

1. A tanulási és motivációs folyamatokkal összefüggő agyterületek funkcionális morfológiai jellemzése háziszárnyasban.

1.1. Thalamus

A háziszárnyas thalamus limbikus kapcsolatokkal rendelkező, és a tanulási folyamatokban feltehetően szerepet játszó magcsoportjának kapcsolatrendszerét vizsgáltuk anterográdfárayajelöléses (Phaseolus vulgaris lectin) módszerrel. Megállapítottuk, hogy a madár dorsomedialis thalamus részben az emlős középvonali és intralamináris, részben mediodorsalis magjaihoz hasonló összeköttetésekkel rendelkezik. A munka közlemény formájában megjelent (**Montagnese et al., 2003**). Saját kutatás valamint irodalmi áttekintés segítségével leírtuk a madár thalamikus magcsoportjainak összehasonlító jellemzését, a gerincesek különböző osztályaival összevetve, elsősorban a kapcsolatrendszer alapján. E munkáról előbb nemzetközi kongresszus meghívott előadójaként Témavezető beszámolt (**Csillag, 2004**), majd kibővítve közleményben is megjelent (**Csillag és Montagnese, 2005**).

1.2. Septum

A subpallium alapvető szerepet játszik a viselkedés motivációjában és a tanulási mechanizmusban (Csillag, 1999, **Csillag et al. 2005**) Ezen belül a madár septum fontos kapocs a limbikus pallium és a hypothalamus között. Az első fázisban befejeztük és leközzöltük azt a munkánkat, amely a háziszárnyas septalis magok efferens összeköttetéseit vette vizsgálat alá. Megállapítottuk, hogy az ismert hipotalamikus kapcsolatok mellett a madár septum számos limbikus összeköttetéssel rendelkezik, amelyek az emlős viszonyaival összevethetők. Az emlősben nagy jelentőségű septohippocampalis pálya azonban madárban nem a nucl. septalis lateralis és medialisból, hanem a nucleus diagonalis Brocae-ból ered. (**Montagnese et al., 2004**).

Vizsgálataink folytatásaként a csirke septalis magok afferenseit tanulmányoztuk, retrográdfáraykövetés (Fast blue ill. rhodamin-fluoreszcens latex gyöngy) segítségével. A munka eredményeképpen kirajzolódnak a septumra vetítő agyterületek, közte számos reciprok kapcsolatot mutató mag. A septum efferens kapcsolataival ellentétben, úgy tűnik, hogy az afferensek alapján kevésbé különíthetők el szubdivíziók a septumon belül, viszont számos eddig nem definiált kapcsolatra derült fény, amelyek bizonyos viselkedési funkciók (pl. ivadékgondozás, ivari működés, agresszió, tanulás bizonyos vonatkozásai) jobb megértését tehetik lehetővé. A munkát kongresszusi előadáson bemutattuk (**Montagnese et al., 2005**), majd 2006-ban közlésre benyújtottuk a J. Comp. Neurology-nak, ahonnan alapjában pozitív kritikával átdolgozásra visszaküldték. Jelenleg folyik a kiegészítő kísérletek kiértékelése

(néhány kritikus területről anterográd pályakövetéssel is igazoljuk a retrográd pályakövetéssel kapott eredményeket), majd az átdolgozott verziót várhatóan egy-két hónapon belül újra benyújtjuk.

1.3. Nucleus accumbens.

A viselkedés megerősítésében fontos szerepet tulajdonítanak a nucleus accumbensnek, amely emlős és emberi idegrendszerben az addiktív viselkedés kulcsa. Madárban ez a magterület bizonytalanul meghatározott, és különösen az nem volt általánosan ismert és elfogadott, hogy az emlősökben megkülönböztethető szubdivíziók (core, shell, ill. rostral pole) megtalálhatók-e madárban. Ezt a kérdést célozta a 2005. évben befejezett munkánk, amelyben immuncitokémiai térképezés (calbindin, NPY, DARPP-32) és pályajelölés (nucl. tractus solitarii felől érkező afferensek) segítségével megállapítottuk, hogy a ventrobasisalis előagy eredetileg medialis striatumnak (MSt) definiált területén belül core jellegű régió különíthető el, míg az ehhez ventral és lateral felől csatlakozó régió a shell megfelelője. Az utóbbi ráterjed az eredetileg ventralis pallidumként (VP) definiált agyterületre is. A rostralis ventralis striatumban, korábbi leírásunknak (Mezey és Csillag, 2002) megfelelően, szintén található accumbens releváns terület, minden valószínűség szerint az emlős rostral pole megfelelője, mivel ebben core és shell jellegű szubdivíziók az általunk használt módszerekkel nem voltak kimutathatók. A munkának ezen része közlemény formában megjelent (**Bálint és Csillag, 2007a**), jelenleg tovább dolgozunk a nucl. accumbens szubdivízióinak afferens kapcsolatain, valamint immuncitokémiai jellemzőin, ezekről egyelőre kongresszusi beszámoló készült (**Bálint és Csillag, 2007b**).

