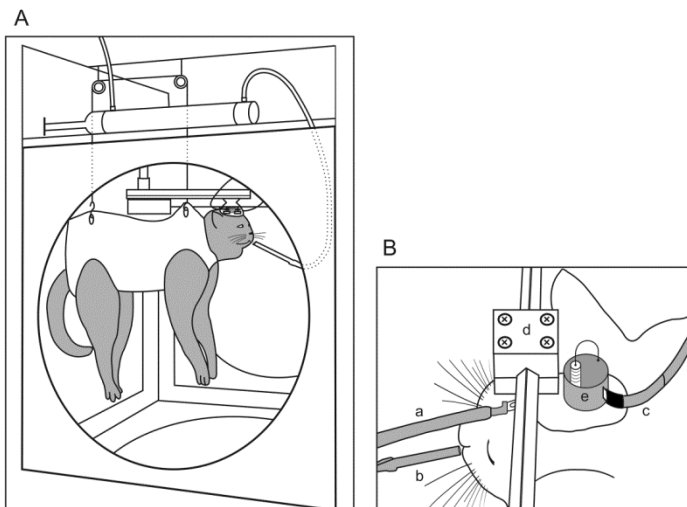


A nucleus caudatus neuronok vizuális válaszkarakterisztikái éber házimacskákban

Ph.D. értekezés tézisei



Dr. Nagypál Tamás

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Élettani Intézet

Szeged

2015

Bevezetés

A nucleus caudatus (NC), mint a bazális ganglionok egyik fő bemeneti képlete, egyike azon kéreg alatti struktúráknak, melyek az idegtudományi kutatások középpontjában állnak. Az utóbbi 50 év elektrofiziológiai kutatásai rávilágítottak a NC központi szerepére a szenzomotoros és kognitív folyamatokban, többek között a cél vezérelt mozgások, a memória funkciók, a tanulás, az alvás és az érzelmelek irányításában. A környezetünkből a NC-hoz érkező szenzoros információ elengedhetetlen a motoros folyamatok kivitelezéséhez. Ismert, hogy a NC neuronok érzékenyek a vizuális ingerekre. A NC neuronok az alacsony térbeli és magas időbeli frekvenciákra érzékenyséjük mellett szűk idő és térbeli frekvencia-hangolással rendelkeznek. A neuronok ezen tér- és időbeli vizuális tulajdonságokkal képesek lehetnek érzékelni az optikai áramlást, és részt vehetnek a mozgás érzékelésében. Továbbá képesek lehetnek a vizuális környezet változásainak észlelésére. Kérdésként merült fel, hogy az optikai áramlás aktiválja-e a NC neuronokat és milyen típusú vizuális neuronális válaszok találhatóak a házimacska NC-ában?

Tüzelési mintázatuk alapján a NC neuronokat már az 1960-as évektől két nagy csoportra tudták elosztani: fázikusan aktív neuronokra és tónusosan aktív neuronokra. Az 1990-es évek közepén egy harmadik elektrofiziológiai csoportot, a magas tüzelésű neuronokat (feltehetően GABAerg interneuronok) is leírtak, melyet később neurokémiai tulajdonságok alapján további alcsoportokba osztottak. Főemlősökön és rágcsálókön alapuló eredmények alapján átfedés van a NC neuronok

anatómiai és elektrofiziológiai csoportosítása között. A fázikusan aktív idegsejtek megfeleltethetők a közepesen tüskés kimeneti neuronoknak, a magas tüzelésű neuronok megegyeznek a parvalbumin pozitív GABAerg interneuronokkal, míg a tónusosan aktív idegsejtek a cholinerg interneuronokkal mutatnak egyezést. Kérdésként merült fel hogy a házimacska NC-ban is hasonló elektrofiziológiai csoportok találhatóak? Tudjuk elektrofiziológiai tulajdonságaik alapján csoportosítani a házimacska NC neuronokat?

