

**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

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
Bevezetés	6
A motivációkutatás története	6
<i>A motivációkutatás pszichológiai szakasza.....</i>	<i>6</i>
<i>A motivációkutatás neurophysiologiai szakasza</i>	<i>7</i>
<i>A motivációkutatás incentive szakasza</i>	<i>7</i>
A motiváció neuronális szubsztrátuma	8
<i>A hypothalamus elektromos ingerlése</i>	<i>8</i>
<i>Motivációt tükröző acusticus kiváltott potenciálok</i>	<i>9</i>
A pavlovi és az instrumentális kondicionálás elméleti alapjai.....	10
<i>A pavlovi kondicionálás</i>	<i>10</i>
<i>Az instrumentális kondicionálás</i>	<i>12</i>
Az amygdala, a nucleus accumbens és a prefrontalis cortex szerepe a kondicionálásos tanulási folyamatokban	14
<i>Az amygdala</i>	<i>14</i>
<i>A nucleus accumbens</i>	<i>15</i>
<i>A prefrontalis cortex</i>	<i>17</i>
<i>A medialis prefrontalis cortex</i>	<i>18</i>
<i>A prelimbic cortex.....</i>	<i>18</i>
<i>Az infralimbicus cortex.....</i>	<i>18</i>
<i>Az anterior cingularis cortex</i>	<i>19</i>
<i>Az insularis cortex.....</i>	<i>20</i>
<i>Az orbitofrontalis cortex.....</i>	<i>20</i>
Célkitűzések.....	22
Kísérletek.....	25
Elektrophysiológiai kísérletek szabadon mozgó patkányon cukoroldat szabad ivása során	25
A kísérlet rövid leírása.....	25
Módszerek	26
<i>Kísérleti állatok</i>	<i>26</i>
<i>Elektródák implantálása</i>	<i>26</i>
<i>Magatartás</i>	<i>27</i>
<i>Elektrophysiológiai adatok gyűjtése</i>	<i>28</i>
<i>Elektrophysiológiai adatok elemzése</i>	<i>28</i>
Eredmények	30
<i>Elektródák lokalizációja.....</i>	<i>30</i>
<i>Neuronális válaszok.....</i>	<i>31</i>
<i>A "licking cluster"-ek kezdetéhez időben kapcsolt és ezeket közvetlenül megelőző neuronális válaszok.....</i>	<i>31</i>
<i>Excitátoros "before licking cluster" sejtek</i>	<i>31</i>

<i>Inhibitoros "before licking cluster" sejtek</i>	31
A "licking cluster"-ek alatt válaszoló neuronok	32
<i>Excitátoros "licking cluster" sejtek</i>	32
<i>Inhibitoros "licking cluster" sejtek</i>	32
Diszkusszió	34
A "licking cluster"-ek jelentősége	34
A cukoroldat jelentősége	34
Szacharózszer specifikus válaszok, a szacharózszer, mint jutalom.....	35
A jutalom predikciója.....	36
A "licking" mikrostruktúrája	36
A cukoroldat ízének jelentősége	37
Konklúzió	38
Elektrophysiológiai kísérletek szabadon mozgó patkányon módosított pavlovi kondicionálás során	39
Kérdéseink	40
A kísérlet rövid leírása	40
Módszerek	41
<i>Kísérleti állatok</i>	41
<i>Elektródák implantálása</i>	41
<i>Magatartási paradigma és berendezés</i>	41
<i>Adatgyűjtés és "spike sorting"</i>	42
<i>Adatok elemzése</i>	43
<i>Szövegtani értékelés</i>	44
Eredmények	45
<i>Szövegtan</i>	45
<i>A fej gyorsulása a megközelítési magatartás alatt</i>	46
<i>Neuronális válaszok</i>	48
<i>Neuronális válaszok a CS-ek alatt</i>	48
<i>Egysejtválaszok</i>	48
<i>Populációs aktivitás</i>	49
<i>A "licking cluster"-ek kezdetéhez időben kapcsolt és ezeket közvetlenül megelőző neuronális válaszok</i>	52
<i>Egysejtválaszok</i>	52
<i>Populációs aktivitás</i>	52
<i>A "licking cluster"-ek alatt válaszoló neuronok</i>	56
<i>Egysejtválaszok</i>	56
<i>Populációs aktivitás</i>	56
<i>A "licking" ritmussal modulált neuronok</i>	58
Diszkusszió	58
<i>A fejgyorsulás és a megközelítő magatartás igazolta a létrejött pavlovi CS-US asszociációt</i>	59
<i>Neuronális aktivitásváltozások a különböző minőségű jutalmakat prediktáló CS-ek alatt</i>	60
<i>A "licking cluster"-ek kezdetéhez időben kapcsolt és ezeket közvetlenül megelőző neuronális válaszok</i>	62
<i>A "licking cluster"-ek alatt válaszoló neuronok</i>	64
Konklúzió	65
Juxtacelluláris elektrophysiológiai kísérletek altatott patkányon	66
Módszerek	67
<i>Kísérleti állatok és műtét</i>	67

<i>A BLA és VTA elektromos ingerlése</i>	<i>67</i>
<i>Juxtacelluláris egysejtelvezetés és a neuronok töltése Neurobiotinnal</i>	<i>67</i>
<i>A juxtacelluláris elektrophysiologia statisztikus értékelése</i>	<i>68</i>
<i>A Neurobiotinnal jelölt neuronok szövettani kimutatása</i>	<i>68</i>
Eredmények	69
<i>Egysejtválaszok.....</i>	<i>69</i>
<i>A Neurobiotinnal töltött neuronok morfológiája.....</i>	<i>69</i>
<i>A morfológiailag jellemzett neuronok BLA/VTA-ingerlésre adott válasza.....</i>	<i>70</i>
Diszkusszió	73
Konklúzió	75
Eredmények összefoglalása.....	76
Elektrophysiologia kísérletek szabadon mozgó patkányon	76
<i>A "licking cluster"-ek alatt válaszoló neuronok</i>	<i>76</i>
<i>Közvetlenül a "licking cluster"-ek előtt válaszoló neuronok.....</i>	<i>77</i>
<i>Neuronális aktivitásváltozások a különböző minőségű jutalmakat prediktáló CS-ek alatt</i>	<i>77</i>
Juxtacelluláris egysejtelvezetés és a neuronok töltése akut patkánykísérletben.....	78
<i>A "kis és közepes méretű piramis sejtek" válaszai a BLA/VTA elektromos ingerlésére</i>	<i>79</i>
<i>A "nagy piramis sejtek" válaszai a BLA/VTA elektromos ingerlésére.....</i>	<i>79</i>
<i>A "nagy multipoláris sejtek" válaszai a BLA/VTA elektromos ingerlésére.....</i>	<i>79</i>
<i>Az mPFC (aCg/PL), a BLA és VTA kapcsolatrendszere és szerepe a motivációban ...</i>	<i>79</i>
Irodalom.....	81
Publikációs jegyzék.....	88
A disszertáció alapjául szolgáló publikációk	88
Egyéb publikációk	88
Konferenciakiadványokban megjelent absztraktok.....	89
Köszönetnyilvánítás	96

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.

A motivációkutatás története

A motivációkutatás pszichológiai szakasza

Grastyán Endre a motivációkutatás három szakaszát különítette el: a pszichológiai, a neurophysiológiai 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 táplálékmegvonással az éhség esetében. Ebben az időben sokan a motivációt az elvetett ösztön fogalmat helyettesítő kifejezésnek tekintették. Woodworth bemutatta, hogy ez nem így van: a motivációt nem lehet az ösztönrel, vagy az egymást követő reflexek láncolataként interpretálni. A motivált magatartás sokkal inkább flexibilis magatartási mintázatok szekvenciája, ezek egy cél érdekében egy koherens folyamatba szerveződnek: egy vadászkutya a préda üldözése során az aktuális körülményeknek megfelelően rohan, ugrik, úszik, akadályokat kerül ki és a pázásra fogékony szukát figyelmen kívül hagyja, és csak akkor áll meg, ha célját elérte (Woodworth, 1918).

Ebben a szakaszban jelentek meg a motiváció és megerősítés első nagy szisztematikus elméletei. Ilyen Hull „drive”-redukciós elmélete (Hull, 1943) és a hatás törvénye (Thorndike,

1911). Mindkét elmélet empirikus szemszögből a mai napig érvényesnek tekinthető. Például a hatás törvénye sok esetben meggyőzően magyarázza az instrumentális kondicionálást. Az a válasz, amelyik "kielégítő" hatáshoz vezet, megerősödik, vagyis egy válaszmegerősítő ("action-outcome"; A-O) asszociáció jön létre. Neurophysiologiai szempontból ezek az elméletek azonban már elavultak, vagyis nem sokat mondanak arról, hogy hogyan is működik valójában az idegrendszer.

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 motivációkutatás második szakasza a neurophysiologiai szakasz. Ez a diffúz aktivációs elv megfogalmazásával vette kezdetét (Moruzzi és Magoun, 1949). Hebb összefoglalója szerint (Hebb, 1955) "a motiváció egy motor nem egy kormány". Ez azt jelentené, hogy a motiváció egy önmagában céltalan hajtóerő, aminek az irányát más mechanizmusok adják meg. A későbbiekben látni fogjuk, hogy bizonyos kísérletek ezt az elképzelést támasztják alá (Grastyán, 1976), más kísérletek cáfolják ezt (Bindra, 1968), ennek egy lehetséges oka az, hogy a motivációért felelős folyamatok nem egységesek (Wagner és Brandon, 1989).

A motivációkutatás incentív szakasza

A motivációkutatás harmadik szakasza az incentív szakasz. Az 1950-es évektől kezdve egyre nagyobb jelentőséget nyert az incentív-motivációs elv (Mowrer, 1947; Hull, 1952; Cofer, 1959). Először 1970 körül vette át a vezető szerepet, mint általános incentív-motivációs elmélet (Bolles, 1967; Bindra, 1968; Appley, 1970; Bolles, 1972). Egyik jelentős képviselője Bindra. Konceptiójának 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 tanulás lényege a kondicionált és nem kondicionált incentív stimulusok közötti kontingencia megtanulása. A nem kondicionált incentív stimulusok hatására a kondicionált stimulusok incentív értéket nyernek, és képesek lesznek a CMS-t befolyásolni az US-hez hasonlóan.

Elmélete három lényeges tulajdonsággal rendelkezik, amelyek a korábbi elképzelésektől megkülönböztetik. Először is különböző mechanizmusok befolyásolják a viscerális (nyáleválasztás), a "tranzakcionális" (consumptio), és "instrumentális" (megközelítés, ez valójában pavlovi CR) aktusokat, ezért ezek nem mindig kell, hogy összhangban legyenek egymással. Így lehetséges bizonyos esetekben a fenti folyamatok disszociációja. A CMS koncepció elveti azt az elképzelést, hogy a motiváció csak egy energizáló folyamat (motor), amely egy előre szelektált folyamatot kikényszerít. A válasz szelekció és motiváció integrációjának alapja, hogy a környezeti objektum (pl. táplálék), ami felé a válasz irányul, azonos azzal az objektummal, ami a CMS létrehozásában részt vett, tehát a motivációt és a válasz célját ugyanaz az incentive objektum határozza meg. A harmadik tulajdonság, hogy a motiváció nem a válasz következményeitől (válaszmegegerősítés) függ. A CMS-t az organizmikus állapot és az incentive változók hozzák létre, ha egyszer létrejött egy "feed-forward" mechanizmussal bizonyos környezeti ingerek azon képességét növeli, hogy velük kapcsolatos választ váltanak ki, ezért az állat inkább ezekkel a stimulusokkal kapcsolatban fog cselekedni, mint más stimulusokkal kapcsolatban.

A motiváció neuronális szubsztrátuma

A hypothalamus elektromos ingerlése

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 és Milner, 1954). Ugyanebben az évben kimutatták (Delgado és mts., 1954), hogy a hypothalamus elektromos ingerlése negatív megerősítő hatással is bírhat. Mindezekből a kísérletekből azt a következtetést vonták le, hogy a hypothalamus a motiváció központja. Később látni fogjuk, hogy valójában a limbicus rendszer az a rendszer, amely a motivációt szabályozza.

Grastyán több kísérletben tanulmányozta a "kondicionált reflex" aktivációját (Grastyán és mts., 1956; Grastyán és mts., 1965a). A jelenség lényege, hogy a hypothalamus bizonyos területeinek elektromos ingerlése kondicionált választ vált ki a kondicionált inger jelenléte nélkül, vagy gátolja a kondicionált inger által kiváltott kondicionált választ ("conditioned response": CR).

Egy kettős kondicionálás után, amikor a macskának a kondicionált inger ("conditioned stimulus": CS) függvényében a biztonságos platformra kellett menekülnie, vagy táplálékhoz jutott az etetőnél, a hypothalamus számos területének ingerlése azonos ingerlési paraméterek mellett is vagy az egyik, vagy a másik választ, a menekülést, vagy a megközelítést váltotta ki. Nyilvánvaló volt, hogy a válasz irányát a stimulációt megelőző környezeti ingerek befolyásolták. Azt a következtetést vonták le, hogy a hypothalamus ingerlésével kiváltott hatás megfelelt egy generalizált aspecifikus "drive"-nak. Ezzel összhangban Valenstein kísérletében (Valenstein és mts., 1968) a hypothalamus ingerlése során, az ingerlés helyétől függetlenül, a patkány fajspecifikus válaszokat mutatott, a pontos választ az határozta meg, hogy az adott kísérlet során milyen "consummálható" objektumok voltak jelen. Grastyán elképzelésével ellentétben mások az aktiváló hatást specifikus "drive"-központok működésének tulajdonították (Konorski, 1967).

Grastyán szerint a kondicionált orientáció/exploráció is az aspecifikus motiváció elméletet támasztja alá, mert nincs összefüggésben a specifikus jutalmazó eseménnyel, amely kiváltotta (Grastyán, 1976). A „drive”-nak van egy válasz irányát meghatározó hatása, ami Grastyán definíciója szerint, unilateralis ingerlés során kontraverzív, vagy ipsziverzív elfordulás. Később kimutatták, hogy bilateralis ingerléssel a kontraverzív mozgás megfelelője az előre mozgás (megközelítés), míg az ipsziverzív mozgás megfelelője a hátra mozgás (Grastyán, 1976). Így érthető, hogy a kontraverzív mozgás pozitív, jutalmazó motivációra utal, míg az ipsziverzív mozgás negatív, averzív vagy büntető motivációra utal. A hypothalamus ingerléssel kiváltott, motivációt tükröző motoros válaszokat rendszeresen feltűnő motoros "rebound" hatás követte. Az utóhatások iránya szignifikáns korrelációt mutatott a pozitív, vagy negatív megerősítő hatással. Abban az esetben, ha az utóhatás egy kontraverzív motoros "rebound" hatás volt, egy stabil tanult megközelítési válasz alakult ki ahhoz a helyhez, ahol a "rebound" hatás volt. Ipsziverzív utóhatás esetében a hely elkerülése alakult ki. A fentiekben leírtakat az agyi lassú hullámok regisztrálásával is kiegészítették. Kimutatták, hogy a kontra- és ipsziverzív direkt és utóhatások szigorúan korrelálnak a hippocampális theta-aktivitással (megközelítési reakció) és deszinkronizációval (eltávolodás) (Grastyán és mts., 1965).

Motivációt tükröző acusticus kiváltott potenciálok

A motivációban szerepet játszó agyterületek működésével kapcsolatos első alapvető következtetéseket elektromos ingerlést használó kísérletekből vonták le, ami távol áll a

természetes szituációtól, és félrevezető lehet. Ezért Karmos kísérleteiben acusticus ingereket alkalmazott és elemezte az acusticus kiváltott potenciálokat (Grastyán, 1976). Kísérletének első szakaszában kattogó hangra habituálta a macskát. Ezután, a kattogó hang rendszeres bemutatása közben, egy elkerülési reakciót épített ki, melyben vizuális ingerek szolgáltak "cue"-ként vagy diszkriminatív stimulusként. A kattogás semmilyen összefüggésben nem volt a kondicionálással, ezért a kattogással összefüggő kiváltott potenciálokban megjelenő változásokat csak általános motivációs hatásként lehetett értelmezni.

Egy másik kísérletben (Grastyán és Vereczkey, 1974) a kondicionált acusticus szignállal összefüggő kiváltott potenciálokat elemezték. A kísérlet során elkülönítették egymástól a kondicionált acusticus szignál felé irányuló orientációs választ, és a táplálék megközelítését, illetve consumptioját. Az orientációs válasz megjelenése és fennmaradása szoros összefüggésben volt a kondicionált acusticus szignállal összefüggő kiváltott válasz változásával. Az eredményben az a leginkább meglepő, hogy az orientációs válasszal kapcsolatos változások azonosak azokkal, amelyek Karmos kísérletében a motiváció változásait tükrözik.

Tehát, Karmos és Grastyán acusticus kiváltott potenciált alkalmazó kísérleteivel igazolták Grastyán korábbi tisztán elméleti feltételezését, miszerint a motivált magatartás szoros összefüggésben van az orientációs, explorációs magatartással.

A pavlovi és az instrumentális kondicionálás elméleti alapjai

A disszertációban leírt egyik kísérletünk során pavlovi kondicionálást alkalmaztunk, amelyik az alapvető tanulási mechanizmusok tanulmányozására egyik leggyakrabban használt kísérleti eljárás, ezért ennek elméleti alapjait az alábbiakban részletesen ismertetjük. A motivált magatartás megértése érdekében foglalkozunk a másik gyakori eljárással is, az instrumentális kondicionálással.

A pavlovi kondicionálás

A pavlovi kondicionálás során a kísérletező, a kísérleti állat magatartásától függetlenül, a környezeti ingerek közötti kontingenciákat rendezi el. Semmilyen előfeltételezés nincs azzal

kapcsolatban, hogy az állat mit is tanul meg valójában (fordítva, pavlovi tanulás jöhet létre az állatot érő különböző ingereknek megfelelően az instrumentális kondicionálás során). Egy kezdetben semleges környezeti inger egy biológiailag releváns feltétlen ingerrel ("unconditioned stimulus"; US) társítunk. Például egy csengőhangot táplálékkal (US) társítunk, ami feltétlen válaszként ("unconditioned response"; UR) nyáleválasztást vált ki. A társítás következtében a semleges inger kondicionált ingerré ("conditioned stimulus"; CS) válik és táplálék jelenléte nélkül is kiváltja a nyáleválasztást ("conditioned response"; CR). 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 és Brandon, 1989).

A legegyszerűbb esetben direkt asszociáció jöhet létre a CS és az UR között, egy ilyen inger-válasz asszociáció gyakran semmilyen információt nem hordoz az US-sel kapcsolatban. Bár az S-R tanulás hasznos magatartást generálhat, nem flexibilis, a motiváció nem képes a teljesítményt befolyásolni. Amennyiben egy állat egy habituális válaszra (S-R) táplálékjutalmat kap és a táplálék értéke megváltozik (pl. táplálékmérgezés), a magatartás nem változik meg (Adams, 1982). Gyakran S-R tanulás jön létre instrumentális szituációban túltrenírozás során. Az eleinte instrumentális válasz habituálissá (S-R) válik, és az instrumentális válasz érzéketlen lesz az A-O ("action-outcome") kontingencia leértékelésére, vagyis a válasz valójában már nem instrumentális, hanem pavlovi (Dickinson, 1994).

Egy US számos különböző választ válthat ki. Például a szemre fújás egy egyszerű motoros választ, pislogást vált ki, emellett az éberség és figyelem fokozódásához vezet. Az US által kiváltott több különböző UR-nek megfelelően egy CS több, különböző S-R asszociációban vehet részt. A CS természete is meghatározó abban, hogy milyen választ vált ki. Egy táplálékkal társított kevésbé lokalizálható hang CS nem vált ki megközelítő magatartást a hangforrás irányába, míg egy jól lokalizálható fényforrás igen.

A CS aktiválhatja az affektusnak (félelem vagy jutalomexpektancia) egy reprezentációját. Egy CS amelyet korábban sokkolással társítottunk blokkolja a kondicionálást, amelyben egy másik CS-t a várt táplálék elmaradásával társítunk (transz-megerősítő blokkolás). A két különböző megerősítőben semmi más nem közös, csak az, hogy mindkettő averzív, ebből az következik, hogy a blokkoló hatás a CS és az affektus közötti asszociáció következménye.

Asszociáció jöhet létre a CS és az US specifikus sensoros tulajdonságai között (vizuális megjelenés, hang, szag, íz, nutritív érték). Ezt demonstrálja meggyőzően a sensoros prekondicionálás. Először két sensoros ingert társítunk, majd ezek közül az egyiket egy biológiailag jelentős US-sel. Ezután a másik CS önmagában képes US-specifikus CR-t kiváltani (Brogden, 1939). Az US-specifikus asszociáció további bizonyítéka az US értékének kondicionálás utáni változásával kapcsolatos. Először egy CS-t ízletes táplálékkal társítunk, majd a táplálékot leértékeljük (LiCl injekcióval társítva, ami hányingert okoz). Az állat nem csak a táplálékot utasítja el, hanem a CS által kiváltott válasz is megváltozik.

A pavlovi kondicionálás során létrejövő reprezentációk némelyike emóciókkal kapcsolatos. Például, ha egy hangot sokkolással társítunk, asszociáció jön létre a CS és a félelem egyik reprezentációja között (LeDoux, 2000).

