

**A medialis prefrontalis kéreg szerepe a
tanulási-jutalmazási folyamatokban**

Doktori (PhD) értekezés

Petykó Zoltán

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR**

**Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola
Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Szekeres Júlia
Programvezető: Prof. Dr. Karádi Zoltán
Témavezető: Prof. Dr. Lénárd László**

Pécs, 2016

Rövidítések jegyzéke

Acb: nucleus accumbens
AcbC: nucleus accumbens core
AcbSh: nucleus accumbens shell
ACe: az amygdala centralis magja
aCg: anterior cingularis kéreg
A-O: "action-outcome"
BSS: magatartási jóllakási szekvencia ("behavioral satiety sequence")
BL: "before licking cluster"
BLA: az amygdala basolateralis magja
CMS: centrális motivációs állapot
CR: kondicionált válasz
CRf: kondicionált megerősítés
CTA: kondicionált ízaverzió
CS: kondicionált inger ("conditioned stimulus")
CS+: jutalmazott CS
CS-: nem jutalmazott CS
DA: dopamin
ERN: hibázási negativitás ("error related negativity")
LC: "licking cluster"
MD: thalamus mediodorsalis magja
mPFC: medialis prefrontalis kéreg
OFC: orbitofrontalis cortex
PETH: esemény körüli időhisztogram ("perievent time histogram")
PFC: prefrontalis kéreg
PIT: pavlovi-instrumentális transzfer
PL: prelimbicus kéreg
PSTH: peristimulus időhisztogram ("peristimulus time histogram")
s.e.: az átlag standard hibája
S-R: stimulus-válasz ("stimulus-response")
UR: feltétlen válasz ("unconditioned response")
US: nem kondicionált inger ("unconditioned stimulus")
VTA: ventralis tegmentalis area

Bevezetés

Az idegrendszer működésével kapcsolatban az egyik legfontosabb és legizgalmasabb kérdéskör a tanulás. Konkrétan a kérdés az, hogy egy emlős egy adott szituációban mit tanul meg, melyek azok az agyterületek, amelyek a tanulás bizonyos aspektusaiban szerepet játszanak, és hogyan működnek a neuronhálózatok a tanulás során. Az itt bemutatott disszertációban édes ízű cukoroldattal, tágabb értelemben a táplálékkal jutalmazott motivált magatartással foglalkozunk. Úgy a tanulás, mint a nem tanult, illetve már megtanult (kondicionált) magatartás során központi szerepet tölt be a motiváció.

Grastyán Endre a motivációkutatás három szakaszát különítette el: a pszichológiai, a neurophysiologiai és incentive szakaszokat (Grastyán, 1976). A pszichológiai szakaszban, mely az 1910-es évektől a korai 1950-es évekig tartott, a motivációt egy közbeeső változónak tekintették, mely a kutató által objektív módon kontrollálható és manipulálható, például táplálékmegevonással az éhség esetében. A pszichológiai szakaszban jelentek meg a motiváció és megerősítés első nagy szisztematikus elméletei. Ilyen Hull „drive”-redukciós elmélete (Hull, 1943) és a hatás törvénye (Thorndike, 1911). A hatás törvényének megfogalmazásától kezdve, a válaszmegerősítés elve egyre elfogadottabbá vált, mint legfontosabb mechanizmus, amely a magatartás változását magyarázza a tanulás következtében (Skinner, 1938; Hull, 1943; Skinner, 1953). A motivációkutatás neurophysiologiai szakasza a diffúz aktivációs elv megfogalmazásával vette kezdetét (Moruzzi and Magoun, 1949). Hebb összefoglalója szerint (Hebb, 1955) "a motiváció egy motor nem egy kormány". Ez azt jelenti, hogy a motiváció egy önmagában céltalan hajtóerő, aminek az irányát más mechanizmusok adják meg. Az 1950-es évektől kezdve egyre nagyobb jelentőséget nyert az incentive-motivációs elv (Bolles, 1967; Bindra, 1968). Bindra koncepciójának középpontjában a centrális motivációs állapot áll ("central motiv state"; CMS). A CMS-t az organizmikus állapot és a környezeti ingerek együttesen hozzák létre. Elméletében elveti a korábbi elképzelést, miszerint a tanulás lényege a válasz megerősítése. Szerinte a nem kondicionált incentive stimulusok hatására a kondicionált stimulusok incentive értéket nyernek, és képesek lesznek a CMS-t befolyásolni az US-hez hasonlóan.

Az 1950-es években több, módszerként a hypothalamus elektromos ingerlését használó kísérlet ahhoz a következtetéshez vezetett, hogy a motiváció nem egyszerűen egy elméleti folyamat, hanem van egy neuronális szubsztrátuma. Az egyik ilyen, alapvető felfedezés az elektromos öningerlés, Olds és Milner által, akik hypothalamus motivációra gyakorolt hatását vizsgálták patkányban (Olds and Milner, 1954). Grastyán több kísérletben tanulmányozta a "kondicionált reflex" aktivációját (Grastyán és mts., 1956; Grastyán és mts., 1965a). A hypothalamus bizonyos területeinek elektromos ingerlése kondicionált választ váltott ki a kondicionált inger jelenléte nélkül, vagy gátolta a kondicionált inger által kiváltott kondicionált választ ("conditioned response": CR). Agyi lassú hullámok regisztrálásával kimutatták, hogy a kontra- és ipsziverzív direkt és "rebound"-hatások szigorúan korrelálnak a hippocampális theta-aktivitással (megközelítési reakció) és deszinkronizációval (eltávolodás) (Grastyán et al., 1965).

A disszertációban leírt egyik kísérletünk során pavlovi kondicionálást alkalmaztunk. A pavlovi kondicionálás során a kísérletező, a kísérleti állat magatartásától függetlenül, a környezeti ingerek közötti kontingenciákat rendezzi el. Egy kezdetben semleges környezeti ingert egy biológiailag releváns feltétlen ingerrel ("unconditioned stimulus"; US) társítunk. A társítás következtében a semleges inger kondicionált ingerré ("conditioned stimulus"; CS) válik és az US (pl. táplálék) jelenléte nélkül is kiváltja a kondicionált választ ("conditioned response"; CR, pl. nyáleválasztást). Pavlov magyarázata szerint asszociáció jön létre a CS és az US centrális reprezentációja között. Ezen túlmenően, a pavlovi kondicionálás

következtében több különböző asszociatív reprezentáció is létrejöhet. A kondicionálás modern elméleteiben megfogalmazódott, hogy ezek a különböző asszociációk nem egy egységes folyamat következményei (Wagner and Brandon, 1989). A legegyszerűbb esetben direkt asszociáció jöhet létre a CS és az UR között (S-R). Gyakran S-R tanulás jön létre instrumentális szituációban túltrenírozás során. (Dickinson, 1994). A CS aktiválhatja az affektusnak (félelem vagy jutalomexpektancia) egy reprezentációját. Továbbá asszociáció jöhet létre a CS és az US specifikus sensoros tulajdonságai között. A pavlovi kondicionálás során létrejövő reprezentációk némelyike emóciókkal (pl. félelem) kapcsolatos (LeDoux, 2000).

Az instrumentális kondicionálás során a kísérletező az állat magatartása és egy megerősítő eredmény között rendez el kontingenciát (az eredmény a magatartástól függ). Több különböző pszichológiai folyamat járul hozzá a tanuláshoz és az instrumentális teljesítményhez (Dickinson, 1994). Az ember és az állat magatartása gyakran célirányos és a motivációs állapot által flexibilisen modulálható. Flexibilis reprezentációk jönnek létre állatkísérletben az instrumentális kondicionálás során. Pavlovi CS-ek modulálhatják az instrumentális teljesítményt, ez a pavlovi-instrumentális transzfer (PIT). Az instrumentális, illetve pavlovi kondicionálással kapcsolatban egy említésre méltó jelenség a kondicionált megerősítés ("conditioned reinforcement", CRF). Neutrális inger társítunk egy elsődleges megerősítővel, ezáltal az inger affektív, vagy motivációs értéket nyer, ezután az állat dolgozni fog magáért az ingerért (Mackintosh, 1974).

A disszertációban bemutatott kísérletek elsődleges célterülete a prefrontalis cortex (PFC), ezen belül a medialis PFC (mPFC), ezen belül pedig a prelimbicus cortex (PL). A PFC az amygdala, a nucleus accumbens egy neuronhálózat részeit képezik, melyek központi szerepet töltenek be a motivált magatartásban, illetve tanulásban.

Az amygdala számos magcsoportból álló struktúra, az emóciókkal kapcsolatos folyamatokban különösen a centralis mag (ACe) és a basolateralis amygdala (BLA) játszik szerepet. Az amygdala az emóciókban kulcsszerepet játszó agyterület (Kluver and Bucy, 1939). Úgy a BLA mint az ACe léziója a kondicionált félelemtanulás zavarát okozza (LeDoux, 2000). Jelentős szerepet játszik a táplálékfelvétel szabályozásában (Lenard and Hahn, 1982; Lenard et al., 1982) és a táplálékkal jutalmazott kondicionálási folyamatokban (Hatfield et al., 1996). Kevésbé ismert a BLA szerepe az instrumentális kondicionálásban. A BLA léziója csökkenti az instrumentális választ egy kondicionált megerősítőért (pavlovi CS) (Cador et al., 1989).

A stimulusok motivációs hatásai részben a nucleus accumbensnek (Acb) tulajdoníthatóak. Számos kísérletet végeztek az Acb DA innervációjával kapcsolatban, ami jelentős szerepet játszik a természetes megerősítők jutalmazó, vagy motivációs hatásában és a drogfüggőségben (Hoebel et al., 1983). Az AcbC ("core") fontos a kondicionált lokomotoros megközelítési válaszhoz ("autoshaping"). (Parkinson et al., 2000) és a PIT-hez (Hall et al., 2001). Az AcbSh ("shell") a nem kondicionált stimulusok motivációs hatását közvetíti. Elsődleges megerősítők, mint a táplálék vagy kokain, megnövelik az extracelluláris DA szintet (Bassareo and Di Chiara, 1999). Ezzel szemben a CS-ek hatására az AcbC-ben nő meg a DA szint. Az Acb közvetlen és közvetett módon (az amygdalán és a VTA-n keresztül) kapcsolatban áll az mPFC-vel, és képes annak működését befolyásolni.

Patkányban a PFC magában foglalja a prelimbicus (PL), anterior cingularis (aCg), agranularis insularis és orbitofrontalis kérget (OFC) (Zilles and Wree, 1995). A PL és aCg a medialis prefrontalis kéreg (mPFC) részei. A PFC valamennyi területe hozzájárul a magatartás motivációs szabályozásához.

A prelimbicus cortex felelős az instrumentális kontingencia detektálásért (Balleine and Dickinson, 1998). Feltételezhetően a BLA szerepet játszik az incentív érték centrális reprezentációjában. Kimutatták, hogy a BLA és mPFC összeköttetésének léziója modulálja az

instrumentális választást (Coutureau et al., 2000). Nyúlón (mely a patkányhoz hasonló PL-el rendelkezik) végzett elektrophysiológiai kísérlet egyértelműen igazolta, hogy a PL a pavlovi kondicionálásos tanulásban is részt vesz. (McLaughlin et al., 2002). Újabb kísérletek igazolták az PL jelentőségét a pavlovi "trace"-kondicionálásban. (Pezze et al., 2015).

A primates és rágcsáló aCg hasonló funkciókat lát el. Mindkettő válaszol affektív stimulusokra és mindkettő számos motoros és autonóm rendszert kontrollál. A patkány aCg fontos a magatartás irányításához, ha hasonló CS-ek különböző megerősítőket prediktálnak. Szintén patkány aCg-ben elektrophysiológiai kísérletben "unsigned prediction error"-t kódoló neuronokat mutattak ki (Totah et al., 2009).