1.4. Ventralis tegmentalis area.

A magatartás motivációjában szintén jelentős terület a ventralis tegmentalis area (VTA), amely számos reciprok kapcsolatával madárban is valószínűleg a jutalmazási (hedonikus) központ szerepét tölti be. Jelenleg e központ raphe magok felől érkező serotonerg afferenseit, valamint a prefrontalis kéreg-ekvivalens agyterületekkel való összefüggéseit vizsgáljuk pályajelöléssel kombinált fény- és elektronmikroszkópos immuncitokémia segítségével. E munkából kongresszusi posztterek készültek, részben a programba időközben bekapcsolódott orvostanhallgató, Hanics János jóvoltából (**Székely et al., 2005; Hanics et al. 2006**). Ugyancsak folyamatban van a házi csirke VTA elektronmikroszkópos leírása, különös tekintettel az itt található glomeruláris szinapszisok szerkezetére. Az utóbbi témából is kongresszusi előadást tartottunk (**Székely et al., 2006**).

2. Dopaminerg és dopaminoceptív neuronrendszerek szerepe háziszárnyas tanulási és motivációs folyamataiban.

2.1. Dopamin antagonisták hatása a memória retenciójára.

Dopaminerg antagonisták intracerebralis beadását követően vizsgáltuk a házicsirke passzív elhárító tanulása során észlelhető tanulást ill. a memória retencióját. Megállapítottuk, hogy a D1 antagonista koncentráció-függően gátolja a memória retencióját, míg a D2 antagonista ilyen hatást csak sokkal magasabb dózisban fejt ki. Ez a megfigyelés alátámasztja korábbi eredményeinket, amelyekben a dopaminreceptorok agyi megoszlását írtuk le, valamint a D1 receptor szelektív upregulációját is megfigyeltük a striatumban passzív elhárító tanulást követően (Stewart et al. 1996). A munka közlemény formájában megjelent (**Kabai et al. 2004**).

2.2. Striato-tegmentalis pályarendszerek és szelektív projekciókkal rendelkező neuronjaik jellemzése kvalitatív és kvantitatív fény-és elektronmikroszkópia segítségével.

Kettős ill. hármas immunfluoreszcens mikroszkópia segítségével leírtuk a striatum dopaminoceptív struktúráinak kvantitatív viszonyait, a tegmentumra vetítő D1 dopaminoceptív (DARPP-32 immunreaktív) neuronok részarányát, valamint a tegmentum dopaminerg magjaiban (substantia nigra ill. area ventralis tegmentalis) végződő DARPP-32 tartalmú rostok kapcsolatát a dopaminerg (tirozinhidroxiláz-tartalmú) neuronokkal. A vizsgálat fontos állomás a striatum és a tegmentum közötti, a viselkedés megerősítésében és a memória képződésében szereplő reciprok kapcsolatok feltárásában. Ez a munka közlemény formájában megjelent (**Bálint et al. 2004**).

Egysejt-feltöltést követő fény- és elektronmikroszkópia segítségével jellemeztük a passzív elhárító tanulásban kulcsszerepet betöltő medialis striatumból (LPO) a ventralis tegmentalis areába vetítő projekciós neuronokat, valamint a rajtuk végződő serkentő (glutamát-immunreaktív) ill. gátló (GABA-immunreaktív) szinapszisokat. Ezáltal madáron elsőként sikerült azonosított projekcióval rendelkező neuronok szinaptikus bemenetének részletes morfológiai leírása. Ez a munka közlemény formájában megjelent (**Mezey és Csillag, 2003**).