Korábban általánosan elterjedten instrumentálisnak tekintették a lokomotoros aktivitást, de patkány esetében még nem vizsgálták meg közvetlenül, hogy valójában A-O kontingencia vezérli-e. Megvizsgálták azonban csirkénél a megközelítő magatartást. Az útvonalon, ahol a csirkék a táplálékot megközelítették egy olyan tükörrendszert helyeztek el, amelyben azt látták az állatok a táplálék megközelítése során, hogy távolodnak tőle. Más szóval a csirkéknek azt kellett volna megtanulni, hogy távolodjanak el a tápláléktól, ahhoz, hogy megkapják. Ha a megközelítés instrumentális lett volna (A-O kontingencia) akkor az állatok képesek lettek volna megváltoztatni a "mozgás irányát" azért, hogy megkapják a táplálékot, de a csirkék képtelenek voltak ezt megtenni, vagyis a megközelítést egy pavlovi CR-ként tanulták meg (Hershberger, 1986). Egy másik cikk arra utal, hogy patkánynál is, a megközelítő magatartás egy pavlovi CR, ugyanis az állatok képtelenek voltak megtanulni, hogy jutalomért ne közelítsenek meg egy vizuális CS-t (Bussey és mts., 1997).

Az instrumentális kondicionálás

Az instrumentális kondicionálás során a kísérletező az állat magatartása és egy megerősítő eredmény között rendez el kontingenciát (az eredmény a magatartástól függ). Fontos megjegyezni, a kifejezés csak a kísérleti elrendezésre vonatkozik és nem a tanulási folyamatra. Több különböző pszichológiai folyamat járul hozzá a tanuláshoz és az instrumentális teljesítményhez (Dickinson, 1994). Korábbi elméletek szerint a jutalom megerősíti az asszociációt egy környezeti inger és egy bizonyos válasz között (Thorndike,

1911) . Az ilyen tanulás procedurális tudáshoz vezet, ami nem flexibilis, a jutalom értékének változása nem képes megváltoztatni a választ. Az ember és az állat magatartása gyakran célirányos és a motivációs állapot által flexibilisen modulálható. Flexibilis reprezentációk jönnek létre állatkísérletben az instrumentális kondicionálás során. A magatartás célirányos, ha a két következő kritériumtól függ: 1. instrumentális kontingencia az instrumentális válasz és az eredmény között ("action-outcome"; A-O kontingencia); 2. az eredmény egy cél (van ilyen reprezentációja) (Dickinson és Balleine, 1994). Egy célirányos állat lenyomja a pedált táplálékért, mert tudja, hogy a pedál lenyomása táplálékhoz vezet, és a táplálék egy cél.

Pavlovi CS-ek modulálhatják az instrumentális teljesítményt, ez a pavlovi-instrumentális transzfer (PIT). Például egy stimulus, amelyik a cukoroldat adagolását prediktálja, fokozni fogja cukoroldatért való pedálozást. Az egyik a PIT-ért felelős mechanizmus a CS által kiváltott általános motiváló hatás (kondicionált motiváció). Egy másik mechanizmus válaszszerítkusan fokozza az állat magatartását.

Az instrumentális, illetve pavlovi kondicionálással kapcsolatban egy említésre méltó jelenség a kondicionált megerősítés ("conditioned reinforcement", CRf). Neutrális ingert társítunk egy elsődleges megerősítővel, ezáltal az inger affektív, vagy motivációs értéket nyer, ezután az állat dolgozni fog magáért az ingerért (Mackintosh, 1974).

A motivált magatartás szempontjából jelentős az affektív, vagy hedonikus rendszer. Ez a rendszer, azonnal reagál a táplálék leértékelésére, hatása a táplálék közvetlen megtapasztalása által nyilvánul meg, és az instrumentális incentív értéktől független. A táplálék leértékelése megváltoztatja a rendszer működését, ezáltal a leértékelt táplálékra adott reakció megváltozik, adott esetben az élvezet helyett a mutatott reakció az undor. Leértékelés után eleinte a táplálék instrumentális incentív értéke nem változik meg, ezért az állat dolgozik a leértékelt táplálékért. Később a táplálék közvetlen megtapasztalása, ami undort vált ki, átírja az incentív érték reprezentációját, ezután az állat kevesebbet, vagy nem dolgozik a táplálékért. Az ember hedonikus értékelése megállapítható az alany kikérdezésével. Kísérleti állatnál ez természetesen nem működik, de általánosan elfogadott, hogy az ízreaktivitás tesztben a rágszálókon megfigyelhető orofaciális reflex az állat hedonikus értékelésének kifejeződése.

Az amygdala, a nucleus accumbens és a prefrontalis cortex szerepe a kondicionálásos tanulási folyamatokban

A disszertációban bemutatott kísérletek elsődleges célterülete a prefrontalis cortex (PFC), ezen belül a medialis PFC (mPFC), ezen belül pedig a prelimbicus cortex (PL). Látni fogjuk, hogy az amygdala, a nucleus accumbens és a PFC egy neuronhálózat részeit képezik, melyek központi szerepet töltenek be a motivált magatartásban, illetve tanulásban. Ezért az alábbiakban bemutatjuk ezen agyterületek szerepét a pavlovi és instrumentális kondicionálásban.

Az amygdala

Számos magcsoportból álló struktúra, az emóciókkal kapcsolatos folyamatokban különösen a centralis mag (ACe) és a basolateralis amygdala (BLA) játszik szerepet. A BLA kiterjedt reciprok kapcsolatokkal rendelkezik a polysensoros neocortexszel és a frontalis cortexszel, ezen belül az mPFC-vel, és masszív rostkötegeket küld a ventralis striatumba. Az ACe viszont a hypothalamussal, a középaggyal és az agytörzzsel áll összeköttetésben és ezek működését kontrollálja (Kapp és mts., 1992).

Az amygdala az emóciókban kulcsszerepet játszó agyterület. Amygdala lézió után a majmok teljesen elvesztik a félelmüket (Kluver és Bucy, 1939). Ezen kívül az amygdala léziója az emóciókkal kapcsolatos tanulás, illetve memória zavarát okozza (Bechara és mts., 1995; Cahill, 2000).

Jelentős szerepet játszik a táplálékfelvétel szabályozásában (Lénárd és Hahn, 1982; Lénárd és mts., 1982) és a táplálékkal jutalmazott kondicionálási folyamatokban. Ha egy CS-t táplálékkal társítunk, BLA lézió után a patkány megtanulja az etető tál megközelítését (CR), de a válasz nem mutatja az egészséges állatoknál megfigyelhető flexibilitást. Ha a táplálékot későbbi, LiCl-al való társítással leértékeljük, a BLA-ledált állat képtelen a CS által kiváltott etetőtál megközelítést az US értékének megfelelően megváltoztatni (Hatfield és mts., 1996). A jelenség magyarázata, hogy a BLA ledált állat megtanulta a CS és a CR közötti asszociációt (pavlovi S-R asszociáció), de a CS nem aktiválja az US affektív reprezentációját. Különbséget kell tennünk az US pusztán sensoros és affektív reprezentációja között. BLA ledált állatok képesek egy CS-US (sensoros) asszociációt megtanulni, de nem tudnak egy CS-US (affektív) asszociációt megtanulni (Holland, 1998).

Úgy a BLA mint az ACe léziója a kondicionált félelemtanulás zavarát okozza (LeDoux, 2000). LeDoux elképzelése szerint a sensoros thalamus, neocortex és hippocampus a környezeti ingerekről (CS) komplex információt vetít a BLA-ba, ahol létrejön a CS-US asszociáció. A BLA/ACe működésének szeriális modellje szerint a BLA a CS-US asszociáció reprezentációjának helye, az ACe pedig a rendszer kimenete (Davis, 1992; Nader és Ledoux, 1997).

A fent leírt soros rendszer mellett létezik egy párhuzamos rendszer is: a másodlagos appetitív pavlovi kondicionáláshoz (Hatfield és mts., 1996), a kondicionált megerősítéshez (Robledo és mts., 1996) és bizonyos elsőrendű appetitív (pl. az etetőre irányuló) CR-ekhez (Hatfield és mts., 1996) fontos a BLA, a kondicionált orientációban viszont csak az ACe játszik szerepet (Hatfield és mts., 1996).

Csak az ACe-től függő averzív CR a kondicionált szupresszió (enyhe sokkal társított CS csökkenti a pedálozást táplálékjutalomért) (Killcross és mts., 1997), az appetitív CR-ek közül pedig ebbe a csoportba tartozik a patkány orientációs válasza, amit táplálékkal társított CS vált ki és a kondicionált lokomotoros megközelítés ("autoshaping") (Bussey és mts., 1997). Csak az ACe-től (és a BLA-tól nem) függő folyamatok közé tartozik még a CRf (kondicionált megerősítés) és a PIT (pavlovi-instrumentális transzfer) (Cador és mts., 1989; Killcross és mts., 1997).

Kevésbé ismert a BLA szerepe az instrumentális kondicionálásban. A BLA léziója csökkenti az instrumentális választ egy kondicionált megerősítőért (pavlovi CS) (Cador és mts., 1989). Szerepet játszik a cél incentív értékével kapcsolatban (Malkova és mts., 1997). A BLA és az orbitofrontalis cortex (OFC) közötti kapcsolat megszüntetése a leértékelt jutalmak közötti helyes választást befolyásolja (Baxter és mts., 2000). Végül a BLA jelentősen befolyásolja a memória emocionális modulációját (McGaugh és mts., 2000).

Tekintettel az amygdala és az mPFC közötti masszív reciprok kapcsolatokra feltételezhető, hogy a pavlovi és instrumentális kondicionálás legkülönbözőbb aspektusaival kapcsolatos információ megjelenik az mPFC-ben.

A nucleus accumbens

A stimulusok motivációs hatásai részben a nucleus accumbensnek (Acb) tulajdoníthatóak. A striatumra jellemző módon egy cortico-striato-thalamo-corticalis funkcionális kör része (Alexander és mts., 1990). Számos limbicus területről kap bemenetet, mint az amygdala, a hippocampus és a PFC, és olyan területekre vetít, melyek a magatartást

szabályozzák. Ezért limbicus-motoros interfacének is nevezik (Mogenson és mts., 1980). Hisztokémiai és anatómiai jellegzetességek alapján "core" (AcbC) és "shell" (AcbSh) részekre osztották fel (Zaborszky és mts., 1985). Az AcbC főleg a ventralis pallidumba vetít, ezzel szemben az AcbSh vetít a lateralis hypothalamusba és a periaqueductalis szürkeállományba, amely a nem tanult magatartás szabályozásában vesz részt (Berendse és mts., 1992). Számos kísérletet végeztek az Acb DA innervációjával kapcsolatban, ami jelentős szerepet játszik a természetes megerősítők jutalmazó, vagy motivációs hatásában és a drogfüggőségben (Hoebel és mts., 1983; Robbins és Everitt, 1992; Berridge és Robinson, 1998).

Az AcbC fontos a kondicionált lokomotoros megközelítési válaszhoz ("autoshaping"). Léziója akadályozza a megközelítési válasz elsajátítását (Parkinson és mts., 2000), a tanulás utáni lézió pedig csökkenti a teljesítményt (Cardinal és mts., 2002). AcbC lézióhoz hasonló hatása van a 6-OHDA-val végzett DA deplíciónak.

A pavlovi instrumentális transzfer (PIT) során a patkányok megtanulják, hogy pedálynymásra táplálékjutalmat kapnak. Az ezt követő tesztben, kioltás alatt, ugyanazt a jutalmat prediktáló CS nem kontingens prezentálása fokozza a pedálozás frekvenciáját (Lovibond, 1983). Az AcbC léziója megakadályozza a PIT-et (Hall és mts., 2001). Hasonló hatása van a szisztémásan adagolt DA-receptor-antagonistának (Dickinson és mts., 2000). Feltételezhetően a pavlovi CS instrumentális magatartást fokozó képessége az Acb-t innerváló mesolimbicus dopamin rendszertől függ. A fent leírt pavlovi CS-ek motivációs hatását "pavlovi incentív érték"-nek nevezték el (Dickinson és mts., 2000).

A kondicionált megerősítés (CRf) során instrumentális kontingencia áll fenn a válasz és az ezt követő CS között (amit ezt megelőzően elsődleges megerősítővel társítottunk). A CRf-ben nem játszik lényeges szerepet az Acb, de amfetamin injekciója az Acb-be drámai módon fokozza a CRf-et (Taylor és Robbins, 1984).

Az Acb nem játszik szerepet a célirányos instrumentális magatartás szervezésében. Acb ledált patkányokat tanulmányoztak egy instrumentális paradigmában, amelyben az állatok jutalomért pedáloztak (Corbit és mts., 2001). A patkányok érzékenyek maradtak az instrumentális kontingencia változtatására. Ezzel látszólag ellentmondásban, az Acb NMDA-receptor blokkolása akadályozza a táplálékért való pedálozás elsajátítását és az Acb DA-deplícója akadályozza a patkányokat az instrumentális válaszban, ha a követelmény magas (Aberman és Salamone, 1999). A kondicionált megközelítéséhez (autoshaping) és a PIT-hez azonban fontos az AcbC (Parkinson és mts., 1998; Hall és mts., 2001). Pavlovi folyamatok gyakran jelen vannak a célirányos magatartás során, figyelembe véve, hogy az instrumentális

tanulást a megerősítés késleltetése (a csökkent pavlovi folyamatok miatt) könnyen megakadályozhatja, a fenti ellentmondás feloldható.

Az AcbC léziója jelentősen csökkenti a patkányok azon képességét, hogy késleltetett jutalmat válasszanak, ennek következménye impulzív választás (Cardinal és mts., 2001). Ez azt is megmagyarázza, hogy az Acb DA depléciója megakadályozza, hogy az állatok keményen dolgozzanak a preferált táplálékért, ez utóbbi ugyanis a jutalom késleltetéséhez is vezet (Salamone és mts., 1994). Az mPFC léziója nem befolyásolja az impulzív választást, de az orbitofrontalis kéreg léziója igen, valószínűleg innen kapja az Acb a késleltetett jutalommal kapcsolatos információt (Mobini és mts., 2002).

Az AcbSh a nem kondicionált stimulusok motivációs hatását közvetíti. Elsődleges megerősítők, mint a táplálék vagy kokain, megnövelik az extracelluláris DA szintet (Bassareo és Di Chiara, 1999b; Ito és mts., 2000). Ezzel szemben a CS-ek hatására az AcbC-ben nő meg a DA szint. Az AcbSh egy magas szintű kontroll rendszert képez, amely a motivációs állapot szerint képes a különböző magatartási formák között váltani (pl. táplálkozás vagy ragadozótól való menekülés).

Az Acb közvetlen és közvetett módon (az amygdalán és a VTA-n keresztül) kapcsolatban áll az mPFC-vel, és képes annak működését befolyásolni. Ezen kapcsolatok funkcionális jelentősége azonban még nem teljesen tisztázott.

A prefrontalis cortex

A komoly anatómiai eltérések ellenére anatómiai és funkcionális párhuzam vonható a patkány és a primates PFC különböző területei között (Ongur és Price, 2000). Patkányban a PFC magában foglalja a prelimbicus (PL), anterior cingularis (aCg), agranularis insularis és orbitofrontalis kérget (OFC) (Zilles és Wree, 1995). A PL és aCg a medialis prefrontalis kéreg (mPFC) részei, gyakran ide sorolják még a PL alatt található infralimbicus kérget (IL). Valamennyi hozzájárul a magatartás motivációs szabályozásához.

A medialis prefrontalis cortex

A prelimbic cortex

A prelimbic cortex felelős az instrumentális kontingencia detektálásért. Ezzel látszólag ellentmondásban, instrumentális szituációban, patkányban kiépül az instrumentális válasz a prelimbicus kéreg léziója után is. Ha azonban kifejezett kontingencia percepciók paradigmát alkalmaznak, akkor, bár kiépül az instrumentális válasz, a PL kéreg ledált patkányok érzéketlenek az instrumentális kontingencia manipulálására (Balleine és Dickinson, 1998). Ebben az esetben a választ a patkányok az S-R "habituális" rendszer segítségével tanulják meg.

A célirányos magatartás feltétele az instrumentális kontingencia és a cél incentiv értékének interakciója. Feltételezhetően a BLA szerepet játszik az incentiv érték centrális reprezentációjában. Kimutatták, hogy a BLA és mPFC összeköttetésének léziója modulálja az instrumentális választást (Coutureau és mts., 2000). Feltételezhetően ez az összeköttetés felelős az instrumentális kontingencia és az incentiv érték funkcionális kapcsolatáért.

Bár az PL pavlovi kondicionálás során betöltött szerepével kapcsolatban jóval kevesebb kísérletet végeztek, néhány nyúl (mely a patkányhoz hasonló PL-el rendelkezik) végzett elektrophysiológiai kísérlet egyértelműen igazolta, hogy a PL a pavlovi kondicionálós tanulásban is részt vesz. A kísérletek többsége averzív kondicionálással (Powell és mts., 1996), néhány viszont appetitív kondicionálással kapcsolatos (McLaughlin és mts., 2002). Újabb kísérletek igazolták az PL jelentőségét a pavlovi "trace"-kondicionálásban. (Pezze és mts., 2015). A prelimbic és infralimbic kéregbe injektált dopamin D1 agonista (az elvárással ellentétben, a receptorok túlingerlése által) gátolta az asszociáció létrejöttét. Elektrophysiológiai kísérletekben ú.n. "bridging" sejteket mutattak ki, ezek képesek a "trace"-kondicionálás során a "trace"-intervallumot áthidalni, ami az asszociáció szükséges feltétele (Gilmartin és mts., 2014).

Az infralimbic cortex

A ventralis mPFC (IL) léziója akadályozza a pavlovi kondicionálással kiépített "freezing" extinkcióját (Morgan és mts., 1993). Az extinkció nem a tanult információ törlése, hanem egy új asszociáció megtanulása (CS - nem-US), amely a korábban tanultat gátolja. Ez

összhangban van azzal az elképzeléssel, miszerint a PFC a magatartás gátlását közvetíti (Ongur és Price, 2000).

Az anterior cingularis cortex

Sok szempontból ekvivalencia állapítható meg a rágcsáló, majom és emberi anterior cingularis cortex (aCg) között (Ongur és Price, 2000). Képzelt eljárásokkal nyert adatok alapján a humán aCg szerepet játszik a depresszióban, a hangulat szabályozásában és megváltoztatja aktivitását emocionálisan szignifikáns stimulusok hatására. Kifejezetten aktiválódik kokainnal asszociált stimulusokra kokainfogyasztóknál (Childress és mts., 1999). Hasonlóan aktiválódik emocionálisan szignifikáns stimulusok hatására normális embereknél is (Garavan és mts., 2000). PET kísérletek alapján a humán aCg szerepet játszik az exekutív figyelemben (Posner, 1995).

A humán aCg részt vesz a hiba, és a válaszkonfliktus detektálásában. Választásos reakcióidő mérés során negatív EEG hullámot vált ki a hibás választás. Ez a hibázási negativitás (ERN) (Falkenstein és mts., 2000), melynek forrása az aCg. Az ERN egy olyan folyamat része, amelyik a jövőbeni helyes válasz érdekében az aktuális választ a helyes válasszal összehasonlítja, és a hibát detektálja. A fentihez hasonlóan a hiba szignál több tanulási modellben központi szerepet játszik.

Rágcsáló aCg-ről kimutatták, hogy részt vesz az appetitív és averzív stimulus-megerősítés tanulásban. Nyúlban az aCg léziója csökkenti a pavlovi kondicionálással kiépített bradycardiát (Buchanan és Powell, 1982). Szintén nyúl aCg-t vizsgáltak aktív elhárító szituációban, ami az instrumentális és a pavlovi kondicionálás kombinációja. A CS+ nagyobb egysejtválaszt vált ki mint a CS- a tanulás kezdeti szakaszában (Gabriel és Orona, 1982). Patkányban, az aCg léziója megakadályozza a stimulus és a táplálék megerősítő közötti asszociációt az "autoshaping" alatt (Bussey és mts., 1997). Egyszerűbb pavlovi kondicionálásos tanulás azonban továbbra is létrejön aCg ledált patkányoknál és a pavlovi CS kondicionált megerősítővé válhat. Kiderült azonban, hogy az aCg lézió mindig akkor csökkenti a teljesítményt, ha több CS van jelen a szituációban. Az irodalmi adatokat összeegyeztethetővé teszi az az elképzelés, hogy, ha hasonló CS-ek különböző asszociációkban vesznek részt, az aCg megakadályozza a hasonló CS-ek általánosítását.

Annak ellenére, hogy a kutatási irányok különbözőek voltak, megállapítható, hogy 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: ehhez hasonló a humán aCg funkciója a válasz konfliktusban. A humán aCg-t aktiválja az újdonság, vagy a hiba. A patkány aCg ehhez hasonló funkcióira utal, hogy elektrophysiológiai kísérletben "unsigned prediction error"-t kódoló neuronokat mutattak ki (Totah és mts., 2009).

Az insularis cortex

Az insularis cortex felelős a táplálék specifikus sensoros aspektusainak (íz) memóriájáért. Tanulmányozták a szerepét táplálékkal jutalmazott instrumentális szituációban. Léziója után a patkányok normálisan teljesítenek instrumentális kontingencia tesztben. Egy további szatiációs tesztben két táplálékból az egyikkel jóllakatták az állatokat, ezáltal megtanulhatták, hogy ennek a tápláléknak az incentive értéke csökkent. Ezután az instrumentális teljesítményt extinkció alatt tesztelték. Míg az álműtött állatok kevesebbet dolgoztak a leértékelt táplálékért, a ledált állatok nem tettek különbséget a táplálékok között. Egy további tesztben azonban, amikor megkapták a táplálékot, a ledált állatok is azonnal különbséget tettek a táplálékok között. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az insularis kéreg nem lényeges az instrumentális incentive érték detektálásában, de nélkülözhetetlen az incentive értékkel kapcsolatos memória tárolásához, vagy ennek közvetítéséhez (Balleine és Dickinson, 2000).

Hasonló szerepet játszik az insularis kéreg a pavlovi kondicionálásban is, közvetíti az US specifikus sensoros tulajdonságait (Holland, 1998). Insularis kéreg ledált patkányok kevesebbet isznak egy LiCl-al társított aromájú táplálékból és normális nem kondicionált rejektív orofaciális válaszokat mutatnak, de nem mutatnak kondicionált orofaciális válaszokat (Kiefer és Orr, 1992). A ledált patkányoknál is érvényesül a táplálék kondicionált motivációs értéke, ezért kevesebbet isznak, és normálisan érzékelik az ízeket, de a CS-sel kapcsolatban nem emlékeznek az ízére.

