

Poszttraumás stressz szindróma kialakulásának háttérében álló glutamáterg folyamatok tanulmányozása állatmodellben

Doktori értekezés

Balázsfői Diána Gabriella

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Haller József, DSc., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Dobolyi Árpád, DSc., tudományos tanácsadó
Dr. Altbácker Vilmos DSc., egyetemi docens.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Rihmer Zoltán, DSc., MD.,
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tímár Júlia, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Gacsályi István, Ph.D., kutató

Budapest
2017

Tartalomjegyzék

| | | |
|------|---|----|
| I. | Rövidítések jegyzéke | 5 |
| II. | Irodalmi áttekintés | 8 |
| 1. | Bevezetés | 8 |
| 2. | A stressz folyamata és a poszttraumás stressz szindróma (PTSD) kialakulása | 10 |
| 3. | A PTSD előfordulása régen és ma..... | 13 |
| 4. | A PTSD fogalma, diagnosztikai kritériumai a DSM V.-ben..... | 14 |
| 4.1. | A PTSD állatmodellje, a félelmi kondicionálás | 16 |
| 4.2. | A PTSD kialakulását befolyásoló tényezők | 20 |
| 4.3. | A PTSD kezelése..... | 21 |
| 5. | A PTSD kialakulásának háttere | 23 |
| 5.1. | Agyterületek és kapcsolataik..... | 23 |
| 5.2. | Neurotranszmitterek és hormonok..... | 26 |
| 6. | Glutamát rendszer jellemzői és szerepe a félelmi memória kialakulásában | 27 |
| 6.1. | HHM tengely jellemzése és kapcsolata a glutamát rendszerrel | 30 |
| 6.2. | Glutamát transzporterek..... | 33 |
| 7. | VGluT3 KO egerek, mint modell állatok | 35 |
| 7.1. | A raphe magok és a szerotonin | 36 |
| III. | Célkitűzések..... | 40 |
| IV. | Módszerek | 42 |
| 1. | Állatok | 42 |
| 2. | Magatartás tesztek..... | 42 |
| 2.1. | Félelmi memória és tanulás vizsgálata félelmi kondicionálás során (<i>conditioned fear test, CFT</i>) | 43 |
| 2.2. | Fiatal egerek vizsgálata | 45 |
| 2.3. | Felnőtt egerek vizsgálata..... | 46 |
| 3. | Immunhisztokémiai vizsgálatok | 49 |
| 4. | Génexpresszió vizsgálata (rtPCR) | 50 |
| 5. | Hormonkoncentrációk mérése vérmintákból | 52 |
| 6. | Farmakológiai kezelés | 52 |
| 7. | Optogenetikai vizsgálat | 53 |
| 7.1. | Vírus injektálása | 53 |
| 7.2. | Optikai szál beültetése | 53 |

| | |
|--|-----|
| 7.3.Lézeres stimuláció vagy gátlás alkalmazásának módja | 54 |
| 7.4.Anatómiai analízis | 56 |
| 8. Adatok statisztikai elemzése | 58 |
| 9. Kísérleti elrendezés | 59 |
| 9.1.A félelmi kondicionálás rövid és hosszútávú hatásainak vizsgálata és a glutamát szerepének vizsgálata patkányokon..... | 59 |
| 9.2.A VGlut3 hiányos egerek | 59 |
| 9.3.MR régió vizsgálata optogenetikával | 60 |
| V. Eredmények | 62 |
| 1. Félelmi kondicionálás rövid és hosszabb távú hatásai patkányokban | 62 |
| 1.1.Magatartásbeli változások | 62 |
| 1.2.Hormonális változások | 63 |
| 1.3. c-Fos aktiváció vizsgálata | 65 |
| 1.4.CP-AMPA receptor szerepének vizsgálata | 66 |
| 1.5.CP-AMPA receptort célzó farmakológiai kezelés hatása | 69 |
| 2. VGlut3 hiány hatásainak vizsgálata KO egerekben..... | 70 |
| 2.1.VGlut3 KO egerek általános jellemzői | 70 |
| 2.2.VGlut3 hiány hatása fiatal állatokban..... | 71 |
| 2.3.Félelmi kondicionálás felnőtt egereken | 73 |
| 2.4.Félelmi kondicionálás VGlut3 egereken | 76 |
| 3. Mediális raphe régió vizsgálata..... | 83 |
| 3.1.MR régió optogenetikai modulációjának magatartásbeli hatásai | 83 |
| VI. Megbeszélés..... | 95 |
| 1. A PTSD modell | 95 |
| 2. Magatartási tünetek..... | 95 |
| 3. Stresszhormonok..... | 96 |
| 4. Agyi aktivitás mérése | 96 |
| 5. CP-AMPA receptor szerepének vizsgálata | 98 |
| 6. VGlut3 hiány hatásainak vizsgálata | 101 |
| 6.1.Általános jellemzés..... | 101 |
| 6.2.Félelmi kondicionálás..... | 101 |
| 6.3.Korai posztnatális kor | 103 |
| 6.4.HHM tengely felnőtt állatokban..... | 104 |

| | |
|---|-----|
| 7. A mediális raphe régió optogenetikai manipulálása..... | 106 |
| VII. Következtetések..... | 109 |
| VIII. Összefoglalás..... | 111 |
| IX. Summary..... | 112 |
| X. Irodalomjegyzék..... | 113 |
| XI. Saját publikációk jegyzéke..... | 142 |
| XII. Köszönetnyilvánítás..... | 144 |

I. Rövidítések jegyzéke

| | |
|---------------|--|
| (vm)PFC | (ventromediális) prefrontális kéreg |
| 5-HTTLPR/SERT | szerootonin transzporter |
| AAV | adenoasszociált vírus |
| ACTH | adrenokortikotróp hormon |
| AMPA | α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionát |
| ASD | akut stressz szindróma |
| AVP | arginin vazopresszin |
| BLA | basolaterális amigdala |
| BNST | bed nucleus of stria terminalis |
| CeA | centrális amigdala |
| Cg1 | cinguláris kéreg |
| ChR2 | channelrhodopsin |
| CP-AMPA | kalcium-permeábilis/áteresztő AMPA receptor |
| CRH | kortikotróp-elválasztást serkentő hormon |
| CRHR1 | kortikotróp-elválasztást serkentő hormon receptora |
| dACC | dorzális anterior cinguláris kéreg |
| dl-PAG | dorzolaterális PAG |
| dm-PAG | dorzomediális PAG |
| DR | dorzális raphe |

| | |
|--------------|---|
| DSM III/IV/V | Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (kiadás száma) |
| EPM | megemelt keresztpalló teszt (<i>elevated plus maze</i>) |
| GABA | gamma-amino-vajsav |
| GluA1-4 | glutamát receptor alegységei |
| GR | glükokortikoid receptor |
| HHM-tengely | hipotalamo-hipofízis-mellékvese tengely |
| i.p. | intraperitoneális |
| IL | infralimbikus kortex |
| KO | génkiütött (<i>knockout</i>) |
| LA | laterális amigdala |
| l-PAG | laterális PAG |
| LPS | lipopoliszacharid |
| MeA | mediális amigdala |
| MR | mediális raphe |
| NMDA | N-metil-D-aszpartát |
| OF | nyílt tér teszt (<i>open field</i>) |
| PAG | periakveduktális szürkeállomány |
| PEPA | 4-(2-fenilszulfonilamino)etil-2,6-difluoro-fenoxi-acetamid |
| POMC | pro-opiomelanokortin |
| PrL | prelimbikus kéreg |
| PTSD | poszttraumás stressz szindróma (<i>posttraumatic stress disorder</i>) |

| | |
|----------|---|
| PVN | paraventriculáris mag |
| SSRI | szelektív szerotonin visszavétel gátlók |
| USV | ultrahangos vokalizáció |
| V1b | vazopresszin receptor |
| VGluT1-3 | vezikuláris glutamát transzporterek |
| vl-PAG | ventrolaterális PAG |
| VMAT1,2 | vezikuláris monoamin transzporter |
| WT | vad típus (<i>wild type</i>) |

II. Irodalmi áttekintés

1. Bevezetés

Erőteljes stressz vagy valamilyen traumatikus esemény következtében, ha az egyén nem képes valamilyen megküzdési stratégiát használva felépülni a traumából, pszichiátriai zavar fejlődik ki. Ha a traumatikus eseményt követően - akár több héttel vagy hónappal – az egyén újra és újra átéli a történeteket annak ellenére, hogy már nem fenyegeti semmilyen veszély, poszttraumás stressz szindróma (PTSD) kialakulásáról beszélhetünk. Általában hirtelen, egy kulcsinger hatására jelentkeznek a mindent elsöprő, heves tünetek. A traumatikus esemény során érzett félelem újbóli felbukkanása és generalizálódása következtében - egy idő után nem tudnak különbséget tenni a biztonságos és veszélyes helyek /helyzetek között - a félelmet idéző helyek, események kerülése kerül előtérbe. Sokszor társul PTSD-hez valamilyen más pszichiátriai betegség (szorongás, depresszió) vagy függőség is. Mindezek az életvitelt negatívan befolyásolják, a beteg bezárkózik, elvonul a külvilágtól, súlyos esetben öngyilkosságot is elkövethet.

A traumatikus esemény csak az arra fogékony egyéneknél vezet PTSD kialakulásához. A fogékonyságot egyéni tényezők - genetika és korábbi életesemények által meghatározott idegi-neuroendokrinológiai háttér - alakítják ki. A betegség háttere nem teljesen feltárt, valószínű, hogy a félelem szabályozásában részt vevő folyamatok szenvednek zavart. Mivel úgy tűnik a félelmi tanulás során hasonló agyi hálózatok aktiválódnak, a kondicionált félelem állatmodellje jó preklinikai vizsgálómódszernek tűnik a PTSD kialakulásának hátterében álló folyamatok, patofiziológiai változások modellezésére (VanElzakker és mtsai 2014).

A humán betegség tüneteinek vizsgálatára az állatokban magatartás tesztek szolgálnak. A külsőleg is megfigyelhető és leírható magatartást viselkedésnek nevezzük. A tesztek során az állatok magatartásának belső mozgatórugóit nem tudjuk meghatározni, így csak a magatartás külső aspektusát, a viselkedést tanulmányozva vonhatunk le következtetéseket. A következőkben ezért a magatartás és viselkedés szavakat az állatok esetében szinonimaként használom (Tringer 2010).

Az állatmodelleknek különböző kritériumoknak kell megfelelniük, melyek a következők: (1) a modell képes-e előidézni a betegségre jellemző tüneteket („face

validity”) és (2) arra nézve specifikus-e („construct validity”), illetve talán a legfontosabb, hogy (3) modellünk képes-e előrejelezni egy kezelés vagy gyógyszer hatásosságát emberben is („prediktív validitás”) (BelzungLemoine 2011, SiegmundWotjak 2006).

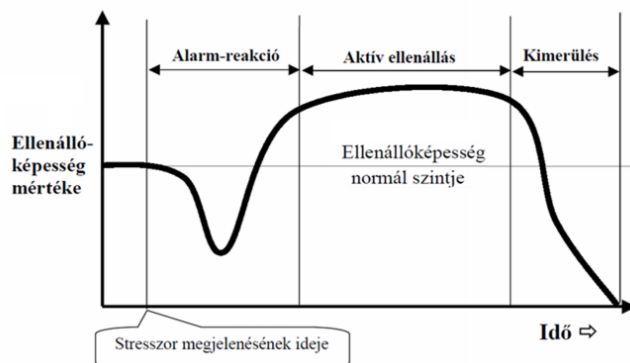
Többféle állatmodell is létezik, mellyel a humán PTSD során lejátszódó folyamatokhoz hasonló tüneteket idézhetünk elő. Mindegyik alapja a klasszikus félelmi kondicionálás, mely során egy alapvetően nem félelmetes helyet vagy helyzetet egy félelmet keltő stimulussal kapcsoljuk össze. Lehet ez egy fizikai stresszor - (pl. elektromos lábsokk), pszichoszociális stresszor (pl. fiataalkori anyai szeparáció), pszichogén stresszor (pl. predátor stressz), illetve mindezek kombinálhatóak különböző genetikai háttérű állattörzsek vizsgálatával (BorghansHomberg 2015, Goswami és mtsai 2013, Whitaker és mtsai 2014).

Vizsgálatunk során az elektromos lábsokk indukálta félelmi kondicionálást használtuk a PTSD tüneteinek kiváltásához, hiszen így már egyszeri alkalom biológiai és magatartásbeli változásokat idézett elő, és mindezek a változások hosszabb távon is fennmaradtak (YehudaAntelman 1993). Mivel a betegség kezelése nem megoldott, sok a terápia rezisztens egyén, újabb hatásmechanizmusú gyógyszercélpontok azonosítása létfontosságú. A PTSD-ben szenvedő betegeket főleg szorongásoldókkal, antidepresszánsokkal kezelik, melyek leginkább a PTSD-hez társuló másodlagos pszichiátriai zavarok tüneteire hatnak. PhD munkám során a glutamát rendszer PTSD-ben játszott szerepét vizsgáltam egy speciális glutamát receptor, illetve specifikus elhelyezkedéssel bíró glutamát transzporter segítségével állatmodellen.

2. A stressz folyamata és a poszttraumás stressz szindróma (PTSD) kialakulása

A stressz fogalmát Selye János 1930-as években fogalmazta meg (Selye 1952, Selye 1985, Selye 1998), mely szerint „stressz a szervezet nem specifikus válasza bármilyen igénybevételre”, Day tovább finomítva megalkotta a ma legszélesebb körben elfogadott definícióját: „a szervezet komplex válasza minden, a szervezet homeosztatisz mechanizmusait ténylegesen vagy potenciálisan fenyegető kihívásra” (Day 2005). Az imént említett kihívásokat, melyek kibillentik a szervezetet a

homeosztatisz egyensúlyából, stresszoroknak nevezzük, melyek lehetnek fizikai vagy pszichés természetűek. Selye azon folyamatok összességét, amivel a szervezet a stresszorokra reagál generalizált adaptációs szindrómának (GAS) nevezte, melynek három szakaszát különítette el: alarm reakciót,



1. ábra: Selye-féle általános adaptációs szindróma három fázisa.

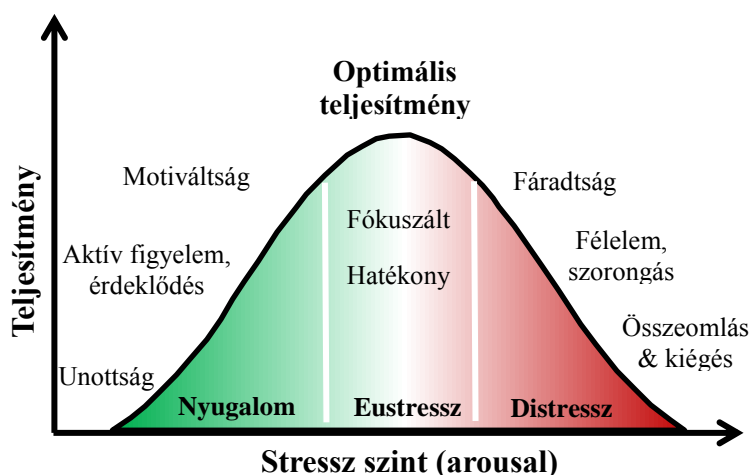
forrás: http://www.jgypk.hu/mentorhalo/tananyag/Ertelmileg_akadalyozottak_kortana/4_fejezet_tanuls_megismers.html

aktív ellenállást és a kimerülés fázisát (1. ábra). A stresszor megjelenése alarm reakciót indukál, mely fokozott éberségi szintet eredményez, többek között a szimpatikus idegrendszer aktiválásával, és ez lehetővé teszi az aktuális helyzettel való megbirkózást. Az akut stresszre adott viselkedésbeli vészreakciót a Cannon által megfigyelt támadó vagy elkerülő magatartás jellemzi („fight or flight”, „küzdj vagy fuss”) (Cannon 1929, Cannon 1932). A GAS második szakasza az aktív ellenállás, mely során a szervezet normál ellenálló képességét felhasználva igyekszik megküzdeni a problémával. Pszichés stressz esetén ezeket a különböző megküzdési stratégiákat „coping”-nak nevezzük. A GAS harmadik, kimerülési fázisa, pedig az élőlény tartalékainak felélésével, végül pusztulásával jár.

Az ember élete során többször is találkozik a stressz valamilyen formájával, amelyek minőségileg, mennyiségileg és intenzitásukban is különböznek. Probléma akkor alakul ki, ha az ember nem képes megfelelően kezelni ezeket a kihívásokat, nem

képes megküzdeni az adott stresszhelyzettel. Ez fiziológiai és/vagy pszichés változásokat indukál, melyek idővel patológiássá válhatnak, betegségekké fejlődhetnek. Azonban a stressz nem csak káros, negatív hatású lehet (distressz), hanem pozitív is, amennyiben fokozza a koncentrációt, motiválja az embert és hatékonyabb munkavégzésre ösztönzi. Az utóbbi, pozitív stresszt eustressznek nevezzük. A kétféle stressz egymáshoz való viszonyát a Yerkes–Dodson-féle görbe írja le (2. ábra). Az, hogy éppen a görbe melyik része jellemez minket az egyéni stressz toleranciánk és a körülmények kölcsönhatása befolyásolja.

A stresszorokat időbeliségük alapján két nagy csoportra oszthatjuk, melyek akut, illetve krónikus stresszt váltanak ki



2. ábra: Yerkes-Dodson-féle görbe. Eustressz a görbe közepén a teljesítőképességünk maximumánál helyezkedik el. Bal oldalán a nyugodtság, mely szakaszban nem fókuszálunk eléggé, jobb oldalán pedig a distressz van, ahol már a teljesítményünk ismét lecsökken.
forrás:http://media.advisorone.com/advisorone/article/2012/08/16/1A_0912_Herbers_Chart.png

(Schneiderman és mtsai 2005, Tsigos C 2016). Akut stressz aránylag rövid ideig tart, mely során az energiaraktárak mobilizálódnak, a szorongás csökken, az agresszió fokozódik, a memória javul, valójában ez tekinthető a GAD első szakaszának. Ha a stresszor hosszabb ideig jelen van, akkor krónikus stresszről beszélhetünk. Ha a szervezet homeosztázisának helyreállítására irányuló akut kísérletek nem sikerültek, a cél az energiaraktárak megőrzése lesz, mely során a szorongás fokozódik, az agresszió csökken és tanulási zavarok léphetnek fel, illetve mindezek következményeként olyan pszichiátriai betegségek alakulhatnak ki, mint például a patológiás szorongás vagy depresszió.

Akutan jelentkező stresszorok egy specifikus, nagyon erős, „kezelhetetlen” fajtája traumatikus stresszt idézhet elő, amely már egyszeri jelentkezésével is végletes, végleges és tartós érzelmi és magatartásbeli változásokat okoz. Akut stressz során a félelelmről, mint normál adaptív mechanizmusról beszélhetünk, amely közvetlen

veszélyforrás hatására megjelenő azonnali élettani és magatartásbeli válaszokat idéz elő. A viselkedésbeli változásokat, mint már korábban említettem a menekülés vagy támadás reakciója jellemzi, azonban extrém helyzetben, például traumatikus stressz esetén ledermedés („freezing”), paralízis is megfigyelhető. Ez alapvetően normál adaptív mechanizmus, egyfajta „halottnak tettetés” révén elkerült küzdelem. Napjainkban ezért akut stresszválaszként a „küzdj vagy fuss” reakción kívül más komplexebb válaszokat is definiálnak, mint például az imént említett „freeze” (demedés), „fright” (félelem/megijedés), és „faint” (gyengeség) (Bracha 2004). Ha azonban ez a dermedés később valós veszély nélkül is megjelenik, mint traumatikus stresszorok után szokásos, akkor már patológiás jelenségről beszélhetünk.

Ha az (akut) stressz reakció hosszabb ideig tart, mint normál esetben várnánk, akkor akut stressz szindrómáról (ASD) beszélhetünk, mely minimum 3 napig, maximum 1 hónapig tart és általában az eseményt követően azonnal jelentkezik, de legalább 4 héten belül (American Psychiatric Association 2013). Legtöbb esetben különösebb kezelést sem igényel, a beteg magától felépül. Abban az esetben, ha a gyógyulás mégsem következik be és a tünetek továbbra is fennállnak, igen gyakran poszttraumás stressz szindróma (PTSD) alakul ki. A PTSD traumatikus esemény vagy események után fellépő védekező tünetegyüttes, amely (sokszor elveszettnek hitt) emlékek újbóli felidézésén, átélésén alapul, és a félelemi válaszra hasonlító tüneteket idéz elő. A betegek felénél, akiknél PTSD-t diagnosztizáltak, korábban ASD is megfigyelhető volt (American Psychiatric Association 2013).

Igaz a PTSD kialakulásához sokszor egyetlen igen erős traumatikus esemény is elegendő, például harctéri robbanás, vagy szexuális erőszak, azonban sokszor a traumát előidéző stresszorok hosszabb ideig is jelen vannak, például katonáknál a harctéri szolgálat alatt, így a stressz krónikussá válhat. A hosszan fennálló traumatikus események sorozata más, PTSD-hez társult pszichiátriai zavar –szorongás, depresszió- kialakulását is okozhatja.

3. A PTSD előfordulása régen és ma

Már időszámításunk előtt, az 1300-as évekből is vannak írásos utalások arra, hogy PTSD-szerű tünetektől szenvedtek a háborúban részt vett katonák. Ókori asszír írásokban említik, hogy a katonákat olyan szellemek gyötörték, akikkel a csatákban néztek farkasszemet. PTSD-re utaló első írásos emlékek Hérodotosztól származnak. Többek közt egy a marathoni csatában részt vett katonáról ír, aki megvakult annak ellenére, hogy semmilyen sérülést nem szenvedett a harcokban. Illetve azt is leírta, hogy a thermopülai csatára készülve Leonidasz spártai király elbocsátotta azokat a katonákat, akiket a korábbi harcok pszichológiai értelemben nagyon megviseltek. Az 1727-es gibraltári spanyol ostromnál a várvédők öngyilkosok lettek vagy megsebesítették magukat, és még a legegyszerűbb parancsokat sem voltak képesek végrehajtani, látszólag minden ok nélkül (Kucmin és mtsai 2016, mult-kor.hu 2015).

Bár az első említések főként háborúban részt vett emberekről szóltak, nem csak katonáknál fordulhat elő ez a pszichiátriai zavar. Samule Pepys királyi haditengerészeti főtitkár naplójából megtudhatjuk, hogy az 1666-os londoni tűz után a túlélők PTSD-szerű tüneteket mutattak, illetve a 19. század közepe felé több írás is született vasúti baleset túlélőiről, akik hasonló tünetektől szenvedtek.

A betegség mai fogalma az első világháború után kezdett körvonalazódni, mikor többek közt tüzéségi sokknak („shell shock”, harci fáradtság szindrómának, harci neurózisnak) hívták, és a vietnámi háború után került orvosi értelemben is a középpontba (Andreasen 2004, Kucmin és mtsai 2016).

Egyszóval úgy tűnik a PTSD már nagyon régóta jelen van az emberek életében, mondhatni egy idős a hadviseléssel. Bár már az 1952-es *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM) kézikönyvének első kiadásában súlyos stressz reakcióként definiálták, mai formájában csak az 1980-as DSM III.-ban szerepel diagnózisként, ahol már PTSD-nek nevezik (Andreasen 2010, Sareen 2014).

A PTSD élettartam prevalenciája nagyban eltér a különböző országok, térségek között. Az Egyesült Államokban és Kanadában 6-9 % között van (Kessler és mtsai 1995), míg Európában ennél alacsonyabb valószínűséggel alakul ki (Darves-Bornoz és mtsai 2008). A 20 hónapos prevalencia felnőtt amerikaiak körében 3,5%, míg Európában, Ázsiában és Afrika nagy részén 0,5-1% között mozog (American

Psychiatric Association 2013). Ezek az arányok nagyban különböznek egy országon belül is, attól függően, hogy az ember milyen társadalmi, kulturális csoportba tartozik, illetve milyen típusú munkát végez. A betegség nagyobb arányban fordul elő veteránoknál, rendőröknél, tűzoltóknál, és az egészségügyben dolgozóknál. Ezenkívül nők között is magasabb az arány, illetve hosszabb ideig szenvednek a betegség tüneteitől, mint a férfiak (American Psychiatric Association 2013).

A PTSD-vel diagnosztizált emberek 80-90%-ánál fordul elő más társult mentális zavar is (szorongás, major depresszió, szerhasználati, kisebb arányban neurokognitív zavarok) (Davidson és mtsai 1991). PTSD és szerhasználat együttes előfordulása gyakoribb férfiaknál, mint nőknél, és nagyfokú kockázat az öngyilkosság is. Újabb kutatások kimutatták, hogy az enyhe traumatikus agyi sérülés is nagy kockázati tényező PTSD esetén (komorbiditása 48%) (American Psychiatric Association 2013).

A magas komorbiditás jelenléte elengedhetlenné teszi más pszichiátriai zavarok, például a szorongás és/vagy depresszió tüneteinek vizsgálatát, ezáltal még összetettebbé téve a megfelelő kezelés kiválasztását, mind gyógyszeres mind pszichoterápiás szempontból.

4. A PTSD fogalma, diagnosztikai kritériumai a DSM V.-ben

A PTSD-t a 2013-ban megjelent DSM V.-ben már egy új kategóriaként megjelenő trauma és stresszel összefüggő betegségek csoportjába sorolták át a szorongásos zavarok közül. Szükség volt erre a változtatásra hiszen, az egyik legfőbb kritériuma a betegségnek, hogy jellemzően valamilyen traumatikus esemény vagy stresszhelyzet előzi meg a tünetek jelentkezését, szemben a szorongásos zavarokkal, melyeknél sok esetben nem találunk ehhez hasonló konkrét eseményt. A PTSD-re a félelem érzése - egy közvetlen vélt vagy valós fenyegetéstől - jellemző, mely azonnali élettani és magatartásbeli változásokat indukál. Ezzel ellentétben a szorongásra egy esetleges, jövőbeli veszélytől való félelem, óvatosság, sokszor elkerülő magatartás jellemző. Mindezek ellenére a PTSD jellemzőit tekintve szoros kapcsolatban áll a szorongásos, obszesszív-kompulzív és disszociatív zavarokkal, de legjellemzőbb tüneteinek - az anhedónia, diszfória, externalizálódó harag, agresszió és disszociatív

állapot - sokszor együttes jelenléte el is különíti ezektől. Trauma és stresszel összefüggő zavarok kategóriájába tartozik a PTSD-n kívül a reaktív kötődési zavar, gátolatlan szociális kapcsolati zavar (disinhibited social engagement disorder), alkalmazkodási zavar, illetve a már korábban említett ASD (American Psychiatric Association 2013).

A PTSD kiváltó oka lehet valamilyen fenyegető vagy valós haláleset, súlyos sérülés vagy szexuális erőszak megtapasztalása. Kritériumok szerint a következő kategóriák közül legalább egynek teljesülnie kell. **A1**: traumatikus esemény(ek) közvetlen átélése; **A2**: másokkal történő traumatikus esemény tanúja; **A3**: közeli családtaggal vagy baráttal történt traumatikus eseménnyel kapcsolatos hír; **A4**: traumatikus esemény(ek) averzív részleteinek extrém és/vagy ismételt megtapasztalása, mely sokszor foglalkozáshoz köthető (pl. orvos, halottkém, rendőr).

A tünetek általában 3-6 hónapon belül megjelennek, de olyan is előfordulhat, hogy csak évek múltán jelentkeznek a betegség, viszont minden alább említett tüneti kategóriából minimum 1-2 jellemzőnek legalább 1 hónapig fenn kell állnia (**F** kategória) és tartósan negatívan kell befolyásolnia az életvitelt (**G** kategória), illetve a tünetek nem származhatnak valamilyen drog használat vagy orvosi kezelés következményeiből. Az legújabb, DSM V. kritériumrendszerben nagyobb hangsúlyt fektettek a magatartásbeli jelenségek megfigyelésére, melyek röviden összefoglalva a következők:

- **B**: események újra (át)élése („re-experiencing”): során a traumatikus eseménnyel kapcsolatos spontán emlékek felszínre törése, visszatérő álmok, súlyosabb esetben disszociativitás is jellemző, mialatt a beteg a traumatikus eseménysort újra átéli („flashbacks”), annak minden fiziológiai és pszichés jellemzőivel együtt. Mindezekon kívül súlyos pszichés distresszt váltanak ki a traumára emlékeztető tárgyak, helyszínek, jelek.
- **C**: elkerülő magatartás („avoidance”): mely önmagával, másokkal vagy a világgal kapcsolatos, tartósan fennálló, túlzott negatív hiedelmekből vagy elvárásokból adódik. Külső kiváltó tényezőktől, traumára emlékeztető tárgyaktól való indokolatlan és túlzott félelem jellemző.
- **D**: negatív gondolatok és hangulat („negative cognitions and mood”): tartós és torzult gondolatok kialakulása és megléte a traumatikus esemény okaira és következményire vonatkozóan (bár néha kulcsfontosságú jelenetekre nem

emlékeznek). Tünetei közt szerepelhet még a tartósan fennálló és túlzó negatív érzelmi állapot (félelem, harag, bűntudat, szégyen), érdeklődés csökkenése és elhatároltság érzése másoktól.

- **E:** készenlét, figyelmi állapot („arousal and reactivity”): jellemző a traumatikus eseménnyel kapcsolatos éberség és reaktivitás változása, melyre féktelen, meggondolatlan vagy öndestruktív viselkedés, hipervigilancia, koncentrációs problémák, és alvási zavarok jellemzőek.

A fent említett tünetek felnőtt és idősebb gyermekekre jellemzőek, 6 éves kor alatti gyermekekre egy külön kategóriát határoztak meg a PTSD-n belül.

4.1. A PTSD állapotmodellje, a félelmi kondicionálás

Több elmélet szerint a PTSD tüneteinek kialakulása és fennmaradása nagyrészt a Pavlovi kondicionálás módszerén alapul (Pavlov 1927), melyben kulcsjelek (feltételes inger), a trauma (feltétlen (averzív) inger) megtörténtével egy időben jelen vannak, és ezek összekapcsolódva az úgynevezett félelmi kondicionálás során létrehozzák a félelmi memóriát (Myers és mtsai 2011). A kulcsjel, vagyis a feltételes inger lehet maga a környezet is, ebben az esetben környezethez köthető (kontextuális) félelmi kondicionálásról beszélhetünk. Kontextuális félelmi emlék generalizációjáról (félelmi emlék transzfere biztonságos környezetbe) beszélhetünk, ha az egyén nem tud különbséget tenni a félelmet keltő és biztonságos környezet között (Lopresto és mtsai 2016, Rudy és mtsai 2004). A biztonságos környezetben is fél, retteg, szorong, illetve a visszatérő emlékeknek köszönhetően újra úgy érzi, mintha a trauma helyszínén lenne. Emlékeztető jel vagy szituáció lehet, egy a háborús övezetben látott bármilyen tárgyra hasonlító dolog - például egy autó - vagy valamilyen stresszhelyzet.

A PTSD-ben szenvedő betegeknél az egyik leggyakrabban alkalmazott kezelési módszer az expozíciós technika, melyben újra és újra szembesítik a beteget bizonyos kulcsjelekkel (feltételes inger) és ennek során a páciens megtanulja, hogy ebben a helyzetben nem kell félni. Amikor a kulcsinger, vagyis a feltételes inger elválik a feltétlen, ez esetben félelmi választól, extinkcióról, kioltódásról beszélhetünk (VanElzaker és mtsai 2014).

A környezet összekapcsolása a nem kondicionált stimulussal lényegében egy tanulási folyamat (akvizíció), mely során a tanult asszociáció a rövid távú

munkamemóriából átkerül a hosszabb távú memóriába (konszolidáció) és stabil emléknym (engram) képződik (McGaugh 2000). Azonban több tanulmány is kimutatta, hogy az emléknym az újraaktiválás során (recall, retrieved) újra formálhatóvá válik, lehetőséget adva ezzel a kioltódás folyamatának (NaderHardt 2009). Az imént említett folyamatot, mely során az emléknym destabilizálódik, majd restabilizálódik rekonszolidációnak nevezzük. A rekonszolidáció kísérletileg általában 24 órával a kondicionálás (akvizíció) után történik, amikor az állatot a kondicionáló környezetbe visszahelyezzük, feltétlen stimulus nélkül (BaldiBucherelli 2015, Hong és mtsai 2013, Lee 2008). Ezzel ellentétben az extinkció hosszantartó, ismételt visszahelyezést jelent az adott környezetbe vagy kulcsinger jelenlétét a feltétlen választ kiváltó stimulus jelenléte nélkül, ezzel előidézve a korábbi engram gyengülését (BaldiBucherelli 2015, Myers és mtsai 2011). Az extinkció során valójában nem törlődik az eredeti emlék, hanem az immár létrejött új asszociáció elnyomja a kondicionált félelmi választ (Bouton 1993). Éppen ezért, néha előfordulhat, hogy hirtelen visszatér a régi asszociáció, például súlyos betegség hírének hallatán (VanElzakker és mtsai 2014).

Vizsgálatunkban az imént említett klasszikus kondicionálás modellt alkalmaztuk rágcsálókban. A kontextust vagyis a környezetet, mint feltételes stimulust kapcsoltuk össze a feltétlen ingerrel (lábsokkal) és a kondicionált félelmi választ vizsgáltuk.

A rágcsálók, köztük az általunk is vizsgált egerek és patkányok természetes, fajspecifikus reakciója valamilyen félelmet kiváltó vagy averzív ingerre, a mozdulatlan dermedés vagy megfagyási reakció („freezing”) feltétlen válasz). Dermedés során az állat, semmiféle mozgást nem végez, kivéve légzőmozgásokat (BaldiBucherelli 2015, FendtFanselow 1999, Sacchetti és mtsai 1999). Kondicionált válaszként más magatartásbeli jelenségek is megfigyelhetők, például zavart, nem célorientált gyors mozgások (megrohanások), ugrálás (kiútkeresés a dobozból), illetve distressz vokalizáció is (Myers és mtsai 2011).

A PTSD tüneteinek előidézésére és vizsgálatára rágcsálókban egy a munkacsoportunkban kidolgozott protokollt használtunk, melynek jellemzőit korábban a betegség tüneteinek kategóriáival összehasonlítva (ekkor még DSM IV., de a DSM V.-re is megfeleltethetőek (BorghansHomberg 2015)) validáltuk. Az állatokban a

tünetek hosszabb távon is fennmaradtak (akár 1 hónapnál tovább is), és az állatok normális életvitele zavart szenvedett (F,G kritérium kategóriák) (3. ábra).

| | |
|---|--|
| ✓ | A. tünetcsoport: trauma átélése (mindkét tünet jelen kell legyen) |
| ✓ | 1. extrém veszélyhelyzetben: |
| ✓ | 2. védtelenség érzete és rémület |
| ✓ | B. tünetcsoport: trauma ismételt belső újraélése (legalább egy az alábbiak közül) |
| ✓ | 1. felkavaró emlékek ismételt megjelenése |
| ✓ | 2. felkavaró álmok |
| ✓ | 3. az trauma újbóli megjelenésének érzete |
| ✓ | 4. pszichikai distressz traumára emlékeztető körülmények hatására |
| ✓ | 5. élettani distressz traumára emlékeztető körülmények hatására |
| ✓ | C. tünetcsoport: traumára emlékeztető élmények kerülése; élmények iránti érzéketlenség (legalább 3 az alábbiak közül) |
| ✓ | 1. a traumára való emlékezés kerülése |
| ✓ | 2. a traumára emlékeztető körülmények kerülése |
| ✓ | 3. a trauma felidőzésének képtelensége |
| ✓ | 4. fontos tevékenységekben való részvétel hiánya |
| ✓ | 5. elidegenedés a szociális környezettől |
| ✓ | 6. érzelmi élet elsivárosodása |
| ✓ | 7. sötét jövőkép |
| ✓ | D. tünetcsoport: felajzott állapot (legalább 2 az alábbiak közül) |
| ✓ | 1. elalvási nehézségek, éjszakai felébredés |
| ✓ | 2. ingerlékenység, dühkitörések |
| ✓ | 3. koncentrációs zavarok |
| ✓ | 4. fokozott éberség és elővigyázatosság |
| ✓ | 5. "összerezzelési" reakció felfokozódása |
| ✓ | E. tünetcsoport: a tünetek egy hónapnál tovább tartanak |
| ✓ | F. tünetcsoport: normális életvitel zavart szenved, szenvedés |

3. ábra: A modellben vizsgált állatoknál DSM-IV kritériumok alapján diagnosztizálható a PTSD. Kék jelek az állatokban is megfigyelhető tüneteket jelentik.

A modell során vizsgált paraméterek általános összefoglalója:

1. fázis (A): trauma előidézése, átélése: elektromos lábsokk alkalmazása
2. fázis (B-D): viselkedési zavarok nyomon követése:
 - B. trauma ismételt átélése azáltal, hogy ugyanabba a környezetben visszakerül:
 - i. vizsgálata mind magatartásbeli (kondicionált félelem teszt: dermedés, menekülés, distressz vokalizáció)
 - ii. mind élettani jellemzőknek (alacsonyabb szívritmus, dobozba visszahelyezve emelkedés; stressz-tengely hormonszintjeinek emelkedése)
 - C. traumára emlékeztető élmények kerülése

- i. fontos tevékenységekben való részvétel hiánya (csökkent mozgékonyság a nyílt tér tesztben)
- ii. elidegenedés szociális környezettől, érzelmi élet elsivárosodása (csökkent szociális érdeklődés mind a szociális elkerülés, mind rezidens-intruder tesztekben)

D. felajzott állapot, arousal

- i. fokozott éberség, elővigyázatosság (csökkent alvás-ébrenlét ritmus, traumához köthető tárgy fokozott temetése)

Erős stresszor hatása azonban nem csak a kondicionált félelmi válaszban jelenik meg, hanem más viselkedésbeli diszfunkciókat is eredményez, melyek a humán PTSD-re jellemző társult betegségekre jellemzőek, például szorongás vagy depresszió, memória problémák, alvási nehézségek, hipervigilancia, szociális problémák, stb. (Foa és mtsai 1992, Garrick és mtsai 1997, Haller és mtsai 2003, Mikics és mtsai 2008, Mikics és mtsai 2008).

Köszönhetően a hasonlóságnak a rágcsálók és emberek között - a trauma után megfigyelt élettani és viselkedésbeli változások között – a félelmi kondicionálás jól használható modellnek bizonyult (Stam 2007, Ursano és mtsai 2008). A modell használatának köszönhetően jobban megismerhetjük a PTSD kialakulásának hátterében álló folyamatokat, és új kezelési módok fejlesztésére nyílik lehetőség.

4.2. A PTSD kialakulását befolyásoló tényezők

A vizsgálatok során kiderült, hogy a traumán átesett emberek 10-30 %-ánál alakul ki PTSD (de VriesOlf 2009, Dohrenwend és mtsai 2006, Neigh és mtsai 2013). A betegség kialakulásának valószínűségét egyéni kockázati tényezők határozzák meg, melyek csoportosíthatóak a trauma előtti, alatti és utáni jellemzőkre.

A traumát megelőzően fontos az illető genetikai háttere. Iker és más genetikai vizsgálatokból kiderült, hogy PTSD kialakulását 1/3-ad arányban befolyásolja a genetikai hajlam. Ehhez az arányhoz úgy tűnik három nagyobb gén csoport polimorfizmusa járul hozzá legnagyobb mértékben, melyek fokozzák a félelmi memória kialakulását és csökkentik a felépülés esélyét (Almli és mtsai 2014). A betegségre hajlamosító gének a következők: szerotonin transzporter (5-HTTLPR, SERT, slc6a4), katekolamin o-metil transzferáz (COMT), ami a dopaminerg és noradrenerg rendszeren keresztül hat, illetve az agyi eredetű neurotróf faktor (BDNF), ami a neuronális fejlődésben, plaszticitásban játszik fontos szerepet (Garpenstrand és mtsai 2001, Hajcak és mtsai 2009, Lonsdorf és mtsai 2009, Norrholm és mtsai 2013). A fentiek közül a szerotonin transzportert emelném ki, mely rövid (s) allél megjelenése esetén már heterozigóta formában is csökkenti a génexpressziót, ezzel a szerotonin szintet az agyban. Ha ehhez egy másik, szintén szerotonerg rendszerhez köthető triptofán-hidroxiláz 2 (TPH2) gén polimorfizmusa is hozzájárul, még nagyobb a valószínűsége a PTSD kialakulásának (Goenjian és mtsai 2012, Hermann és mtsai 2012). A fent említett három csoporton kívül más géneket is összefüggésbe hoztak már a PTSD kialakulásával, köztük például a FKBP5 gén polimorfizmusát, mely a glükokortikoid receptorok (GR) aktivitásán keresztül a stresszadaptáció fontos alapjának tekinthető hipotalamusz-hipofízis-mellékvese (HHM) tengely működését befolyásolja (Skelton és mtsai 2012, True és mtsai 1993). A gamma-amino-vajsav (GABA) 2 α receptor allélvariációinak szerepe is felmerült. Úgy tűnik, az imént tárgyalt hajlamosító genetikai faktorok nem kizárólag a PTSD kialakulását segítik elő, hanem egy általános érzékenységi endofenotípust hoznak létre, mely a mentális betegségek gyakoribb kialakulásával jár (LonsdorfKalisch 2011).

Végül, de nem utolsó sorban az egyén korábbi élményei, tapasztalatai és ebből következően személyisége, megküzdési stratégiája is fontos a trauma hatása szempontjából. Fontos, hogy voltak-e korábban más pszichiátriai zavarai. Az ember

személyiségbeli tulajdonságain kívül a környezet is nagy hatással van a betegség kialakulására, például milyen a kulturális környezet, szociogazdasági státusz, iskolázottság és így tovább.

Peritraumatikusan leginkább a közvetlen környezettől függ a betegség kialakulása, melyet például a trauma súlyossága, hossza, minősége határoz meg.

Poszttraumatikusan az egyén megküzdési képessége az adott stressz helyzettel, és a támogató vagy ellenséges szociális környezet válik meghatározóvá. A lakókörnyezet is fontos, még hozzá, abban az értelemben, hogy milyen traumára emlékeztető dolgot élhet át, illetve mennyi emlékeztető jelet láthat az egyén a mindennapjaiban (American Psychiatric Association 2013).

4.3. A PTSD kezelése

Mint a legtöbb pszichiátriai betegségénél PTSD-nél is a legjobb kezelési mód a pszichoterápia és farmakológiai kezelés együttes alkalmazása. Pszichoterápiák közül a kognitív viselkedés terápia tűnik a leghatékonyabbnak, amely abban segít, hogy a betegek felismerjék és megváltoztassák a hibás, torzult gondolkodásmódjukat. Ahogy a legtöbb pszichiátriai betegségben, a PTSD-ben is zavart szenved az információfeldolgozás az eseményeket illetően, így a történések torzult, félreértelmezett jelentést nyernek. Az utóbbi igaz lehet a múltbeli, de a jelenben történt eseményekre is. Kognitív viselkedés terápiák egy speciális, kimondottan PTSD-ben szenvedő páciensekre fejlesztett változata a hosszantartó expozíciós terápia, mely során a beteget több alkalommal is szembesítik a traumára emlékeztető helyzettel (lehet az egy tárgy, helyszín, bizonyos személyek) biztonságos körülmények között, így szép lassan megtanulja reálisan értelmezni a történeteket (Hofmann és mtsai 2013, VanElzakker és mtsai 2014). Gyakran alkalmazott eszköz a virtuális valóság, mely segítségével valóság-hű környezetet képesek a terapeuták előállítani (Maples-Keller és mtsai 2017).

Gyógyszeres kezelést illetően az Amerikai (FDA) és az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) az antidepresszánsok közül a sertralint (Zoloft) és paroxetint (Paxil) ajánlja elsődleges gyógyszeres kezelésként. Mindkét gyógyszer a szelektív szerotonin visszavétel gátlók (SSRI) csoportjába tartozik, melyek a szerotonin szint szabályozásán keresztül hatnak (Brady és mtsai 2000, Hoskins és mtsai 2015, Marshall és mtsai 2001). Alkalmaznak még szorongásoldókat (benzodiazepinek)

(BernardyFriedman 2015), és egyéb neurotranszmitterekre ható gyógyszereket is az egyes tünetek kezelésére, például az adrenerg rendszerre ható prazosin (Minipress) nevű gyógyszert álmatlanság, rémálmok ellen használják (Raskind és mtsai 2013). Ezeken kívül azonban sokféle más gyógyszerre is szükség lehet, hiszen sokszor más mentális zavarral is társul, így jóval összetettebb feladatot jelent a betegek megfelelő kezelése.

A kezelések hatására a betegek egy része a PTSD jelentkezését követően fél év alatt meggyógyul, de sokszor a kezelés ellenére a tünetek krónikussá válnak, és nem ritka az öngyilkossági kísérlet sem. Egy kimutatás szerint, melyben a betegeket a tünetek súlyossága alapján osztályozták a traumát követő 6 évben, a kezelés a betegek 14%-án tudott segíteni. 10%-nál a betegség folyamatosan egyre súlyosabbá vált, és a maradék 75%-nál az értékek nem változtak, a betegség végig jelen volt, igaz a kezdeti alacsonyabb szintet mutatva (Bryant és mtsai 2015).

