

A laterális habenula agytörzsi kontrollja

Doktori értekezés tézisei

Zichó Krisztián

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola
Szentágotthai János Idegtudományi Tagozat



Témavezető:

Dr. Nyiri Gábor, D.Sc., csoportvezető, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók:

Dr. Zachar Gergely, PhD, tudományos főmunkatárs

Dr. Tóth Attila, PhD, habilitált egyetemi docens

Bíráló bizottság elnöke:

Dr. Alpár Alán, D.Sc., habilitált egyetemi tanár

Komplex vizsga bizottság tagjai:

Dr. Dobolyi Árpád, D.Sc., egyetemi tanár

Dr. Dénes Ádám, D.Sc., MTA doktora,
tudományos főmunkatárs

Budapest, 2025

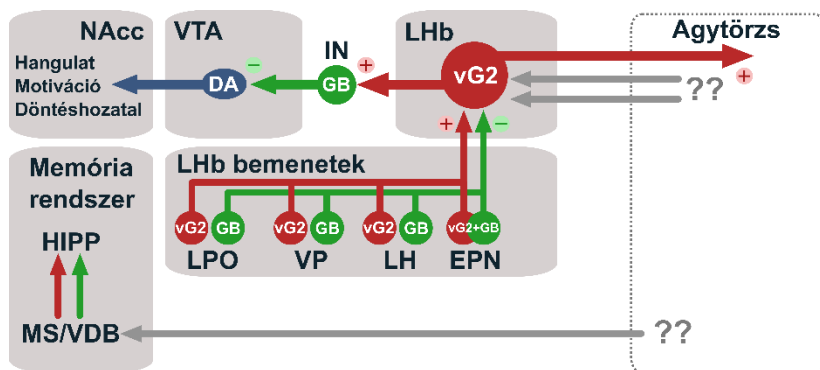
1. Bevezetés

A hétköznapiak során bennünket érő pozitív és negatív élmények folyamatosan befolyásolják érzelmeinket, hangulatunkat, mely kihat mindennapi viselkedésünkre, döntéseink meghozatalára. Ezen folyamatos értékelési folyamat krónikus, akár belső tényezőkből, akár külső faktorokból származó hibája olyan népbetegségnek számító pszichiátriai betegségekhez vezethet, mint a depresszió vagy a szorongás. E betegségek gyógyításához nélkülözhetetlen megértenünk az érzelmeinket és hangulatunkat meghatározó agyi folyamatokat.

A bennünket érő élmények pozitívnak vagy negatívnak való értékelését, annak kontextusba való helyezését és kognitív kontrollját számos agykérgi és kéreg alatti mag szabályozza. Az egyik legfontosabb élményértékelésben szerepet játszó kéreg alatti, döntően serkentő mag a laterális habenula (LHb). Kapcsolatrendszerét tekintve fő bemeneteit előagyi kéreg alatti magokból kapja, kimeneteivel pedig a mezolimbikus és mezokortikális dopaminerg rendszert, továbbá az agytörzsi szerotonerg, kolinerg és noradrenerg rendszereket szabályozza (1. ábra). Jól ismert, hogy a LHb idegsejtjeinek aktiválódása figyelhető meg egy negatív élmény vagy egy negatív élményt előrejelző esemény során, amely az állatban a körülményektől függően válthat ki elkerülő magatartást, menekülést, agressziót vagy éppen ledermedést. E folyamat során a jutalmazást, pozitív élményt okozó dopaminerg rendszer a LHb hatására gátlás alá kerül (1. ábra). Ezzel szemben a LHb idegsejtek direkt gátlódása figyelhető meg egy pozitív élmény vagy egy pozitív élményt előrejelző esemény során, amely serkentettebbé teszi a dopaminerg rendszert, ezzel preferenciát, jutalmazó érzést