Az orbitofrontalis cortex

Általánosan elterjedt elképzelés szerint az orbitofrontalis cortex (OFC) a magatartást annak alapján irányítja, hogy a várható végeredménynek mi az incentive értéke. A Damasio-féle "hazardjáték teszt"-ben biztos, kis nyereséget jelentő kártyák (néha kis veszteséget) és nagy nyereséget ígérő kártyák között kell választani, az utóbbiak választása néha katasztrofális veszteséget okoz. Normális személyek a biztos, kis nyereséget választják, OFC-

léziós páciensek viszont rosszul teljesítenek a tesztben (Bechara és mts., 2000). A leírt döntéshozatal olyan magatartás ahol az instrumentális választás a kimenetel incentív értéke alapján történik. Az OFC nagy valószínűséggel az incentív érték egyik neuronális reprezentációjának a helye, ugyanis a neuronok gyorsan válaszolnak a táplálék jutalmazó értékének változására. Ha a majom egy bizonyos táplálékkal jóllakik, az OFC neuronok válasza a táplálék ízére vagy szagára csökken, ugyanakkor más tápláléokra adott válaszok nem változnak (Rolls és mts., 1999; Rolls, 2000). A szükséges inputot az OFC a polimodális sensoros kéregből (Ongur és Price, 2000), a motivációs állapottal kapcsolatos információt pedig a hypothalamusból kapja.

Az OFC kiterjedt reciprok kapcsoltban áll a BLA-val (Ongur és Price, 2000), de ezen kapcsolatok funkcionális jelentősége még nem tisztázott. A funkcionális kapcsolatnak egy közvetlen bizonyítéka Baxter kísérlete (Baxter és mts., 2000). Rhesus majmoknál, a két agyterület közötti funkcionális kapcsolat megszakítása megakadályozta a helyes választást az egyik megerősítő leértékelése után. Ez összhangban áll azzal az elképzeléssel, hogy az OFC, amely struktúra kapcsolatban áll a BLA értékrendszerével, befolyásolja az instrumentális választást a helyes döntés érdekében.

A PFC-ről röviden megállapíthatjuk, hogy számos területe járul hozzá a motivált magatartás irányításához. Az OFC és az aCg különösen fontos szerepet tölt be az érték és emóció reprezentációjában. A prelimbic cortex fontos szerepet tölt be a munkamemóriában és a figyelemben, ezáltal a pavlovi "trace"-kondicionálásban, és az instrumentális ("action-outcome") kontingencia detektálásának a helye. A patkány insularis cortex az íz emlékének felidézéséhez (és ezáltal a táplálék incentív értékének előhívásához) fontos. A humán aCg rendellenes működése az emóciókkal kapcsolatos funkciók zavarát okozza.

Célkitűzések

A motivációkutatás kezdeti szakaszában olyan elméleteket fogalmaztak meg, amelyek összhangban vannak a kísérleti eredményekkel, de gyakran nem ismerték kellőképpen ezek neuronális szubsztrátumát. Több korai elmélet abból az elképzelésből indult ki, hogy létezik egy egységes folyamat, amelyik a magatartást és a motivációt megmagyarázza. A modern kutatás ennek éppen az ellenkezőjét igazolta. Már az 1940-es években lehetővé vált a különböző agyterületek elektromos ingerlése, ami lehetővé tette, hogy egy adott agyterület motivációban, illetve tanulásban betöltött szerepét vizsgálják. Egy másik elektrophysiológiai kísérleti megközelítés az agyi elektromos hullámok regisztrálása vagy az egysejtelvezetés implantált elektródák segítségével. Ezek a módszerek is már az 1950-es, 1960-as években elérhetővé váltak, de az 1990-es évektől vált általánosan elterjedtté számos neuron aktivitásának szimultán elvezetése. Továbbra is hatékony az eddig nem említett léziós technika, illetve a különböző agyterületek célzott neurokémiai manipulálása, illetve transzmitterszintek mérése. Láthattuk, hogy jól tervezett kísérleti paradigmák használatával feltérképezhető, hogy a különböző agyterületek a tanulás és a motiváció mely aspektusában játszanak szerepet. Ezekkel a módszerekkel azonban nem vizsgálható az információ gyors (ms-os felbontású) feldolgozása. Az információfeldolgozás vizsgálatának egyik legjobb módszere az egysejtelvezetés 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, úgy az averzív, mint a táplálékkal jutalmazott magatartásban. Az instrumentális kontingencia detektálásának a helye és fontos a táplálékkal jutalmazott pavlovi "trace"-kondicionáláshoz. Mindkét esetben meg kell jelennie a táplálékjutalommal kapcsolatos információ (sensoros tulajdonságok, és/vagy jutalomérték, és/vagy

incentív érték és/vagy motivációs hatás) a PL-ben. Ezért feltételeztük, hogy cukoroldat (szacharóz, nagy jutalomértékkel bíró megerősítő) ivásával kapcsolatosan a PL neuronok megváltoztatják tüzelési frekvenciájukat. A PL neuronok működését szabadon mozgó patkányokon vizsgáltuk implantált tetród elektródok segítségével. A patkányok (víz ivása után) szabadon ihattak cukoroldatot. Kísérletünkhöz a folyékony táplálékot választottunk mert így egyszerű volt a táplálék adagolása és a consummatio ("licking cluster")* kezdetének és végének pontos detektálása. A cukoroldatot választottuk, mert íze és magas energiatartalma által nagy jutalomértékkel bír. Tekintettel arra, hogy cukoroldat ivásával kapcsolatban első kísérletünket végeztük egy egyszerű szituációt választottunk (szabad ivás), így bonyolult tanulási folyamatok nem nehezítették az eredmények interpretációját.

A fentieket összefoglalva, kérdésünk az volt, hogy patkány a 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. Ismert ugyanis a nyúl PL szerepe averzív "trace"-kondicionálás alatt. Ezért feltételeztük, hogy a PL neuronok megváltoztatják tüzelési frekvenciájukat a pavlovi appetitív "trace"-kondicionálás különböző fázisai alatt is, a CS, a CR, a "trace"-intervallum illetve az US alatt. 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. A fejgyorsulással jól korreláló egysejtválaszok feltételezhetően a mozgással kapcsolatosak, az ettől függetlenek pedig nem. Feltételeztük, hogy az US-t megelőző egysejtválaszokban a jutalomexpektancia is megjelenik.

* lásd 27. oldal

A fentieket összefoglalva, 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. A PL, mint az instrumentális kontingencia detektálásának a helye feltételezhetően a BLA-ból kapja a táplálékjutalom incentív értékével kapcsolatos információt. Ismert a BLA és mPFC közötti kapcsolat szerepe a másodlagos pavlovi kondicionálásban és feltételezhetően fontos a táplálékkal jutalmazott pavlovi "trace"-kondicionáláshoz is. A VTA fontos a kondicionált motivációs hatás közvetítéséhez. Elektrophysiológiai kísérletek alapján a CS alatti válaszok a várható jutalom "értékével" korrelálnak, a jutalom alatti válaszok pedig "reward prediction error"-t kódolnak. a hiba detektálása a predikció megfelelő változásához vezet. Berridge szerint viszont ugyanezek a válaszok az incentív motivációs értékkel kapcsolatosak. Ismertek a BLA, illetve a VTA ingerlésével kiváltott egysejtválaszok, és hogy ezek részben ugyanazon mPFC-neuronokon konvergálnak. Csak részben ismert az mPFC-ben található különböző morfológiájú neuronok és az elektrophysiológiai választípusok közötti összefüggés.

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. Feltételeztük, hogy a különböző elektrophysiológiai jellegzetességgel bíró neuronok különböző morfológiai kategóriákba sorolhatóak. Továbbá feltételeztük, hogy a neuronok egy csoportja konvergens mono- vagy polysynapticus inputot kap a BLA-ból és a VTA-ból.

Kísérletek

Elektrophysiológiai kísérlek szabadon mozgó patkányon cukoroldat szabad ivása során

A patkány PFC egyik funkciója a táplálék- és folyadékfelvétellel kapcsolatos információ integrációja. Számos neurokémiai adat arra utal, hogy az mPFC, dopaminerg innervációja által, részt vesz a jutalmazási mechanizmusokban, a táplálékjutalom predikciójában, illetve ízletességének értékelésében (D'Angio és Scatton, 1989; Bassareo és Di Chiara, 1999a).

Kevésbé ismert az mPFC-neuronok működése egysejtszinten a táplálékkal vagy folyadékkal jutalmazott magatartással kapcsolatosan. Mivel a szacharóz és egyéb cukrok a patkány által preferált természetes jutalmak, kísérletünkben szabadon mozgó patkányon, 5%-os szacharózoldat fogyasztása közben sokelektrodás elvezetést végeztünk. Kontrollként a vízivást használtuk, így tanulmányoztuk a cukoroldattól független ivás hatását a neuronok aktivitására.

A kísérlet rövid leírása

Az operáns dobozban az elektrophysiológiai rendszerrel összekötött előerősítőt csatlakoztattuk az implantált elektródákhoz. A kísérleti ülések kezdetén a patkányok először vizet ihattak. Miután legalább 5 percig nem ittak többet, a vizet tartalmazó palackot 5%-os cukoroldatot tartalmazó palackra cseréltük ki. Ezt az oldatot a patkányok szintén telítődésig itták. Egy kísérleti ülés kb. 60 percig tartott annak függvényében, hogy a patkány mikor hagyta abba az ivást.

Módszerek

Kísérleti állatok

Kísérletünkben hím Wistar patkányokat (350-500g) használtunk.

Az állatok tartása megfelelt minden intézeti, nemzeti és nemzetközi előírásnak (BA02/2000-8/2012; Law XXVIII, 1998; 40/2013 Government Decree, 2013, Hungary; European Community Council Directive 86/609/EEC, 1986; 2006; 2010). Mindent megtettünk annak érdekében, hogy a kísérleti állatok számát, fájdalmát és szenvedését a kísérletek alatt minimalizáljuk.

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, vizet csak az operáns dobozban a kísérletek alatt és az ezt követő 20 percben (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 (Tóth és mts., 2007; Petykó és mts., 2009). A műtétek során Na-pentobarbital (60 mg/kg Nembutal, Phylaxia-Sanofi, Magyarország) anesthesiát alkalmaztunk. A vegetatív parasimpaticus hatás csökkentése érdekében atropint adtunk (2 mg/kg EGIS, Magyarország). A koponya tetejéről eltávolítottuk a bőrt, és a peremébe 6 db. 0,8 mm átmérőjű órás csavart hajtottunk. Két további csavart, melyekhez korábban drótot (100 μm -es rozsdamentes acél) forrasztottunk, a kisagy fölötti koponyatetőbe

hajtottunk. Ezek közül az egyikhez a földelést csatlakoztattuk, a másikat pedig referenciaelektrodként használtunk. Az mPFC vizsgált része fölött (Bregma AP: 2,7-3,7; DV: 3,2-4,4; ML: 0,5-0,8 Paxinos és Watson atlaszának megfelelően) (Paxinos és Watson, 1996) a koponyát fúró segítségével megnyitottuk és a "microdrive"-ot mikromanipulátor segítségével a nyílás fölé helyeztük, majd a tetródokat bevezettük az agyba a prelimbic area (PL) tetejéig. Ebben a helyzetben a vezető kanülként szolgáló vastag szilika csövek elérték az agy felszínét.

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. Meghatározásunk szerint a patkányok vízzel telítődtek, ha legalább 10 percig nem ittak többet és háromszor megszaglászták az itatót anélkül, hogy ittak volna. A patkányok azért ihattak először vizet, mert (pilot kísérletek alapján) amennyiben először cukoroldatot ittak, a továbbiakban nem ittak vizet, vagy csak nagyon keveset ittak a vízből, így nem állt volna megfelelő mennyiségű (vízivással kapcsolatos) kontroll adat rendelkezésre. Ezután a vizet tartalmazó palackot 5% szacharózzal tartalmazó palackra cseréltük ki. Ezt az oldatot a patkányok szintén telítődésig itták. Egy kísérleti ülés kb. 60 percig tartott annak függvényében, hogy a patkány mikor hagyta abba az ivást. Az állatok 23-35 ml cukoroldatot ittak.

Az állatok magatartását webkamerával rögzítettük a Spike2 programcsomag "videófelvétel" 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 és Smith, 1992). Minden "licking cluster" (15-30 per ülés) kezdetét a videófelvétel elemzésével határoztuk meg 0,1 másodperces felbontással.

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

Elektrophysiológiai adatok gyűjtése

Az elektrophysiológiai adatgyűjtéshez a 32-csatornás "head stage" erősítőt (Noted Bt., Magyarország) a "microdrive"-val egybeépített elektród interface boardhoz csatlakoztattuk. Valamennyi szabadon mozgó patkányon végzett kísérletünkben a Szabó Imre által tervezett "PCB" "microdrive"-ot használtuk (Tóth és mts., 2007). Ennek meghatározó alkatrészei nyomtatott áramkör (PCB: printed circuit board) technológiával készülnek.

A tetródokat a kísérleti ülések után 150 μm -es lépésekben mozgattuk. Minden tetród mozgatót feljegyeztünk. Ezeket az adatokat az elvezetési helyek rekonstrukciójához használtuk fel. A rendelkezésre álló főerősítő és adatgyűjtő rendszer (lásd alább) 8 csatorna adatainak rögzítését engedték meg, de a "microdrive" lehetővé tette 8 tetród egyenkénti mozgatóját, az ehhez illeszthető előerősítő szintén 32 csatornás. Gyakran nem vezethetőek el valamennyi tetródról optimális jelek. A felsoroltak miatt azt a stratégiát választottuk, hogy 8 tetródot implantálunk, és ebből kiválasztjuk a két legjobbat megjelenítésre, illetve adatgyűjtésre. Az előerősítő kimeneteit egy kábelon 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

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. Ha az ilyen "cluster"-ek grafikusan ábrázolva egymástól jól elkülönülő, általában ovális "felhőt" képeznek akkor feltételezhetjük, hogy egy "cluster" egy "single-unit"-nak felel meg, vagyis egy idegsejt akciós potenciáljainak. A feltételezett single-unitok refrakter periódusát az autokorrelogramok segítségével határoztuk meg. Amennyiben az abszolút refrakter fázis 1 és 3 ms között volt, a "cluster"-t elfogadtuk single-unitnak, a továbbiakban ezeket elemeztük.

A kísérleti ülések adatait "perievent" időhisztogramok segítségével ábrázoltuk (PETH). Minden üléshez tartozott egy PETH mely a vízivás adatait összesítette, egy másik a cukorivás

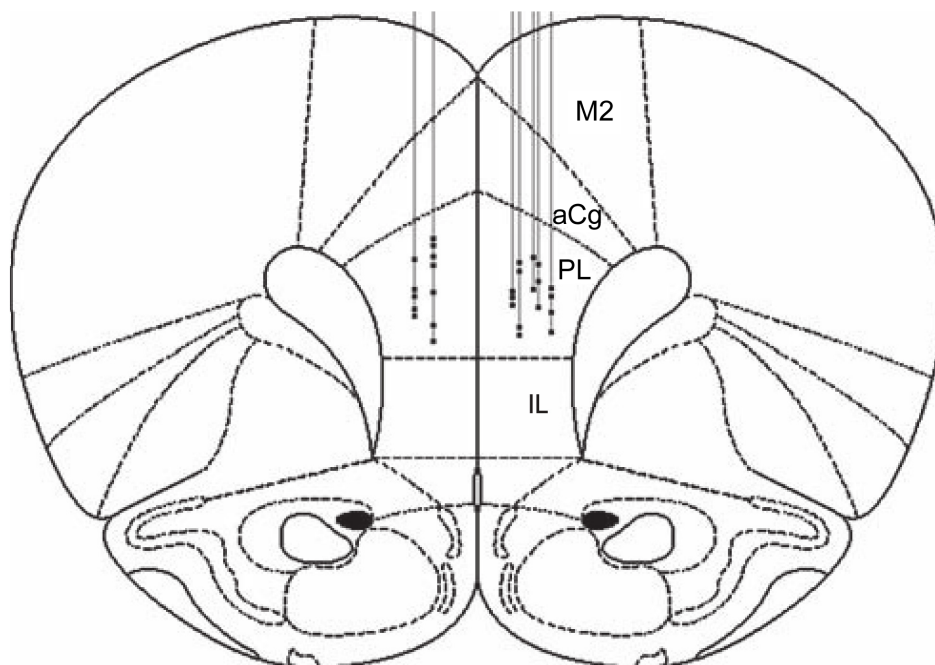
adataihoz tartozott. A "licking cluster"-ek kezdetét ("first lick") ($t=0$) használtuk triggernek valamennyi PETH-ban. Valamennyi PETH a "licking cluster" kezdete előtti és utáni 10-10 másodpercet ábrázolta. A serkentő válaszoknál 0,1 másodperces "bin"-szélességet alkalmaztunk, a gátló válaszoknál viszont 0,4 s-os "bin"-szélességet kellett alkalmazni az alkalmazott statisztikai elemzés sajátosságai következtében. Szignifikáns aktivitásváltozások igazolására a PETH adataira alkalmazható Poisson-tesztet használtunk (Dorrscheidt, 1981). A "licking cluster"-t megelőző fél másodpercet tekintettük az adott neuron spontán aktivitásának. Ennek alapján meghatároztuk a 99%-os konfidenciaintervallumot. Az ezen kívül eső tüzelési frekvenciát serkentő, illetve gátló válasznak tekintettük. Amennyiben egy adott neuron úgy cukorra, mint vízre szignifikáns aktivitásváltozást mutatott, a 99%-os intervallumot valamennyi "bin"-re meghatároztuk és a két PETH megfelelő "bin"-jeinek egyenkénti összehasonlítása alapján határoztuk meg, hogy hol van szignifikáns különbség a két PETH között.

A kísérletek végeztével toluidinkék festés segítségével határoztuk meg az elektródák szúrscatornáit. A pontos elvezetési helyeket a metszetek mikroszkópos vizsgálatával rekonstruáltuk, figyelembe véve az elektródák mozgását a feljegyzett adatok szerint.

Eredmények

Elektródák lokalizációja

Valamennyi, az ebben kísérletben bemutatott neuron elvezetési helyét az mPFC prelimbic area piramissejtrétegeiben lokalizáltuk (Bregma AP: 2,7-3,7; DV: 3,2-4,4; ML: 0,5-0,8 Paxinos és Watson atlaszának megfelelően) (Paxinos és Watson, 1996); (1. Ábra).



1. Ábra Tetród elektródák szúrásatornái és elvezetési helye. Mind a három implantált patkány szúrásatornáit egy frontális metszetre vetítettük (Bregma 3,2) (Paxinos és Watson, 1996). A szúrásatornák maximális anterior-posterior eltérése 0,5 mm volt. Az elvezetési helyeket jelölő pontokat mikroszkópos elemzés alapján rekonstruáltuk figyelembe véve az elektródák mozgását. Valamennyi elvezetési hely a Bregma AP: 2,7–3,7; DV: 3,22–4,4; ML: 0,5–0,8 tartományban volt (Paxinos és Watson, 1996). aCg, anterior cingularis cortex; IL, infralimbicus cortex; M2, másodlagos motoros cortex; PL, prelimbicus cortex.

Neuronális válaszok

A neuronok spontán tüzelési frekvenciája 0,07 és 7,95 Hz között volt. Az autokorrelogramoknak megfelelően a neuronok abszolút refrakter periódusa 1-3 ms volt. Valamennyi vizsgált sejtet "nem ritmikusan tüzelő" neuronok kategóriájába soroltuk (Gemmell és mts., 2002).

Összesen 76 neuronnak vizsgáltuk meg a cukoroldat fogyasztására adott válaszmintázatát. A neuronális válaszok jellemzésére a "licking cluster"-ek kezdete ("first lick") körüli tüzelésifrekvencia-változásokat használtuk. A vizsgált 76 neuron közül 38 változtatta meg szignifikánsan az aktivitását (konfidenciaintervallum 99%). Ezen neuronok többsége (38-ból 33) csak a cukoroldat fogyasztása közben 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"-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) (2. Ábra, A.). 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) (2. Ábra, B.). 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

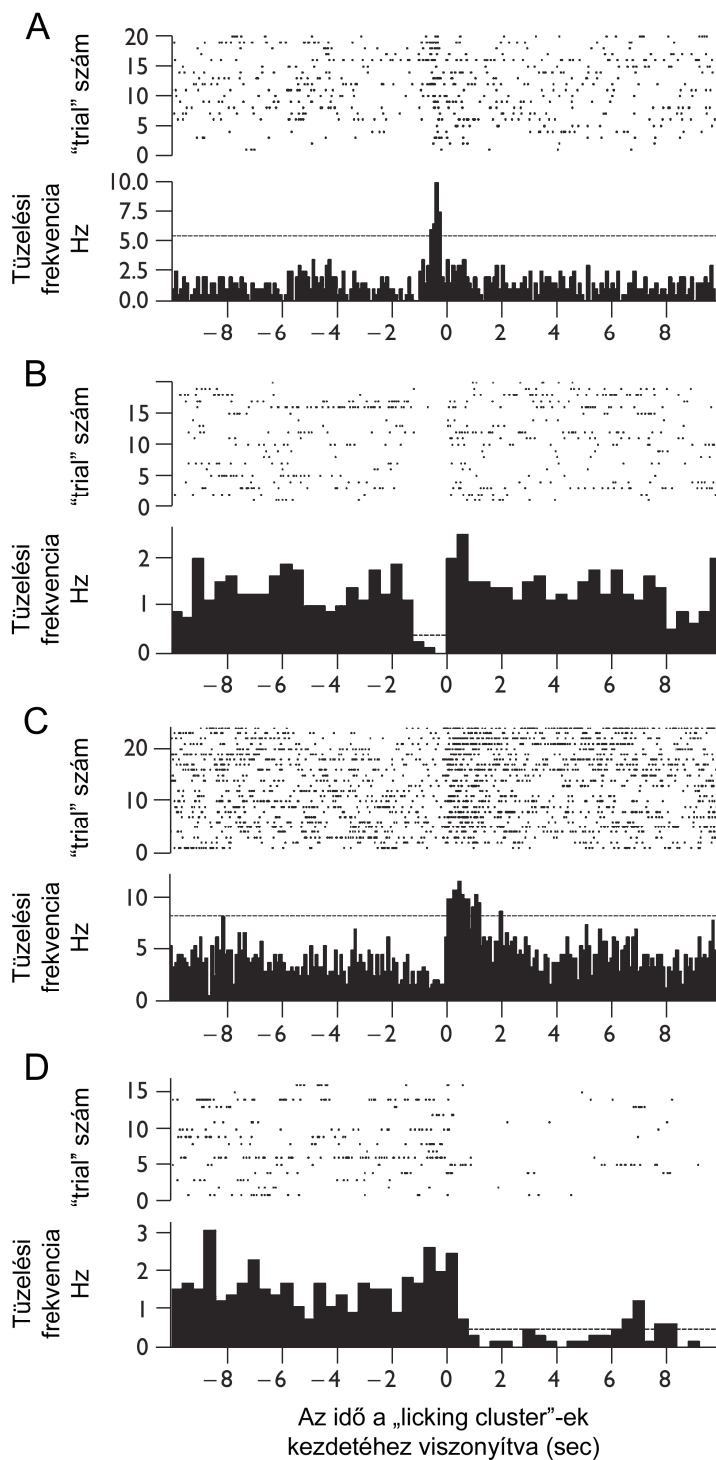
A válaszoló neuronok egy másik jelentős csoportja (n=18) tüzelési frekvenciáját a "licking cluster" kezdete után változtatja meg ("licking cluster" (LC) neuronok).