5. A PTSD kialakulásának háttere

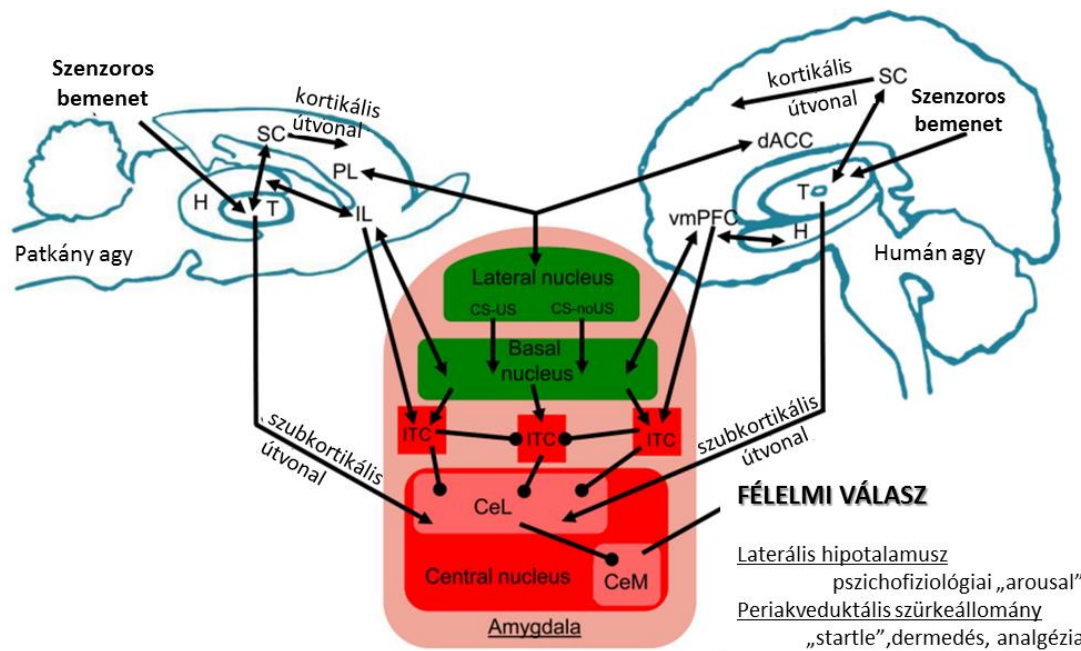
5.1. Agyterületek és kapcsolataik

Agyi képalkotó eljárással (pl. funkcionális mágneses rezonanciavizsgálat (fMRI), pozitron emissziós tomográfia (PET)) készült tanulmányok azt mutatják, hogy PTSD-ben szenvedő emberek agyának azon területei, amelyek a félelmi folyamatok kialakításában szerepet játszanak fokozott mértékben aktiválódnak (dorzális anterior cinguláris kéreg (dACC), amigdala), míg a félelmi reakció gátlásában résztvevők csökkent válasz készséget mutatnak (ventromediális prefrontális kéreg (vmPFC), hippocampusz) (Linnman és mtsai 2011, Milad és mtsai 2009, Rougemont-Bucking és mtsai 2011). Egy 2005-ös tanulmányban, szexuális zaklatást gyerekkorukban átélt PTSD-vel diagnosztizált felnőttek egy úgynevezett félelem kondicionáló kísérletben (képernyőn feltűnő bizonyos geometriai formák megjelenésével egyidőben enyhe áramütést kapnak az ujjukra erősített elektródán keresztül) vettek részt. A traumatizált nőkben a félelem megerősítésében részt vevő agyterületek (az előbb említett dACC és amigdala) nagyobb aktivitást mutattak (Bremner és mtsai 2005). Sőt, a kioltódási, vagyis a félelmi válasz eltüntetését célzó kísérlet alatt az érintett területek aktivációja a kondicionálás alatt megfigyeltre hasonlított. Vagyis, az áramütés nélküli, biztonságos képnézegetés alatt (kioltódási protokoll) a hippocampusz nem volt képes megkülönböztetni a biztonságos és nem biztonságos környezetet. Továbbá a vmPFC sem volt képes megtartani a kioltódási kezelés alatt tanultakat, vagyis, hogy az adott környezet immár nem jelent veszélyt (Milad és mtsai 2009). Egy másik kísérletben pedig PTSD-ben szenvedő alanyok agyában a vmPFC aktivitása nagymértékben csökkent a kontroll alanyokhoz képest, ha traumára emlékeztető helyzeteket kellett elképzelniük (Lanius és mtsai 2001, Shin és mtsai 1999).

Míg az irodalmi adatok a dACC, amigdala és vmPFC területek hiper és hipoaktivitását illetően nagyrészt egységesek, addig a hippocampusz aktivitásának növekedését és csökkenését is kimutatták különböző kísérletekben, melyek a trauma típusától, illetve a körülményektől függően változtak (HughesShin 2011). Megfigyelték például, hogy a PTSD-ben szenvedő embereknek kisebb méretű a hippocampusza a kontrollokhoz képest (O'Doherty és mtsai 2015, Woon és mtsai 2010), és az ebből

következő csökkent működési kapacitás, lehet az egyik oka annak, hogy nehezen különítik el a traumatikus és biztonságos környezetet egymástól.

A fent említett humán eredmények megfeleltethetőek a rágcsálókban végbemenő változásokkal a PFC-ben, az amigdalában és a hippocampusban (4. ábra) (VanElzakker és mtsai 2014).



4. ábra: Egyszerűsített, sematikus ábra a félelmi válaszban részt vevő agyi hálózatok funkcionális hasonlóságáról emberben és rágcsálóban. H: hippocampus; T: talamusz; SC: szomatoszenzoros kéreg; PL: prelimbikus kéreg; IL: infralimbikus kéreg; dACC: dorzális anterior cinguláris kéreg; vmPFC: ventromediális prefrontális kéreg; ITC: interkaláris sejtek; CeL: centrális amigdala laterális része; CeM: centrális amigdala mediális része; forrás: (VanElzakker és mtsai 2014)

A környezetből érkező szenzoros jel a talamuszon keresztülhaladva kétféle úton érheti el az amigdalát, mely többek között az érzelmi memória - köztük a félelmi memória - kialakításában vesz részt (NewportNemeroff 2000). Az egyik út, amikor a thalamusból jövő jel először a neokortexbe vagy a hippocampusba megy. A másik, gyorsabb szubkortikális útvonalon keresztül az információ közvetlenül a laterális (LA) és centrális amigdalába (CeA) jut. A feltétlen (félelmi válasz) és feltételes inger (hang, fény jele vagy környezet) összekapcsolása a LA-ban történik, ami a centrális amigdalán keresztül autonóm (pl. szívfrekvencia emelkedés) és viselkedésbeli (pl. ledermedés) változásokat idéz elő (Blair és mtsai 2001, VanElzakker és mtsai 2014). A rágcsálók esetén mind a félelmi kondicionálás és a kioltódás folyamatában fontos szerepe van mediális PFC-nek (mPFC). A mPFC dorzálisabb részén elhelyezkedő prelimbikus

kortex (PrL) - mely emberben a dACC-nak felel meg - főleg erősítőként működik a félelmi kondicionálás során (Burgos-Robles és mtsai 2009), míg a ventrálisabban elhelyezkedő infralimbikus kortex (IL) - emberben vmPFC - a kioltódás elősegítésében játszik szerepet (Resstel és mtsai 2006). Ezenkívül az IL-nek fontos szerepe van a félelmi válasz összekapcsolásában a környezettel, ugyanis szoros kapcsolatban áll a hippokampuszal és az amigdalával (Maren és mtsai 2013, Quirk és mtsai 2003). A hippokampusz - az asszociáción kívül - a memória nyomok tárolásában is fontos szerepet játszik, mely a medális temporális kortexel való kapcsolatán alapul. Ennek megfelelően funkcionális összehasonlítóként működik, mely folyamatosan összehasonlítja az élőlény jelenlegi helyzetét a múltbeli környezettel és tapasztalataival, és ennek megfelelően értékeli az adott helyzetet (veszélyes-e vagy sem) (VanElzakker és mtsai 2008). A CeA-ból származó kimenet biztosít kapcsolatot a félelmi válasz kialakításában fontos szerepet játszó szomatomotoros (pl. periakveduktális szürkeállomány (PAG)) és autonóm idegrendszeri (pl. adrenerg hormonokat a mellékvesevelőből) központokkal, illetve az innen származó rostok aktiválják a HHM tengelyt is, amely glükokortikoid felszabadulást indukál a mellékvesekéregből (AxelrodReisine 1984, LeDoux 2012, McEwen 2009).

A túlélő viselkedés kialakításában („küzdj vagy fuss”) központi effektor funkciót tölt be a PAG, mely az α -motoneuronok ingerlékenységének növelésén keresztül alakítja ki a megfelelő viselkedési választ (Koutsikou és mtsai 2014), menekülést, küzdést vagy a (le)dermedést (Koutsikou és mtsai 2015, LeDoux 2012). A PAG ventrolaterális részének léziójával csökken a dermedés hossza félelmi kondicionálás után (LeDoux és mtsai 1988, Vianna és mtsai 2001), illetve a dermedés alatt növekedett idegi aktivitást mutatható ki (Carrive és mtsai 1997). Ez az összefüggés emberekben is kimutatható volt fMRI vizsgálattal, mely során a pislogási válasz alatti agyi aktivitás változását figyelték a félelmi kondicionálás során (Lindner és mtsai 2015). Egy másik vizsgálatban PTSD-ben szenvedő betegeknél fokozott idegi aktivitást mértek a PAG-ban, traumára emlékeztető hangok lejátszása közben (Pissiota és mtsai 2002).

5.2. Neurotranszmitterek és hormonok

Az idegi kapcsolatok feltárásán túl számos ismerettel rendelkezünk félelmi memória kialakulásában szerepet játszó molekulákról is. A PTSD-ben szenvedő betegeknél a noradrenalin és kortizol arány a vizeletben igen magas, mely megkülönbözteti más mentális betegségektől (Delahanty és mtsai 2005, Mason és mtsai 1988).

A **noradrenerg rendszer** fontos szerepet játszik a félelmi memória kialakításában és kioltódásában is. A kioltódás során emelkedett szintet találtak az mPFC-ben, valamint β -adrenoreceptorok aktiválása segítette a kioltódás folyamatát, a locus coeruleusból származó felszálló rostok gátlása, pedig hátráltatta a kioltódásos kezelés sikerét (Giustino és mtsai 2016, KrystalNeumeister 2009, O'Donnell és mtsai 2004).

Egy másik katekolaminnak, a **dopaminnak** alacsony szintje hozzájárulhat az apátiához, anhedóniához, figyelemzavar és motoros problémák kialakulásához, a magas szintje, pedig pszichózt, agitációt, nyugtalanságot okozhat (OlszewskiVarrasse 2005).

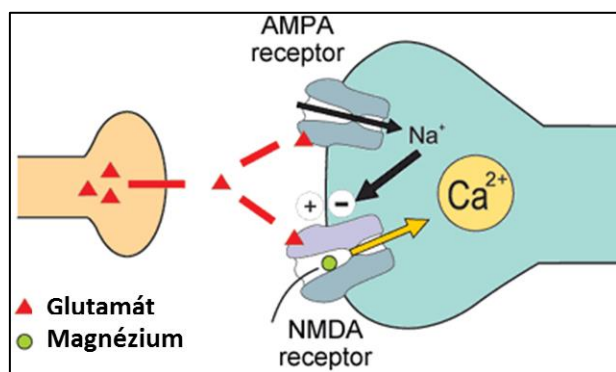
A katekolaminokat is magukba foglaló monoamin neurotranszmitterek egy másik klasszikus alkotója a **szero-tonin** (5-HT). Krónikusan alacsony szintjét szorongással, ingerlékenységgel, öngyilkossággal, megnövekedett agresszióval hozzák összefüggésbe (Seo és mtsai 2008). A szerotonerg rendszer hozzájárul a glükokortikoid szint stabilizálásához, hiszen hiányában HHM tengely működése sérül (Chaouloff 1993, Harvey és mtsai 2004).

Már eddig is láhattuk mennyire összetett folyamatok vesznek részt a PTSD alapjelenségét képező félelmi tanulásban. A továbbiakban a glutamáterg rendszer szerepét és kapcsolatát a HHM tengellyel emelném ki, illetve a mediális raphe-t, mint glutamát és szerotonin neurotranszmittert egyaránt kibocsátó mag speciális helyzetét részletezem, mivel ezek álltak a vizsgálataink középpontjában.

6. Glutamát rendszer jellemzői és szerepe a félelmi memória kialakulásában

Glutamát az anyagcsere egy általánosan előforduló molekulája, mely a szervezet minden sejtjében jelen van. A központi idegrendszerben neurotranszmitter szereppel is bír, az egyik legnagyobb mennyiségben jelen levő serkentő neurotranszmitterünk. Mint ilyen, szerepe van a neurogenesisben, szinaptogenesisben, neuronális differenciációban, és az idegsejtek nyúlványainak kialakításában már a fejlődés első szakaszától. Kimutatták, hogy a stressz, illetve trauma szinaptikus regressziót okozhat, sőt teljes nyúlványok, dendritek visszafejlődését is indukálhatja, így - többek közt a glutamaterg rendszer megzavarása révén - a neuronális hálózat zavarát okozva különböző pszichiátriai és neurológiai zavarokat idéz elő (Bennett 2008, Cerqueira és mtsai 2008, Hashimoto 2009).

A glutamát egy aminosav, mely az agyban α -ketoglutársavból redukív transzaminálással, vagy glutamin dezaminálásával képződik és szinaptikus vezikulákban tárolódik, amíg akciós potenciál hatására fel nem szabadul a serkentő idegvégződésekből. A poszt-szinaptikus neuronon kétféle glutamát receptor családot különíthetünk el: ionotróp és metabotróp receptorokat. A gyors excitátoros glutamát szignalizációt biztosítják az ionotróp glutamát receptorok, melyek közé N-metil-D-aszpartát (NMDA), kainát és az általunk is vizsgált α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionát (AMPA) receptor tartozik. Nagy általánosságban elmondható, hogy az AMPA és kainát receptorok ligandkötés hatására nátriumot és káliumot, míg az NMDA kalciumot is képes átengedni, viszont a csatornanyitáshoz a membrán



5. ábra: AMPA és NMDA receptor sematikus váza.
forrás: <http://currentsinbiology.tumblr.com/post/128064660767/neurobiology-light-activated-learning>

potenciál változására is szükség van, hogy a csatornát nyugalmi állapotban elzáró Mg^{2+} iont kimozdítsa (5. ábra). A másik nagy csoportba a metabotróp glutamát receptorok

(mGluR1-8) tartoznak, melyek lassabb, G-protein kapcsolt szignalizációs útvonalakat aktiválnak (JainZelena 2011, WillardKoochekpour 2013).

Több vizsgálat is igazolta, hogy a glutamát neurotranszmisszióinak meghatározó szerepe van a kondicionált félelem és PTSD kialakulásában (Riaza Bermudo-Soriano és mtsai 2012). A glutamaterg szignalizációnak fontos szerepe van az hosszú távú potencírozás (long-term potentiation, LTP) kialakulásában, mely elengedhetetlen a szinaptikus plaszticitás kialakításához, vagyis a különböző tanulási és memória folyamatokban, így a félelmi memória kialakulásában is (Chambers és mtsai 1999, Fortin és mtsai 2010, Kim és mtsai 2007, Myers és mtsai 2011). Receptorai nagy arányban fordulnak elő a félelmi memória kialakításában részt vevő agyterületeken, például az amigdalában vagy a PFC-ben (Monaco és mtsai 2015, Perusini és mtsai 2016, Sweatt 2016). Egyes klinikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a vér glutamát szintjéből következtetni lehet a PTSD jelenlétére illetve súlyossága azzal egyenesen arányos, viszont a glutamát szintből a PTSD kialakulása előre nem jelezhető (Nishi és mtsai 2015).

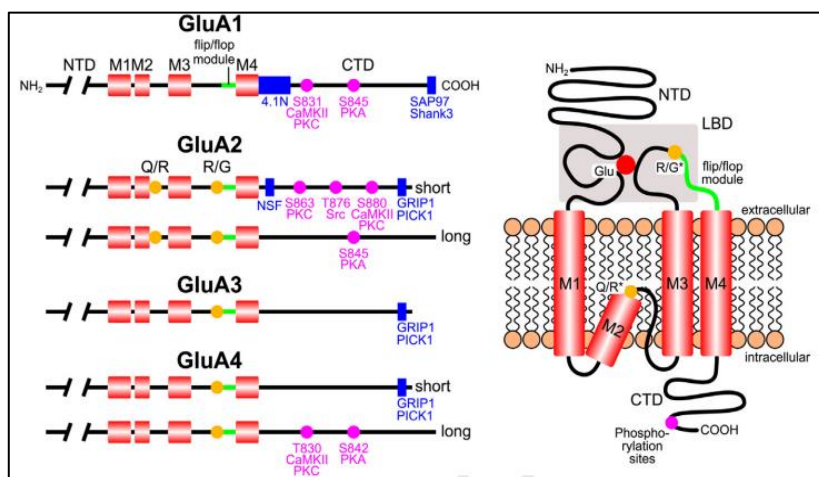
Több olyan gyógyszer is elérhető már kereskedelmi forgalomban, melyek a glutamát rendszert célozva több esetben is hatékonyak bizonyultak PTSD kezelésében. Ilyen például a lamotrigin, ami a glutamát felszabadulást gátolja (Hertzberg és mtsai 1999), ketamin, amely egy NMDA receptor antagonist (Feder és mtsai 2014) és D-cikloszerin, mely parciális NMDA agonista (Averill és mtsai 2017, McGuire és mtsai 2017).

Viszont a glutamát általános előfordulása miatt az agyban, nem érdemes egyszerre az egész glutamát rendszerre ható gyógyszert alkalmazni, mivel az általuk befolyásolt folyamatok nagyon szerteágazóak, így szedésük sok mellékhatással járhat. Érdemesebb megcélozni egy specifikus alegységet tartalmazó receptort, melynek köszönhetően jobban kontrollálható, hatásosabb terápiát érhetünk el. Legintenzívebben a félelmi memória kialakulásában, kioltódásában az NMDA receptor szerepét vizsgálták. A specifikus alegységet célzó kezelésre jó példa a laborunkban nemrégiben vizsgált NMDA receptor NR2B antagonist alkalmazása, mely PTSD patkány modelljében csökkentette a trauma hatásait a viselkedés tesztekben (Haller és mtsai 2011). Valóban, klinikailag a visszatérő emlékek csökkentésében hatékonyak bizonyult a NR2B antagonist ifenprodil (Hashimoto és mtsai 2013, Kishimoto és mtsai

2012). További vizsgálataink viszont arra utaltak, hogy bár a PTSD-szerű viselkedés egyes tüneteit az NR2B receptorok blokkolása megszünteti, de például patkányokban a szociális visszahúzóásra nem hatott. Ezért figyelmünk az AMPA receptor felé fordult, mely szerepét több tanulmány is feltételezte.

Az AMPA receptornak 4 alegysége (GluA1-4) van, melyek tetramert alkotva építik fel a csatornát

(6. ábra). GluA2 alegység határozza meg a receptor ionáteresztő képességét, ha nincs jelen a tetramerben, akkor a csatorna kalciumot is képes átengedni (CP-AMPA). A CP-AMPA általánosan



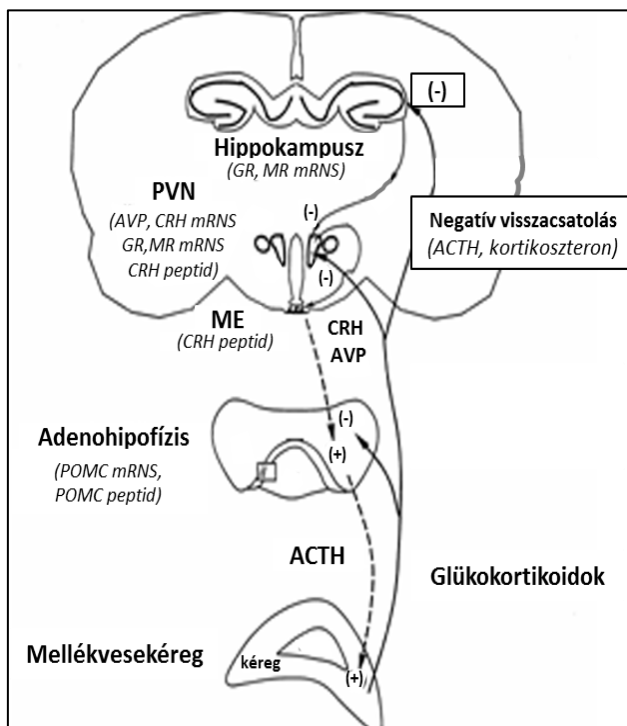
6. ábra: AMPA receptor szerkezete és alegységeinek felépítése.
forrás: (Freudenberg és mtsai 2015)

előfordul a neuronális fejlődés során (BrillHuguenard 2008), azonban kimutatták, hogy a már érett neuronok is tartalmazzák, például a hippocampusban (Wenthold és mtsai 1996). Ezenkívül egyre több tanulmány azt mutatja, hogy fontos szerepet játszik a szinaptikus plaszticitásban is (Fortin és mtsai 2010, Isaac és mtsai 2007, Man 2011).

Az AMPA receptor aktivitását potenciózni képes 4-(2-fenilszulfonilamino)etil(2,6-difluoro-fenoxi)acetamid (PEPA) nem volt hatással a félelmi memória kialakulására, viszont segítségével felgyorsítható volt a kioltódásos tanulás (Yamada és mtsai 2009). Elektrofiziológiai vizsgálatok, azt mutatták, hogy a PEPA hatása kifejezettebb volt mPFC-ben, mint a BLA-ban (Zushida és mtsai 2007). Egy másik vizsgálatban kimutatták, hogy a CP-AMPA szintje 1 nappal a félelmi kondicionálás után éri el a maximumot, mely megfelelő alkalmat teremt a kioltódás farmakológiai gyorsítására (ClemHuganir 2010).

6.1. HHM tengely jellemzése és kapcsolata a glutamát rendszerrel

Stresszorok hatására működésbe lép egy alkalmazkodási válasz, melynek fontos eleme a HHM tengely (7. ábra). A HHM tengely központi részét a hipotalamusz paraventriculáris magjának (PVN) parvocelluláris sejtjei alkotják. Itt kolokalizáltan kortikotróp-elválasztást serkentő hormont (kortikotropin-felszabadító hormon, CRH) és arginin vazopresszint (AVP) termelő sejtek találhatóak (Antoni és mtsai 1984). Innen az eminentia medianán keresztül a hipofízis elülső lebenyéhez érve adrenokortikotróp hormon (ACTH) termelést - melynek a pro-opiomelanokortin (POMC) az előanyaga - és annak ürülését serkentik a szisztémás keringésbe (Antoni 1993). Az ACTH elérve a mellékvesekérget főként



7. ábra: HHM tengely felépítése.

PVN: paraventriculáris mag; GR: glükokortikoid receptor; MR: mineralokortikoid receptor; AVP: arginin-vazopresszin; CRH: kortikotropin-felszabadító hormon; ACTH: adrenokortikotróp hormon; ME: eminentia mediana

forrás: <http://umich.edu/~vazquezd/Stress-HPA.htm>

glükokortikoidokat (emberben kortizolt, patkányban kortikoszteront) szabadít fel, melyek szteroid hormonok és a kéreg középső, zona fasciculata rétegében termelődnek (Dallman és mtsai 1987). Ezenkívül szintén a mellékvese szteroidok közé tartozó, a kéreg külső, zona glomerulosa részében szintetizálódó mineralokortikoidok (pl. aldoszteron) szekréciója is fokozódik különféle stresszorok hatására. Ezen utóbbi hormonok az elektrolit-víz háztartás szabályozásában fontosak (de Kloet és mtsai 2005).

A vérplazmában úgynevezett kortikoszteroid kötő fehérje (CBG) és albumin köti a glükokortikoidokat, de a glükokortikoid hatásért csak a szabad molekulák felelősek. A kortikoszteroidok pulzatiliszen szekretálódnak, melyek amplitúdója és frekvenciája stressz hatására megnő (de Kloet és mtsai 2005). A HHM tengelyt a glükokortikoidok negatív visszacsatolással szabályozzák, melyek a glükokortikoid (GR) és

mineralokortikoid receptorokon keresztül hatnak. A mineralokortikoid receptorok leginkább limbikus területeken, a PFC-ben, az amigdalában és a hippokampuszban vannak, míg GR szinte az egész agyban egyaránt előfordul, de legnagyobb mennyiségben a PVN-ben és hippokampuszban (Bentz és mtsai 2010, Mizoguchi és mtsai 2003, Reulde Kloet 1985). A GR különösen fontos szerepet játszik a stresszválaszban, ugyanis meglehetősen alacsony affinitással kötődnek hozzá a glükokortikoidok, így nyugalomban nem telített és válaszképes marad viszonylag magas glükokortikoid szintek esetén is (de Kloet és mtsai 2005, Feder és mtsai 2009).

A CRH-nak kétféle receptora fordul elő agyunkban, a CRHR1 és CRHR2. A CRHR1-hez a CRH jóval nagyobb affinitással köt, míg a CRHR2-nek az urocortin II és III a specifikusabb ligandja. A CRHR1 megtalálható a hippokampuszban, BLA-ban, ventrális tegmentális areában, hídmagvakban, laterális dorzális tegmentumban, illetve a HHM tengely szabályozásában fontos hipofízis elülső, anterior lebenyében. A CRHR2 általánosabban előforduló receptor, például a bed nucleus of stria terminálisban (BNST), nucleus tractus solitarius-ban (NTS), amigdalában, dorzális raphe-ban, illetve a laterális szeptumban; előfordulási területe kevésbé fed át az előbb említett receptortípussal és nem tűnik meghatározónak a HHM tengely szabályozása szempontjából sem (DautzenbergHauger 2002, HolsboerIsing 2010, Potter és mtsai 1994).

Kimutatták, hogy krónikus stressz során a PVN-ben a szintetizálódó neuropeptid arány eltolódik, az AVP mennyisége nő, míg a CRH aránya csökken (Aguilera 1994, Dallman 1993). Az eltolódásnak valószínűleg a stressz tengely működésének további fenntartásában van szerepe. Ugyanis az AVP által serkentett ACTH termelés kevésbé érzékeny a glükokortikoid feedback-re, amire szükség is van, hiszen krónikus stressz esetén folyamatosan magas a glükokortikoidok plazmaszintje (Mizoguchi és mtsai 2003, SurgetBelzung 2008).

A glükokortikoidok mobilizálják az energiaraktárakat, felkészítik a testet a megküzdésre a traumatikus stressz helyzettel (fiziológiai alkalmazkodást segítve növelik az elérhető glükóz szintjét, például az izomfehérjék katabolikus lebontásával, glükoneogenezissel, lipolízis fokozásával). Azonban nem csak a mobilizálásban hanem a stressz válasz leállításában is fontos a glükokortikoidok szerepe, negatív visszacsatoláson keresztül (de Kloet és mtsai 2005).

Krónikus és/vagy traumatikus stressz azonban a HHM tengely hibás működéséhez vezet, melynek következtében patológiás elváltozások indulhatnak el, kialakítva különböző mentális betegségeket, köztük a PTSD-t is.

Korábbi eredmények szerint az adenektómia (Silva 1973), vagyis az ebből következő csökkent glükokortikoid szint rontotta a félelmi memória kioltódását expozíciós terápia mellett. Az imént említett hatást újabb állatkísérletekben szisztémásan vagy intra-amigdalárisan adott glükokortikoid antagonisták (pl. mifepristone) és glükokortikoid szintézist gátló anyagok (pl. metyrapone) eredményei is alátámasztották. Ezzel szemben, amikor agonistákat (pl. ip. dexametazon vagy intra-amigdalárisan RU28362) adtak rágcslóknak az expozíciós terápia alatt, a folyamatot sikerült felgyorsítani (Blundell és mtsai 2011, Ninomiya és mtsai 2010, Singewald és mtsai 2015, Yang és mtsai 2006). Ezzel összhangban a glükokortikoidok elősegítik a glutamaterg szignalizációt genomiális és nem genomiális mechanizmusokon keresztül. Egyrészt növelik az azonnali felszabadításra alkalmas glutamátot tartalmazó vezikulák számát, másrészt növelik az AMPA és NMDA receptorok mennyiségét a szinapszisban, elősegítve ezzel az újabb tanulási folyamatokat, a szinaptikus plaszticitást (Ganapati 1990). Krónikusan magas glükokortikoid koncentráció, azonban csökkenti az NMDA és AMPA expressziót, így a szinaptikus plaszticitás hiányával magyarázható, hogy az ismételt traumatikus eseményeket átélő emberek nagyobb rezisztenciát mutatnak az expozíciós kezeléssel kapcsolatban (Gourley és mtsai 2009, Singewald és mtsai 2015).

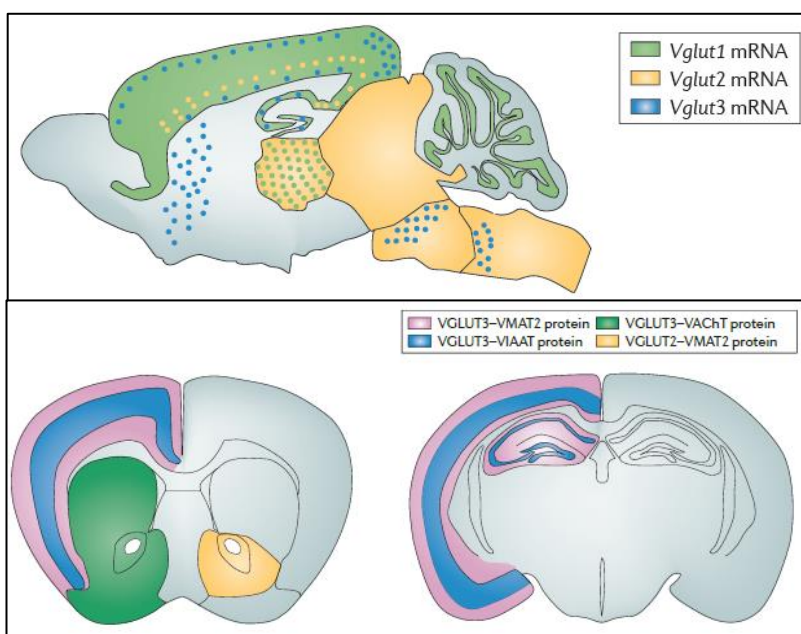
Ezzel ellentétben nagy hányada a PTSD-ben szenvedő betegeknek alacsony nyugalmi kortizol szintet és megnövekedett receptor érzékenységet mutat (Bremner és mtsai 2007, Yehuda 2004). Az expozíciós terápiával együtt alkalmazott hidrokortizon (kortizol gyógyászatban használt neve) adása pozitív hatással volt a tanulási folyamatokra (Huang és mtsai 1992, Yehuda és mtsai 2010, Yehuda és mtsai 2007).

6.2. Glutamát transzporterek

Bár a glutamát hatása jól megfogható a poszt-szinaptikus receptorain keresztül, de a folyamatban résztvevő glutamaterg idegsejtek jellemzésére, a glutamát membránokon keresztül történő szállítását biztosító transzporterek a legalkalmasabbak.

A központi idegrendszerben lévő glutamát transzportereknek két nagy csoportját különböztethetjük meg. Az egyik csoportjuk a szinaptikus részben felszabaduló glutamátot távolítja el (EAAT1-5), és megtalálható a neuronok és glia sejtek membránjában is. Az extracelluláris térben lévő glutamát körülbelül 90 %-át EAAT2 típusú, főleg glia sejtekben jelen lévő transzporter veszi fel és a glutamát-glutamin ciklus által juttatja vissza az idegsejtekbe. A másik csoportjuk a vezikuláris glutamát transzporterek (VGluT1-3), melyek proton gradiens segítségével (ATP felhasználásával) töltik fel glutamáttal a szinaptikus vezikulákat és ezáltal a glutamaterg idegsejtek legfőbb markerei (O'Shea 2002, Popoli és mtsai 2011).

Glutamaterg neuronokat a bennük található vezikuláris glutamát transzporterek (8. ábra) alapján oszthatjuk osztályozhatjuk (Freneau és mtsai 2004, Takamori 2006). A VGluT1 főleg a kéregben, hippokampuszban és kisagyi kéregben, VGluT2 pedig a mélyebb agyi struktúrákban (pl. talamusz és agytörzs) fordul elő nagy mennyiségben (Freneau és mtsai 2001, Herzog és mtsai 2001, Sakata-Haga és mtsai 2001). Sokáig az imént említett két transzporter volt csak közismert, azonban 2002-ben kimutattak egy harmadik típust is, mely sokkal



8. ábra: A VGluT eloszlása az agyban és kolokalizációjuk más neurotranszmitterekkel az axonterminálisokban. VMAT2: vezikuláris monoamin transzporter 2; VACHT: vezikuláris acetilkolin transzporter; VIAAT: vezikuláris gátló aminosav transzporter; forrás: (El Mestikawy és mtsai 2011)

korlátozottabb mennyiségben és meghatározott területeken van jelen, nagyrészt elkülönülve a másik két izotípustól. VGluT3 főleg olyan neuronokban fordul elő, melyek fő neurotranszmitterként egy másik ingerületátvivő anyagot használnak kommunikációjuk során. Megtalálható a raphe magok szerotonerg neuronjaiban, tartalmazzák kolinerg sejtek a striatumban és bazális előagyban, illetve még GABAerg interneuronokban is megtalálható a hippocampusban és a kéregben (szuperficiális réteg, II/III). Egyes kutatások szerint a GABAerg sejtekben lévő glutamát a GABA-val együtt felszabadulva moduláló funkciót tölt be a metabotróp glutamát receptorokon keresztül (El Mestikawy és mtsai 2011). Az idegrendszeren kívül is kimutattak VGluT3 transzportereket, például a vesében, májban és izmokban (Fremeau és mtsai 2002, Gras és mtsai 2002, Schafer és mtsai 2002). A VGluT1,2 kizárólag az axonterminálisokban, ezzel szemben VGluT3 a terminálisokon kívül a sejttestben és dendritekben is megtalálható, ezáltal szerepet játszhat a glutamát retrográd szinaptikus felszabadulásában (Fremeau és mtsai 2002, Fremeau és mtsai 2004).

A glutamát rendszer kapcsolatát a HHM tengellyel a VGluT-ok előfordulási mintázatával is lehet jellemezni. VGluT1 és 2 megtalálható a hipotalamuszban (Herman és mtsai 2004) a CRH neuronok sejttestjeiben (VGluT1 (Kocsis és mtsai 2010), illetve a hipofízisben található axon terminálisaiban (VGluT2 (Wittmann és mtsai 2013)).

A VGluT3 kolokalizációi közül a szerotoninnal közös expresszióját emelném ki. Egy tanulmány szerint a VGluT3 transzporter a raphe-ban lévő szerotonerg neuronok több, mint 80 %-ában előfordul, így befolyásolja a gyors excitátoros glutamát felszabadulást a szerotonerg neuronokból (El Mestikawy és mtsai 2011). A VGluT3 hiánya kissé növeli az extracelluláris szerotonin szintet, és ezzel indukálja 5-HT1A deszenzitizációját. Az irodalmi adatok szerint a MR magban található neuronok 14,8 %-a tartalmaz VGluT3-at, míg a 2,2 %-a szerotonint és VGluT3 transzportert is (Sos és mtsai 2017).

7. VGluT3 KO egerek, mint modell állatok

Az idegrendszerben széles körben előforduló glutamát rendszer szerepét a félelmi kondicionálásban - az előzőekben említett farmakológiai befolyásoláson túl - egy génkiütött egértörzset használva is tanulmányozhatjuk.

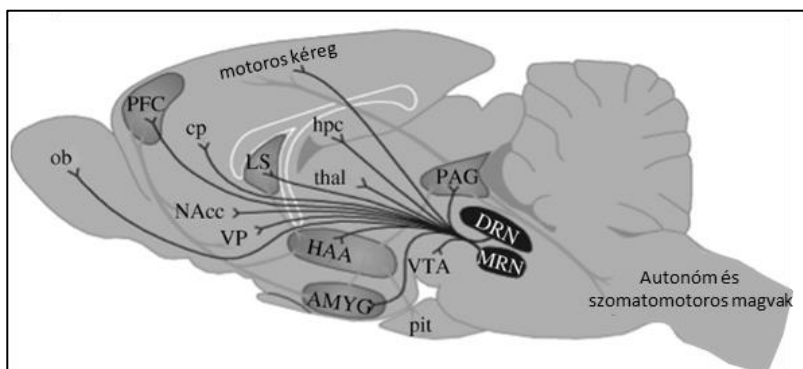
A VGluT1 és 2 teljes hiánya letális (Callaerts-Vegh és mtsai 2013), azonban heterozigóta formában életképesek és neuropszichiátriai betegségekkel összefüggésbe hozható viselkedésbeli változásokat is mutatnak. Kutatások szerint expressziójuk aránya is változik különböző stresszorok hatására. Mivel legkevésbé a VGluT3 ismert és speciális elhelyezkedése és tulajdonságai révén egészen eltérő lehet a szerepe a VGluT1, illetve 2-höz képest, ezért VGluT3 génkiütött (KO) állatokat vizsgáltunk. Vizsgálatok arra utalnak, hogy a VGluT3 jelenléte csökkenti a szorongás kialakulásának valószínűségét. Továbbá a szorongás és PTSD korábban említett szoros kapcsolata miatt feltételezhetjük, hogy VGluT3 tartalmú idegsejtek részt vesznek a félelmi memória kialakulásában is (Amilhon és mtsai 2010).

7.1. A raphe magok és a szerotonin

A - irodalmilag kissé eltérően csoportosított - 7-8 raphe magot elhelyezkedésük alapján 3 nagy csoportba sorolják. A nyúltvelőben található a nucleus raphe obscurus, nucleus raphe magnus, nucleus pallidus, melyek főleg a gerincvelővel és kisaggyal állnak kapcsolatban, és vitális funkciók (láz, légzés) szabályozását végzik. A hídi magvak a nucleus raphe pontis, nucleus centralis inferior. A harmadik csoport, amelybe az általam is vizsgált mediális raphe mag (nucleus centralis superior) is tartozik a középgygi részén helyezkedik el, emellett itt található a nucleus raphe dorsalis (DR) is (mely projekcióinak a 10%-a az amygdalába fut) (Carpenter és mtsai 1983, DahlstroemFuxe 1964, Taber és mtsai 1960).

Az agytörzsi raphe magok (MR és DR) főként monoaminerg neuronjaikról ismertek, melyek a szerotonerg bemenetet biztosítják az agy különböző területeire (Frazer A 1999) (9. ábra). Fontos szerepet játszanak az érzelmek, hangulat kialakításában, és a tanulási, memória folyamatokban.

Annak ellenére, hogy az MR és DR neurotranszmitter összetétele hasonló, a két terület ingerlése vagy gátlása eltérő fiziológiai és patofiziológiai



9. ábra: DR és MR idegi kapcsolatainak vázlatos ábrázolása rágcsőban. MRN: mediális raphe; DRN: dorzális raphe; PAG: periaqueductális szürkeállomány; VTA: ventrális tegmentális area; AMYG: amigdala; HAA: hipotalamikus támadási terület; thal: talamusz; hpc: hippocampusz; LS: laterális szeptum; NAcc: nucleus accumbens; VP: ventrális pallidum; cp: putamen; PFC: prefrontális kéreg; ob: bulbus olfactorius; forrás: (Coppens és mtsai 2010)

válaszokat eredményez, mely részben köszönhető az eltérő idegrendszeri kapcsolatainak. Mindkét terület ad bemenetet a kondicionált félelmi válasz kialakításáért felelős legfőbb agyterületekhez (amigdala, hippocampusz, PFC), azonban az innerváció mennyisége és területspecifitása más és más. A MR például több bemenetet ad a temporális kéregbe, a hippocampusz dorzális részébe a CeA-ba, mediális szeptumba a DR-el ellentétben, amely inkább fronto-parietális kéregbe, egész amygdalába egyaránt és a laterális szeptumba ad több rostot. Ami a dopaminerg

rendszerrel illeti az MR inkább a nucleus accumbens mag régiójába és ventrális tegmentális területre küld bemenetet, míg a DR inkább a striatumot idegzi be nagyobb mértékben. Hipotalamikus területekkel mindkét agyterület kapcsolatban áll, azonban egyes kutatások szerint az MR nem tartalmaz glükokortikoid receptorokat, kapcsolata a HHM tengellyel közvetett a hippokampális glutamaterg neuronokon keresztül (Le és mtsai 2002, Lechin és mtsai 2006, MoskoJacobs 1975). Pszichés stresszben, ahol az érzelmi faktor meghatározó, *in vivo* mikrodialízissel emelkedett extracelluláris szerotonin szintet mértek például az amigdalában és a PFC-ben (RueterJacobs 1996).

A szerotonin (5-HT; 5-hidroxitriptamin) egy monoamin ami a központi idegrendszerben neurotransmitter funkciót tölt be A szervezetben előforduló szerotonin mennyiségének körülbelül 90%-át a gyomor-bél enterokromaffin sejtei állítják elő, melyek a bélmozgást szabályozzák. A vérlemezkék is tartalmazzák, melyből felszabadulva segíti a sebgyógyulást és vazokonstriktációt okoz. Periférián szerepe van még a csont metabolizmusban és szervek fejlődésében, köztük kardiovaszkuláris szervrendszer formálódásában (Berger és mtsai 2009).

Az agyban fontos szerepet játszik sok vitális folyamatban, melyek például az étvágy, alvás, légzés, illetve kognitív funkciók, tanulás és memória szabályozásában. Zavarai igen fontosak az idegrendszeri megbetegedések kialakulásában, így sok farmakológiai kezelés célpontja, pl. depresszió, szorongás, PTSD esetén. A szerotonint a szervezet triptofánból állítja elő, triptofán hidroxiláz (TPH) és a DOPA-dekarboxiláz (DDC) enzimek segítségével. Majd a preszinaptikus neuronban a szinaptikus vezikulákba a vezikuláris monoamin transzporter (VMAT) juttatja. A VMAT monoamin neurotransmitterek - dopamin, szerotonin, noradrenalin, adrenalin, hisztamin - szállítását végzi. A VMAT1 a perifériás idegrendszerben, míg a VMAT2 a központi idegrendszerben fordul elő. A szerotonerg idegsejtek preszinapszisán található egy specifikus nátrium-függő monoamin transzporter (SERT), amely a szerotonin visszavételt szabályozza a szinaptikus részből. A SERT gátlásán keresztül hatnak, a már korábban is említett SSRI-k, melyek megnövelik az elérhető szerotonin szintet. A szerotonin lebomlása során 5-hidroxi indolecetsav (5-HIAA) keletkezik, amit a vese választ ki. A vér-agy gáton a triptofán és az 5-hidroxitriptofán (5-HTP) képes átjutni (Frazer A 1999).

A szerotonin receptorai szerte az agyban megtalálhatóak. Hét receptor családot különíthetünk el. Az 5-HT₃ ligand aktivált ioncsatornán kívül a többi receptor mind G-fehérjéhez kapcsolt, ami másodlagos hírvivő kaszkádot aktivál. Az 5-HT₁ receptorcsalád Gi/0 fehérjén keresztül gátló adenilátcikláz útvonalat indít el (Singewald és mtsai 2015). Ezek közül 5-HT_{1A} receptort emelném ki, mely agonistái csökkentik a szorongás, depresszió, agresszió tüneteit (Saito és mtsai 2013, Wang és mtsai 2013). Ezen receptorok autoreceptorok, melyek a preszinapszison helyezkednek el és modulálják a szerotonin kibocsátást (Caspi és mtsai 2001). Az 5-HT₂ receptorcsalád Gs proteinen keresztül serkentő foszfolipáz útvonalat indít el. Ezek közül az 5-HT_{2A} mutációja duplájára növeli az öngyilkosság valószínűségét mentális betegségben szenvedőknél, viszont agonistái növelik a preszinaptikus glutamát felszabadulást az NMDA receptorok érzékenységének növelésével (Arvanov és mtsai 1999). 5-HT_{1A} és 5-HT_{2A} receptorok szelektív aktivációja elősegíti a kioltódás folyamatát és ezt a hatást valószínűleg a mPFC és az LA-n keresztül fejt ki (Santana és mtsai 2004). Az akut SSRI kezelés anxiogén hatású, amelyet 5-HT_{2C} antagonistá adásával kiküszöbölhetünk azonban ezt krónikusan alkalmazva segíti az extinkciót. Az imént említett anxiogén hatás előidézhető ugyanezen receptor agonistájával akár szisztémásan akár közvetlenül a BLA-ba injektálva. Az 5-HT₃ receptorok szerepe kevésbé vizsgált és az irodalmi adatok is vegyesek (Kondo és mtsai 2013, ParkWilliams 2012). Az 5-HT_{5,6,7} receptorok főleg a memória konszolidációban, tanulásban vesznek részt (Singewald és mtsai 2015).