Célkitűzések

Az információfeldolgozás vizsgálatának egyik legjobb módszere az egysejtelvezés éber kísérleti állat agyából. Számos ilyen kísérletet végeztek pavlovi, illetve instrumentális kondicionálás során. Több kísérlet igazolta, hogy az mPFC (PL és IL területei) a pavlovi kondicionálásban is részt vesz, ennek ellenére csak néhány kísérletben vizsgálták az appetitív pavlovi kondicionálásban betöltött szerepét.

A disszertációban bemutatott kísérletekben a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Az PL szerepet játszik a motivált magatartás szabályozásában, és a táplálékkal jutalmazott pavlovi "trace"-kondicionálásban. Ezért első kísérletünkben a PL neuronok működését szabadon mozgó patkányokon vizsgáltuk implantált tetród elektródok segítségével. A patkányok (víz ivása után) szabadon ihattak cukoroldatot. Kérdésünk az volt, hogy az mPFC-neuronok aktivitása hogyan változik folyékony táplálékjutalom szabad ivása során, kimutatható-e jutalom expektanciával, illetve a consummatioval kapcsolatos egysejtválasz.
2. Első kísérletünk során kiderült, hogy a PL neuronok nem csak a cukoroldat ivása közben (íz, illetve consumptio), hanem közvetlenül a "licking" előtt is megváltoztatják aktivitásukat. Feltételeztük, hogy ez a válasz jutalom expektanciával kapcsolatos. Ennek vizsgálatára a következő kísérletünkben pavlovi "trace"-kondicionálást alkalmaztunk szintén elektrophysiológiai kísérletben szabadon mozgó patkányon. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy a "licking" előtti egysejtválasz az itató megközelítésével kapcsolatos mozgástól függ-e, vagy valami mástól (pl. jutalomexpektancia) mértük a patkány mozgását a fejen elhelyezett gyorsulásmérővel. Kérdésünk az volt, hogy pavlovi szituációban, hogyan változik a patkány mPFC-neuronok aktivitása a "trace"-kondicionálás különböző fázisai alatt, illetve, hogy megjelenik-e a jutalom expektanciával kapcsolatos egysejtválasz.
3. Az mPFC (aCg, és PL) a motivációval kapcsolatosan jelentős inputot kap a BLA-ból és a VTA-ból. Ezért akut kísérletben juxtacelluláris elvezetéssel vizsgáltuk az mPFC-neuronokat, miközben a BLA-t és/vagy a VTA-t elektromosan ingereltük. A vizsgált neuronokat juxtacelluláris mikroionophoreticus eljárással Neurobiotinnal töltöttük, amit szövettani eljárással (ABC-Peroxidáz, Ni-DAB, ezüstözés) vizualizáltunk. Vizsgáltuk a mPFC-ben található különböző morfológiájú neuronok és az elektrophysiológiai választípusok közötti összefüggés. Továbbá elemeztük,

hogy a neuronok egy csoportja konvergens mono- vagy polysynapticus inputot kap-e a BLA-ból, illetve a VTA-ból.

Kísérletek

Elektrophysiológiai kísérletek szabadon mozgó patkányon cukoroldat szabad ivása során

Módszerek

Kísérleti állatok

Három, hím Wistar patkányt (400-500g) használtunk. Az állatokat naponta "handling"-eltük, és 12-12 órás világos/sötét periódus alkalmazásával egy hőmérséklet kontrollált ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) viváriumban tartottuk. Az elektródák implantálását megelőzően standard laboratóriumi patkánytáp (CRLT/N, Charles River Laboratories, Budapest, Hungary) és csapvíz ad lib. állt rendelkezésre. Azért, hogy a magatartási kísérletek alatti vízfelvételt motiváljuk, a patkányok vizet csak az operáns dobozban, a kísérletek alatt és az ezt követő 20 percen (konstans motiváció valamennyi kísérlet során) a lakóketrecben kaptak. A testsúlyt rendszeresen mértük és a normál testtömeg 80-90%-án tartottuk.

Elektródák implantálása

A kísérletek megkezdése előtt a patkányokat 8 tetróddal feltöltött nyomtatott áramkör alapú (PCB) "microdrive"-val implantáltuk (Toth et al., 2007; Petyko et al., 2009) (Bregma AP: 2,7-3,7; DV: 3,2-4,4; ML: 0,5-0,8 Paxinos és Watson atlaszának megfelelően) (Paxinos and Watson, 1996). A műtétek során Na-pentobarbital (60 mg/kg Nembutal, Phylaxia-Sanofi, Magyarország) anesthesiát alkalmaztunk.

Magatartás

Kísérleteinket két hét felépülési idő után kezdtük el egy 40 x 40 cm-es operáns dobozban. A kísérleti ülések között a patkányok nem ihattak, de a táplálék (lásd fent) továbbra is ad libitum rendelkezésre állt. A kísérleti ülések alatt az állatok először vizet ihattak telítődésig, 17-34 perc alatt 13-27 ml-t ittak. Ezután a vizet tartalmazó palackot 5% szacharózzal tartalmzó palackra cseréltük ki. Ezt az oldatot a patkányok szintén telítődésig itták. Egy kísérleti ülés alatt (60 perc) az állatok 23-35 ml cukoroldatot ittak. Az állatok magatartását webkamerával rögzítettük a Spike2 programcsomag "videofelvétel" funkciójával (10 kép/s). A patkányok ivási mintázatának egy fontos egysége a "licking

cluster"^{**}. A "licking cluster" kezdetét egy legalább 0,5 s-os szünet előzi meg (Davis and Smith, 1992). Minden "licking cluster" (15-30 per ülés) kezdetét a videófelvétel elemzésével határoztuk meg 0,1 másodperces felbontással.

Elektrophysiológiai adatok gyűjtése

Az adatgyűjtő rendszert rendszeresen teszteltük egy 32-csatornás miniatűr jelgenerátor segítségével (Mathe et al., 2007). Az elektrophysiológiai adatgyűjtéshez a 32-csatornás "head stage" erősítőt (Noted Bt., Magyarország) a "microdrive"-val egybeépített elektródinterfaceboardhoz csatlakoztattuk (Toth et al., 2007). A 8 tetródot a kísérleti ülések után 150 µm-es lépésekben mozgattuk. Minden tetród mozgást feljegyeztünk. Az előerősítő kimeneteit egy kábelen keresztül a tetródszelektor (Noted Bt) bemeneteihez csatlakoztattuk. A legjobb minőségű jeleket adó két tetródot a szelektor segítségével a kísérleti ülés kezdetén választottuk ki. Az így kiválasztott 8 csatornát Axon Cyberamp 380 erősítő (Axon Instruments, Foster City, California, USA) segítségével szűrtük (300-6000 Hz) és erősítettük. Az erősített jeleket 41 kHz-es mintavételezési frekvenciával digitalizáltuk CED micro interface (Cambridge Electronic Designs) segítségével. Az adatokat a Spike2 program segítségével jelenítettük meg, PC-n rögzítettük és elemeztük.

Elektrophysiológiai adatok elemzése és szövettani értékelés

Az offline analízis során a nyers elektrophysiológiai adatokat digitálisan szűrtük (700-3000 Hz), a Spike2 program principális komponens analízis és matematikai "cluster"-analízis funkciója segítségével a "spike"-okat "cluster"-ekbe válogattuk szét. A kísérleti ülések adatait "perievent"-időhisztogramok segítségével ábrázoltuk (PETH). Szignifikáns aktivitásváltozások igazolására a PETH adataira alkalmazható Poisson-tesztet használtunk (Dorrscheidt, 1981). A kísérletek végeztével toluidinkékfestés segítségével határoztuk meg az elektródák szúrscsatornáit. A pontos elvezetési helyeket a metszetek mikroszkópos vizsgálatával rekonstruáltuk, figyelembe véve az elektródák mozgását a feljegyzett adatok szerint.

Eredmények

Neuronális válaszok

A vizsgált 76 neuron közül 38 változtatta meg szignifikánsan az aktivitását a cukor oldatta kapcsolatosan (konfidenciaintervallum 99%). Ezen neuronok többsége (38-ból 33) csak a cukoroldat fogyasztásával kapcsolatban változtatta meg aktivitását. Csak 5 neuron változtatta meg aktivitását a "licking cluster" kezdetéhez csatoltan függetlenül attól, hogy a patkány cukoroldatot vagy vizet ivott.

^{**} A „licking cluster”-nek nincs magyar megfelelője, sőt a magyarosítási kísérlet inkább félrevezető lenne, ezért a továbbiakban az angol kifejezést használjuk.

A "licking cluster"-ek kezdetéhez időben kapcsolt és ezeket közvetlenül megelőző neuronális válaszok

A válaszoló neuronok több mint fele (n=20) aktivitását a "licking cluster" előtt változtatta meg ("before licking cluster" (BL) neuronok).

Excitátoros "before licking cluster" sejtek

A fenti 20 neuron többsége (n=16) 0,2-1,0 s intervallumban a "licking cluster"-ek kezdete előtt maximális aktivitást mutatott (excitátoros BL neuronok). Ez utóbbiak közül 3 szintén válaszolt víz ivására, de nem volt szignifikáns különbség a csapvízre és a cukoroldatra adott válaszok között. Valamennyi excitátoros BL neuronra hasonló válaszmintázat volt jellemző. A neuronok aktiválódása 0,6-1 szekundummal, a tüzelési frekvencia maximuma pedig 0,6-0,3 szekundummal volt a "licking cluster"-ek kezdete előtt. A neuronok aktivitása "licking cluster"-t megelőző 0,2 másodperces időintervallum alatt visszatért az alapvonalra.

Inhibitoros "before licking cluster" sejtek

A BL neuronok egy kisebb hányada maximális gátlás alá került a "licking cluster"-ek kezdete előtt (inhibitoros BL neuronok). A válaszok időbeli lefutása hasonlított az excitátoros BL neuronokéhoz. A neuronok maximális gátlása a "licking cluster"-ek kezdete előtti 1,2 szekundum és a "cluster" kezdete között volt. Ezen sejtek közül egyik sem válaszolt vízre.

A "licking cluster"-ek alatt válaszoló neuronok

A válaszoló neuronok egy másik jelentős csoportja (n=18) tüzelési frekvenciáját a "licking cluster" kezdete után változtatta meg ("licking cluster" (LC) neuronok).

Excitátoros "licking cluster" sejtek

Ezen neuronok többsége (n=11) növelte tüzelési frekvenciáját 0,3-1,2 szekundummal a "cluster" kezdete után (excitátoros LC neuronok). Csak egy excitátoros LC neuron válaszolt csapvízre is, ezen sejt vízre, illetve cukorra adott válasza között nem volt szignifikáns különbség. Valamennyi excitátoros LC neuronra hasonló időbeli lefutású aktiválódás volt jellemző, a tüzelési frekvencia növekedését 0,3-1,2 szekundummal a "cluster" kezdete után figyelhattuk meg. A BL excitátoros neuronokkal ellentétben a megnövekedett tüzelési frekvencia lecsengése változatos volt. A neuronok többségének aktivitása 2 sec alatt visszatért az alapszintre. Két neuron szignifikánsan megnövekedett tüzelési frekvenciát mutatott a "licking cluster"-ek végéig.

Inhibitoros "licking cluster" sejtek

Az LC neuronok egy kisebb csoportja (n=7) csökkentette tüzelési frekvenciáját cukoroldat ivása közben (inhibitoros LC neuronok). Az LC excitátoros neuronokhoz hasonlóan a válasz kezdete konstans, a spontán tüzelési frekvenciára való visszatérés variábilis volt. Csak egy inhibitoros LC neuron mutatott szignifikáns aktivitásváltozást csapvíz fogyasztására. Ez a neuron a szignifikáns tüzelésifrekvencia-csökkenést viszonylag későn, a "licking cluster" 4. másodpercében érte el.