Az utóbbi néhány évtizedben a neurofiziológiai kutatásokban fokozatosan előtérbe kerültek a betanított állatmodellek az altatott, relaxált modellel szemben. Viselkedő állatmodellekkel gyakran találkozhatunk főemlős vizuális kísérletek során, de a technikai nehézségek miatt kevésbé használták ezeket eddig macskáknál. Vizuális kísérletek során a vizsgált képletek gyakran mutatnak vizuomotoros (pl. szakkád) aktivitást. Ezért a szemmozgások folyamatos követése nélkülözhetetlen. Hogy a felvételek alatt kizárjuk a szemmozgásból eredő hatásokat, a macskának fixációt kell fenntartania, és a szem pozíciója folyamatos kontroll alatt áll. Korábbi kísérleteinket altatott és relaxált házimacskákon végeztük. Annak érdekében, hogy kizárjuk az altatószer hatásait egy új házimacska modellt fejlesztettünk ki, mely alkalmas folyamatos szemmozgás kontroll mellett krónikus vizuális és multiszenzoros vizsgálatokra éber viselkedő állatokban.

Célkitűzések

Az értekezés egyik fő célja az volt, hogy létrehozzunk egy új, betanított, fejrögzített és folyamatos szemmozgás kontroll alatt álló házimacska modellt krónikus vizuális kísérletekhez. Másik fő célkitűzésünk a viselkedő macska modellből regisztrált NC neuronok elektrofiziológiai tulajdonságaik alapján való csoportosítása, és a csoportok vizuális válaszkészségének elemzése egy vizuális fixációs paradigmában, ahol statikus (random pontmintázat) és dinamikus (optikai áramlás) vizuális ingereket mutattunk be az állatnak.

Anyagok és módszerek

A gondosan kiválasztott állatokat először a laboratóriumi környezethez szoktattuk. Miután az állat megszokta a laboratóriumot, óvatosan felöltöztettük egy pamut ruhába. A ruha szabadon hagyta az állat fejét, végtagjait és farkát. Kezdetben az állat néhány percet töltött felöltöztetve majd ezt az időt fokozatosan két órára növeltük. A betanítás következő lépése, mely modellünk újdonsága, az állat felfüggesztése a kísérleti állványba. A kísérleti állvány minden oldala nyitott, melyben az állat két ponton egy csigarendszeren keresztül van felfüggesztve. A következő lépésben a felfüggesztett macska fejét rögzítettük egy sztereotaxiás keretbe egy a koponyára implantált acél fejrögzítő és két rögzítő rúd segítségével. Modellünkben a macskának tolerálnia kellett a teste körüli ruhát, a felfüggesztett helyzetet és a fejrögzítést. A fejre implantált visszazárható műanyag regisztráló kamra és a mikrodriver rendszer stabil felvételi hátteret biztosított a NC-ből. Az állat folyamatos

szemkövetését egy az inhártya alá ültetett fémhurokkal és annak mozgásait detektáló kétdimenziós elektromágneses mező alkalmazásával biztosítottuk.

A vizuális paradigma során az állatnak egy fixációt tartalmazó feladatot kellett teljesítenie. A fixáció volt a betanítás első szakasza. Ha az állat egy adott méretű négyzet alakú ablakban, adott ideig tartotta a szemét, jutalmat kapott. A fixációs tréning során fokozatosan növeltük a fixáció időtartamát 100 ms-ről 1500 ms-ig. A kezdeti ablakméret $\pm 10^\circ$ volt majd fokozatosan csökkentettük $\pm 2,5$ fokenként $\pm 2,5^\circ$ -ig. A végső ablakméret mindkét macskánál $\pm 2,5^\circ$ volt. A fixációs tréning után vizuális ingerként statikus (random pontmintázat) és dinamikus (optikai áramlás) ingerlést alkalmaztunk. A vizuális fixációs paradigma során a macskának először a szemét 500 ms-ig a fixációs ablakban kell tartania, majd a statikus (200-500 ms) utána pedig a dinamikus vizuális ingerlés (1000 ms) történik. Ha az állat teljes ingerlési idő alatt megtartja a fixációt, akkor jutalmat kap.