Azonban - az általam vizsgált - MR-ben nem csak szerotonerg, hanem glutamaterg és GABAerg neuronok is vannak (Sos és mtsai 2017). Vannak, amelyek csak szerotonint (sejtek 8,5%-a), vannak olyanok, amik csak glutamátot (26%) és vannak, amelyek mindkét neurotranszmittert (12,8%) tartalmazzák. Egy negyedik csoport, pedig kizárólag GABA-t szintetizál (37,2%), illetve van egy ötödik sejtcsoport is 1% alatti arányban, mely GABA mellett glutamátot is termel. A maradék, körülbelül 14 %-ára a sejteknek egyik neurotranszmitter típus sem bizonyult jellemzőnek. Az MR projekciói a hippokampuszba, laterális szeptumba, PrL-be kétféleképpen lehetnek. Az egyik a klasszikus, melyben megtalálható a VMAT2 és SERT, a másik csoportban azonban VMAT2 és VGluT3 van jelen és SERT nincs. Az utóbbi SERT nélküli axonterminálisok erősítik a szerotonin választ, hiszen a szinaptikus részben a szerotonin

hosszabb ideig és nagyobb mennyiségben áll rendelkezésre (Amilhon és mtsai 2010, Gras és mtsai 2008).

III. Célkitűzések

A PTSD kezelése még nem teljesen megoldott, és ezért nagyon fontos a PTSD kialakulásának hátterében álló idegi és neuroendokrinológiai változások felderítése, és újabb terápiás lehetőségek keresése. Az irodalmi adatokból tudjuk, hogy a glutamát rendszer fontos szerepet tölt be a betegség kialakulásában. Azonban a glutamát idegrendszerben való széleskörű elterjedése miatt nehézségekbe ütközünk, ha egyszerre próbáljuk az egész glutamát rendszert befolyásolni, hiszen nem tudjuk kontrollálni, mely agyterületeket, illetve idegi hálózatokat manipuláljuk.

A munkánk célja szűkíteni valamiképpen ezt a kört - csökkentve a mellékhatásokat -, ezáltal specifikusabban megvizsgálni a glutamát rendszer szerepét PTSD-ben. Így először egy specifikus glutamát receptort (CP-AMPA), majd egy glutamát transzportert (VGluT3) vizsgáltunk. Utóbbit először egy olyan egértörzsön, melynek az egész idegrendszeréből hiányzik ez a transzporter, majd pedig egy olyan agyterületet - medális raphe -, melyben a glutamát ezen transzporter segítségével nagy számban van jelen sok esetben kolokalizáltan a szerotoninnal.

Egyes vizsgálataink célja a következő kérdések megválaszolása volt:

- 1. A félelmi kondicionálás rövid és hosszútávú hatásainak vizsgálata patkányokban és egerekben**
 - a. PTSD emberekre megfeleltethető tüneteinek jellemzése rágcsálókban
 - b. A félelmi kondicionálás hatásainak HHM tengelyre gyakorolt hatása (stressz hormon szintek elemzésével)
 - c. A félelmi memória kialakításában részt vevő agyterületek vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel

2. Glutamát rendszer szerepének vizsgálata

- a. Az CP-AMPA receptor szerepe a félelmi kondicionálásban
 - i. AMPA receptor altípusok mRNS arányának változása a félelmi kondicionálás során rt-PCR-al
 - ii. CP-AMPA receptor farmakológiai vizsgálata, mint a PTSD lehetséges terápiás célpontja
- b. Specifikus VGluT hiányos egértörzs (VGluT3 KO) jellemzése
 - i. Általános tulajdonságok
 - ii. Szorongás és stresszreaktivitás fiatal állatokban
 - iii. VGluT3 hiány hatása a félelmi kondicionálásra
 - iv. VGluT3 hiány hatása a HHM tengelyre

3. Az erőteljes VGluT3 jelenléttel rendelkező MR régió vizsgálata optogenetikával

- a. MR régió serkentésének és gátlásának magatartásbeli hatásai
- b. MR régió modulációja következtében aktiválódó félelmi kondicionálás szempontjából releváns agyterületek vizsgálata c-Fos immunhisztokémiával

IV. Módszerek

1. Állatok

A vizsgálatban résztvevő állatok Wistar patkányok (körülbelül 10 hetesek; testsúlyuk 300g körül volt a kísérlet kezdetén) és C57BL/6J vagy C57BL/6N egerek (fiatal állatok 7-8, felnőtt állatok 14-18 hetesek voltak, testsúlyuk 25g körül volt a kísérlet kezdetén) (Charles River Laboratories, Budapest, Magyarország) voltak. A genetikailag módosított egerek (C57BL/6J háttérű, és csak homozigóta egereket használtunk (VGluT3^{+/+} vad típusú (*wild type* (WT)) és VGluT3^{-/-} génkiütött (*knockout* (KO))), szaporítása az MTA Kísérleti Orvostudományi Intézetben tenyésztett törzsből heterozigóta tenyészpárokkal történik. (Szonyi és mtsai 2016). A genotipizálásuk qPCR módszerrel történt 2-3 napos korokban farkból vett mintával. A vizsgálatban részt vett állatok számát “Kísérleti elrendezés” bekezdésben tüntettem fel.

Az állatházban és a kísérleti szobákban egységesen a hőmérséklet 22 ± 2 °C és a páratartalom $60 \pm 10\%$ közötti volt. Vízzel és a rágcsáló táplálék (JRS, Rehofix, Németország) *ad libitum* hozzáférhető volt az összes kísérletben. Az állatokat 12 órás fény-sötét ciklusban tartottuk, a kísérletnek megfelelően normál (világos: 7.00-19.00), illetve fordított (világos: 21.00-9.00) ciklusban. Az állatokat egyesével helyeztük el az állattartó dobozokban (patkányok esetén: Tecniplast 1291H Eurostandard Típus 425x266x185 mm; egerek esetén: Tecniplast 1284L Eurostandard Típus 365x207x140) és testsúlyukat hetente ellenőriztük.

A kísérletek az Európai Közösség Tudományos Bizottságának /Európai Unió előírásai szerint (2010/63/EU) és az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Állatjóléti Bizottságának jóváhagyásával zajlottak.

2. Magatartás tesztek

A magatartás teszteket egy külön erre a célra kijelölt kísérleti szobában végeztük, ahol az állattartó szobára jellemző feltételek voltak adottak. Az egyes tesztekben az állatok között a kísérleti apparátust szappanos vízzel, majd csapvízzel átmostuk és szárazra töröltük. A teszteket videókamerával rögzítettük, majd utólag egy

eseményrekorder szoftver segítségével elemeztük (H77; Haller József, MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Budapest). Egyes esetekben (nyílt tér teszt, kényszerített úszás teszt, illetve reprezentatív ábrák készítésénél) automata elemző szoftvert használtunk (Noldus EthoVision 10.1, Noldus Information Technology, Wageningen, Hollandia). A magatartásbeli változókat az összes idő alatt az adott viselkedéssel töltött idő százalékában fejeztük ki vagy az adott viselkedési válasz előfordulásának gyakoriságát adtuk meg.

2.1. Félelmi memória és tanulás vizsgálata félelmi kondicionálás során (*conditioned fear test, CFT*)

A félelmi kondicionálás háttéréről a bevezetőben részletesen kitértem. A vizsgálat két részből áll. Először is valamilyen traumatikus eseménnyel kell szembenéznie az állatnak, melyet kísérletünkben az elektromos lábsokk váltott ki. A tesztek minden esetben 5 percig tartottak egy fém rácsos aljzatú műanyag dobozban (30 x 30 x 30 cm) és az állatok félpercenként kaptak egy 1 másodperc hosszú sokksorozatot (0,01 másodperces sokkot 0,02 másodperces szünet követett), így mindegyik állat 10 db elektromos impulzusnak volt kitéve a teszt első napján (10. ábra). A patkányok 3 mA, az egerek 0,8 mA erősségű lábsokkot kaptak. A kontroll állatokat csak a sokkoló dobozba helyeztük 5 percre (Haller és mtsai 2014).



10. ábra: Félelmi kondicionáló doboz.

A teszt második részében, már nem alkalmaztunk elektromos lábsokkot, csak időről időre

visszahelyeztük az állatokat ugyanabba a környezetbe 5 percre (kontextus függő félelmi kondicionálás). Vizsgáltuk a rövidtávú hatásokat egy nap múlva, illetve a hosszabb távúakat, egerek esetén egy hét vagy patkányoknál 28 nap múlva.

Megfigyelt magatartásbeli változók: *(le)dermedés* („freezing”), teljes mozdulatlanságot jelent, a légzéshez szükséges mozgást leszámítva; *exploráció*, a környezet felderítését célozza, mely során az állat érdeklődve szagolhatja a környezetét, jelen esetben a teszt doboz falát és rácsos aljzatot és a levegőt; *önápolás* („grooming”), tisztálkodó mozdulatokat végez a mellső lábával vagy vakaródzás; *pihenés* („resting”) nem változtatja a helyét, kis pozícióbeli változtatások lehetségesek; *menekülő ugrások*

(„escape jump”): gyors ugrások a fal mellett, kiütkeresés a helyzetből. Az optogenetikai vizsgálat során tovább finomítottuk az elemzést, meghatároztunk egy *ambuláció* paramétert, mely lényegében az állat lokomóciója, viszont elkülönül az explorációtól. Ehhez a teszt doboz alját virtuálisan felosztottuk 10x10 cm-es négyzetekre (az állat számára nem volt látható), és a vonalátlépés (állat mind a négy lábával átlépte) mennyiségéből határoztuk meg a megtett utat; megrohanás (run): ez a magatartásforma a sokk vagy az optogenetikai stimulálás alatt figyelhető meg, amikor látszólag különösebb cél nélkül az állat megiramodik a teszt dobozban és legalább egy doboz hossznyi utat megtesz.

Az optogenetikai vizsgálat során az 5 perces tesztet további 10 („*ON response*”) és 20 másodpercekre („*OFF response*”) bontottuk az optogenetikai stimulálásnak (50Hz theta burst, stimulálási protokollt lásd „Lézeres stimuláció vagy gátlás alkalmazásának módja” részben) megfelelően, melyet alkalmaztunk a kontrollok, 20 Hz-es optogenetikailag stimulált és elektromos sokkot kapott állatok viselkedésére is.

Az „*ON-OFF response*” viselkedésbeli változót a következőképpen számoltuk ki:

$$\text{ON response} = \sum (S_i - NS_{i-1}) / nS$$

$$\text{OFF response} = \sum (NS_i - S_{i-1}) / nI$$

ahol 'S' az optogenetikai stimuláció vagy sokk alatt (1 másodperc sokk és azt követő 9 másodperc) az exploráció időszázaléka vagy a vonalátlépés száma; 'NS', nincs stimuláció, az előbbi változók értékei az optogenetikai stimuláció vagy sokk periódusok közti időben; 'i' a sorszáma az adott szakasznak; 'nS' vagy 'nNS' az összes stimulációs illetve közti periódus összege. Tehát „*ON response*”, a stimulálás előtt és stimulálás alatt viselkedésbeli változók különbsége, az „*OFF response*”, pedig ennek az ellentéte.

2.2. Fiatal egerek vizsgálata

2.2.1. Bakteriális fertőzés modellezése

Az LPS injekció hatására - mely a természetesen is előforduló bakteriális fertőzést modellezi - olyan tünetek figyelhetők meg, melyek akár érzelmi zavarokban is előtérbe kerülhetnek (anhedónia, kognitív diszfunkció, szorongás, fáradtság, stb.) (Al-Amin és mtsai 2016). Másik relevanciája az alkalmazásának, hogy egyes kutatások azt mutatják, hogy korai fertőzések kockázati tényezői lehetnek a felnőttkorban kialakuló neuropszichiátriai zavaroknak, érzékenyebbé téve az alanyt (Reus és mtsai 2017).

Az egereknek posztnatálisan, 14-15 naposan lipopoliszacharid (LPS) injekciót adtunk, bakteriális fertőzést modellezve (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo. USA; O55:B5; 100 µg/ml/kg, fiziológiás sóoldatban oldva), a kontroll állatok fiziológiás sóoldatot kaptak intraperitoneálisan (*i.p.*). Egy órával később a begyűjtött vérből hormonszinteket (ACTH, kortikoszteron) mértünk, és egy kis darabot az állat farkából genotipizálásra küldtünk. Az állatok véletlenszerűen lettek beosztva a különböző csoportokba, a genotípus meghatározása a kísérletek után zajlott.

2.2.2. Ultrahangos vokalizáció (ultrasonic vocalization, USV)

Az anyai szeparáció hatására a fiatal állatok ultrahangot bocsátanak ki (Noirot 1972, Takahashi és mtsai 2009), mennyiségének jellemzéséből az állat szorongó fenotípusára következtethetünk. Preklinikai vizsgálatokban validált, gyakran alkalmazott módszer a szorongásoldó gyógyszerek jellemzésére (Gardner 1985, Miczek és mtsai 2008).

A fiatal állatokat az anyjuktól elválasztva egy hangszigetelt szobába vittük és egy 600 ml üveg főzőpohárba helyeztük alom nélkül 10 percre (Varga és mtsai 2015). Az ultrahangokat egy speciális detektor (CIEL detector cdb 205, Koenigslutter, Németország) - melynek mikrofonja 12 cm-rel az üveg teteje felett volt – segítségével számítógépen rögzítettük. Az adatokat Audacity 2.0.5. nevű ingyenesen használható szoftver segítségével rögzítettük. A detekciós spektrumot 30-50kHz közé állítottuk, majd USV Counter (Zsebők Sándor által fejlesztett) nevű szoftverrel elemeztük. A kibocsátott ultrahangok számát, frekvenciáját (összes hang / 10 perc) és a hangok hosszát vizsgáltuk.

2.3. Felnőtt egerek vizsgálata

2.3.1. Motoros koordináció vizsgálata (forgó rúd (rotarod))

Ezt a tesztet leggyakrabban valamilyen drog hatásának jellemzésére, agyi sérülés következményeinek vizsgálatára használják. Jól alkalmazható valamilyen genetikai módosítás következményeinek jellemzésére, melyben az egyensúlyt és motoros koordinációt vizsgálják. (Minasyan és mtsai 2009).

Kísérletünkben az egereket egy 6 darab 3 cm átmérőjű forgó rudat tartalmazó szerkezetre helyeztük (IITC Life Science, Woodland Hills, CA, USA), de mi egyszerre csak egy egeret teszteltünk. A rúd forgása 5 rpm-ről 25 rpm-re gyorsult egyenletesen, 1 perc alatt. Mértük, hogy az állat mennyi ideig képes a rúdon maradni, vagyis a leesés latenciáját (egy menet maximum 1 percig tartott). A tesztet háromszor ismételtük meg 30 perc különbséggel és a három mérés átlagát vettük. Az egyes állatokat mindig ugyanarra a forgó rúdra helyeztük, ahol előzőleg is voltak (Horvath és mtsai 2014). Minél előbb leestek a rúdról, annál valószínűbb, hogy valamilyen mozgáskoordinációs problémája van az állatnak.

2.3.2. Fájdalomküszöb vizsgálata (hot plate és flinch-jump teszt)

A vizsgálatunkban arra voltunk kíváncsiak, hogy az optogenetikai stimulálás vagy VGluT3 transzporter hiány volt-e hatással az állatok fájdalomküszöbére. Az irodalomban háromféle fájdalom érzékelést különítenek el, nociceptív, neuropátiás, centrális szenzitizációs fájdalom (Chen és mtsai 2016), de a nociceptív fájdalmat különféle ingerek (hő vagy termális, elektrosokk, stb.) is kiválthatják.

A termális fájdalomküszöböt egy elektromosan melegíthető padon teszteltük. A teszt napján az állatokat először hozzászoktattuk a szerkezethez, amely egy melegíthető fém lapból és hozzá tartozó műanyag keretből állt (IITC Life Science, Woodland Hills, CA, USA). A habituáció 10 percig tartott mialatt a fémlap állandó 35 °C fokos volt. A teszt során a fémlap 6°C/perc sebességgel folyamatosan melegedett, addig a pontig, amíg az állat látható jelét nem adta a fájdalom érzékelésének, amely gyakori lábemelgetést, annak nyalogatását, ritka esetben ugrálást jelentett (Horvath és mtsai 2014). Ezután azonnal elkezdtük a fémlap lehűtését, egészen a kezdő hőmérsékletig. A tesztet háromszor megismételtük egy perces szünetekkel. A hőérzékelés

fájdalomküszöbét - ahol a lábemelő magatartást (PWT: „*paw withdrawal threshold*”) megfigyeltük - a három alkalom átlagában, Celsius-ban fejeztük ki.

Az áramütés fájdalomküszöbének vizsgálatát 3 perces habituációt követően kezdtük. A teszt doboz és az áramütés időbelisége megegyezett a kondicionált félelem tesztben alkalmazottakkal, azzal a különbséggel, hogy a lábsokk erősségét 30 másodpercenként emeltük 0,05mA-al és a maximum erősséget 1,2 mA-ben határoztuk meg, hogy elkerüljük a sérülést. Elsőként az érzékelési küszöböt („*flinch*”) határoztuk meg, mely a legalacsonyabb áram intenzitást jelenti, és amely már megfigyelhető magatartási választ vált ki. A másik feljegyzett paraméter, pedig az ugrás („*jump*”), amikor az állat egyszerre legalább három lábbal nem érinti a rácsos aljzatot (ezek közül kettőnek a mellső lábának kell lennie). Az eredményeket az áramerősség mértékegységében, mA-ben fejeztük ki.

2.3.3. Megküzdési stratégia vizsgálata (kényszerített úszás (*forced swim(FST)*) teszt)

A vizsgálatunk során a kényszeres úszás tesztet a megküzdési stratégia vizsgálatára használtuk, Porsolt tesztje alapján (Porsolt és mtsai 1977). Az egereket egy henger alakú üvegtartályba (40 cm magas és 10 cm átmérőjű) helyeztük, amit $24 \pm 1^\circ\text{C}$ hőmérsékletű csapvízzel töltöttünk fel (Aliczki és mtsai 2013). Vizsgáltuk a lebegés („*floating*”), mint a passzív megküzdési stratégia előfordulását, mely során az állat csak a legszükségesebb mozdulatokat végzi annak érdekében, hogy a fejét a víz felszíne felett tartsa

2.3.4. Hallás vizsgálata (*startle* válasz)

Az irodalmi adatok alapján, a VGluT3 egértörzs süket, mert bennük a hangra kiváltott összerezenési (*startle*) reflex nem működik (Amilhon és mtsai 2010). Annak bizonyítására, hogy saját kolóniánk hasonlít az irodalomban alkalmazott törzsrre, megismételtük ezt a vizsgálatot. Az egerek hallását mi is erős hangot követő összerezenés esetén bekövetkező tömegváltozással mértük. Az állatokat egy hangszigetelt dobozban lévő súlymérő érzékelőre helyeztük kis műanyag dobozban (Animal Acoustic Startle System; Coulbourn Instruments, Holliston, USA). 5 perces

habituáció után kezdtük a tesztet, mely 5 darab 40 ms hosszú 120dB erősségű hangból állt, melyek 20 másodpercenként követték egymást. A program a 0dB intenzitás alatt mért tömegváltozással összehasonlítva számította ki az összerezzenési választ. Abban az esetben, ha nem mért tömegváltozást, összerezzenést, illetve az esetlegesen mért tömegváltozás nem különbözött a 0dB alatt érzékelttől, feltételezhetjük, hogy az állat nem hallotta a lejátszott hangot.

2.3.5. Megemelt keresztpalló teszt (elevated plus maze, EPM)

Az egyik legelterjedtebben alkalmazott teszt szorongás vizsgálatára. Alapja, hogy a rágcsálók ismeretlen környezetbe kerülve, igyekeznek megismerni az új környezetet, azonban nem kedvelik a nyílt tereket (Pellow és mtsai 1985). A környezet megismerésének motivációja és a nyílt terektől való félelem verseng egymással. Ha szorongásoldó szert adunk az állatnak viselkedése megváltozik, több időt fog tölteni a nyílt területen (Bourin 2015).

A megemelt keresztpalló teszt során az állatokat egy fekete, fém, két egymást keresztező karral rendelkező apparátusra helyeztük, melynek két szemben lévő karját fal vette körül (70 cm magas, karok 50 cm hosszú és 10 cm szélesek, centruma 10x10 cm és a zárt kar magassága 40cm). A vizsgált állatokat a megemelt keresztpalló centrumába helyeztük, úgy hogy a nyílt kar felé nézzenek, és a teszt 5 percig tartott. Mértük, hogy az állat az idő hány százalékát töltötte a nyílt karban, illetve a nyílt kari belépések (három lábának az új térrészben kellett lennie) számát, melyet az összes (zárt+nyílt) karba való belépés számával osztottunk (mozgékonyaságtól független szorongás paraméter). Figyeltük a zárt kari belépési frekvenciát is, mely jellemzi az állat általános mozgékonyaságát.

2.3.5. Nyílt tér teszt (open field, OF)

A nyílt tér tesztet alapvetően az állatok mozgékonyaságának vizsgálatára fejlesztették ki, azonban jól használható szorongás vizsgálatára is, melyben szintén az új környezet felfedezésnek motivációja és a nyílt tértől (porond közepe, centrum) való félelem verseng egymással (HallBallachey 1932, PrutBelzung 2003).

Az állatokat egyenként egy fehér műanyag arénába (40 cm x 36 cm x 19 cm) helyeztük 5 percre. Két részre osztottuk az arénát egy perifériára és egy centrumra, mely utóbbi az egész terület 60%-át fedte le. Az állatok által megtett utat (cm), sebességüket (cm/s), és a centrumba való belépés frekvenciáját mértük. Az utóbbi az állatok szorongásának mértékét adja meg.

3. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Immunhisztokémiai módszer segítségével becsültük meg az aktiválódott idegsejtek számát a c-Fos jelenléte alapján. A c-Fos a korai aktiválódású gének (*IEM: immediate early gene*) családjába tartozik, átíródásuk az idegsejt stimulációja után gyorsan indukálódik (Minatohara és mtsai 2015). A magatartás tesztek kezdete után 90 perccel az állatokat elaltattuk (ketamin-xylazin koktéllal), majd ezt követő transzkardiális perfúzióval fixáltuk az agyukat. A transzkardiális perfúziót először 3 perces fosztfát pufferes (phosphate-saline buffer (PBS)) mosással, azt követően, pedig 20 perces PBS-ben oldott 4% paraformaldehid (PFA) oldattal végeztük. Az agyukat 24 óráig posztfixáltuk +4°C-on majd újabb 24 óráig 20 %-os glükózt tartalmazó PBS-ben áztattuk +4°C-on. Ezután fagyasztottuk és -80°C-on tároltuk feldolgozásig. A fagyasztott mintát 30 µm vastag szeletekre vágtuk szánkamikrotóm segítségével. A metszeteket 0,5% Triton X-100-at (Calbiochem) és 0,5% H₂O₂-ot (Sigma-Aldrich) tartalmazó PBS-ben inkubáltuk 30 percig. Ezután a nem specifikus antigéneket 2% bovine serum albumint (BSA; Sigma–Aldrich) tartalmazó PBS-ben blokkoltuk szintén 30 percig szobahőmérsékleten. A PBS-ben oldott elsődleges c-Fos antitesttel (nyúl anti-c-Fos, 1:5000, Santa Cruz Biotechnology) 72 óráig +4 °C-on inkubáltuk a mintákat. Újabb PBS mosás után 1 óráig inkubáltuk a mintákat biotinált anti-nyúl IgG másodlagos antitestet (1:500, Jackson ImmunoResearch) tartalmazó oldatban, és még 1 órát avidin–biotin komplexet (1:1000, ABC Vectastain Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) tartalmazó 0,05 M Tris-ben (TBS, pH=7.6) szobahőmérsékleten. Ezt követő többszöri PBS mosás után Ni-DAB-al (nikkel 3,3'-diaminobenzidin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)) tettük láthatóvá az immunjelölt sejteket (30 percet áztattuk 0,2 mg/ml DAB-ot, 0,1% nikkel-ammonium-szulfátot és

0,003% H₂O₂-ot tartalmazó PBS-ben). Az enzimatis reakciót PBS mosással állítottuk le. A mintákat DePeX-el (Sigma–Aldrich) fedtük.

Az aktiválódott sejteket Olympus BX51 fénymikroszkóppal 20x nagyítással fényképeztük és az immunpozitív sejtek számát Scion Image program (version: 4.0.2; freeware software) segítségével elemeztük a szürkeség küszöbértékének figyelembevételével (Tulogdi és mtsai 2012). A 20 pixelnél kisebb struktúrákat kizártuk az elemzésből és az egymástól 150 µm-re lévő 4 metszet mindkét oldalán végeztünk méréseket, azaz állatonként 8 adatot átlagoltunk minden agyterület esetén. A c-Fos aktivitás változást a kontrollokhoz mérve ábrázoltuk, mely során a kontrollok értékét 100 %-nak tekintettük.

4. Génexpresszió vizsgálata (rtPCR)

A vizsgálni kívánt agyterületeket RNáz mentes környezetben szárazjégen gyűjtöttük. A feldolgozás során először a szövet darabokat 500 µL Quiazol Lysis Reagent (Qiagen, Valencia, CA, USA) segítségével homogenizáltuk, majd az RNS-t izoláltuk a mintákból QIAGEN RNeasy MiniKit (Qiagen, Valencia, CA, USA) használatával a gyártó által javasolt protokoll szerint. A minta minőségét és teljes RNS mennyiségét NanoDrop (Thermo Scientific) spektrofotométerrel állapítottuk meg. A cDNS gyártását nagy kapacitású cDNS reverz transzkriptázt tartalmazó oldattal végeztük (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Az mRNS mennyiségét rt-PCR (ABI StepOnePlus instrument (Applied Biosystems)) segítségével határoztuk meg a megfelelő primerek és Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) felhasználásával. A génexpresszió analízisét ABI StepOne 2.3 program (Applied Biosystems) segítségével végeztük (Pinter-Kubler és mtsai 2013). A kapott adatokat normalizáltuk az adott állatban és agyterületre jellemző „house keeping” génekkel (hipofízisben: riboszomális fehérje S18 (RPS18) (Kriszt és mtsai 2015); hipotalamuszban: glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) (Demeter és mtsai 2016)), és az eredményeket a $2^{-\Delta\Delta CT}$ módszer alkalmazásával a kontroll csoporthoz viszonyítva adtuk meg. A változást a kontrollokhoz mérve ábrázoltuk, mely során a kontrollok értékét 100 %-nak tekintettük.

A primerek patkányok esetén (az Applied Biosystem-től beszerezve):

glutamát AMPA receptorának alegységei: GluA1 (Gria1, Rn00709588_m1), GluA2 (Gria2, Rn00568514_m1) GAPDH (Rn01775763_g1)

A primerek egerek esetén (saját tervezés):

GAPDH (*forward*: ACAGCCGCATCTTCTTGTGC,
reverse:GCCTCACCCCATTTGATGTT);

CRH (*forward*:CGCAGCCCTTGAATTTCTTG,
reverse:CCAGGCGGAGGAAGTATTCTT);

AVP (*forward*:CTGCTGCAGCGACGAGAG,
reverse:CTGTACCAGCCTTAGCAGCA);

RPS18 (*forward*:TCCAGCACATTTTGCGAGTA,
reverse:TTGGTGAGGTCGATGTCTGC);

POMC (*forward*:TGCTTCAGACCTCCATAGATGTGT,
reverse:GGATGCAAGCCAGCAGGTT);

CRH-R1 (*forward*:TGGGGAGAAGGCGACCAGAC,
reverse:CCAGGATCGCTCCGACATC);

V1b (*forward*:CTCTGCCGGGCTGTCAAATA,
reverse:ATGGCCAGCAGCATGTAAGT).

5. Hormonkoncentrációk mérése vérmintákból

A mintavétel után a vérmintákat +4°C-on lecentrifugáltuk (2500rpm, 25 perc), majd a különvált szérumot -20°C-on tároltuk radioimmunoassay-vel (RIA) történt feldolgozásig. A méréshez az intézetünk által kifejlesztett specifikus antitesteket (nyúlban termeltetett, ACTH mérés esetén h-ACTH₁₋₃₉ (no. 8514) (Zelena és mtsai 1999)), kortikoszteron mérésnél kortikoszteron-3-karboximetiloxim-bovin szérum albumin ellen (Zelena és mtsai 2003) használtunk. ACTH mérés esetén a hormonkoncentrációt 50 µl szérumból határoztuk meg. Az antitest nagy specifitást mutat. A keresztreakció aránya α-MSH-val 0,2 %, ezenkívül nem mérhető szignifikáns keresztreakció γ-MSH, CLIP, ACTH₁₁₋₂₄, ACTH₂₅₋₃₉, ACTH₁₋₁₄, and ACTH₁₋₁₉ peptidekkel. Egy futtatáson belül a szórás 4,7 % volt.

Kortikoszteron koncentrációját 10 µl szérumból határoztuk meg. Nyomjelző anyagként (tracer) ¹²⁵I-jelölt karboximetiloxim-tirozin-metil észtert használtunk és a transzkortinnal (CBG) való reakciót alacsony pH alkalmazásával zártuk ki. A mérés érzékenysége 1 pmol, és a mérésen belüli szórás 7,5 % volt. Az egy kísérlethez tartozó mintákat mindig egyszerre mértük, hogy a mérések közötti (inter-assay) szórást kiküszöböljük. A hormonkoncentrációk változását a kontrollokhoz mérve ábrázoltuk, mely során a kontrollok értékét 100 %-nak tekintettük.

6. Farmakológiai kezelés

A félelmi kondicionálás után 1 illetve 28 nappal a dobozba visszahelyezés előtt 1 órával a patkányok CP-AMPA antagonistát (IEM-1460; Tocris Bioscience) kaptak intraperitoneálisan. Az antagonistát különböző dózisokban (1mg/kg vagy 3mg/kg IEM-1460 drogot 2ml/kg fiziológiás sóoldatban oldva) adtuk, illetve kontrollként egy másik csoport állat fiziológiás sóoldatot (0,9% NaCl) kapott. A dózisokat az irodalom alapján választottuk (Gmiro és mtsai 2008, Kobylecki és mtsai 2010).

7. Optogenetikai vizsgálat

A vizsgálat során először az MR régió területére vírust injektáltunk. Két hét eltelte után megtörtént az optikai szál beültetése, és az állatok átkerültek egy vírus injektált állatok tartására szolgáló helyiségbe. Az operációk során az állatokat ketamin-xylazin koktéllal (i.p. 25mg/kg xylazine-t és 125mg/kg ketamine-t oldottunk fel 0.9% fiziológiás sóoldatban) altattuk el. Egy hét felépülési idő után kezdődtek a magatartás tesztek a fentiekben leírt protokollok alapján. A magatartás tesztek után az állatok agyát transzkardiális perfúzióval fixáltuk és immunhisztokémiai vizsgálattal elemeztük a vírus és a beültetett optikai szál helyét.

7.1. Vírus injektálása

40 μ L channelrodopsint (ChR2, channelrhodopsin; AAV2.5.hSyn. hChR2 (H134R) eYFP.WPRE.hGH; 1.3e13 GC/ml; Addgene26973) vagy halorodopsint (NpHR (AAV9.hSyn.eNpHR3.0-eYFP.WPRE.hGH; 2.04e13 GC/ml; Addgene26972) tartalmazó adeno-asszociált vírust (AAV; Penn Vector Core, PA, USA) injektáltunk a MR területére üvegapillárison át egy pumpa segítségével (MicroSyringe Pump Controller (World Precision Instruments)) a következő koordinátákra: AP: -4.10 mm Bregma-tól; laterálisan: 0.0 mm a középvonaltól; DV: -4.60 mm a koponyafelszíntől.

7.2. Optikai szál beültetése

A beültetett optikai szál tartalmozó csatlakozót a laborban készítettük el, egy multimodális optikai szálból (250 μ m átmérőjű és 105 μ m magátmérőjű, AFS 105/125Y, NA: 0,22, low-OH, Thorlabs Corp.) és egy fém csatlakozóból (LMFL-172-FL-C35-OSK, Senko). Optikai szál tartó fém csatlakozót akril ragasztó és két csavar (Duracryl Plus; SpofaDental, Czech Republic) segítségével rögzítettük a koponyafelszínhez (11. ábra). Az optikai szál megfelelő helyre való beültetéséhez a sztereotaxis karját 10°-ban megdőntöttük, hogy elkerüljük a sinus megsértését, így a koordináták a következők voltak: AP: -4.80 mm

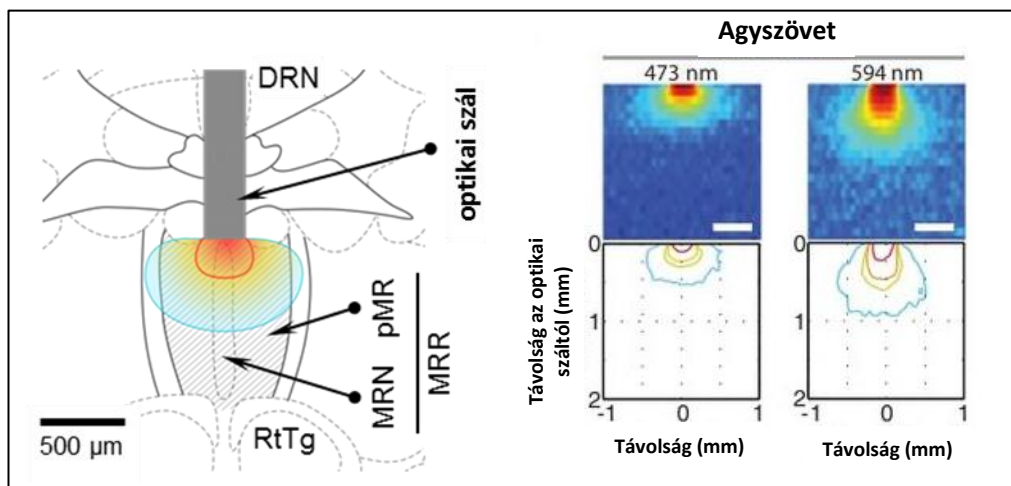


11. ábra: Beültetett optikai szál és elhelyezkedése az állat fején.

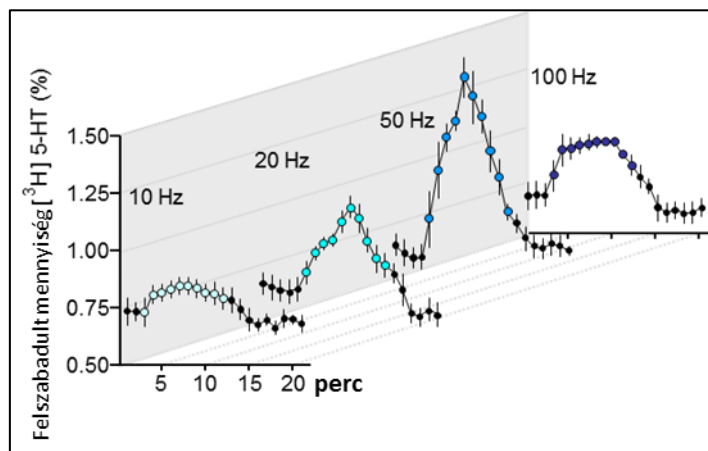
Bregma-tól; laterálisan: 0.0 mm a középvonaltól; DV: -4.10 mm a koponyafelszíntől, illetve így a stimuláció az egész MR régiót érintette.

7.3. Lézeres stimuláció vagy gátlás alkalmazásának módja

A ChR2-t tartalmazó vírussal injektált egerek esetén kék fényű (473 nm), NpHR csatornát tartalmazó állatok esetén sárga fényű (594 nm) lézert (Ikecool Corp. Anaheim, CA, USA) alkalmaztunk (12. ábra). A lézerfény fókuszálása után egy optikai kábellel (105 μm magátmérőjű FT900SM és FT030-BLUE kábellel, Thorlabs Corp.) teremtettünk kapcsolatot a lézer és az egér fején lévő csatlakozó közt. A nettó energiát folyamatos fényáram mellett mértük és állítottuk be 10-20 mW közötti értékre egy teljesítménymérő segítségével (Coherent, LaserCheck, Santa Clara, CA, USA) minden kísérlet előtt.

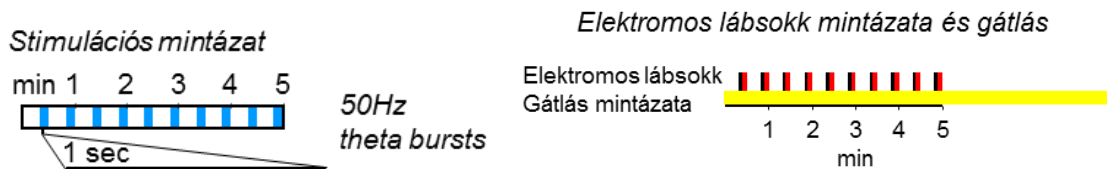


12. ábra: Az általunk optogenetikai technikával megvilágított terület és a fény terjedése az agyban.
 DRN: dorzális raphe mag; MRN: mediális raphe mag; pMR: paramediális raphe mag; MRR: mediális raphe régió; RtTg: retikulotegmentális mag; forrás:(Yizhar és mtsai 2011).



13. ábra: Szerotonin felszabadulás *in vitro* mérése ChR2-vel injektált MR-t tartalmazó szeleten, különböző frekvenciájú stimulálás hatására. (forrás: Gölöncsér és mtsai közlés alatt álló cikkéből)

A stimulációs mintázat kiválasztásához egyrészt az irodalomban talált adatok (Kocsis és mtsai 2006), illetve Intézetünk másik munkacsoportjában végzett *in vitro* kísérletek voltak segítségünkre (13. ábra). Az *in vitro* kísérletben a ChR2-t tartalmazó MR régióból származó agyszelet stimulációja után felszabaduló, radioaktívan jelzett szerotonint mérték. A legnagyobb mennyiségben 50 Hz-es stimuláció esetén szabadult fel szerotonin, majd szinte minden esetben 5-7 perc után csökkenni kezdett a mennyisége a neuronok szerotonin raktárainak kimerülése miatt. Így kísérleteinkben is 50 és 20 Hz stimulációkat alkalmaztunk, és maximum 5 percig stimuláltunk. Az optogenetikai gátlás során a már ismertetett elektromos lábsokk alatt és utána még 30 percig folyamatos fénnel gátoltuk a vírus injektált neuronokat (14. ábra) (FreyFrey 2008, Montarolo és mtsai 1986, Raimondo és mtsai 2012).



14. ábra: Az MR régió optogenetikai modulációja során alkalmazott 50 Hz és az elektromos lábsokkolás alatti folyamatos gátlás ritmusának vázlatos rajza.

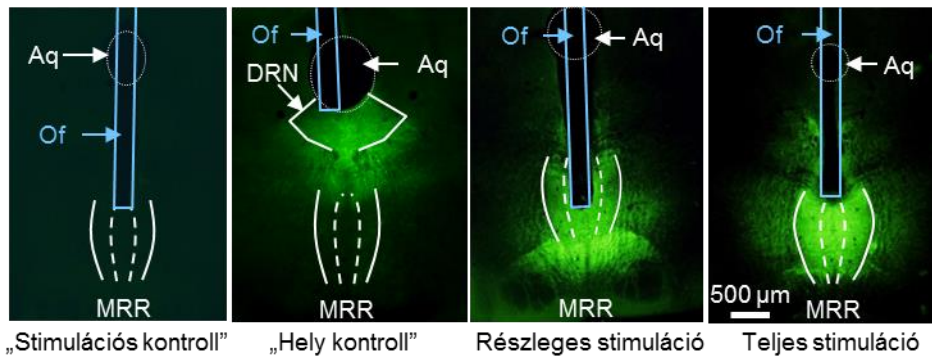
7.4. Anatómiai analízis

A perfúzió után az optikai szálakat óvatosan eltávolítottuk és 24 óráig posztfixáltuk +4°C-on, majd újabb 24 óráig 20 %-os glükózt tartalmazó PBS-ben áztattuk +4°C-on. A vírus helyének pontos meghatározása céljából a vírussal már bejuttatott fluoreszcens jelet tovább erősítettük, illetve az 5-HT neuronokat is megfestettük. Az 50 µm-es koronális metszeteket (Vibratome VT1200S, Leica, Wetzlar, Germany) elsődleges antitestet (nyúl anti-serotonin, 1:10000, ImmunoStar, Hudson, WI, USA; CatNo: 20080; csirke anti-GFP, 1:2000, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA; CatNo: A10262) tartalmazó TBS oldatban inkubáltuk 2 napig. Mosás után inkubáltuk a szeleteket másodlagos antitestet (Cy3-konjugált szamar-anti-nyúl, 1:500, Jackson ImmunoResearch West Grove, PA, USA; CodeNo:711-165-152; Alexa488-konjugált kecske-anti-csirke, 1:1000, Life Technologies, CatNo: A-11039) tartalmazó TBS oldatban egy éjszakán át. Újabb TBS mosások után a metszeteket lefedtük és Zeiss Axioplan mikroszkóp segítségével értékeltük. Az optikai szál által megvilágított terület nagyságát Yizhar és mtsai által meghatározott paraméterek alapján határoztuk meg (12. ábra). Kizártuk azokat az állatokat, amelyek gyenge vírus jelölést mutattak vagy az optikai szál nem a megfelelő helyen volt.

A következő csoportokat különítettük el a magatartás vizsgálatokhoz (15. ábra)

- „Stimulációs kontroll”: ha a vírus és optikai szál elhelyezkedése megfelelő volt, azonban nem alkalmaztunk lézeres stimulációt, illetve ha az optikai szál az imént említett helyen volt, azonban nem volt vírus jelenlét az MR régióban
- „Hely kontroll”: ha a vírus expresszió látható volt az MR régióban, azonban az optikai szál vége az MR régió kívül volt, és a megvilágítás nem érthette el a ChR2-t kifejező neuronokat
- MR régió részleges stimulációja („partial”): a vírus expresszió az egész MR régióra kiterjedt, azonban az optikai szál vége dorzo-ventrálisan az MR régió egy-harmadánál volt
- MR régió teljes stimulációja („central”): ha az optikai szál vége az MR régió felett, dorzo-mediális részen helyezkedett el, és az egész régióban vírus expresszió volt megfigyelhető

- Sokk kontroll: NpHR vírus expresszió jelenléte, de sem elektromos lábsokkot, sem optogenetikai stimulációt nem alkalmaztunk
- Sokk: NpHR vírus expresszió jelenléte, elektromos lábsokkot kaptak, de optogenetikai gátlást nem
- Gátolt: NpHR vírus expresszió jelenléte, elektromos lábsokkot és optogenetikai gátlást is kaptak az állatok



15. ábra: Az optogenetikai stimuláció során vizsgált csoportok az MR régió vírus fertőzöttsége és az optikai szál helyezete alapján.

Külön állatokon - párhuzamos agymetszeteken ellenőrzött műtéti sikeresség esetén - a korábban említett módon c-Fos immunhisztokémiával idegsejtaktivitást is vizsgáltuk:

A c-Fos idegsejtaktivitás vizsgálata során létrehozott csoportok:

- „home cage” kontroll: saját lakódobozában maradt, nyugodt körülmények között
- „no Chr2” kontroll: vírus expresszió nem volt az agyukban, de operálva voltak, illetve kondicionáló dobozba is bekerültek, de sem elektromos sem optogenetikai stimulálást nem kaptak
- „no light” kontroll: volt vírus expresszió az MR régióban, kondicionáló dobozba kerültek, de nem voltak optogenetikailag stimulálva
- 50 Hz stimulált: volt vírus expresszió az MR régióban, kondicionáló dobozba kerültek, és optogenetikailag stimulálva voltak („central” stimulációnak felel meg)

8. Adatok statisztikai elemzése

A különböző vizsgálatok során kapott adatok elemzése STATISTICA 12.0 programmal történt (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Az adatokat egyszempontos (one-way), többszempontos (factorial) és ismételt mérések (repeated measure) varianciaanalízissel (ANOVA) elemeztük. A szignifikáns főhatásokat továbbiakban Newman-Keuls/Duncan post hoc analízissel elemeztük. A korrelációt többszörös (lineáris) regresszióval vizsgáltuk. Az adatokat átlag±standard hiba (standard error of the mean; SEM) formátumban adtuk meg. Szignifikáns hatásnak a $p < 0,05$ értékeket tekintettük.

9. Kísérleti elrendezés

9.1. A félelmi kondicionálás rövid és hosszútávú hatásainak vizsgálata és a glutamát szerepének vizsgálata patkányokon

A magatartásbeli válaszokat vizsgáltuk félelmi kondicionálás hatására. A kontroll (5 percre a sokkoló dobozba került) vagy az elektromos lábsokkot kapott patkányokat egy vagy 28 nappal később 5 percre visszahelyeztük a sokkoló dobozba.

Az első kísérletsorozatban a tesztet követően dekapitáltuk az állatokat ((2 kontroll és egy sokkolt) 3 alkalommal ($n=10db/csoport$)) sokkolás után, és 1 illetve 28 nappal később az 5 perces visszahelyezés után. Vizsgáltuk a tesztdobozban mutatott magatartást, a teszt végén mérhető ACTH és kortikoszteron szinteket, valamint egy másik csoport állatból agyterületeket (vmPFC (PrL és IL területe), BLA, CeA) gyűjtöttünk AMPA receptor alegységek (GluA1 és GluA2) előfordulási arányának rt-PCR-rel történő vizsgálatára ($n=8-7db/csoport$).

