

## **Nederlandse Samenvatting**

### *Inleiding*

Stress-ervaringen kunnen veelvuldig en onverwachts optreden. De fysiologische reacties die bij een stress optreden zijn belangrijk voor het behoud van psychische en fysieke controle over de situatie. Zo kunnen bijvoorbeeld de bijnierschors hormonen snel alertheid opwekken of makkelijk op te nemen energie vrijmaken, wat adequate reacties ondersteunt. Op de lange duur kan stress echter, middels secundaire reacties, bepaalde lichaamsfuncties ook negatief beïnvloeden, en zo een aanhoudende belasting vormen voor het welzijn. Te denken is hier bijvoorbeeld aan traumatische ervaringen die kunnen uitmonden in een klinische depressie of in een posttraumatische stressstoornis. Om deze positieve en negatieve werkingen van stress beter te kunnen begrijpen is kennis nodig over wat er zich afspeelt op celniveau, dwz. kennis over de cellulaire en neurofysiologische mechanismen van de stress-respons.

In dit promotieonderzoek wordt met behulp van diermodellen de effecten van stress onderzocht aan de hand van individuele zenuwcellen (neuronen) in het gebied van de zgn. hippocampus, een hersenstructuur die van groot belang is voor de omgang met stress. De hippocampus bezit twee belangrijke eigenschappen. In de eerste plaats is de hippocampus nauw betrokken bij verschillende typen van leerprocessen en de tijdelijke opslag van informatie. De hippocampus neuronen coderen alle soorten van tijd- en plaats-verbonden gebeurtenissen, inclusief gedrag, herkenning en taal. De neuronen die in een netwerk verbonden zijn vormen zo een soort representatie van de gebeurtenis. Een tweede functie van de hippocampus is de terugkoppeling van de hypothalamus-hypofyse-bijnier as (HPA-as). De HPA-as wordt direct geactiveerd bij een bedreigende situatie en reguleert het vrijkomen van de bijnierschors hormonen, waaronder de zgn. corticosteroiden. De interactie tussen de corticosteroidhormonen en de hippocampusstructuur is essentieel voor terugkoppeling van de HPA-as.

### *Het CA3 gebied*

Het bouwplan van een neuron bepaalt grotendeels de eigenschappen van de cel en zijn werking. Vanuit het cellichaam (soma) worden signalen naar andere zenuwcellen overgedragen via het axon en het daaropvolgend netwerk van uitlopers (collateralen). Via een ander type van uitlopers, genaamd dendrieten, nemen de neuronen impulsen van andere cellen op. De dendrieten maken een belangrijk deel uit van het neuron omdat ze 90% van het signaalopnemend oppervlak beslaan en als aanknopingspunt dienen voor de ongeveer 15.000 verschillende verbindingen (synapsen) die een enkel hippocampus neuron bezit. Het is bekend dat synapsen kunnen veranderen in hun transmissiesterkte (de output) als functie van de inkomende activiteit (de input), een proces dat vermoedelijk ten grondslag ligt aan de opslag van informatie in de hersenen (zie Hebb, 1949). Dit betekent dus dat de structuur, omvang en rangschikking van de dendrieten dus zowel de verbindingen tussen neuronnen bepalen alsook hoe informatie opslag wordt gestructureerd.

Een speciaal subgebied van de hippocampus is genaamd CA3. De neuronnen die hier zijn gelegen bezitten gespecialiseerde collateralen die een interne feed-back loop vormen. Hierdoor kan het CA3 gebied informatie opslaan over gebeurtenissen die zich slechts één keer voordoen. Deze eigenschap wordt ook wel 'snapshot' geheugen genoemd. Dit snapshot geheugen speelt waarschijnlijk een belangrijke rol in

bedreigende, stressvolle situaties en kan verder nog betrokken zijn bij de samenstelling van associaties tussen de verschillende elementen van een herinnering.

### *Probleemstelling*

Het centrale uitgangspunt van dit proefschrift is dat bij aanhoudende stress in dieren de CA3 neuronen veranderen in hun structuur: na stress worden hun dendrieten korter. Alhoewel deze (morfologische) bevindingen belangrijk lijken, is het echter nog niet bekend wat de functionele consequenties hiervan zijn en is het dus ook niet duidelijk hoe we de invloed van stress op de CA3 neuronen moeten interpreteren.