kiváltva. Tehát a LHb idegsejtjei mind a negatív, mind a pozitív élményekre képesek válaszolni különböző módon, ezzel befolyásolva az élőlények adott helyzetben való megfelelő viselkedésének kialakítását. A depresszió kialakulása során a LHb serkentő bemeneteinek aktivitása túlzottan felerősödik, amely tartósan megváltoztatja a LHb idegsejtjeinek működését, ezzel kialakítva egy kóros viselkedési válaszadást. Ennek eredményeként jelennek meg a depresszió egyes tünetei, mint az anhedónia, a hangulat krónikus nyomottsága, alvás és evészavarok, koncentráció csökkenése és fáradtság.

Az eddigi szakirodalmi adatok azt sugallják, hogy a LHb nem minden idegi bemenete ismert (1. ábra), és több agytörzsi mag potenciálisan döntő szerepet játszhat a LHb aktivitásának szabályozásában, így az ahhoz köthető viselkedések kialakításában. Eddig azonban a LHb-nak agytörzsből eredő gyors, serkentő vagy gátló bemenete még nem ismert.



1. ábra. A LHb kapcsolatrendszerének összefoglalása

2. Célkitűzések

A dolgozatban bemutatandó eredmények célja az agytörzs szerepének vizsgálata a LHb működésének befolyásolásában negatív és pozitív élmények során.

2.1. Serkentő beidegzés az agytörzsből a LHb-ba

A laterális habenula (LHb) központi szerepet játszik a negatív események értékelésében és előrejelzésében, és működési zavara összefüggésbe hozható a depresszióval. Ugyanakkor a LHb aktivációjának és a negatív információk közvetítésének neuronális mechanizmusai kevésbé ismertek. Az agytörzsi median raphe régió (MRR) kedvező helyzetben van ahhoz, hogy negatív események során gyors és összehangolt serkentést biztosítson a LHb és a memória rendszerek számára. Ezért a továbbiakban a következő kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

2.1.1. Melyik a legnagyobb vetítő idegsejtpopuláció a MRR-ban?

2.1.2. Mely agyterületekre vetítenek ezek a MRR idegsejtek?

2.1.3. Mely agyterületek adnak szinaptikus bemenetet ezeknek a MRR idegsejteknek?

2.1.4. Hogyan befolyásolja ezen MRR idegsejtek serkentése az egerek viselkedését?

2.1.5. Egy negatív emléknym kialakulásakor szükséges-e ezen MRR idegsejtek aktivitása a megfelelő félelemi emlékek kialakulásához?

2.2. Gátló beidegzés az agytörzsből a LHb-ba

A LHb gátlása pozitív élményt és jutalmazást kódol, továbbá elengedhetetlen a rugalmas viselkedésszabályozás és a megfelelő döntéshozatal szempontjából. Annak ellenére, hogy évtizedek óta kutatják a LHb-t, a LHb gátló idegi bemenetei továbbra is kevésbé ismertek, és mindeddig nem azonosítottak agytörzsből eredő gátló kapcsolatokat. A továbbiakban az alábbi kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

2.2.1. Mely idegsejtek biztosítják a LHb elsődleges gátló bemenetét?

2.2.2. Ezek az idegsejtek az agytörzsben helyezkednek el?

2.2.3. Hogyan befolyásolja ezen gátló idegsejtek serkentése vagy gátlása az egerek viselkedését?

2.2.4. Mely szinaptikus bemenetek szabályozzák ezen gátló idegsejtek aktivitását?

2.2.5. Léteznek-e olyan molekuláris markerek, amelyek szelektíven azonosítják ezeket a gátló idegsejteket?

2.2.6. Kimutathatók-e hasonló idegsejtpopulációk az emberi agyban?

3. Módszertan

3.1. Etikai engedélyek

Minden kísérletet az Intézeti Etikai Kódex és az állatkísérletekről szóló magyar jogszabályok (1998. évi XXVIII. törvény, 40/2013-as kormányrendelet) szerint végeztünk, összhangban az EU 2010/63/EU irányelvével. A kísérletek elvégzését a Kísérleti Orvostudományi Intézet Állatvédelmi Testülete és a Pest Megyei Kormányhivatal engedélyezte a PEI/001/33-4/2013, PE/EA/2553-6/2016, PE/EA/254-7/2019 és PE/EA/00063-5/2022 projektszámokon.