Egy következő sorozatban a félelmi kondicionálás után egy vagy 28 nappal a patkányokat ($n=5/csoport$) a teszt dobozba való visszahelyezést követően 90 perccel perfundáltuk, és az idegsejt aktivitást korábban leírt módon c-Fos immunhisztokémiával (PFC (PrL, IL, dorzális pedunkuláris régió (DP)), hippocampusz (CA1, CA2, CA3), amigdala (BLA, MeA, CeA)) vizsgáltuk.

Harmadik sorozatunkban a dobozba való visszahelyezés (1 vagy 28 nappal később) előtt 1 órával a patkányok CP-AMPA antagonistát (IEM-1460, i.p) kaptak. Az antagonistát különböző dózisokban (1mg/kg vagy 3mg/kg) adtuk, illetve a kontrollok fiziológiás sóoldatot (0,9% NaCl) kaptak ($n=14-13db/csoport$).

9.2. A VGluT3 hiányos egerek

A magatartás vizsgálatokat az állatok számos élettani tulajdonsága befolyásolhatja (pl. súlyosabb állatnak nehezebb megtartania magát a mozgáskoordinációt vizsgáló forgó rúd teszten), ezért először a KO törzsünket általánosságban jellemeztük (testsúly, víz és táplálékfogyasztás, forgórúd, fájdalomküszöb, megküzdési stratégia, hallás vizsgálat) ($n=11-9db/csoport$).

A korai fejlődési és környezeti hatások is meghatározóak, és mivel irodalmi adatok a felnőtt állatokat szorongóbbnak mutatták (Amilhon és mtsai 2010) megvizsgáltuk, ez veleszületett tulajdonságuk-e.

A születés után 7-8 nappal hasonlítottuk össze az anyjuktól 10 percre elválasztott fiatal egerek ultrahang kibocsátását ($n=13-10db/csoport$). Majd egy héttel (posztnatálisan, 14-15 napon) később LPS injekciót adtunk, bakteriális fertőzést modellezve. Egy órával később a begyűjtött vérből homonszinteket (ACTH, kortikoszteron) mértünk, és egy kis darabot az állat farkából genotipizálásra küldtünk.

Végül fő célunk a felnőtt állatokban a VGluT3 hiány hatásainak vizsgálata volt félelmi kondicionálásra. Először kontroll, intakt egereken bizonyítottuk az elektromos lábsokk rövid (1 nap) és hosszú (7 nap) távú magatartási ($10-8db/csoport$) és HHM tengelyre ($n=10db/csoport$) gyakorolt hatását (Haller és mtsai 2014). Ezt követően VGluT3 WT és KO egereket sokkoltunk, majd 1 és 7 nappal később 5 percre visszahelyeztük őket a sokkoló dobozba ($n=11-9db/csoport$). A félelmi reakció generalizálódásának megítélésére ugyanezen állatokon EPM (14-15 nappal a sokk után) tesztet is végeztünk. Mivel számos állat – valószínűleg a félelem jeleként – leugrott a vizsgálati eszközről, ezért az eredmények megítélésénél ezt figyelembe kellett venni, őket kizártuk a statisztikából (*leugrott*: $n=7-5db/csoport$). Majd 16-17 nappal a sokk után még egy 5 perces OF tesztet is végeztünk. Annak megerősítésére, hogy a KO állatok csökkent mozgékonyága az újdonságtól való félelmükből fakadt, külön állatokon 15 perces OF tesztet is végeztünk ($n=13-11db/csoport$) és a mozgékonyág időbeli alakulását követtük. A VGluT3 hiány HHM tengelyre gyakorolt hatását az egyes tesztek (sokk, OF) után vett hormonszint változásokból (ACTH, kortikoszteron) próbáltunk következtetni, illetve külön állatokon rt-PCR segítségével a VGluT3 krónikus hiányának HHM-tengely komponenseire (CRH, CRHR1, AVP, V1b, POMC) gyakorolt hatását is megvizsgáltuk ($n=7db/csoport$).

9.3. MR régió vizsgálata optogenetikával

A MR régiót optogenetikai technikával serkentettük és gátoltuk, majd kondicionált félelem tesztben vizsgáltuk ennek magatartásbeli hatásait. A már ismertett kondicionált félelem teszt protokollját alkalmaztuk kisebb módosításokkal.

Az MR stimuláció során nem használtunk elektromos lábsokkot, helyette hasonló ritmusban alkalmazott theta burst-töt (ez 50 Hz-es stimulációt jelentett) vagy 20 Hz-et alkalmaztunk; a gátlás során, pedig a már ismertetett elektromos lábsokk alatt és utána még 30 percig folyamatos fénnel gátoltuk a vírus injektált neuronokat. Az egy nappal későbbi és egy hetes visszahelyezésnél is csatlakoztattuk az optikai szálát az állat fején lévő csatlakozóhoz, hogy a lehető legjobban felidézzük a kontextust. Először az akut sokk, sokk alatti MR régió gátlás ($n=15-7db/csoport$), illetve MR régió stimuláció ($n=14-9db/csoport$) alatt bekövetkező magatartásbeli változásokat követtük, majd 1 és 7 nappal később a félelmi reakciót vizsgáltuk.

Külön csoport állaton az MR régió akut stimulációjának következtében aktiválódott agyterületeket c-Fos immunhisztokémiával elemeztük (PFC (Cg1, PrL, IL), PVN, BNST, hippocampusz (CA1, gyrus dentatus, hilus), amigdala (BLA, MeA, CeA), PAG (dorzomediális (dm), dorzolaterális (dl), laterális (l), ventrolaterális (vl)) ($n=8db/csoport$).

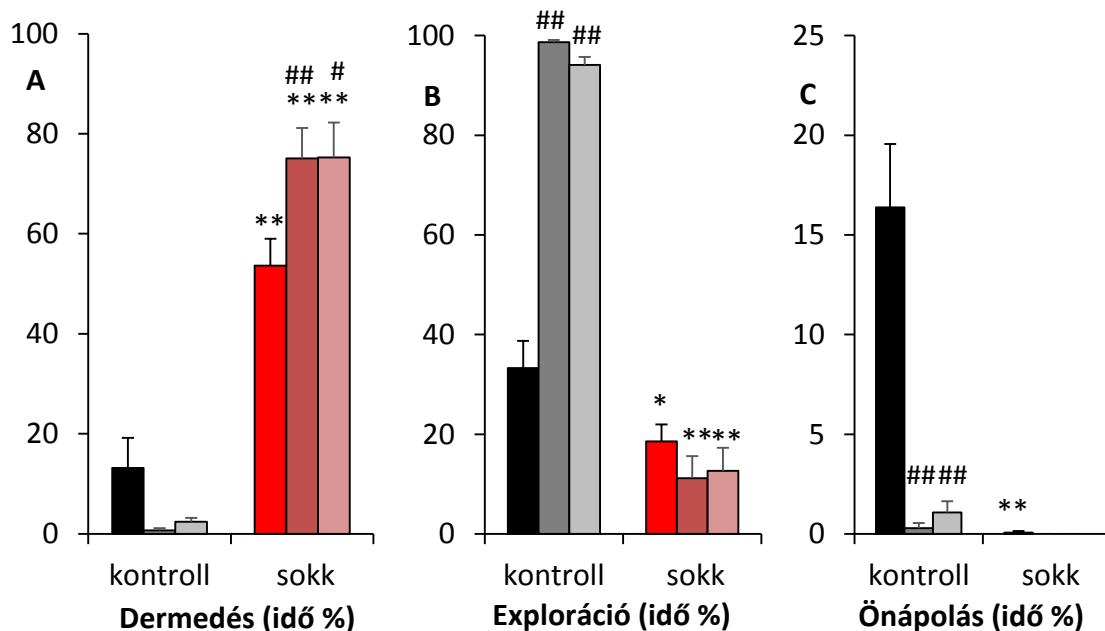
Annak bizonyítására, hogy az optogenetikai gátlás nem a fájdalomérzet befolyásolása - hanem a félelmi szituáció megítélésének megváltoztatásán keresztül - révén hatott, a sokkolás utáni 10-11. napon megmértük a gátlás hatását a fájdalomküszöbre vonatkoztatva is ($n=13-10db/csoport$).

V. Eredmények

1. Félelmi kondicionálás rövid és hosszabb távú hatásai patkányokban

Sokk napja
 Rövid táv (1 nap múlva)
 Hosszabb táv (28 nap múlva)

1.1. Magatartásbeli változások



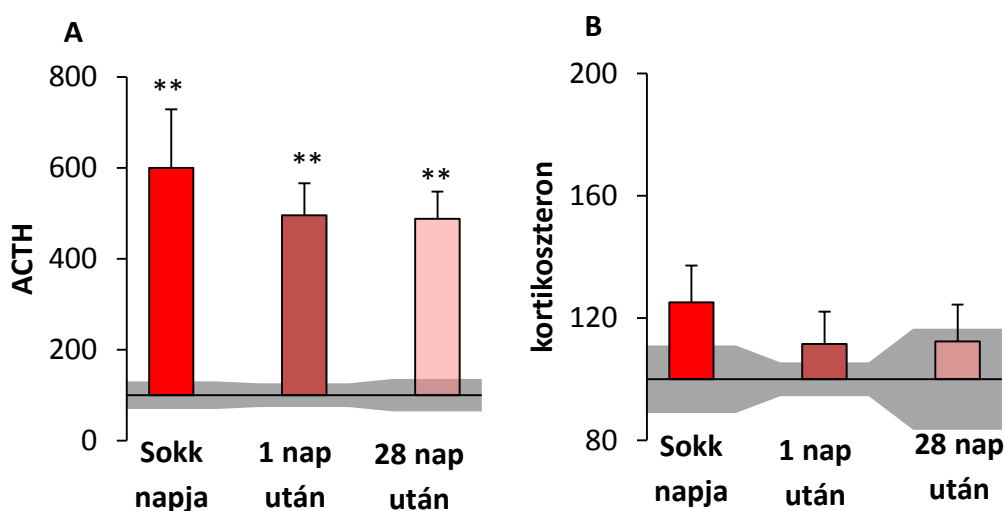
16. ábra: A félelmi kondicionálás indukálta magatartásbeli változás. (A) dermedéssel, (B) explorációval, (C) önápolással töltött idő a sokk napján, illetve 1 és 28 nappal később.

** p<0,01 vs. kontroll; *p<0,05 vs. kontroll; ##p<0,01 vs. sokk napja; #p<0,05 vs. sokk napja

A félelmi kondicionálás során alkalmazott elektromos lábsokk hatását megfigyelhettük akután, rövid távon (1 nap), illetve hosszabb távon (28 nap) is. Mindhárom időpontban a sokkolt állatok dermedéssel töltött ideje szignifikánsan több volt a kontroll állatokéhoz képest (sokk: $F_{(1,43)} = 194,35$; $p < 0,01$; nap: $F_{(1,43)} = 0,59$; $p < 0,55$; sokk x nap interakció: $F_{(1,43)} = 6,42$; $p < 0,01$; 16/A. ábra). A post hoc analízis megmutatta, hogy a visszahelyezések alkalmával a sokkot kapott patkányok több dermedést mutattak, mint a sokk alatt. Változást láttunk az exploráció (sokk: $F_{(1,43)} =$

367,18; $p < 0,01$; nap: $F_{(1,43)} = 36,81$; $p < 0,01$; sokk x nap interakció: $F_{(1,43)} = 56,30$; $p < 0,01$; 16/B. ábra), illetve az önápolás (sokk: $F_{(1,43)} = 39,99$; $p < 0,01$; nap: $F_{(1,43)} = 33,62$; $p < 0,01$; sokk x nap interakció: $F_{(1,43)} = 33,00$; $p < 0,01$; 16/C. ábra) esetén is, melyek mennyisége nagymértékben csökkent a sokk hatására függetlenül annak akut vagy korábbi alkalmazásától. A post hoc analízisek alapján, a kontroll csoportok sokk napján mutatott viselkedése az exploráció és önápolás tekintetében szignifikánsan különbözött a többi nap adataitól.

1.2. Hormonális változások

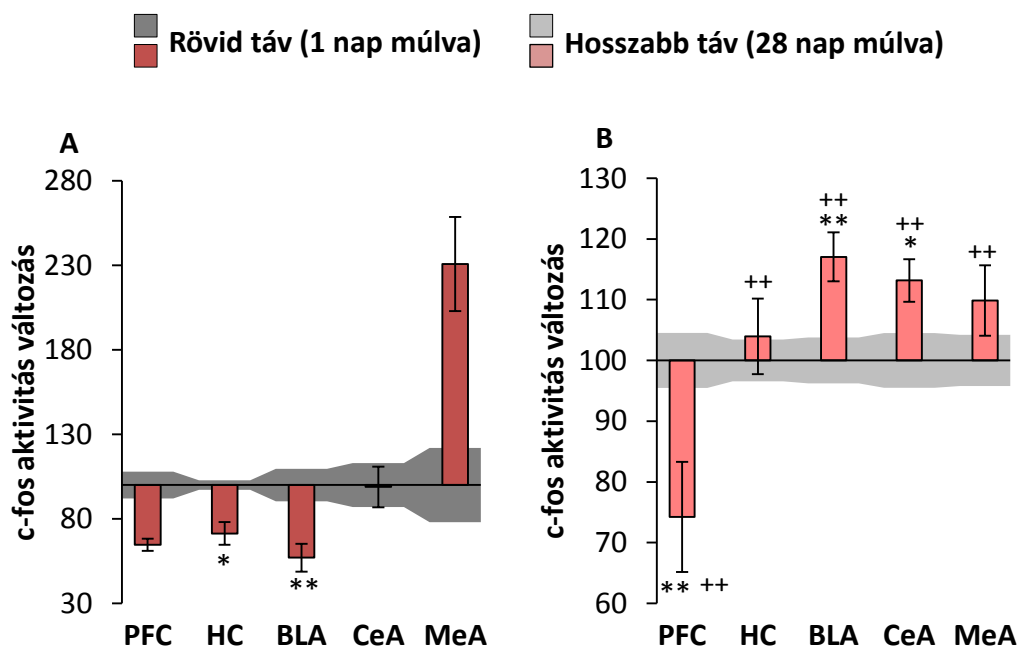


17. ábra: Hormonális változások a félelmi kondicionálás hatására. (A) ACTH (fmol/ml) szint és (B) kortikoszteron (pmol/ml) szint változása a kontroll csoporthoz (szürke sáv) viszonyítva. * $p < 0,05$ vs. kontroll; ** $p < 0,01$ vs. kontroll

A félelmi kondicionálás nem csak viselkedésbeli változásokat, hanem a HHM tengely hormonjainak (ACTH és kortikoszteron) szintjeiben is változást idézett elő. A kontroll csoport értékeit a szürke sáv mutatja. A sokk előtt 1 nappal mért, nyugalmi szintnek tekintett értékekben nem volt különbség a csoportok között. Sem a kontroll, sem a sokkot kapott csoportokban egyik vizsgált hormon esetében sem volt szignifikáns különbség a sokk napján és az 1 illetve 28 nappal később mért értékek közt. A sokk hatására nagymértékű emelkedést láttunk az ACTH esetén a kontrollokhoz képest, mely 1 illetve 28 nappal később is magas szintet mutatott, ha az állatot ugyanabba a dobozba helyeztük vissza, ez esetben sokkolás nélkül (sokk: $F_{(1,36)} = 44,71$; $p < 0,01$; idő: $F_{(2,36)} = 0,01$; $p = 0,99$; sokk x idő interakció: $F_{(2,36)} = 0,04$; $p = 0,98$; 17/A. ábra). A kortikoszteron

esetén nem láttunk szignifikáns különbséget a kontroll és sokkolt állatok szintjei között (17/B. ábra).

1.3. c-Fos aktiváció vizsgálata



18. ábra: c-Fos aktiváció vizsgálata félelmi tanulás szempontjából releváns agyterületeken (A) 1 és (B) 28 nap múlva. A kontroll csoport értékeit a szürke sáv jelzi. PFC: prefrontális kéreg, HC: hippocampus, BLA: bazolaterális, CeA: centrális, MeA: mediális amigdala; * $p < 0,05$ vs. kontroll; ** $p < 0,01$ vs. kontroll; ++ $p < 0,01$ vs. 1 nap múlva

Az ábrán csak a főbb területeket ábrázoltuk, ha az alrégiók egyéni változása megegyezett. A kontroll csoport értékeit szintén a szürke sáv jelzi.

A vizsgált agyterületeken szignifikáns főhatásokat találtunk: A PFC esetén: sokk: $F_{(1,15)}=10,62$; $p < 0,01$; idő: $F_{(1,15)}=134,27$; $p < 0,01$; sokk x idő interakció: $F_{(1,15)}=2,05$; $p=0,17$, illetve részletezve: PrL: sokk: $F_{(1,15)}=5,22$; $p < 0,05$; idő: $F_{(1,15)}=193,59$; $p < 0,01$; sokk x idő interakció: $F_{(1,15)}=1,39$; $p=0,26$; Cg1: sokk: $F_{(1,15)}=5,22$; $p=0,07$; idő: $F_{(1,15)}=44,52$; $p < 0,01$; sokk x idő interakció: $F_{(1,15)}=0,30$; $p=0,267759$; IL: sokk: $F_{(1,15)}=29,10$; $p < 0,01$; idő: $F_{(1,15)}=164,21$; $p < 0,01$; sokk x idő interakció: $F_{(1,15)}=11,62$; $p < 0,01$; DP: sokk: $F_{(1,15)}=5,22$; $p < 0,07$; idő: $F_{(1,15)}=56,41$; $p < 0,01$; sokk x idő interakció: $F_{(1,15)}=0,85$; $p=0,37$.

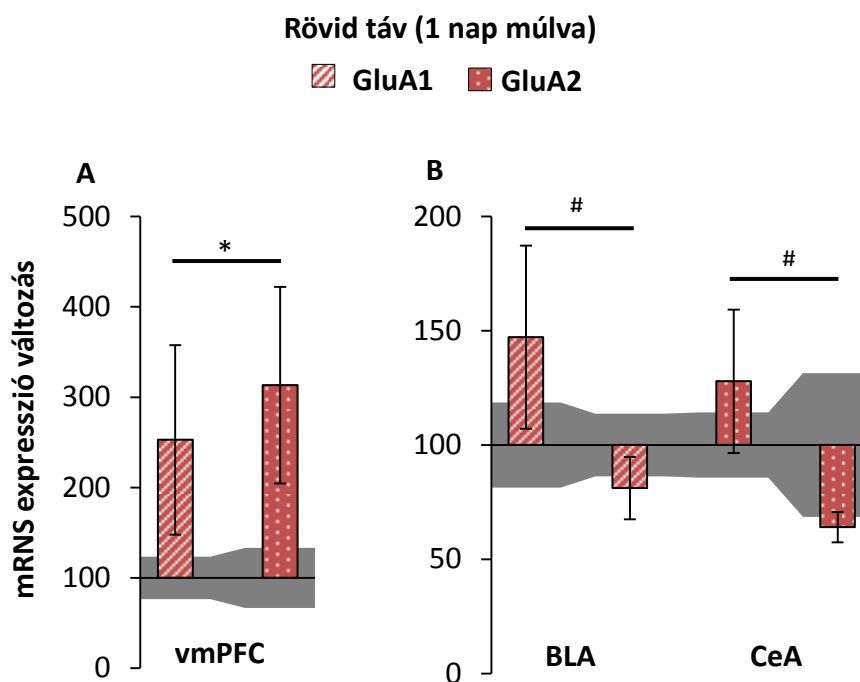
A hippocampus esetén: sokk: $F_{(1,14)}=4,68$; $p < 0,05$; idő: $F_{(1,14)}=8,16$; $p < 0,05$; sokk x idő interakció: $F_{(1,14)}=8,16$; $p < 0,05$, és részletezve: CA1: sokk: $F_{(1,14)}=1,38$; $p=0,26$; idő: $F_{(1,14)}=40,42$; $p < 0,01$; sokk x idő interakció: $F_{(1,14)}=2,39$; $p=0,14$; CA2: sokk: $F_{(1,14)}=4,58$; $p=0,05$; idő: $F_{(1,14)}=91,30$; $p < 0,01$; sokk x idő interakció: $F_{(1,14)}=2,37$;

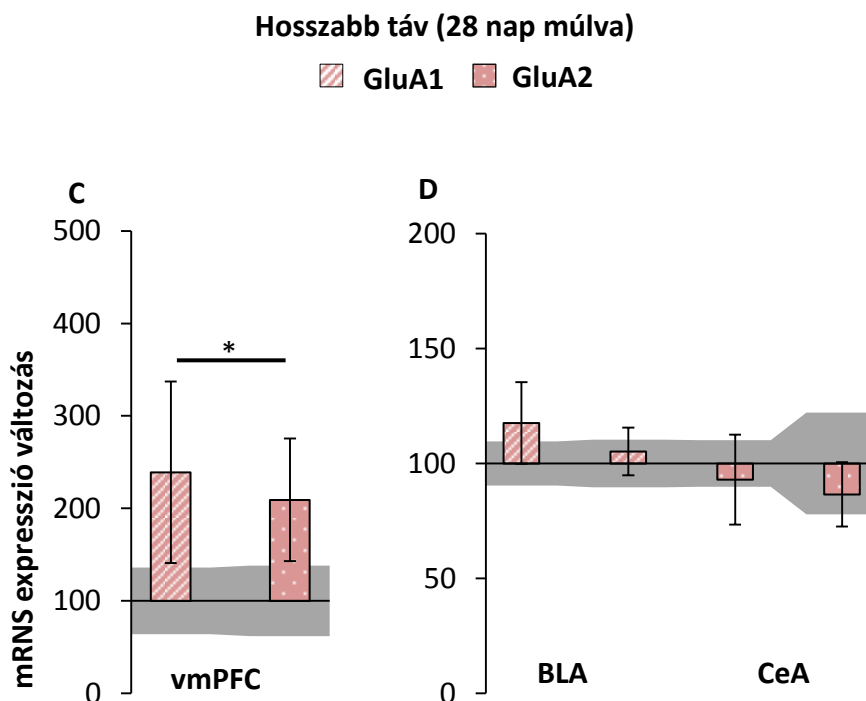
p=0,14; CA3: sokk: $F_{(1,14)}=0,96$; p=0,3; idő: $F_{(1,14)}=54,20$; p<0,01; sokk x idő interakció: $F_{(1,14)}=11,14$; p<0,01.

Az amigdala magok között: BLA: sokk: $F_{(1,15)}=0,20$; p=0,67; idő: $F_{(1,15)}=298,67$; p<0,01; sokk x idő interakció: $F_{(1,15)}=21,25$; p<0,01; CeA: sokk: $F_{(1,15)}=2,97$; p=0,11; idő: $F_{(1,15)}=469,39$; p<0,01; sokk x idő interakció: $F_{(1,15)}=3,25$; p=0,09; MeA: sokk: $F_{(1,15)}=3,97$; p=0,06; idő: $F_{(1,15)}=633,35$; p<0,01; sokk x idő interakció: $F_{(1,15)}=0,30$; p=59.

A viselkedési és hormonális változásokkal szemben a c-Fos aktivitásban határozott különbségek mutatkoztak az 1 (18/A. ábra) és 28 napi (18/B. ábra) visszahelyezés között. Alacsonyabb c-Fos aktivitást láttunk a PFC minden vizsgált területén mindkét nap a kontrollokhöz képest. A hippocampusz esetén a sokkot követő 1 nap múlva csökkenést láttunk, míg 28 nap múlva szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk a kontrollokhöz képest. Az amigdala alterületei vegyes képet mutattak. A CeA és MeA esetén nem láttunk eltérést vagy emelkedett szintet mértünk a kontrollokhöz képest, a BLA területén azonban ellentétes változásokat láttunk a korai (1 nap) és későbbi (28 nap) visszahelyezések alkalmával. 1 nap múlva szignifikánsan kevesebb, 28 nap múlva, pedig több c-Fos pozitív sejtet találtunk.

1.4. CP-AMPA receptor szerepének vizsgálata

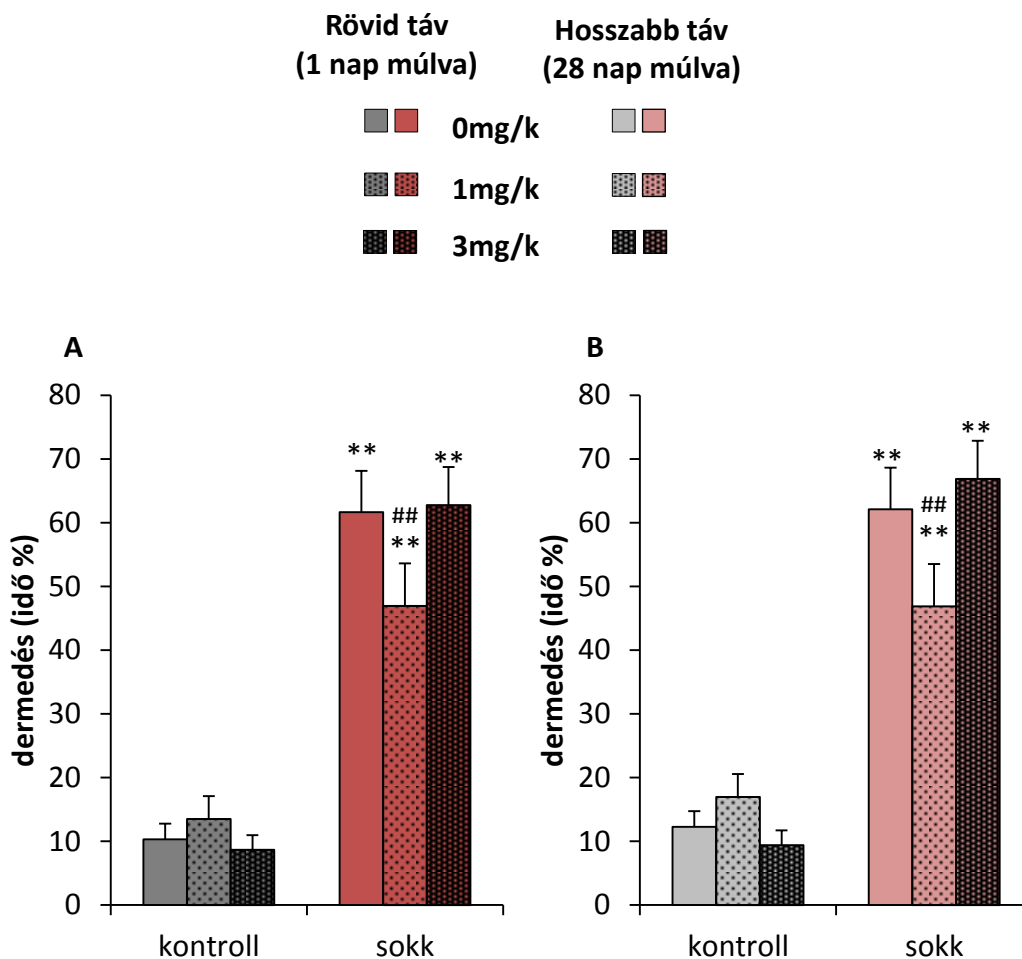




19. ábra: AMPA receptor GluA1 és A2 alegységek eloszlásának változása a vmPFC, BLA, CeA területeken (A,B) 1 és (C,D) 28 nappal a félelmi kondicionálást követően. A kontroll csoport értékeit a szürke sáv jelzi. vmPFC: ventromediális prefrontális kéreg, BLA: bazolaterális amigdala, CeA: centrális amigdala. A vonal a főhatás szignifikanciáját jelöli: *p<0,05 vs. kontroll; #p<0,05 vs. GluA2

A glutamát szerepét vizsgálva a CP-AMPA receptor alegység mRNS szintjeiben szintén eltérés mutatkozott a félelmi kondicionálás rövid és hosszútávú hatásait illetően. A vmPFC esetén mindkét AMPA receptor alegység mRNS szintje növekedést mutatott a kontrollokhöz (értékeit a szürke sáv jelzi) képest függetlenül attól, hogy 1 (19/A. ábra) vagy 28 nappal (19/C. ábra) később vizsgáltuk-e, illetve arányuk sem változott (sokk: $F_{(1,19)}=4,71$; $p<0,05$; idő: $F_{(1,19)}=0,49$; $p=0,49$; sokk x idő interakció: $F_{(1,19)}=0,49$; $p=0,49$). Ezzel ellentétben az amigdalában - BLA és CeA - 1 (19/B. ábra), de nem 28 nappal (19/D. ábra) a sokkot követően a visszahelyezett állatokban nőtt a GluA1/GluA2 alegységek aránya a kontrollokhöz képest (sokk: $F_{(1,21)}=4,94$; $p<0,05$; idő: $F_{(1,21)}=3,53$; $p=0,07$; sokk x idő interakció: $F_{(1,21)}=2,93$; $p=0,10$).

1.5. CP-AMPA receptort célzó farmakológiai kezelés hatása



20. ábra: Farmakológiai kezelés (CP-AMPA antagonistá) viselkedésbeli hatása rövid ((A) 1 nap múlva) és hosszabb ((B) 28 nap múlva) távon. ** $p < 0,01$ vs. kontroll; ## $p < 0,0$ vs. 0 mg/kg

A kontroll állatok IEM-1460, CP-AMPA antagonistá kezelése során nem találtunk különbséget a csoportok között (0,1,3 mg/kg). Ahogy már korábban is láthattuk sokkolás hatására szignifikánsan megnő a dermedéssel töltött idő, és ez a növekedés független a visszahelyezés napjától (sokk: $F_{(1,114)}=198,15$; $p < 0,01$). A különböző koncentrációjú (0,1,3 mg/kg) IEM-1460, CP-AMPA antagonistá kezelés és a korábbi sokk hatása között szignifikáns kapcsolatot találtunk (kezelés: $F_{(2,114)}=15,74$; $p < 0,01$; sokk x kezelés interakció: $F_{(2,114)}=15,74$; $p < 0,01$), és az adatok azt mutatják, hogy az adott kontrollokhoz képest az 1 mg/kg-os kezelés hatására csökkent a dermedéssel töltött idő, és ez független volt a visszahelyezés idejétől. Az 1 mg/kg-os kezelés eredménye független volt attól, hogy a kezelést 1 (20/A. ábra) vagy 28 nap (20/B. ábra) múlva alkalmaztuk a visszahelyezést megelőzően.

2. VGluT3 hiány hatásainak vizsgálata KO egerekben

2.1. VGluT3 KO egerek általános jellemzői

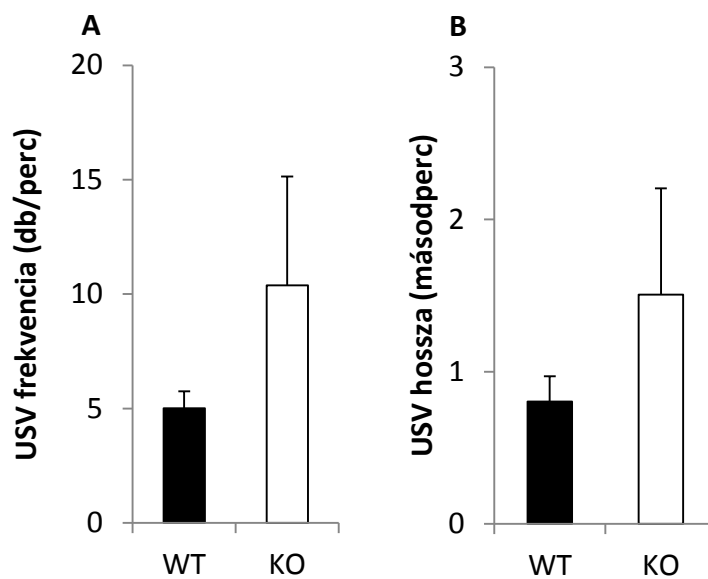
1. táblázat VGluT3 hiányának hatása fiziológiai és általános viselkedésbeli jellemzők. WT: vad típus (*wild type*); KO: génkiütött (*knockout*); FT: érzékelési küszöb (*flinch threshold*); JT: fájdalomérzékelési küszöb (*jump threshold*); PWT: fájdalomérzékelési küszöb (*paw withdrawal threshold*); * $p < 0.05$ vs WT; ** $p < 0.01$ vs WT

| | | WT | KO |
|--|------------------------|------------|---------------|
| <i>Fiziológiai változók</i> | | | |
| Testsúly <i>fiatal állat (g)</i> | USV előtt (7-8 napos) | 4,38±0,11 | 4,13±0,14 |
| | USV után (14-15 napos) | 7,52±0,18 | 6,92±0,21* |
| Testsúly <i>felőtt állat (g)</i> | | 24,78±0,74 | 24,64±0,49 |
| Vízfogyasztás (<i>ml/hét</i>) | | 32,57±0,98 | 40,07±2,06 ** |
| Ételfogyasztás (<i>g/hét</i>) | | 32,32±1,99 | 30,40±0,85 |
| <i>Viselkedésbeli változók</i> | | | |
| Mozgáskoordináció vizsgálata (<i>leesés latenciája (másodperc)</i>) | | 16,07±3,03 | 16,08±2,02 |
| Áramütés érzékelése FT (<i>mA</i>) | | 0,24±0,04 | 0,5±0,08 |
| Áramütés érzékelése JT (<i>mA</i>) | | 0,28±0,03 | 0,63±0,07 |
| Hőérzékelés mértéke PWT (<i>°C</i>) | | 42,85±0,3 | 42,53±0,27 |
| Kényszerített úszás (lebegés) (<i>idő%</i>) | | 21,31±3,72 | 22,96±2,16 |
| Összerezenés mértéke (<i>egység</i>) | | 10,48±1,11 | 3,38±0,42 ** |

A VGluT3 transzporter hiánya nem volt hatással sem a fiatal sem a felőtt hím egereknél a testsúlyra, azonban az USV stresszt - mely anyai szeparációval járt - követően (14-15 napos korban) a KO állatok testsúlya szignifikánsan alacsonyabb volt (genotípus: $F_{(1,41)}=4,09$; $p < 0,05$; idő: $F_{(1,41)}= 690,02$; $p < 0,01$; genotípus x idő interakció: $F_{(1,41)}=2,26$; $p=0,14$). A felőtt egereknél genotípusbeli különbséget nem tapasztaltunk az elfogyasztott étel mennyiségében, azonban megnövekedett vízfogyasztást figyelhettünk meg a KO állatoknál (genotípus $F_{(1,22)}=11,96$, $p < 0,01$). Nem

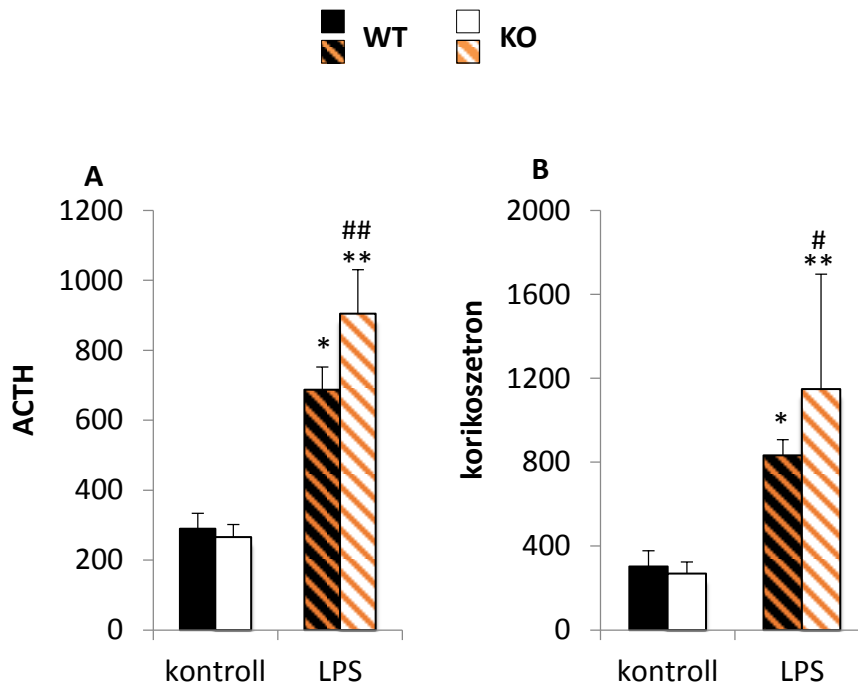
tapasztaltunk különbséget a genotípusok között a mozgáskoordináció vizsgálata során, illetve a fájdalomérzékelés küszöbértékei között sem (sem a hőérzékelésben, sem az elektromos lábsokk esetén) és a megküzdési stratégiákban sem. Az összerezzenés mértéke - irodalmi adatoknak megfelelően - szignifikánsan alacsonyabb volt a KO állatok esetén (genotípus $F_{(1,18)}=35.72$, $p<0.01$) (1. táblázat).

2.2. VGlut3 hiány hatása fiatal állatokban



21. ábra: Fiatal állatoknál megfigyelt USV (A) frekvenciája és (B) hossza anyai szeparáció hatására. WT: vad típus (*wild type*); KO: génkiütött (*knockout*)

Az anyai szeparációt követően mind az USV kibocsátás hosszában (genotípus: $F_{(1,28)}=3,05$; $p=0,09$; 21/A. ábra) mind frekvenciájában (genotípus: $F_{(1,28)}=3,82$; $p=0,06$; 21/B. ábra) emelkedett tendenciát mutattak a KO állatok szignifikáns különbségek nélkül.

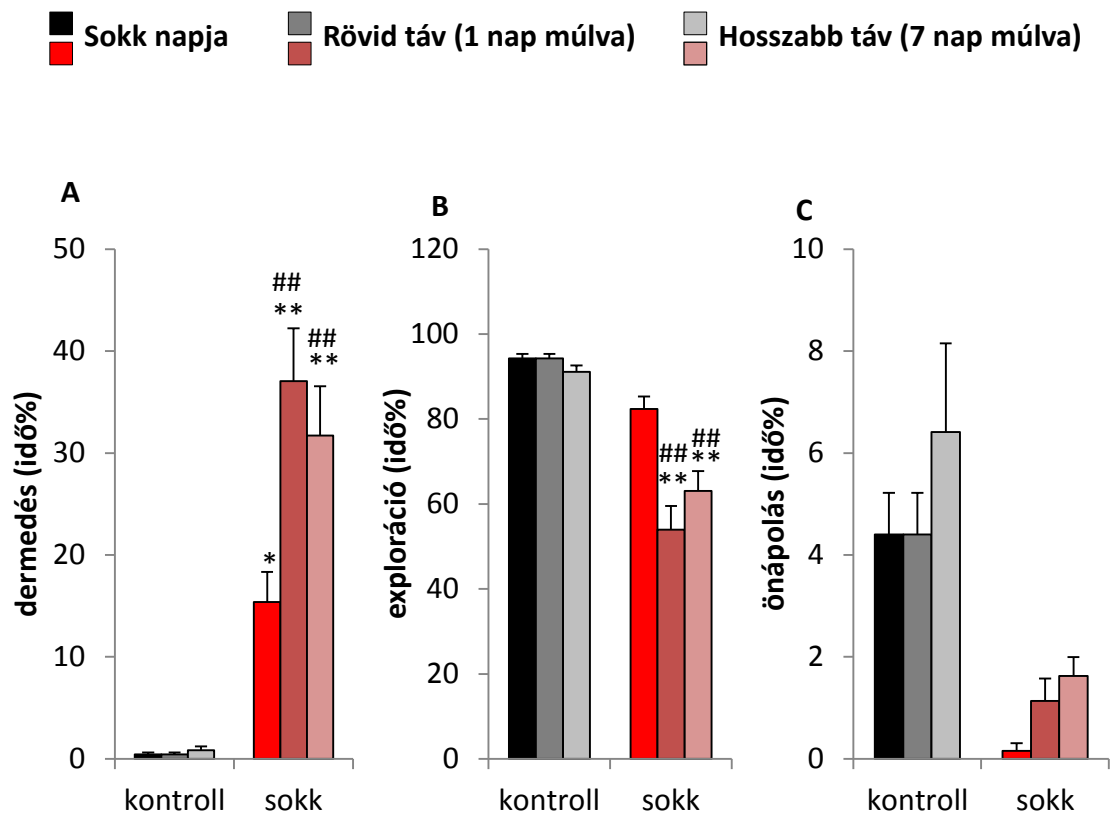


22. ábra: Hormonszint ((A) ACTH (fmol/ml) és (B) kortikoszteron (pmol/ml)) változás LPS kezelés hatására. ACTH: adrenokortikotrop hormon; LPS: lipopoliszacharid; * $p < 0,05$ vs. kontroll; ** $p < 0,01$ vs. kontroll; # $p < 0,05$ vs. WT; ## $p < 0,01$ vs. WT

Az LPS indukálta stressz választ követően ACTH és kortikoszteron szintekben emelkedést tapasztaltunk mindkét genotípusban, ami kifejezettebb volt a KO állatoknál. Szignifikáns fő hatást találtunk a genotípus és a kezelés interakciójában mindkét hormon esetén (ACTH: genotípus: $F_{(1,32)}=6,26$; $p < 0,05$; LPS: $F_{(1,32)}=93,42$; $p < 0,01$; genotípus x LPS: $F_{(1,32)}=14,97$; $p < 0,01$; 22/A. ábra), (kortikoszteron: genotípus: $F_{(1,34)}=4,00$; $p=0,05$; LPS: $F_{(1,34)}=68,93$; $p < 0,01$; genotípus x LPS: $F_{(1,34)}=5,14$; $p < 0,05$; 22/B. ábra).

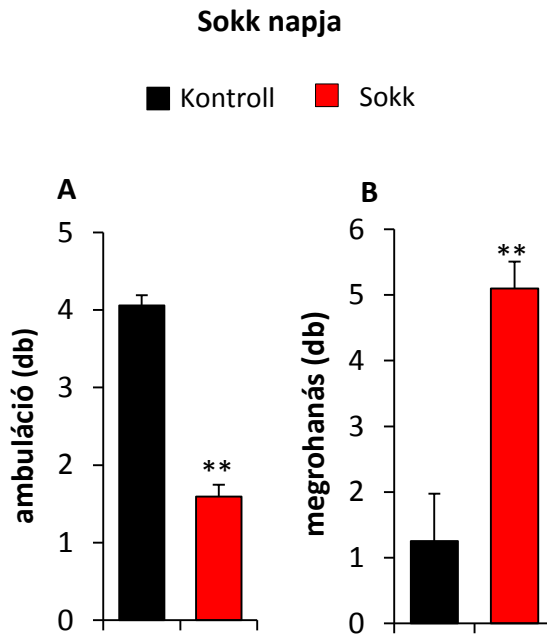
2.3. Félelmi kondicionálás felnőtt egereken

2.3.1. Kontroll magatartási és hormonális vizsgálatok



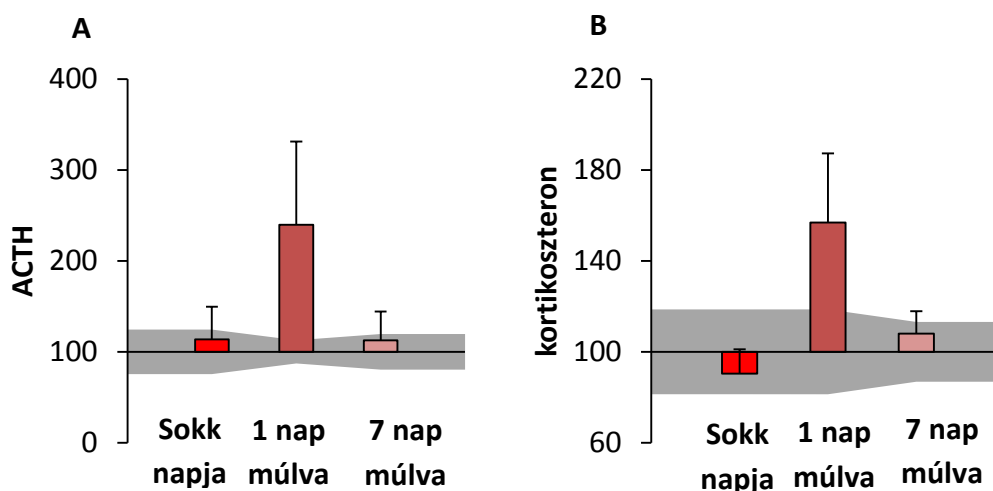
23. ábra: A félelmi kondicionálás magatartási hatása intakt egerekre. Megfigyelt magatartásváltozások: (A) dermedés, (B) exploráció és (C) önápolás során. * $p < 0,05$ vs. kontroll; ** $p < 0,01$ vs. kontroll; ## $p < 0,01$ vs. sokk napja

Ahogy a patkányoknál is láthattuk az intakt egerek a félelmi kondicionálás alatt és azt követően rövid távon - 1 nap múlva - és hosszabb távon - 7 nap múlva - is jóval több időt töltöttek dermedéssel a kontrollokhoz képest (sokk: $F_{(1,17)}=60,16$; $p < 0,01$; idő: $F_{(2,34)}=5,83$; $p < 0,01$; sokk x idő interakció: $F_{(2,34)}=5,70$; $p < 0,01$; 23/A. ábra). A post hoc elemzés megmutatta, hogy a visszahelyezések alkalmával szignifikánsan több dermedést mutattak, mint a sokk alatt, a két időpont (1 és 7 nap múlva) között azonban nem találtunk különbséget. Ahogy a patkányoknál is megfigyelhettük, az exploráció (sokk: $F_{(1,17)}=48,75$; $p < 0,01$; idő: $F_{(2,34)}=9,70$; $p < 0,01$; sokk x idő interakció: $F_{(2,34)}=8,78$; $p < 0,01$; 23/B. ábra), és az önápolás (sokk: $F_{(1,17)}=21,36$; $p < 0,01$; idő: $F_{(2,34)}=5,24$; $p < 0,01$; sokk x idő interakció: $F_{(2,34)}=0,97$; $p=0,39$; 23/C. ábra) is csökkent a sokk hatására és alacsony maradt a visszahelyezések során is.