Elektrophysiológiai kísérletek szabadon mozgó patkányon módosított pavlovi "trace kondicionálás" során

Kérdéseink

Azért, hogy tanulmányozzuk az mPFC jutalom predikcióban betöltött szerepét, mely a stimulus-jutalom társítás következménye, vizsgáltuk, hogy a különböző folyékony táplálékjutalmak egy reprezentációja megtalálható-e a neuronok válaszaiban (i) a különböző CS-ek alatt; (ii) a kondicionált válaszként megjelenő megközelítési magatartás alatt; (iii) az US által kiváltott "nyalási magatartás" alatt (consummatio); (iv) és, hogy vannak-e olyan CS alatt válaszoló neuronok, melyeken a consummatio és a CR reprezentációja is megjelenik.

Módszerek

Kísérleti állatok

A három (400-500 g-os) kísérleti állatot az előző kísérletben leírtak szerint tartottuk.

Elektródák implantálása

Az elektródákat az előző kísérletben leírtak szerint implantáltuk.

Magatartási paradigma és berendezés

A kísérleteket egy 40 x 40 cm-es hangszigetelt dobozban végeztük a világos periódusban. A cukoroldat vagy a víz adagolására két mozgatható (elektromágnessel, számítógépvezérelt) palackos itatót használtunk. Minden kísérleti ülés során a patkányok 23 h vízmegvonás után kerültek a dobozba.. A két különböző jutalmat, az 5%-os cukoroldatot, illetve a vizet két különböző hanggal társítottuk, egy 16 kHz-es hangot cukoroldattal (CS1-US1), egy 8 kHz-es hangot pedig vízzel (CS2-US2). Fix interstimulus intervallumot (24 sec) alkalmaztunk. A 2 másodperces CS-t egy 1 másodperces "trace"-intervallum követte ("trace"-kondicionálás). Ezután következett a 12 másodpercig tartó US. Egy kísérleti ülés alatt (40 perc) 50-50 CS1-US1 illetve CS2-US2 társítás véletlenszerűen váltakozott. Kondicionálás után összesen 24 kísérleti ülés adatait elemeztük.

A nyalogatást az itató csőve és a patkány nyelve között átfolyó kis áram (100 nA) segítségével detektáltuk. A CS kezdetét, az itató megjelenésének pillanatát és a "licking cluster"-ek kezdetét az adatgyűjtő rendszer segítségével rögzítettük ms pontossággal.

Adatgyűjtés és "spike sorting"

A 32 csatornás előerősítőt (Noted Bt., Pécs, Magyarország) a "microdrive"-on található csatlakozó és "interface board" segítségével az elektródákhoz csatlakoztattuk. Az erősítő beépített accelerométert is tartalmazott, mely a fej gyorsulását mérte. A tetródok minden mozgását az agyban a "microdrive" segítségével feljegyeztük. A 8 tetróddal (32 csatorna) elvezetett szélessávú jeleket (0,1 Hz-10 kHz) egy 64 csatornás alacsony feszültségű ($\pm 1,5$ mV) AD konverter segítségével (LVC-64, Noted Bt., Pécs, Hungary) PC-n rögzítettük. A

tárolt szélessávú adatokat offline digitálisan szűrtük (0,8-5 kHz). Automatikus küszöbdetektálás után kigyűjtöttük a "spike"-okat (Csicsvari et al., 1998). Egy "spike" általában a tetród mind a négy csatornáján megjelenik különböző amplitúdójú hullámformaként. Csatornánként meghatároztuk principális komponens analízissel (PCA) a hullámformák első három principális komponensét. Így minden "spike"-hoz egy 12 (4 tetród x 3) dimenziós "feature" vektort rendeltünk (Csicsvari et al., 1998). A feltételezhetően az egyes neuronokhoz tartozó "spike"-okat a "feature" vektorok alapján először egy automatikus klaszteranalízissel válogattuk szét a KlustaKwik software segítségével (Harris et al., 2000). Ezután az így kapott klasztereket egy grafikus klaszterező program segítségével ellenőriztük és tovább finomítottuk (Klusters) (Hazan et al., 2006).

Adatok elemzése

Az adatok offline elemzését, raszterplotok és esemény körüli időhisztogramok ("peri-event time histogram", PETH) kirajzolását és statisztikai elemzését Matlab software illetve linux shell scriptek segítségével végeztük.

Az időben a CS-ekhez, illetve a "licking cluster"-ekhez kapcsolt egysejtválaszok detektálására a PETH-eket használtuk. A "licking cluster" egy olyan nyalogatási sorozat, amelyben az egyes nyalások közötti intervallum kisebb mint 0,5 másodperc (Davis and Smith, 1992). A CS kezdetéhez viszonyítottuk a CS-re adott válaszokat, illetve az ezt megelőző figyelemmel kapcsolatos válaszokat. A "licking cluster"-eket közvetlenül megelőző és ezek kezdetével időben kapcsolt neuronális válaszokat szintén elemeztük, ennek alapján meghatároztuk a CS által kiváltott kondicionált válaszra, konkrétan az itató megközelítésére adott idegi aktivitásváltozásokat. Továbbá elemeztük a "licking cluster"-ek alatti válaszokat, ezek a folyadék jutalom consummatiojával kapcsolatosak.

A PETH-eket normalizáltuk, minden "bin"-hez meghatároztunk egy z-értéket feltételezve, hogy az elvárt tüzelési frekvencia (kontroll periódus alapján) Poisson eloszlást mutat. Amennyiben a teszt periódus alatt a z-érték legalább 3 egymást követő "bin"-ben $\geq 2,36$ vagy $\leq (-2,36)$, akkor a neuront az adott eseményre válaszolónak tekintettük $p < 0,01$ szinten (Totah et al., 2009). A populációs aktivitás elemzéséhez a válaszoló neuronok z-értékeit átlagoltuk, illetve varianciaanalízist végeztünk. Amennyiben szükséges volt Tukey HSD tesztet alkalmaztunk post hoc tesztnek ($p < 0,05$).

A patkányok a "licking cluster"-ek előtt határozott mozdulattal megközelítették az itatót. Ezt a potenciálisan kondicionált válaszként (CR) megjelenő megközelítési magatartást a patkány fején található gyorsulásmérő segítségével mértük. Meghatároztuk a palack megközelítése alatti maximális gyorsulást és az így kapott értékeket egyfaktoros ANOVA-val elemeztük ($p < 0,01$). Tukey HSD tesztet alkalmaztunk az egyes szituációk közötti szignifikáns különbségek detektálására ($p < 0,05$).

Szövetteni érékelés

A kísérletek végén a patkányokat urethannal (3 g/kg) túlaltattuk, transcardialisan perfundáltuk és az agyakat a koponyából kivettük. Negyven μm vastagságú metszeteket készítettünk, ezeket toluidinkékkel festettük. A festett metszeteket lefényképeztük, majd ezek alapján az elektródák pozícióját és az elvezetési helyeket rekonstruáltuk (Nikon Optiphot2).

Eredmények

Szövettan

Valamennyi elvezetési hely a prelimbic area (PL) III-IV rétegeiben volt vagy az anterior cingularis area (aCg) és a PL határán. (Bregma AP: 2,2-3,2; DV: 3,2-4,4; ML: 0,45-1,1).

A fej gyorsulása a megközelítési magatartás alatt

A megközelítési magatartást a "licking cluster"-eket közvetlenül megelőző fej gyorsulás mérésével kvantifikáltuk ("first lick"-hez viszonyítva (-1)-0,5 s). A palack megközelítése, a "first lick" időpontjának megfelelően gyakran az US adagolás (itató elérhető) első 2 másodpercében történt (korai megközelítés). A később történő megközelítéseket első megközelítésekre (kései megközelítés) és a "lickig cluster"-ek közötti megközelítésekre (intercluster megközelítés) osztottuk fel. A megközelítés fent meghatározott 3 típusa a 2 különböző US típusal (cukoroldat és víz) 6 különböző szituációt eredményezett. Az egyfaktoros ANOVA szignifikáns fő hatást mutatott a szituáció faktor következtében ($F(5,417)=48.72$, $p<0.0001$). A különböző szituációk páros összehasonlítására a Tukey-féle HSD tesztet használtuk. Szignifikáns különbség volt a korai megközelítések során a két US típus között. A gyorsulások az intercluster megközelítések alatt voltak a legkisebbek, ez esetben nem volt szignifikáns eltérés az US típusok között. Cukoroldat-jutalom esetében szignifikáns különbség volt a korai megközelítés és a két későbbi megközelítés között. Hasonló különbségeket találtunk a víz esetében is.

Neuronális válaszok

Összesen 211 kiértékelt neuron közül 120 (56%) válaszolt legalább egy eseménnyel kapcsolatosan ($|z|>2,36$; $p<0,01$), számos neuron több különböző eseménnyel kapcsolatban is válaszolt.

Neuronális válaszok a CS-ek alatt

Negyvenegy neuron (19%) válaszolt a CS hangok alatt. A CS-ek alatti tüzelésifrekvencia-változásokat a "trial"-típusok szerint (CS1-US1, illetve CS2-US2) és aszerint elemeztük, hogy ivott-e a patkány az adott "trial" alatt. A két különböző "trial"-típus, és, hogy a patkány ivott-e vagy sem, 4 különböző szituációt eredményezett.

Egysejtválaszok

A CS-ek alatt válaszoló neuronok közül 27 fokozta a tüzelési frekvenciát a cukoroldatot vagy vizet prediktáló hangok alatt. Ebből a 27 neuronból 24 csak akkor válaszolt, ha ezt követően az adott "trial" alatt a patkány ivott a prediktált jutalomból. Tizenhat neuron mindkét "cue" hangra válaszolt, 8 neuron csak a cukrot prediktáló hangra, 3 csak a vizet prediktáló hangra adott szignifikáns választ. Az előbbi 27 neuron közül 12 nem csak a jutalmat prediktáló hang alatt, hanem a "licking cluster", vagyis a jutalom elfogyasztása alatt is szignifikáns (serkentő vagy gátló) választ adott.

Egy kisebb neuroncsoport (14) csökkentette a tüzelési frekvenciát a cukoroldatot vagy vizet prediktáló hangok alatt. Ezek közül 11 csak akkor válaszolt a CS-re, ha ezt követően az adott "trial" alatt a patkány ivott a prediktált jutalomból. Hét neuron mindkét CS-hangra válaszolt, 2 csak a cukoroldatot prediktáló hangra, 5 pedig csak a vizet prediktáló hangra válaszolt. A fenti 14 neuron közül 6 különböző válaszokat adott a "licking cluster"-ek alatt.

Populációs aktivitás

Meghatároztuk annak a 27 neuronnak a populációs aktivitását, amely szignifikáns tüzelésifrekvencia-növekedéssel válaszolt legalább egy CS-re. Azon "trial"-típusok alatt, amikor a patkányok ittak a prediktált jutalomból, a z-értékek átlagában egy határozott meredek emelkedés figyelhető meg a CS kezdetét követően. A populációs válasz nagyobb volt a cukoroldatot prediktáló CS alatt. Azon "trial"-ek alatt, amikor a patkányok ittak a prediktált folyadékból a CS-re adott populációs válasz egyértelműen nagyobb volt ahhoz képest, mint amikor nem ittak, ez esetben a CS-ek alatti populációs aktivitás alig különbözött az alapvontól. A kétfaktoros ANOVA szerint szignifikáns hatása volt az idő faktornak ($F(19,2080)=17,19$, $p<0,0001$) és a "trial"-típus faktornak ($F(3,2080)=73,66$; $p<0,0001$). Ezen kívül szignifikáns interakció volt az idő és "trial"-típus faktorok között ($F(57,2080)=4,36$, $p<0,0001$). A Tukey-féle HSD teszt szignifikáns különbséget mutatott azon "trial"-típusok között, amikor ittak cukoroldatból, vagy vízből, és amikor nem ittak a prediktált jutalomból. Ezen kívül, amikor az állatok ittak, szignifikáns különbség volt a különböző jutalmakat prediktáló CS-ekre adott válaszok között.