In de literatuur worden telkens twee hypothesen ingezet. De eerste veronderstelt dat CA3-dendrieten worden ‘aangetast’ door de verhoogde concentraties van glutamaat (de meest voorkomende exciterende neurotransmitter). Een tweede hypothese stelt dat chronische stress de CA3-dendrieten verzwakt vanwege de verhoogde afgifte van het corticosteron hormoon, en kettingreacties die daarop volgen. Beide hypothesen veronderstellen dus dat de verkorting van dendrieten een negatieve invloed uitoefent, en een fundamentele eerste stap is van celaantasting naar permanente schade. Nu blijft het echter de vraag wat er zich precies afspeelt op het niveau van de CA3-cel en of dit wel als beschadiging geïnterpreteerd moet worden. Dit is grotendeels onbekend. Om meer inzicht te verkrijgen in de werking van de de structurele veranderingen en de neurobiologische processen die hieraan ten grondslag liggen werden in deze dissertatie verschillende eigenschappen onderzocht door middel van directe metingen aan CA3-cellen, met b.v. electrofysiologische en morfologische technieken.

### *De resultaten*

Met behulp van de zgn. patch-clamp techniek zijn er metingen verricht aan individuele neuronen in hersenplakjes van de hippocampus. Allereerst (**Hoofdstuk 1**) werd gevonden dat wanneer corticosteron direct wordt toegediend de  $Ca^{2+}$  stromen groter worden en onder andere de amplitude van de ‘after hyperpolarization’ (AHP) en de actiepotentialen vergrootte. Ook als corticosteron endogeen verhoogd was (vlak na het begin van de dag) waren de  $Ca^{2+}$  stromen groter.

Een diermodel dat veelvuldig gebruikt wordt voor het bestuderen voor de effecten van chronische stress is het psychosociale stress model in de tree shrew (een klein zoogdier). In dit model wordt het bijnierschorshormoon cortisol langdurig verhoogd wanneer de dieren dagelijks voor vier weken worden blootgesteld aan psychosociale stress. We onderzochten na zo'n lange periode van stress de eigenschappen van CA3 pyramide neuronen (**Hoofdstuk 2**). In tegenstelling tot onze verwachtingen bleek het dat de kinetische eigenschappen van de AHP niet veranderden en ook de actiepotentialen en vuurpatroon van deze cellen waren hetzelfde gebleven. Wel bleek de intrinsieke prikkelbaarheid (excitatie) van de CA3-cel te zijn verlaagd. Deze bevindingen komen in grote lijnen overeen met de resultaten van een studie bij ratten, waar fysiologische effecten van de excitatie van CA3 cellen uitbleven, zelfs na langdurige verhoging van corticosteron.

In **Hoofdstuk 2** van dit proefschrift pasten we een nauwkeuriger methode toe om de dendrieten van de CA3 cellen te visualiseren. We vonden dat na stress de architectuur van de dendrieten minder lange vertakkingen vertoonde binnen het zgn. stratum radiatum, een gebied waar zich voornamelijk de synapsen bevinden die verbindingen

maken met andere CA3 cellen. Echter, in het gebied van de lacunosum-moleculaire, wat nog verder van de soma afgelegen is, was het aantal dendrieten onveranderd (**Hoofdstuk 2 en 3**). Het feit dat dunne uitlopers van de dendrieten in sommige gebieden behouden blijven duidt erop dat de verkorting ervan eerder een selectief geregeld proces is, en dat sommige delen van dendrietstructuur gevoeliger zijn voor stress.

Vervolgens bepaalden we welke eigenschappen beïnvloed worden door de veranderde geometrie van de dendrieten. Het verkleinde oppervlak vergrootte de excitatie van de cel (**Hoofdstuk 3**) en ook bleek het dat bij meer eenvoudige dendritische structuren de postsynaptische glutamaat respons vanaf de input zone sneller het cellichaam (soma) bereikt. Dit komt waarschijnlijk doordat de voorwaartse verspreiding van het voltage een kortere weg aflegt, en dat de ingangsweerstand van de cel verhoogd is. Inderdaad bleken de exciterende postsynaptische potentialen (EPSPs) na herhaaldelijke stress ook groter te zijn, alsook de stroom door het *N*-methyl-D-aspartaat (NMDA) ion kanaal, gelegen binnen de synaps (**Hoofdstuk 5**). Met andere woorden, de verkorting van dendritische uitlopers, vergroot de excitatie op basisfrequentie maar blokkeert de activiteitsafhankelijke lange-termijn potentiatie van exciterende synapsen. Vanuit een concept dat stress opvat als factor die beschadiging induceert, zou verondersteld kunnen worden dat zulke veranderingen een mogelijk risico leveren voor hyperactivatie (bijvoorbeeld epileptische excitatie).

