

Właściwe rozpoznawanie i rozróżnianie bodźca nowego od znajomego jest kluczowe dla poprawnego funkcjonowania i nawigowania w środowisku, a adekwatna ekspresja preferencji nowości może być kluczowa dla przetrwania. Wiele schorzeń neuropsychiatrycznych, takich jak zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi, schizofrenia czy depresja, objawiają się nietypową reakcją na nowe bodźce. W związku z danymi literaturowymi wskazującymi na potencjalne zaangażowanie jądra niepewnego (ang. nucleus incertus, NI), jądra międzykonarowego (ang. interpeduncular nucleus, IPN) oraz brzuszego pola nakrywki (ang. ventral tegmental area, VTA) w kontrolę preferencji nowości, celem opisanych w niniejszej rozprawie eksperymentów było zbadanie wzajemnych interakcji systemu katecholaminergicznego (w którego skład wchodzi między innymi układ dopaminergiczny, wraz z VTA), IPN oraz NI. Wiodącą hipotezą przedstawionych badań jest istnienie funkcjonalnych połączeń pomiędzy badanymi strukturami oraz ich wzajemne interakcje.

Dostępne wyniki badań naukowych wskazują na kluczową rolę zlokalizowanego w śródmózgowiu IPN w kontrolę ekspresji preferencji nowości. Ponadto, opisana została rola umiejscowionego bezpośrednio ponad IPN VTA w sygnalizacji istotności i/lub nagradzających właściwości nowego bodźca w środowisku, oraz zależność tego procesu od uwalnianej z neuronów VTA do IPN dopaminy (ang. dopamine, DA). Ponadto pokazano, że neurony dopaminowe VTA są wrażliwe na cechę prezentowanego bodźca jaką jest nowość, ale dokładny mechanizm kontroli preferencji nowości przez VTA, wraz z zaangażowanymi w tę funkcję unerwianymi przez VTA strukturami mózgu, nie został w pełni zbadany. Co ważne, stres uznawany jest za czynnik predysponujący do rozwoju wcześniej wspomnianych schorzeń neuropsychiatrycznych, charakteryzujących się zaburzeniami preferencji nowości. Dlatego też, aby zrozumieć neuronalny mechanizm wpływu stresu na preferencję nowości, podczas realizacji badań opisanych w niniejszej dysertacji, zbadano unerwienie IPN oraz VTA przez wysoce wrażliwą na stres strukturę pnia mózgu, którą jest NI. Dostępna literatura naukowa wskazuje, że ekspozycja na nowość powoduje podwyższony poziom wzbudzenia, w którego kontrolę zaangażowany jest zarówno NI, jak i system katecholaminergiczny. W celu zbadania możliwego działania katecholamin na neurony NI, przetestowano wpływ aktywacji receptora dopaminowego typu D2 na aktywność elektryczną neuronów NI.

W celu zbadania natury neurochemicznej i funkcjonalnych właściwości połączeń neuronalnych między badanymi strukturami mózgowia oraz sprawdzenia wpływu aktywacji receptorów dopaminowych D1 (D1R) i typu D2 na aktywność elektryczną neuronów IPN i NI, wykonano rejestracje elektrofizjologiczne *ex vivo* połączone z użyciem narzędzi optogenetycznych i podaniami agonistów receptorów dopaminowych (odpowiednio SKF81297 oraz quinpirole). By zweryfikować, czy pojedyncze neurony IPN integrują sygnalizację za pośrednictwem receptora D1 (potencjalnie niosącą informację o nowości) oraz receptora nikotynowego (potencjalnie sygnalizującą do IPN znajomości bodźca) wykonano rejestrację z podaniami agonistów tych receptorów (odpowiednio SKF81297 i nikotyna). Ponadto, znakowanie szlaków neuronalnych, barwienia immunohistochemiczne oraz fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* metodą RNAscope pozwoliły na opisanie anatomii badanego obwodu neuronalnego.

Wyniki eksperymentów z wstecznym znakowaniem szlaków neuronalnych wskazały, że VTA wraz z istotą czarną są głównymi źródłami dopaminy w IPN. Aktywacja D1R przez podanie selektywnego agonisty tego receptora miała przede wszystkim pobudzające działanie na aktywność neuronów IPN. W trakcie rejestracji aktywności elektrycznej neuronów IPN metodą whole-cell patch-clamp w trybie stabilizacji napięcia, w większości zbadanych neuronów IPN zaobserwowano wywołany podaniem agonisty D1R prąd dokomórkowy. U większości z przetestowanych komórek, pobudzający wpływ aktywacji receptora był obserwowalny po ponownym podaniu agonisty w warunkach izolacji farmakologicznej (po wzbogaceniu sztucznego płynu mózgowo-rdzeniowego o bloker napięciowozależnych kanałów sodowych oraz antagonistów receptorów GABA<sub>A</sub> oraz AMPA i NMDA), co pozwoliło stwierdzić, że obserwowany efekt jest postsynaptyczny. Ponadto, zewnątrzkomórkowe rejestracje aktywności neuronów IPN z użyciem macierzy wieloelektrodowych wskazały, że aktywacja D1R może również hamować aktywność neuronów IPN oraz, że w zarówno pobudzające, jak i w hamujące działanie aktywacji tego receptora mogą być zaangażowane GABAergiczne połączenia wewnątrz IPN, wewnątrz VTA oraz unerwienie z VTA do IPN.