Meghatároztuk azon 14 neuron populációs aktivitását, melyek szignifikáns tüzelésifrekvencia-csökkenéssel válaszoltak legalább egy CS-re. A serkentő választ mutató neuronokhoz képest a gátló sejtek populációs aktivitása folyamatosan csökkent a CS-t megelőző két másodpercben. Nem volt különbség azon "trial"-típusok között, amikor a patkányok cukoroldatot, és amikor vizet ittak. A serkentő neuronokhoz hasonlóan nagyobb volt a populációs aktivitás azon "trial"-ok alatt amikor a patkányok ittak a prediktált jutalomból. A kétfaktoros ANOVA szerint szignifikáns hatása volt az idő faktornak ($F(19,1040)=14,77$, $p<0,0001$) és a "trial"-típus faktornak ($F(3,1040)=63,17$, $p<0,0001$). Az idő és a "trial"-típus között szignifikáns interakció volt ($F(57,1040)=3,95$, $p<0,0001$). A Tukey-féle HSD teszt szignifikáns különbséget mutatott azon "trial"-típusok között amikor ittak cukoroldatot vagy vizet, és amikor nem ittak a prediktált jutalomból. A serkentő neuronokkal ellentétben, amikor ittak a jutalomból, nem volt különbség a különböző jutalmakat prediktáló CS-ekre adott válaszok között.

A "licking cluster"-ek kezdetéhez időben kapcsolt és ezeket közvetlenül megelőző neuronális válaszok

Valamennyi (211) vizsgált neuron közül 56 (26,5%) változtatta meg tüzelési frekvenciáját közvetlenül a "licking cluster"-ek előtt.

Egysejtválaszok

Összesen 30 (14,2%) neuron szignifikánsan növelte a tüzelési frekvenciát közvetlenül a "licking cluster"-ek előtt. A 30 neuron közül 12 mindkét jutalmat megelőzően válaszolt, 13 csak a cukoroldat ivása előtt, 5 pedig csak víz ivása előtt. A 30 neuron közül 14 különböző válaszokat adott a "licking cluster"-ek alatt.

Hasonló részarányban, 26 (12,3%) neuron szignifikánsan csökkentette a tüzelési frekvenciát közvetlenül a "licking cluster"-ek előtt. A 26 neuron közül 15 mindkét jutalmat megelőzően válaszolt, 8 csak a cukoroldat ivása előtt, 3 pedig csak víz ivása előtt. A neuronok

többsége, 26 neuron közül 22, különböző, többnyire gátló válaszokat (20 gátló; 2 serkentő) mutatott a "licking cluster"-ek alatt.

Populációs aktivitás

Meghatároztuk a "licking cluster"-eket közvetlenül megelőzően serkentő egysejtválaszt mutató 30 neuron populációs aktivitását. A populációs válasz nagyobb volt amennyiben a patkányok cukoroldatot ihattak mint vízivás előtt. A kétfaktoros ANOVA az idő faktor ($F(19,1160)=22,43$, $p<0,0001$) és a "trial"-típus ($F(1,1160)=28,25$, $p<0,0001$) szignifikáns hatását mutatta. Ezen kívül szignifikáns interakció volt az idő és "trial"-típus faktorok között ($F(19,1160)=1,96$, $p<0,01$).

A fent leírt serkentő populációs aktivitás és a fejjorsulás kapcsolatának elemzéséhez a "licking cluster"-ek kezdetét felosztottuk a fej gyorsulásának elemzéséhez használt 6 szituáció szerint. A neuronoknak csak egy kisebb csoportját lehetett bevonni ebbe az elemzésbe, ezért a Tukey-féle HSD teszt nem mutatott adekvát szignifikáns eltérést a különböző szituációk között. Ezért vizsgáltuk a serkentő populációs aktivitást egy külön analízisben, amelyben csak két fázist különítettünk el, aszerint, hogy a "licking cluster"-ek kezdete az US adagolás első 2 másodpercében volt-e (korai szituációk) vagy később (kései/intercluster szituációk). A két megkülönböztetett fázis a 2 US-típussal (cukoroldat vagy víz) 4 különböző szituációt eredményezett. A kétfaktoros ANOVA szerint szignifikáns hatása volt az idő ($F(19,2320)=38,16$; $p<0,0001$) és a szituáció faktoroknak ($F(3,2320)=9,86$; $p<0,0001$). A négy különböző szituáció összehasonlítására a Tukey-féle HSD tesztet használtuk. A két korai szituációt összehasonlítva szignifikáns különbség volt az US típusok között. Ehhez hasonlóan a kései/intercluster szituációkat összehasonlítva szintén szignifikáns különbség volt a két US-típus között. A magatartási eredménnyel ellentétben nem volt különbség a korai és kései/intercluster szituációk között, ha a patkány cukoroldatot ivott. Ehhez hasonlóan nem volt különbség a korai és kései/intercluster szituáció között, ha a patkány vizet ivott.

Meghatároztuk a "licking cluster"-eket közvetlenül megelőzően gátló egysejtválaszt mutató 26 neuron populációs aktivitását. A kétfaktoros ANOVA az idő faktor ($F(19,1000)=22,43$, $p<0,0001$) szignifikáns hatását mutatta. Nem volt szignifikáns hatása a "trial"-típusnak, és nem volt szignifikáns interakció.

A "licking cluster"-ek alatt válaszoló neuronok

Az összes vizsgált neuron jelentős hányada, 211-ből 80 (38%) változtatta meg tüzelési frekvenciáját a "licking cluster"-ek alatt.

Egysejtválaszok

Az ivás alatt válaszoló 80 neuron közül 33 (15%) növelte tüzelési frekvenciáját. A 33 neuron közül 14 minkét jutalomra válaszolt, 9 csak akkor, amikor a patkány cukoroldatot ivott és 10 csak akkor, amikor vizet ivott.

Összesen 47 neuron (22%) csökkentette tüzelési frekvenciáját. A 47 neuron közül 28 minkét jutalomra válaszolt, 12 csak akkor, amikor a patkány cukoroldatot ivott és 7 csak akkor, amikor vizet ivott.

Populációs aktivitás

Meghatároztuk a fenti 33 serkentő választ mutató neuron populációs aktivitását. A populációs aktivitás magasabb volt a "licking cluster"-ek alatt, amikor a patkányok

cukoroldatot ittak. A kétfaktoros ANOVA szerint szignifikáns hatása volt az idő ($F(34,2240)=8,81$, $p<0,0001$) és a "trial"-típus ($F(1,2240)=31,82$ $p<0,0001$) faktoroknak, de nem volt szignifikáns interakció.

Meghatároztuk a 47, gátló választ mutató neuron populációs aktivitását. Szignifikáns hatása volt az idő ($F(34,3220)=50,53$, $p<0,0001$) és a "trial"-típus ($F(1,3220)=71,26$, $p<0,0001$) faktoroknak, de nem volt szignifikáns interakció.

A "licking" ritmussal modulált neuronok

A 211 vizsgált neuronból 19-nél (9%) minden egyes "lick" kezdete körül a tüzelési frekvencia modulációját figyelhettük meg. Tizenkét neuron a tüzelési frekvencia növekedését mutatta közvetlenül a "lick" kezdete után, 7 neuron a tüzelési frekvencia csökkenését mutatta. A fenti 19 neuron közül 2 válaszolt a cue hangokra, 2 a "licking cluster"-ek előtt, 3 pedig a "licking cluster"-ek alatt.

Juxtacelluláris elektrophysiológiai kísérletek altatott patkányon

Keveset tudunk a BLA- és VTA-ingerléssel az mPFC-ben kiváltott egysejszintű elektrophysiológiai válaszok és az ott található neuronok morfológiája közötti összefüggésről. Az itt bemutatott kísérletben elektromosan ingereltük a BLA-t és a VTA-t, az mPFC-neuronokról pedig juxtacellulárisan vezettünk el egysejtaktivitást. A neuronok elektrophysiológiai jellemzése után megkíséreltük a juxtacelluláris jelölésüket Neurobiotinnal (Pinault, 1994). Ezért az itt bemutatott kísérlet célja az volt, hogy a BLA és/vagy VTA ingerlésére válaszoló mPFC-neuronokat Golgi-szerűen jelöljük, hogy ezáltal meghatározzuk az elektrophysiológiai választípusok (Perez-Jaranay és Vives, 1991; Pirot és mts., 1992) és Golgi-tanulmányok során leírt sejtípusok (Vogt and Peters, 1981) közötti összefüggést.

Módszerek

Kísérleti állatok és műtét

Kísérletünkben 83 hím Wistar patkányt (350-400g) használtunk. Az anaesthesiát urethannal végeztük (1,2 g/kg) a patkányokat sztereotaxikus készülékben rögzítettük és műtöttük. A testhőmérsékletet 36,5-37,5 °C-ra állítottuk be egy meleg vizet keringető rendszer segítségével. Ott ahol az elvezető, illetve az ingerlő elektródákat az agyba bevezettük lyukakat fúrtunk a koponyába. A következő sztereotaxikus koordinátákat használtuk (Paxinos and Watson, 1996): BLA stimuláció: Bregma AP: -2,5; DV: 8; ML: 5; VTA stimuláció: Bregma AP: -6,04; DV: 7,4; ML: 0,5; elvezetés az mPFC-ből: Bregma AP: 2,7-3,7; DV: 0,5-3; ML: 0,3-1,5.

A BLA és VTA elektromos ingerlése

A koncentrikus bipoláris ingerlő elektródákat (külső átmérő 200 μm , "tip-ring"-távolság 0,5 mm) mechanikus mikromanipulátorok segítségével (Narishige Japan) vezettük be a BLA-ba és a VTA-ba. A monofázisos egyes négyszögimpulzusokat PSIU6 (Grass) stimulusizoláló-egységgel ellátott Grass S88 stimulátorral generáltuk.

Juxtacelluláris egysejtelvezetés és a neuronok töltése Neurobiotinnal

Az extracelluláris egysejtelvezetéshez üveg mikroelektrodát használtunk (boroszilikát üveg, hegyátmérő 1-2 μm , impedancia 10-50 $\text{M}\Omega$), mely 0,5 M NaCl oldatban 2% Neurobiotint tartalmazott. Az elvezető elektrodát az agyban mechanikus mikromanipulátor segítségével mozgattuk (Eric Sobotka). Az akciós potenciálokat "iontophoreticus" előerősítő (Supertech, Magyarország) és főerősítő (Supertech, Magyarország) segítségével erősítettük és szűrtük (2000x; 300-5000 Hz). Az erősített jeleket Tektronix TDS 210 oszcilloszkóp segítségével monitoroztuk, CED 1401 plus interface (Cambridge Electronic Design Ltd.) segítségével IBM kompatibilis PC merevlemezére írtuk.

A juxtacelluláris elektrophysiológia statisztikus értékelése

Az akciós potenciálokat offline principális komponens és klaszter analízissel a Spike2 program segítségével szeparáltuk. A BLA és a VTA elektromos ingerlésének hatását peristimulus időhisztogram (PSTH) segítségével határoztuk meg. A PSTH-at ("bin"-szélesség 1 ms; "bin"-szám: 400; offset: 100 ms) online és offline a Spike2 program segítségével generáltuk. A szignifikáns aktivitásváltozások kezdetét a peristimulus hisztogram adatait értékelő kumulatív összeg teszt (cumulative sum test: Cusum) segítségével határoztuk meg. Elektrophysiológiai jellemzés után a neuronokat Neurobiotinnal jelöltük (Pinault, 1994). Ehhez egy alacsony zajszintű áramgenerátort használtunk amely extracelluláris elvezetésre alkalmas AC erősítővel volt egybeépítve (Supertech, Magyarország). A morfológiai és elektrophysiológiai típusok gyakorisága közötti összefüggést Fischer Exact Teszttel analizáltuk a Stat 100 program segítségével.