24. ábra: Félelmi kondicionálás akut hatása intakt egerekben. (A) Megfigyelt ambuláció (vonalátlépés/perc) és (B) megrohanások frekvenciája. ** $p < 0,01$ vs. kontroll

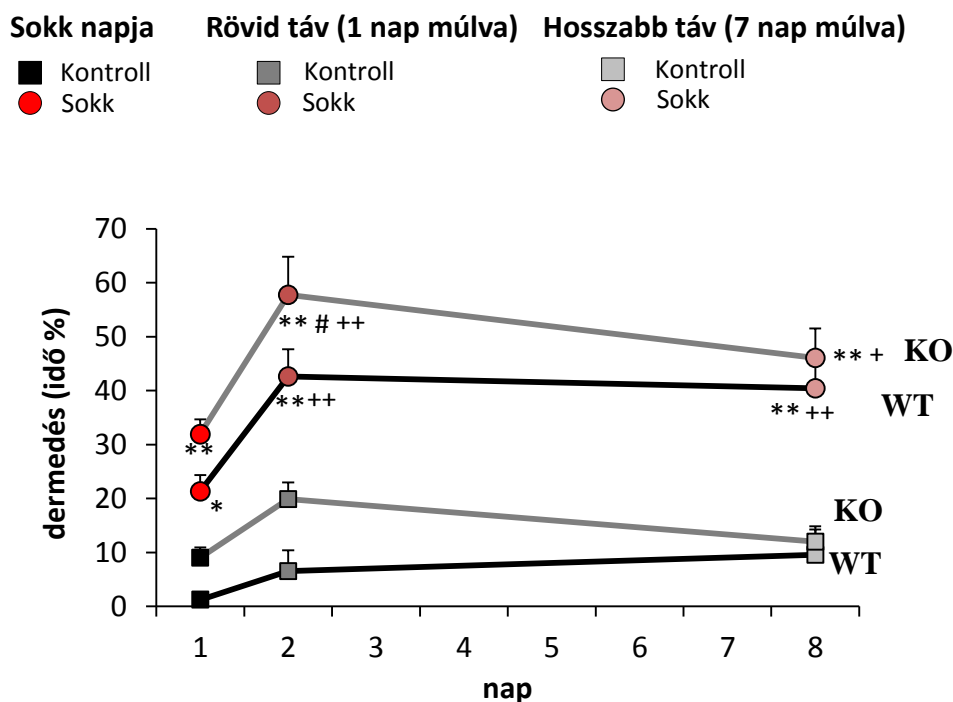
A fenti paramétereken túl az állatok a sokk alatt akutan még az ambulációs ($F_{(1,16)}=141,61$; $p < 0,01$; 24/A. ábra) viselkedésben és az úgynevezett „megrohanások” számában ($F_{(1,16)}=23,74$; $p < 0,01$; 24/B. ábra) is különböztek. Az előbbi (ambuláció) kevésbé, míg az utóbbi (megrohanások) gyakrabban fordult elő a sokkolás alatt.



25. ábra: Hormonális változások a félelmi kondicionálás hatására egerekben. (A) ACTH (fmol/ml) szint és (B) kortikoszteron (pmol/ml) szint változása a kontroll csoporthoz viszonyítva. A kontroll csoport értékeit a szürke sáv jelzi. ACTH: adrenokortikotróp hormon

Érdekes módon egerekben 1 nappal a sokk után láttunk tendenciákat magasabb ACTH és kortikoszteron szintekre, míg úgy tűnik más vizsgálati napokon maga a sokkoló dobozba, új környezetébe történő helyezés is stresszt okozott az állat számára (25/A,B. ábra).

2.4. Félelmi kondicionálás VGlut3 egereken

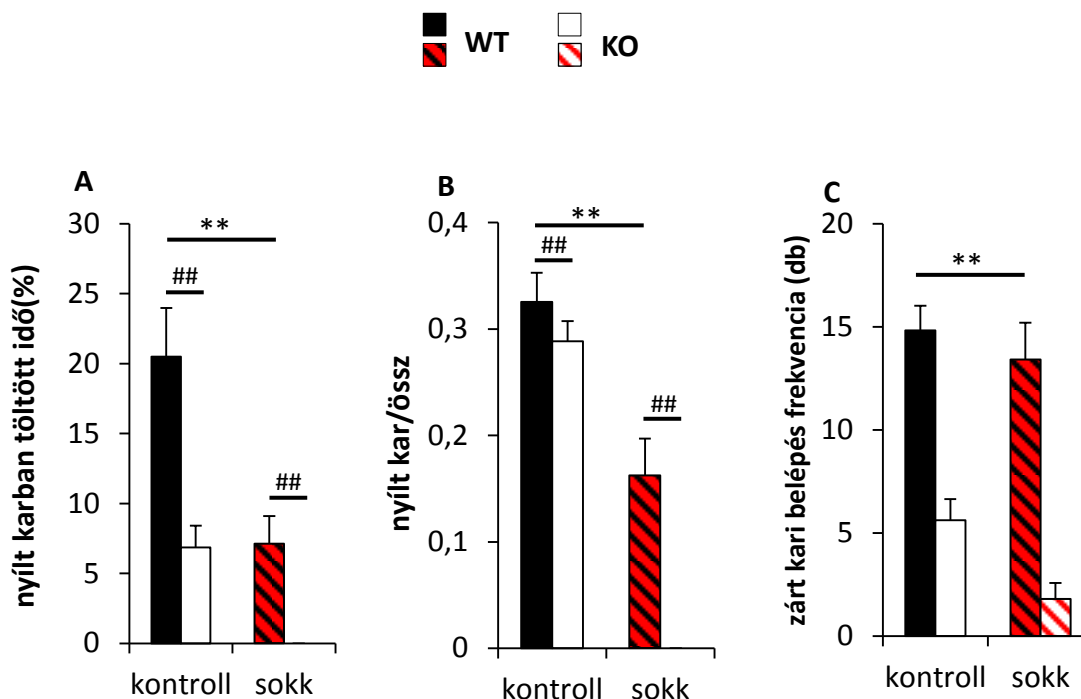


26. ábra: A kondicionált félelem teszt magatartásbeli eredményei VGlut3 KO állatokban.
 WT: vad típus (*wild type*), fekete vonal jelzi; KO: génkiütött (*knockout*), szürke vonal jelzi; * $p < 0,05$ vs. kontroll; ** $p < 0,01$ vs. kontroll; # $p < 0,05$ vs. WT; + $p < 0,05$ vs. sokk napja; ++ $p < 0,01$ vs. sokk napja

Ebben az esetben szignifikáns főhatásokat találtunk, melyek megmutatták, hogy az állatok viselkedését befolyásolta a genotípus, a sokk jelenléte, illetve az idő (genotípus: $F_{(1,36)}=8,42$; $p < 0,01$; sokk: $F_{(1,36)}=92,13$; $p < 0,01$; genotípus x sokk interakció: $F_{(1,36)}=0,17$; $p < 0,68$; idő: $F_{(2,72)}=23,41$; $p < 0,01$; genotípus x sokk interakció: $F_{(2,72)}=2,31$; $p=0,11$; sokk x idő interakció: $F_{(2,72)}=5,59$; $p < 0,01$; genotípus x sokk x idő: $F_{(2,72)}=0,01$; $p=0,99$; 26. ábra). Mindkét genotípus esetén már a sokk alatt jelentős növekedés látható a dermedéssel töltött idő mennyiségében, mely csak tovább növekedett az 1 nappal későbbi visszahelyezés alkalmával, majd egy hét múlva ugyanolyan szinten maradt. Az első nap során - sokk alatt - marginálisan szignifikáns különbséget detektáltunk a genotípusok között ($p=0,07$), mely 1 nap múlva - a visszahelyezés során - elérte a szignifikáns szintet ($p < 0,05$). A kontroll állatok esetén nem volt szignifikáns különbség a genotípusok között.

2.4.1. A félelmi kondicionálás kontextus függésének vizsgálata VGlut3 egereken

2.4.1.1. Megemelt keresztpalló teszt



27. ábra: A félelmi kondicionálás hosszú távú hatásának vizsgálata megemelt keresztpalló tesztben.

Szorongószerű magatartás mérése a (A) nyílt karban töltött idő, (B) lokomóció független nyílt kari belépések száma és a (C) zárt kari belépés frekvenciája alapján. WT: vad típus (*wild type*), fekete vonal jelzi; KO: génkiütött (*knockout*);

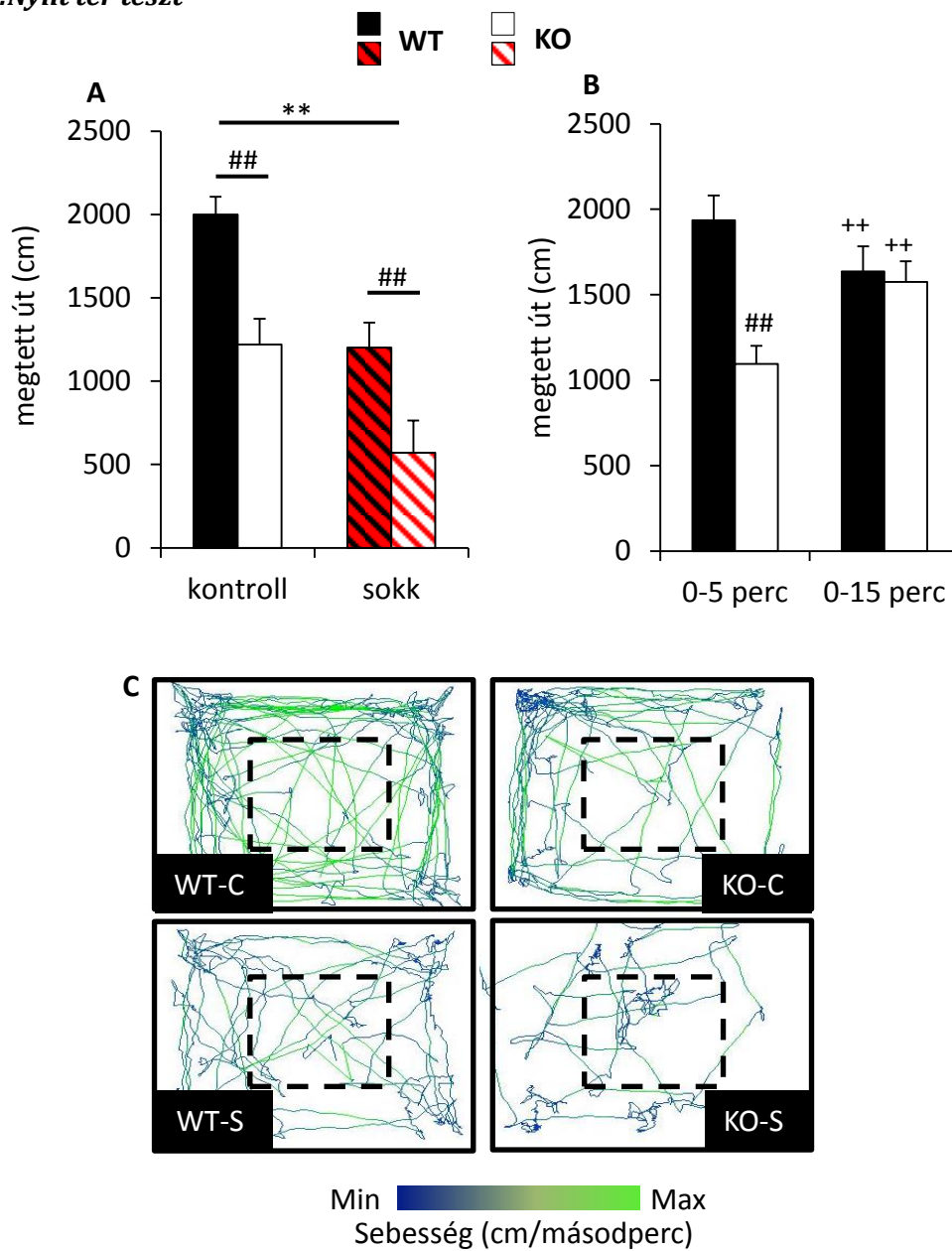
A vonal a főhatás szignifikanciáját jelöli: * $p < 0,05$ vs. kontroll; # $p < 0,05$ vs. WT

A nyílt karban töltött idő szignifikánsan különbözött a genotípusok között, kevesebb időt töltöttek ebben a karban a KO állatok (genotípus: $F_{(1,25)}=11,82$; $p < 0,01$; 27/A. ábra). A kondicionált félelem teszt során korábban sokkot kapott állatok mindkét genotípus esetén szignifikánsan kevesebb időt töltöttek a nyílt karban (sokk: $F_{(1,25)}=12,45$; $p < 0,01$; genotípus x sokk interakció: $F_{(1,25)}=1,23$; $p=0,28$). A korábban sokkolt állatok közül a WT csoportból 7 darab, míg a KO csoportból 4 darab egér leugrott (+1 db a centrumból nem mozdult) a kísérleti eszköztől, így őket kizártuk a statisztikai elemzésből. A korábban sokkot kapott WT állatok esetén a nyílt karban töltött idő mennyisége nagyban csökkent a kontrollokhoz képest. KO állatok, pedig be sem tették a lábukat a nyílt karba.

A mozgékonyaságtól független, a nyílt kar/össz belépések számának értéke szintén szignifikánsan különbözött a csoportok között (genotípus: $F_{(1,25)}=40,83$; $p<0,01$; sokk: $F_{(1,25)}=7,94$; $p<0,01$; genotípus x sokk interakció: $F_{(1,25)}=3,14$; $p=0,08$; 27/B. ábra). A kontroll és a sokkolt csoportban is a KO állatok szignifikánsan kevesebbszer léptek be a nyílt karba. A korábbi sokk nem volt hatással a WT állatoknál a nyílt kari belépés frekvenciájára, míg a - le nem ugrott - KO állatok nem léptek be a nyílt karba.

A mozgékonyaságra, vagyis a lokomócióra a zárt kari belépés frekvenciájából következtettünk. Szignifikáns különbség mutatkozott a kontroll és korábban sokkolt állatok között (genotípus: $F_{(1,25)}=2,19$; $p=0,15$; sokk: $F_{(1,25)}=34,45$; $p<0,01$; genotípus x sokk interakció: $F_{(1,25)}=0,46$; $p=0,50$; 27/C. ábra) - utóbbi esetén csökkenés volt megfigyelhető - azonban a VGluT3 transzporter hiánya ezt nem befolyásolta. Vagyis a korábbi sokknak hosszú távú hatása (14-15 nappal később) volt a lokomóciót tekintve mindkét genotípus esetén.

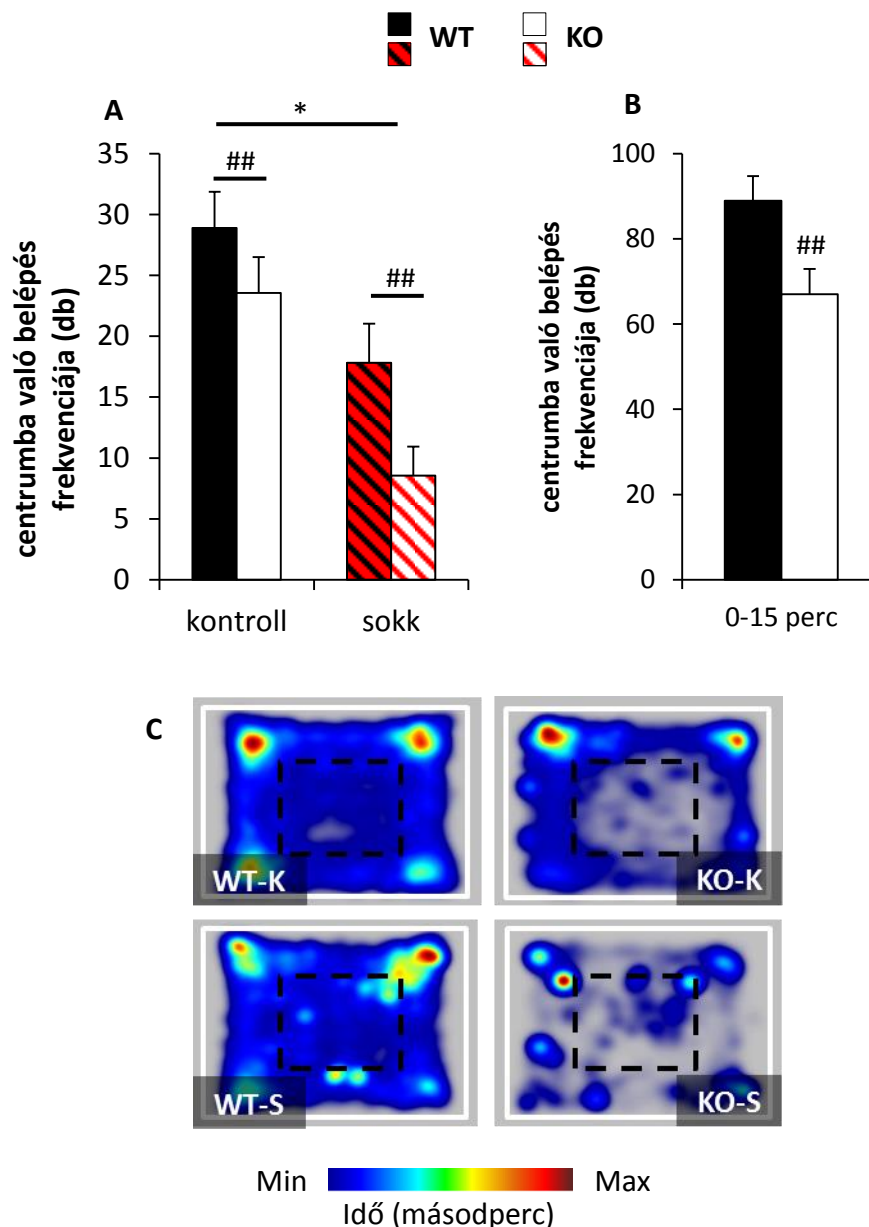
2.4.1.2. Nyílt tér teszt



28. ábra: A félelmi kondicionálás hosszú távú hatásának vizsgálata nyílt tér tesztben. (A) megtett út 5 perces, (B) 15 perces teszt és (C) egy-egy reprezentatív példa a vizsgált csoportokból. WT: vad típus (*wild type*), fekete vonal jelzi; KO: génkiütött (*knockout*); A vonal a főhatás szignifikanciáját jelöli: ** $p < 0,01$ vs. kontroll; ## $p < 0,01$ vs. WT; ++ $p < 0,01$ vs. 0-5perc

A nyílt tér tesztben vizsgált mozgékonyosság - jelen esetben a teszt alatt megtett út és ezzel párhuzamosan a sebesség - szignifikánsan különbözött a csoportok között (genotípus: $F_{(1,36)}=21,56$; $p < 0,01$; sokk: $F_{(1,36)}=20,58$, $p < 0,01$; genotípus x sokk interakció: $F_{(1,36)}=0,23$; $p=0,63$; 28/A,C. ábra). A sokkolt állatok mozgékonyága mindkét genotípusban lecsökkent, a VGlut3 hiányos állatok, pedig kevesebbet mozogtak, mint a WT-ok 5 perc alatt. Ha azonban tovább vizsgáljuk a genotípus hatást

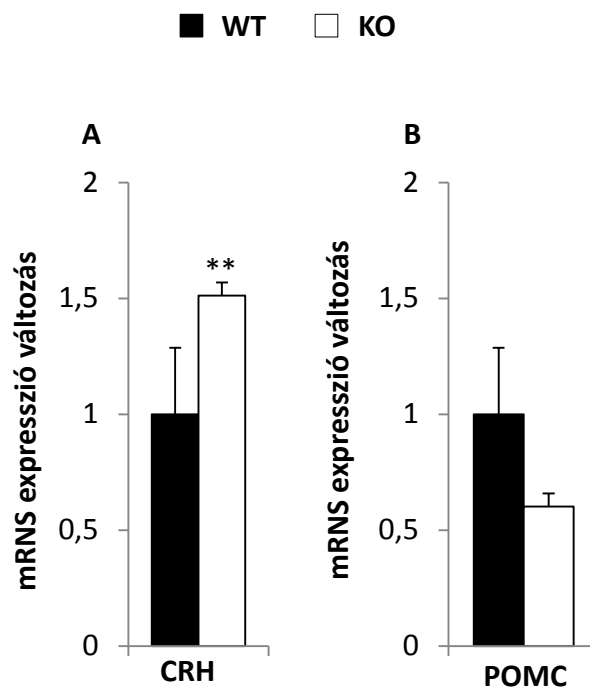
(másik, nem sokkolt állatcsoport 15 perces nyílt tér tesztjében az első és utolsó 5 perc összehasonlítása (genotípus: $F_{(1,22)}=6,35$; $p<0,05$; idő: $F_{(1,22)}=1,93$; $p=0,18$; genotípus x idő: $F_{(1,22)}=36,01$; $p<0,01$; 28/B. ábra) a KO állatok a 15 perc utolsó 5 percében ugyanannyi utat tettek meg, mint a transzporterrel rendelkező társaik. Ebből arra következtethetünk, hogy ahogy már a rotarod teszt (1. táblázat) esetén is észleltük a megfigyelt viselkedés nem valamilyen motoros problémából ered, hanem valószínűleg a szorongás jelzője.



29. ábra: A félelmi kondicionálás hosszú távú hatásának vizsgálata nyílt tér tesztben. Szorongószerű magatartás mérése a centrumba lépés frekvenciája alapján (A) 5 perc, (B) 15 perc alatt, illetve (C) a vizsgált csoportokból egy-egy reprezentatív példa az állatok arénában töltött idejéről. WT: vad típus (*wild type*), fekete vonal jelzi; KO: génkiütött (*knockout*); A vonal a főhatás szignifikanciáját jelöli: * $p<0,05$ vs. kontroll; ## $p<0,01$ vs. WT

A centrumba lépést, mint szorongást jellemző paramétert vizsgáltuk. A KO állatok kevesebbszer léptek be a centrumba (29/A,C. ábra), mint a WT egerek, még akkor is, ha a teszt 15 percig tartott (29/B. ábra) (5 perc: genotípus: $F_{(1,36)}=19,26$; $p<0,01$; 15 perc: genotípus: $F_{(1,22)}=6,91$; $p<0,05$). A korábban sokkot kapott állatok szintén kevesebbszer léptek be a centrumba (sokk: $F_{(1,36)}=6,05$; $p<0,05$; genotípus x sokk interakció: $F_{(1,36)}=0,44$; $p=0,51$). Míg a WT állatok esetén nem volt különbség a sokkolt és nem sokkolt állatok közt, addig a KO sokkolt állatok csökkent frekvenciát mutattak.

2.4.2. VGlut3 hiány hatása a HHM tengelyre

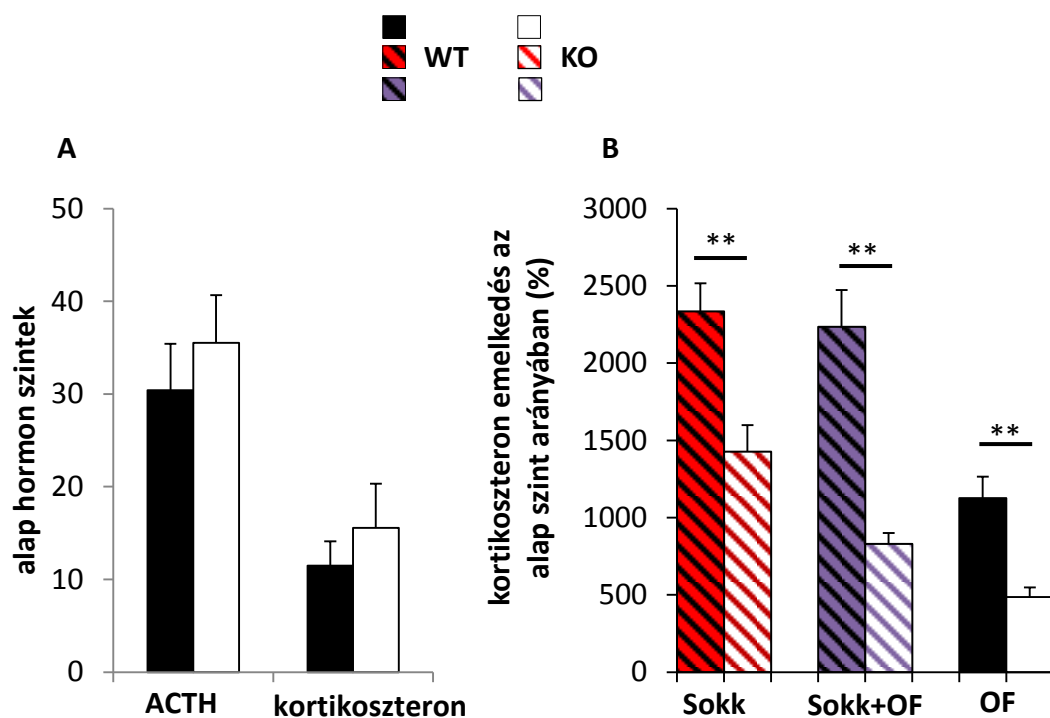


30. ábra: A VGlut3 hatása a nyugalmi mRNS szintre a (A) hipotalamuszban és a (B) hipofízisben. CRH: kortikotróp felszabadító hormon, POMC: proopiomelanokortin; WT: vad típus (*wild type*), fekete vonal jelzi; KO: génkiütött (*knockout*); ** $p<0,01$ vs. WT

2. táblázat: A VGlut3 hiányának hatása a krónikus stresszre érzékeny szervekre. WT: vad típus (*wild type*), fekete vonal jelzi; KO: génkiütött (*knockout*)

| | WT | KO |
|---------------------------|------------|------------|
| Mellékvese súlya (mg) | 6,03±0,55 | 5,36±0,17 |
| Csecsemőmirigy súlya (mg) | 41,07±2,47 | 48,22±4,48 |
| Lép súlya (mg) | 68,77±3,33 | 69,48±1,86 |

Egyedül a hipotalamuszban találtunk a genotípusok között szignifikáns különbséget a CRH mRNS szintek (genotípus: $F_{(1,10)} = 34,11$, $p < 0,01$; 30/A,B. ábra) között. A hipotalamuszban mért AVP mRNS szint, a hipofízisben mért POMC (ACTH prekursor), CRHR1 és V1b receptor mRNS szintekben sem találtunk különbséget (30/A,B. ábra). Az HHM tengely működésének változásából eredő esetleges krónikus elváltozásokat sem találtunk a vizsgált szervekben (2. táblázat).



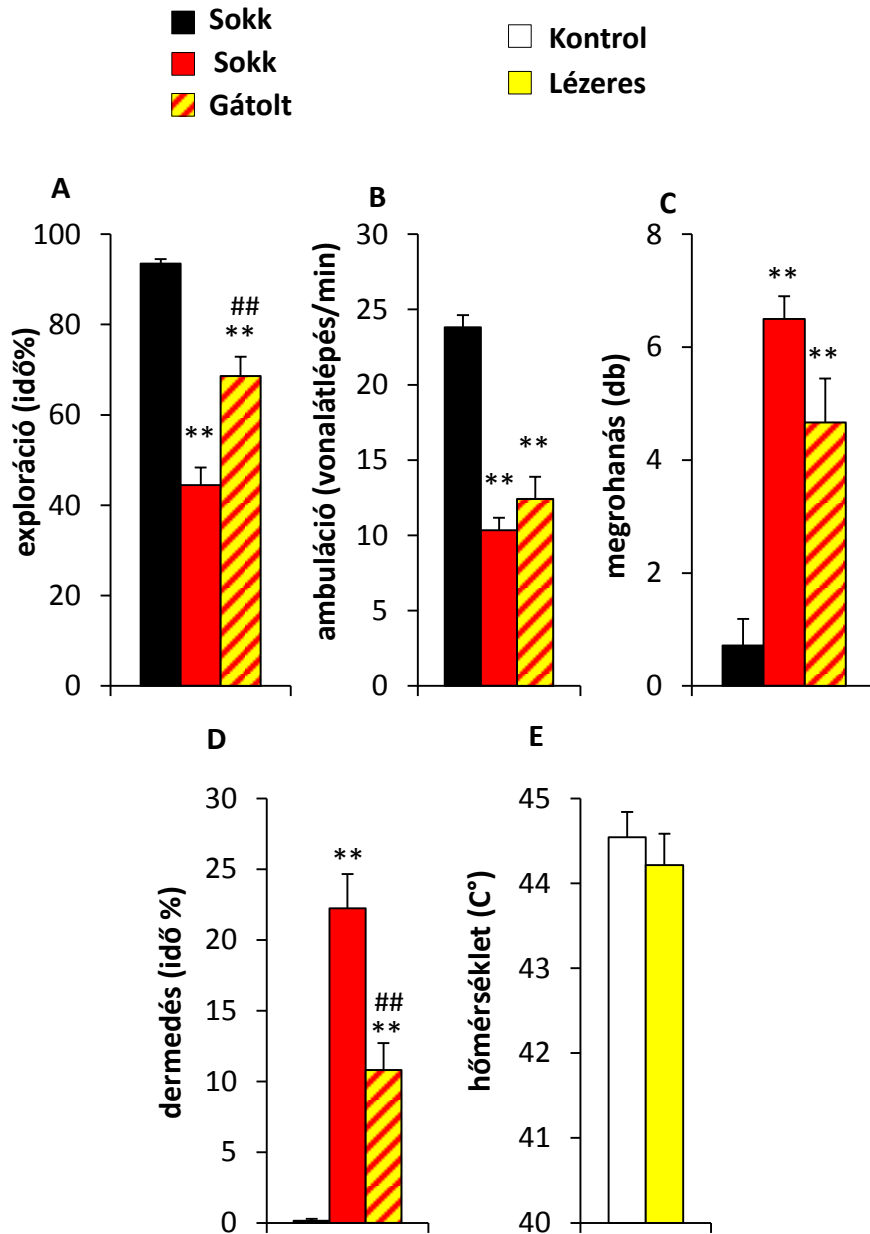
31. ábra: VGLUT3 hiányának hatása az (A) alap ACTH (fmol/ml) és kortikoszteron (pmol/ml), illetve a (B) stressz indukálta kortikoszteron szintre. ACTH: adrenokortikotrop hormon, OF: nyílt tér (*open field*) teszt, WT: vad típus (*wild type*), KO: génkiütött (*knockout*); A vonal a főhatás szignifikanciáját jelöli: * $p < 0,05$ vs. kontroll; ## $p < 0,01$ vs. WT

A két genotípus esetén az alap hormonszintek (ACTH és kortikoszteron) szignifikánsan nem különböztek egymástól (31/A. ábra). Mindegyik stresszor szignifikáns emelkedést indukált a kortikoszteron szintekben (stressz $F_{(1,123)} = 191,3$, $p < 0,01$), mely minden esetben kisebb mértékű volt a KO állatoknál (genotípus x stressz interakció $F_{(1,123)} = 4,6$, $p < 0,05$; 31/B. ábra). Ha a különböző stresszorokat tekintjük: csak sokk: $F_{(1,16)} = 13,19$, $p < 0,01$, sokk+OF: $F_{(1,13)} = 16,64$, $p < 0,01$, csak OF: $F_{(1,14)} = 18,11$, $p < 0,01$). A legnagyobb eltérés a genotípusok között az OF után volt, melyet elektromos lábsokk előzött meg.

3. Mediális raphe régió vizsgálata

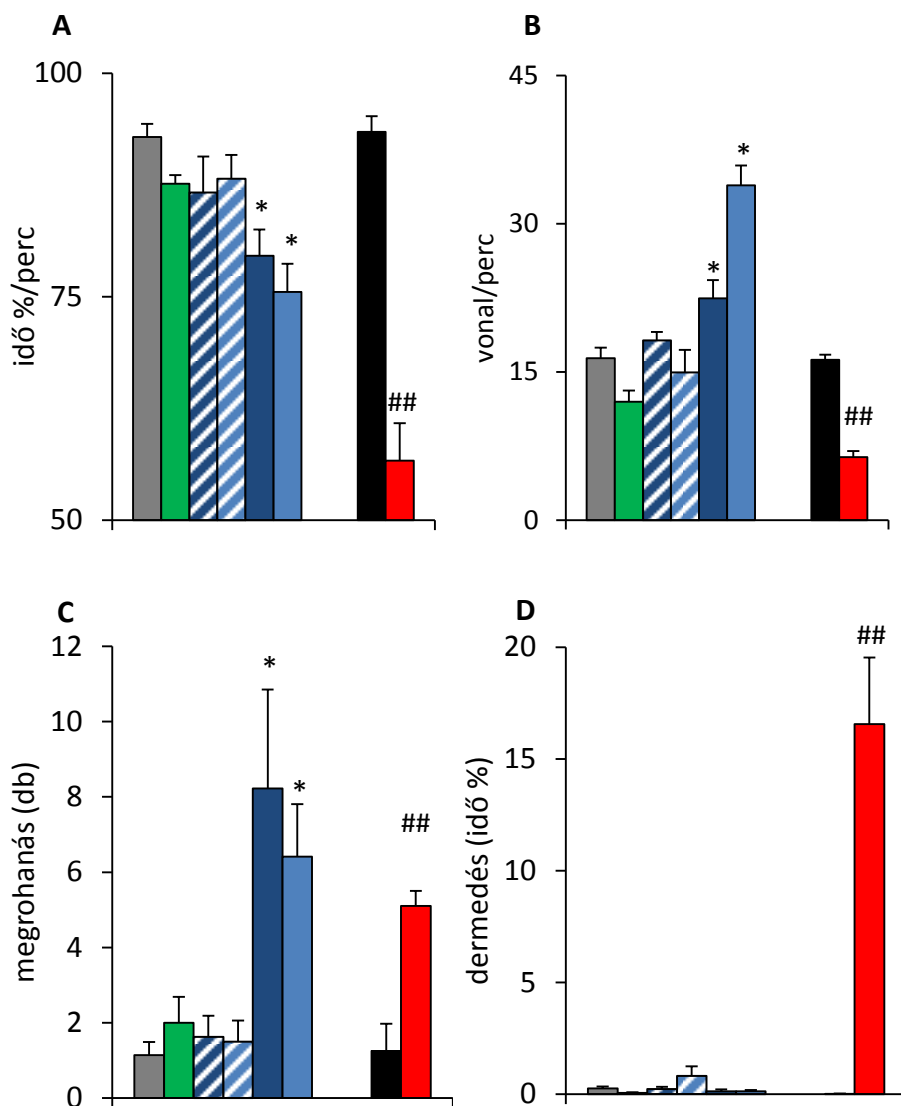
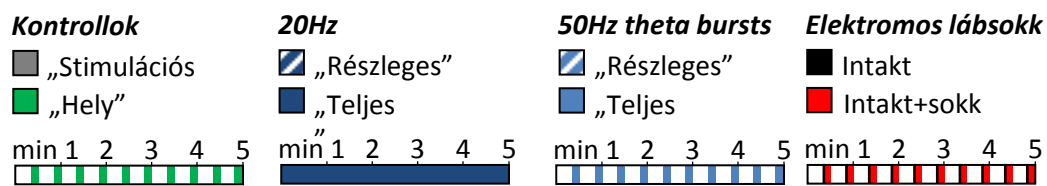
3.1. MR régió optogenetikai modulációjának magatartásbeli hatásai

3.1.1. Félelmi kondicionálás akut hatása



32. ábra: Félelmi kondicionálás alatt alkalmazott MR régió optogenetikai gátlásának következtében egerekben megfigyelhető viselkedésbeli változások. ((A) exploráció, (B) ambuláció, (C) megrohanás, (D) dermedés és a (E) fájdalomküszöb vizsgálata ** p<0,01 vs. kontroll; ## p<0,01 vs. sokk

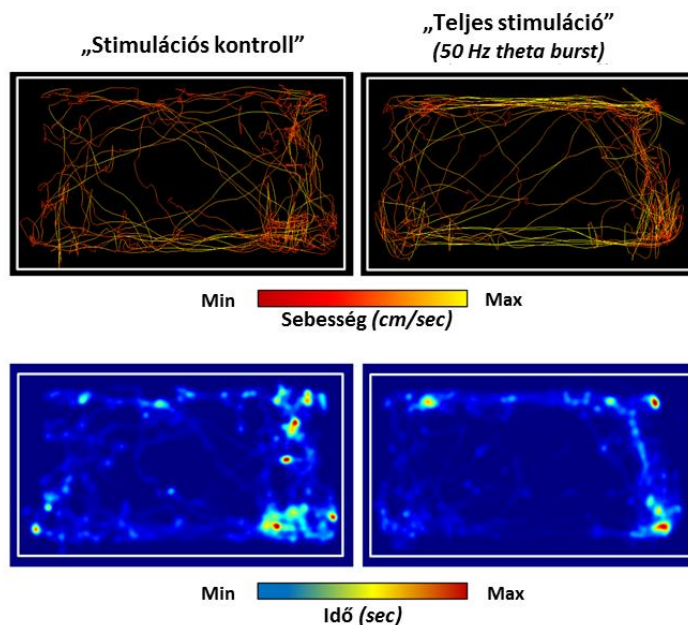
Először a félelmi kondicionálás alatt alkalmazott MR régió optogenetikai gátlásának hatását vizsgáltuk. Mindegyik állat operáción átesett és vírust és optikai szálát egyaránt kapott. Lábsokkot kapott állatok felénél folyamatos sárga fényt alkalmazva gátoltuk az MR régió aktivitását („Gátolt” csoport), ennek következtében a viselkedésben szignifikáns hatást láttunk (exploráció: $F_{(2,29)}=28,30$; $p<0,01$; 32/A. ábra; ambuláció: $F_{(2,29)}=22,31$; $p<0,01$; 32/B. ábra; megrohanás: $F_{(2,29)}=13,44$; $p<0,01$; 32/C. ábra; dermedés: $F_{(2,29)}=23,37$; $p<0,01$; 32/D. ábra). Post hoc analízis megmutatta, amit már az intakt állatokban is láthattuk, hogy sokk hatására szignifikánsan lecsökken a lokomóció, az exploráció és ambuláció is, azonban a MR régió gátlása képes volt szignifikáns mértékben kompenzálni a lábsokk explorációt csökkentő és dermedést növelő hatását. A megrohanások mértéke is némileg csökkent gátlás hatására. Ezek a hatások nem a fájdalomküszöb megváltozásának köszönhetőek, ugyanis az állatok fájdalomérzete nem változott az optogenetikai megvilágítás hatására (32/E. ábra).



33. ábra: Optogenetikai stimuláció hatására bekövetkező magatartásbeli változások, (A) ambuláció, (B) exploráció, (C) megrohanás, (D) dermedés jellemzésével. Az ábra jobb oldalán összehasonlításként az intakt állatokban megfigyelt változások szerepelnek. * $p < 0,05$ vs. kontroll („hely” és „stimulációs”); ** $p < 0,05$ vs. kontroll („hely” és „stimulációs”); ## $p < 0,01$ vs. intakt kontroll

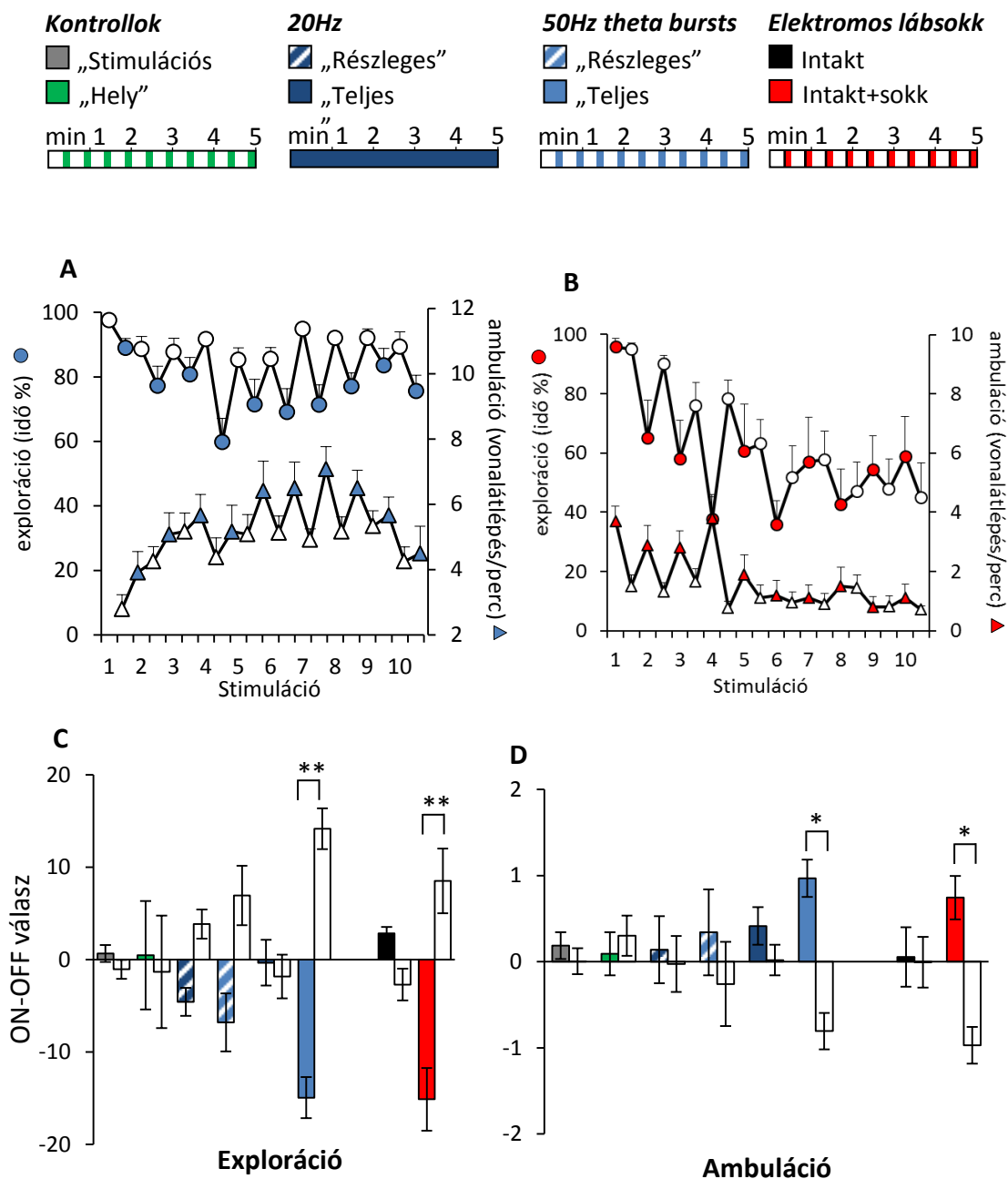
Ezután megpróbáltunk az elektromos lábsokkhoz hasonló változásokat MR régió ingerléssel létrehozni. Ebben az esetben az optogenetikai stimulálás hatását többféle kontrollhoz hasonlítottuk. A kontrollok esetén - ha az intakt kontrollokhoz (lásd fekete

oszlopok) hasonlítottuk őket - az operációnak, vagy a vírus jelenlétének nem volt hatása a vizsgált viselkedésekre. Az intakt állatok sokkolás alatt csökkent explorációt és ambulációt, valamint fokozott megrohanásokat mutattak, míg az optogenetikai stimulálás hatására az exploráció szintén csökkent, és a megrohanások száma nőtt, azonban az ambuláció magasabb értéket mutatott a kontrollokhöz képest (exploráció : $F_{(5,52)}=6,94$; $p<0,01$; 33/A. ábra; ambuláció: $F_{(5,52)}=27,13$; $p<0,01$; 33/B. ábra; megrohanás frekvenciája: $F_{(5,52)}=5,62$; $p<0,01$; 33/C. ábra). Az 50 Hz theta burst és a 20 Hz-es stimulációs protokollok között nem volt szignifikáns különbség a fent ábrázolt paraméterekben, illetve ha a stimuláció az MR régió kívül volt („hely kontroll”), vagy csak a terület egy részét érte („részleges stimuláció”), akkor sem volt különbség. Az intakt állatokban megfigyelhető emelkedett dermedéssel töltött idő, nem jelentkezett az optogenetikai stimuláció hatására (33/D. ábra).



34. ábra: Az állat mozgásáról a „stimulációs kontroll” és „teljes stimuláció” csoportból egy-egy reprezentatív példa látható. Az állat lokomócióját a megtett út sebességével (felül; sárga színnel jelölve a leggyorsabban megtett utat) és az állat az aréna különböző területein töltött idejével jellemeztük (alul; piros színnel jelölve, ahol a legtöbb időt töltötte).

Az ábrán egy reprezentatív összehasonlítást láthatunk a „stimulációs kontroll” és „teljes stimulálás” (50 Hz theta burst) csoportból származó állat lokomóciójáról. A sárga vonalakkal jelzett nagyobb sebességből, és a hőterkép alapján kevesebb egy helyben töltött időből csökkent explorációra és növekedett megrohanások frekvenciájára következtethetünk (34. ábra).