3.2. Génmódosított állatok

Munkánkban olyan genetikailag módosított egereket használtunk, melyek a Cre vagy flippáz (Flpo) restrikciós endonukleáz enzim segítségével egy vírus genomjából fluoreszcens fehérjéket és fénnnyel aktiválható opszinokat képesek kifejezni. A módszer során a Cre vagy Flpo enzim kifejeződését egy másik, endogénen a sejtben működő enzim promótere hajtja meg, mely promóter alapján az egértörzs elnevezésre kerül. Jelen munkában vGAT-Cre, vGAT-Flpo, vGluT1-Cre és vGluT2-Cre egereket használtunk. Továbbá a munka során felhasználásra került anatómiai vizsgálatok céljából egy patkány és három majom (*Macaca mulatta*) agytörzs is.

3.3. Emberi minták

A munka során felhasználásra került kettő emberi agytörzsminta is, melyeket két olyan személytől szereztünk be, akik olyan okok miatt haltak meg, amelyek nem jártak

közvetlenül agyi betegséggel vagy károsodással, és nem volt neurológiai vagy pszichiátriai rendellenességre utaló kórelőzményük. Minden eljárást a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően végeztünk, és az Egészségügyi Tudományos Tanács Regionális Tudományos és Kutatási Etikai Bizottsága hagyta jóvá (ETT TUKEB 31443/2011/EKU, megújítva: BM/15092-1/2023). A vizsgálati alanyok a tatabányai Szent Borbála Kórház Patológiai Osztályán estek át boncoláson. Az agyszövet kutatási célú felhasználásához és az egészségügyi dokumentációhoz való hozzáféréshez a hozzátartozók tájékozott beleegyezését kértük.

3.4. Sztereológiai műtétek

Az egereket 2,5%-os izofluránnal bódítottuk, majd intraperitoneálisan ketamin-xilazin-hidroklorid keveréket adtunk be, vagy az altatást 1-1,5%-os izofluránnal tartottuk fent, ezt követően pedig kisállat sztereotaxiás keretbe helyeztük őket, ahol a koponyafelszínt feltártuk. A különféle vírusokat sztereotaxiás atlasz alapján meghatározott koordináták mentén mikropumpa segítségével a célterületekre injektáltuk. Az opotgenetikai viselkedéskísérletekhez ugyanezen módszer segítségével az egerek agyának megfelelő célterülete fölé optikai szálakat ültettünk. Minden műtét után az egerek szubkután buprenorfin, intraperitoneálisan fiziológiás sóoldatot és meloxicamot kaptak a posztoperatív diszkomfort csökkentésére.

3.5. Monoszinaptikus veszettségvírus technika

A sejttípus specifikus szinaptikus bemenetek feltérképezését monoszinaptikus rabies-nyomkövetési

technikával végeztük. Az egerek agyának megfelelő célterületére először Cre-fdependens segédvírusokat, majd 5 hét után módosított veszettség vírusokat injektáltunk, amely lehetővé tette a transz-szinaptikus jelölést, majd 7-10 napos túlélési idő után az egerek perfúziójára került sor.

3.6. Perfúzió és metszés

Az egerek mélyaltatását követően, őket transzkardiálisan perfundáltuk 4%-os paraformaldehid oldattal. A perfúziót követően az agyakat eltávolítottuk a koponyából és 50-60 μm vastag koronális metszetekre vágtuk vibrációs mikrotóm segítségével.

