51.
- Richardson J. S., Keegan D. L., Bowen R. C., Blackshaw S. L., Cebrian-Perez S., Dayal N., et al. Verbal learning by major depressive disorder patients during treatment with fluoxetine or amitriptyline. *Int Clin Psychopharmacol* 1994; 9: 35-40.
- Riedel W. J., Klaassen T. and Schmitt J. A. Tryptophan, mood, and cognitive function. *Brain Behav Immun* 2002; 16: 581-9.
- Robbins T. W. and Arnsten A. F. The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation. *Annu Rev Neurosci* 2009; 32: 267-87.
- Roth B. L., Hanizavareh S. M. and Blum A. E. Serotonin receptors represent highly favorable molecular targets for cognitive enhancement in schizophrenia and other disorders. *Psychopharmacology (Berl)* 2004; 174: 17-24.
- Rudy B., Fishell G., Lee S. and Hjerling-Leffler J. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol* 2011; 71: 45-61.
- Salinas E. and Sejnowski T. J. Correlated neuronal activity and the flow of neural information. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 539-50.
- Sanchez-Vives M. V. and McCormick D. A. Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci* 2000; 3: 1027-34.
- Santana N., Bortolozzi A., Serrats J., Mengod G. and Artigas F. Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 2004; 14: 1100-9.
- Schaechter J. D. and Wurtman R. J. Serotonin release varies with brain tryptophan levels. *Brain Res* 1990; 532: 203-10.
- Schmitt J. A., Wingen M., Ramaekers J. G., Evers E. A. and Riedel W. J. Serotonin and human cognitive performance. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 2473-86.
- Schmitz D., Gloveli T., Empson R. M. and Heinemann U. Serotonin reduces polysynaptic inhibition via 5-HT1A receptors in the superficial entorhinal cortex. *J Neurophysiol* 1998; 80: 1116-21.
- Schmitz D., Gloveli T., Empson R. M., Draguhn A. and Heinemann U. Serotonin reduces synaptic excitation in the superficial medial entorhinal cortex of the rat via a presynaptic mechanism. *J Physiol* 1998; 508 (Pt 1): 119-29.
- Schweighofer N., Bertin M., Shishida K., Okamoto Y., Tanaka S. C., Yamawaki S., et al. Low-serotonin levels increase delayed reward discounting in humans. *J Neurosci* 2008; 28: 4528-32.
- Seguela P., Watkins K. C. and Descarries L. Ultrastructural relationships of serotonin axon terminals in the cerebral cortex of the adult rat. *J Comp Neurol* 1989; 289: 129-42.
- Shaw E. and Woolley D. W. Some serotoninlike activities of lysergic acid diethylamide. *Science* 1956; 124: 121-2.

- Shepherd G. M. The organization of the Brain. New York: Oxford University Press; 2004. p.
- Shopsin B., Gershon S., Goldstein M., Friedman E. and Wilk S. Use of synthesis inhibitors in defining a role for biogenic amines during imipramine treatment in depressed patients. *Psychopharmacol Commun* 1975; 1: 239-49.
- Silberberg G. Polysynaptic subcircuits in the neocortex: spatial and temporal diversity. *Curr Opin Neurobiol* 2008; 18: 332-7.
- Silberberg G. and Markram H. Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells mediated by Martinotti cells. *Neuron* 2007; 53: 735-46.
- Sloper J. J., Hiorns R. W. and Powell T. P. A qualitative and quantitative electron microscopic study of the neurons in the primate motor and somatic sensory cortices. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1979; 285: 141-71.
- Smiley J. F. and Goldman-Rakic P. S. Serotonergic axons in monkey prefrontal cerebral cortex synapse predominantly on interneurons as demonstrated by serial section electron microscopy. *J Comp Neurol* 1996; 367: 431-43.
- Sohal V. S., Zhang F., Yizhar O. and Deisseroth K. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 2009; 459: 698-702.
- Somogyi P. A specific 'axo-axonal' interneuron in the visual cortex of the rat. *Brain Res* 1977; 136: 345-50.
- Somogyi P. and Klausberger T. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 2005; 562: 9-26.
- Somogyi P., Freund T. F. and Cowey A. The axo-axonic interneuron in the cerebral cortex of the rat, cat and monkey. *Neuroscience* 1982; 7: 2577-607.
- Somogyi P., Kisvarday Z. F., Martin K. A. and Whitteridge D. Synaptic connections of morphologically identified and physiologically characterized large basket cells in the striate cortex of cat. *Neuroscience* 1983; 10: 261-94.
- Somogyi P., Tamas G., Lujan R. and Buhl E. H. Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev* 1998; 26: 113-35.
- Song S., Sjöström P. J., Reigl M., Nelson S. and Chklovskii D. B. Highly nonrandom features of synaptic connectivity in local cortical circuits. *PLoS Biol* 2005; 3: e68.
- Spruston N., Jaffe D. B. and Johnston D. Dendritic attenuation of synaptic potentials and currents: the role of passive membrane properties. *Trends Neurosci* 1994; 17: 161-6.