Excitátoros "licking cluster" sejtek

Ezen neuronok többsége (n=11) növelte tüzelési frekvenciáját 0,3-1,2 szekundummal a "cluster" kezdete után (excitátoros LC neuronok) (2. Ábra, C.). 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" első nyalása után figyelhettük 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) (2. Ábra, D.). 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.



2. Ábra mPFC-neuronok egysejtválaszait ábrázoló raszter diagramok és esemény körüli időhisztogramok, cukorivás során. Az időhisztogramok az átlagos tüzelési frekvenciát ábrázolják. Különböző "bin"-szélességet alkalmaztunk a serkentő (0,1 sec) és a gátló válaszok (0,4 sec) ábrázolásához. A szaggatott vonalak az alapaktivitás (-10-től -2 szekundumig) alapján számított 99%-os konfidencia intervallumot jelzik. **A:** Excitátoros "before licking cluster" neuron válasza. **B:** Inhibitoros "before licking cluster" neuron válasza. **C:** Excitátoros "licking cluster" neuron válasza. **D:** Inhibitoros "licking cluster" neuron válasza.

Diszkusszió

A "licking cluster"-ek jelentősége

Ezen kísérletünkben egysejtszinten elemeztük az mPFC-neuronok aktivitását folyékony táplálék fogyasztása során (cukoroldat). 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 és Smith, 1992; Gutierrez és mts., 2006). A "licking cluster" motivált magatartás (Gutierrez és mts., 2006): a "cluster"-ek mérete és száma a folyékony táplálék ízletességének függvénye és a szatiáció során megváltozik. Ezért jelen 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 tegmentalis area, a hypothalamus és a nucleus accumbens (Beckstead, 1979). Ezen kívül az mPFC azon agyterületek közé tartozik, ahol elektromos öningerlés építhető ki (Routtenberg, 1971). Az OFC és az mPFC közötti kétirányú kölcsönös kapcsolat megszakítása a jutalom íze és helye közötti asszociáció károsodásához vezet (Schalomon és mts., 1994), ez arra utal, hogy az mPFC a táplálékkal jutalmazott folyamatokban is szerepet játszik (Petykó és mts., 2009). Az

mPFC kainát léziója a kondicionált ízaverzió kiépítésének és retenciójának deficitéhez vezet (Hernádi és mts., 2000). Sőt mi több, az mPFC extracelluláris dopamin szintje emelkedett új, vagy ízletes táplálék fogyasztása során (Bassareo és Di Chiara, 1999a). A fent felsorolt tényeket figyelembe véve feltételeztük, hogy ízletes táplálék fogyasztása során az mPFC-neuronok tüzelési mintázata megváltozik. Ezért ennek a kísérletnek a célja a neuronális válaszok jellemzése volt egy jutalmazó folyékony táp szabad fogyasztása során.

Szacharózszer specifikus válaszok, a szacharózoldat, mint jutalom

A vizsgált neuronoknak kb. a fele szignifikánsan megváltoztatta aktivitását szacharózoldat fogyasztása során a "licking cluster" kezdetével összefüggésben. Két fő neuron csoportot különböztettünk meg, a BL és LC neuronokat. Az itt leírt kísérlet alapján feltételeztük, hogy a neuronális válaszok a szacharóz jutalomra specifikusak, tekintettel arra, hogy a neuronok többsége (38-ból 33) a szacharóz fogyasztásához időzítve megváltoztatta aktivitását. Ugyanezeknek a neuronoknak a többsége víz fogyasztása során nem változtatta meg tüzelési frekvenciáját, bár 5 neuron jellegzetes választ mutatott a vízivással összefüggően és ezek a válaszok a cukorivás során megfigyeltekhez hasonló jellegzetességeket mutattak. Tekintettel arra, hogy 23 órás vízmegvonás után a patkányok először vizet ihattak (cukoroldat fogyasztása előtt) feltételeztük, hogy az előbbi 5 neuronban ugyanazok a mechanizmusok játszanak szerepet a neuronális válaszok létrehozásában a víz ivása és a cukoroldat ivása során. A disszertációban bemutatott másik kísérletben (pavlovi szituáció, de ugyanazok az oldatok és itatók) a válaszok nem voltak specifikusak szacharózoldatra. Ebben a második kísérletben, bár átlagosan a cukoroldatra adott válaszok nagyobbak voltak, a legtöbb neuron vízre is válaszolt. Bár ivás közben, mindkét kísérletben a körülmények azonosak, mégis a különböző kísérleti elrendezés következtében a neuronok nagyobb választ adnak vízre a pavlovi szituációban.

A jutalom predikciója

Fent leírt első kísérletünkben, már az első kísérleti ülések során, a patkányok hamar megtanulták, hogy először víz áll rendelkezésre. Azt is megtanulták, hogy miután a vizes palackot kicseréltük egy cukoroldatot tartalmazóra, az utóbbi oldatból ihatnak a kísérleti ülés végéig. Ennek következtében a patkányok prediktálhatták a cukoroldat jutalmat attól az időponttól kezdve, hogy először ihatták ezt az oldatot egy kísérleti ülés során. Egy késleltetett válasz paradigmában majom dorsolaterális PFC neuronok jutalomfüggő aktivitásváltozásokat mutattak a késleltetési fázis alatt, és kimutatták, hogy ezek a neuronok a meghatározott jutalom predikciójában játszanak szerepet (Watanabe, 1996). Bár ebben a kísérletünkben a magatartást nem manipuláltuk késleltetéssel a "cue" és a jutalom között, mégis feltételezhetjük, hogy az általunk leírt BL neuronok legalábbis részben a jutalom predikcióját reprezentálják. Az a tény, hogy miután a patkányok vízzel telítődtek, itták az ízletesebb cukoroldatot és, hogy ilyen körülmények között a neuronok többségénél (33 neuron) jellegzetes válaszok jelentek meg (BL vagy LC), a jutalom minőségének a jelentőségére utal. A fent idézett késleltetett válasz paradigmához viszonyítva az itt bemutatott szituációban a patkány mozgott az itató irányába. Ezért a leírt válaszok az itató felé való mozgással, vagy az orientációval is összefügghetnek. Az itt leírt kísérlet alapján nem dönthető el egyértelműen, hogy a BL neuronok részt vesznek-e a jutalompredikcióban, ez volt az egyik fő kérdésünk a disszertációban bemutatott másik kísérlet tervezése során, melyben pavlovi kondicionálást alkalmaztunk.

A "licking" mikrostruktúrája

Egy hasonló kísérletben, melyben a patkányok szacharóoldatot szabadon ihattak, "lickig" magatartással összefüggő aktivitásváltozást mutattak ki egysejtszinten a patkány OFC-ben (Gutierrez és mts., 2006). Ennek a cikknek megfelelően a tüzelési mintázat váltakozása az OFC-ben szorosan összefügg a "lickig" magatartás mikrostruktúrájával a folyékony táplálék akaratlagos fogyasztása során. A mi eredményeink szerint a predikcióval összefüggő válaszok az mPFC-ben hamarabb jönnek létre mint az OFC-ben az idézett cikk

szerint (kb. -400 ms vs. -250 ms) Az OFC-ben kimutatott válaszokkal szemben az általunk kimutatott aktivitásváltozás úgy tűnik, hogy nem játszik közvetlen szerepet a "lickig" mikrostruktúrájának organizációjában mert: (i) nem volt olyan ritmikus tüzelési mintázat megfigyelhető, mely a "lickig" frekvenciát követi; (ii) az mPFC-neuronok nem prediktálták a "licking cluster" végét; (iii) víz "lickig" előtt nem volt prediktáló aktivitásváltozás megfigyelhető, holott ez esetben a "licking cluster" indítása hasonló volt ahhoz, mint mikor a patkányok cukoroldatot ittak.

A cukoroldat ízének jelentősége

A szacharózoldat kellemes íze és tápértéke miatt nagymértékben preferált tápláléka a patkánynak kísérleti körülmények között (Sclafani, 1988). Az íz (amit a koncentráció is befolyásol), a somatosensoros input és a posztingesztív negatív visszacsatolás, mind fontosak a szacharózoldat fogyasztásának a szabályozásában. Az íz és a somatosensoros inputok azonnal megjelennek minden "licking cluster" alatt. A neuronális információ feldolgozása, amely az LC neuronokhoz kötődik, feltételezhetően a jutalom elfogyasztását reprezentálják, így könnyen elképzelhető, hogy ezeken a neuronokon az oropharingealis stimulusok (somatosensoros input), száj- és ritmikus nyelvmozgás és a táplálék jutalmazó értékével összefüggő ízinformáció konvergál. A posztingesztív szignálok később jönnek létre, ezek befolyásolhatják a táplálék fogyasztását azáltal, hogy megrövidülnek a "licking cluster"-ek és végül a patkány befejezi az ivást. A kísérleti ülések alatt a "licking cluster"-ek a jóllakottságnak megfelelően rövidültek de az egysejtválaszok a "cluster" ek kezdete körül nem változtak, ebből arra következtethetünk, hogy a posztingesztív szignálok nem, vagy alig befolyásolták az itt leírt válaszokat.

Konklúzió

Szabadon mozgó patkányon, **az mPFC-ben először mutattunk ki olyan neuronokat melyek szacharózoldat szabad ivása közben BL és LC válaszokat adnak.** Mindkét esetben serkentő és gátló választ adó neuronokat is kimutattunk. Feltételeztük, hogy **a BL neuronok válasza a folyékony táplálékjutalom predikciójával kapcsolatosak** (lásd második kísérlet). Feltételezésünk szerint **az LC neuronok válasza a folyadékjutalom elfogyasztásával, kellemes ízével, illetve jutalomértékével kapcsolatosak.**

Tehát eredményeink igazolják, hogy a patkány mPFC-neuronok a táplálkozási magatartás jutalmazással kapcsolatos mechanizmusában játszanak szerepet.

Elektrophysiológiai kísérletek szabadon mozgó patkányon módosított pavlovi kondicionálás során

A neuronok aktivitásának változásait a CS-sel és az aktuális jutalommal kapcsolatban pavlovi szituációban számos limbikus területen kimutatták. A VTA dopaminerg sejtjei válaszolnak a CS alatt, ezek a válaszok a jutalom feltételezett értékével kapcsolatosak (Tobler és mts., 2005), és a jutalompredikció hibáját kódolják majomban (Fiorillo és mts., 2003; Fiorillo, 2011) és rágsálókban (Schultz, 1998; Cohen és mts., 2012; Jo és mts., 2013). Ezen kívül majom centralis és basolateralis amygdalában olyan neuronokat is kimutattak, amelyek stimulus-jutalom kontingenciát, a jutalom elmulasztásának a rizikóját, vagy a jutalom időpontjának határozatlanságát ("unpredictability") kódolják (Paton és mts., 2006; Bermudez és Schultz, 2010). Patkány BLA-ban a neuronok válaszoltak különböző CS-ekre, amelyek a jutalom sensoros (Nishijo és mts., 1998), illetve affektív (Muramoto és mts., 1993) tulajdonságaival kapcsolatos információt hordoztak, egy további tanulmány szerint a neuronok a jutalom váratlan kimaradására válaszoltak (Roesch és mts., 2010). A várt jutalommal kapcsolatos neuronális válaszokat írtak le patkány OFC-ben (Takahashi és mts., 2009), cingularis kéregben (Bryden és mts., 2011) és striatumban (Stalnaker és mts., 2012).

A mPFC masszív bemenetet kap a VTA dopaminerg sejtjeiből (Carter és Fibiger, 1977) és kapcsolatban áll valamennyi struktúrával, amelyek szerepet játszanak az aktuális jutalommal kapcsolatos folyamatokban és/vagy a jutalom predikciójában (Beckstead, 1979; Kolb, 1984; Gabbott és mts., 2006). Csak néhány elektrophysiológiai kísérletben tanulmányozták az mPFC-neuronok szerepét táplálékkal jutalmazott pavlovi szituációban (McLaughlin és mts., 2002). Ebben a kísérletben különböző válaszokat mutattak ki a táplálékjutalommal társított CS alatt. Az mPFC pavlovi szituációban betöltött szerepére utal, hogy az mPFC inaktiválása csökkenti a pavlovi-instrumentális transzfert (Ishikawa és mts., 2008) és a pavlovi-instrumentális transzfer során a neuronok fokozták az instrumentális válaszra adott aktivitásváltozást akkor, ha a válasz előtt a jutalommal társított CS-t prezentálták. Ez arra utal, hogy az mPFC a CS-hez kapcsolt motiváció reprezentációjában is szerepet játszik. Az első kísérletünkben leírtuk a táplálékjutalom elfogyasztásával kapcsolatos egysejtválaszokat (Petykó és mts., 2009). Egy újabb publikációban leírták, hogy az mPFC

monitorozza a jutalom adagolását, és vezérli annak elfogyasztását, vagyis folyékony táplálék esetében a "nyalási magatartást" (Horst és Laubach, 2013).

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.

A kísérlet rövid leírása

Kérdéseink megválaszolására az elektrophysiológiai kísérlet szempontjainak megfelelő kísérleti protokollt dolgoztunk ki. Az mPFC-neuronok aktivitását egy módosított "trace"-kondicionálás alatt vizsgáltuk, amelyben a patkányoknak két különböző CS-t kellett megkülönböztetni ("differential conditioning"). Két különböző hangot (CS) két különböző jutalmazó US-sel társítottunk, cukoroldattal, illetve vízzel. Feltételeztük, hogy az itató megközelítése a US adás első másodperceiben egy CS által kiváltott kondicionált válasz. Adatokat csak létrejött tanulás után gyűjtöttünk, a jutalom pedig minden "trial" alatt rendelkezésre állt a kioltás elkerülése érdekében.

Az előerősítőt (mely az adatgyűjtő rendszerrel állt összeköttetésben) a kísérleti ülés kezdetén az elektródákhoz csatlakoztattuk. Összesen 24 kísérleti ülés során a két különböző jutalmat, az 5%-os cukor (szacharóz) oldatot, illetve a vizet két különböző hanggal társítottuk, egy 16 kHz-es hangot cukoroldattal (CS1-US1), egy 8 kHz-es hangot pedig vízzel (CS2-US2). A "trace"-kondicionálás során minden "trial" időtartama 24 másodperc volt (2 sec CS, 1 sec "trace"-intervallum, 12 sec US). A 40 perces kísérleti ülések alatt a CS1-US1 illetve CS2-US2 társítások véletlenszerűen váltakoztak (4. Ábra).

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 magatartás és "multiple unit" aktivitás mérését és rögzítését két hét felépülési periódus után kezdtük el. A kísérleteket egy 40 x 40 cm-es hangszigetelt dobozban végeztük a világos periódusban. A doboz falába egy 1 cm széles és 3 cm magas nyílást vágunk. A cukoroldat vagy a víz adagolására két mozgatható palackos itatót használtunk. Jutalom adagolás során az egyik itatót számítógéppel vezérelt elektromágnes segítségével a nyílás elé vittük, ezáltal a patkány elérhette az itatócsövet.

Minden kísérleti ülés során a patkányok 23 h vízmegvonás után kerültek a dobozba. Az első két ülés alatt megtanultak inni az itatóból. Az ezt követő ülésekben 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, mely 40 percig tartott 50-50 CS1-US1 illetve CS2-US2 társítás véletlenszerűen váltakozott. Amennyiben a patkányok 5 percen keresztül semmit sem ittak, a kísérleti ülést befejeztük. Az adatok gyűjtése előtt a patkányokat egy hétig kondicionáltuk, az ezt követő összesen 24 kísérleti ülés adatait elemeztük.

A "cue" hangokat audiofileok lejátszásával generáltuk a PC hangkártyája segítségével. A magatartási eszközök vezérlését, a hangok és az itatók szinkronizálását a Labcommander software (Noted Bt. Hungary) segítségével végeztük. A nyalogatást az itató csöve és a patkány nyelve között átfolyó kis áram (100 nA) segítségével detektáltuk. Minden magatartási eseménnyel kapcsolatban a magatartást vezérlő számítógép a Labcommander program segítségével TTL jeleket generált. A CS kezdetét, az itató megjelenésének pillanatát és a

"licking cluster"-ek kezdetét az adatgyűjtő rendszer segítségével rögzítettük. A 32 bites adatok legkisebb helyértékű bitjei tartalmazták a magatartással kapcsolatos eseményeket. Ezáltal a magatartással kapcsolatos adatok és az elektrophysiológiai adatok szinkronizációját ms pontossággal biztosítottuk.

Adatgyűjtés és "spike sorting"

A neuronális aktivitás elektrophysiológiai vizsgálatához a kisméretű, 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, később ennek alapján a szövettani adatok birtokában rekonstruáltuk az elvezetési helyeket. A 8 tetróddal (32 csatorna) elvezetett szélessávú jeleket (0,1 Hz-10 kHz) és magatartással kapcsolatos TTL jeleket folyamatosan rögzítettük 32 bites formátumban egy 24 bites 64 csatornás alacsony feszültségű ($\pm 1,5$ mV) AD konverter segítségével (LVC-64, Noted Bt., Pécs, Hungary). A tárolt szélessávú adatokat offline digitálisan szűrtük (0,8-5 kHz). Automatikus küszöbdetektálás után kigyűjtöttük a "spike"-okat ("power" 5-ször nagyobb mint az alapvonal standard deviációja). A jobb "spike sorting" érdekében a "spike"-okat, a mintavételezés elméletét felhasználva (Bankman és mts., 1993) kétszeres (37,5 kHz) mintavételezési frekvenciával újramintavételeztük és a csúcsuk szerint szinkronizáltuk (Csicsvári és mts., 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 (Abeles és Gerstein, 1988; Csicsvári és mts., 1998). A feltételezhetően az egyes neuronokhoz tartozó "spike"-okat a "feature" vektorok alapján először egy automatikus klaszteranalízissel válogattuk szét a KlustaKwik software segítségével (Harris és mts., 2000). Ezután az így kapott klasztereket egy grafikus klaszterező program segítségével ellenőriztük és tovább finomítottuk. Az egyik klaszterezési hiba az, hogy egy adott klaszter több idegsejttől származó "spike"-okat tartalmaz. Ennek kiküszöbölése érdekében csak olyanokat fogadtunk el (a Klusters software segítségével), amelyeknél az autokorrelogramm közepén egy egyértelmű, 3 ms-nál nagyobb abszolút refrakter fázist jelző, szimmetrikus rés található és a klaszter grafikus ábrázolása egy jól körülhatárolható ovális "felhőt" eredményez. Az automatikus klaszterezés egy másik hibája a túlklaszterezés, ami azt eredményezi, hogy egy

idegsejtből származó "spike"-ok több különböző klaszterbe kerülnek, ezeket össze kell vonni. Az összevonandó klaszterek könnyen felismerhetőek a Klusters software segítségével (Hazan és mts., 2006) mely a tetród valamennyi klaszterének auto- és keresztkorrelogrammját ábrázolja. Ha a két klaszter auto- és keresztkorrelogrammja hasonló, emellett a jelalakok is hasonlóak, akkor a két klaszter egybetartozik.

A sokcsatornás adatgyűjtő rendszer használata során gyakran előfordul, hogy néhány csatornán nagy zaj figyelhető meg, az is lehetséges, hogy az innen származó adatok értékelhetetlenek. Ilyenkor fontos a hiba okának minél gyorsabb kiderítése. Ezért a rendszer teszteléséhez 32 csatornás jelgenerátort használtunk (Máthé és mts., 2007).

Adatok elemzése

Az adatok offline elemzését, rasterplotok 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 és 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.