A Neurobiotinnal jelölt neuronok szövettani kimutatása

A Neurobiotin injektálása után egy vagy két órával az állatokat transcardialisan perfundáltuk fiziológias sóoldattal, majd 600 ml phosphat pufferben (PB) oldott 4%-os paraformaldehid oldattal. Az agyakat eltávolítottuk, és 20 órán át 30% szacharózt tartalmazó PB-ben tároltuk. Az agyakból 40 μm vastagságú coronalis metszeteket készítettünk, ezekben a Neurobiotint ABC hisztokémiai eljárással mutattuk ki (Pinault, 1994). Az így keletkező nickel-DAB terméket ezüstözési eljárással intenzifikáltuk (Merchenthaler et al., 1989). A coronalis metszeteket zselatinózott tárgylemezre húztuk fel és Pertex-szel fedtük le. A prefrontalis coticális neuronokat camera lucida (Nikon) segítségével lerajzoltuk, illetve lefényképeztük (Nikon Optiphot 2).

Eredmények

Egysejtválaszok

82 neuronról vezettünk el egysejttevékenységet az mPFC-ből. A neuronok spontán aktivitása 0,2 Hz és 24 Hz között váltakozott. A neuronok mintegy felének spontán aktivitása 1 és 6 Hz között váltakozott. A BLA-ingerlésre 55 neuron válaszolt gátlással, 6 neuron a tüzelési frekvencia fokozódásával, 21 neuron egyáltalán nem válaszolt.

Összesen 30 BLA-ingerlésre válaszoló neuron esetében vizsgáltuk a VTA-ingerlés hatását is. 23 esetben sikerült gátló választ kiváltani, a többi neuron nem válaszolt. A 23 VTA-ingerlésre válaszoló neuron közül 2 serkentő választ mutatott BLA-ingerlésre, 21 neuron csökkentette tüzelési frekvenciáját. A mindkét agyterület ingerlésére gátlással

válaszoló neuronok közül 2 esetben lehetett nagyobb intenzitású VTA-ingerléssel antidromos választ kiváltani.

A Neurobiotinnal töltött neuronok morphológiája

Csak válaszoló neuronok töltését kíséreltük meg Neurobiotinnal. Az 55 válaszoló neuron közül 36 esetben sikerült az elvezetett neuron spontán aktivitását a Neurobiotin iontophoreticus alkalmazása során modulálni. A patkányok agyi metszeteit Neurobiotin hisztokémiával dolgoztuk fel. A 36 feldolgozott patkányból 31 esetben sikerült kizárólagosan egy neuront jelölni a szúracsatorna végén. Amennyiben a szúracsatorna vége a szövettani metszetben felismerhető volt, akkor mindig a feltöltött neuron közvetlen közelében volt, ezért nagy valószínűséggel az elektróda hegye a legtöbb neuron esetében juxtacelluláris pozícióban helyezkedett el.

A jelölt neuronokat korábbi Golgi tanulmányok alapján osztályoztuk (Vogt and Peters, 1981). 1) kis és közepes piramissejtek: a perykarion kevésbé piramis alakú, mérete 8-12 μm , a dendrit-fa elágazódása szegényes, 2) nagy piramissejtek: a perykarion mérete 12-20 μm , a dendritfa gazdagon elágazó, 3) nagy multipoláris sejtek: a perykarion 12-17 μm átmérőjű, 4) kis és közepes multipoláris sejtek: a perykarion 8-12 μm átmérőjű.

A morphologiailag jellemzett neuronok BLA/VTA-ingerlésre adott válasza

Huszonegy válaszoló neuront jelöltünk sikeresen a dorsalis mPFC-ben. Valamennyi (16) "kis és közepes méretű piramissejt" (Vogt and Peters, 1981) válasza a BLA ingerlésére a rövid latenciájú (20-25 ms) gátlás kategóriájába tartozott. A 4 "nagy piramissejt" közül kettő BLA-ingerlésre excitatorikus választ mutatott melyet csendes periódus követett, egy rövid latenciájú (20-25 ms), egy pedig hosszú latenciájú (55 ms) gátló választ mutatott.

A BLA-ingerléssel kiváltott 20-25 ms latenciájú gátlás tekintetében szignifikáns eltérés mutatkozott a "kis és közepes piramissejtek" (valamennyi), illetve a "nagy piramissejtek" (4-ből 2) csoportja között (Fischer Exact teszt; $p=0,0035$). Szintén szignifikáns eltérés volt (csak "nagy piramissejt") a serkentő válaszok tekintetében (Fischer Exact teszt; $p=0,0316$).

A jelölt multipoláris interneuron feltételezhetően monosynapticus serkentő választ mutatott, amit csendes periódus követett.

A jelölt neuronok közül 10 piramissejt a BLA-ingerlésre adott válasz mellett VTA-ingerlésre is válaszolt. A VTA-ingerlésre adott válaszok mind gátlóak voltak. BLA-ingerlésre 9 neuron adott gátló, egy pedig serkentő választ. Két piramis sejt (1 nagy és 1 kis piramis sejt), mely inhibitoros választ adott BLA-ingerlésre, inhibitoros választ adott VTA-ingerlésre, és antidromos serkentő választ adott VTA-stimulációra.

Diszkusszió

A "licking cluster"-ek jelentősége

A folyékony táplálékot a patkány "licking" magatartással fogyasztja el. Ez a magatartás egy komplex motoros tevékenység által valósul meg. A "licking"-ek "burst"-ökbe rendeződnek. A "licking burst"-ön belül a "licking" frekvencia egy adott patkánynál csak szűk tartományban változik és egy centrális motoros mintagenerátor működésének következménye. Ennek működését a nyelv oldalmozgásai szakítják meg, ami 250-500 ms hosszúságú "interburst" intervallumhoz vezet. Egy vagy több "burst" "licking cluster"-t alkot, a "cluster"-eket 500 ms-nál hosszabb szünetek választják el egymástól (Davis and Smith, 1992; Gutierrez et al., 2006). A "licking cluster" motivált magatartás (Gutierrez et al., 2006): a "cluster"-ek mérete és száma a folyékony táplálék ízletességének függvénye és a szatiáció során megváltozik. Ezért az első két kísérletünkben az egysejtaktivitást a "licking cluster" függvényében tanulmányoztuk. Feltűnő válaszok tipikusan a "cluster" kezdete körül jelentek meg, ezért részletesen a "cluster"-ek kezdetének környékét elemeztük.

A cukoroldat jelentősége

Az mPFC számos olyan agyterülettel van összeköttetésben, amely jutalmazási mechanizmusokban játszik szerepet: az orbitofrontális kéreg, a ventralis tegmentális area, a hypothalamus és a nucleus accumbens (Beckstead, 1979). Az OFC és az mPFC közötti kétirányú kölcsönös kapcsolat megszakítása a jutalom íze és helye közötti asszociáció károsodásához vezet (Schalomon et al., 1994), Sőt mi több, az mPFC extracelluláris dopamin szintje emelkedett új, vagy ízletes táplálék fogyasztása során (Bassareo and Di Chiara, 1999). Ezért feltételeztük, hogy ízletes táplálék fogyasztása során az mPFC-neuronok tüzelési mintázata megváltozik. Ezért kísérleteinkben a neuronális válaszokat egy jutalmazó folyékony táp fogyasztása során jellemeztük.

A "licking cluster"-ek alatt válaszoló neuronok

Mindkét kísérlet során a neuronok jelentős hányada (23%, illetve 38%) változtatta meg tüzelési frekvenciáját a "licking cluster"-ek alatt, mindkét esetben serkentő és gátló válaszokat mutattunk ki. **Eredményeink azt igazolják, hogy a válaszok nem az ivással, mint motoros aktussal kapcsolatosak**, mert az ivásban a két különböző oldat ivása során gyakorlatilag nincs különbség (pl. azonos "licking" frekvencia), az egysejtválaszok viszont eltérőek. Egy újabb cikkben (Horst and Laubach, 2013) a "licking" magatartás kezdetét el lehetett különíteni a jutalom adagolás kezdetétől. Jelen kísérletünkben a "licking" magatartást nem lehetett elkülöníteni a consumptiótól, ennek ellenére feltételezhetjük, hogy mindkettő, azaz a "licking" magatartás és a consumptio hozzájárultak a "licking cluster"-ek alatti egysejtválaszokhoz. Feltételezésünk szerint **a táplálék íze és jutalomértéke jelentős szerepet játszik a válaszok kialakításában**. Ezzel összhangban egy másik újabb cikkben kimutatták, hogy mPFC-neuronok a táplálék sensoros tulajdonságait kódolják, konkrétan a táplálék ízét vagy azt, hogy mennyire kellemes, vagy mindkettőt (Jezini et al., 2013). Összesen 19 neuron modulálta tüzelési frekvenciáját a "licking" ritmusnak megfelelően. Meglepően, a "licking cluster"-ek alatt válaszoló neuronok közül csak 3 neuron modulálta tüzelési frekvenciáját a "licking" ritmusnak megfelelően. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy **a "licking cluster"-ek alatti válaszok nem a "licking" ritmus által okozott**

moduláció következményei. Érdekes, hogy, a neuronok többségével ellentétben, néhány neuron nem tett különbséget a cukoroldat és a víz között, elképzelhető, hogy ezen neuronok válaszai magával a consumptioval kapcsolatosak (Horst and Laubach, 2013).

Közvetlenül a "licking cluster"-ek előtt válaszoló neuronok

Jutalompredikcióval kapcsolatos egysejtválaszokat mutattak ki majom dorsolaterális PFC-ben (Watanabe, 1996), egy olyan agyterületen, amelyik részben a patkány mPFC-nek felel meg (Gabbott et al., 2003).. A disszertációban bemutatott két kísérlet során a neuronok 26%-a változtatta meg tüzelési frekvenciáját közvetlenül a "licking cluster"-ek előtt. Feltételeztük, hogy ezek a válaszok jutalomexpektanciával kapcsolatosak, de az első kísérletben ezt nem lehetett igazolni. Ezt figyelembe véve terveztük a második kísérletet, amelyben pavlovi szituációban a "korai megközelítés" során az itató megközelítése CS függő pavlovi CR, ennek megfelelően ebben az esetben közelítették meg az itató a leggyorsabban (legnagyobb fejjorsulás). Az a tény hogy a neuronok populációs válasza azonos volt a "korai megközelítések" illetve a "kései/intercluster megközelítések" alatt, azt a feltételezést igazolja, hogy **az egysejtválaszok többsége nem a megközelítési reakcióval, hanem jutalomexpektanciával kapcsolatos.** Valóban, egysejtszinten számos neuron mutatott a megközelítési reakciótól független válaszmintázatot, néhány neuron azonban a fejjorsulásoknak megfelelően modulálta tüzelési frekvenciáját, vagyis **ezeknek a válasza a megközelítési reakcióval volt kapcsolatos.** Nyúl mPFC-ben olyan egysejtválaszokat mutattak ki (McLaughlin et al., 2002), amelyek az állmozgással kapcsolatosak (CR), ezek a neuronok válaszolnak a "CS+"-ra, de nem válaszolnak a "CS-"-ra. Eredményeink összhangban vannak az idézett cikkel, mert a korai fázisban a populációsaktivitás-különbséget mutatott a "trial"-típusok szerint, melyek alatt különböző fejjorsulásokat figyeltünk meg a különböző kondicionált válaszok során.