Wewnątrzkomórkowe rejestracje aktywności elektrycznej neuronów IPN metodą whole-cell patch-clamp, połączone z optogenetyczną stymulacją włókien z NI pokazały, że zarówno uwalniające GABA, jak i kwas glutaminowy neurony NI tworzą monosynaptyczne połączenia z neuronami IPN, przy czym większość zaobserwowanych

odpowiedzi na optogenetyczną stymulację stanowiły wywołane światłem hamujące prądy postsynaptyczne (ang. light evoked inhibitory postsynaptic currents, le iPSC). Jednoczesne podania agonisty D1R i stymulacja optogenetyczna włókien z NI w trakcie rejestracji aktywności neuronów IPN pozwoliły wykazać, że aktywacja D1R w IPN negatywnie modulowała hamujące wejście z neuronów NI, prowadząc do zmniejszenia amplitudy zarejestrowanych le iPSC. Ponadto, wykazano, że pojedyncze neurony IPN integrują sygnały z NI (potencjalnie sygnalizujące sytuację stresową) z sygnalizacją za pośrednictwem D1R (potencjalnie niosącą informację o nowości). Co więcej, pokazano, że pojedyncze neurony IPN integrują również sygnalizację mediowaną przez D1R, z sygnalizacją za pośrednictwem receptora nikotynowego (potencjalnie sygnalizującą w IPN znajomości bodźca). Razem, dane te popierają hipotezę, że system katecholaminergiczny oraz unerwienie z NI wpływając na aktywność neuronów IPN tworzą razem funkcjonalny obwód neuronalny złożony z trzech badanych struktur.

Podczas rejestracji aktywności neuronów VTA połączonych z optogenetyczną stymulacją włókien z NI zaobserwowano zarówno hamujące, jak i pobudzające wywołane światłem prądy postsynaptyczne (odpowiednio le iPSC i le ePSC). Większość zarejestrowanych odpowiedzi na stymulację optogenetyczną stanowiły le iPSC, ale zarówno le iPSC, jak i le ePSC zostały zarejestrowane z prawdopodobnie dopaminowych neuronów VTA.

Eksperymenty z iniekcjami wstecznego wektora wirusowego do NI i barwieniem immunohistochemicznym przeciwko hydroksylazie tyrozynowej (markerowi neuronów katecholaminergicznych) wykazały, że głównymi źródłami katecholamin w NI są jądro Darkszewicza, jądra szwu oraz grupa neuronów dopaminergicznych A13. Aktywacja receptorów typu D2 dzięki podaniu agonisty tych receptorów (quinpirole), miała zarówno pobudzające, jak i hamujące działanie na aktywność neuronów NI, a oba efekty obserwowane były w warunkach izolacji farmakologicznej, wskazując postsynaptyczne działanie aktywacji receptora na aktywność neuronów NI. Co ciekawe, wpływ aktywacji receptorów typu D2 na aktywność elektryczną neuronów NI był zależny od typu neuronów NI; neurony typu I (charakteryzujące się obecnością prądu potasowego typu A) równie często były pobudzane, jak i hamowane podaniem agonisty receptora typu D2, podczas gdy poziom aktywności neuronów typu II (wykazujących obecność aktywowanego hiperpolaryzacją prądu wapniowego), w większości przypadków

podwyższał się po podaniu agonisty. Ponadto, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* metodą RNAscope wskazała, że 36% komórek NI wykazywała ekspresję mRNA dla receptora dopaminowego D2, włączając to zarówno komórki wykazujące ekspresję markerów GABAergicznych, jak i markerów glutaminianergicznych.

Podsumowując, dane przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej potwierdzają hipotezę o istnieniu funkcjonalnego obwodu neuronalnego złożonego z układu katecholaminergicznego (w którego skład wchodzi między innymi dopaminergiczne neurony VTA) – IPN – NI. Opisanie w literaturze naukowej funkcje poszczególnych elementów obwodu, wraz ze scharakteryzowaną w niniejszej rozprawie doktorskiej naturą połączeń, wskazują na jego możliwą rolę w kontroli preferencji nowości. Opisanie wyników eksperymentów sugerują, że wysoce wrażliwy na stres NI, za pośrednictwem GABA- i glutaminianergicznego unerwienia IPN i VTA, może być ważną składową tego obwodu, zaangażowaną w transmisję informacji związanych ze stresem do struktur kontrolujących preferencję nowości, tym samym leżąc u podstaw opisanych w literaturze zaburzeń w preferencji nowości po ekspozycji na stresory.