3.7. Immunhisztokémia és fluoreszcens képalkotás

Az immunhisztokémiai vizsgálatok során megbízhatóan tesztelt primer és szekunder antitesteket használtunk, kizárva az autofluoreszcenciát és a nem specifikus jelöléseket. A perfúzióval fixált agyi metszeteket krioprotekció után antigénfeltárás céljából háromszor gyorsfagyasztottuk, majd primer és szekunder antitestekkel inkubáltuk. A fluoreszcens beadási helyeket és axonarborizációkat epifluoreszcens mikroszkóppal rekonstruáltuk, míg a sejtek, azok sztereológiai mérését és szinaptikus kapcsolatainak számlálását Nikon A1R konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal és NIS-Elements szoftverrel végeztük.

3.8. Viselkedésvizsgálatok

A viselkedéskísérletek során a vírussal injektált (opszin kódoló vagy csak fluoreszcens fehérjét kódoló vírusok) és optikai szállal beültetett egereket különböző viselkedési

tesztekben vizsgáltuk, mint akut és kondicionált helypreferencia (RTPP, CPP) és helyelkerülési (RTPA, CPA) tesztek, averzív operáns kondicionálás, önadagolási stimulációs valamint kontextuális és kulcsinger asszociált félelemkondicionálási tesztek. A helypreferencia tesztek során az egerek vizsgálni kívánt agyterületét serkentés vagy gátlás céljából fénnel világítottuk meg egy kétrekeszes doboz egyik oldalán, ahol közben mértük, hogy mennyi időt töltenek a rekeszekben. Ezen kívül az egerek motivációs szintjét operáns kondicionálás segítségével mértük, ahol a jutalmat (cukros pellet) kapcsolóaktiválással kapták, miközben világítottuk a MRR sejtjeit. Az önadagolási stimulációs tesztben az egerek saját maguk aktiválhatták idegsejtjeiket. A félelemkondicionálási tesztekben az egereknek ijesztés céljából 3-4 közepesen erős lábsokkot adtunk, majd későbbi napokon félelmi szintjüket ledermedéssel töltött idejükkel vizsgáltuk. Az összes tesztet jól kontrollált körülmények között, különböző környezetekben végeztük el, hogy minél pontosabb adatokat nyerjünk az egerek viselkedésére.

3.9. Statisztikai analízisek

A viselkedési kísérleti adatokat Noldus EthoVision 15.0 és Tibco Statistica 13.4 szoftverek segítségével elemeztük. Minden viselkedési kísérletet legalább két különböző egércsoporton végeztünk. A statisztikai különbségeket nemparametrikus Mann–Whitney U-teszttel vagy parametrikus Student's t-teszttel, valamint nemparametrikus Wilcoxon-teszttel vizsgáltuk, és az adatokat az alábbi szignifikanciaszintek figyelembevételével értékeltük: n.s. (nem szignifikáns): $p > 0.05$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

4. Eredmények

4.1. A LHb serkentő beidegzése az agytörzsből

4.1.1. Az eddig ismeretlen, vGluT2 pozitív glutamaterg idegsejtek alkotják a median raphe régió (MRR) legnagyobb projekciós sejtpopulációját.

4.1.2. A MRR vGluT2 idegsejtek beidegzik a LHb-t, illetve más hangulati étellel és memóriaképzéssel kapcsolatos kéreg alatti magot.

4.1.3. A MRR vGluT2 idegsejtek negatív élményeket feldolgozó agyi régiókból kapnak szinaptikus bemenetet.

4.1.4. A MRR vGluT2 idegsejtek optogenetikai stimulálása negatív élményt és erősen averzív viselkedést okoz egerekben.

4.1.5. A MRR vGluT2 idegsejtek aktivitása szükséges a félelmi emléknymok kialakulásához: A MRR vGluT2 sejtjeinek negatív élmény alatti optogenetikai gátlása jelentősen csökkenti az egerek kontextuális és kulcsingerhez kötött félelmének kialakulását.