Minden PETH-ban a 0 időpont az adott esemény kezdetét jelentette. Tekintettel arra, hogy a figyelem vagy mozgás modulálhatta a neuronok tüzelési frekvenciáját, a CS kezdetéhez viszonyított (-6)-tól (-4) másodpecig terjedő időszakaszt használtuk kontroll periódusnak. A jutalmat prediktáló hang alatti neuronális aktivitás változásának detektálására a CS kezdetéhez viszonyított 0-tól 2 s-ig terjedő időintervallumot használtuk teszt periódusnak. A "licking cluster"-ek kezdetéhez viszonyított (-2)-tól 0 s-ig terjedő időintervallumot használtuk teszt periódusnak a közvetlenül a "licking cluster"-eket megelőző neuronális válaszok detektálására, a 0-tól 5 s-ig terjedő időintervallumot pedig a "licking cluster"-ek alatti válaszok detektálására. A PETH-eket 0,2 s-os "bin"-mérettel számoltuk ki. 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 és mts., 2009). A populációs aktivitás elemzéséhez a válaszoló neuronok z-értékeit átlagoltuk, illetve varianciaanalízist végeztünk. Ezt megelőzően az eltérő "trial"-számok hatásának kiküszöbölésére a z-értékeket korrigáltuk. Kétfaktoros ANOVA-t végeztünk idő és "trial"-típus illetve szituáció faktorokkal. Szignifikáns hatásnak azt fogadtuk el, ha $p < 0,01$ érték volt. Amennyiben szükséges volt Tukey HSD tesztet alkalmaztunk post hoc tesztnek ($p < 0,05$).

Vizsgáltuk továbbá, hogy a nyalogatás modulálja-e a neuronok tüzelési frekvenciáját. Ehhez 10 ms-os "bin"-szélességű PETH-eket generáltunk. A kontroll periódus a nyalás kezdete előtti 50 ms, a teszt periódus pedig az ez utáni 50 ms volt.

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 ($p < 0,05$).

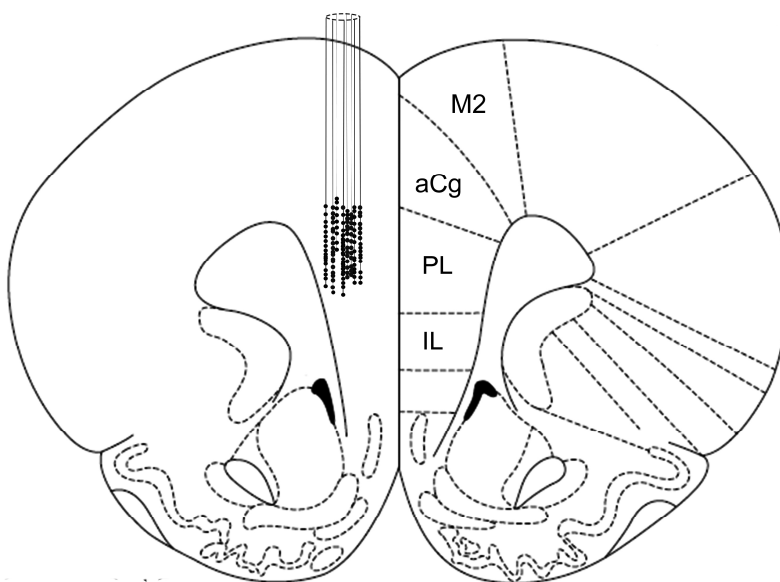
Szövetteni értékelés

A kísérletek végén a patkányokat urethannal (3 g/kg) túlaltattuk, transcárdialisan 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

Szövevény

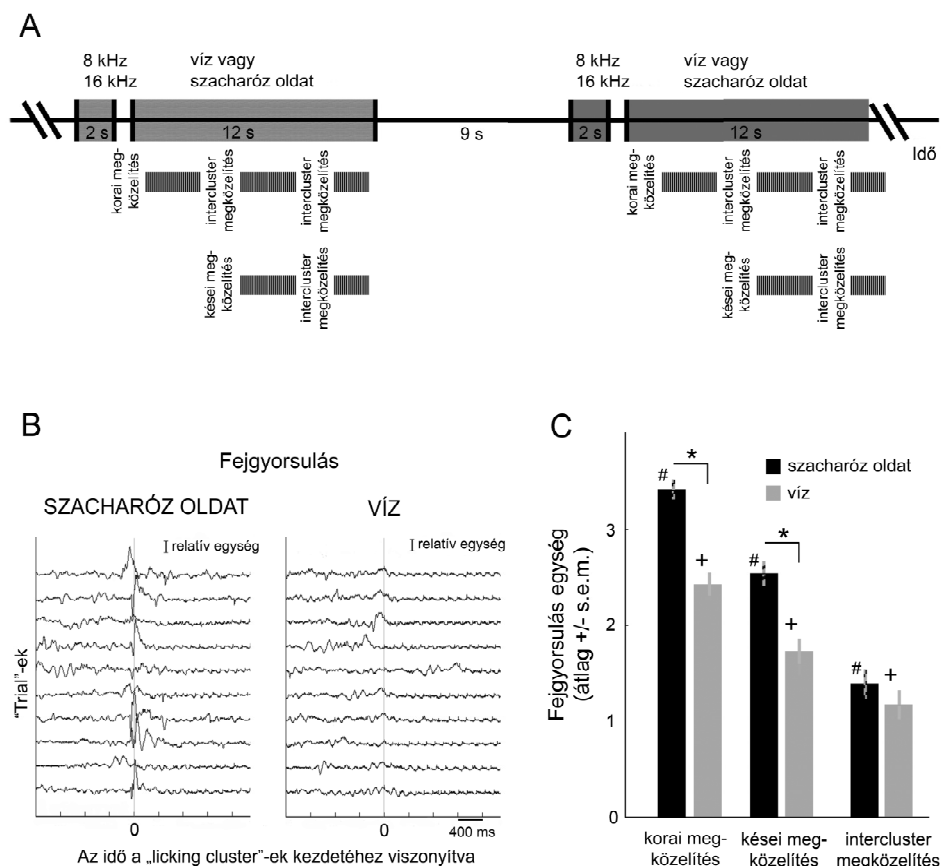
A nyolc "tetród" elektróda a Bregma ponthoz viszonyított anterior-posterior 2,2-től 3,2 mm-ig terjedő tartományban volt Paxinos és Watson atlasza szerint (Paxinos és Watson, 1996). A rekonstruált elvezetési helyeket a 3. ábrán láthatjuk. Valamennyi elvezetési hely a prelimbic area (PL) III-IV rétegeiben 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).



3. Ábra Tetród elektródák szúracsatornái és elvezetési helye. Mind a négy implantált patkány szúracsatornáit egy frontális metszetre vetítettük (Bregma 2,7) (Paxinos és Watson, 1996). A szúracsatornák maximális anterior-posterior eltérése 0,5 mm volt. Az elvezetési helyeket jelölő pontokat mikroszkópos elemzés alapján rekonstruáltuk figyelembe véve az elektródák mozgását. Valamennyi elvezetési hely a Bregma AP: 2,2–3,2; ML: 0,45–0,11; DV: 3,2–4,4 tartományban volt (Paxinos és Watson, 1996) aCg, anterior cingularis cortex; IL, infralimbicus cortex; M2, másodlagos motoros cortex; PL, prelimbic cortex.

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). Az ennél később történő megközelítések időpontja széles határok között változott 2-12 s-ig, vagyis 2 s-től az US adagolás végéig. Ezeket a későbbi történő megközelítéseket tovább felosztottuk későn történő első megközelítésekre (kései megközelítés) és a "lickig cluster"-ek közötti megközelítésekre (intercluster megközelítés). A megközelítés fent meghatározott 3 típusa a 2 különböző US típussal (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. A 4. C. Ábrán jól megfigyelhető a két US típus közötti szignifikáns különbség a korai megközelítések során. 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.



4. Ábra Kísérleti elrendezés és fejgyorsulás a korai, kései és intercluster megközelítések során. **A:** A kísérleti elrendezés sematikus ábrája. A víz CS-t mindig egy 8 kHz-es hang előzte meg, a cukoroldat-jutalmat pedig egy 16 kHz-es hang. A sűrű függőleges vonalak a jutalom ideje alatt a "licking cluster"-eket jelképezik, az ezt megelőző időszakasz alatt voltak a különböző megközelítések. **B:** Reprezentatív fejgyorsulási görbék a korai megközelítés során. Amikor a patkány elérte az itatócsövet a fejgyorsulás elérte a maximális értéket. **C:** A fejgyorsulási adatok statisztikus értékelésének ábrázolása. Szignifikáns különbség figyelhető meg (Tukey-féle HSD teszt) a fejgyorsulások között a különböző jutalmak felé (korai és kései megközelítés). Mindkét jutalom esetében szignifikáns különbség volt a megközelítési szituációk között (korai, kései és intercluster). ^{#,+} $p < 0,05$, ha a korai megközelítést hasonlítottuk össze a későbbi megközelítésekkel. * $p < 0,05$, ha a cukoroldat megközelítését hasonlítottuk össze a víz megközelítésével.

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

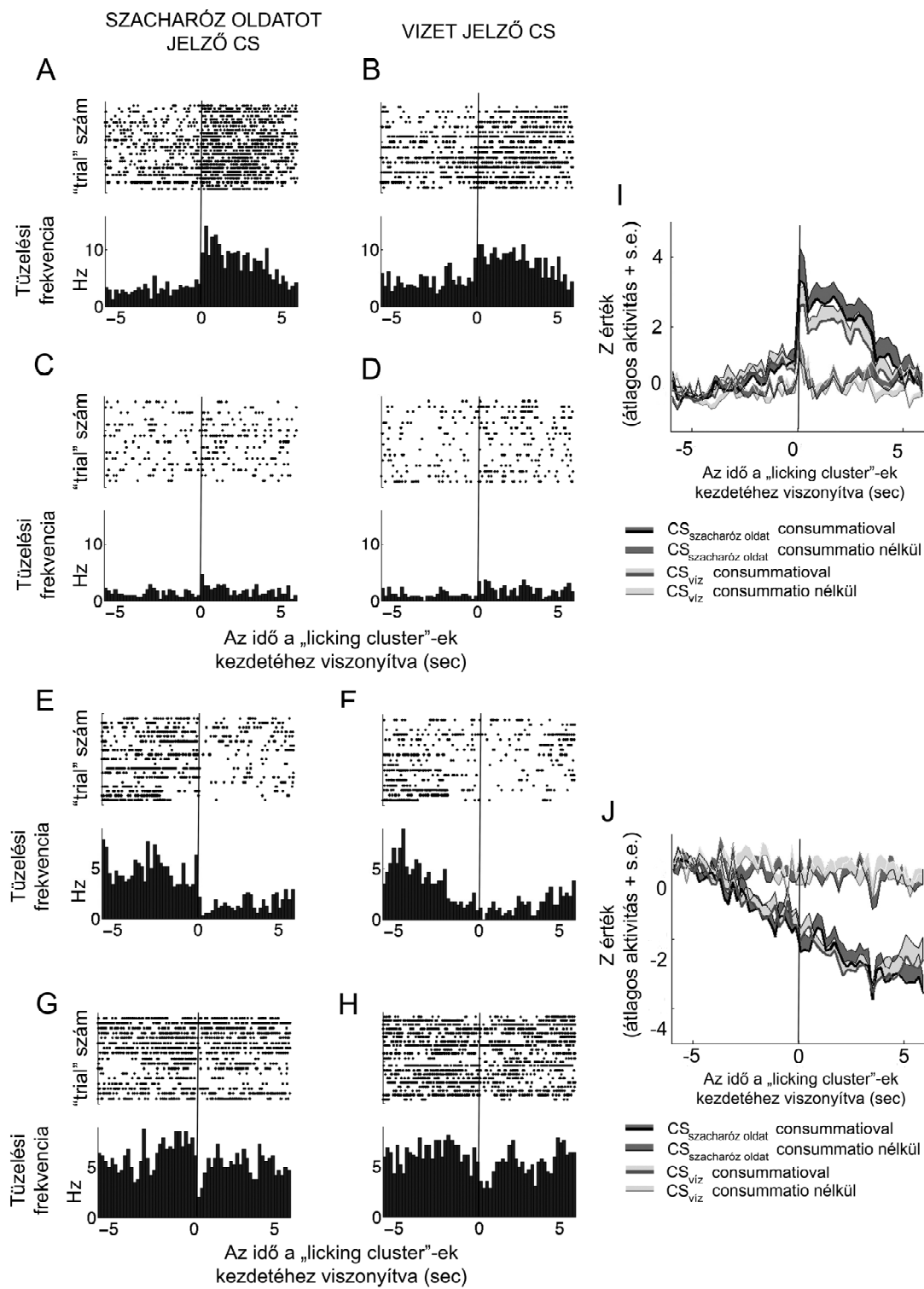
A CS-ek alatt válaszoló neuronok közül 27 fokozta a tüzelési frekvenciát a cukoroldatot vagy vizet prediktáló hangok alatt (5. Ábra, A-D). Ebből a 27 neuronból 24 csak akkor válaszolt, ha ezt követően az adott "trial" alatt a patkány ivott a prediktált jutalomból (5. Ábra, A. és B.). Tizenhat neuron 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 (5. Ábra, E-H). Ezek közül 11 csak akkor válaszolt a CS-re, ha ezt követően az adott "trial" alatt a patkány ivott a prediktált jutalomból (5. Ábra, E. és F.). 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

Az 5. I. Ábra annak a 27 neuronnak a populációs aktivitását ábrázolja, 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 alapvonalától. 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.

Az 5. J. Ábra azon 14 neuron populációs aktivitását ábrázolja, 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 látható 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.



5. Ábra

5. Ábra Szacharózoldattal, illetve vízzel társított CS-ek alatti egysejtválaszok (**A-H**) és populációs válaszok (**I-J**) patkány mPFC-ben. Raszterdiagramok és esemény körüli időhisztogramok (0,2 s "bin"-szélesség) két neuron jellegzetes serkentő (**A-D**) és gátló válaszait (**E-H**) ábrázolják (t=0: a CS kezdete). Azoknak a "trial"-eknek az ábrái amikor volt consummatio (**A, B, E és F**), illetve azoké, amikor nem volt consummatio (**C, D, G és H**). **A-H**: a raszterdiagramok minden sora egy "trial"-nek felel meg, egy pont pedig egy akciós potenciálnak. Az esemény körüli időhisztogramok az átlagos tüzelési frekvenciát ábrázolják 200 ms-os "bin"-szélességgel. A CS alatt serkentő választ adó neuronok populációs aktivitása (**I**) és gátló választ adó neuronok populációs aktivitása (**J**). Nagyobb serkentő populációs aktivitás figyelhető meg a cukoroldat ivása során mint a víz ivása során (**I**). Nagyobb a populációs aktivitás, ha volt consummatio, a két jutalom közötti különbség csak ebben az esetben figyelhető meg. A gátló populációs aktivitás estében (**J**) nincs szignifikáns különbség a két oldat tekintetében. Szignifikánsan nagyobb a populációs aktivitás csökkenése, ha volt consummatio (**J**). Az **I** és **J** ábrák esetében a szürke sávok alatti vonalak a válaszoló neuronok normalizált átlagát ábrázolják. A szürke sávok a s.e.-t adják meg.

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 (-2-0 s; 6. Ábra, A. és B.). 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 (-2-0 s; 6. Ábra, C. és D.). 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

A 6. E. Ábra a "licking cluster"-eket közvetlenül megelőzően serkentő egysejtválaszt mutató 30 neuron populációs aktivitását ábrázolja. 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 ($F(19,1160)=1,96$, $p<0,01$).

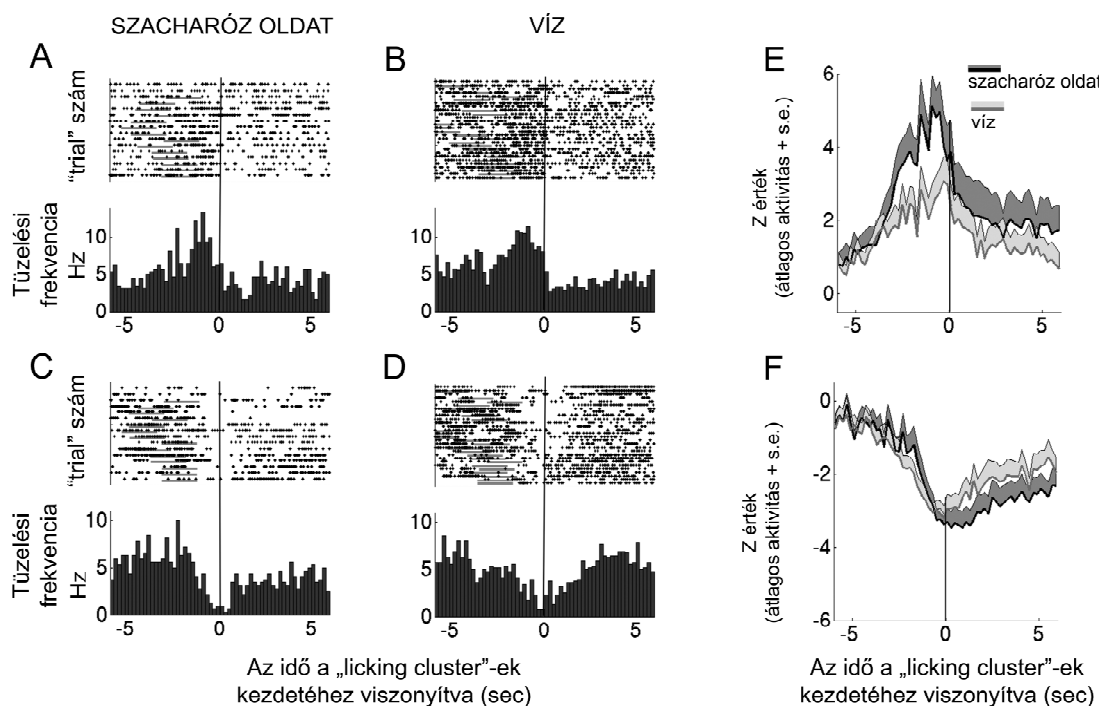
A 6. F. Ábra a "licking cluster"-eket közvetlenül megelőzően gátló egysejtválaszt mutató 26 neuron populációs aktivitását ábrázolja. A kétfaktoros ANOVA az idő faktor ($F(19,1000)=22,43$, $p<0,0001$) szignifikáns hatását mutatta. Nem volt szignifikáns hatása a "trial"-típusnak, és nem volt szignifikáns interakció.

A gátló neuronok populációs aktivitását újra elemeztük miután a "trial"-típusokat felosztottuk aszerint, hogy a "licking cluster"-ek kezdete az US-adagolás első 2

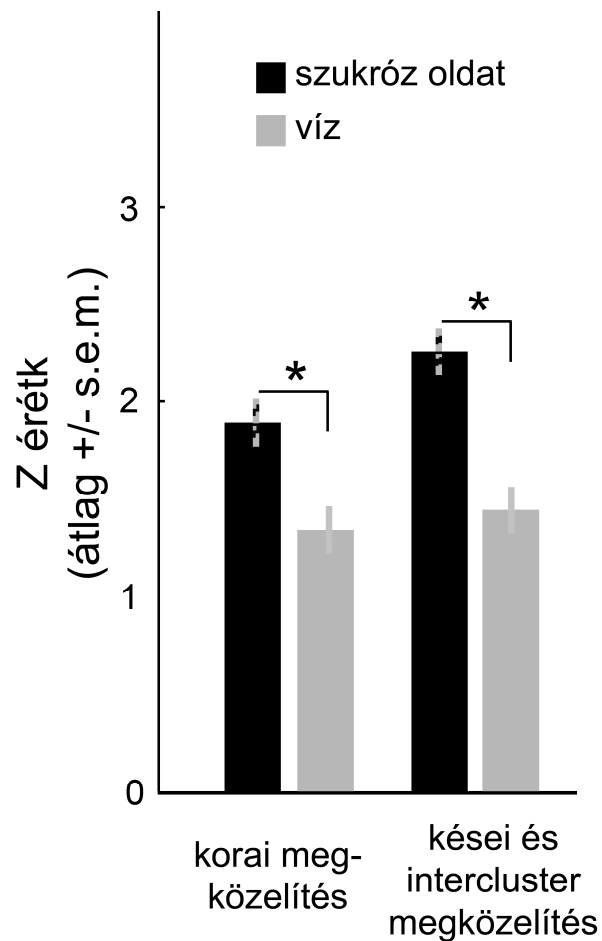
másodpercében volt-e (korai szituációk) vagy később (kései/intercluster szituációk). Ez esetben szignifikáns hatása volt az idő faktornak, de nem volt szignifikáns hatása a "trial"-típusnak, és nem volt szignifikáns interakció.

A fent leírt serkentő populációs aktivitás és a fejjyorsulás 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). (7. Ábra). 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.



6. Ábra A "licking cluster"-eket közvetlenül megelőző egysejtválaszok (**A-D**) és populációs válaszok (**E és F**) patkány mPFC-ben. Raszterdiagramok és esemény körüli időhisztogramok (0,2 s "bin"-szélesség) két neuron jellegzetes serkentő (**A és B**) és gátló válaszait (**C és D**) ábrázolják (t=0: a "licking cluster" kezdete). **A és C**: egysejtválaszok cukor ivása során, **B és D**: ugyanazon sejtek válaszai víz ivása során. **A-D**: a raszterdiagramok minden sora egy "trial"-nek felel meg, egy pont pedig egy akciós potenciálnak. A horizontális szürke vonalak a CS-ek pontos időzítését adják meg. Az esemény körüli időhisztogramok az átlagos tüzelési frekvenciát ábrázolják 200 ms-os "bin"-szélességgel. A "licking cluster"-eket megelőzően serkentő választ adó neuronok populációs aktivitása (**E**) és gátló választ adó neuronok populációs aktivitása (**F**). Nagyobb serkentő populációs aktivitás figyelhető meg a cukoroldat ivása előtt mint a víz ivása előtt (**E**). Nincs szignifikáns különbség a gátló populációs aktivitás esetében (**F**). Az **E és F Ábrákon** a szürke sávok alatti görbék a válaszoló neuronok normalizált átlagát ábrázolják. A szürke sávok a s.e.-t adják meg.