35. ábra: Az optogenetikai stimulálás akut hatásának részletes jellemzése. Az exploráció és ambuláció felbontása stimulációs (kék vagy piros jelű) és nem stimulációs (fehér jelű) szakaszokra (A) 50 Hz theta burst ingerlés és (B) elektromos ingerlés során. Az „ON-OFF válasz” ábrázolása (C) exploráció és (D) ambuláció során. „ON választ” az adott csoport színe, az „OFF választ”, pedig fehér szín jelzi; x-tengelyen a 10 db stimulációs periódus látszik; ** $p < 0,01$ vs. nincs stimulus („OFF” válasz)

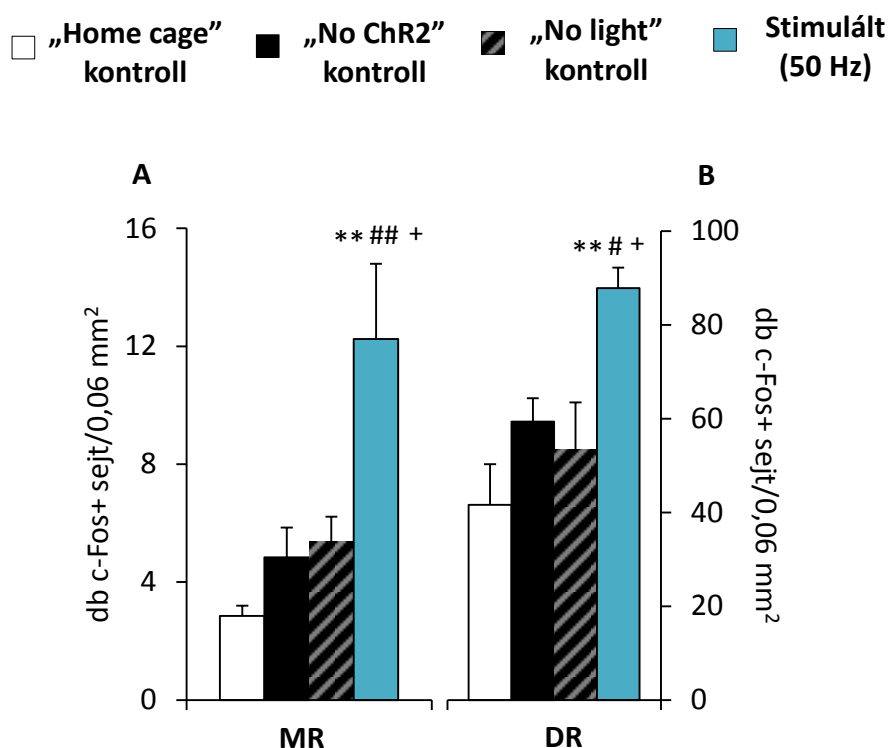
A félelmi kondicionálás 5 perce alatt megfigyelt akut hatáson kívül egy ritmikus viselkedésváltozást is megfigyelhettünk az elektromos lábsokkot vagy optogenetikai stimulálást követően (35/A,B. ábra). Ugyanis amikor kellemetlen inger éri az állatot mozgása felgyorsult, pontosabban az exploráció lecsökkent és az ambuláció

megnövekedett, mely utóbbi részben a megrohanásokból is fakadt. Mind a ritmikus elektromos (exploráció: csoportok: $F_{(1,14)}=13,45$; $p<0,01$; ON-OFF válasz: $F_{(1,14)}=5,10$; $p<0,05$; csoportok x ON-OFF válasz: $F_{(1,14)}=13,29$; $p<0,05$; ambuláció: csoportok: $F_{(1,16)}=6,51$; $p<0,05$; ON-OFF válasz: $F_{(1,16)}=5,35$; $p<0,05$; csoportok x ON-OFF válasz: $F_{(1,16)}=4,63$; $p<0,05$) és mind az optogenetikai ingerlés hatására (exploráció: csoportok : $F_{(5,52)}=2,89$; $p<0,05$; ON-OFF válasz: $F_{(1,52)}=9,81$; $p<0,01$; csoportok x ON-OFF válasz: $F_{(5,52)}=5,23$; $p<0,01$; ambuláció: $F_{(5,52)}=2,90$; $p<0,05$; ON-OFF válasz: $F_{(1,52)}=5,29$; $p<0,05$; csoportok x ON-OFF válasz: $F_{(5,52)}=2,21$; $p=0,06$) szignifikáns különséget tapasztaltunk az „ON-OFF válasz” esetén (35/C,D. ábra). A stimulus alatti 10 másodpercben az optogenetikai ingerlés hatására, illetve az elektromos 1 másodperces ingerlést követő 9 másodpercben csökkent explorációt és megnövekedett ambulációt találtunk, mely optogenetikai ingerlés esetén az 5 perc végéig kitartott, míg az elektromos lábsokk esetén a teszt első felében volt jellemzőbb. A különbség abból is fakadhat, hogy míg a centrális optogenetikai ingerlés hatására nem alakul ki akutan jelentős dermedés, addig az elektromosan lábsokkolt állatok már a félelmi kondicionálás alatt is jelentős dermedést mutatnak, így a lokomócióbeli változások eltűnnek. Várakozásunknak megfelelően az imént említett ritmus nem volt megfigyelhető, sem a 20 Hz-es optogenetikai ingerlés, sem pedig a különböző kontroll csoportok esetén sem.

3.1.1.1.c-Fos aktivitás vizsgálata MR régió ingerlést követően

Ahogy a módszerek leírásban láthattuk a legnagyobb szerotonin felszabadulás az MR régió 50 Hz-es theta burst stimulációjának hatására történt, ezért ezt a stimulációs protokollt alkalmaztuk a c-Fos analízisben részt vevő egereken is. A félelmi kondicionálás céljából alkalmazott optikai stimuláció dorzo-mediálisan (centrálisan) történt az MR régióban. Ebben a kísérletben az MR régió stimulálását saját ketrecükben maradó („home cage” kontroll), a sokkoló dobozba behelyezett, de vírust nem tartalmazó („no Chr2” kontroll) és nem stimulált kontroll állatokhoz („no light” kontroll) hasonlítottuk. Ezen állatok viselkedésbeli adatait nem mutatom be, hiszen eredményeik megegyeztek a korábban bemutatottakkal.

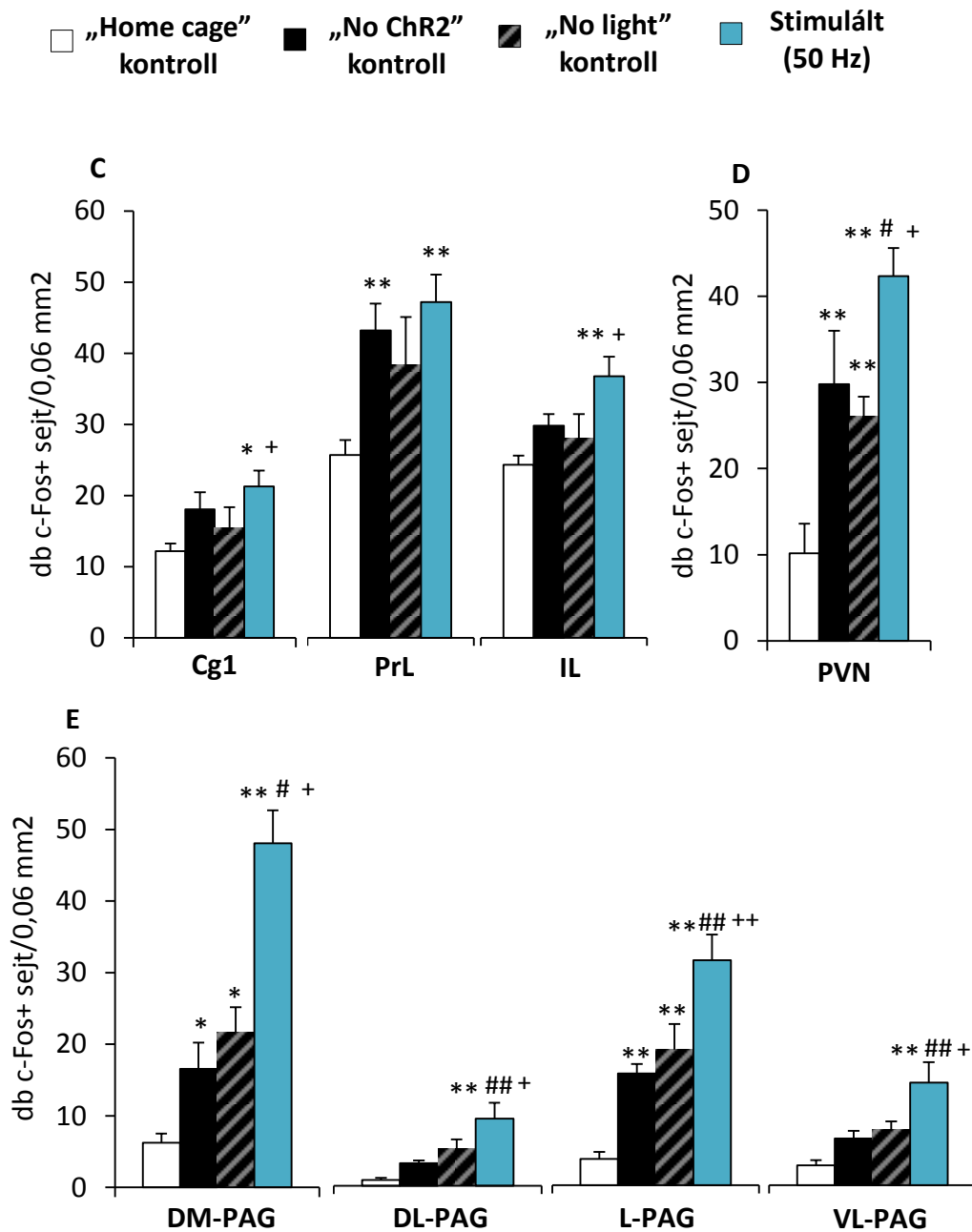
Az agy több területét is megvizsgálva vegyes képet kaptunk a c-Fos sejtaktivitást illetően.

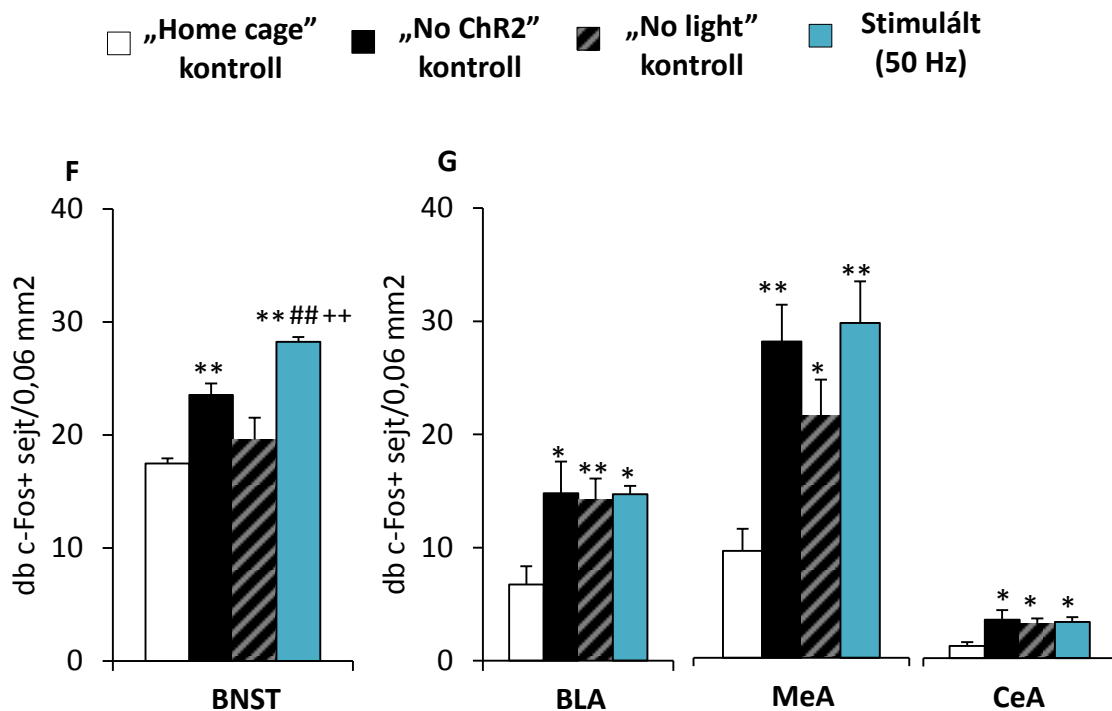


36. ábra: c-Fos aktivitás mérése MR-ben és DR-ben az MR régió optogenetikai stimulációjának hatására. MR: mediális raphe, DR: dorzális raphe; ** p<0,01 vs. „home cage” kontroll; ## p<0,01 vs. „no Chr2” kontroll; # p<0,05 vs. „no Chr2” kontroll; + p<0,05 vs. „no light” kontroll

Az MR és DR régió c-Fos aktivitásában a négy csoport között szignifikáns főhatást találtunk (MR: $F_{(1,29)}=7,38$; $p<0,01$; DR: $F_{(1,28)}=7,62$; $p<0,01$; 36/A,B. ábra). A

post hoc analízis megmutatta, hogy a stimulált állatok mindhárom kontroll csoporttól különböztek, míg a kontroll állatok között nem volt szignifikáns különbség, tehát a hatás független volt az operációtól és attól, hogy az MR régió tartalmazott e vírust.





37. ábra: c-Fos aktivitás vizsgálata különböző agyterületeken MR régió stimuláció hatására.
 Cg1: cinguláris kéreg, PrL: prelimbikus, IL: infralimbikus kéreg, PVN: paraventriculáris mag, DL: dorzomediális, dorzolaterális, L: laterális, VL-PAG: ventrolaterális periakveduktális szürkeállomány, BNST: bed nucleus of stria terminalis, BLA: bazolaterális, MeA: mediális, CeA: centrális amigdala
 * p<0,05 vs. „home cage” kontroll; ** p<0,01 vs. „home cage” kontroll; # p<0,05 vs. „no Chr2” kontroll; ## p<0,01 vs. „no Chr2” kontroll; + p<0,05 vs. „no light” kontroll; ++ p<0,01 vs. „no light” kontroll

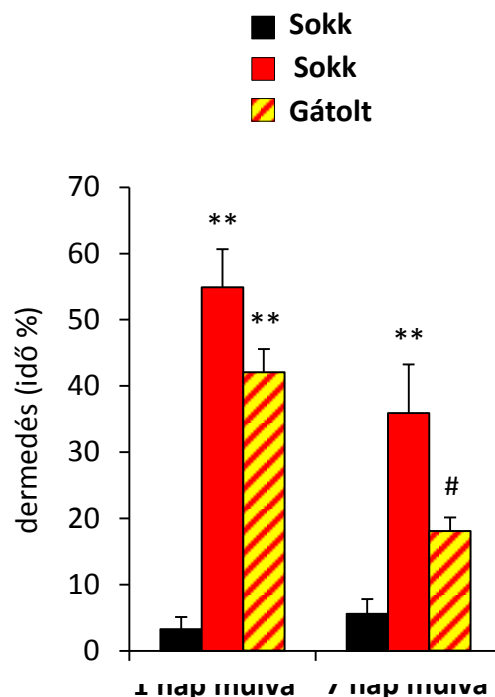
Szignifikáns különbséget találtunk a csoportok közt az mPFC 3 legnagyobb alrészében, az Cg1 ($F_{(3,24)}=3,56$; $p<0,05$), IL ($F_{(3,24)}=6,72$; $p<0,01$) és PrL ($F_{(3,24)}=4,37$; $p<0,05$) régiókban (37/C. ábra). A PAG esetén szintén minden vizsgált alrészében szignifikáns különbséget találtunk a csoportok közt: mind a dorzomediális (dm-PAG) ($F_{(3,24)}=25,55$; $p<0,01$), dorzolaterális (dl-PAG) ($F_{(3,24)}=7,19$; $p<0,01$), laterális (l-PAG) ($F_{(3,24)}=21,94$; $p<0,01$) és ventrolaterális (vl-PAG) ($F_{(3,24)}=7,98$; $p<0,01$) régiók esetén (37/E. ábra). A hipotalamuszban a PVN-ben ($F_{(3,24)}=9,95$; $p<0,01$; 37/D. ábra), valamint az amigdala különböző részeit vizsgálva (BLA ($F_{(3,24)}=4,86$; $p<0,01$), MeA ($F_{(3,24)}=8,19$; $p<0,01$), CeA ($F_{(3,24)}=3,97$; $p<0,05$) 37/G. ábra), illetve a BNST ($F_{(3,27)}=20,36$; $p<0,01$; 37/F. ábra) esetén szintén szignifikáns különbséget találtunk a csoportok közt.

A post hoc analízis szerint a dobozba való behelyezés növelte a c-Fos szintjét a Cg1, IL és dl- és vl-PAG kivételével az összes vizsgált területen. Az MR régió

stimulációja a nem stimulált, vírus kezelt kontrollokhöz képest szignifikáns növekedést okozott a c-Fos aktivitásban a Cgl és IL területén az mPFC-ben, az egész PAG-ban, illetve a PVN-ben és BNST-ben is. Azonban az amigdalában és a hippocampusban nem találtunk specifikus választ az optikai stimulációra.

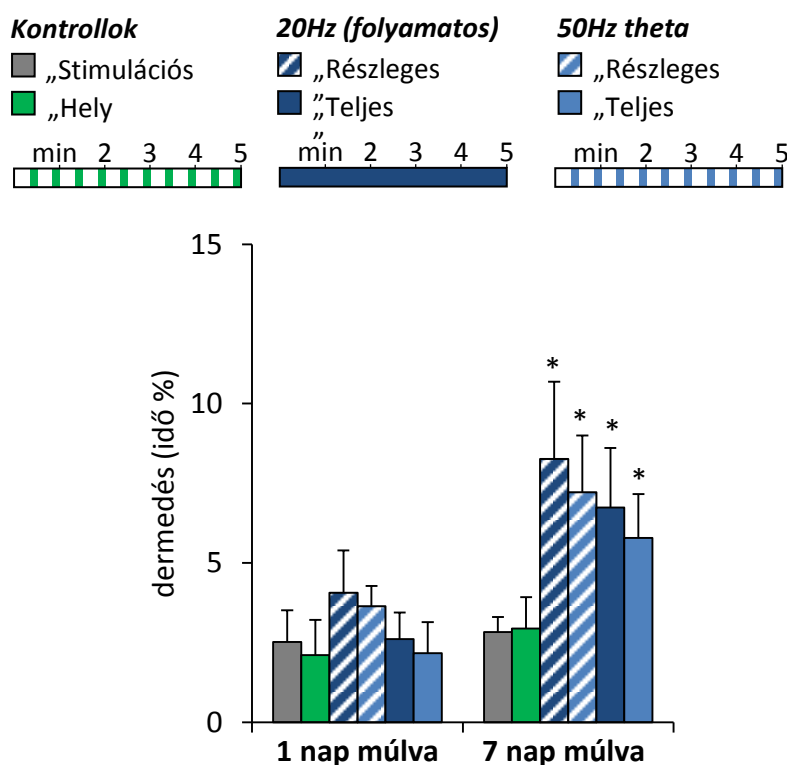
A megfigyelt akut magatartásbeli változók és c-Fos által mért agyi aktivitás között korrelációt is néztünk. A többszörös lineáris regresszió analízis kimutatta, hogy a PAG aktiváció - legnagyobb részben a dm-PAG ($\beta=1,07$; $p<0,01$) és dl-PAG ($\beta=-0,76$; $p<0,01$) - nagymértékben hozzájárul a viselkedésbeli változásokhoz, köztük az „ON-OFF válasz” nagyságához ($F_{(4,16)}=8,11$; $p<0,01$; $\beta=0,82$; (R^2): 67%) és az ambuláció növekedéséhez ($F_{(4,16)}=3,02$; $p<0,05$; $\beta=0,66$; (R^2): 43%) is. Predikciós erő jelentősen nem növekedett, ha a számításba vettük a Cgl és IL területeket is ((R^2): 69-70%).

3.1.2. Félelmi kondicionálás hosszabb távú hatásai



38. ábra: Az MR régió optogenetikai gátlásának hatása félelmi kondicionálás közben és annak rövid és hosszabb távú hatásai a dermedést, mint magatartásbeli változót tekintve. ** $p<0,01$ vs. kontroll; # $p<0,05$ vs. sokk

A gátlás vagy éppen a stimulálás hosszabb távú hatásait megvizsgálva viselkedésbeli változást tapasztaltunk a dermedéssel töltött idő mennyiségében. Ahogy már korábban is láthattuk az elektromos sokkolással hosszabb távon is emelkedett dermedési időt tudunk előidézni, ha visszahelyezzük az állatot a félelmi kondicionálás helyszínére. Vagyis a félelmi memória kialakul és kontextus függő módon jelenik meg. Az operációnak ez esetben sem volt hatása a viselkedésre. A félelmi kondicionálást követő napon, vagyis rövid távon, az MR régió gátlásával kapcsolatban nem találtunk szignifikáns hatást a dermedéssel töltött idő mennyiségét tekintve. Hosszabb távon, 1 hét múlva, a sokkolás alatti halorodopszinnel történő gátlás szignifikánsan csökkentette a dermedés idejét az elektromosan sokkolt állatokhoz képest (csoportok: $F_{(2,29)}=22,02$; $p<0,01$; idő: $F_{(1,29)}=29,76$; $p<0,01$; csoportok x idő interakció: $F_{(2,29)}=9,42$; $p<0,01$; 38. ábra).



39. ábra: Az MR régió optogenetikai stimulálásának hatása félelmi kondicionálás előidézése céljából és annak rövid és hosszabb távú hatásai a dermedést, mint magatartásbeli változót tekintve. * $p<0,01$ vs. kontroll

Bár a MR régió ingerlése nem indukált akut félelmi választ, és dermedést 1 nap múlva sem láttunk, azonban hosszabb távon (1 hét múlva) mind a kétféle ingerlési protokollal (20Hz és theta burst (50Hz)), valamint nemcsak a teljes, hanem a részleges stimulálás esetén is szignifikáns növekedést figyelhettünk meg a dermedéssel töltött időben (csoport: $F_{(5,52)}=2,94$; $p<0,05$; idő: $F_{(2,104)}=42,94$, $p<0,01$; csoport x idő: $F_{(10,104)}=2,06$, $p<0,05$; 39. ábra).

VI. Megbeszélés

1. A PTSD modell

Mind patkányokban, mind egerekben az elektromos lábsokk traumatikus eseménynek bizonyult, amit alátámasztott az állatok sokk alatti, valamint későbbi (1 illetve 7/28nap múlva), a sokkoló környezetbe való visszahelyezés (kontextus) során mutatott viselkedése. Azaz megerősítettük, hogy - mint már a bevezetőben is említettük - a félelmi kondicionálással elő lehet állítani a PTSD tüneteinek magatartási állatmodelljét, melyben a neurális és hormonális változások vizsgálhatók.

2. Magatartási tünetek

A félelmi kondicionálás alatti magatartási változásokat a megnövekedett dermedéssel töltött idő, és a lecsökkent exploráció és önápolás mutatta. A traumatikus környezetbe való visszahelyezés során az állatok ugyanolyan „tüneteket” mutattak, mintha újra sokkon estek volna át, azaz nem volt különbség annak függvényében, hogy mennyi idő múlva helyeztük vissza az egyedeket. Illetve a megfigyelhető viselkedés független volt attól is, hogy patkányban vagy egérben vizsgáltuk a jelenséget. Egerekben a lábsokk hosszabb távú hatásait, a félelem generalizálódását is vizsgáltuk új környezetbe helyezve, és új kihívással szembeállítva. A vad típusú VGluT3 egerek esetén, azt láthatjuk, hogy a sokknak volt hosszú távú, másodlagosan szorongószerű magatartást kiváltó hatása is. A megemelt keresztpalló tesztben kevesebbszer léptek az állatok a nyílt karba, és összességében is kevesebb időt töltöttek ott. A nyílt tér tesztben kevesebbet mozogtak, és kevesebbszer léptek be a centrumba. Korábbi kísérletek is utalnak a félelmi reakció generalizálódására (Jasnow és mtsai 2017), mivel a rágszálók traumatikus eseményt követően csökkent explorációt mutattak nyílt tér tesztben (Kinn Rod és mtsai 2012), és EPM-en (Belda és mtsai 2008), valamint erős hangokra fokozott érzékenység volt jellemző rájuk (Perusini és mtsai 2016), illetve fokozott alkoholfogyasztás (Meyer és mtsai 2013) és a kényszerített úszás tesztben depressziószerű fenotípus is megfigyelhető (Perusini és mtsai 2016) volt.

Ezen eredmények azt mutatják, hogy stressz, vagyis traumatikus esemény indukálta félelmi tanulás állatokban hasonló viselkedési változásokat okoz, mint a PTSD-s betegekben megfigyelhető tünetek. Az intenzív pszichés distressz érzet külső kulcsingerek (melyek szimbolizálják a traumatikus eseményt, pl. környezet) hatására

megjelent. A patkányok esetén a tünetek 1 hónapig is fennálltak, mely intervallum az állatok életében jóval hosszabb időszakot jelöl. Egy relatív skálán, ha egy hetet nézünk egy 2,5-3 évig élő patkány életében, ez emberben nagyjából 6 hónappal egyenlő (ha 75 évvel számolunk) (Cohen és mtsai 2014). Más szerzők szerint is rágcsálónál már egy hét után megfigyelhetők magatartási változások, és ezek nem változnak akkor sem, ha egy hónappal később vizsgáljuk őket (Cohen és mtsai 2004).

3. Stresszhormonok

Érdekes módon a lábsokk magatartásváltozást előidéző stresszkeltő hatása nem egyértelműen követhető nyomon a HHM tengelyt jellemző hormonszintekben. Patkányoknál az ACTH-szint egyértelműen megemelkedett az 5 perces stressz hatására mind a sokkolás alatt, mind ha csak a sokkoló környezetbe lett visszahelyezve az állat a sokkot nem kapott, csak dobozba helyezett állatokhoz képest. Ezzel szemben az 5 perc nem volt elég, hogy a kortikoszteron szintekben jelentős változást okozzon, illetve, hogy az egerekben mérhető ACTH vagy kortikoszteron emelkedés legyen kimutatható a sokk hatására. Az irodalmi eredmények sem teljesen egyértelműek. Humán vizsgálatokban is találhatunk példát kortizol szint emelkedésre (LemieuxCoe 1995, Maes és mtsai 1998) és csökkenésre (Boscarino 1996, Yehuda és mtsai 1990) PTSD-ben szenvedő betegekben. Egy elmélet szerint a megnövekedett negatív visszacsatolás következtében, csökken a kortizol szint (Yehuda 1997, Yehuda 2001). Mások szerint hosszabb távú, a stresszoroknak való krónikus kitettség felborítja a nyugalmi kortizol szint napi ritmusát, és ahelyett, hogy egy hormonszint emelkedés lenne patkányokban a sötét periódus alatt, mind a nappali mind az éjszakai periódusban is van egy-egy (Perusini és mtsai 2016). Így attól függően, hogy épp a ciklus melyik részén tartunk, a kontroll állatokkal való összehasonlítás eredményezhet magasabb, de alacsonyabb értékeket is. A glükokortikoid szint változásai nemcsak a HHM tengelyre hatnak negatív visszacsatolással (de Kloet és mtsai 2007, Yehuda és mtsai 2002), hanem más agyterületeken elhelyezkedő receptoraik révén, például növelhetik a neuronális aktivitást a BLA-ban is (Conrad és mtsai 2004, Poulos és mtsai 2014).

4. Agyi aktivitás mérése

A félelmi kondicionálást követő magatartási változásokkal szemben - patkány kísérleteinkben - nem volt mindegy, hogy a neuronális aktivitást sokkolást követő

napon vagy 28 nappal később vizsgáltuk. Ez tovább erősíti állatmodellünk „érvényességét”, hiszen PTSD betegekben is hosszú távú strukturális változásokról számolnak be (Cisler és mtsai 2014), melyek alapján három agyterület - mPFC, hippocampus, amigdala - tűnik kiemelkedően fontosnak a félelmi kondicionálásban (Dejean és mtsai 2015, MarenQuirk 2004). Sok tanulmány bizonyítja a reciprokális kapcsolatot az mPFC és az amigdala között (Arruda-CarvalhoClem 2015, GiustinoMaren 2015), pontosabban a PrL a BLA-n keresztül serkenti, az IL, pedig az interkaláris sejteken (gátló sejtek a BLA-ban, melyek bemenetet adnak a CeA magba) keresztül gátolja a CeA aktivitását (4. ábra) (Marek és mtsai 2013, Vidal-Gonzalez és mtsai 2006). A CeA, mint egy kimeneti állomás, közvetlenül serkenti az agytörzset, a PAG-ot és a hipotalamuszt, kiváltva ezzel a félelmi választ (pl. dermedést) (Pare és mtsai 2004).

Kísérletünk során 1 nappal a félelmi kondicionálást követően, nem találtunk különbséget az egyes mPFC régiók között, illetve aktivitásuk sem különbözött szignifikánsan a kontroll állatoktól. Még érdekesebb, hogy a BLA csökkent aktivitást mutatott 24 óra múlva a kontrollokhoz képest, míg a CeA aktivitása nem különbözött a kontrolloktól. Elképzelhető, hogy ebben az esetben a CeA-nak a PFC-ből a paraventriculáris talamuszon – és nem a BLA-n – keresztüli bemenete került túlsúlyba (Arruda-CarvalhoClem 2015). Azonban kisebb növekedést láthattunk sokk hatására a MeA aktivitásában, mely a hipotalamuszsal együtt az olfaktorikus információkra adott érzelmi válaszok (pl. predátortól való félelem) kialakításában vesz részt (Choi és mtsai 2005, Keshavarzi és mtsai 2014).

28 nap múlva szintén nem találtunk különbséget a PrL és IL aktivitásában, azonban mindkét terület szignifikánsan kisebb aktivitást mutatott a kontroll állatokhoz képest. Más kutatások szerint az IL régió léziója vagy farmakológiai gátlása meggátolja a kioldódást, aktivitása pedig pozitívan korrelál a félelem csökkenésével, és a PrL gátlásával is csökkenthető volt a dermedés (ChangMaren 2010, CorcoranQuirk 2007, Sierra-Mercado és mtsai 2011). A Cg1 mikrostimulálása nem befolyásolta a félelmi válasz kialakulását (Vidal-Gonzalez és mtsai 2006). Ennek megfelelően mi sem találtunk különbséget a kontroll vagy előzetesen sokkolt patkányok Cg1 c-Fos aktivitásában sem 1 sem 28 nappal a félelmi kondicionálást követően.

A hippocampus szerepe fontos a félelmi kondicionálás során, hiszen a térbeli memória kialakításán keresztül fontos szerepe van a félelem környezethez való kötésében (Dejean és mtsai 2015, GiustinoMaren 2015, MarenQuirk 2004, Selden és mtsai 1991). Azonban aktiválódása nem szükségszerű, ugyanis más kutatások szerint HC lézió ellenére is kialakul a kondicionált félelmi válasz (Frankland és mtsai 1998, Maren és mtsai 1997, Wiltgen és mtsai 2006). Kísérletünkben egy nap múlva kisebb sejtaktivitást láttunk a HC-ban, míg 28 nap múlva nem tapasztaltunk különbséget a kontrollokhöz képest. Eredményeinkkel némileg összhangban a PTSD-ben szenvedő betegen a HC csökkent méretéből adódóan csökkent működést mutat, melynek következtében a beteg képtelen a kioltódásos tanulásra, azaz nem tudja megtanulni, hogy a környezet immár nem veszélyes (O'Doherty és mtsai 2015, Woon és mtsai 2010). Részben ez magyarázhatja a mPFC - IL - csökkent aktivitását is, mely a tanulási folyamat zavarát, azaz az asszociáció kialakulásának hiányát jelzi (Milad és mtsai 2009).

5. CP-AMPA receptor szerepének vizsgálata

Az AMPA receptor félelmi memória kialakulásában és kioltódásában játszott szerepének megítélése nem egységes, hiszen az AMPA receptor KO egerekben mind a félelem megjelenése, mind a félelmi kioltódás folyamata is zavart szenvedett (Dachtler és mtsai 2011, Feyder és mtsai 2007, Humeau és mtsai 2007), ennek ellenére a farmakológiai kezelések főként a félelmi memória kioltódásában igazolták szerepét (Dalton és mtsai 2008, Yamada és mtsai 2009, Zushida és mtsai 2007). Más kísérletek lokalizálták is az AMPA receptorokat, mégpedig a félelmi memória kioltódásában, az mPFC ventrális részében (IL) lévők fontos szerepére hívták fel a figyelmet (Lisboa és mtsai 2010, MorganLeDoux 1995, Zushida és mtsai 2007). Az eltérő eredményekben közre játszhat az alegység összetétel, ezáltal az ionáteresztő képesség változása, ugyanis ha hiányzik a GluA2 alegység az AMPA receptorból, akkor a csatorna a kalciumot is képes átengedni a sejtmembránon, míg alapvetően csak Na^+ és K^+ számára átjárható. A GluA1/GluA2 receptor-alegység arány növekedéséből - közvetett módon - következtethetünk CP-AMPA receptor típus mennyiségének növekedésére. Amíg a félelmi memória kioltódásával kapcsolatban leginkább a CP-AMPA receptorokat emlegetik, más tanulmányok azt feltételezik, hogy a GluA2 alegységet tartalmazó - kalciumot nem-áteresztő - AMPA receptoroknak az érzékenység beállításán keresztül

van hatása a szinaptikus plaszticitásra (Dalton et al. 2008; Gainey et al. 2009; Isaac et al. 2007; Kim et al. 2007).

Vizsgálatunkban az AMPA receptor alegységeinek mRNS szintjét szignifikánsan befolyásolta a félelemi kondicionálás, és ezek a változások idő és agyterületfüggő módon mentek végbe (Myers és mtsai 2011). A vmPFC-ben - vagyis PrL és IL-ben - mindkét alegység (GluA1 és GluA2) mRNS szintje növekedett a félelemi kondicionálás hatására, mely alapján itt a CP-AMPA receptor fokozottabb szerepe nem bizonyítható. Eltérő mRNS arányt az amigdala esetén láthattunk. 1 és 28 nappal a félelemi kondicionálás után a GluA1/GluA2 arány nőtt a sokkolt állatok esetén, melyből arra következtethetünk, hogy a CP-AMPA receptor mennyisége megemelkedett. Nem találtunk különbséget a BLA és CeA al régiók között (Zelena és mtsai 2016). Ezek az eredmények összhangban vannak azokkal a korábbi adatokkal, melyek emelkedett CP-AMPA receptor neurotranszmissziót találtak 24 órával a félelemi kondicionálás után (ClemHuganir 2010, MahantySah 1998). Más kutatások szerint CP-AMPA receptor szintje emelkedést mutatott az amigdalában különböző plaszticitást kiváltó stimulusok hatására, és ez a magas szint az idegi hálózatot „plasztikus” állapotban tarthatja (Shepherd 2012).

Összességében a GluA1/GluA2 arány változása alátámasztja, hogy neuronális plaszticitás révén az amigdaláris CP-AMPA receptornak szerepe van a félelemi tanulásban, azonban a vmPFC esetén más folyamatok állhatnak a háttérben. A két terület (PFC és amigdala) eltérő reakcióját bizonyítja más tanulmány is, melyben AMPA receptor allosztérikus modulátorát (PEPA: nem alegység szenzitív) injektáltak közvetlenül a vmPFC-be és nagyobb hatást láttak a félelemi kondicionálás kiváltotta viselkedésben, mint amikor az amigdalába adták. Eredményeink értékelésekor azonban számításba kell azt is vennünk, hogy a CP-AMPA receptor kifejeződésének arányát a szinapszisban az mRNS szinteken kívül más folyamatok is befolyásolják (pl. receptor összeszerelése, szállítást végző molekulák aránya, foszforiláció mértéke, stb.) (Geiger és mtsai 1995, Jonas és mtsai 1994, Studniarczyk és mtsai 2013).

Farmakológiai vizsgálatok szerint CP-AMPA receptor antagonistá alkalmazása felgyorsítja a félelemi kioltódás folyamatát (ClemHuganir 2010, Fortin és mtsai 2010, MahantySah 1998). Clem és Huganir cikke szoros összefüggést mutatott a félelemi kioltódás és CP-AMPA receptor szinapsziszból való eltávolítása között a laterális

amigdalában. Popova és munkatársai szerint a félelmi kioltódás növelte a GluA2 mRNS szintet a vmPFC-ben, és az amigdala három területén (laterális, basolaterális és centrális) is (Popova és mtsai 2014). Ezen eredmények összhangban vannak az általunk megfigyelt hatással is, hiszen a CP-AMPA receptor antagonistá, IEM-1460 adása a traumatikus környezetbe való visszahelyezés előtt csökkentette a félelmi reakció kialakulását. Ez a hatás független volt attól, hogy röviddel (1 nap múlva) vagy hosszabb idő (28 nap múlva) eltelte után alkalmaztuk a kondicionálást követően és már egyszeri kezelést követően is jelentkezett. Érdekességként megállapíthatjuk, hogy nem tapasztalható egyértelmű dózis-hatás összefüggés, mivel az 1mg/kg hatásos volt, viszont a nagyobb, 3mg/kg-os dózis már nem (Zelena és mtsai 2016). Ez annak is lehet a következménye, hogy nagyobb koncentrációk esetén az antagonistá elveszti specifikusságát és a CP-AMPA-receptoron kívül más receptorokra is hathat (az ID50-je NMDA-receptor gátlásra 310 μ M, míg CP-AMPA-receptorra 3.1 μ M (Magazanik és mtsai 2003)).

Eredményeink arra utalnak, hogy CP-AMPA-receptor-határozott befolyással bír a félelmi memória kialakulására, bár szerepének súlya eltérő az egyes agyterületek között. CP-AMPA-receptor-antagonistá IEM-1460 alkalmazásával már egyszeri alkalommal elősegítettük a félelmi reakció csökkenését. Ez ígéretes terápiás lehetőség, hiszen szinte az egész agyat behálózó glutamát-rendszert specifikusabban tudjuk vele befolyásolni. Természetesen további vizsgálatokat igényel lehetséges jövőbeni klinikai alkalmazása, de a cél új kezelési stratégiák kifejlesztése, melyek nem csak a tüneteket csökkentik, hanem képesek az averzív memória felszámolására (Cain és mtsai 2012, Fitzgerald és mtsai 2014).

6. VGluT3 hiány hatásainak vizsgálata

6.1. Általános jellemzés

A VGluT3 KO törzs saját tenyészetként van fenntartva, ezért fontos volt megvizsgálni, hogy a saját kolóniánk is az irodalomban leírt eltéréseket mutatja. Így igazoltuk, hogy a VGluT3 hiány következtében süketség alakul ki bennük (Seal és mtsai 2008).

A VGluT3 speciális elhelyezkedése és szerepe miatt további kísérletek előtt fontos volt megvizsgálunk, hogy nincs e valamilyen más oka a megfigyelt viselkedési változásoknak, azaz a kapott eredmények nem másodlagosan valamilyen egyéb fiziológiai különbség hatására jönnek létre. Éppen ezért az alap fiziológiai változók genotípusok közti összehasonlításával kezdtük vizsgálatainkat, mely során nem találtunk szignifikáns különbséget a vad típusú és VGluT3 hiányos egerek között. Érdekességként az egyetlen kivétel a KO állatok megnövekedett vízfogyasztása volt (Horvath és mtsai 2017). Az emlős állatok vízháztartásának szabályozásában a központi szerepet az AVP játssza, mely a vízvisszavételt szabályozza (BoubyFernandes 2003). Az AVP mRNS szintjének elemzése azonban nem mutatott különbséget a genotípusok között. Egy másik lehetséges molekula, mely szintén fontos szerepet játszik a só-vízháztartásban az aldosteron, mely hasonló a - stressz válaszban is részt vevő - glükokortikoidokhoz, olyan értelemben, hogy ugyanazon receptorokat használja. Közvetlen bizonyítékunk nincs az aldosteron szerepére, de az irodalomból tudjuk, hogy az aldosteron mennyisége érzékeny az ACTH-ra, mely pedig a HHM tengely egyik alkotója (Varga és mtsai 2013). Mivel azt tapasztaltuk, hogy VGluT3 hiány hatással van HHM tengelyre, közvetetten hatással lehet az aldosteron szintre, mely következtében megváltozhatott az egerek só-vízháztartása.

6.2. Félelmi kondicionálás

Ebben az esetben is félelmi kondicionálást alkalmaztunk, hogy modellezzük a PTSD-szerű tüneteket (Van Dijken és mtsai 1992). VGluT3 KO állatok fokozottabb félelmi választ mutattak, mint a vad típusúak, ugyanis több időt töltöttek dermedéssel már a sokk alatt, illetve 1 és 7 nappal később is. Más vizsgálatok, azt mutatták, hogy a

transzporternek fontos szerepe lehet a sérülés okozta mechanikai és hideg okozta fájdalom érzékelésében (Draxler és mtsai 2014, Yang és mtsai 2015, Yang és mtsai 2012). Azonban méréseink azt mutatták, hogy a megfigyelt magatartási válaszok nem a VGluT3 hiány miatt megváltozott érzékelési eltérésekből fakadnak, mivel sem a hő, sem az elektromos stimulus fájdalomküszöbe nem különbözött a genotípusok közt (Horvath és mtsai 2017). A félelmi kondicionálás eredményeiből - csökkent mozgékonyág és fokozott dermedés - arra következtetünk, hogy a VGluT3 hiánya elsősorban nem a félelmi memória vagy PTSD-szerű tünetek hosszabb távú kialakításáért felelős, hanem egyfajta belső félelem kialakulásában játszik szerepet, ugyanis a KO állatok által mutatott dermedés aránya végig magasabb volt, mint a vad típusúaké.

Érdekes módon a nyílt tér tesztben a kontroll VGluT3 hiányos állatok csökkent mozgékonyágot mutattak a vad típusúakhoz képest. Mozgékonyágbeli különbség nem volt megfigyelhető a zárt kari belépések számában EPM esetén, illetve a rotarodról való leesés latenciájában sem, így elmondható, hogy nem a mozgáskoordinációban megfigyelhető rendellenesség okozza ezen eredményeket (Gras és mtsai 2008, Seal és mtsai 2008). Valószínűbb, hogy a megfigyelt csökkent lokomóció az új környezettől való félelem miatt alakult ki. Ezt az elképzelést támasztja alá az is, hogy ha az OF tesztet meghosszabbítjuk 15 percre, a teszt utolsó harmadában mozgékonyágbeli különbség eltűnik a genotípusok közt, ezáltal úgy tűnik, hogy amint a VGluT3 hiányos állat megszokja az új környezetet, „bátrabbá” válik.

Habár a félelmi reakcióban és szorongás kialakításában és fenntartásában résztvevő idegi hálózatok nem teljesen egyeznek (FlandreauToth 2017), a generalizált félelem könnyen vezethet szorongás kialakulásához (Jasnow és mtsai 2017). Ezeket a folyamatokat állatmodellekben nem könnyű elkülöníteni egymástól (pl. a lokomóció csökkenése mindkét esetben jellemző lehet), illetve eredményeink, egy harmadik lehetőséget is felvetnek, mely egy érzékenyítési folyamatként, belső félelemként is jellemezhető. Ellentmondásosnak tűnik, hogy egy serkentő neurotranszmitter ürülésében szerepet játszó glutamát transzporter hiánya félelmet és szorongásszerű tüneteket produkál, amihez inkább fokozott aktivitást társítanánk. Valószínű, hogy a fenotípus megjelenése inkább a VGluT3 speciális elhelyezkedéséből, más neurotranszmitterekkel való kolokalizációjából adódik, illetve ezt kiegészítve egyes kutatások arra is utalnak, hogy a VGluT3-nak szerepe van a retrográd

neurotranszmisszóban is (Harkany és mtsai 2004). Valószínűleg a transzporter hiánya felborítja az egyensúlyt a félelmi memória és szorongásszerű tünetek kialakításában résztvevő idegi hálózatokban is, pl. PFC, hippocampusz, amigdala (GiustinoMaren 2015).

6.3. Korai posztnatális kor

Felnőtt állatokon végzett vizsgálataink és korábbi tanulmányok is azt igazolták, hogy a felnőtt VGluT3 KO állatok szorongószerű tüneteket mutatnak (Amilhon és mtsai 2010). A mi kísérleteink is alátámasztották, hogy a szorongó fenotípus már a fejlődés korai szakaszában is megfigyelhető (Balazsfi és mtsai 2016), ugyanis az anyai szeparációt követően a fiatal VGluT3 hiányos állatok több ultrahangot bocsátottak ki a vad típusúakhoz képest. Az anyai szeparáció indukálta ultrahang kibocsátást nagy mértékben befolyásolja a fiatal állatok érettségi szintje (Varga és mtsai 2015). Éppen ezért a tesztek előtt megmértük az állatok súlyát, mint egyfajta fokmérőjét a fejlettségnek, de a genotípusok között nem találtunk különbséget. Így valószínű, hogy a megfigyelt különbségek egy korai szorongós fenotípusra utalnak, és nem másodlagos következményei a VGluT3 hiány fejlődésre gyakorolt hatásának.