4.2. A LHb gátló beidegzése az agytörzsből

4.2.1. Egy új, LHb-t beidegző GABAerg agytörzsi mag, a szubventrikuláris tegmentális mag (SVTg), amely a legnagyobb tisztán gátló beidegzést adja a LHb-ba, továbbá beidegez más negatív élménnyel és memóriaképzéssel kapcsolatos kéreg alatti magot.

4.2.2. A SVTg idegsejtjeinek optogenetikai stimulálása pozitív élményt és jutalomkereső viselkedést vált ki egerekben.

4.2.3. A SVTg idegsejtjeinek aktivitása szükséges az érzelmi állapotok kiegyensúlyozott értékeléséhez: A SVTg idegsejtjeinek optogenetikai gátlása negatív élményt okoz, továbbá a SVTg sejtjeinek negatív élmény alatti optogenetikai gátlása jelentősen növeli és generalizálja az egerek félelmét.

4.2.4. A SVTg idegsejtek olyan agyterületekről kapnak szinaptikus bemenetet, amelyek érzelmi értéket és figyelemfelkeltő ingerek feldolgozását végzik.

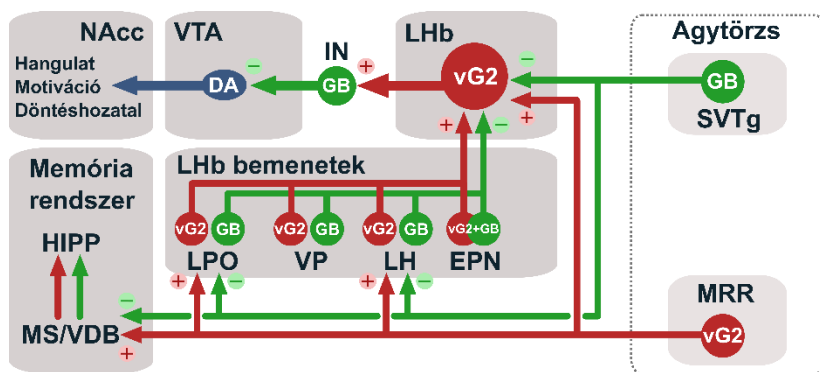
4.2.5. A SVTg idegsejtek egyedi molekuláris markerei: A SVTg idegsejtek szelektíven és specifikusan kifejezik a *Satb1*, *Pax6* és *reelin* fehérjéket.

4.2.6. A SVTg idegsejtek megtalálhatóak rágcsálók (egér, patkány), főemlősök (*Macaca mulatta*) és az ember agytörzsében is.

5. Következtetések

Az élmények és események megfelelő érzelmi értékkel való felruházása a laterális habenula (LHb) egyik kulcsfontosságú funkciója. Ez a folyamat elengedhetetlen a hangulat szabályozásához és a megfelelő döntések meghozatalához, támogatva a környezethez való alkalmazkodást ezzel biztosítva a túlélést. A LHb eme gyors értékelésben betöltött szerepét az eddig ismert előagyi bemenetei (2. ábra) nem tudták teljes mértékben megmagyarázni. Az agytörzsi idegsejtpopulációk alkalmasnak tűntek e funkció ellátására azonban korábban ismeretlenek voltak ezen idegsejtek és idegpályák. Vizsgálataink során két, korábban nem ismert agytörzsi idegsejtpopulációt azonosítottunk, amelyek beidegzik a LHb-t. Egyrészt leírtuk az agytörzsi median raphe régió (MRR) vGluT2-pozitív idegsejtjeit, amelyek serkentő beidegzezést adnak a LHb-ba, valamint számos más, kéreg alatti hangulati élettellel és memóriefunkciókkal kapcsolatos agyterületre (2. ábra). Emellett azonosítottunk egy korábban ismeretlen, gátló (GABAerg) agytörzsi magot, a szubventrikuláris tegmentális magot (SVTg), amely a MRR-al ellentétben gátló axonokat küld a LHb-ba (2. ábra). Optogenetikai viselkedéskísérleteink során kimutattuk, hogy a MRR vGluT2 idegsejtek stimulációja negatív, averzív élményt váltott ki, míg a SVTg idegsejtek stimulációja pozitív élményt indukált egerekben. Továbbá azt találtuk, hogy a MRR vGluT2 idegsejtek gátlása negatív élmények során csökkentette, míg a SVTg idegsejtek gátlása negatív élmények alatt növelte az egerek félelmét. Mindkét agytörzsi idegsejtpopuláció számos, érzelmi érték- és jelentőség feldolgozó kéreg alatti és kérgi agyterületről kap szinaptikus bemenetet, amelyek befolyásolják e sejtek működését.