Extracelluláris multielektroda felvételeket készítettünk a NC-ból az első macska esetében nyolc platina-íridium pamacs típusú elektródával, a második macskánál nyolc nikkel-króm pamacs típusú elektródával. A NC idegsejteket három kategóriába osztottuk: fázikusan aktív neuronok (PAN), magas tüzelésű neuronok (HFN) és tónusosan aktív neuronok (TAN). Minden idegsejtet két autokorrelogrammal (100 ms-os és 1000 ms-os), a 2 másodpercet meghaladó interspike intervallum aránnyal ($\text{propISI}_{>2\text{sec}}$) és nyugalmi tüzelési frekvenciával (háttéraktivitás) jellemeztünk.

Eredmények

Betanított, fejrögzített és szemmozgás kontrollált házimacska modell létrehozása

Létrehoztunk egy új, vizuális struktúrákból, krónikus elektrofiziológiai elvezetésekre alkalmas házimacska modellt. A modell előnyei a napi akár két órás felvételi idő, több éves felvételi lehetőség egy állatból, a felfüggesztett állat fejrögzítése és a szemmozgás folyamatos ellenőrzése a felvételek alatt. A felsorolt előnyök ideálissá teszik modellünket klasszikus vizuális elektrofiziológiai kísérletekhez. A szemmozgásból eredő aktivitások kizárása céljából a macskának képesnek kellett lennie fixáció fentartására miközben az állat fejét rögzítettük. A betanítási periódus végére a felfüggesztett, fejrögzített állat képes volt megtartani a fixációt (mindkét macska $\pm 2,5$ fokos fixációs ablakon belül) a paradigma teljes hosszában mind a statikus mind a dinamikus vizuális ingerlés alatt. A szemmozgást követő rendszer segítségével lehetővé vált, hogy kövessük és rekonstruáljuk az állat szemmozgásait. Így lehetővé vált, hogy érzékeljük a fixáció megtörését, miután a vizuális ingerlés azonnal megszakadt.

A NC neuronok klasszifikációja

Az alkalmazott betanított vizuális fixációs paradigmában összesen 346 neuront regisztráltunk a NC dorsolaterális részéről két felnőtt házimacskából. A korábban említett elektrofiziológiai tulajdonságok alapján a regisztrált neuronokat három kategóriába osztottuk: PAN (221 neuron), HFN (88 neuron) és TAN (28 neuron).

A PAN-ok csúcsos autokorrelogrammal rendelkeznek és ISI értékeik 2 másodpercet meghaladóak. A $\text{propISI}_{>2\text{sec}}$ érték általában magasabb mint 0,5 és a spontán tüzelési aktivitásuk alacsony, gyakran 3 spike/s alatti. A HFN-ek hegyes autokorrelogrammal bírnak, $\text{propISI}_{>2\text{sec}}$ értékeik 0,5 alattiak és a spontán tüzelési rátájuk magasabb mint 5 spike/s. A TAN-ok autokorrelogramja „völgyszerű”, a $\text{propISI}_{>2\text{sec}}$ érték alacsonyabb mint 0,5 és spontán aktivitásuk 2-12 spike/s között van. 135 fázikusan aktív neuront kizártunk az elemzésből 1 spike/s alatti háttéraktivitásuk miatt. További kilenc idegsejtet szintén kizártunk az elemzésből, mert nem tudtuk egyértelműen besorolni ezeket a fent említett három csoport egyikébe.

NC neurontípusok vizuális válaszai éber házimacsokban

A fixációs paradigma során aktivitásváltozást mutató neuronoknál döntően aktivitásnövekedést míg kisebb részükben aktivitáscsökkenést tapasztaltunk. Meg kell említenünk, hogy nem csak statikus és dinamikus vizuális ingerlés során észleltünk szignifikáns aktivitásváltozást, hanem korábbi vizsgálatoknak megfelelően jutalomkapcsolt aktivitást is regisztráltunk a NC-ból.