Mivel a szorongás stressz-függő betegség, a magatartási változások háttérben álló esetleges HHM tengely eltéréseket is megvizsgáltuk. A fiatal VGluT3 hiányos állatokban az immunrendszert aktiváló LPS stresszor hatására nagyobb ACTH és kortikoszteron szint emelkedést láttunk, mint a vad típusúaknál.

Habár VGluT-ek megtalálhatóak a HHM tengely egyes részein (pl. VGluT1 és 2 a hipotalamuszban, CRH sejtek beidegzése (Herzog és mtsai 2001)), a VGluT3 jelenlétére eddig nincs bizonyíték. Éppen ezért valószínűbb, hogy a VGluT3 által biztosított glutamát kotranszmisszió a szerotonerg, kolinerg és GABAerg neuronok kapcsolatain keresztül befolyásolja a HHM tengelyt. 5-HT1A receptor antagonistá szisztémás adása megakadályozza a „restraint” (mozgásában korlátozott) stressz okozta kortikoszteron emelkedést hím patkányokban (Goel és mtsai 2014). A DR - melyben a szerotonerg sejtek jó része található - elektromos stimulációja ACTH felszabadulást okoz (Weidenfeld és mtsai 2002), míg léziója csökkent hormonális stressz választ eredményez (Jorgensen 2007). A kolinerg rendszer szerepe a stressz reakcióban, szintén

igazolt. A PVN-be közvetlenül injektált acetilkolin növelte az ACTH felszabadulást, sőt az acetilkolin gátolta a gyulladási folyamatokban részt vevő citokinek termelődését is. Utóbbi az LPS injekció indukálta HHM tengely aktivációra lehet hatással (OfekSoreq 2013). A GABAerg rendszer ismert gátló tónusának megváltozása a HHM tengelyre is, befolyásolhatja a stressz reaktivitást (Herman és mtsai 2004).

Az imént említett neurotranszmitter rendszerek pontosan beállított egyensúlyának felborulása, illetve a HHM tengelyre gyakorolt hatása okozhatja a már ekkor jellemző, veleszületett szorongó fenotípus kialakulását, mely érzékenyítést végez a jövőbeni stresszorokkal szemben.

6.4. HHM tengely felnőtt állatokban

Mivel a PTSD-t stressz váltja ki, és a HHM tengely zavarai is szerves részét képezik a kórképnek, ezért megvizsgáltuk, hogy a VGluT3 hiánya felnőtt állatban is zavarokat okoz-e a HHM tengely működésében, mely hozzájárulhat a szorongó fenotípus kialakulásához. Azt találtuk, hogy a KO egereknek már nyugodt körülmények közt is magasabb a CRH mRNS szintje a hipotalamuszukban, azonban ez különbség nem okozott krónikus fiziológiai változásokat (stressz triádnak nevezett szervek súlyában nem volt különbség) (Selye 1985), és a nyugalmi hormon szinteket sem befolyásolta. A CRH szintek egy lehetséges magyarázata az élethosszig csökkent negatív visszacsatolás lehet, mert a stressz helyzetekre a VGluT3 KO állatok csökkent glükokortikoid szekrécióval reagálnak. A CRH-szint eltérések valószínűleg más agyterületek - és nem a HHM tengely - befolyásolása révén járhatnak hozzá a magatartási zavarokhoz. Irodalmi adatok szerint a CRHR1 receptor nagy mennyiségben expresszálódik a limbikus rendszerben, amelynek, nagy szerepe van az érzelmi zavarok kialakulásában, mint pl. PTSD-ben (Kuhne és mtsai 2012, Van Pett és mtsai 2000). Sőt, preklinikai vizsgálatok alapján néhány CRHR1 antagonistá potenciális terápiás szernek tűnt szorongásos zavarokban (Holsboer-Ising 2008).

Manapság széles körben elfogadott tény, hogy alacsony kortizol válasz emberekben nagyobb kockázatot jelent traumát követő PTSD kialakulására (Yehuda és mtsai 1998) és PTSD betegek, alacsonyabb hormon szinttel reagálnak más stimulusokra is (Daskalakis és mtsai 2013). Más kísérletek is kapcsolatot mutattak a csökkent

kortikoszteron emelkedés és fokozott félelmi reakció kialakulása közt (Browne és mtsai 2014, Chester és mtsai 2014, Verma és mtsai 2016). Ezen irodalmi adatok alapján elmondható, hogy a VGluT3 KO állatok csökkent stresszre adott hormonválaszai hozzájárulhatnak az érzékenyebb fenotípus kialakulásához.

Összefoglalva az alap fiziológiai és viselkedési jellemzőkben alapvetően nem különböztek a VGluT3 hiányos állatok a vad típusúaktól, viszont a csökkent mozgékonyág, új környezettől való félelem, hosszabb alkalmazkodást igényel a különféle viselkedés tesztek esetén is. Eredményeink alapján a VGluT3 fontos szerepet játszik az érzékenyítésben, úgynevezett belső félelem kialakításában. A VGluT3 expressziójának hiánya befolyásolja a HHM tengely működését, mely csökkent hormonválasszal járul hozzá az imént említett érzékeny fenotípushoz.

7. A mediális raphe régió optogenetikai manipulálása

A félelmi kondicionálás közben alkalmazott MR régió optogenetikai gátlása csökkentette a lábsokk félelmet keltő hatását, illetve a félelmi kondicionálást helyettesítő MR régió optogenetikai stimulálása hasonló viselkedési változásokat idézett elő, mint az elektromos lábsokkolás.

Egy régóta fennálló elmélet szerint a szerotonin egyfajta „viselkedés gátló” szerepet tölt be az agyban (Soubrié 2010). Ezt az elméletet olyan eredmények támasztják alá, mint pl. 5-HT hiány - mely adódhat farmakológiai gátlásból vagy lézió következtében - esetén megnövekszik az összerenzenési (startle) válasz (DavisSheard 1974, Davis és mtsai 1980), illetve megnövekszik a mozgékonyág (Correia és mtsai 2017, Eagle és mtsai 2009). Ezzel ellentétben az MR régió optogenetikai gátlása során nem tapasztaltunk magasabb ambulációt, sőt az optogenetikai stimuláció hatására az ambuláció mennyisége még növekedett is a félelmi kondicionálás napján. Más szerzők azt találták, hogy a DR szerotonerg sejtjeinek optogenetikai aktivációja frekvencia függő módon csökkentette a lokomóciót (Correia és mtsai 2017), míg a mi eredményeink az MR régió stimulálása esetén ennek ellenkezőjét mutatták. Sőt, ha a félelmi kondicionálás napján az 5 perces tesztet még részletesebb elemezzük, ritmust figyelhetünk meg, mind az elektromos (10 darab 1 másodperces ingerlés) mind pedig az MR régió 50Hz theta burst frekvenciával való optogenetikai stimulálása esetén. Az előidézett gyors viselkedési változások rövid időn belül visszafordíthatók voltak és a 20Hz-es stimulálás és kontrollok esetén ez a ritmus nem volt megfigyelhető (Balazsfői és mtsai 2017). Ez is alátámasztja, hogy a DR-ből regisztrált tónikusan felszabaduló szerotoninnal ellentétben az MR régió stimulálás során egy gyors, fázikusan ürülő neurotranszmitter szerepe kerülhet előtérbe (Szonyi és mtsai 2016).

Az eredményeink és az irodalmi adatok ellentmondása két okból is adódhat. Az egyik, hogy a korábban alkalmazott technikák nem voltak túl specifikusak - oldalkamrába injektált farmakonok, lézió (Gatély és mtsai 1985) -, illetve ha specifikusabban is vizsgálták a szerotonerg rendszert, akkor leginkább a DR-t célozták meg (Correia és mtsai 2017). Az MR esetén számításba kell vennünk azonban, hogy újabb eredmények szerint az MR régió idegsejtjeinek összetétele elég változatos - csak kisebb százaléká egyedül szerotonerg, más része glutamáttal kolokalizált (VGLuT3

jelenléte figyelhető meg) vagy glutamaterg -, így ezen mag ingerlése során sokkal összetettebb neurotranszmitter összetételt és funkciót kell feltételeznünk.

Széles körben elfogadott elmélet, hogy a szerotonin rendszernek és ezzel együtt a raphe-nak fontos szerepe van a negatív életeseményekre adott válaszban, azok jövőbeni elkerülésében (Schipper és mtsai 2017), félelmi memória kialakításában (Aikins és mtsai 2017, Schmidt és mtsai 2016), félelemhez köthető viselkedésekben (Takeda és mtsai 2017), félelem okozta szorongás kialakulásában (Gorka és mtsai 2017, Hatherall és mtsai 2016), illetve ha valamilyen büntetéssel járó feladatot kell megoldani (Daw és mtsai 2002, DeakinGraeff 1991, OhmuraYoshioka 2017). Vizsgálatunkban az MR régió optogenetikai stimulációja nem indukált dermedést akutan, ezzel arra utalva, hogy ez az agyterület nem tagja a közvetlen félelmi reakció kialakításáért felelős hálózatnak (mint pl. PAG) (Bittencourt és mtsai 2004, Johansen és mtsai 2010). Bár az igaz, hogy a stimuláció hatására az állatoknál agitációt figyelhettünk meg, mely egyfajta kellemetlen helyzetre utal az állat szemszögéből, melyet a csökkent exploráció és averzív esemény kiváltotta megrohanások (mely a „küzdj vagy fuss” félelmi reakcióból a futást jelentheti) jellemeztek. Az agitációt intakt, elektromosan sokkolt állatoknál is megfigyelhettünk, igaz náluk ez társult a dermedéssel is. Az MR régió gátlása ezt az agitációt némileg csökkenteni tudta (több exploráció), és a dermedéssel töltött idő is szignifikánsan kevesebb volt.

Azonban sem az optogenetikai gátlás pozitív hatásait sem a serkentés averzív természetét tekintve az MR külső szabályozása nem váltott ki viselkedésváltozást (dermedést illetően) a félelmi kondicionálást követő nap, mely arra utal, hogy a MR régió önmagában nem elegendő a félelmi memória kialakításában, vagyis az esemény és a környezet összekapcsolása nem történik meg. Ezzel szemben hosszabb távon, egy hét múlva MR régió gátlás esetén kevesebb, serkentés esetén több dermedést láttunk, mely mégis valamilyen memória nyom kialakulását feltételezi (Balazsfi és mtsai 2017). Korábbi vizsgálatok is arra utalnak, hogy MR régió kapcsolatban áll - indirekt módon - olyan neuronhálózatokkal, melyek a traumatikus élmények félelmi memóriává alakításában vesznek részt, és melyek szerepet játszanak ezen emlékek hasonló környezetben való felidézésében, vagy valamilyen kiváltó eseménnyel kapcsolatban (Amo és mtsai 2014, Avanzi és mtsai 1998, Liu és mtsai 2015, Silva és mtsai 2004, Wang és mtsai 2015). A vizsgálatunkból úgy tűnik, hogy MR régió önmagában,

valamilyen moduláció hatására direkt módon képes befolyásolni a távoli félelmi memória kialakulását.

A félelmi memória kialakulásában részt vevő agyterületek szerepét c-Fos immunhisztokémiával elemeztük. Az optogenetikai stimuláció hatására akutan c-Fos aktivációt mértünk a MR-ban, sőt DR-ban is, így úgy tűnik a raphe egészére hatással voltunk. A raphe kiterjedt és összetett kapcsolatokkal bír, és efferensei behálózzák az egész előagyat, köztük, olyan területeket, melyek fontosak a memória nyomok kialakításában, például a prefrontális, entorhinális kérget, hippocampuszt (Imai és mtsai 1986, Muzerelle és mtsai 2016). Az optogenetikai stimulálás averzív hatását az is bizonyítja, hogy emelkedett aktivitást találtunk a PVN-ben, melynek a stressz válasz kialakításában fontos szerepe van, illetve a BNST-ben (Maren 2011), mely pedig többek között az éber figyelem - készenléti állapot - fenntartásában vesz részt. Szintén szignifikánsan több c-Fos jelet láttunk a Cg1, és az IL területén (HayesNorthoff 2011), mely az averzív stimulus feldolgozásában és a PAG régiókban, melyek a viselkedésbeli válasz közvetlen kialakításában vesznek részt (BandlerDepaulis 1991). Azonban az MR régió optogenetikai stimulációja nem volt elegendő ahhoz, hogy tényleges félelmi reakciót, dermedést kiváltson, ennek megfelelően akutan a félelmi kondicionálás alatt nem láttunk c-Fos aktivációt sem az amigdalában sem pedig a hippocampuszban, melyek igen fontos szerepet játszanak félelmi válasz kialakításában (DuvarciPare 2014, Sanders és mtsai 2003).

Ezenkívül, korrelációt figyelhettünk meg a félelmi kondicionálás során az akut „ritmikus” viselkedési válasz („ON-OFF” válaszok) és a dm/dl-PAG-ban mérhető c-Fos aktiváció mértéke között. Ez arra utal, hogy a megfigyelt magatartási változások előidézésében fontos szerepe volt a PAG-nak, amely az averzív stimulusokra adott viselkedési változások kialakításáért felelős (Schenberg és mtsai 2005). A dorzális része főként a menekülési válasszal hozható kapcsolatba (BandlerDepaulis 1991), mely a kísérletünkben a megnövekedett ambulációval, megrohanásokkal, és csökkent explorációval magyarázható a stimulált egerek esetén. A rövid távú hatások mellett az MR régió a PAG, az mPFC és a PVN aktivációján keresztül befolyásolhatja a félelmi hálózatot, hozzájárulva ezzel a hosszútávú félelmi memória kialakulásához (Balazsfi és mtsai 2017).

VII. Következtetések

Munkánk során a glutamát rendszer szerepét vizsgáltuk a PTSD kialakulásában, mely alapján a következő következtetéseket vonhatjuk le:

1. Félelmi kondicionálás hatásainak általános vizsgálata

- a. A félelmi kondicionálás során alkalmazott elektromos lábsokk megfelelő modellnek bizonyult az emberekben megfigyelhető PTSD tüneteinek előidézésre.
- b. Mind hormonális, mind agyi aktivitási különbségeket is találtunk a kontrollokhoz képest, és ezen változások időbelisége fontos volt, bizonyítva ezzel egy hosszabb távú, összetett hatást, mely a HHM tengely működésének megváltozását és félelmi tanulásban részt vevő idegi hálózatok átrendeződését okozza.

2. Glutamát rendszer szerepének vizsgálata

- a. GluA1/GluA2 arány változása alátámasztja, hogy neurális plaszticitás révén az amigdaláris CP-AMPA receptornak szerepe van a félelmi tanulásban, azonban a vmPFC esetén más folyamatok állhatnak a háttérben.
- b. CP-AMPA receptor antagonist (IEM-1460) alkalmazásával már egyszeri alkalommal elősegítettük a félelmi reakció csökkenését, mely a jövőben ígéretes terápiás lehetőség lehet.
- c. VGluT3 hiánya szerepet játszik egyfajta belső félelem kialakulásában, érzékenyítő hatása van a jövőben előforduló negatív eseményekkel szemben.
- d. A VGluT3 hiánynak hatása van a HHM tengelyre is, csökkent stressz-indukálta kortikoszteron emelkedést okoz, mely nagyobb kockázatot jelenthet traumát követő PTSD kialakulására.

3. Az erőteljes VGluT3 jelenléttel rendelkező MR régió vizsgálata optogenetikával

- a. Az MR régió optogenetikai modulációja, nem volt elegendő ahhoz, hogy akutan befolyásolja a félelmi reakciót, de averzív magatartási változásokat idézett elő (agitált, felfokozott állapot), illetve stimulációja fokozott neurális aktivitást okozott a raphe-ban, PVN-ben, BNST-ben, Cg1-ben, IL-ben és a PAG területein. Hosszabb távon (1 hét múlva), azonban képes volt befolyásolni a távoli félelmi memória kialakulását.

VIII. Összefoglalás

Traumatikus eseményt követően poszttraumás stressz szindróma (PTSD) alakulhat ki, melyhez sokszor más pszichiai zavar is társul még tovább súlyosbítva a tüneteket, illetve nehezítve a megfelelő kezelés alkalmazását. Éppen ezért nagyon fontos a PTSD kialakulásának hátterében álló idegi és neuroendokrinológiai folyamatok felderítése. A PhD munkám során azt vizsgáltam, hogy a glutamát rendszerben végbemenő változások miképpen befolyásolják a betegség kialakulását. A PTSD tüneteit állatmodellen félelmi kondicionálással indukáltam.

Eredményeink szerint már egy traumatikus eseménynek is olyan hosszú távú hatásai vannak, mely a HHM tengely működésének megváltozását és a félelmi tanulásban részt vevő idegi hálózatok átrendeződését okozza mind patkányokban, mind egerekben.

Félelmi kondicionálás hatására a kalciumot is átengedő glutamát receptor (CP-AMPA) arányának növekedését figyelhettük meg patkány amigdalában, ami neurális plaszticitás fokozása révén járulhat hozzá a félelmi memória kialakulásához. Már egyszeri CP-AMPA receptor antagonistá (IEM-1460) alkalmazásával csökkenteni tudtuk a félelmi reakció magatartási következményeit, mely a jövőre nézve ígéretes terápiás lehetőség lehet.

Egerekben a vezikuláris glutamát transzporter 3 (VGluT3) hiánya egyfajta belső félelmet indukál, mely már korai posztnatális kortól megfigyelhető. Illetve ez a szorongó fenotípus érzékenyebbé teszi az állatot a jövőbeni negatív életeseményekkel szemben. A VGluT3 hiánya a stressz-tengelyre hatva csökkent stressz-indukálta hormonszint reaktivitást okoz, mely szintén nagyobb kockázatot jelent a PTSD kialakulására nézve.

Egerekben a mediális raphe régió (MRR) optogenetikai modulációja akutan, illetve rövid távon nem volt hatással a félelmi reakció kialakulására, azonban - kapcsolatai révén - hosszabb távon (1 hét múlva) képes volt a félelmi memória kialakítására. Az optogenetikai stimulálás akutan averzív magatartási változásokat idézett elő (agitált, felfokozott állapot), illetve növelte a neurális aktivitást a raphe-ban, paraventriculáris magban, bed nucleus of stria terminálisban, anterior cinguláris kéregben, infralimbikus kéregben és a periakveduktális szürkeállományban.

IX. Summary

About one third of people experience a traumatic event during their lifetime, but not all of them develop posttraumatic stress disorder (PTSD). PTSD is often associated with other psychiatric illnesses, making the choice of the right treatment more difficult. The treatment of PTSD is not completely solved, the drugs are mainly suitable for the treatment of the secondary symptoms. Therefore, it is very important to investigate the neurological and neuroendocrinological processes.

During my PhD work I studied how changes in glutamatergic system influences the development of PTSD. PTSD symptoms were induced in animals (rats and mice) by fear conditioning. According to our results, a traumatic event has a long-term effect that changes the function of the stress-axis and reorganizes the neural networks involved in the fear learning both in rats and mice.

Increased proportion of calcium permeable glutamate receptor (CP-AMPA) was observed in the rat amygdala, contributing to the development of fear memory through neuronal plasticity. Moreover, a single injection of CP-AMPA receptor antagonist (IEM-1460) could reduce the behavioral consequences of a trauma, which is a promising therapeutic target for the future.

The lack of vesicular glutamate transporter 3 (VGluT3) in mice induced innate fear that could have been observed from the early postnatal age, and this anxious phenotype made the animal more vulnerable to future negative life events. The lack of VGluT3 had an effect on stress-axis and leads to reduced stress-induced hormone reactivity, which also poses a higher risk of PTSD.

The optogenetic modulation of median raphe (MR) region in mice did not affect the formation of a fear response neither acutely nor after 1 day, but was able to create fear memory in the long run (1 week). Acutely, optogenetic stimulation induced aversive behavioral changes (agitation, vigilance) and elevation of neuronal activity in the raphe, paraventricular nucleus of the hypothalamus, bed nucleus of stria terminalis, anterior cingulate cortex, infralimbic cortex, and periaqueductal grey areas.

X. Irodalomjegyzék

- Aguilera G. (1994) Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol*, 15(4): 321-50.
- Aikins DE, Strader JA, Kohler RJ, Bihani N, Perrine SA. (2017) Differences in hippocampal serotonergic activity in a mouse single prolonged stress paradigm impact discriminant fear acquisition and retention. *Neurosci Lett*, 639: 162-166.
- Al-Amin MM, Sultana R, Sultana S, Rahman MM, Reza HM. (2016) Astaxanthin ameliorates prenatal LPS-exposed behavioral deficits and oxidative stress in adult offspring. *BMC Neurosci*, 17: 11.
- Aliczki M, Zelena D, Mikics E, Varga ZK, Pinter O, Bakos NV, Varga J, Haller J. (2013) Monoacylglycerol lipase inhibition-induced changes in plasma corticosterone levels, anxiety and locomotor activity in male CD1 mice. *Horm Behav*, 63(5): 752-8.
- Almli LM, Fani N, Smith AK, Ressler KJ. (2014) Genetic approaches to understanding post-traumatic stress disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*, 17(2): 355-70.
- American Psychiatric Association. In: Book title. Washington, DC, 2013:
- Amilhon B, Lepicard E, Renoir T, Mongeau R, Popa D, Poirel O, Miot S, Gras C, Gardier AM, Gallego J, Hamon M, Lanfumey L, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S. (2010) VGLUT3 (vesicular glutamate transporter type 3) contribution to the regulation of serotonergic transmission and anxiety. *J Neurosci*, 30(6): 2198-210.
- Amo R, Fredes F, Kinoshita M, Aoki R, Aizawa H, Agetsuma M, Aoki T, Shiraki T, Kakinuma H, Matsuda M, Yamazaki M, Takahoko M, Tsuboi T, Higashijima S, Miyasaka N, Koide T, Yabuki Y, Yoshihara Y, Fukai T, Okamoto H. (2014) The habenulo-raphe serotonergic circuit encodes an aversive expectation value essential for adaptive active avoidance of danger. *Neuron*, 84(5): 1034-48.
- Andreasen NC. *Brave New Brain: Conquering Mental Illness in the Era of the Genome*. Oxford University Press, New York, 2004:
- Andreasen NC. (2010) Posttraumatic stress disorder: a history and a critique. *Ann N Y Acad Sci*, 1208: 67-71.
- Antoni FA. (1993) Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. *Front Neuroendocrinol*, 14(2): 76-122.

Antoni FA, Holmes MC, Makara GB, Karteszi M, Laszlo FA. (1984) Evidence that the effects of arginine-8-vasopressin (AVP) on pituitary corticotropin (ACTH) release are mediated by a novel type of receptor. *Peptides*, 5(3): 519-22.

Arruda-Carvalho M, Clem RL. (2015) Prefrontal-amygdala fear networks come into focus. *Front Syst Neurosci*, 9: 145.

Arvanov VL, Liang X, Magro P, Roberts R, Wang RY. (1999) A pre- and postsynaptic modulatory action of 5-HT and the 5-HT_{2A}, 2C receptor agonist DOB on NMDA-evoked responses in the rat medial prefrontal cortex. *Eur J Neurosci*, 11(8): 2917-34.

Avanzi V, Castilho VM, de Andrade TG, Brandao ML. (1998) Regulation of contextual conditioning by the median raphe nucleus. *Brain Res*, 790(1-2): 178-84.

Averill LA, Purohit P, Averill CL, Boesl MA, Krystal JH, Abdallah CG. (2017) Glutamate dysregulation and glutamatergic therapeutics for PTSD: Evidence from human studies. *Neurosci Lett*, 649: 147-155.

Axelrod J, Reisine TD. (1984) Stress hormones: their interaction and regulation. *Science*, 224(4648): 452-9.

Balazsfi D, Farkas L, Csikota P, Fodor A, Zsebok S, Haller J, Zelena D. (2016) Sex-dependent role of vesicular glutamate transporter 3 in stress-regulation and related anxiety phenotype during the early postnatal period. *Stress*, 19(4): 434-8.

Balazsfi DG, Zelena D, Farkas L, Demeter K, Barna I, Cserep C, Takacs VT, Nyiri G, Goloncser F, Sperlagh B, Freund TF, Haller J. (2017) Median raphe region stimulation alone generates remote, but not recent fear memory traces. *PLoS One*, 12(7): e0181264.

Baldi E, Bucherelli C. (2015) Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. *Neurosci Biobehav Rev*, 53: 160-90.

Bandler R, Depaulis A. Midbrain Periaqueductal Gray Control of Defensive Behavior in the Cat and the Rat. In: Depaulis A, Bandler R, Book title. Springer US, Boston, MA, 1991: 175-198.

Belda X, Rotllant D, Fuentes S, Delgado R, Nadal R, Armario A. (2008) Exposure to severe stressors causes long-lasting dysregulation of resting and stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Ann N Y Acad Sci*, 1148: 165-73.

Belzung C, Lemoine M. (2011) Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol Mood Anxiety Disord*, 1(1): 9.

- Bennett AOM. (2008) Stress and anxiety in schizophrenia and depression: glucocorticoids, corticotropin-releasing hormone and synapse regression. *Aust N Z J Psychiatry*, 42(12): 995-1002.
- Bentz D, Michael T, de Quervain DJ, Wilhelm FH. (2010) Enhancing exposure therapy for anxiety disorders with glucocorticoids: from basic mechanisms of emotional learning to clinical applications. *J Anxiety Disord*, 24(2): 223-30.
- Berger M, Gray JA, Roth BL. (2009) The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med*, 60: 355-66.
- Bernardy NC, Friedman MJ. (2015) Psychopharmacological strategies in the management of posttraumatic stress disorder (PTSD): what have we learned? *Curr Psychiatry Rep*, 17(4): 564.
- Bittencourt AS, Carobrez AP, Zamprogno LP, Tufik S, Schenberg LC. (2004) Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience*, 125(1): 71-89.
- Blair HT, Schafe GE, Bauer EP, Rodrigues SM, LeDoux JE. (2001) Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learn Mem*, 8(5): 229-42.
- Blundell J, Blaiss CA, Lagace DC, Eisch AJ, Powell CM. (2011) Block of glucocorticoid synthesis during re-activation inhibits extinction of an established fear memory. *Neurobiol Learn Mem*, 95(4): 453-60.
- Borghans B, Homberg JR. (2015) Animal models for posttraumatic stress disorder: An overview of what is used in research. *World J Psychiatry*, 5(4): 387-96.
- Boscarino JA. (1996) Posttraumatic stress disorder, exposure to combat, and lower plasma cortisol among Vietnam veterans: findings and clinical implications. *J Consult Clin Psychol*, 64(1): 191-201.
- Bouby N, Fernandes S. (2003) Mild dehydration, vasopressin and the kidney: animal and human studies. *Eur J Clin Nutr*, 57 Suppl 2: S39-46.
- Bourin M. (2015) Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. *Dialogues Clin Neurosci*, 17(3): 295-303.
- Bouton ME. (1993) Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychol Bull*, 114(1): 80-99.

Bracha HS. (2004) Freeze, flight, fight, fright, faint: adaptationist perspectives on the acute stress response spectrum. *CNS Spectr*, 9(9): 679-85.

Brady K, Pearlstein T, Asnis GM, Baker D, Rothbaum B, Sikes CR, Farfel GM. (2000) Efficacy and safety of sertraline treatment of posttraumatic stress disorder: a randomized controlled trial. *JAMA*, 283(14): 1837-44.

Bremner D, Vermetten E, Kelley ME. (2007) Cortisol, dehydroepiandrosterone, and estradiol measured over 24 hours in women with childhood sexual abuse-related posttraumatic stress disorder. *J Nerv Ment Dis*, 195(11): 919-27.

Bremner JD, Vermetten E, Schmahl C, Vaccarino V, Vythilingam M, Afzal N, Grillon C, Charney DS. (2005) Positron emission tomographic imaging of neural correlates of a fear acquisition and extinction paradigm in women with childhood sexual-abuse-related post-traumatic stress disorder. *Psychol Med*, 35(6): 791-806.

Brill J, Huguenard JR. (2008) Sequential changes in AMPA receptor targeting in the developing neocortical excitatory circuit. *J Neurosci*, 28(51): 13918-28.

Browne CA, Hanke J, Rose C, Walsh I, Foley T, Clarke G, Schwegler H, Cryan JF, Yilmazer-Hanke D. (2014) Effect of acute swim stress on plasma corticosterone and brain monoamine levels in bidirectionally selected DxH recombinant inbred mouse strains differing in fear recall and extinction. *Stress*, 17(6): 471-83.

Bryant RA, Nickerson A, Creamer M, O'Donnell M, Forbes D, Galatzer-Levy I, McFarlane AC, Silove D. (2015) Trajectory of post-traumatic stress following traumatic injury: 6-year follow-up. *Br J Psychiatry*, 206(5): 417-23.

Burgos-Robles A, Vidal-Gonzalez I, Quirk GJ. (2009) Sustained conditioned responses in prelimbic prefrontal neurons are correlated with fear expression and extinction failure. *J Neurosci*, 29(26): 8474-82.

Cain CK, Maynard GD, Kehne JH. (2012) Targeting memory processes with drugs to prevent or cure PTSD. *Expert Opin Investig Drugs*, 21(9): 1323-50.

Callaerts-Vegh Z, Moechars D, Van Acker N, Daneels G, Goris I, Leo S, Naert A, Meert T, Balschun D, D'Hooge R. (2013) Haploinsufficiency of VGluT1 but not VGluT2 impairs extinction of spatial preference and response suppression. *Behav Brain Res*, 245: 13-21.

Cannon W. *Bodily changes in pain, hunger, fear and rage*. Appleton Century Crofts, New York, 1929:

Cannon W. Wisdom of the body. W.W. Norton & Company, United States, 1932:

Carpenter MB, Sutin J, Strong OS. Human neuroanatomy. Baltimore : Williams & Wilkins, United States, 1983:

Carrive P, Leung P, Harris J, Paxinos G. (1997) Conditioned fear to context is associated with increased Fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray. *Neuroscience*, 78(1): 165-77.

Caspi N, Modai I, Barak P, Waisbourd A, Zbarsky H, Hirschmann S, Ritsner M. (2001) Pindolol augmentation in aggressive schizophrenic patients: a double-blind crossover randomized study. *Int Clin Psychopharmacol*, 16(2): 111-5.

Cerqueira JJ, Almeida OF, Sousa N. (2008) The stressed prefrontal cortex. Left? Right! *Brain Behav Immun*, 22(5): 630-8.

Chambers RA, Bremner JD, Moghaddam B, Southwick SM, Charney DS, Krystal JH. (1999) Glutamate and post-traumatic stress disorder: toward a psychobiology of dissociation. *Semin Clin Neuropsychiatry*, 4(4): 274-81.

Chang CH, Maren S. (2010) Strain difference in the effect of infralimbic cortex lesions on fear extinction in rats. *Behav Neurosci*, 124(3): 391-7.

Chaouloff F. (1993) Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Res Brain Res Rev*, 18(1): 1-32.

Chen X, Zhang J, Wang X. (2016) Hormones in pain modulation and their clinical implications for pain control: a critical review. *Hormones (Athens)*, 15(3): 313-320.

Chester JA, Kirchoff AM, Barrenha GD. (2014) Relation between corticosterone and fear-related behavior in mice selectively bred for high or low alcohol preference. *Addict Biol*, 19(4): 663-75.

Choi GB, Dong HW, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Swanson LW, Anderson DJ. (2005) Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron*, 46(4): 647-60.

Cisler JM, Steele JS, Lenow JK, Smitherman S, Everett B, Messias E, Kilts CD. (2014) Functional reorganization of neural networks during repeated exposure to the traumatic memory in posttraumatic stress disorder: an exploratory fMRI study. *J Psychiatr Res*, 48(1): 47-55.

Clem RL, Haganir RL. (2010) Calcium-permeable AMPA receptor dynamics mediate fear memory erasure. *Science*, 330(6007): 1108-12.

Cohen H, Matar MA, Zohar J. (2014) Maintaining the clinical relevance of animal models in translational studies of post-traumatic stress disorder. *ILAR J*, 55(2): 233-45.

Cohen H, Zohar J, Matar MA, Zeev K, Loewenthal U, Richter-Levin G. (2004) Setting apart the affected: the use of behavioral criteria in animal models of post traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology*, 29(11): 1962-70.

Conrad CD, MacMillan DD, 2nd, Tsekhanov S, Wright RL, Baran SE, Fuchs RA. (2004) Influence of chronic corticosterone and glucocorticoid receptor antagonism in the amygdala on fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem*, 81(3): 185-99.

Coppens CM, de Boer SF, Koolhaas JM. (2010) Coping styles and behavioural flexibility: towards underlying mechanisms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365(1560): 4021-8.

Corcoran KA, Quirk GJ. (2007) Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *J Neurosci*, 27(4): 840-4.

Correia PA, Lottem E, Banerjee D, Machado AS, Carey MR, Mainen ZF. (2017) Transient inhibition and long-term facilitation of locomotion by phasic optogenetic activation of serotonin neurons. *Elife*, 6.

Dachtler J, Fox KD, Good MA. (2011) Gender specific requirement of GluR1 receptors in contextual conditioning but not spatial learning. *Neurobiol Learn Mem*, 96(3): 461-7.

Dahlstroem A, Fuxe K. (1964) Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons. *Acta Physiol Scand Suppl*: SUPPL 232:1-55.

Dallman MF. (1993) Stress update Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic stress. *Trends Endocrinol Metab*, 4(2): 62-9.

Dallman MF, Akana SF, Cascio CS, Darlington DN, Jacobson L, Levin N. (1987) Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Recent Prog Horm Res*, 43: 113-73.

Dalton GL, Wang YT, Floresco SB, Phillips AG. (2008) Disruption of AMPA receptor endocytosis impairs the extinction, but not acquisition of learned fear. *Neuropsychopharmacology*, 33(10): 2416-26.

Darves-Bornoz JM, Alonso J, de Girolamo G, de Graaf R, Haro JM, Kovess-Masfety V, Lepine JP, Nachbaur G, Negre-Pages L, Vilagut G, Gasquet I, Investigators ESM.

(2008) Main traumatic events in Europe: PTSD in the European study of the epidemiology of mental disorders survey. *J Trauma Stress*, 21(5): 455-62.

Daskalakis NP, Lehrner A, Yehuda R. (2013) Endocrine aspects of post-traumatic stress disorder and implications for diagnosis and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 42(3): 503-13.

Dautzenberg FM, Hauger RL. (2002) The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci*, 23(2): 71-7.

Davidson JR, Hughes D, Blazer DG, George LK. (1991) Post-traumatic stress disorder in the community: an epidemiological study. *Psychol Med*, 21(3): 713-21.

Davis M, Sheard MH. (1974) Habituation and sensitization of the rat startle response: effects of raphe lesions. *Physiol Behav*, 12(3): 425-31.

Davis M, Strachan DI, Kass E. (1980) Excitatory and inhibitory effects of serotonin on sensorimotor reactivity measured with acoustic startle. *Science*, 209(4455): 521-3.

Daw ND, Kakade S, Dayan P. (2002) Opponent interactions between serotonin and dopamine. *Neural Netw*, 15(4-6): 603-16.

Day TA. (2005) Defining stress as a prelude to mapping its neurocircuitry: no help from allostasis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 29(8): 1195-200.

de Kloet CS, Vermetten E, Heijnen CJ, Geuze E, Lentjes EG, Westenberg HG. (2007) Enhanced cortisol suppression in response to dexamethasone administration in traumatized veterans with and without posttraumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology*, 32(3): 215-26.

de Kloet ER, Joels M, Holsboer F. (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*, 6(6): 463-75.

de Vries GJ, Olf M. (2009) The lifetime prevalence of traumatic events and posttraumatic stress disorder in the Netherlands. *J Trauma Stress*, 22(4): 259-67.

Deakin JF, Graeff FG. (1991) 5-HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol*, 5(4): 305-15.

Dejean C, Courtin J, Rozeske RR, Bonnet MC, Dousset V, Michelet T, Herry C. (2015) Neuronal Circuits for Fear Expression and Recovery: Recent Advances and Potential Therapeutic Strategies. *Biol Psychiatry*, 78(5): 298-306.

Delahanty DL, Nugent NR, Christopher NC, Walsh M. (2005) Initial urinary epinephrine and cortisol levels predict acute PTSD symptoms in child trauma victims. *Psychoneuroendocrinology*, 30(2): 121-8.

Demeter K, Torok B, Fodor A, Varga J, Ferenczi S, Kovacs KJ, Eszik I, Szegedi V, Zelena D. (2016) Possible contribution of epigenetic changes in the development of schizophrenia-like behavior in vasopressin-deficient Brattleboro rats. *Behav Brain Res*, 300: 123-34.

Dohrenwend BP, Turner JB, Turse NA, Adams BG, Koenen KC, Marshall R. (2006) The psychological risks of Vietnam for U.S. veterans: a revisit with new data and methods. *Science*, 313(5789): 979-82.

Draxler P, Honsek SD, Forsthuber L, Hadschieff V, Sandkuhler J. (2014) VGluT3(+) primary afferents play distinct roles in mechanical and cold hypersensitivity depending on pain etiology. *J Neurosci*, 34(36): 12015-28.

Duvarci S, Pare D. (2014) Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron*, 82(5): 966-80.

Eagle DM, Lehmann O, Theobald DE, Pena Y, Zakaria R, Ghosh R, Dalley JW, Robbins TW. (2009) Serotonin depletion impairs waiting but not stop-signal reaction time in rats: implications for theories of the role of 5-HT in behavioral inhibition. *Neuropsychopharmacology*, 34(5): 1311-21.

El Mestikawy S, Wallen-Mackenzie A, Fortin GM, Descarries L, Trudeau LE. (2011) From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat Rev Neurosci*, 12(4): 204-16.

Feder A, Nestler EJ, Charney DS. (2009) Psychobiology and molecular genetics of resilience. *Nat Rev Neurosci*, 10(6): 446-57.

Feder A, Parides MK, Murrough JW, Perez AM, Morgan JE, Saxena S, Kirkwood K, Aan Het Rot M, Lapidus KA, Wan LB, Iosifescu D, Charney DS. (2014) Efficacy of intravenous ketamine for treatment of chronic posttraumatic stress disorder: a randomized clinical trial. *JAMA Psychiatry*, 71(6): 681-8.

Fendt M, Fanselow MS. (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev*, 23(5): 743-60.

Feyder M, Wiedholz L, Sprengel R, Holmes A. (2007) Impaired associative fear learning in mice with complete loss or haploinsufficiency of AMPA GluR1 receptors. *Front Behav Neurosci*, 1: 4.

Fitzgerald PJ, Seemann JR, Maren S. (2014) Can fear extinction be enhanced? A review of pharmacological and behavioral findings. *Brain Res Bull*, 105: 46-60.

Flandreau EI, Toth M. (2017) Animal Models of PTSD: A Critical Review. *Curr Top Behav Neurosci*.

Foa EB, Zinbarg R, Rothbaum BO. (1992) Uncontrollability and unpredictability in post-traumatic stress disorder: an animal model. *Psychol Bull*, 112(2): 218-38.

Fortin DA, Davare MA, Srivastava T, Brady JD, Nygaard S, Derkach VA, Soderling TR. (2010) Long-term potentiation-dependent spine enlargement requires synaptic Ca²⁺-permeable AMPA receptors recruited by CaM-kinase I. *J Neurosci*, 30(35): 11565-75.

Frankland PW, Cestari V, Filipkowski RK, McDonald RJ, Silva AJ. (1998) The dorsal hippocampus is essential for context discrimination but not for contextual conditioning. *Behav Neurosci*, 112(4): 863-74.

Frazer A HJ. Serotonin. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1999:

Freneau RT, Jr., Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Reimer RJ, Chaudhry FA, Edwards RH. (2002) The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(22): 14488-93.

Freneau RT, Jr., Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Fortin D, Storm-Mathisen J, Edwards RH. (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron*, 31(2): 247-60.

Freneau RT, Jr., Voglmaier S, Seal RP, Edwards RH. (2004) VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci*, 27(2): 98-103.

Freudenberg F, Celikel T, Reif A. (2015) The role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors in depression: central mediators of pathophysiology and antidepressant activity? *Neurosci Biobehav Rev*, 52: 193-206.

- Frey S, Frey JU. (2008) 'Synaptic tagging' and 'cross-tagging' and related associative reinforcement processes of functional plasticity as the cellular basis for memory formation. *Prog Brain Res*, 169: 117-43.
- Ganapati R. (1990) Leprosy control within urban primary health care. *Indian J Lepr*, 62(2): 161-8.
- Gardner CR. (1985) Distress vocalization in rat pups. A simple screening method for anxiolytic drugs. *J Pharmacol Methods*, 14(3): 181-7.
- Garpenstrand H, Annas P, Ekblom J, Orelund L, Fredrikson M. (2001) Human fear conditioning is related to dopaminergic and serotonergic biological markers. *Behav Neurosci*, 115(2): 358-64.
- Garrick T, Morrow N, Eth S, Marciano D, Shalev A. (1997) Psychophysiologic parameters of traumatic stress disorder in rats. *Ann N Y Acad Sci*, 821: 533-7.
- Gately PF, Poon SL, Segal DS, Geyer MA. (1985) Depletion of brain serotonin by 5,7-dihydroxytryptamine alters the response to amphetamine and the habituation of locomotor activity in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 87(4): 400-5.
- Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H. (1995) Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron*, 15(1): 193-204.
- Giustino TF, Fitzgerald PJ, Maren S. (2016) Revisiting propranolol and PTSD: Memory erasure or extinction enhancement? *Neurobiol Learn Mem*, 130: 26-33.
- Giustino TF, Maren S. (2015) The Role of the Medial Prefrontal Cortex in the Conditioning and Extinction of Fear. *Front Behav Neurosci*, 9: 298.
- Gmiro VE, Serdyuk SE, Efremov OM. (2008) Peripheral and central routes of administration of quaternary ammonium compound IEM-1460 are equally potent in reducing the severity of nicotine-induced seizures in mice. *Bull Exp Biol Med*, 146(1): 18-21.
- Goel N, Innala L, Viau V. (2014) Sex differences in serotonin (5-HT) 1A receptor regulation of HPA axis and dorsal raphe responses to acute restraint. *Psychoneuroendocrinology*, 40: 232-41.

Goenjian AK, Bailey JN, Walling DP, Steinberg AM, Schmidt D, Dandekar U, Noble EP. (2012) Association of TPH1, TPH2, and 5HTTLPR with PTSD and depressive symptoms. *J Affect Disord*, 140(3): 244-52.

Gorka SM, Lieberman L, Klumpp H, Kinney KL, Kennedy AE, Ajilore O, Francis J, Duffecy J, Craske MG, Nathan J, Langenecker S, Shankman SA, Phan KL. (2017) Reactivity to unpredictable threat as a treatment target for fear-based anxiety disorders. *Psychol Med*: 1-11.

Goswami S, Rodriguez-Sierra O, Cascardi M, Pare D. (2013) Animal models of post-traumatic stress disorder: face validity. *Front Neurosci*, 7: 89.

Gourley SL, Kedves AT, Olausson P, Taylor JR. (2009) A history of corticosterone exposure regulates fear extinction and cortical NR2B, GluR2/3, and BDNF. *Neuropsychopharmacology*, 34(3): 707-16.

Gras C, Amilhon B, Lepicard EM, Poirel O, Vinatier J, Herbin M, Dumas S, Tzavara ET, Wade MR, Nomikos GG, Hanoun N, Saurini F, Kemel ML, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S. (2008) The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone. *Nat Neurosci*, 11(3): 292-300.

Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S. (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci*, 22(13): 5442-51.

Hajcak G, Castille C, Olvet DM, Dunning JP, Roohi J, Hatchwell E. (2009) Genetic variation in brain-derived neurotrophic factor and human fear conditioning. *Genes Brain Behav*, 8(1): 80-5.

Hall CS, Ballachey EL. A study of the rat's behavior in a field; a contribution to method in comparative psychology. [Univ. of California Press], [Berkeley], 1932:

Haller J, Aliczki M, Pelczer KG, Spitzer K, Balogh Z, Kantor S. (2014) Effects of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 on coping behavior under challenging conditions in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 231(3): 593-601.

Haller J, Leveleki C, Baranyi J, Mikics E, Bakos N. (2003) Stress, social avoidance and anxiolytics: a potential model of stress-induced anxiety. *Behav Pharmacol*, 14(5-6): 439-46.

Haller J, Nagy R, Toth M, Pelczer KG, Mikics E. (2011) NR2B subunit-specific NMDA antagonist Ro25-6981 inhibits the expression of conditioned fear: a comparison with the NMDA antagonist MK-801 and fluoxetine. *Behav Pharmacol*, 22(2): 113-21.

Harkany T, Holmgren C, Hartig W, Qureshi T, Chaudhry FA, Storm-Mathisen J, Dobszay MB, Berghuis P, Schulte G, Sousa KM, Fremeau RT, Jr., Edwards RH, Mackie K, Ernfors P, Zilberter Y. (2004) Endocannabinoid-independent retrograde signaling at inhibitory synapses in layer 2/3 of neocortex: involvement of vesicular glutamate transporter 3. *J Neurosci*, 24(21): 4978-88.

Harvey BH, Naciti C, Brand L, Stein DJ. (2004) Serotonin and stress: protective or malevolent actions in the biobehavioral response to repeated trauma? *Ann N Y Acad Sci*, 1032: 267-72.

Hashimoto K. (2009) Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. *Brain Res Rev*, 61(2): 105-23.