A korábban fénymikroszkópiával leírt dopamine-adenosine related phosphoprotein (DARPP-32) immunreaktív struktúrák szinaptikus kapcsolatrendszerben elfoglalt helyzetét kvantitatív elektronmikroszkópos immuncitokémia segítségével vizsgáltuk a medialis striatumban, valamint két másik tanulóval kapcsolatos agyterületen: a hippocampusban és a prefrontalis kéreg szerepét betöltő poszterolaterális telencephalonban. Megállapítottuk, hogy a

glutamát immunreaktív axonterminalisok preferenciálisan létesítenek aszimmetrikus szinapszisokat DARPP-32 tartalmú dendritekkel ill. tüskékkel mind a hippocampusban, mind a poszterolaterális telencephalonban. A medialis striatumban azonban a glutamát immunreaktív boutonok jelentős számban szinaptizálnak DARPP-negatív dendritekkel. Ez utóbbi struktúrák jelenlétét már korábbi fénymikroszkópos vizsgálataink is valószínűsítették, kémiai azonosításuk folyamatban van. Az elektronmikroszkópos munka közzésre előkészített állapotban van.

3. Excitatorikus aminosavak a striatalis rendszerben. Az aszpartát lehetséges szerepe az elhárító tanulási folyamatban.

3.1. Excitatorikus aminosavak és aminok extracelluláris követése.

In vivo mikrodialízis és HPLC segítségével folyamatosan követtük a passzív elhárító tanulás valamint az appetitív és averzív kondicionálás során a striatumban bekövetkező neurotranszmitter változásokat. A vizsgálatokba bekapcsolódott HPLC mérések révén a Dr. Juhász Gábor vezette ELTE akadémiai munkacsoport (Dr. Kékesi Adrienna Katalin), valamint egy japán kollaborációban Naoya Aoki doktorandusz (Nagoya, Japán). Az előzetes eredmények szerint az averzív kondicionálás során az összes vizsgált aminosav és amin közül a legmarkánsabb válaszokat az aszpartát mutatja. Az aszpartát szöveti koncentrációja a tesztelési fázisban, a memória felidézésekor, szignifikánsan csökken a medialis striatumban. Ez összefügghet a medialis striatum szuppresszor szerepével, amely - tanult averzív asszociáció esetén – meggátolja a fiatal madár természetes csipegetési válaszát. Az aminosav méréseket altatott állatokban is elvégeztük, ilyen esetben az alapvonal stabilabb, és a fenti változáshoz hasonló mértékű aszpartát-szint változások sem mutatkoznak. Altatott kontroll állatokból még szükséges néhány további vizsgálat elvégzése. A mérőrendszer zajának csökkentése és a stresszmentes kezelés szükségessé tesz bizonyos technikai módosításokat, amelyekkel az adatok szórását tovább redukálhatjuk. Az eredmények összegzése megtörtént, kongresszusi előadásban elhangzott (**Zachar et al., 2005**), további kiegészítésük és közzésre előkészítésük jelenleg folyamatban van.

3.2. Az aszpartát szelektív előfordulása a striatum és a striatumra vetítő agyterületek egyes neuroncsoportjaiban.

Az in vivo mikrodialízis mérések eredményei abba az irányba mutatnak, hogy a medialis striatumban aszpartátra épülő jelátviteli mechanizmus működhet. Az aszpartát glutamáttal korrelált előfordulását a medialis striatumba vetítő agyterületeken kettős

immunfluoreszcens módszerrel valamint immun-elektronmikroszkópiával tanulmányoztuk. Megfigyelésünk szerint a arcopallium (amygdala-homológ agyterület) jelentős számban tartalmaz olyan neuronokat, amelyek immunreaktívak aszpartáttal szemben, azonban glutamáttal szemben nem. Maga a medialis striatum is tartalmaz szelektíven aszpartáttal reagáló neuronokat. Ezek az eredmények, az előző funkcionális vizsgálattal összhangban felvetik annak lehetőségét, hogy az aszpartát szelektív viselkedési válaszokban szerepelhet bizonyos striatummal összefüggő neuronrendszerekben. E felismerés, amennyiben további megalapozást nyer, túlmutat a madarak központi idegrendszerének vizsgálatán, hiszen az amygdalo-striatalis ill. amygdalo-accumbens pályák nagyfokú homológiát mutatnak a különböző gerincesek idegrendszerében. Az aszpartát (ill. a végződéseken felszabaduló aszpartát/glutamát arány) sajátos viselkedési relevanciája e transzmitter aminosav új, eddig nem bizonyított szerepét valószínűsítheti a megerősítéshez szükséges visszacsatolásban és az azzal kapcsolatos tanulásban. A munka közlemény formájában megjelent (**Ádám és Csillag, 2006**).