Neuronális aktivitásváltozások a különböző minőségű jutalmakat prediktáló CS-ek alatt

A pavlovi szituációban a neuronok mintegy 1/5-e válaszolt a különböző minőségű jutalmat prediktáló CS-ek alatt. **Kísérletünk feltűnő eredménye, hogy a válaszok többsége azon "trial"-ek alatt volt, amikor a patkányok ittak a jutalomból.** A neuronok alig válaszoltak a CS-ekre, amikor a patkányok a nem consummativ magatartási mintázatokra (ágaskodás, mászkálás, vakarózás, exploratio, nyugalom) váltottak, vagyis a magatartást nem a pavlovi szituáció irányítja, tehát **ez a válasz szorosan összefügg magával a pavlovi szituációval.** Ebből arra is következtethetünk, hogy **a válaszok nem a CS sensoros tulajdonságaival kapcsolatosak.** Ezt az állítást támasztja alá az a megfigyelés, hogy néhány neuron mindkét CS-re azonos választ ad, egy másik neuroncsoport a CS1-re, egy harmadik pedig a CS2-re ad nagyobb választ. Appetitív pavlovi kondicionálással kapcsolatos neuronális válaszokat mutattak ki nyúl mPFC-ben (McLaughlin et al., 2002). Különböző válaszmintázatot mutattak ki a jutalommal társított stimulusra (CS+), ezek a válaszok nem jelentek meg a jutalommal nem társított stimulus alatt (CS-). Eredményeink és irodalmi adatok alapján valószínűsíthetjük, hogy az mPFC-neuronok CS hangok alatti válaszai a stimulus-jutalom asszociációt kódolják. Averzív szituációban "trace"-kondicionálás során elektrophysiológiai kísérletben "bridge sejtek"-et mutattak ki (Siegel et al., 2012; Gilmartin et al., 2014), ami szükséges a CS és az US közötti intervallum áthidalásához annak érdekében, hogy létrejöhessen az asszociáció. Ehhez természetesen szükség van a CS-sel kapcsolatos információra. A kísérletünk során választott 1s-os "trace"-intervallum nem tette lehetővé "bridge sejtek" egyértelmű detektálását. Ennek ellenére, **több CS alatt válaszoló neuronnál**

megfigyeltük, hogy a CS után is aktívak maradnak, valószínűleg ezek a "bridge sejtek" közé tartoznak. A fentiek alapján feltételezzük, hogy **a CS alatt válaszoló neuronok egyik fontos funkciója a "trace"-intervallum áthidalásával kapcsolatos**. Általánosan elfogadott, hogy az mPFC egyik funkciója a magatartás gátlása (Ongur and Price, 2000). Ezzel összhangban van az a feltűnő eredményünk, hogy a nem consummatív magatartási mintázatok megjelenése közben a neuronok nem csak a CS-re nem válaszolnak, hanem semmilyen, a magatartással összefüggő aktivitást nem mutatnak, és sok neuron spontán aktivitása is csökken. Elképzelhető, hogy ilyenkor a felsorolt magatartásformák gátlása megszűnik, a pavlovi kondicionálás alatt pedig ezek magatartásformák gátlás alá kerülnek.

BLA és VTA elektromos ingerlésével kiváltott egysejtválaszok az mPFC-ben

Kísérleteinkben a BLA és VTA elektromos ingerlésével kiváltott tüzelésifrekvencia-változásokat vezettünk el az mPFC-ből altatott patkányon. **Az mPFC-neuronok mintegy kétharmada adott gátló választ a BLA ingerlésére, a neuronok egy kisebb hányada serkentő választ adott** a maradék egyharmad nem válaszolt. A választípusok és spontán tüzelési frekvenciák megfeleltek korábbi irodalmi adatoknak (Perez-Jaranay és Vives, 1991; Pirot és mts., 1992; Floresco és Tse, 2007).

Az mPFC neuronok morfológiája

A Neurobiotinnal jelölt neuronok morfológiája a korábbi Golgi tanulmányoknak megfelelő volt (Vogt and Peters, 1981), de különösen az immunhisztokémiai eredményekhez képest (Gabbott et al., 1997) a különböző interneuron típusokat nem sikerült kimutatnunk. Ennek több, a módszerben rejlő oka is volt. Elektrophysiológiai jellemzés után csak egy neuront jelöltünk, ez a jelölés is csak kb. a neuronok felénél volt lehetséges, így a jelölt neuronok száma viszonylag alacsony volt. Ezen kívül lehetséges, hogy az általunk használt módszer bizonyos sejttípusokra szelektív.

A "kis és közepes méretű piramissejtek" válaszai a BLA/VTA elektromos ingerlésére

Összesen 22 elektrophysiológiailag vizsgált neuront sikerült morfológiailag is jellemezni. Ezekből 16 "kis és közepes méretű piramissejt" volt, **mindegyik ebbe a csoportba tartozó neuron kivétel nélkül rövid latenciájú gátlással (20-25 ms) válaszolt** BLA-ingerlésre. Korábbi és az itt bemutatott eredmények alapján a 20-25 ms latenciájú gátlás a BLA-ingerlésre adott leggyakoribb választípus (Perez-Jaranay and Vives, 1991). Az az eloszlás azonban, hogy valamennyi kis és közepes méretű piramissejt 20-25 ms lateciájú gátlással válaszolt BLA-ingerlésre szignifikánsan eltér egy random eloszlástól (Fischer Exakt teszt; $p=0,0035$). Ebből a neuroncsoportból nyolc VTA-ingerlésre is gátló választ mutatott, egy pedig antidromos serkentő választ is mutatott nagyobb intenzitású VTA-ingerlésre, vagyis a neuron egyik vetülete a VTA, ahonnan bemenetet kap.

A "nagy piramissejtek" válaszai a BLA/VTA elektromos ingerlésére

A négy "nagy piramissejt" közül kettő 7 ms-os "onset" latenciájú (monosynapticus) serkentő, egy rövid latenciájú, egy pedig hosszú latenciájú (polysynapticus) gátló választ mutatott (Beckstead, 1979; Perez-Jaranay and Vives, 1991; Gabbott et al., 1997). Az eredmény arra utal, hogy **ez a pírmisszejtcsoport funkcionálisan eltér a "kis és közepes**

méretű piramis sejtek"-hez viszonyítva a BLA-ból kapott input tekintetében. Egy serkentő, és a hosszú latenciájú gátlást mutató neuron gátlással válaszolt VTA-ingerlésre. Az utóbbi antidromos serkentő választ mutatott a VTA-ingerlésére, vagyis visszavetít a VTA-ba ahonnan bemenetet kap.

A "nagy multipoláris sejtek" válaszai a BLA/VTA elektromos ingerlésére

Az interneuronok közé tartozó "nagy multipoláris sejt" 7 ms "onset" latenciájú (monosynapticus) serkentő bemenetet kapott az irodalmi adatokkal összhangban (Gabbott et al., 2006; Floresco and Tse, 2007). A neuron gátló választ mutatott a VTA-ingerlésére.

Az mPFC (aCg/PL), a BLA és VTA kapcsolatrendszere és szerepe a motivációban

A BLA monosynapticus glutamaterg bemenetet küld az mPFC-be, ami interneuronokon és számos piramis sejten végződik. Parvalbumin-pozitív GABA-erg interneuronok viszont monosynapticusan gátolják a piramis sejteket (Gabbott et al., 2006). A BLA elektromos ingerlése tehát számos piramis sejt monosynapticus ingerléséhez és bisynapticus gátlásához vezet. **Először mutattuk ki, hogy amennyiben a BLA-t elektromosan ingereljük a "kis piramis sejt"-eken a bisynapticus gátlás ("onset" latencia 20-25 ms) dominál. Ezzel szemben a mindössze 4 "nagy piramis sejt"-en monosynapticus serkentést, bisynapticus gátlást és hosszú latenciájú polysynapticus gátlást is sikerült kimutatnunk.** Az utóbbi valószínűleg az MD-n keresztül valósul meg, az innen érkező glutamaterg input, nemcsak piramis sejteken, hanem gátló interneuronokon is végződik (Beckstead, 1979; Perez-Jaranay and Vives, 1991; Gabbott et al., 1997). A VTA-ból származó dopaminerg input a piramis sejteken közvetlenül, illetve az BLA-ból, thalamusból és hippocampusból érkező rostokon presynapticusan végződnek. A VTA elektromos ingerlése általában az mPFC-neuronok masszív gátlásához vezet. **Először mutattunk ki, hogy a "kis piramis sejtek" és a "nagy piramis sejtek" között is található olyan, amelyik konvergens gátló inputot kap a BLA-ból és a VTA-ból és a VTA-ba vetít (antidromos serkentő válasz).**

Az mPFC a BLA és a VTA a motivált magatartás számos aspektusában játszanak szerepet. BLA ledált állatok esetében csökkent a másodlagos megerősítőként szolgáló pavlovi CS-re adott instrumentális válasz (Cador et al., 1989). A BLA szerepet játszik a jutalom incentív értékével kapcsolatban (Malkova et al., 1997). Ezzel szorosan összefügg, hogy nélkülözhetetlen a kondicionált ízaverzió (CTA) kiépítéséhez és fenntartásához (Yamamoto and Ueji, 2011). Ugyancsak a CTA kiépítésének és fenntartásának zavarait mutatták ki az mPFC kainsavas és 6-hydroxydopamin léziója után (Hernádi és mts., 2000; Karádi és mts., 2005). Mivel mindkét struktúra, a BLA és az mPFC szerepet játszanak a CTA-ban, az őket összekötő pályák, melyek a fent leírt elektromos ingerlést közvetítik, szintén befolyásolhatják a CTA-t. A VTA működése viszont a jutalommal összefüggő ingerek incentív motivációs értékével kapcsolatos (Berridge and Robinson, 1998).

Altatott patkányban, elektromos ingerlés során nem állapítható meg, hogy a vizsgált neuronok milyen magatartásformákban játszanak szerepet. Az is biztos, hogy az elektromos ingerléssel létrehozott aktivációs mintázatok eltérnek a fiziologiástól. Ennek ellenére megállapíthatjuk, hogy a motivációban szerepet játszó agyterületekből az információ komplex módon integrálódik az mPFC-ben. Eredményeink alapján elképzelhető, hogy a "kis" és "nagy piramis sejtek" funkcionálisan eltérő párhuzamos rendszerek részei.

Irodalom

- Balleine BW, Dickinson A (1998) Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates. *Neuropharmacology* 37:407-419.
- Bassareo V, Di Chiara G (1999) Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. *Eur J Neurosci* 11:4389-4397.
- Beckstead RM (1979) An autoradiographic examination of corticocortical and subcortical projections of the mediodorsal-projection (prefrontal) cortex in the rat. *J Comp Neurol* 184:43-62.
- Berridge KC, Robinson TE (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev* 28:309-369.
- Cador M, Robbins TW, Everitt BJ (1989) Involvement of the amygdala in stimulus-reward associations: interaction with the ventral striatum. *Neuroscience* 30:77-86.
- Coutureau E, Dix SL, Killcross AS (2000) Involvement of the medial prefrontal cortex-basolateral amygdala pathway in fear-related behaviour in rats. *Eur J Neurosci* 12(Suppl. 11):156.
- Csicsvari J, Hirase H, Czurko A, Buzsaki G (1998) Reliability and state dependence of pyramidal cell-interneuron synapses in the hippocampus: an ensemble approach in the behaving rat. *Neuron* 21:179-189.
- Davis JD, Smith GP (1992) Analysis of the microstructure of the rhythmic tongue movements of rats ingesting maltose and sucrose solutions. *Behav Neurosci* 106:217-228.
- Dickinson A (1994) Instrumental conditioning. In: *Animal learning and cognition* (Mackintosh NJ, ed), pp 45-79. San Diego: Academic Press.
- Dorrscheidt GH (1981) The statistical significance of the peristimulus time histogram (PSTH). *Brain Res* 220:397-401.
- Floresco SB, Tse MT (2007) Dopaminergic regulation of inhibitory and excitatory transmission in the basolateral amygdala-prefrontal cortical pathway. *J Neurosci* 27:2045-2057.
- Gabbott PL, Warner TA, Busby SJ (2006) Amygdala input monosynaptically innervates parvalbumin immunoreactive local circuit neurons in rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 139:1039-1048.
- Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Bacon SJ (2003) Areal and synaptic interconnectivity of prelimbic (area 32), infralimbic (area 25) and insular cortices in the rat. *Brain Res* 993:59-71.
- Gabbott PL, Dickie BG, Vaid RR, Headlam AJ, Bacon SJ (1997) Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: morphology and quantitative distribution. *J Comp Neurol* 377:465-499.
- Gilmartin MR, Balderston NL, Helmstetter FJ (2014) Prefrontal cortical regulation of fear learning. *Trends Neurosci* 37:455-464.
- Grastyan E (1976) Motivation and reinforcement. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 48 (4):299-322.
- Grastyan E, Karmos G, Vereczkey L, Martin J, Kellenyi L (1965) Hypothalamic Motivational Processes as Reflected by their Hippocampal Electrical Correlates. *Science* 149:91-93.
- Gutierrez R, Carmena JM, Nicolelis MA, Simon SA (2006) Orbitofrontal ensemble activity monitors licking and distinguishes among natural rewards. *J Neurophysiol* 95:119-133.