A PAN neuronok vizuális válaszkarakterisztikái

A vizuális fixációs paradigmában 86 PAN neuront elemeztünk. Az átlagos háttéraktivitás 2,93 spike/s volt (SD: $\pm 2,18$ spike/s). Statikus ingerlés alatt 50 neuronnak változott az aktivitása szignifikáns mértékben. Ebből 26 idegsejt mutatott szignifikáns aktivitásnövekedést és 24

idegsejt aktivitáscsökkenést. 29 neuronnak változott az aktivitása dinamikus ingerlés alatt. A középpontból a periféria felé áramló („center out”) optikai áramlás esetén 17 neuron és a középpont felé áramló („center in”) optikai áramlás során 16 idegsejt növelte az aktivitását. Nyolc PAN mutatott aktivitáscsökkenést optikai áramlás alatt. A paradigma jutalmi fázisa alatt 27 neuronnak növekedett szignifikáns mértékben az aktivitása és 6 neuron volt amelyik aktivitáscsökkenést mutatott. Tisztán jutalomkapcsolt aktivitásról van itt szó vagy az inger levillanásától (tehát vizuális off inger) is függ az aktivitásváltozás? Ennek eldöntésére azokat az ismétléseket is elemeztük, melyekben az állat megtörte a fixációt. Ezekben az esetekben az inger azonnal levillant, és nem kapott jutalmat az állat. Ha a vizuális inger levillanásához időzítjük a tüzeléseket és akkor is aktivitásfokozódást látunk, akkor ez a stimulus levillanásához kapcsolt változás és nem jutalmi komponens. Egy PAN volt érzékeny az inger levillanására.

A HFN neuronok válaszkaraktisztikái

A vizuális fixációs paradigmában 88 HFN neuront elemeztünk. Az átlagos háttér aktivitás 14,45 spike/s (SD: \pm 6,81 spike/s) volt. A paradigma statikus fázisa alatt 18 neuron növelte és 18 csökkentette szignifikáns mértékben az aktivitását. 37 HFN neuronnak változott az aktivitása optikai áramlás alatt. A „center out” optikai áramlás alatt 16 neuron, míg a „center in” optikai áramlás során 20 idegsejt növelte az aktivitását. Jutalom alatt 30 neuron növelte az aktivitását és egy sem mutatott

szignifikáns aktivitáscsökkenést. Az inger levillanása 8 HFN idegsejtnél váltott ki szignifikáns választ.

A TAN neuronok válaszkarakterisztikái

28 regisztrált NC neuront soroltunk ebbe a csoportba. Az átlagos tüzelési ráta 5,24 spike/s (SD: \pm 2,37 spike/s) volt. Statikus ingerlés alatt 11 neuron mutatott szignifikáns aktivitásnövekedést és 2 aktivitáscsökkenést. Optikai áramlás során hét neuronnak növekedett az aktivitása. Jutalom alatt 6 neuron mutatott aktivitásemelkedést. Az inger levillanása egy TAN aktivitását módosította.

Az optikai áramlás irányára mutatott érzékenység

Összesen 74 neuron (30 PAN, 36 HFN és 8 TAN) mutatott szignifikáns aktivitásváltozást az optikai áramlás alatt. Összehasonlítottuk az optikai áramlásra szignifikáns aktivitásváltozást mutató neuronok „center out” és „center in” ingerlés alatt mutatott tüzelési mintázataikat. A NC neuronok többsége nem tudott különbséget tenni aktivitásában a „center in” és „center out” irányú optikai áramlások között. Húsz neuron (27%) azonban szelektív volt az optikai áramlás irányára, kilenc PAN, nyolc HFN és három TAN. Az irányérzékeny neuronok „center in” és „center out” irányokra adott válaszai elemzésekor 9 NC neuron mutatott szignifikánsan nagyobb választ „center out” ingerlés alatt és 11 a „center in” irány esetén. Populációs szinten nem volt szignifikáns különbség az irányérzékeny neuronok arányában a PAN, HFN és TAN kategóriák közt (χ^2 -teszt; $\chi^2(2)=1,001$, szignifikancia szint: 0,05). Tehát a

PAN, HFN és TAN NC neuronok hasonló módon képesek kódolni az optikai áramlás irányát.