Mind maga a medialis striatum, mind az arra vetítő arcopallium fontos szerepet játszik a házicsirke táplálkozásához szükséges döntéshozatali mechanizmusban, különösen a nyereség- és kockázatbecslésben, és valószínűleg az azzal kapcsolatos emléknym-rögzítésben. Erre utalnak japán kollaborációs partnereinkkel (Nagoyai Egyetem) közös viselkedésbiológiai munkáink, amelyekben a ventralis striatum léziója után impulzív táplálékválasztás kialakulását figyeltük meg (**Aoki et al., 2006b**), míg az arcopallium intermedium szelektív léziója után a csirkék averziós választ mutattak a táplálék kiválasztásában (**Aoki et al., 2006a**). Az utóbbi munkák nem közvetlenül a jelen pályázat keretében valósultak meg, azonban az észleletek relevanciával bírnak a pályázat több témájára is, azok fontos viselkedésbiológiai hátterét adják. Az amygdalo-striatalis ill. amygdalo-accumbens pályarendszer kiemelt jelentőségére a madár motivációra épülő viselkedés-szervezésében saját munkáink is rámutattak (**Csillag et al., 2006**).

4. Cannabinoid receptorok szerepe házicsirke tanulási és motivációs folyamataiban.

Megkezdjük a cannabinoid (CB1) receptor immunreaktív struktúrák feltérképezését a madár előagyban. A receptor immuncitokémiához és a cannabinoid témához segítséget nyújtott az amerikai Nathan Kline intézettel (Orangeburg, USA) folytatott együttműködés (B. L. Hungund laboratóriuma). Ebből az anyagból kongresszusi posztert mutattunk be (**Ádám et al, 2005**), közzlése előkészületben van.

Az előző témához kapcsolódva, Wenger Tibor professzorral együttműködve (Humánmorfológiai Intézet) megvizsgáltuk, hogyan hat a CB1 receptor agonista házicsirke passzív elhárító tanulására. Az eddigi, biztató eredmények alapján az ágens gátolja az emléknym-rögzülést, a memória konszolidációs fázisában, a második fehérjeszintézis-hullám idején fejt ki hatását, és e hatás dóziszfüggő. A már bemutatott kongresszusi előadást követően ezt a munkát is még az év folyamán közlésre benyújtjuk.

Személyi változások

Az eredeti szerződésben szereplő kutatótársak közül Dr. Mezey Szilvia gyermekszülés miatt csak egy évig, 2003-ban tudott a programban részt venni. Helyét a hátralévő 3 évben Ádám Ágota doktorandusz hallgató vette át (ő a szerződésben még hallgatóként volt feltüntetve, mert csak később kapta meg a PhD hallgatói státuszt). Ugyancsak 3 évre csatlakozott a projekthez a szerződésben még nem szereplő Bálint Eszter doktorandusz. Ezekről a változásokról függetlenül, valamennyi a szerződésben feltüntetett kutató tevőlegesen, publikációk szintjén részt vett a kutatóprogram megvalósításában.

Irodalmi hivatkozások

- Ádám ÁS and Csillag A (2006) Differential distribution of L-aspartate and L-glutamate immunoreactive structures in the arcopallium and medial striatum of the domestic chick (*Gallus domesticus*), *J. Comp. Neurol.* 498, 266-276.
- Ádám ÁS, Wenger T, Hungund BL, Csillag A (2005) Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the chick brain and its implications in passive avoidance learning, *ICRS 15th Annual Symp. on the Cannabinoids, Florida, USA*
- Aoki N, Csillag A, Matsushima T (2006a) Localized lesions of arcopallium intermedium of the lateral forebrain caused a handling-cost aversion in the domestic chick performing a binary choice task, *Eur. J. Neurosci.* 24, 2314-2326.
- Aoki N., Suzuki R., Izawa EI, Csillag A., Matsushima T. (2006b) Lesions of ventral striatum, but not arcopallium, enhanced impulsiveness in choices based on anticipated spatial proximity of food rewards in domestic chicks, *Behav. Brain Res.* 168, 1-12.
- Bálint E, Kitka T, Zachar G, Ádám Á, Hemmings HC Jr, Csillag A (2004) Abundance and location of DARPP-32 in striato-tegmental circuits of domestic chicks, *J. Chem. Neuroanat.* 28, 27-36.