7. Ábra Valamennyi, az itató megközelítése alatt (közvetlenül a "licking cluster"-ek előtt) válaszoló neuron válaszaiból kalkulált populációs válaszok statisztikai értékelése. Amennyiben a "licking cluster" kezdete a jutalom adagolásának első 2 másodpercében volt, az ezt megelőző megközelítést korai megközelítésnek tekintettük. Valamennyi későbbi megközelítést egy szituációnak (kései/intercluster) tekintettünk. Mindkét szituációban (korai, illetve kései/intercluster) szignifikáns különbség figyelhető meg a különböző jutalmak (cukoroldat, illetve víz) felé irányuló megközelítések alatti populációs válaszok között, de nem volt különbség a szituációk tekintetében. * $p < 0,05$, ha a cukoroldat megközelítése alatti populációs válaszokat hasonlítottuk össze a víz megközelítése alattival.

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

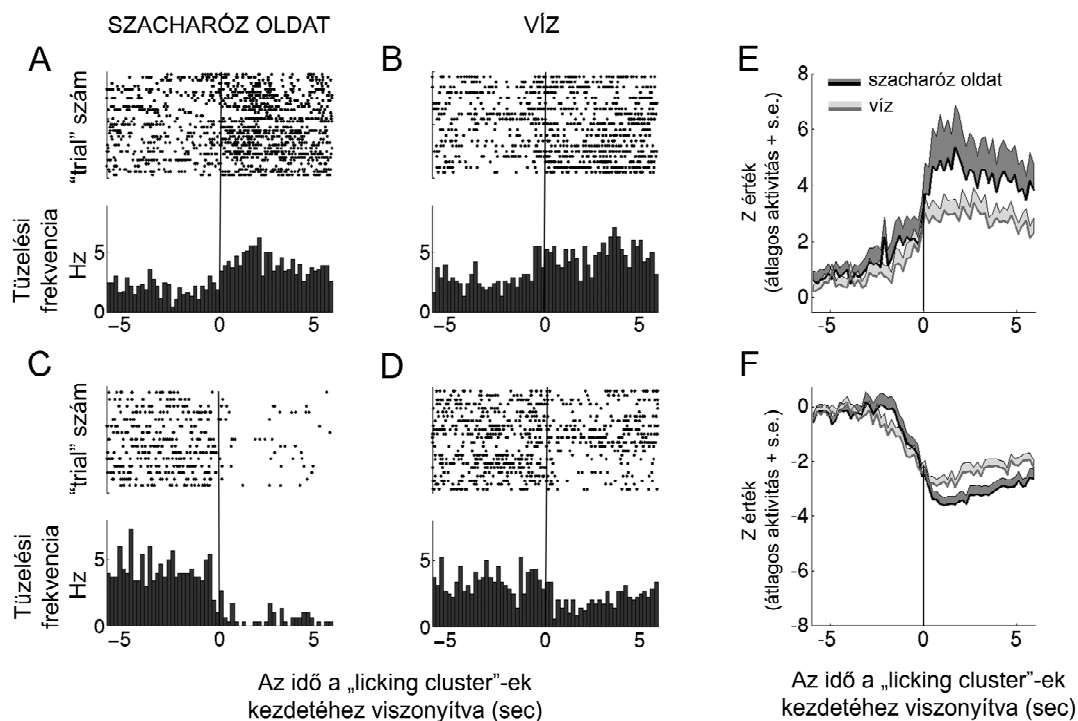
Az ivás alatt válaszoló 80 neuron közül 33 (15%) növelte tüzelési frekvenciáját (8. Ábra, A. és B.). A 33 neuron közül 14 minkét jutalomra válaszolt, 9 csak akkor, amikor a patkány cukoroldatot ivott és 10 csak akkor, amikor vizet ivott.

Összesen 47 neuron (22%) csökkentette tüzelési frekvenciáját (8. Ábra, C. és D.). 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

A 8. E. Ábra a fenti 33 serkentő választ mutató neuron populációs aktivitását ábrázolja. 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.

A 8. F Ábra a 47, gátló választ mutató neuron populációs aktivitását ábrázolja. 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.



8. Ábra A "licking cluster"-ek alatti egysejtválaszok (A-D) és populációs válaszok (E és F) patkány mPFC-ben. Raszterdiagramok és esemény körüli időhisztogramok két neuron jellegzetes serkentő (A és B) és gátló válaszait (C és D) ábrázolják (t=0: a "licking cluster" kezdete). (A és C) egysejtválaszok cukor ivása során, (B és D) ugyanazon sejtek válaszai víz ivása során. (A-D) a raszterdiagramok minden sora egy "trial"-nek felel meg, egy pont pedig egy akciós potenciálnak. Az esemény körüli időhisztogramok az átlagos tüzelési frekvenciát ábrázolják 200 ms-os "bin"-szélességgel. A "licking cluster"-ek alatt serkentő választ adó neuronok populációs aktivitása (E) és gátló választ adó neuronok populációs aktivitása (F). A serkentő és a gátló válaszoknál egyaránt nagyobb populációs válasz figyelhető meg a szacharózzoldat ivása alatt mint a víz ivása alatt. Az E és F ábrákon a szürke sávok alatti vonalak a válaszoló neuronok normalizált átlagát ábrázolják. A szürke sávok a s.e.-t adják meg.

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.

Diszkusszió

Számos megfigyelés arra utal, hogy az mPFC részt vesz a táplálkozási magatartás szabályozásában (Kolb, 1984; Petykó és mts., 2009; Gálosi és mts., 2015). Neurokémiai adatok arra utalnak, hogy az mPFC a dopaminerg beidegzése által fontos szerepet játszik a táplálkozási magatartás olyan mechanizmusában amelyek a jutalmazással kapcsolatosak (D'Angio és Scatton, 1989; Bassareo és Di Chiara, 1999a; Bassareo és mts., 2002). Azon cikkek többségében, melyek az mPFC jutalompredikcióval kapcsolatos funkcionális jellegzetességeivel foglalkoznak, táplálékjutalmat és az instrumentális kondicionálás paradigmát használták. Természetes körülmények között egy instrumentális szituációban gyakran létrejön a pavlovi kondicionálás is. Az így kialakuló tanulás módosíthatja az instrumentális teljesítményt. Egy ilyen helyzetben nehezen állapítható meg, hogy mi az, ami a környezeti stimulusok hatásával kapcsolatos (pavlovi kondicionálás), és mi az, ami a cselekvés és a válasz között létrejövő asszociációval kapcsolatos (instrumentális kondicionálás). Ugyancsak bonyolult annak a megállapítása, hogy a két különböző tanulás, milyen mértékben befolyásolja az aktuális magatartást.

Az itt bemutatott kísérletünkben az mPFC-neuronok válaszait vizsgáltuk egy folyékony táplálékkal jutalmazott pavlovi "trace"-kondicionálás során. A vizsgált neuronok jelentős hányada változtatta meg tüzelési frekvenciáját a pavlovi kondicionálás különböző fázisai alatt, a jutalmat prediktáló hangok alatt (CS), a megközelítési magatartás (CR) és a consummatio alatt (US). Serkentő és gátló válaszmintázatokat is megfigyeltünk. A populációs aktivitás elemzésével kimutattuk, hogy a neuronok diszkrimináltak a CS-ek, a CR-ek és az US-ek

között. A serkentő választ adó neuronok nagyobb populációs választ mutattak a cukoroldattal kapcsolatosan, nagyobb volt a válasz a cukrot prediktáló CS alatt, az itató megközelítése alatt (CR) és a cukoroldat ivása alatt. Ezen túlmenően azon neuronok egy szubpopulációja, amelyek az US alatt is válaszoltak, fenntartották aktivitásukat a CR és/vagy az US alatt. Egy feltűnő eredmény, hogy a CS alatt válaszoló neuronok többsége csak azon "trial"-ek alatt válaszolt, amikor a patkányok ittak a prediktált folyadékból, ezáltal megkülönböztették a consummatív magatartási fázisokat a nem consummatív magatartási fázisoktól.

A fejjgyorsulás és a megközelítő magatartás igazolta a létrejött pavlovi CS-US asszociációt

Kísérletünkben két különböző CS-US társítást alkalmaztunk. A patkányok az itatót egy gyors mozgással közelítették meg. A maximális fejjgyorsulást akkor mértük, amikor a patkányok elérték az itatót, ekkor egy stabil hullámot figyelhettünk meg a gyorsulási görbén, ennek a maximumát használtuk, mint mérhető választ. Az esetek többségében az itató megközelítése az US adagolás első 2 másodpercében történt (korai megközelítés). Ebben az esetben az US-sel kapcsolatos információt kizárólagosan a CS hordozta, vagyis csak a jutalmat prediktáló hangból tudhatták a patkányok, hogy milyen jutalmat tartalmaz az itató. Ezért feltételeztük, hogy a viszonylag konstans és rövid késleltetés miatt leginkább a korai megközelítés válhat kondicionált válasszá (CR). Ritkábban az itató megközelítése később történt (US adagolás 3.-9. másodperce, kései megközelítés). Ebben a szituációban, az előzőhöz hasonlóan az US-sel kapcsolatos információt csak a CS hordozta, a késleltetés viszont hosszú volt és nagy mértékben változó. Ezért feltételeztük, hogy annak a valószínűsége, hogy az itató megközelítése CR-ré válik sokkal kisebb, amennyiben mégis CR-ré válna, az asszociáció feltételezhetően gyengébb. Feltételezhetjük, hogy a patkányok a kései fázisban kezdtek el inni akkor, amikor kevésbé voltak motiváltak. Az "intercluster" megközelítések alatt az US-sel kapcsolatos információ nem függött a CS-től, mert a patkányok már ittak a jutalomból, és a "trial" alatt a jutalom nem változott (folyamatosan ugyanabból az itatóból ihattak). Nagyobb fejjgyorsulást mértünk a korai fázis alatt, mint a kései/intercluster megközelítések alatt. A korai és kései megközelítések alatt nagyobb fejjgyorsulást mértünk, ha a patkányok cukoroldatot ihattak. Tehát a patkányok anticipálták a jutalom milyenségét, függetlenül attól, hogy a megközelítés a korai vagy a kései fázisban volt.

Mindkét esetben a jutalom minőségével kapcsolatos információ csak a CS hangokból származhatott, ezért a különböző gyorsulások bizonyítják, hogy a CS hangok prediktálták a jutalom minőségét. Az a megfigyelés, hogy a fejgyorsulás a korai fázis alatt volt a legnagyobb, együtt azzal, hogy ugyanekkor nagyobb volt a fejgyorsulás cukoroldat esetében bizonyította, hogy az itató megközelítése a korai fázis alatt egy US függő (cukoroldat, illetve víz) kondicionált válasz (CR).

Neuronális aktivitásváltozások a különböző minőségű jutalmakat prediktáló CS-ek alatt

A tanulmányozott neuronok mintegy 1/5-e válaszolt a jutalmat prediktáló hangok (CS) alatt. Serkentő és gátló válaszokat is megfigyeltünk. A serkentő neuronok populációs aktivitása szignifikáns különbséget mutatott a különböző jutalmakat prediktáló (cukoroldat 16 kHz; víz 8 kHz) hangok alatt. Ennek egy lehetséges magyarázata az, hogy a különböző frekvenciájú hangok különböző válaszokat váltottak ki. Az a megfigyelés, hogy néhány neuron ugyanúgy válaszolt (amplitúdó és mintázat) mindkét hangra, egy másik neuroncsoport csak az egyik, vagy csak a másik hangra válaszolt, együtt a consumptiótól való függéssel azt sugallják, hogy a válaszok elsősorban nem a hangok sensoros tulajdonságait kódolják, hanem más információt. Appetitív pavlovi kondicionálással kapcsolatos neuronális válaszokat mutattak ki nyúl mPFC-ben (McLaughlin és mts., 2002). Különböző válaszmintázatokat 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.

Kísérletünk feltűnő eredménye, hogy a válaszok többsége azon "trial"-ek alatt volt, amikor a patkányok ittak a jutalomból. Ennek megfelelően a populációs aktivitás jelentősen nagyobb volt, amikor volt consumptio. Táplálkozási magatartás alatt a patkányok többször is változtatják a consummatív magatartási mintázatokat (ivás, evés, rágás) a nem consummatív magatartási mintázatokkal (ágaskodás, mászkálás, vakarózás, exploratio, nyugalom). A jóllakottság fokozódása közben a nem consummatív magatartási mintázatokkal eltöltött idő addig növekszik, míg az állat be nem fejezi a táplálkozást. A különböző magatartási formák egymásutánisága a táplálkozás során a "magatartási jóllakási szekvencia" ("behavioral satiety

sequence": BSS) (Rodgers és mts., 2010). A BSS fogalmát az irodalmi adatok alapján tudomásunk szerint csak a szilárd táplálék fogyasztására alkalmazzák, de az itt bemutatott kísérletben a különböző magatartási formák hasonló szekvenciája volt megfigyelhető a cukoroldat, illetve a víz ivása során. A fent leírtak szerint, az egyik legfeltűnőbb hatás a "trial"-típusok hatása volt a jutalmat prediktáló cue hangok alatti populációs aktivitásra. Feltételezzük, hogy a fent leírt hatás a BSS-sel kapcsolatos.

A neuronok egy kisebb hányada (41-ből 14) gátló válaszokat mutatott a CS alatt. A serkentő válaszokat mutató neuronokhoz hasonlóan ezek a neuronok is egyértelműen megkülönböztették azokat a "trial"-eket, amikor volt consumptio, azoktól, amikor nem volt, de nem tettek különbséget a különböző minőségű jutalmak között. Egy további különbség az volt, hogy míg a serkentő válaszokat mutató neuronok populációs aktivitása meredeken emelkedett a CS kezdete után, a gátló populációs aktivitás folyamatosan fokozódott a (-4)-tól 4 másodpercig terjedő időintervallumban. Sőt, a gátló válaszokat mutató neuronok jelentős hányada (13-ből 9) folyamatosan csökkentette tüzelési frekvenciáját a CS alatt. Lehetséges, hogy a fent leírt válaszok egy része fenntartott aktivitásváltozás, amely már a CS kezdete előtt kezdődik. Egy lehetséges magyarázat, hogy több neuron a preparatív folyamatokkal kapcsolatban (pl. preparatív figyelem) is megváltoztatja tüzelési frekvenciáját (Totah és mts., 2009). A serkentő és a gátló populációs válaszok különböző időbeli lefutása és az a tény, hogy a serkentő populációs válaszok különbséget tesznek a jutalom típusok között, ezzel szemben a gátló válaszok nem, arra utal, hogy legalábbis részben különböző funkciót töltenek be. Néhány gátló választ mutató neuron azonban a serkentő válaszokhoz hasonló időbeli lefutású választ mutat. Ezek a válaszok gátló interneuronok által jöhetnek létre (Gabbott és mts., 2003).

A pavlovi asszociáció kialakulása után a magatartást a CS-US kontingencia vezérli, vagyis az, hogy a jutalom mennyire függ a kondicionált stimulustól. Ezért egy pavlovi szituációban a legfontosabb kérdések közé tartozik, hogy a CS alatti egysejtválaszok CS-US kontingenciát kódolnak-e. Ilyen egysejtválaszokat, amelyek CS-US kontingenciát kódolnak, mutattak ki majom amygdalában (Bermudez és Schultz, 2010). Ebben a kísérletben a zéró kontingencia paradigmát alkalmazták, amelyben pavlovi kondicionálás után nem csak a CS-hez időben kapcsoltan kap a kísérleti állat jutalmat, hanem más időpontban is, ugyanazzal a valószínűséggel. Ez a kontingencia leértékeléséhez vezet, mert a jutalom nem függ a CS-től, ugyanakkor a CS-t továbbra is időben kapcsoltan követi az US (a kontiguitás nem változik). Eredményeinkhez hasonlóan, kondicionált hangstimulusokra adott serkentő és gátló válaszokat mutattak ki nyúl prelimbicus kéregben differenciális pavlovi kondicionálás során

(McLaughlin és mts., 2002). Bár a kísérlet nem vizsgálta specifikusan a CS-US kontingenciát, a szerzők azt a következtetést vonták le, hogy a CS alatti válaszok a CS-US kontingenciával kapcsolatosak: egy bizonyos sejtsz csoportban ("session related cells"), a válasz a kondicionált állkapocsmozgással párhuzamosan alakult ki és a "komplex sejtek" ellentétes választ mutattak a jutalmazott CS-re (CS+) és a nem jutalmazott CS-re (CS-). Kísérletünkben két megfigyelés utal arra, hogy a CS alatti válaszok CS-US kontingenciát kódolnak: (i) a populációs aktivitás megkülönböztette egymástól a két különböző CS-t, ezektől a CS-ektől függött, hogy milyen jutalmat kapnak az állatok és (ii) a populációs válasz alig tért el az alapvonalától amikor a "trial" során nem volt consumptio.

Kísérletünk során a CS alatt serkentő választ mutató 27 neuron közül 12, és a gátló választ mutató 14 neuron közül 8 fenntartotta az aktivitásváltozást a "trace"-intervallum alatt. Ez a megfigyelés összhangban van azon irodalmi adatokkal (Siegel és mts., 2012), melyek szerint az mPFC-ben egy neuronpopuláció fenntartja a CS alatti aktivitásváltozást egészen az US kezdetéig, néha tovább. Elképzelésük szerint "trace"-kondicionálás alatt, amikor az US kezdete nem a CS alatt vagy a végén van, hanem a CS vége után egy ún. "trace"-intervallummal később, a CS-US asszociáció létrejöttének feltétele, hogy a CS-sel kapcsolatos információt kódoló neuronok fenntartják aktivitásukat a "trace"-intervallum alatt.

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

Összesen 56 neuron (26,5%) változtatta meg tüzelési frekvenciáját a "licking cluster"-ek előtt. Serkentő és gátló válaszokat is megfigyeltünk, de ezek több szempontból is különböztek egymástól. A serkentő populációs aktivitás egyértelműen különbséget mutatott a CS típusok alapján, és egyértelmű maximumot mutatott a "first lick" előtt. Ezért először elemeztük, hogy a serkentő populációs aktivitás a fejgyorsulással kapcsolatos-e, vagy sem. Ahogy fent leírtuk, az itató megközelítése a korai fázisban (első 2 másodperc) egy CS-sel kapcsolatos megközelítési magatartás és egyben CR. Az itató palack megközelítése során a serkentő populációs aktivitás különbséget mutatott a "trial"-típusok alapján. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy a különbség a megközelítési magatartás motoros aspektusaival kapcsolatos, amit különböző fejgyorsulásokhoz vezetett. Egy másik lehetséges magyarázat, hogy a különböző populációs aktivitás a jutalomexpektanciával kapcsolatos.

Ezt a hipotézist úgy teszteltük, hogy összehasonlítottuk a korai megközelítések alatti válaszokat a kései megközelítések alatti válaszokkal. A fejgyorsulásokkal ellentétben, amelyek egyértelműen különbözőek voltak a különböző szituációkban, a populációs aktivitás nem különböztette meg a korai és a kései szituációt, ez arra utal, hogy az idegi válaszok inkább a jutalomexpektanciával kapcsolatosak és nem a fejgyorsulással. Egysejtszinten a helyzet azonban ettől eltérő. A neuronok többsége a populációs válaszhoz hasonlóan válaszol, ezek valószínűleg a jutalomexpektanciával kapcsolatosak. Néhány (4) neuron azonban egyértelműen a fejgyorsulásnak megfelelően különbséget mutatott a korai és kései szituációk alapján, ezek a válaszok valószínűleg a fejgyorsulással kapcsolatosak. Nyúl mPFC-ben olyan egysejtválaszokat mutattak ki (McLaughlin és mts., 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 fejgyorsulásokat figyeltünk meg a különböző kondicionált válaszok során.

Jutalomexpektanciát kódoló neuronokat mutattak ki majom dorsolateralis PFC-ben (Watanabe, 1996), egy olyan agyterületen, amelyik részben a patkány mPFC-nek felel meg (Gabbott és mts., 2003). Bár egy "késleltetett válasz" paradigmát alkalmaztak, amely nem egy pavlovi, hanem egy instrumentális szituáció, a leírt "delay" aktivitásról, amelyik jutalomexpektanciát kódol, elképzelhető, hogy legalábbis részben CS függő CR-rel kapcsolatos, ugyanis a jutalomexpektancia instrumentális szituációban is lehet egy affektív (pavlovi) CR. Az itt bemutatott kísérlet során 9 neuron különbséget tett a különböző jutalmak között (nagyobb válasz a cukoroldatra), de nem tett különbséget a különböző szituációk között (korai, kései és intercluster megközelítés). Úgy tűnik, hogy ezek a válaszok függetlenek a megközelítési magatartás motoros komponenseitől és inkább a jutalomexpektanciával kapcsolatosak.

Néhány gátló választ is megfigyeltünk, ahol a válaszmintázat megfelelt a fent leírtaknak, ennek alapján feltételezhető, hogy a gátló neuronok között is vannak olyanok, amelyek a megközelítési magatartással, és olyanok, amelyek jutalomexpektanciával kapcsolatosak. A gátló populációs aktivitás több szempontból is különbözött a serkentő populációs aktivitástól. Ezzel ellentétben nem mutatott különbséget a két jutalomtípus tekintetében, a gátló válasz maximuma pedig a "licking cluster"-ek elején volt, mindez arra utal, hogy a gátló válaszok jelentős hányada más információt kódolhat, mint a serkentő válaszok, például a "licking cluster"-ek indítását.