Neuroncsoportok aktivitása a fixációs paradigma alatt

Egyszempontos ANOVA statisztikai próbával hasonlítottuk össze a NC neuroncsoportok populációs aktivitásmintázatát. A HFN neuroncsoport háttéraktivitása szignifikánsan magasabb volt ($p < 0,001$) mint a PAN és TAN kategória értékei. Annak érdekében, hogy kizárjuk a magas háttéraktivitásból eredő különbséget, kivontuk az aktivitásokból az alapaktivitás értékét és nettó tüzelési rátát számoltunk. A nettó értékek abszolút értékét véve folytattuk a további elemzést. Az elemzés során kiderült, hogy az alkalmazott paradigma összes szakaszán, mind a statikus vizuális inger, mind a dinamikus vizuális inger illetve jutalmazás alatt is, populációs szinten az aktivitások szignifikáns mértékben eltértek ($p < 0,01$). A Tukey-féle post hoc elemzés feltárta, hogy a teljes alkalmazott vizuális fixációs paradigma során a HFN neuronok válasz amplitúdói voltak a legnagyobb mértékűek, ami arra utal, hogy a HFN idegsejtek vizuálisan a legérzékenyebb NC neuronok.

Diszkusszió

Munkánk során létrehoztunk egy új, krónikus, vizuális elektrofiziológiai elvezetésekre alkalmas, éber, viselkedő házimacska modellt. A kifejlesztett modellben idegi aktivitásokat regisztráltunk két felnőtt házimacska NC-ből vizuális fixációs paradigmában. A háttéraktivitást, az autokorrelogramok alakját és a $\text{propISI}_{>2s}$ értékeket

figyelembe véve három nagy csoportra osztottuk a NC neuronokat: PAN, HFN és TAN.

Az elektrofiziológiai tulajdonságaik alapján kialakított NC neuroncsoportok válaszkarakterisztikáit vizsgáltuk a vizuális fixációs paradigma adott szakaszaiban. Eredményeink alapján a vizuális információ statikus és dinamikus komponense is megjelenik a NC-ban. Az alkalmazott dinamikus inger az optikai áramlás merőben újszerű volt, korábban ilyen ingerlést nem használtak a NC neuronjainak vizuális vizsgálatában. Jelen tanulmányban megvizsgáltuk és elsőként bizonyítottuk az optikai áramlás feldolgozását macska NC-ban. Mindhárom vizsgált neuroncsoportban (PAN, HFN, TAN) aktivitásnövekedés mellett kisebb gyakorisággal aktivitáscsökkenés is megfigyelhető volt. A PAN és TAN csoportok érzékenyebbek voltak az ingerlés statikus komponenseire. Másrészt pedig elmondható, hogy a HFN idegsejtek egyenlő mértékben preferálták a statikus és dinamikus vizuális ingereket. A levillanó fényinger modulálta egyes HFN-ek aktivitását, míg PAN-ok és TAN-ok esetében nem volt jelentős hatással az aktivitásokra. Ezen válaszkarakterisztikák alapján arra lehet következtetni, hogy a PAN és TAN csoportok elsődlegesen a nem változó, folyamatos, statikus ingerekre érzékenyek. A HFN-ek válaszkarakterisztikái ettől eltérőek, mert a statikus vizuális ingerlés alatt mutatott aktivitásváltozás mellett a neuronok többsége a vizuális környezet változásaira volt érzékeny, úgymint a mozgásokra és az inger levillanására. A HFN idegsejtek nettó aktivitása a paradigma szakaszain szignifikánsan magasabb volt mint a PAN és TAN-oké. Így elmondható,

hogy a HFN neuronpopuláció volt a legérzékenyebb a vizuális ingerekre NC-on belül.