- Bálint E, Csillag A (2007a) Nucleus accumbens subregions: hodological and immunohistochemical study in the domestic chick (*Gallus domesticus*), Cell Tiss. Res. 327, 221-230.
- Bálint E, Csillag A (2007b) A ventrobasalis előagy efferens kapcsolatai házicsirkében, MITT XI. Konferenciája, Szeged, p. 182.
- Csillag A (1999) Striato-telencephalic and striato-tegmental circuits: relevance to learning in domestic chicks, Behavioural Brain Research, Special Issue 'Avian Behavioural Neuroscience' (Eds: A Csillag, AD Székely, MG Stewart), 98, 227-236.
- Csillag A., Montagnese C.M., Zachar G., Bálint E., Szabo A. (2005) Subpallial circuits with a bearing on motivation and learning, Avian Brain Conference, Budapest 2005, Abs. book p. 20.
- Csillag A., Montagnese CM. (2005) Thalamotelencephalic organization in birds, Brain Res. Bull. 66, 303-310.
- Csillag A, Zachar G, Ádám Á, Bálint E (2006) Amygdalo-striatal input regulating avoidance learning of domestic chick, Clinical Neurosci. 59, Abs. of IBRO Workshop, p. 25.
- Hanics J, Zachar G, Tóth Cs, Csillag A, Székely AD (2006) Tyrosine hydroxylase and serotonin containing elements within the ventral tegmental area of rat and chicken, Clinical Neurosci. 59, Abs. of IBRO Workshop, p. 25.
- Kabai P, Stewart MG, Tarcali J, Csillag A (2004) Inhibiting effect of D1, but not D2 antagonist administered to the striatum on retention of passive avoidance in the chick, Neurobiol. Learn. Mem. 81, 155-158.
- Mezey S, Csillag A. (2002) Selective striatal connections of midbrain dopaminergic nuclei in the chick (*Gallus domesticus*), Cell Tiss. Res. 308, 35-46.
- Mezey SE, Csillag A (2003) The light and electron microscopic characterization of identified striato-ventrosegmental projection neurons in the chick (*Gallus domesticus*), Neurosci. Res. 47, 299-308.
- Montagnese CM, Mezey SE, Csillag A (2003) Efferent connections of the dorsomedial thalamic nuclei of the domestic chick (*Gallus domesticus*), J. Comp. Neurol. 459, 301-326.
- Montagnese CM, Székely AD, Ádám Á, Csillag A (2004) Efferent connections of septal nuclei of the domestic chick (*Gallus domesticus*): An anterograde pathway tracing study with a bearing on functional circuits, J. Comp. Neurol. 469, 437-456.

- Montagnese CM, Zachar G, Patai Á, Szabó A, Csillag A (2005) Afferent connectivity of the septal area in relation to motivation and learning of domestic chicks, *Clinical Neurosci.* 58, Abs. Book p. 67.
- Stewart MG, Kabai P, Harrison E, Steele RJ, Kossut M, Gierdalski M, Csillag A, (1996) The involvement of dopamine in the striatum in passive avoidance training in the chick. *Neuroscience*, 70, 7-14.
- Székely AD, Montagnese CM, Csillag A (2005) Serotonergic innervation of the avian ventral tegmental area, *Clinical Neurosci.* 58, Abs. Book p. 91.
- Székely AD, Hanics J, Csillag A. (2006) Glomerular synapse of the avian ventral tegmental area, *Clinical Neurosci.* 59, Abs. of IBRO Workshop, p. 61.
- Zachar G, Aoki N, Kékesi AK, Juhász G, Kabai P, Csillag A (2005) Behaviour related changes in extracellular level of amino acids in the medial striatum of the domestic chick: An in vivo microdialysis study, *Clinical Neurosci.* Abs. Book p. 107.