Hashimoto K, Sasaki T, Kishimoto A. (2013) Old drug ifenprodil, new hope for PTSD with a history of childhood abuse. *Psychopharmacology (Berl)*, 227(2): 375-6.

Hatherall L, Sanchez C, Morilak DA. (2016) Chronic Vortioxetine Treatment Reduces Exaggerated Expression of Conditioned Fear Memory and Restores Active Coping Behavior in Chronically Stressed Rats. *Int J Neuropsychopharmacol*.

Hayes DJ, Northoff G. (2011) Identifying a network of brain regions involved in aversion-related processing: a cross-species translational investigation. *Front Integr Neurosci*, 5: 49.

Herman JP, Mueller NK, Figueiredo H. (2004) Role of GABA and glutamate circuitry in hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress integration. *Ann N Y Acad Sci*, 1018: 35-45.

Hermann A, Kupper Y, Schmitz A, Walter B, Vaitl D, Hennig J, Stark R, Tabbert K. (2012) Functional gene polymorphisms in the serotonin system and traumatic life events modulate the neural basis of fear acquisition and extinction. *PLoS One*, 7(9): e44352.

Hertzberg MA, Butterfield MI, Feldman ME, Beckham JC, Sutherland SM, Connor KM, Davidson JR. (1999) A preliminary study of lamotrigine for the treatment of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*, 45(9): 1226-9.

Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S. (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci*, 21(22): RC181.

Hofmann SG, Smits JA, Rosenfield D, Simon N, Otto MW, Meuret AE, Marques L, Fang A, Tart C, Pollack MH. (2013) D-Cycloserine as an augmentation strategy with cognitive-behavioral therapy for social anxiety disorder. *Am J Psychiatry*, 170(7): 751-8.

Holsboer F, Ising M. (2008) Central CRH system in depression and anxiety--evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists. *Eur J Pharmacol*, 583(2-3): 350-7.

Holsboer F, Ising M. (2010) Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy. *Annu Rev Psychol*, 61: 81-109, C1-11.

Hong I, Kim J, Kim J, Lee S, Ko HG, Nader K, Kaang BK, Tsien RW, Choi S. (2013) AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(20): 8218-23.

Horvath G, Goloncser F, Csolle C, Kiraly K, Ando RD, Baranyi M, Kovanyi B, Mate Z, Hoffmann K, Algaier I, Baqi Y, Muller CE, Von Kugelgen I, Sperlagh B. (2014) Central P2Y12 receptor blockade alleviates inflammatory and neuropathic pain and cytokine production in rodents. *Neurobiol Dis*, 70: 162-78.

Horvath HR, Fazekas CL, Balazsfi D, Jain SK, Haller J, Zelena D. (2017) Contribution of Vesicular Glutamate Transporters to Stress Response and Related Psychopathologies: Studies in VGluT3 Knockout Mice. *Cell Mol Neurobiol*.

Hoskins M, Pearce J, Bethell A, Dankova L, Barbui C, Tol WA, van Ommeren M, de Jong J, Seedat S, Chen H, Bisson JI. (2015) Pharmacotherapy for post-traumatic stress disorder: systematic review and meta-analysis. *Br J Psychiatry*, 206(2): 93-100.

Huang TC, Blanks RH, Berns MW, Crumley RL. (1992) Laser vs. suture nerve anastomosis. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 107(1): 14-20.

Hughes KC, Shin LM. (2011) Functional neuroimaging studies of post-traumatic stress disorder. *Expert Rev Neurother*, 11(2): 275-85.

Humeau Y, Reisel D, Johnson AW, Borchardt T, Jensen V, Gebhardt C, Bosch V, Gass P, Bannerman DM, Good MA, Hvalby O, Sprengel R, Luthi A. (2007) A pathway-

specific function for different AMPA receptor subunits in amygdala long-term potentiation and fear conditioning. *J Neurosci*, 27(41): 10947-56.

Imai H, Steindler DA, Kitai ST. (1986) The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol*, 243(3): 363-80.

Isaac JT, Ashby MC, McBain CJ. (2007) The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron*, 54(6): 859-71.

Jain SK, Zelena D. (2011) Gender specific influence of endogenous glutamate release on stress-induced fear in rats. *Endocr Regul*, 45(1): 13-21.

Jasnow AM, Lynch JF, 3rd, Gilman TL, Riccio DC. (2017) Perspectives on fear generalization and its implications for emotional disorders. *J Neurosci Res*, 95(3): 821-835.

Johansen JP, Hamanaka H, Monfils MH, Behnia R, Deisseroth K, Blair HT, LeDoux JE. (2010) Optical activation of lateral amygdala pyramidal cells instructs associative fear learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(28): 12692-7.

Jonas P, Racca C, Sakmann B, Seeburg PH, Monyer H. (1994) Differences in Ca²⁺ permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron*, 12(6): 1281-9.

Jorgensen HS. (2007) Studies on the neuroendocrine role of serotonin. *Dan Med Bull*, 54(4): 266-88.

Keshavarzi S, Sullivan RK, Ianno DJ, Sah P. (2014) Functional properties and projections of neurons in the medial amygdala. *J Neurosci*, 34(26): 8699-715.

Kessler RC, Sonnega A, Bromet E, Hughes M, Nelson CB. (1995) Posttraumatic stress disorder in the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry*, 52(12): 1048-60.

Kim J, Lee S, Park K, Hong I, Song B, Son G, Park H, Kim WR, Park E, Choe HK, Kim H, Lee C, Sun W, Kim K, Shin KS, Choi S. (2007) Amygdala depotentiation and fear extinction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(52): 20955-60.

Kinn Rod AM, Milde AM, Gronli J, Jellestad FK, Sundberg H, Murison R. (2012) Long-term effects of footshock and social defeat on anxiety-like behaviours in rats: relationships to pre-stressor plasma corticosterone concentration. *Stress*, 15(6): 658-70.

Kishimoto A, Kaneko M, Gotoh Y, Hashimoto K. (2012) Ifenprodil for the treatment of flashbacks in female posttraumatic stress disorder patients with a history of childhood sexual abuse. *Biol Psychiatry*, 71(4): e7-8.

Kobylecki C, Cenci MA, Crossman AR, Ravenscroft P. (2010) Calcium-permeable AMPA receptors are involved in the induction and expression of 1-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 114(2): 499-511.

Kocsis B, Varga V, Dahan L, Sik A. (2006) Serotonergic neuron diversity: identification of raphe neurons with discharges time-locked to the hippocampal theta rhythm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(4): 1059-64.

Kocsis ZS, Molnar CS, Watanabe M, Daneels G, Moechars D, Liposits Z, Hrabovszky E. (2010) Demonstration of vesicular glutamate transporter-1 in corticotroph cells in the anterior pituitary of the rat. *Neurochem Int*, 56(3): 479-86.

Kondo M, Nakamura Y, Ishida Y, Yamada T, Shimada S. (2013) The 5-HT_{3A} receptor is essential for fear extinction. *Learn Mem*, 21(1): 1-4.

Koutsikou S, Crook JJ, Earl EV, Leith JL, Watson TC, Lumb BM, Apps R. (2014) Neural substrates underlying fear-evoked freezing: the periaqueductal grey-cerebellar link. *J Physiol*, 592(10): 2197-213.

Koutsikou S, Watson TC, Crook JJ, Leith JL, Lawrenson CL, Apps R, Lumb BM. (2015) The Periaqueductal Gray Orchestrates Sensory and Motor Circuits at Multiple Levels of the Neuraxis. *J Neurosci*, 35(42): 14132-47.

Kriszt R, Winkler Z, Polyak A, Kuti D, Molnar C, Hrabovszky E, Kallo I, Szoke Z, Ferenczi S, Kovacs KJ. (2015) Xenoestrogens Ethinyl Estradiol and Zearalenone Cause Precocious Puberty in Female Rats via Central Kisspeptin Signaling. *Endocrinology*, 156(11): 3996-4007.

Krystal JH, Neumeister A. (2009) Noradrenergic and serotonergic mechanisms in the neurobiology of posttraumatic stress disorder and resilience. *Brain Res*, 1293: 13-23.

Kucmin T, Kucmin A, Nogalski A, Sojczuk S, Jojczuk M. (2016) History of trauma and posttraumatic disorders in literature. *Psychiatr Pol*, 50(1): 269-81.

Kuhne C, Puk O, Graw J, Hrabe de Angelis M, Schutz G, Wurst W, Deussing JM. (2012) Visualizing corticotropin-releasing hormone receptor type 1 expression and neuronal connectivities in the mouse using a novel multifunctional allele. *J Comp Neurol*, 520(14): 3150-80.

Lanius RA, Williamson PC, Densmore M, Boksman K, Gupta MA, Neufeld RW, Gati JS, Menon RS. (2001) Neural correlates of traumatic memories in posttraumatic stress disorder: a functional MRI investigation. *Am J Psychiatry*, 158(11): 1920-2.

- Le AD, Harding S, Juzysch W, Fletcher PJ, Shaham Y. (2002) The role of corticotropin-releasing factor in the median raphe nucleus in relapse to alcohol. *J Neurosci*, 22(18): 7844-9.
- Lechin F, van der Dijs B, Hernandez-Adrian G. (2006) Dorsal raphe vs. median raphe serotonergic antagonism. Anatomical, physiological, behavioral, neuroendocrinological, neuropharmacological and clinical evidences: relevance for neuropharmacological therapy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 30(4): 565-85.
- LeDoux J. (2012) Rethinking the emotional brain. *Neuron*, 73(4): 653-76.
- LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ. (1988) Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J Neurosci*, 8(7): 2517-29.
- Lee JL. (2008) Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci*, 11(11): 1264-6.
- Lemieux AM, Coe CL. (1995) Abuse-related posttraumatic stress disorder: evidence for chronic neuroendocrine activation in women. *Psychosom Med*, 57(2): 105-15.
- Lindner K, Neubert J, Pfanmoller J, Lotze M, Hamm AO, Wendt J. (2015) Fear-potentiated startle processing in humans: Parallel fMRI and orbicularis EMG assessment during cue conditioning and extinction. *Int J Psychophysiol*, 98(3 Pt 2): 535-45.
- Linnman C, Zeffiro TA, Pitman RK, Milad MR. (2011) An fMRI study of unconditioned responses in post-traumatic stress disorder. *Biol Mood Anxiety Disord*, 1(1): 8.
- Lisboa SF, Stecchini MF, Correa FM, Guimaraes FS, Resstel LB. (2010) Different role of the ventral medial prefrontal cortex on modulation of innate and associative learned fear. *Neuroscience*, 171(3): 760-8.
- Liu Y, Kelly MA, Sexton TJ, Neumaier JF. (2015) 5-HT_{1B} autoreceptors differentially modulate the expression of conditioned fear in a circuit-specific manner. *Neuroscience*, 298: 436-47.
- Lonsdorf TB, Kalisch R. (2011) A review on experimental and clinical genetic associations studies on fear conditioning, extinction and cognitive-behavioral treatment. *Transl Psychiatry*, 1: e41.

Lonsdorf TB, Weike AI, Nikamo P, Schalling M, Hamm AO, Ohman A. (2009) Genetic gating of human fear learning and extinction: possible implications for gene-environment interaction in anxiety disorder. *Psychol Sci*, 20(2): 198-206.

Lopresto D, Schipper P, Homberg JR. (2016) Neural circuits and mechanisms involved in fear generalization: Implications for the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder. *Neurosci Biobehav Rev*, 60: 31-42.

Maes M, Lin A, Bonaccorso S, van Hunsel F, Van Gastel A, Delmeire L, Biondi M, Bosmans E, Kenis G, Scharpe S. (1998) Increased 24-hour urinary cortisol excretion in patients with post-traumatic stress disorder and patients with major depression, but not in patients with fibromyalgia. *Acta Psychiatr Scand*, 98(4): 328-35.

Magazanik LG, Tikhonov DB, Bol'shakov KV, Gmiro VE, Buldakova SL, Samoilova MV. (2003) Studies of the structure of glutamate receptor ion channels and the mechanisms of their blockade by organic cations. *Neurosci Behav Physiol*, 33(3): 237-46.

Mahanty NK, Sah P. (1998) Calcium-permeable AMPA receptors mediate long-term potentiation in interneurons in the amygdala. *Nature*, 394(6694): 683-7.

Man HY. (2011) GluA2-lacking, calcium-permeable AMPA receptors--inducers of plasticity? *Curr Opin Neurobiol*, 21(2): 291-8.

Maples-Keller JL, Yasinski C, Manjin N, Rothbaum BO. (2017) Virtual Reality-Enhanced Extinction of Phobias and Post-Traumatic Stress. *Neurotherapeutics*.

Marek R, Strobel C, Bredy TW, Sah P. (2013) The amygdala and medial prefrontal cortex: partners in the fear circuit. *J Physiol*, 591(10): 2381-91.

Maren S. (2011) Seeking a spotless mind: extinction, deconsolidation, and erasure of fear memory. *Neuron*, 70(5): 830-45.

Maren S, Aharonov G, Fanselow MS. (1997) Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav Brain Res*, 88(2): 261-74.

Maren S, Phan KL, Liberzon I. (2013) The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neurosci*, 14(6): 417-28.

Maren S, Quirk GJ. (2004) Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci*, 5(11): 844-52.

Marshall RD, Beebe KL, Oldham M, Zaninelli R. (2001) Efficacy and safety of paroxetine treatment for chronic PTSD: a fixed-dose, placebo-controlled study. *Am J Psychiatry*, 158(12): 1982-8.

Mason JW, Giller EL, Kosten TR, Harkness L. (1988) Elevation of urinary norepinephrine/cortisol ratio in posttraumatic stress disorder. *J Nerv Ment Dis*, 176(8): 498-502.

McEwen BS. (2009) The brain is the central organ of stress and adaptation. *Neuroimage*, 47(3): 911-3.

McGaugh JL. (2000) Memory--a century of consolidation. *Science*, 287(5451): 248-51.

McGuire JF, Wu MS, Piacentini J, McCracken JT, Storch EA. (2017) A Meta-Analysis of D-Cycloserine in Exposure-Based Treatment: Moderators of Treatment Efficacy, Response, and Diagnostic Remission. *J Clin Psychiatry*, 78(2): 196-206.

Meyer EM, Long V, Fanselow MS, Spigelman I. (2013) Stress increases voluntary alcohol intake, but does not alter established drinking habits in a rat model of posttraumatic stress disorder. *Alcohol Clin Exp Res*, 37(4): 566-74.

Miczek KA, Yap JJ, Covington HE, 3rd. (2008) Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacol Ther*, 120(2): 102-28.

Mikics E, Baranyi J, Haller J. (2008) Rats exposed to traumatic stress bury unfamiliar objects--a novel measure of hyper-vigilance in PTSD models? *Physiol Behav*, 94(3): 341-8.

Mikics E, Toth M, Varju P, Gereben B, Liposits Z, Ashaber M, Halasz J, Barna I, Farkas I, Haller J. (2008) Lasting changes in social behavior and amygdala function following traumatic experience induced by a single series of foot-shocks. *Psychoneuroendocrinology*, 33(9): 1198-210.

Milad MR, Pitman RK, Ellis CB, Gold AL, Shin LM, Lasko NB, Zeidan MA, Handwerker K, Orr SP, Rauch SL. (2009) Neurobiological basis of failure to recall extinction memory in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*, 66(12): 1075-82.

Minasyan A, Keisala T, Zou J, Zhang Y, Toppila E, Syvala H, Lou YR, Kalueff AV, Pyykko I, Tuohimaa P. (2009) Vestibular dysfunction in vitamin D receptor mutant mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 114(3-5): 161-6.

- Minatohara K, Akiyoshi M, Okuno H. (2015) Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace. *Front Mol Neurosci*, 8: 78.
- Mizoguchi K, Ishige A, Aburada M, Tabira T. (2003) Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*, 119(3): 887-97.
- Monaco SA, Gulchina Y, Gao WJ. (2015) NR2B subunit in the prefrontal cortex: A double-edged sword for working memory function and psychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, 56: 127-38.
- Montarolo PG, Goelet P, Castellucci VF, Morgan J, Kandel ER, Schacher S. (1986) A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science*, 234(4781): 1249-54.
- Morgan MA, LeDoux JE. (1995) Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. *Behav Neurosci*, 109(4): 681-8.
- Mosko SS, Jacobs BL. (1975) Midbrain raphe neurons: sensitivity to glucocorticoids and ACTH in the rat. *Brain Res*, 89(2): 368-75.
- mult-kor.hu. (2015). "Poszttraumás stresszben szenvedtek az asszír harcosok." 2017., from <http://mult-kor.hu/poszttraumas-stresszben-szenvedtek-az-asszir-harcosok-20150128>.
- Muzerelle A, Scotto-Lomassese S, Bernard JF, Soiza-Reilly M, Gaspar P. (2016) Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5-B9) to the forebrain and brainstem. *Brain Struct Funct*, 221(1): 535-61.
- Myers KM, Carlezon WA, Jr., Davis M. (2011) Glutamate receptors in extinction and extinction-based therapies for psychiatric illness. *Neuropsychopharmacology*, 36(1): 274-93.
- Nader K, Hardt O. (2009) A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat Rev Neurosci*, 10(3): 224-34.
- Neigh GN, Ritschel LA, Kilpela LS, Harrell CS, Bourke CH. (2013) Translational reciprocity: bridging the gap between preclinical studies and clinical treatment of stress effects on the adolescent brain. *Neuroscience*, 249: 139-53.

Newport DJ, Nemeroff CB. (2000) Neurobiology of posttraumatic stress disorder. *Curr Opin Neurobiol*, 10(2): 211-8.

Ninomiya EM, Martynhak BJ, Zanoveli JM, Correia D, da Cunha C, Andreatini R. (2010) Spironolactone and low-dose dexamethasone enhance extinction of contextual fear conditioning. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34(7): 1229-35.

Nishi D, Hashimoto K, Noguchi H, Hamazaki K, Hamazaki T, Matsuoka Y. (2015) Glutamatergic system abnormalities in posttraumatic stress disorder. *Psychopharmacology (Berl)*, 232(23): 4261-8.

Noirot E. (1972) Ultrasounds and maternal behavior in small rodents. *Dev Psychobiol*, 5(4): 371-87.

Norrholm SD, Jovanovic T, Smith AK, Binder E, Klengel T, Conneely K, Mercer KB, Davis JS, Kerley K, Winkler J, Gillespie CF, Bradley B, Ressler KJ. (2013) Differential Genetic and Epigenetic Regulation of catechol-O-methyltransferase is Associated with Impaired Fear Inhibition in Posttraumatic Stress Disorder. *Front Behav Neurosci*, 7: 30.

O'Doherty DC, Chitty KM, Saddiqui S, Bennett MR, Lagopoulos J. (2015) A systematic review and meta-analysis of magnetic resonance imaging measurement of structural volumes in posttraumatic stress disorder. *Psychiatry Res*, 232(1): 1-33.

O'Donnell T, Hegadoren KM, Coupland NC. (2004) Noradrenergic mechanisms in the pathophysiology of post-traumatic stress disorder. *Neuropsychobiology*, 50(4): 273-83.

O'Shea RD. (2002) Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 29(11): 1018-23.

Ofek K, Soreq H. (2013) Cholinergic involvement and manipulation approaches in multiple system disorders. *Chem Biol Interact*, 203(1): 113-9.

Ohmura Y, Yoshioka M. (2017) Raphe serotonergic system modulating emotion - anxiety and fear memory. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 149(1): 27-33.

Olszewski TM, Varrasse JF. (2005) The neurobiology of PTSD: implications for nurses. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv*, 43(6): 40-7.

Pare D, Quirk GJ, Ledoux JE. (2004) New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J Neurophysiol*, 92(1): 1-9.

Park SM, Williams CL. (2012) Contribution of serotonin type 3 receptors in the successful extinction of cued or contextual fear conditioned responses: interactions with GABAergic signaling. *Rev Neurosci*, 23(5-6): 555-69.

Pavlov I. *Conditioned Reflexes*. Oxford University Press, UK, 1927:

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, 14(3): 149-67.

Perusini JN, Meyer EM, Long VA, Rau V, Nocera N, Avershal J, Maksymetz J, Spigelman I, Fanselow MS. (2016) Induction and Expression of Fear Sensitization Caused by Acute Traumatic Stress. *Neuropsychopharmacology*, 41(1): 45-57.

Pinter-Kubler B, Ferenczi S, Nunez C, Zelei E, Polyak A, Milanes MV, Kovacs KJ. (2013) Differential Changes in Expression of Stress- and Metabolic-Related Neuropeptides in the Rat Hypothalamus during Morphine Dependence and Withdrawal. *PLoS One*, 8(6): e67027.

Pissiota A, Frans O, Fernandez M, von Knorring L, Fischer H, Fredrikson M. (2002) Neurofunctional correlates of posttraumatic stress disorder: a PET symptom provocation study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 252(2): 68-75.

Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G. (2011) The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci*, 13(1): 22-37.

Popova D, Agustsdottir A, Lindholm J, Mazulis U, Akamine Y, Castren E, Karpova NN. (2014) Combination of fluoxetine and extinction treatments forms a unique synaptic protein profile that correlates with long-term fear reduction in adult mice. *Eur Neuropsychopharmacol*, 24(7): 1162-74.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604): 730-2.

Potter E, Sutton S, Donaldson C, Chen R, Perrin M, Lewis K, Sawchenko PE, Vale W. (1994) Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(19): 8777-81.

Poulos AM, Reger M, Mehta N, Zhuravka I, Sterlace SS, Gannam C, Hovda DA, Giza CC, Fanselow MS. (2014) Amnesia for early life stress does not preclude the adult development of posttraumatic stress disorder symptoms in rats. *Biol Psychiatry*, 76(4): 306-14.

Prut L, Belzung C. (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*, 463(1-3): 3-33.

Quirk GJ, Likhtik E, Pelletier JG, Pare D. (2003) Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. *J Neurosci*, 23(25): 8800-7.

Raimondo JV, Kay L, Ellender TJ, Akerman CJ. (2012) Optogenetic silencing strategies differ in their effects on inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci*, 15(8): 1102-4.

Raskind MA, Peterson K, Williams T, Hoff DJ, Hart K, Holmes H, Homas D, Hill J, Daniels C, Calohan J, Millard SP, Rohde K, O'Connell J, Pritzl D, Feiszli K, Petrie EC, Gross C, Mayer CL, Freed MC, Engel C, Peskind ER. (2013) A trial of prazosin for combat trauma PTSD with nightmares in active-duty soldiers returned from Iraq and Afghanistan. *Am J Psychiatry*, 170(9): 1003-10.

Resstel LB, Joca SR, Guimaraes FG, Correa FM. (2006) Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. *Neuroscience*, 143(2): 377-85.

Reul JM, de Kloet ER. (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117(6): 2505-11.

Reus GZ, Simoes LR, Colpo GD, Scaini G, Oses JP, Generoso JS, Prossin AR, Kaddurah-Daouk R, Quevedo J, Barichello T. (2017) Ketamine potentiates oxidative stress and influences behavior and inflammation in response to lipopolysaccharide (LPS) exposure in early life. *Neuroscience*, 353: 17-25.

Riaza Bermudo-Soriano C, Perez-Rodriguez MM, Vaquero-Lorenzo C, Baca-Garcia E. (2012) New perspectives in glutamate and anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 100(4): 752-74.

Rougemon-Bucking A, Linnman C, Zeffiro TA, Zeidan MA, Lebron-Milad K, Rodriguez-Romaguera J, Rauch SL, Pitman RK, Milad MR. (2011) Altered processing of contextual information during fear extinction in PTSD: an fMRI study. *CNS Neurosci Ther*, 17(4): 227-36.

Rudy JW, Huff NC, Matus-Amat P. (2004) Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neurosci Biobehav Rev*, 28(7): 675-85.

Rueter LE, Jacobs BL. (1996) A microdialysis examination of serotonin release in the rat forebrain induced by behavioral/environmental manipulations. *Brain Res*, 739(1-2): 57-69.

Sacchetti B, Ambrogi Lorenzini C, Baldi E, Tassoni G, Bucherelli C. (1999) Memorization of contextual and CS conditioned fear response (freezing) in a one-trial acquisition paradigm. *Arch Ital Biol*, 137(4): 235-48.

Saito Y, Matsumoto M, Yanagawa Y, Hiraide S, Inoue S, Kubo Y, Shimamura K, Togashi H. (2013) Facilitation of fear extinction by the 5-HT(1A) receptor agonist tandospirone: possible involvement of dopaminergic modulation. *Synapse*, 67(4): 161-70.

Sakata-Haga H, Kanemoto M, Maruyama D, Hoshi K, Mogi K, Narita M, Okado N, Ikeda Y, Nogami H, Fukui Y, Kojima I, Takeda J, Hisano S. (2001) Differential localization and colocalization of two neuron-types of sodium-dependent inorganic phosphate cotransporters in rat forebrain. *Brain Res*, 902(2): 143-55.

Sanders MJ, Wiltgen BJ, Fanselow MS. (2003) The place of the hippocampus in fear conditioning. *Eur J Pharmacol*, 463(1-3): 217-23.

Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F. (2004) Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, 14(10): 1100-9.

Sareen J. (2014) Posttraumatic stress disorder in adults: impact, comorbidity, risk factors, and treatment. *Can J Psychiatry*, 59(9): 460-7.

Schafer MK, Varoqui H, Defamie N, Weihe E, Erickson JD. (2002) Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem*, 277(52): 50734-48.

Schenberg LC, Pova RM, Costa AL, Caldellas AV, Tufik S, Bittencourt AS. (2005) Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. *Neurosci Biobehav Rev*, 29(8): 1279-98.

Schipper P, Henckens M, Borghans B, Hiemstra M, Kozicz T, Homberg JR. (2017) Prior fear conditioning does not impede enhanced active avoidance in serotonin transporter knockout rats. *Behav Brain Res*, 326: 77-86.

Schmidt SD, Furini CR, Zinn CG, Cavalcante LE, Ferreira FF, Behling JA, Myskiw JC, Izquierdo I. (2016) Modulation of the consolidation and reconsolidation of fear memory by three different serotonin receptors in hippocampus. *Neurobiol Learn Mem*.

Schneiderman N, Ironson G, Siegel SD. (2005) Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants. *Annu Rev Clin Psychol*, 1: 607-28.

Seal RP, Akil O, Yi E, Weber CM, Grant L, Yoo J, Clause A, Kandler K, Noebels JL, Glowatzki E, Lustig LR, Edwards RH. (2008) Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3. *Neuron*, 57(2): 263-75.

Selden NR, Everitt BJ, Jarrard LE, Robbins TW. (1991) Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. *Neuroscience*, 42(2): 335-50.

Selye H. (1952) [The concept of stress as it appears in 1952]. *Brux Med*, 32(46): 2383-92.

Selye H. (1985) The nature of stress. *Basal Facts*, 7(1): 3-11.

Selye H. (1998) A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 10(2): 230-1.

Seo D, Patrick CJ, Kennealy PJ. (2008) Role of Serotonin and Dopamine System Interactions in the Neurobiology of Impulsive Aggression and its Comorbidity with other Clinical Disorders. *Aggress Violent Behav*, 13(5): 383-395.

Shepherd JD. (2012) Memory, plasticity and sleep - A role for calcium permeable AMPA receptors? *Front Mol Neurosci*, 5: 49.

Shin LM, McNally RJ, Kosslyn SM, Thompson WL, Rauch SL, Alpert NM, Metzger LJ, Lasko NB, Orr SP, Pitman RK. (1999) Regional cerebral blood flow during script-driven imagery in childhood sexual abuse-related PTSD: A PET investigation. *Am J Psychiatry*, 156(4): 575-84.

Siegmund A, Wotjak CT. (2006) Toward an animal model of posttraumatic stress disorder. *Ann N Y Acad Sci*, 1071: 324-34.

Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ. (2011) Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*, 36(2): 529-38.

Silva MT. (1973) Extinction of a passive avoidance response in adrenalectomized and demedullated rats. *Behav Biol*, 9(5): 553-62.

Silva RC, Gargaro AC, Brandao ML. (2004) Differential regulation of the expression of contextual freezing and fear-potentiated startle by 5-HT mechanisms of the median raphe nucleus. *Behav Brain Res*, 151(1-2): 93-101.

Singewald N, Schmuckermair C, Whittle N, Holmes A, Ressler KJ. (2015) Pharmacology of cognitive enhancers for exposure-based therapy of fear, anxiety and trauma-related disorders. *Pharmacol Ther*, 149: 150-90.

Skelton K, Ressler KJ, Norrholm SD, Jovanovic T, Bradley-Davino B. (2012) PTSD and gene variants: new pathways and new thinking. *Neuropharmacology*, 62(2): 628-37.

Sos KE, Mayer MI, Cserep C, Takacs FS, Szonyi A, Freund TF, Nyiri G. (2017) Cellular architecture and transmitter phenotypes of neurons of the mouse median raphe region. *Brain Struct Funct*, 222(1): 287-299.

Soubrié P. (2010) Reconciling the role of central serotonin neurons in human and animal behavior. *Behavioral and Brain Sciences*, 9(2): 319-335.

Stam R. (2007) PTSD and stress sensitisation: a tale of brain and body Part 2: animal models. *Neurosci Biobehav Rev*, 31(4): 558-84.

Studniarczyk D, Coombs I, Cull-Candy SG, Farrant M. (2013) TARP gamma-7 selectively enhances synaptic expression of calcium-permeable AMPARs. *Nat Neurosci*, 16(9): 1266-74.

Surget A, Belzung C. (2008) Involvement of vasopressin in affective disorders. *Eur J Pharmacol*, 583(2-3): 340-9.

Sweatt JD. (2016) Neural plasticity and behavior - sixty years of conceptual advances. *J Neurochem*, 139 Suppl 2: 179-199.

Szonyi A, Mayer MI, Cserep C, Takacs VT, Watanabe M, Freund TF, Nyiri G. (2016) The ascending median raphe projections are mainly glutamatergic in the mouse forebrain. *Brain Struct Funct*, 221(2): 735-51.

Taber E, Brodal A, Walberg F. (1960) The raphe nuclei of the brain stem in the cat. I. Normal topography and cytoarchitecture and general discussion. *J Comp Neurol*, 114: 161-87.

Takahashi A, Yap JJ, Bohager DZ, Faccidomo S, Clayton T, Cook JM, Miczek KA. (2009) Glutamatergic and GABAergic modulations of ultrasonic vocalizations during maternal separation distress in mouse pups. *Psychopharmacology (Berl)*, 204(1): 61-71.

Takamori S. (2006) VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? *Neurosci Res*, 55(4): 343-51.

Takeda K, Tsuji M, Miyagawa K, Takeda H. (2017) 5-HT₇ receptor-mediated fear conditioning and possible involvement of extracellular signal-regulated kinase. *Neurosci Lett*, 638: 69-75.

Tringer L. A pszichiátria tankönyve. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2010:

True WR, Rice J, Eisen SA, Heath AC, Goldberg J, Lyons MJ, Nowak J. (1993) A twin study of genetic and environmental contributions to liability for posttraumatic stress symptoms. *Arch Gen Psychiatry*, 50(4): 257-64.

Tsigos C, Kirsch I, Kassi E. (2016) Stress, Endocrine Physiology and Pathophysiology. De Groot LJ, Chrousos GP, Dungan K. South Dartmouth, MD: Text.com.

Tulogdi A, Soros P, Toth M, Nagy R, Biro L, Aliczki M, Klausz B, Mikics E, Haller J. (2012) Temporal changes in c-Fos activation patterns induced by conditioned fear. *Brain Res Bull*, 88(4): 359-70.

Ursano RJ, Li H, Zhang L, Hough CJ, Fullerton CS, Benedek DM, Grieger TA, Holloway HC. (2008) Models of PTSD and traumatic stress: the importance of research "from bedside to bench to bedside". *Prog Brain Res*, 167: 203-15.

Van Dijken HH, Van der Heyden JA, Mos J, Tilders FJ. (1992) Inescapable footshocks induce progressive and long-lasting behavioural changes in male rats. *Physiol Behav*, 51(4): 787-94.

Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W, Sawchenko PE. (2000) Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol*, 428(2): 191-212.

VanElzakker M, Fevurly RD, Breindel T, Spencer RL. (2008) Environmental novelty is associated with a selective increase in Fos expression in the output elements of the hippocampal formation and the perirhinal cortex. *Learn Mem*, 15(12): 899-908.

VanElzakker MB, Dahlgren MK, Davis FC, Dubois S, Shin LM. (2014) From Pavlov to PTSD: the extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety disorders. *Neurobiol Learn Mem*, 113: 3-18.

Varga J, Ferenczi S, Kovacs KJ, Garafova A, Jezova D, Zelena D. (2013) Comparison of stress-induced changes in adults and pups: is aldosterone the main adrenocortical stress hormone during the perinatal period in rats? *PLoS One*, 8(9): e72313.

- Varga J, Fodor A, Klausz B, Zelena D. (2015) Anxiogenic role of vasopressin during the early postnatal period: maternal separation-induced ultrasound vocalization in vasopressin-deficient Brattleboro rats. *Amino Acids*, 47(11): 2409-18.
- Verma M, Bali A, Singh N, Jaggi AS. (2016) Investigating the role of nisoldipine in foot-shock-induced post-traumatic stress disorder in mice. *Fundam Clin Pharmacol*, 30(2): 128-36.
- Vianna DM, Graeff FG, Landeira-Fernandez J, Brandao ML. (2001) Lesion of the ventral periaqueductal gray reduces conditioned fear but does not change freezing induced by stimulation of the dorsal periaqueductal gray. *Learn Mem*, 8(3): 164-9.
- Vidal-Gonzalez I, Vidal-Gonzalez B, Rauch SL, Quirk GJ. (2006) Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learn Mem*, 13(6): 728-33.
- Wang CC, Lin HC, Chan YH, Gean PW, Yang YK, Chen PS. (2013) 5-HT_{1A}-receptor agonist modified amygdala activity and amygdala-associated social behavior in a valproate-induced rat autism model. *Int J Neuropsychopharmacol*, 16(9): 2027-39.
- Wang DV, Yau HJ, Broker CJ, Tsou JH, Bonci A, Ikemoto S. (2015) Mesopontine median raphe regulates hippocampal ripple oscillation and memory consolidation. *Nat Neurosci*, 18(5): 728-35.
- Weidenfeld J, Newman ME, Itzik A, Gur E, Feldman S. (2002) The amygdala regulates the pituitary-adrenocortical response and release of hypothalamic serotonin following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus in the rat. *Neuroendocrinology*, 76(2): 63-9.
- Wenthold RJ, Petralia RS, Blahos J, II, Niedzielski AS. (1996) Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci*, 16(6): 1982-9.
- Whitaker AM, Gilpin NW, Edwards S. (2014) Animal models of post-traumatic stress disorder and recent neurobiological insights. *Behav Pharmacol*, 25(5-6): 398-409.
- Willard SS, Koochekpour S. (2013) Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. *Int J Biol Sci*, 9(9): 948-59.
- Wiltgen BJ, Sanders MJ, Anagnostaras SG, Sage JR, Fanselow MS. (2006) Context fear learning in the absence of the hippocampus. *J Neurosci*, 26(20): 5484-91.

- Wittmann G, Hrabovszky E, Lechan RM. (2013) Distinct glutamatergic and GABAergic subsets of hypothalamic pro-opiomelanocortin neurons revealed by in situ hybridization in male rats and mice. *J Comp Neurol*, 521(14): 3287-302.
- Woon FL, Sood S, Hedges DW. (2010) Hippocampal volume deficits associated with exposure to psychological trauma and posttraumatic stress disorder in adults: a meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34(7): 1181-8.
- Yamada D, Zushida K, Wada K, Sekiguchi M. (2009) Pharmacological discrimination of extinction and reconsolidation of contextual fear memory by a potentiator of AMPA receptors. *Neuropsychopharmacology*, 34(12): 2574-84.
- Yang CQ, Duan LP, Qiao PT, Zhao L, Guo LL. (2015) Increased VGLUT3 involved in visceral hyperalgesia in a rat model of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*, 21(10): 2959-66.
- Yang CQ, Wei YY, Leng YX, Zhong CJ, Zhang YS, Wan Y, Duan LP. (2012) Vesicular glutamate transporter-3 contributes to visceral hyperalgesia induced by *Trichinella spiralis* infection in rats. *Dig Dis Sci*, 57(4): 865-72.
- Yang YL, Chao PK, Lu KT. (2006) Systemic and intra-amygdala administration of glucocorticoid agonist and antagonist modulate extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*, 31(5): 912-24.
- Yehuda R. (1997) Sensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in posttraumatic stress disorder. *Ann N Y Acad Sci*, 821: 57-75.
- Yehuda R. (2001) Biology of posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry*, 62 Suppl 17: 41-6.
- Yehuda R. (2004) Risk and resilience in posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry*, 65 Suppl 1: 29-36.
- Yehuda R, Antelman SM. (1993) Criteria for rationally evaluating animal models of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*, 33(7): 479-86.
- Yehuda R, Bierer LM, Pratchett L, Malowney M. (2010) Glucocorticoid augmentation of prolonged exposure therapy: rationale and case report. *Eur J Psychotraumatol*, 1.
- Yehuda R, Halligan SL, Grossman R, Golier JA, Wong C. (2002) The cortisol and glucocorticoid receptor response to low dose dexamethasone administration in aging combat veterans and holocaust survivors with and without posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*, 52(5): 393-403.

- Yehuda R, Harvey PD, Buchsbaum M, Tischler L, Schmeidler J. (2007) Enhanced effects of cortisol administration on episodic and working memory in aging veterans with PTSD. *Neuropsychopharmacology*, 32(12): 2581-91.
- Yehuda R, McFarlane AC, Shalev AY. (1998) Predicting the development of posttraumatic stress disorder from the acute response to a traumatic event. *Biol Psychiatry*, 44(12): 1305-13.
- Yehuda R, Southwick SM, Nussbaum G, Wahby V, Giller EL, Jr., Mason JW. (1990) Low urinary cortisol excretion in patients with posttraumatic stress disorder. *J Nerv Ment Dis*, 178(6): 366-9.
- Yizhar O, Fenno LE, Davidson TJ, Mogri M, Deisseroth K. (2011) Optogenetics in neural systems. *Neuron*, 71(1): 9-34.
- Zelena D, Kiem DT, Barna I, Makara GB. (1999) Alpha 2-adrenoreceptor subtypes regulate ACTH and beta-endorphin secretions during stress in the rat. *Psychoneuroendocrinology*, 24(3): 333-43.
- Zelena D, Mergl Z, Makara GB. (2003) Maternal genotype influences stress reactivity of vasopressin-deficient brattleboro rats. *J Neuroendocrinol*, 15(12): 1105-10.
- Zelena D, Mikics E, Balazsfi D, Varga J, Klausz B, Urban E, Sipos E, Biro L, Miskolczi C, Kovacs K, Ferenczi S, Haller J. (2016) Enduring abolishment of remote but not recent expression of conditioned fear by the blockade of calcium-permeable AMPA receptors before extinction training. *Psychopharmacology (Berl)*, 233(11): 2065-76.
- Zushida K, Sakurai M, Wada K, Sekiguchi M. (2007) Facilitation of extinction learning for contextual fear memory by PEPA: a potentiator of AMPA receptors. *J Neurosci*, 27(1): 158-66.

XI. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

2017 Balazsfi DG, Zelena D, Farkas L, Demeter K, Barna I, Cserep Cs, Takacs VT, Nyiri G, Goloncser F, Sperlagh B, Freund TF, Haller J. Median raphe region stimulation alone generates remote, but not recent fear memory traces. PLOS ONE 12:(7) p. e0181264. (2017) IF:2,806

Horvath HR, Fazekas CL, **Balazsfi D**, Jain SK, Haller J, Zelena D. Contribution of Vesicular Glutamate Transporters to Stress Response and Related Psychopathologies: Studies in VGluT3 Knockout Mice. CELLULAR AND MOLECULAR NEUROBIOLOGY x:(x) Paper in press. (2017) IF:2,939

2016 Balázsfi D, Farkas L, Csikota P, Fodor A, Zsebők S, Haller J, Zelena D. Sex-dependent role of vesicular glutamate transporter 3 in stress-regulation and related anxiety phenotype during the early postnatal period. Stress. 2016 Jul;19(4):434-8. IF: 2,590

Zelena D, Mikics É, **Balázsfi D**, Varga J, Klausz B, Urbán E, Sipos E, Biró L, Miskolczi C, Kovács K, Ferenczi S, Haller J. Enduring abolishment of remote but not recent expression of conditioned fear by the blockade of calcium-permeable AMPA receptors before extinction training. Psychopharmacology (Berl). 2016 Jun;233(11):2065-76. IF:3,308

Egyéb közlemények:

2017 Mikics E, Guirado R, Umemori J, Toth M, Biro L, Miskolczi C, **Balazsfi D**, Zelena D, Castren E, Haller J, Karpova NN. Social Learning Requires Plasticity Enhanced by Fluoxetine Through Prefrontal Bdnf-TrkB Signaling to Limit Aggression Induced by Post-Weaning Social Isolation. NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY x:(x) p. x. Paper in press. (2017) IF:6,403

2016 Csikota P, Fodor A, **Balázsfi D**, Pintér O, Mizukami H, Weger S, Heilbronn R, Engelmann M, Zelena D. Vasopressinergic control of stress-related behavior: studies in Brattleboro rats. *Stress*. 2016 Jul;19(4):349-61. IF:2,590

Fodor A, Kovács KB, **Balázsfi D**, Klausz B, Pintér O, Demeter K, Daviu N, Rabasa C, Rotllant D, Nadal R, Zelena D. Depressive- and anxiety-like behaviors and stress-related neuronal activation in vasopressin-deficient female Brattleboro rats. *Physiol Behav*. 2016 May 1 ;158:100-11. IF:2,341

2015 Zelena D, Pintér O, **Balázsfi DG**, Langnaese K, Richter K, Landgraf R, Makara GB, Engelmann M. Vasopressin signaling at brain level controls stress hormone release: the vasopressin-deficient Brattleboro rat as a model. *Amino Acids*. 2015 Nov;47(11):2245-53. IF:3,173

Balázsfi D, Pintér O, Klausz B, Kovács KB, Fodor A, Török B, Engelmann M, Zelena D. Restoration of peripheral V2 receptor vasopressin signaling fails to correct behavioral changes in Brattleboro rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2015 Jan;51:11-23. IF:4,788

2012 Fodor A, Klausz B, Pintér O, Daviu N, Rabasa C, Rotllant D, **Balázsfi D**, Kovács KB, Nadal R, Zelena D. Maternal neglect with reduced depressive-like behavior and blunted c-fos activation in Brattleboro mothers, the role of central vasopressin. *Horm Behav*. 2012 Sep;62(4):539-51. IF:3,378

XII. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönöm témavezetőmnek, Dr. Haller Józsefnek a lehetőséget, hogy kutatócsoportjában végezhettem doktori munkámat. Mindig rendelkezésemre álló szakmai támogatása, ötletei, építő kritikái nélkül nem jöhettek volna létre ezek az eredmények.

Köszönettel tartozom Dr. Zelena Dórának, akinél TDK munkámat végezhettem, valamint, hogy PhD munkám során is mindenben és mindenkor a segítségemre volt, támogatott céljaim megvalósításában. Köszönet megértéséért, és végtelen türelméért és idejéért, melyet rám fordított. Külön köszönöm Barna István segítségét az optogenetikai technika bevezetésében, és tanácsait, éleslátását az élet minden területén, melyet megosztott velem. Köszönettel tartozom Dr. Klausz Barbarának és Dr. Pintér Ottónak, hogy társaságukban ismerhettem meg a kísérletes kutatómunka mindennapjait, hogy bármivel és bármikor fordulhattam hozzájuk segítségért TDK munkám során.

Szeretném megköszönni a csoport minden jelenlegi és volt munkatársának az általuk nyújtott segítséget, nélkülük ez a dolgozat nem született volna meg. Külön köszönöm a kísérletek során és a mindennapokban nyújtott segítséget és támogatást Till Ibolyának, Venczkóné Bakos Nikolettának, Barsvári Beátának, Gyimesiné Pelczer Katalinnak és Dobozi Évának. Hálával tartozom a közös munkákért TDK és PhD társaimnak: Dr. Fodor Annának, Kovács Krisztinának, Dr. Aliczki Manónak, Dr. Varga Jánosnak, Bíró Lászlónak, Balogh Zoltánnak és Csikota Péternek. Dr. Demeter Kornélnak, Dr. Mikics Évának, Dr. Tóth Máténak, Dr. Tulogdi Áronnak a gyakorlati segítségnyújtásokon túl, az elméleti, szakmai támogatást és az állandó kritikáikat szeretném megköszönni, amelyek a dolgozatom megírásában is óriási segítséget jelentettek. Köszönöm Dr. Nyíri Gábornak és csoportjának a kollaborációban nyújtott segítségét az optogenetikai kísérletek során és útmutatását Ferenczi Szilamérnak a PCR mérések során.

Köszönet illeti továbbá Dr. Kovács Krisztinát az értekezésemmel kapcsolatos értékes kritikáiért. Köszönöm az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet és az Állatház minden munkatársának, különösen Nagy Alexának, hogy biztosították a háttérrel és a feltételeket a hatékony munkavégzésemhez.

Végül pedig köszönöm családom türelmét és bizalmát, mellyel mindig mögöttem álltak és támogattak. Továbbá hálás vagyok barátaim támogatásáért is, nélkülük mindez nem valósulhatott volna meg.