Eredményeinkkel tehát két, kulcsfontosságú agytörzsi központot azonosítottunk, amelyek ellentétes módon szabályozzák az érzelmi állapotot és a motiváció orientált viselkedést rágszálókban, ezzel feltárva eddig ismeretlen agyi mechanizmusokat. Ezek az idegsejtek központi szerepet játszhatnak a depresszióhoz és szorongáshoz kapcsolódó hangulatzavarok kialakulásában és fennmaradásában, így potenciálisan jövőbeli terápiás célpontokként szolgálhatnak a pszichiátriai betegségek kezelésében.



2. ábra: A LHb agytörzsből eredő bemeneteinek összefoglaló ábrája. A sematikus ábra szemlélteti, hogy az agytörzs anatómiai összeköttetései révén képes szabályozni a hangulatot, motivációt és a memóiafolyamatokat. Mind a MRR vGluT2-pozitív, mind a SVTg GABAerg idegsejtjei beidegzik a LHb-t, valamint más, kéreg alatti LHb idegi bemeneteket és memóriáért felelős központokat is.

6. Saját publikációk jegyzéke:

A dolgozathoz kapcsolódó publikációk:

Zichó K, Balog BZ, Sebestény RZ, Brunner J, Takács V, Barth AM, Seng C, Orosz Á, Aliczki M, Sebők H, Mikics E, Földy C, Szabadics J, Nyíri G.

Identification of the subventricular tegmental nucleus as brainstem reward center.

SCIENCE

2025 Jan 24;387:eadr2191. doi: 10.1126/science.adr2191.

PMID: 39847621

IF: 44.7

Szőnyi A*, **Zichó K***, Barth AM, Gönczi RT, Schlingloff D, Török B, Sipos E, Major A, Bardóczy Z, Sos KE, Gulyás AI, Varga V, Zelena D, Freund TF, Nyíri G.

Median raphe controls acquisition of negative experience in the mouse.

SCIENCE

2019 Nov 29;366(6469):eaay8746. doi:

10.1126/science.aay8746. PMID: 31780530.

*: megosztott szerzőség

IF: 41.846

A dolgozathoz nem kapcsolódó publikációk:

Zichó K, Sos KE, Papp P, Barth AM, Misák E, Orosz Á, Mayer MI, Sebestény RZ, Nyiri G.

Fear memory recall involves hippocampal somatostatin interneurons.

PLOS BIOLOGY

2023 Jun 8;21(6):e3002154. doi:

10.1371/journal.pbio.3002154. PMID: 37289847; PMCID: PMC10284381.

IF: 7.8

Takacs V, Papp P, Orosz Á, Bardóczy Z, Zsoldos T, **Zichó K**, Watanabe M, Maglóczy Z, Gombás P, Freund TF, Nyiri G. Absolute number of three populations of interneurons and all GABAergic synapses in the human hippocampus.

THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE

2025 Jan 14:e0372242024. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0372-24.2024. PMID: 39809540.

IF: 4.4

ΣIF: 98.746