A "licking cluster"-ek alatt válaszoló neuronok

Az itt bemutatott kísérlet során a neuronok egy jelentős hányada megváltoztatta tüzelési frekvenciáját a "licking cluster"-ek alatt. Ehhez hasonló jutalommal kapcsolatos válaszokat mutattunk be a disszertációban is bemutatott korábbi kísérletünkben (Petykó és mts., 2009). Egy újabb cikkben (Horst és Laubach, 2013) egy késleltetett alternációs feladat és egy variábilis intervallum "licking" feladat során a "licking" magatartás kezdetét el lehetett különíteni a jutalom adagolás kezdetétől. Elkülönítették azokat a válaszokat egymástól, amelyek a jutalom megszerzésének kezdetével a consumptio kezdetével, vagy mindkettővel időben kapcsolatosak. A mezőpotenciálok elemzésével kimutatták, hogy a jutalomfüggő "network" aktivitás inkább a "licking" indításával kapcsolatos mint a jutalomadagolás kezdetével. Ezen kívül kimutatták, hogy az mPFC aktivitás fluktuációja a β -tartományban elsősorban a consumptioval és nem a jutalomexpektanciával kapcsolatos (Horst és Laubach, 2013). Jelen kísérletünkben a "licking" magatartást nem lehetett elkülöníteni a consumptiotól, ennek ellenére feltételezhetjük, hogy mindkettő, azaz a "licking" magatartás és a consumptio hozzájárultak a "licking cluster"-ek alatti egysejtválaszokhoz.

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 következtében létrejövő moduláció következményei. 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 és mts., 2013). Jelen kísérletünkhöz hasonlóan úgy serkentő mint gátló válaszokat is kimutattak. Bár az itt bemutatott kísérletünkben a consumptio indítását ("licking"), a jutalom fogyasztásának indítását és a sensoros stimulációt nem lehet egymástól egyértelműen elkülöníteni, eredményeink összhangban vannak az idézett cikkel. Úgy a serkentő, mint a gátló válaszok nagyobbak voltak a cukoroldat consumptio alatt, mint víz ivása közben. Tekintettel arra, hogy mindkét folyadék ivása mint motoros folyamat hasonló (azonos "licking" frekvencia), feltételezzük, hogy a populációs aktivitásokban megfigyelt különbség azzal kapcsolatos, hogy az édes cukoroldatnak más az íze, és ízletesebb mint a víz. Néhány neuron nem tett különbséget a cukoroldat és a víz között, elképzelhető, hogy ezen neuronok válaszai magával a consumptioval kapcsolatosak.

Konklúzió

Az itt bemutatott kísérletben **az appetitív stimulus-jutalom (CS-US) asszociáció neuronális korrelátumát** mutattuk ki patkány mPFC-ben. Olyan neuronokat mutattunk ki, melyek a jutalmat reprezentálják a CS, a CR és a consumptio alatt. Eredményeink igazolják, hogy az mPFC részt vesz a jutalom predikcióban a kondicionált magatartás reprezentációjában és szervezésében, pl. a jutalom megközelítésében és consummatiojában.

Juxtacelluláris elektrophysiológiai kísérletek altatott patkányon

Egy széles körben használt definíció szerint a PFC a thalamus mediodorsalis magjának (MD) projekciós területe (Leonard, 1969; Krettek és Price, 1977b). A PFC fontos afferenciái a VTA és a BLA (Thierry és mts., 1973; Krettek és Price, 1977a).

A PFC és a BLA, mindkettő fontos szerepet játszik számos funkcióban, mint a memória, az emóció, szociális és szexuális magatartás, táplálkozás, viscerális funkciók, stressz és öningerlés. A BLA-mPFC pálya által közvetített funkciókat a VTA-ból az mPFC-be irányuló pálya befolyásolja (Thierry és mts., 1973; Krettek és Price, 1977a).

Korábban említettük, hogy az mPFC táplálkozási magatartással kapcsolatos információt is feldolgoz. Így valószínűsíthető, hogy a masszív BLA-mPFC projekció ezeket a magatartási formákat befolyásolja. Szintén említettük az mPFC-nek a táplálék jutalmazási mechanizmusokkal kapcsolatos szerepe és az itt felszabaduló dopamin közötti összefüggést.

A PFC kapcsolatait a BLA-val és a VTA-val számos elektrophysiológiai tanulmányban is vizsgálták (Perez-Jaranay és Vives, 1991; Pirot és mts., 1992; Floresco és Tse, 2007). A BLA elektromos ingerlése a neuronok többségénél gátló választ vált ki, a neuronok egy kisebb hányadánál viszont serkentő választ vált ki (Perez-Jaranay és Vives, 1991). A VTA stimulációja önmagában az mPFC-neuronok spontán aktivitásának gátlását váltja ki. Amennyiben a VTA stimuláció a BLA stimulációt előzi meg, a VTA ingerlése csökkenti a BLA-ingerléssel kiváltott excitációt és inhibíciót (Pirot és mts., 1992; Floresco és Tse, 2007).

Ugyanakkor keveset tudunk a BLA- és VTA-ingerléssel az mPFC-ben kiváltott egysejtszintű 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).

Az elektromos ingerléssel kiváltott egysejtválaszok és azon sejtek morfológiája közti összefüggés, amelyekről ezek a válaszok elvezethetők, kevésbé ismert. Neurobiotinnal töltött üveg mikroelektródával való elvezetés után a Neurobiotin juxtacelluláris alkalmazásával az elvezetett neuronok Golgi-szerű jelölése érhető el. 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 sejttípusok (Vogt és 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 keringtető rendszer segítségével. Ott ahol az elvezető, illetve az ingerlő elektródákat az agyba bevezettük lyukakat fúrtunk a koponyába. A következő sztereotaxikus koordinátákat használtuk (Paxinos és 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

Az intézetünkben készített 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. A stimulusok pillanatát jelző triggereket az extracelluláris egysejtelvezetéssel szimultán egy digitális csatornán rögzítettük. (CED adatgyűjtő rendszer; Spike2 software, Cambridge Electronics Instruments, Cambridge, UK).

Juxtacelluláris egysejtelvezetés és a neuronok töltése Neurobiotinnal

Az extracelluláris egysejtelvezetéshez üveg mikroelektródát használtunk (boroszilikát üveg, hegyátmérő 1-2 µm, impedancia 10-50 MΩ), mely 0,5 M NaCl oldatban 2% Neurobiotint tartalmazott. Az elvezető elektródát 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 elektrophysiologia 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. A Cusum statisztikai értékeléséhez egy Monte Carlo eljárás alapján alapuló módszert használtunk (Ushiba és mts., 2002). Kontroll PSTH-k alapján (stimulus nélkül) mely a neuron spontán tüzelését adja meg, határoztuk meg a konfidencia intervallumot. Elektrophysiológiai jellemzés után a neuronokat Neurobiotinnal jelöltük (Pinault, 1994). Röviden, az üveg mikroelektrodát olyan közel vittük a neuronhoz, hogy 10 nA-nél kisebb áram, amit az elektrodán keresztül injektáltunk, modulálta a neuron tüzelését. Ezután a Neurobiotint 2-10 nA-es pozitív áramimpulzusokkal juttattuk a neuron közelébe állandó elektrophysiológiai kontroll mellett 2-20 percig. 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 fiziológiás 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 és mts., 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. Az mPFC-neuronok válaszát BLA- és VTA-ingerlésre a peristimulus hisztogramok alapján kvantifikáltuk (150-1500 lefutás) a válasz típusnak és a spontán aktivitásnak megfelelően. 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 (9. Ábra, B.). A 36 feldolgozott patkányból 31 esetben sikerült kizárólagosan egy neuront jelölni a szűrőcsatorna végén. Amennyiben a szűrőcsatorna vége a

szöveti 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 (9. Ábra, B.).

A jelölt neuronokat korábbi Golgi tanulmányok alapján osztályoztuk (Vogt és 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 (9. Ábra, D., F. és H.).

A morfológiailag jellemzett neuronok BLA/VTA-ingerlésre adott válasza

Huszonegy válaszoló neuront jelöltünk sikeresen a dorsalis mPFC-ben. Valamennyi (16) "kis és közepes méretű piramissejt" (Vogt és Peters, 1981) válasza a BLA ingerlésére a rövid latenciájú (20-25 ms) gátlás kategóriájába tartozott (9. Ábra, C.). 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 (9. Ábra, E.).

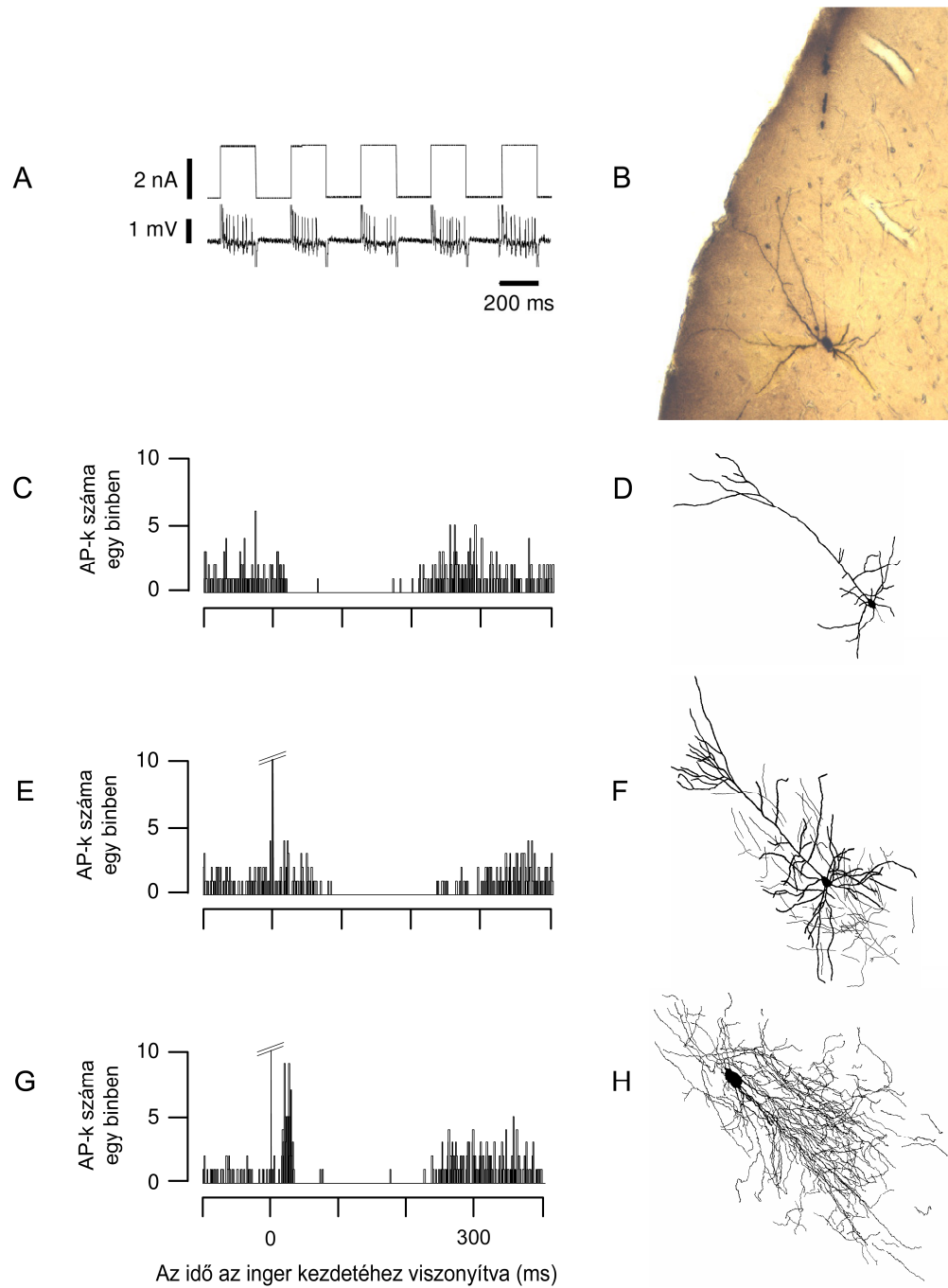
A BLA-ingerléssel kiváltott 20-25 ms latenciájú gátlás tekintetében szignifikáns eltérés mutatkozott a "kis és közepes piramissejtek" (valamennyi), illetve a "nagy piramissejtek" (4-ből 2) csoportja között (Fischer Exact teszt; $p=0,0035$). Szintén szignifikáns eltérés volt (csak "nagy piramissejt")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

Miközben mind a 16 kis és közepes piramissejt 20-25 ms-os latenciájú gátlással válaszolt a BLA elektromos ingerlésére, a 4 nagy piramissejt közül csak 1 válaszolt így. A BLA ingerlésére adott serkentő válaszok tekintetében szintén szignifikáns különbséget mutattunk ki. Miközben a 4 nagy piramissejt közül 2 adott serkentő választ, a 16 kis és közepes piramissejt közül egy sem mutatott serkentő választ (Fischer Exact teszt; $p=0,0316$).

A jelölt multipoláris interneuron feltételezhetően monosynapticus serkentő választ mutatott, amit csendes periódus követett (9. Ábra, G.).

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.



9. Ábra

9. Ábra

A neuronok juxtacelluláris mikroeletrophoreticus töltése Neurobiotinnal (A), Golgi-szerűen jelölt neuron (B), a BLA elektromos ingerlésére adott egysejtválaszokat ábrázoló peristimulus időhisztogramok ("bin"-szélesség 1 ms) (C, E és G) és jelölt neuronok camera lucida rajzai (D, F és H). (A) felső csatorna: a neuronok mikroiontophoreticus töltése során alkalmazott áramimpulzusok (anód, 2 nA, 200 ms on, 200 ms off), az elvezető elektródán keresztül, alsó csatorna: egysejtelvezetés egy mPFC-neuron mikroiontophoreticus töltése közben a felső csatornán látható elektromos impulzusokkal. A neuron ritmikusan tüzel az ingerlés ritmusa szerint (csak az "on" fázis alatt). (B) 2. rétegi "kis piramissejt a patkány aCg-ben. Az ezüstözési eljárás során a szúrscsatorna is kirajzolódott, és jól látható, hogy a sejtest közvetlen közelében végződik (juxtacelluláris). (C) a D ábrán látható "kis piramissejt" 20 ms-os latenciájú gátló válasza a BLA elektromos ingerlésére. (D) "kis piramissejt" camera lucida rajza (E) az F ábrán látható "nagy piramissejt" 55 ms-os latenciájú gátló válasza a BLA elektromos ingerlésére. (F) "nagy piramissejt" camera lucida rajza (G) a H ábrán látható "nagy multipoláris sejt" 15 ms-os latenciájú serkentő válasza a BLA elektromos ingerlésére. A tüzelési frekvencia fokozódását egy hosszan tartó gátlás követi. (H) "nagy multipoláris sejt" camera lucida rajza.

Diszkusszió

Kísérleteinkben a BLA és VTA elektromos ingerlésével kiváltott tüzelésifrekvencia-változásokat vezettünk el az mPFC-ből. 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).

Eredményeinktől eltérően Perez-Yaranay cikkében 127 válaszoló neuron mintegy egyharmada az anterior cingularis kéregben helyezkedett el, de az idézett tanulmányban nem volt szignifikáns összefüggés a neuronok BLA-ingerlésre adott válasza és a neuronok rétegbeli, vagy mPFC területbeli (PL vagy aCG) lokalizációja között. A mi kísérleteinkben a jelölt neuronoknak csak egy kis hányada helyezkedett el a PL-ben, főleg azért, mert minden feltételezhetően sikeres jelölés után az elektródát eltávolítottuk az agyból, annak érdekében, hogy elkerüljük a jelölt neuron károsodását.

A Neurobiotinnal jelölt neuronok morfológiája a korábbi Golgi tanulmányoknak megfelelő volt (Vogt és Peters, 1981), de különösen az immunhisztokémiai eredményekhez képest (Gabbott és mts., 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 sejtípusokra szelektív.

Korábbi és az itt bemutatott eredmények alapján a 20-25 ms latenciájú gátlás a BLA-ingerlésre adott leggyakoribb választípus. Ennek alapján nem meglepő, hogy a morfológiai sejtípusok között leggyakoribb kis és közepes piramissejtek között gyakran ezt a választípust figyelhetjük meg. Az az eloszlás viszont, hogy valamennyi kis és közepes méretű piramissejt 20-25 ms lateciájú gátlással válaszolt BLA-ingerlésre szignifikánsan eltér egy random eloszlástól (Fischer Exakt teszt; $p=0,0035$). A fentiek alapján megállapíthatjuk, hogy a 20-25 ms latenciájú gátlás a kis és közepes piramissejtek jellegzetes válasza a BLA elektromos ingerlésére. Ez természetesen nem zárja ki ebben a sejtcsoportban más választípusok lehetőségét.

A 4 nagy piramissejt közül kettő a BLA elektromos ingerlésére a tüzelési frekvencia növekedésével válaszolt, ezáltal a serkentő válaszok gyakorisága szignifikánsan nagyobb,

mint a kis és közepes piramis sejtek között (Fischer exakt teszt; $p=0,0316$). A másik két nagy piramis sejt 25, illetve 55 ms-os gátlással válaszolt. Az mPFC-ben jelölt nagy multipoláris sejt (interneuron) serkentő választ adott BLA stimulációra. Annak ellenére, hogy csak egyetlen elektrophysiológiai jellemzett interneuront sikerült jelölnünk, ez az eredmény azt sugallja, hogy a serkentő válaszok BLA-ingerlésre nem ritkák az interneuronok között. Ez az eredményünk összhangban van azzal az irodalmi adattal (Gabbott és mts., 2006) miszerint GABA-erg interneuronok monosynapticus serkentő bemenetet kapnak a BLA-ból. Azt is igazolták, hogy ezek a GABA-interneuronok parvalbumin-pozitív immunreaktivitást mutatnak. A fentiek alapján feltételezhető, hogy az általunk jelölt neuron egy parvalbumin-pozitív GABA-erg interneuron.

Irodalmi adatok alapján a BLA monosynapticus glutamaterg bemenetet küld az mPFC-be, melyek interneuronokon és számos piramis sejten végződnek. Ennek megfelelően 7 ms-os latenciájú serkentő bemenetet mutattunk ki a "multipoláris sejt" és két "nagy piramis sejt". Az interneuronok számos piramis sejtet gátolnak. Ennek eredményeként kizárólag 20-25 ms-os latenciájú gátlást mutatott az összes "kis piramis sejt" BLA-ingerlésre. Ugyanakkor ismert, hogy számos piramis sejt kap monosynapticus bemenetet a BLA-ból. A BLA nagy részének elektromos ingerlése során azonban, mint a disszertációban bemutatott kísérletben, a bisynapticus gátlás dominál. Először mutattuk ki, hogy e tekintetben a "kis piramis sejtek" csoportja homogén. Ezzel ellentétben a "nagy piramis sejtek" csoportja heterogén. Valószínűleg, ezek is általában monosynapticus bemenetet kapnak a BLA-ból és ugyanakkor bisynapticus gátló inputot is kapnak interneuronokon keresztül, de ez esetben néha a gátlás, máskor a serkentés dominál. A "nagy piramis sejteken" hosszú "onset" latenciájú polysynapticus gátlást is kimutattunk, amelyik valószínűleg a thalamus mediodorsalis magján keresztül (MD) éri el az mPFC-t (Beckstead, 1979; Perez-Jaranay és Vives, 1991; Gabbott és mts., 1997). A VTA neuronok monosynapticusan és presynapticusan gátolják a piramis sejteket, ezek részben visszavetítenek a VTA-ba, e tekintetben nem volt eltérés a két piramis sejt csoport között.

Az mPFC a BLA és a VTA a motivált magatartás számos aspektusában játszanak szerepet. A BLA szerepet játszik a jutalom incentív értékével kapcsolatban (Malkova és mts., 1997). Ezzel szorosan összefügg, hogy nélkülözhetetlen a kondicionált ízaverzió (CTA) kiépítéséhez és fenntartásához (Yamamoto és 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.

Feltételezhető a kísérletünkben tanulmányozott mindkét pálya komplex együttműködése az instrumentális kondicionálás és az ingerek incentív motivációs értékével kapcsolatban. A prelimbic cortex az instrumentális kontingencia detektálásáért felelős agyterület (Balleine és Dickinson, 1998). Ehhez szükséges az instrumentális kontingencia és a cél incentív értékének interakciója. BLA ledált állatok esetében csökkent a másodlagos megerősítőként szolgáló pavlovi CS-re adott instrumentális válasz (Cador és mts., 1989). Kimutatták, hogy a BLA és mPFC összeköttetésének léziója modulálja az instrumentális választást (Coutureau és mts., 2000). Feltételezhetően ez az összeköttetés felelős az instrumentális kontingencia és az incentív érték funkcionális kapcsolatáért (Pitkanen, 2000). A VTA működése viszont a jutalommal összefüggő ingerek incentív motivációs értékével kapcsolatos (Berridge és 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.

Konklúzió

A patkány mPFC-ben található piramis sejtek monosynapticus serkentő, bisynapticus rövid latenciájú gátló és polysynapticus, hosszú latenciájú gátló bemenetet kapnak a BLA-ból. **Először mutattuk ki, hogy altatott patkányban a "kis piramis sejtek" tipikus válasza a rövid latenciájú válasz, a nagy piramis sejteken viszont mind a három választípus megfigyelhető.** Altatott patkányban a VTA-ingerlésre az mPFC-neuronok gátlással válaszolnak. Számos neuron kap konvergens bemenetet a BLA-ból és a VTA-ból. Eredményeink a motivációval kapcsolatos információ komplex feldolgozására utalnak.

Eredmények összefoglalása

Elektrophysiologia kísérletek szabadon mozgó patkányon

Két különböző kísérletben, cukor szabad ivása közben, illetve pavlovi szituációban szabadon mozgó patkányon, elektrophysiologiai kísérletben vizsgáltuk az mPFC-neuronok működését. A cukor szabad ivása esetében az itató folyamatosan rendelkezésre állt, először vizet tartalmazott, ezt egy kísérleti ülés során egyszer cseréltük ki cukoroldatot tartalmazóra. A pavlovi szituációt az első kísérlet folytatásaként terveztük azzal a céllal, hogy választ kapjunk az első kísérlet után felmerülő kérdésekre. Ezért ugyanazt az itatótípust használtuk (palack, ugyanazzal az itatócsővel), az itató minden "trial" során viszonylag sokáig rendelkezésre állt (13 sec), annak érdekében, hogy a "licking" mikrostruktúrája ("licking cluster"-ek) megmaradjon. Erre azért volt szükség, mert az első kísérletben az egysejtválaszok a "licking cluster"-ekkel voltak kapcsolatosak. Ennek eredményeként a kísérlet során valóban hasonlóan ittak a patkányok, minden kísérleti ülés során 15-25 ml vizet és 20-35 ml cukoroldatot ittak.