- Hall J, Parkinson JA, Connor TM, Dickinson A, Everitt BJ (2001) Involvement of the central nucleus of the amygdala and nucleus accumbens core in mediating Pavlovian influences on instrumental behaviour. *Eur J Neurosci* 13:1984-1992.
- Harris KD, Henze DA, Csicsvari J, Hirase H, Buzsaki G (2000) Accuracy of tetrode spike separation as determined by simultaneous intracellular and extracellular measurements. *J Neurophysiol* 84:401-414.
- Hatfield T, Han JS, Conley M, Gallagher M, Holland P (1996) Neurotoxic lesions of basolateral, but not central, amygdala interfere with Pavlovian second-order conditioning and reinforcer devaluation effects. *J Neurosci* 16:5256-5265.
- Hazan L, Zugaro M, Buzsaki G (2006) Klusters, NeuroScope, NDManager: a free software suite for neurophysiological data processing and visualization. *J Neurosci Methods* 155:207-216.
- Hebb DO (1955) Drives and the C.N.S. (conceptual nervous system). *Psychol Rev* 62:243-254.
- Hoebel BG, Monaco AP, Hernandez L, Aulisi EF, Stanley BG, Lenard L (1983) Self-injection of amphetamine directly into the brain. *Psychopharmacology (Berl)* 81:158-163.
- Horst NK, Laubach M (2013) Reward-related activity in the medial prefrontal cortex is driven by consumption. *Front Neurosci* 7:56.
- Hull CL (1943) Principles of behavior. New York: Appleton.
- Jezzini A, Mazzucato L, La Camera G, Fontanini A (2013) Processing of hedonic and chemosensory features of taste in medial prefrontal and insular networks. *J Neurosci* 33:18966-18978.
- Kluver H, Bucy PC (1939) Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. *Arch Neurol Psychiatry* 42:979-997.
- LeDoux JE (2000) The amygdala and emotion: a view through fear. In: *The amygdala: a functional analysis*, 2 Edition (Aggleton JP, ed), pp 289-310. New York: Oxford University Press.
- Lenard L, Hahn Z (1982) Amygdalar noradrenergic and dopaminergic mechanisms in the regulation of hunger and thirst-motivated behavior. *Brain Res* 233:115-132.
- Lenard L, Hahn Z, Karadi Z (1982) Body weight changes after neurochemical manipulations of lateral amygdala: noradrenergic and dopaminergic mechanisms. *Brain Res* 249:95-101.
- Mackintosh NJ (1974) *The psychology of animal learning*. London: Academic Press.
- Malkova L, Gaffan D, Murray EA (1997) Excitotoxic lesions of the amygdala fail to produce impairment in visual learning for auditory secondary reinforcement but interfere with reinforcer devaluation effects in rhesus monkeys. *J Neurosci* 17:6011-6020.
- Mathe K, Toth A, Petyko Z, Szabo I, Czurko A (2007) Implementation of a miniature sized, battery powered electrophysiological signal-generator for testing multi-channel recording equipments. *J Neurosci Methods* 165:1-8.
- McLaughlin J, Powell DA, White JD (2002) Characterization of the neuronal changes in the medial prefrontal cortex during jaw movement and eyeblink Pavlovian conditioning in the rabbit. *Behav Brain Res* 132:117-133.
- Merchenthaler I, Stankovics J, Gallyas F (1989) A highly sensitive one-step method for silver intensification of the nickel-diaminobenzidine endproduct of peroxidase reaction. *J Histochem Cytochem* 37:1563-1565.
- Moruzzi G, Magoun HW (1949) Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1:455-473.
- Olds J, Milner P (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47:419-427.

- Ongur D, Price JL (2000) The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb Cortex* 10:206-219.
- Parkinson JA, Willoughby PJ, Robbins TW, Everitt BJ (2000) Disconnection of the anterior cingulate cortex and nucleus accumbens core impairs Pavlovian approach behavior: further evidence for limbic cortical-ventral striatopallidal systems. *Behav Neurosci* 114:42-63.
- Paxinos G, Watson C (1996) *The Rat Brain*, 3 Edition: Academic Press.
- Perez-Jaranay JM, Vives F (1991) Electrophysiological study of the response of medial prefrontal cortex neurons to stimulation of the basolateral nucleus of the amygdala in the rat. *Brain Res* 564:97-101.
- Petyko Z, Toth A, Szabo I, Galosi R, Lenard L (2009) Neuronal activity in rat medial prefrontal cortex during sucrose solution intake. *Neuroreport* 20:1235-1239.
- Pezze MA, Marshall HJ, Cassaday HJ (2015) Dopaminergic modulation of appetitive trace conditioning: the role of D1 receptors in medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)* 232:2669-2680.
- Pinault D (1994) Golgi-like labeling of a single neuron recorded extracellularly. *Neurosci Lett* 170:255-260.
- Schalomon PM, Robertson AM, Laferriere A (1994) Prefrontal cortex and the relative associability of taste and place cues in rats. *Behav Brain Res* 65:57-65.
- Siegel JJ, Kalmbach B, Chitwood RA, Mauk MD (2012) Persistent activity in a cortical-to-subcortical circuit: bridging the temporal gap in trace eyelid conditioning. *J Neurophysiol* 107:50-64.
- Skinner BF (1938) *The behavior of organisms: An experimental analysis*. New York: Applenton-Century-Crofts.
- Skinner BF (1953) *Science and human behavior*. New York: Macmillan.
- Thorndike EL (1911) *Animal intelligence*. New York: Macmillan.
- Totah NK, Kim YB, Homayoun H, Moghaddam B (2009) Anterior cingulate neurons represent errors and preparatory attention within the same behavioral sequence. *J Neurosci* 29:6418-6426.
- Toth A, Petyko Z, Mathe K, Szabo I, Czurko A (2007) Improved version of the printed circuit board (PCB) modular multi-channel microdrive for extracellular electrophysiological recordings. *J Neurosci Methods* 159:51-56.
- Vogt BA, Peters A (1981) Form and distribution of neurons in rat cingulate cortex: areas 32, 24, and 29. *J Comp Neurol* 195:603-625.
- Wagner AR, Brandon SE (1989) Evolution of a structured connectionist model of Pavlovian conditioning (AESOP). In: *Contemporary learning theories: Pavlovian conditioning and the status of traditional learning theory* (Klein SB, Mowrer RR, eds). Hillsdale, NJ: Erlbaum.
- Watanabe M (1996) Reward expectancy in primate prefrontal neurons. *Nature* 382:629-632.
- Yamamoto T, Ueji K (2011) Brain mechanisms of flavor learning. *Front Syst Neurosci* 5:76.
- Zilles K, Wree A (1995) Cortex: areal and laminar structure. In: *The rat nervous system*, 2 Edition (Paxinos G, ed), pp 649-685. London: Academic Press.

Publikációs jegyzék

A disszertáció alapjául szolgáló publikációk

- Petyko Z, Galosi R, Toth A, Mate K, Szabo I, Karadi Z, Lenard L (2015) Responses of rat medial prefrontal cortical neurons to Pavlovian conditioned stimuli and to delivery of appetitive reward. *Behav Brain Res* 287:109-119. IF: 3,028
- Petyko Z, Toth A, Szabo I, Galosi R, Lenard L (2009) Neuronal activity in rat medial prefrontal cortex during sucrose solution intake. *Neuroreport* 20:1235-1239. IF: 1,805
- Mathe K, Toth A, Petyko Z, Szabo I, Czurko A (2007) Implementation of a miniature sized, battery powered electrophysiological signal-generator for testing multi-channel recording equipments. *J Neurosci Methods* 165:1-8. IF: 1,884

Egyéb publikációk

- Galosi R, Hajnal A, Petyko Z, Hartmann G, Karadi Z, Lenard L (2015) The role of catecholamine innervation in the medial prefrontal cortex on the regulation of body weight and food intake. *Behav Brain Res* 286:318-327. IF: 3,028
- Kallai V, Toth A, Galosi R, Szabo I, Petyko Z, Karadi Z, Kallai J, Lenard L (2015) [MAM-E17 schizophrenia rat model]. *Psychiatr Hung* 30:4-17.
- Buzas P, Kobor P, Petyko Z, Telkes I, Martin PR, Lenard L (2013) Receptive field properties of color opponent neurons in the cat lateral geniculate nucleus. *J Neurosci* 33:1451-1461. IF: 6,747
- Toth A, Mathe K, Petyko Z, Szabo I, Czurko A (2008) Implementation of a galvanically isolated low-noise power supply board for multi-channel headstage preamplifiers. *J Neurosci Methods* 171:13-18. IF: 2,092
- Toth A, Petyko Z, Mathe K, Szabo I, Czurko A (2007) Improved version of the printed circuit board (PCB) modular multi-channel microdrive for extracellular electrophysiological recordings. *J Neurosci Methods* 159:51-56. IF: 1,884
- Hernadi I, Karadi Z, Vigh J, Petyko Z, Egyed R, Berta B, Lenard L (2000) Alterations of conditioned taste aversion after microiontophoretically applied neurotoxins in the medial prefrontal cortex of the rat. *Brain Res Bull* 53:751-758. IF: 1,758
- Petyko Z, Lenard L, Sumegi B, Hajnal A, Csete B, Faludi B, Jando G (1997) Learning disturbances in offspring of zidovudine (AZT) treated rats. *Neurobiology (Bp)* 5:83-85.
- Petyko Z, Zimmermann T, Smola U, Melzer RR (1996) Central projections of Tomosvary's organ in *Lithobius forficatus* (Chilopoda, Lithobiidae). *Cell Tissue Res* 283:331-334. IF: 1,740

Konferenciakiadványokban megjelent absztraktok

- Petykó Z, Tóth A, Gálosi R, Szabó I, Máté K, Szabó I, Karádi Z, Lénárd L: Responses of rat medial prefrontal cortical neurons to Pavlovian conditioned stimuli and to delivery of appetitive reward. In: XV. Biannual Conference of the Hungarian Neuroscience Society Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary, 2015.01.22-2015.01.23.pp. 88-89.