- Stuart G., Schiller J. and Sakmann B. Action potential initiation and propagation in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 1997; 505 (Pt 3): 617-32.
- Szabadics J., Varga C., Molnar G., Olah S., Barzo P. and Tamas G. Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science* 2006; 311: 233-5.
- Szentagothai J. and Arbib M. A. Conceptual models of neural organization. *Neurosci Res Program Bull* 1974; 12: 305-510.
- Tamas G., Buhl E. H. and Somogyi P. Fast IPSPs elicited via multiple synaptic release sites by distinct types of GABAergic neuron in the cat visual cortex. *J Physiol (Lond)* 1997; 500: 715-738.
- Tamas G., Somogyi P. and Buhl E. H. Differentially interconnected networks of GABAergic interneurons in the visual cortex of the cat. *J Neurosci* 1998; 18: 4255-70.
- Tamas G., Szabadics J. and Somogyi P. Cell type- and subcellular position-dependent summation of unitary postsynaptic potentials in neocortical neurons. *J Neurosci* 2002; 22: 740-7.
- Tamas G., Buhl E. H., Lorincz A. and Somogyi P. Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons. *Nat Neurosci* 2000; 3: 366-371.
- Tamas G., Buhl E. H., Lorincz A. and Somogyi P. Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons. *Nat Neurosci* 2000; 3: 366-71.

- Tamas G., Szabadics J., Lorincz A. and Somogyi P. Input and frequency-specific entrainment of postsynaptic firing by IPSPs of perisomatic or dendritic origin. *Eur J Neurosci* 2004; 20: 2681-90.
- Tang Y., Nyengaard J. R., De Groot D. M. and Gundersen H. J. Total regional and global number of synapses in the human brain neocortex. *Synapse* 2001; 41: 258-73.
- Tsodyks M., Kenet T., Grinvald A. and Arieli A. Linking spontaneous activity of single cortical neurons and the underlying functional architecture. *Science* 1999; 286: 1943-6.
- Verge D. and Calas A. Serotonergic neurons and serotonin receptors: gains from cytochemical approaches. *J Chem Neuroanat* 2000; 18: 41-56.
- Walther D. J., Peter J. U., Bashammakh S., Hortnagl H., Voits M., Fink H., et al. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 2003; 299: 76.
- Wang L., Mulette-Gillman O. A., Gadde K. M., Kuhn C. M., McCarthy G. and Huettel S. A. The effect of acute tryptophan depletion on emotional distraction and subsequent memory. *Soc Cogn Affect Neurosci* 2009; 4: 357-68.
- Wang Y., Gupta A., Toledo-Rodriguez M., Wu C. Z. and Markram H. Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 2002; 12: 395-410.
- Waterhouse B. D., Mihailoff G. A., Baack J. C. and Woodward D. J. Topographical distribution of dorsal and median raphe neurons projecting to motor, sensorimotor, and visual cortical areas in the rat. *J Comp Neurol* 1986; 249: 460-76, 478-81.
- Williams S. R. and Stuart G. J. Dependence of EPSP efficacy on synapse location in neocortical pyramidal neurons. *Science* 2002; 295: 1907-10.
- Wilson M. A. and Molliver M. E. The organization of serotonergic projections to cerebral cortex in primates: regional distribution of axon terminals. *Neuroscience* 1991; 44: 537-53.
- Winfield D. A., Gatter K. C. and Powell T. P. An electron microscopic study of the types and proportions of neurons in the cortex of the motor and visual areas of the cat and rat. *Brain* 1980; 103: 245-58.
- Wong D. T., Bymaster F. P. and Engleman E. A. Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sci* 1995; 57: 411-41.
- Wong D. T., Horng J. S., Bymaster F. P., Hauser K. L. and Molloy B. B. A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140, 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. *Life Sci* 1974; 15: 471-9.
- Woodruff A., Xu Q., Anderson S. A. and Yuste R. Depolarizing effect of neocortical chandelier neurons. *Front Neural Circuits* 2009; 3: 15.
- Woodruff A. R., Monyer H. and Sah P. GABAergic excitation in the basolateral amygdala. *J Neurosci* 2006; 26: 11881-7.
- Xiang Z. and Prince D. A. Heterogeneous actions of serotonin on interneurons in rat visual cortex. *J Neurophysiol* 2003; 89: 1278-87.
- Zhang X., Beaulieu J. M., Sotnikova T. D., Gainetdinov R. R. and Caron M. G. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science* 2004; 305: 217.
- Zhong P. and Yan Z. Differential regulation of the excitability of prefrontal cortical fast-spiking interneurons and pyramidal neurons by serotonin and fluoxetine. *PLoS One* 2011; 6: e16970.
- Zhong P., Liu W., Gu Z. and Yan Z. Serotonin facilitates long-term depression induction in prefrontal cortex via p38 MAPK/Rab5-mediated enhancement of AMPA receptor internalization. *J Physiol* 2008; 586: 4465-79.