A "licking cluster"-ek alatt válaszoló neuronok

Mindkét kísérlet során a neuronok jelentős hányada (23%, illetve 38%) változtatta meg tüzelési frekvenciáját a "licking cluster" 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), de az egysejtválaszok viszont eltérőek. Feltételezésünk szerint a táplálék íze és jutalomértéke jelentős szerepet játszik a "licking cluster"-ek alatti válaszok kialakításában. Egy feltűnő különbség a két kísérlet eredményei között az, hogy míg a szabad ivás során szinte csak a cukor ivása alatt voltak szignifikáns egysejtválaszok, a pavlovi szituációban általában mindkét oldatra válaszoltak a neuronok, de a cukoroldatra nagyobbak voltak a válaszok. A választ a két szituáció közötti különbségben kell keresnünk. A szabad ivás során, miután a patkányok megtapasztalták, mi van az itatóban, a folyadék íze és minősége viszonylag sokáig nem változott, nem kellett sokat "gondolkodni"

az ivás eredményével kapcsolatosan. A pavlovi szituációban a jutalom minősége véletlenszerűen váltakozott, a jutalom minőségét általában a CS jelezte, ezért a helyes jutalomexpektanciához folyamatos figyelemre volt szükség, feltételezhetően a patkányok motivációs állapota is más volt a pavlovi szituációban. Elképzelhető, hogy a jutalom milyensége az ivás során igazolta az állatok helyes expektanciáját. A második kísérletben elemeztük azokat a neuronokat amelyek a "licking"-frekvencia szerint modulálják tüzelésüket, és igazoltuk hogy "licking cluster"-ek alatti válaszok nem a "licking"-el kapcsolatos moduláció következményei.

Közvetlenül a "licking cluster"-ek előtt válaszoló neuronok

Mindkét kísérlet során a neuronok 26%-a változtatta meg tüzelési frekvenciáját közvetlenül a "licking cluster"-ek előtt. Itt is serkentő és gátló válaszokat mutattunk ki. 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 fejjyorsulás). 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 fejjyorsulásoknak megfelelően modulálta tüzelési frekvenciáját, vagyis **ezeknek a válasza a megközelítési reakcióval volt kapcsolatos.**

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. A második kísérlettel foglalkozó fejezetben részletesen elemeztük, hogy ezek a válaszok a jutalom minőségével illetve motivációval kapcsolatosak és nem a hanginger sensoros tulajdonságaival. 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 nem consummativ magatartási mintázatokra

(ágaskodás, mászkálás, vakarózás, exploratio, nyugalom) váltottak, vagyis a pavlovi szituációban való részvétel szünetel, tehát ez a válasz szorosan összefügg magával a pavlovi szituációval.

Averzív szituációban "trace"-kondicionálás során elektrophysiológiai kísérletben "bridge sejtek"-et mutattak ki, 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. 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.

Juxtacelluláris egysejtelvezés és a neuronok töltése akut patkánykísérletben

Akut elektrophysiológia kísérleteinkben Neurobiotint tartalmazó üveg mikroelektródák segítségével juxtacelluláris egysejtelvezést végeztünk patkány medialis prefrontalis cortextből (aCg/PL). Valamennyi kísérlet során egyes impulzusokkal elektromosan ingereltük a basolateralis amygdalát emellett a morfológiailag is jellemzett neuronok mintegy felében a ventralis tegmentalis areát (VTA) is ingereltük szintén egyes impulzusokkal.

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

Összesen 22 elektrophysiologiai 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. Ezek közül 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 (valószínűleg bisynapticus) 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 gátló választ mutatott. 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 polysynapticus 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. A neuron gátló választ mutatott a VTA-ingerlésére.

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

A BLA monosynapticus glutamaterg bemenetet küld az mPFC-be, melyek interneuronokon és számos piramissejten végződnek. Parvalbumin-pozitív GABA-erg interneuronok viszont monosynapticusan gátolják a piramissejteket. A BLA elektromos ingerlése tehát számos piramissejt monosynapticus ingerléséhez és bisynapticus gátlásához vezet. Először mutattuk ki, hogy amennyiben a BLA-t elektromosan ingereljük a "kis piramissejt"-eken a bisynapticus gátlás ("onset" latencia 20-25 ms) dominál. Ezzel szemben a mindössze 4 "nagy piramissejt"-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 glutamáterg input, nemcsak piramissejteken, hanem gátló interneuronokon is végződik. A VTA-ból származó dopaminerg input a piramissejteken 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 piramissejtek" és a "nagy piramissejtek" 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. Ezért juxtacelluláris kísérleteink alapján feltételezhetjük, hogy a motivációval kapcsolatos információ komplex módon integrálódik az mPFC-ben. Továbbá feltételezhető, hogy a "kis" és "nagy piramissejt"-ek eltérő funkcionális tulajdonságokkal rendelkeznek a motivációval kapcsolatban.

Irodalom

- Abeles M, Gerstein GL (1988) Detecting spatiotemporal firing patterns among simultaneously recorded single neurons. *J Neurophysiol* 60:909-924.
- Aberman JE, Salamone JD (1999) Nucleus accumbens dopamine depletions make rats more sensitive to high ratio requirements but do not impair primary food reinforcement. *Neuroscience* 92:545-552.
- Adams CD (1982) Variations in the sensitivity of instrumental responding to reinforcer devaluation. *Q J Exp Psychol, Sect B, Comp Physiol Psychol* 34(May):77-98.
- Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR (1990) Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res* 85:119-146.
- Balleine BW, Dickinson A (1998) Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates. *Neuropharmacology* 37:407-419.
- Balleine BW, Dickinson A (2000) The effect of lesions of the insular cortex on instrumental conditioning: evidence for a role in incentive memory. *J Neurosci* 20:8954-8964.
- Bankman IN, Johnson KO, Schneider W (1993) Optimal detection, classification, and superposition resolution in neural waveform recordings. *IEEE Trans Biomed Eng* 40:836-841.
- Bassareo V, Di Chiara G (1999a) Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. *Eur J Neurosci* 11:4389-4397.
- Bassareo V, Di Chiara G (1999b) Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments. *Neuroscience* 89:637-641.
- Baxter MG, Parker A, Lindner CC, Izquierdo AD, Murray EA (2000) Control of response selection by reinforcer value requires interaction of amygdala and orbital prefrontal cortex. *J Neurosci* 20:4311-4319.
- Bechara A, Damasio H, Damasio AR (2000) Emotion, decision making and the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex* 10:295-307.
- Bechara A, Tranel D, Damasio H, Adolphs R, Rockland C, Damasio AR (1995) Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. *Science* 269:1115-1118.
- 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.
- Berendse HW, Galis-de Graaf Y, Groenewegen HJ (1992) Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. *J Comp Neurol* 316:314-347.
- Bermudez MA, Schultz W (2010) Responses of amygdala neurons to positive reward-predicting stimuli depend on background reward (contingency) rather than stimulus-reward pairing (contiguity). *J Neurophysiol* 103:1158-1170.
- 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.
- Bindra D (1968) A neuropsychological interpretation of the effects of drive and incentive-motivation on general activity and instrumental behavior. *Psychol Rev* 75:1-22.
- Brogden WJ (1939) Sensory pre-conditioning. *J Exp Psychol* 25(4):323-332.

- Bryden DW, Johnson EE, Tobia SC, Kashtelyan V, Roesch MR (2011) Attention for learning signals in anterior cingulate cortex. *J Neurosci* 31:18266-18274.
- Buchanan SL, Powell DA (1982) Cingulate cortex: its role in Pavlovian conditioning. *J Comp Physiol Psychol* 96:755-774.
- Bussey TJ, Everitt BJ, Robbins TW (1997) Dissociable effects of cingulate and medial frontal cortex lesions on stimulus-reward learning using a novel Pavlovian autoshaping procedure for the rat: implications for the neurobiology of emotion. *Behav Neurosci* 111:908-919.
- Cador M, Robbins TW, Everitt BJ (1989) Involvement of the amygdala in stimulus-reward associations: interaction with the ventral striatum. *Neuroscience* 30:77-86.
- Cahill L (2000) Modulation of long-term memory storage in humans by emotional arousal: adrenergic activation and the amygdala. In: *The amygdala: a functional analysis*, 2 Edition (Aggleton JP, ed), pp 425-445. New York: Oxford University Press.
- Cardinal RN, Pennicott DR, Sugathapala CL, Robbins TW, Everitt BJ (2001) Impulsive choice induced in rats by lesions of the nucleus accumbens core. *Science* 292:2499-2501.
- Cardinal RN, Parkinson JA, Lachenal G, Halkerston KM, Rudarakanchana N, Hall J, Morrison CH, Howes SR, Robbins TW, Everitt BJ (2002) Effects of selective excitotoxic lesions of the nucleus accumbens core, anterior cingulate cortex, and central nucleus of the amygdala on autoshaping performance in rats. *Behav Neurosci* 116:553-567.
- Carter DA, Fibiger HC (1977) Ascending projections of presumed dopamine-containing neurons in the ventral tegmentum of the rat as demonstrated by horseradish peroxidase. *Neuroscience* 2:569-576.
- Childress AR, Mozley PD, McElgin W, Fitzgerald J, Reivich M, O'Brien CP (1999) Limbic activation during cue-induced cocaine craving. *Am J Psychiatry* 156:11-18.
- Cofer CN (1959) Motivation. *Annu Rev Psychol* 10:173-202.
- Corbit LH, Muir JL, Balleine BW (2001) The role of the nucleus accumbens in instrumental conditioning: Evidence of a functional dissociation between accumbens core and shell. *J Neurosci* 21:3251-3260.
- 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.
- D'Angio M, Scatton B (1989) Feeding or exposure to food odors increases extracellular DOPAC levels (as measured by in vivo voltammetry) in the prefrontal cortex of food-deprived rats. *Neurosci Lett* 96:223-228.
- 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.
- Davis M (1992) The role of the amygdala in conditioned fear. In: *The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction* (Aggleton JP, ed), pp 255-306. New York: Wiley-Liss.
- Delgado JM, Roberts WW, Miller NE (1954) Learning motivated by electrical stimulation of the brain. *Am J Physiol* 179:587-593.
- Dickinson A (1994) Instrumental conditioning. In: *Animal learning and cognition* (Mackintosh NJ, ed), pp 45-79. San Diego: Academic Press.
- Dickinson A, Balleine B (1994) Motivational control of goal-directed action. *Anim Learn Behav* 22(1):1-18.

- Dickinson A, Smith J, Mirenowicz J (2000) Dissociation of Pavlovian and instrumental incentive learning under dopamine antagonists. *Behav Neurosci* 114:468-483.
- Dorrscheidt GH (1981) The statistical significance of the peristimulus time histogram (PSTH). *Brain Res* 220:397-401.
- Falkenstein M, Hoormann J, Christ S, Hohnsbein J (2000) ERP components on reaction errors and their functional significance: a tutorial. *Biol Psychol* 51:87-107.
- Fiorillo CD (2011) Transient activation of midbrain dopamine neurons by reward risk. *Neuroscience* 197:162-171.
- Fiorillo CD, Tobler PN, Schultz W (2003) Discrete coding of reward probability and uncertainty by dopamine neurons. *Science* 299:1898-1902.
- 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.
- Gabriel M, Orona E (1982) Parallel and serial processes of the prefrontal and cingulate cortical systems during behavioral learning. *Brain Res Bull* 8:781-785.
- 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.
- Garavan H, Pankiewicz J, Bloom A, Cho JK, Sperry L, Ross TJ, Salmeron BJ, Risinger R, Kelley D, Stein EA (2000) Cue-induced cocaine craving: neuroanatomical specificity for drug users and drug stimuli. *Am J Psychiatry* 157:1789-1798.
- Gemmell C, Anderson M, O'Mara SM (2002) Deep layer prefrontal cortex unit discharge in a cue-controlled open-field environment in the freely-moving rat. *Behav Brain Res* 133:1-10.
- 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, Vereczkey L (1974) Effects of spatial separation of the conditioned signal from the reinforcement:: a demonstration of the conditioned character of the orienting response or the orientational character of conditioning. *Behav Biol* 10:121-146.
- 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.
- 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.
- Hershberger WA (1986) An approach through the looking glass. *Anim Learn Behav* 14:443-451.
- 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.
- Holland P (1998) Amount of training affects associatively-activated event representation. *Neuropharmacology* 37:461-469.
- 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.
- Hull CL (1952) A behavior system. New Haven: Yale University Press.
- Ishikawa A, Ambroggi F, Nicola SM, Fields HL (2008) Contributions of the amygdala and medial prefrontal cortex to incentive cue responding. *Neuroscience* 155:573-584.
- Ito R, Dalley JW, Howes SR, Robbins TW, Everitt BJ (2000) Dissociation in conditioned dopamine release in the nucleus accumbens core and shell in response to cocaine cues and during cocaine-seeking behavior in rats. *J Neurosci* 20:7489-7495.
- 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.
- Kapp BS, Whalen PJ, Supple WF, Pascoe JP (1992) Amygdaloid contributions to conditioned arousal and sensory processing. In: *The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction* (Aggleton JP, ed), pp 229-254. New York: Wiley-Liss.
- Kiefer SW, Orr MR (1992) Taste avoidance, but not aversion, learning in rats lacking gustatory cortex. *Behav Neurosci* 106:140-146.
- Killcross S, Robbins TW, Everitt BJ (1997) Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala. *Nature* 388:377-380.
- Kluver H, Bucy PC (1939) Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. *Arch Neurol Psychiatry* 42:979-997.
- Kolb B (1984) Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. *Brain Res* 320:65-98.
- Konorski J (1967) Integrative activity of the brain. An interdisciplinary approach. Chicago: Univ. Chicago Press.
- 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.
- Lovibond PF (1983) Facilitation of instrumental behavior by a Pavlovian appetitive conditioned stimulus. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 9:225-247.
- 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.
- McGaugh JL, Ferry B, Vazdarjanova A, Roozendaal B (2000) Amygdala: role in modulation of memory storage. In: *The amygdala: a functional analysis*, 2 Edition (Aggleton JP, ed), pp 291-423. New York: Oxford University Press.
- 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.
- Mobini S, Body S, Ho MY, Bradshaw CM, Szabadi E, Deakin JF, Anderson IM (2002) Effects of lesions of the orbitofrontal cortex on sensitivity to delayed and probabilistic reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)* 160:290-298.
- Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY (1980) From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* 14:69-97.
- Morgan MA, Romanski LM, LeDoux JE (1993) Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett* 163:109-113.
- Moruzzi G, Magoun HW (1949) Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1:455-473.
- Mowrer OH (1947) On the dual nature of learning—a re-interpretation of "conditioning" and "problem-solving." *Harv Educ Rev* 17:102-148.
- Muramoto K, Ono T, Nishijo H, Fukuda M (1993) Rat amygdaloid neuron responses during auditory discrimination. *Neuroscience* 52:621-636.
- Nader K, LeDoux JE (1997) Is it time to invoke multiple fear learning systems in the amygdala? *Trends Cogn Sci* 1:241-244.
- Nishijo H, Uwano T, Tamura R, Ono T (1998) Gustatory and multimodal neuronal responses in the amygdala during licking and discrimination of sensory stimuli in awake rats. *J Neurophysiol* 79:21-36.
- 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.
- Parkinson JA, Dalley JW, Bamford A, Fehnert B, Robbins TW, Everitt BJ (1998) Effects of 6-OHDA lesions of the rat nucleus accumbens on appetitive Pavlovian conditioning. *J Psychopharmacol* 12(Suppl A):A8.

- Paton JJ, Belova MA, Morrison SE, Salzman CD (2006) The primate amygdala represents the positive and negative value of visual stimuli during learning. *Nature* 439:865-870.
- 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.
- Pitkanen A (2000) Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: *The amygdala: a functional analysis* (Aggleton JP, ed), pp 31-115. New York: Oxford University Press.
- Posner MI (1995) Attention in cognitive neuroscience: an overview. In: *The cognitive neurosciences* (Gazzaniga MS, ed), pp 615-624. Cambridge, MA: MIT Press.
- Powell DA, Maxwell B, Penney J (1996) Neuronal activity in the medial prefrontal cortex during Pavlovian eyeblink and nictitating membrane conditioning. *J Neurosci* 16:6296-6306.
- Robbins TW, Everitt BJ (1992) Functions of dopamine in the dorsal and ventral striatum. *Sem Neurosci* 4:119-127.
- Robledo P, Robbins TW, Everitt BJ (1996) Effects of excitotoxic lesions of the central amygdaloid nucleus on the potentiation of reward-related stimuli by intra-accumbens amphetamine. *Behav Neurosci* 110:981-990.
- Rodgers RJ, Holch P, Tallett AJ (2010) Behavioural satiety sequence (BSS): separating wheat from chaff in the behavioural pharmacology of appetite. *Pharmacol Biochem Behav* 97:3-14.
- Roesch MR, Calu DJ, Esber GR, Schoenbaum G (2010) Neural correlates of variations in event processing during learning in basolateral amygdala. *J Neurosci* 30:2464-2471.
- Rolls ET (2000) The orbitofrontal cortex and reward. *Cereb Cortex* 10:284-294.
- Rolls ET, Critchley HD, Browning AS, Hernadi I, Lenard L (1999) Responses to the sensory properties of fat of neurons in the primate orbitofrontal cortex. *J Neurosci* 19:1532-1540.
- Routtenberg A (1971) Forebrain pathways of reward in *Rattus norvegicus*. *J Comp Physiol Psychol* 75:269-276.
- Salamone JD, Cousins MS, Bucher S (1994) Anhedonia or anergia? Effects of haloperidol and nucleus accumbens dopamine depletion on instrumental response selection in a T-maze cost/benefit procedure. *Behav Brain Res* 65:221-229.
- 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.
- Sclafani A (1988) Carbohydrate appetite in rats: taste and postingestive factors. *Appetite* 11 Suppl 1:20-25.
- 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: Appletton-Century-Crofts.
- Skinner BF (1953) *Science and human behavior*. New York: Macmillan.

- Stalnaker TA, Calhoon GG, Ogawa M, Roesch MR, Schoenbaum G (2012) Reward prediction error signaling in posterior dorsomedial striatum is action specific. *J Neurosci* 32:10296-10305.
- Takahashi YK, Roesch MR, Stalnaker TA, Haney RZ, Calu DJ, Taylor AR, Burke KA, Schoenbaum G (2009) The orbitofrontal cortex and ventral tegmental area are necessary for learning from unexpected outcomes. *Neuron* 62:269-280.
- Taylor JR, Robbins TW (1984) Enhanced behavioural control by conditioned reinforcers following microinjections of d-amphetamine into the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* 84:405-412.
- Thorndike EL (1911) *Animal intelligence*. New York: Macmillan.
- Tobler PN, Fiorillo CD, Schultz W (2005) Adaptive coding of reward value by dopamine neurons. *Science* 307:1642-1645.
- 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.
- Ushiba J, Tomita Y, Masakado Y, Komune Y (2002) A cumulative sum test for a peri-stimulus time histogram using the Monte Carlo method. *J Neurosci Methods* 118:207-214.
- Valenstein ES, Cox VC, Kakolewski JW (1968) Modification of motivated behavior elicited by electrical stimulation of the hypothalamus. *Science* 159:1119-1121.
- 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.
- Woodworth RS (1918) *Dynamic psychology*. New York: Columbia University Press.
- Yamamoto T, Ueki K (2011) Brain mechanisms of flavor learning. *Front Syst Neurosci* 5:76.
- Zaborszky L, Alheid GF, Beinfeld MC, Eiden LE, Heimer L, Palkovits M (1985) Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: a morphological and radioimmunological study. *Neuroscience* 14:427-453.
- 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

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
- 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
- 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.
- 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
- Petyko Z, Lenard L, Sumegi B, Hajnal A, Csete B, Faludi B, Jando G (1997) Learning disturbances in offsprings of zidovudine (AZT) treated rats. *Neurobiology (Bp)* 5:83-85.

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.

Petyko 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:10.111/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. Lukáts, 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: Metodological 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.*

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik segítették a munkámat.

Hálásan köszönöm Prof. Dr. Lénárd László akadémikusnak a támogatását, szakmai tanácsait és a publikációk valamint a disszertáció írása során nyújtott segítségét.

Köszönöm Prof. Dr. Karádi Zoltán egyetemi tanárnak, a PTE ÁOK Élettani Intézet vezetőjének a támogatását.

Köszönöm Prof. Dr. Szabó Imrének és Máthé Kálmán mérnöknek, hogy szakértelmükkel, a szükséges rendszer tervezésével és elkészítésével lehetővé tették a sokcsatornás egysejtelvezetést és az adatok elemzését.

Köszönöm Niedeczky Csaba mérnöknek a juxtacelluláris jelöléshez szükséges előerősítő tervezését, ennek elkészítését és az elektrophysiológia alapjainak elsajátításában nyújtott segítségét.

Köszönöm Tóth Attilának és Gálosi Ritának a kísérletek során nyújtott segítségét.

Köszönöm Sulmics Borbálának a technikai segítséget, a kábelek készítésével, a mikroszkóp alatti forrasztással kapcsolatos segítségét és hogy beavatott ennek műhelytitkaiba.

Köszönöm Hegedüs Jánosné és Friedszám Jánosné asszisztenseknek a szövettani munkában nyújtott segítségét.

Köszönöm Takács Tiborné, Konyovitsné Schulteisz Anna, Kovácsné Korona Erzsébet asszisztenseknek a segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak, hogy megértéssel és türelemmel támogatták munkámat.