- Tóth A, Petykó Z, Feldmann Á, Kállai V, Gálosi R, Karádi K, Máthé K, Szabó I, Karádi Z, Lénárd L: Single unit analysis during auditory sensory gating in medial prefrontal cortex in freely moving rats. In: XV. Biannual Conference of the Hungarian Neuroscience Society Hungarian Academy of Sciences. Budapest, Hungary, 2015.01.22-2015.01.23.p. 112.
- Buzás Péter, Kóbor Péter, Petykó Zoltán: A színlátás pályarendszerei SZEMÉSZET 151:(Suppl.) pp. 32-33.(2014)
- Kállai V, Gálosi R, Tóth A, Petykó Z, Ollmann T, Péczely L, Kovács A, Kállai J, Szabó I, Lénárd L: The MAM-E17 rat model of schizophrenia: Behavioral examinations. In: IBRO Workshop: International Brain Research Organization Workshop. Debrecen, Hungary, 2014.01.16-2014.01.17.Paper P77.
- Kóbor P, Petykó Z, Buzás P: Temporal frequency tuning and response phase of blue-ON cells in the lateral geniculate nucleus of the cat. In: IBRO Workshop: International Brain Research Organization Workshop. Debrecen, Hungary, 2014.01.16-2014.01.17.Paper P42.
- Petykó Z, Toth A, Galosi R, Szabo I, Mate K, Szabo I, Karadi Z, Lenard L: Neuronal responses of the rat medial prefrontal cortex during appetitive classical conditioning ACTA PHYSIOLOGICA 211:(697) p. 160.(2014) Joint meeting of the Federation of European Physiological Societies (FEPS) and the Hungarian Physiological Society. Budapest, Hungary: 2014.08.27 -2014.08.30.
- Tóth A, Petykó Z, Feldmann Á, Kállai V, Gálosi R, Karádi K, Máthé K, Szabó I, Karádi Z, Lénárd L: Single unit analysis of auditory sensory gating in the medial prefrontal cortex (mPFC) in freely moving rats. In: IBRO Workshop: International Brain Research Organization Workshop. Debrecen, Hungary, 2014.01.16-2014.01.17.Paper P95.
- Kóbor P, Petykó Z, Papp L, Allston MA, Buzás P: Testing a novel 7-channel deep brain microelectrode for parallel single unit recording in the cat thalamus In: Csillag András (szerk.) XIV. Conference of the Hungarian Neuroscience Society. 282 p. Budapest, Hungary, 2013. Paper P3.8.
- Petykó, Z., A. Tóth, R. Gálosi, I. Szabó, K. Máté, I. Szaó, Z. Karádi, L. Lénárd: Neuronal responses of the rat medial prefrontal cortex during appetitive classical conditioning. Acta Physiologica, Special Issue: Abstracts of the Joint Meeting of the FEPS and the HPS, 27-30 August, 2014, Budapest, C: Scandinavian Physiological Society, Published by J. Wiley & Sons Ltd. V211: Issue Suppl. S697: 62-184: P. 10.51., 2014. (DOI:10.1111/alpha.12362)
- Kállai V., R. Gálosi, A. Tóth, Z. Petykó, T. Ollmann, L. Péczely, A. Kovács, J. Kállai, I. Szabó, L. Lénárd: The MAM-E17 rat model of schizophrenia: Behavioral examinations. IBRO Workshop, Debrecen 16-17. January, Hungary, P77, 2014.
- Tóth, A., Z. Petykó, V. Kállai, R. Gálosi, K. Karádi, Á. Feldmann, K. Máthé, I. Szabó, Z. Karádi, L. Lénárd: Local field potential analysis of auditory sensory gating in medial prefrontal cortex in freely moving rats. 8th FENS Forum of Neuroscience, July, 14-18, Barcelona, p.: 587, 2012.
- Tóth, A., Z. Petykó, V. Kállai, R. Gálosi, K. Karádi, Á. Feldmann, K. Máthé, I. Szabó, Z. Karádi, L. Lénárd: Auditory sensory gating local field potential analysis in the medial prefrontal cortex in freely moving rats. Clinical Neuroscience, 65(S1): 69-70, 2012.
- Petykó, Z., A. Tóth, R. Gálosi, K. Karádi, K. Máthé, I. Szabó, Z. Karádi, L. Lénárd: Reward predicting neurons in the rat medial prefrontal cortex. 8th FENS Forum of Neuroscience, July, 14-18, Barcelona, p.: 437, 2012.

- Petykó, Z., A. Tóth, R. Gálosi, K. Karádi, K. Máthé, I. Szabó, Z. Karádi, L. Lénárd: Neurons in the rat medial prefrontal cortex (mPFC) respond to reward predicting acoustic stimuli. *Clinical Neuroscience*, 65(S1): 53-54, 2012.
- Kóbor, P., Z. Petykó, I. Telkes, L. Lénárd, Á. Lukács, Á. Szél, P. Buzás: Mixed cone inhibition in colour cells of the cat retina. *Clinical Neuroscience*, 65(S1): 35-36, 2012.
- Tóth, A., Z. Petykó, R. Gálosi, K. Karádi, K. Máthé, I. Szabó, Z. Karádi, L. Lénárd: Auditory sensory gating multi unit and local field potential analysis in medial prefrontal cortex in freely moving rats. *Acta Physiologica*, 202(Suppl 684): 119-120, P86, 2011.
- Petykó, Z., A. Tóth, R. Gálosi, K. Karádi, K. Máthé, I. Szabó, Z. Karádi, L. Lénárd: Reward related single-unit activity changes in the rat medial prefrontal cortex. *Acta Physiologica*, 202(Suppl 684): 96, P69, 2011.
- Petykó, Z., A. Tóth, R. Gálosi, Z. Karádi, K. Máthé, I. Szabó, L. Lénárd: Reward related single unit activity changes in the rat medial prefrontal cortex. 8th IBRO World Congress of Neurosci. Florence, Italy, July 14-18, 2011, 14. Cognition and emotion, D347, 2011.
- Kóbor, P., Z. Petykó, I. Telkes, L. Lénárd and P. Buzás: Receptive field properties of colour cells in the cat lateral geniculate nucleus. 13th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society, January, Budapest, Hungary, 2011. P.5-2, *Frontiers in Neuroscience*, (doi: 10.3389/conf.fnins.2011.84.00158)
- Gálosi, R., A. Tóth, Z. Petykó, L. Lénárd: Effects of catecholaminergic lesion of prelimbic – prefrontal cortex on cued discrimination task in rats. 8th IBRO World Congress of Neurosci., Florence, Italy D297, 2011. July 14-18, 2011, 13. Learning and memory, D297, 2011.
- Gálosi, R., A. Tóth, Z. Petykó and L. Lénárd: Operant cued discrimination task: effects of noradrenaline lesion of prelimbic cortex. *Acta Physiologica*, 202(Suppl 684): 35, P23, 2011.
- Gálosi, R., P. Pusztai, N. Hajnal, A. Tóth, Z. Petykó and L. Lénárd: Effects of catecholaminergic lesions of the prelimbic prefrontal cortex on sustained attention demanding task performance in rats. 13th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society, January, Budapest, Hungary, 2011. P.1-29, *Frontiers in Neuroscience*, (doi: 10.3389/conf.fnins.2011.84.00164)
- Tóth, A., Z. Petykó, K. Máthé, R. Gálosi, L. Lénárd, I. Szabó: Auditory sensory gating investigations in medial prefrontal cortex. *Acta Physiol. Hung.*, 97(4): 482, 2010.
- Tóth, A., Z. Petykó, K. Máthé, M. Wlasitsch, R. Gálosi, L. Lénárd, I. Szabó: Methodological requirements of electrophysiological investigations of acoustic startle response. P7-25. *Frontiers in Neuroscience*, Conference Abstract: IBRO International Workshop 2010. doi: 10.3389/conf.fnins.2010.10.00265
- Gálosi, R., A. Tóth, Z. Petykó, L. Lénárd: Effects of local noradrenaline depletion in the medial prefrontal cortex and body weight regulation. P5-11., *Frontiers in Neuroscience*, Conference Abstract: IBRO International Workshop 2010. doi: 10.3389/conf.fnins.2010.10.00088
- Buzás, P., Z. Petykó, P. Kóbor, I. Telkes, L. Lénárd: "Blue-yellow" chromatic opponent responses in the lateral geniculate nucleus of the cat. *Acta Physiol. Hung.*, 97(4): 430-431, 2010.
- Gálosi, R., A. Tóth, Z. Petykó, L. Lénárd: Local noradrenaline depletion elicits enhanced dopamine activity in the medial prefrontal cortex. 12th Meeting of HNS, Budapest, January, 2009. P221. doi:10.3389/conf.neuro.01.2009.04.193
- Petykó, Z., A. Tóth, I. Szabó, R. Gálosi, L. Lénárd: Multichannel recording of medial prefrontal cortex neurons during glucose solution intake in freely moving rats. *Clinical Neuroscience*, 61(Suppl1): 51, 2008.

- Máthé, K., Z. Petykó, A. Tóth, R. Gálosi, I. Szabó, L. Lénárd: 64-channel recording of medial prefrontal cortex neurons during glucose solution intake in freely moving rats. *FENS Abstract*, Vol: 4, 225.7, p.: 633, 2008.
- Tóth A., Z. Petykó, I. Szabó, K. Máthé, M. Katona, A. Czurkó, R. Gálosi, L. Lénárd: Simple devices for multiple unit activity recordings in freely moving in rats. 39th Annual European Brain and Behaviour Society Abstracts, p.: 85. 2007.
- Tóth A., Z. Petykó, I. Szabó, K. Máthé, M. Katona, A. Czurkó, R. Gálosi, L. Lénárd: Simple devices for multiple unit activity recording in rats. *Acta Physiologica Hungarica* 94(4): 397-398, 2007.
- Petykó, Z., A. Tóth, I. Szabó, R. Gálosi, L. Lénárd: Firing rate patterns in medial prefrontal cortex neurons during glucose solution intake in freely moving rats. 39th Annual European Brain and Behaviour Society Abstracts, p.: 85. 2007.
- Petykó, Z., A. Tóth, I. Szabó, R. Gálosi, L. Lénárd: Recording of multiple unit activity in medial prefrontal cortex during glucose solution intake in freely moving rats. *Acta Physiologica Hungarica* 94(4): 385, 2007.
- Gálosi, R., G. Hartmann, Z. Petykó, A. Tóth, L. Lénárd: Effects of lesions of catecholamine terminals in the medial prefrontal cortex on dopamine and noradrenaline levels and on the regulation of body weight. 39th Annual European Brain and Behaviour Society Abstracts, p.: 114, 2007.
- Petykó, Z., R. Gálosi, L. Lénárd: Drug administration via reverse dialysis during juxtacellular recording of single unit activity in the rat amygdale. *Clinical Neuroscience*, 58. Suppl. 1: 76, 2005.
- Petykó, Z., P. Marton, Cs. Niedetzky L. Lénárd: Electrophysiological characterization and labeling with Neurobiotine of single amygdalar neurons. *Clinical Neuroscience*, 56(2): 70, 2003
- Petykó, Z., Cs. Niedetzky, L. Lénárd: Morphological characterisation of single medial prefrontal neurons responding to subcortical stimulation. *Acta Physiologica Hungarica*, 89(1-3): 212, 2002.
- Petykó, Z., Cs. Niedetzky and L. Lénárd: Morphological and electrophysiological characteristics of medial prefrontal neurons in the rat. *Neurobiology*, 9(3-4): 353, 2001.
- Petykó, Z., Cs. Niedetzky, I. Hernádi, L. Lénárd: Labeling of electrophysiologically characterised neurons with Neurobiotine in the rat prefrontal cortex. *Neurobiology*, 9(3-4): 246, 2001.
- Lénárd, L., Z. Karádi, I. Hernádi, Z. Petykó, B. Berta, R. Egyed and K. Várady: Feeding-associated gustatory information processing and taste aversion learning in the limbic system: Electrophysiological and behavioral investigations. *Chemosensory Information Processing. A Hungarian-Israeli Interacademy Workshop*, 4-5-September, 2000., Budapest. Abstract Book, P.: 17, 2000.
- Petykó, Z., I. Hernádi, Cs. Niedetzky and L. Lénárd: Extracellular recording and simultaneous biocytin labeling of neurons in the insular cortex of the rat. *Neurobiology*, 7(3): 374-375, 1999.
- Gálosi, R., A. Hajnal, Z. Petykó and L. Lénárd: Enhanced glucose preference after the lesion of dopaminergic terminals in the medial prefrontal cortex. *Appetite*, 31(2): 244, 1998.
- Lénárd, L., E. Kertes, G. Nagyházi and Z. Petykó: Enhancement of positive and negative reinforcement by Substance P. *Ann. Congr. of IBNS, Richmond, USA, Abstracts of IBNS*, Vol. 7: 31, 1998.
- Petykó, Z., L. Lénárd and R. Gálosi: Catecholaminergic innervation of the prefrontal cortex in the rat. *IVth Ann. Meeting of MITT, Debrecen, Hungary*, 1998.