In **Hoofdstuk 5** ondezochten we echter dieren die tijdens stress langdurig met het tianeptine behandeld werden. Dit antidepressivum werkt protectief en blokkeert de structurele veranderingen. Het bleek dat de responsen van glutamaat receptoren ook groter werden in dieren die deze behandeling kregen. Het kan daarom verworpen worden dat grotere glutamaat stromen CA3-cellen per definitie ‘beschadigen’. We postuleren daarom dat de CA3-cellen na chronische stress morfo-electrisch compacter worden voor het geleiden van synaptische input. Dat maakt een efficiëntere signaalverwerking mogelijk, en kan bijvoorbeeld bij rustfrequentie de fysiologische terugkoppeling van de HPA-as versterken.

Om te toetsen in hoeverre herhaling van stress een noodzakelijke voorwaarde is om de dendritische structuur te veranderen, lieten we in **Hoofdstuk 3 en 4** ratten twee keer een sociaal verlies ondergaan, en ondezochten we pas drie weken later de CA3 neuronen. Ter vergelijking bekeken we ook dieren die elf keer een sociaal verlies ondergingen gedurende een vergelijkbare periode van drie weken. Het bleek, opmerkelijk, dat de modificaties van dendrieten zich ook voordoen drie weken na een zeer korte stress ervaring. Deze reorganisatie behelsde zowel een selectieve eliminatie alsook groei van nieuwe vertakkingen, met een behoud van het totale oppervlakte van de cel.

### *Conclusies*

Een paar belangrijke conclusies kunnen worden getrokken uit het werk van dit proefschrift. Ten eerste, aanhoudende ervaringen met stress beïnvloedt een selectief gedeelte van de dendritische structuur van de CA3 pyramide neuronen. Namelijk, dat gebied waar de nabij gelegen CA3 cellen naar toe projecteren. Het verkleinde dendritische oppervlak, vergroot de excitatie en versnelt de propagatie van synaptische signalen. Deze morfologie-afhankelijkheid van synaptische stromen sluit aan bij de

visie dat dendrietten ook een actieve rol spelen bij signaalverwerking en zo het gedrag en de elektrische responsen van een neuron medebepalen. We konden geen bewijs vinden dat de cel ‘beschadigd’ zou zijn in zijn functionele aspecten.

Verdere experimenten in dit proefschrift leverde een onverwacht feit op. Alhoewel na stress verbindingen geëlimineerd worden, schijnt de periode na stress ook een grotere speelruimte te bieden voor het aanbrengen van nieuwe verbindingen. Zo bleek dat weken na een korte stress ervaring beide processen zich voordeden binnen de architectuur van individuele cellen. Verkorting van dendrietten vindt dus niet per definitie plaats onder aanhoudende belasting maar kan zich ook met de tijd ontwikkelen wat erop duidt dat de *tijdsperiode na stress* ook een essentiële rol speelt in de structurele veranderingen van het CA3-netwerk.

De resultaten in dit proefschrift bieden ruimte voor nieuwe inzichten in de stress-geïnduceerde structurele veranderingen. Namelijk, chronische stress heeft eerder een remmende invloed op adaptieve processen van CA3 cellen in plaats van dat herhaaldelijke stress-ervaringen de dendrietten afbreken. Deze visie komt ook goed overeen met het feit dat chronische stress hoge metabole kosten met zich meebrengt en de eiwit productie in CA3 cellen remt (zie Vollmann-honsdorf, 2001). Kennelijk induceert een korte stress ervaring al een langdurig proces dat verschillende fasen doorloopt van genexpressie, eiwit productie en een langzame turnover van synaptische verbindingen om uiteindelijk gehele dendriettenstructuren te reorganiseren. Het benodigde tijdsverloop hiervan zou kunnen samenhangen met één van de belangrijke functies van het CA3-netwerk, namelijk het oproepen van informatie vanuit bijv. de neocortex, om deze vervolgens te combineren met nieuwe herinneringspatronen. Zulke processen zijn van belang om ervaringen om te zetten in vaste herinneringen. De gegevens zouden erop kunnen duiden dat het juist de verschillende fasen in geheugen processen zijn die plasticiteit induceren van de dendritische architectuur van CA3 neuronen.