Megvizsgáltuk, hogy az optikai áramlás iránya („center out” és „center in”) milyen mértékben képes modulálni a NC neuronok aktivitását. A neuronok többsége csoporttól függetlenül nem tudott különbséget tenni a „center out” és „center in” irányok között. Egy kisebb NC neuron csoport (kilenc PAN, nyolc HFN és három TAN) azonban szelektív volt az optikai áramlás irányára. Ebben a csoportban a neuronok egyik fele (11 idegsejt) erősebb válaszokat mutatott „center in” irányú optikai áramlás alatt, míg a neuronok másik fele (9 idegsejt) „center out” irányú optikai áramlás alatt növelte aktivitását.

Eredményeink alátámasztják azt a korábbi feltételezést, hogy a NC neuronok részt vesznek a mozgás érzékelésében és felvetik a NC az állatot körülvevő vizuális környezetben létrejött változások érzékelésében játszott szerepét.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Nagy Attila egyetemi docensnek, aki témavezetőm volt az elmúlt hét évben tdk-s majd Ph.D. hallgatóként. Kiemelt köszönettel tartozom Dr. Benedek György professzor úrnak, aki másodévesként meghívott az Élettani Intézetbe tdk-s hallgatónak majd mind szakmai, mind emberi oldalról tanácsaival egyengette pályámat. Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Jancsó Gábor egyetemi tanárnak, az Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola vezetőjének, amiért lehetővé tette számomra, hogy részt vegyek az Idegtudományi Ph.D. programban. Külön köszönettel tartozom Dr. Gombkötő Péternek és Dr. Berényi Antalnak a rengeteg szakmai segítségért, a közös élményekért és barátságukért. Köszönettel tartozom Dr. Braunitzer Gábornak az észrevételeiért és a nyelvi lektorálásért. Kiemelten szeretném megköszönni Dósai Gabriellának a laboratóriumi csapatmunkát és technikai segítségét.

Hálás köszönettel tartozom egykori és jelenlegi kollégáimnak, Dr. Rokszin Alice-nak, Nagy Anettnek, Puskás Tamásnak, Dr. Vöröslakos Mihálynak, Averkin Róbertnek, Dr. Őze Attilának, Dr. Barkóczy Baláznak, Dr. Bodosi Baláznak és Utassy Györgyinek szakmai segítségükért és barátságukért. Köszönöm Liszli Péternek a munkám során nyújtott technikai segítségét, valamint az Élettani Intézetben dolgozó minden munkatársamnak a szakmai és emberi támogatásukat.

Hálás köszönettel tartozom családomnak támogatásukért. Külön szeretném megköszönni a Richter Gedeon Talentum Alapítványnak, hogy ösztöndíjasként támogattak. Kutatásainkat az OTKA PD75156, az OTKA 83810 és a Nemzeti Agykutatási Program KTIA_13_NAP-A-I/15 számú pályázatait támogatták.

Publikációs lista

- I. Nagypál T, Gombkötő P, Utassy G, Averkin RG, Benedek G, Nagy A (2014) A new, behaving, head restrained, eye movement-controlled feline model for chronic visual electrophysiological recordings. *J Neurosci Methods* 221:1-7. IF: 2,025
- II. Nagypál T, Gombkötő P, Barkóczi B, Benedek G, Nagy A (2015) Activity of Caudate Nucleus Neurons in a Visual Fixation Paradigm in Behaving Cats. *PLoS ONE* 10(11): e0142526. IF: 3,234
- III. Gombkötő P, Berényi A, Nagypál T, Benedek G, Braunitzer G, Nagy A (2013) Co-oscillation and synchronization between the posterior thalamus and the caudate nucleus during visual stimulation. *Neuroscience* 242:21-27. IF: 3,357