

# Poszttraumás stressz szindróma kialakulásának hátterében álló glutamáterg folyamatok tanulmányozása állatmodellben

Doktori tézisek

**Balázsfi Diána Gabriella**

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



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

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

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

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

Budapest

2017

# 1. BEVEZETÉS

---

Az embert élete során többféle stresszor éri, azonban probléma akkor adódik, ha az egyén nem képes megküzdni az adott stresszhelyzettel, melynek következtében patológiás folyamatok indulnak meg, és ezek pszichiátriai zavarok kialakulásához vezetnek. Ilyen mentális zavar a poszttraumás stressz szindróma (PTSD) is. A PTSD traumatikus esemény vagy események után fellépő védekező tünetegyüttes, amely (sokszor elveszettek hitt) emlékek újbóli felidézésén, átélésén alapul, és félelmi válaszra hasonlító tüneteket idéz elő. Sokszor egyetlen igen erős traumatikus esemény, harctéri robbanás vagy szexuális erőszak is elegendő a betegség kiváltásához. A traumán átesett emberek 10-30 %-ánál alakul ki PTSD és kialakulásának valószínűségét körülbelül 1/3-ad arányban határozza meg a genetika, 2/3-ad arányban, pedig külső, környezeti tényezők, illetve az egyén megküzdési képessége.

Tovább súlyosbítja a helyzetet, hogy PTSD-vel diagnosztizált emberek 80-90%-ánál más társult mentális zavar is előfordul (szorongás, major depresszió). A betegség kezelése pszichoterápia és farmakológiai kezelés kombinációját jelenti. A pszichoterápia esetén expozíciós (kioltódásos) technikát alkalmaznak, mely során a beteget ismételt szembesítik a traumára emlékeztető kulcsinggerrel biztonságos körülmények között, így lassan megtanulja reálisan értelmezni a történeteket. A farmakológiai kezelések leginkább csak a társult betegségek gyógyítására, és tüneti kezelésre vonatkoznak. Az Amerikai (FDA) és az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) ajánlása szerint a PTSD-ben szenvedőket elsősorban antidepresszánsokkal (szelektív szerotonin visszavétel gátlók (SSRI)), illetve szorongásoldókkal kell kezelni. Egy tanulmány jól példázza a kezelések sikertelenségét, a PTSD megjelenését követő 6 évben elemezték a kezelés hatékonyságát, és azt találták, hogy az csak a betegek 14%-án tudott segíteni.

A PTSD kialakulásának háttérében álló neurológiai folyamatok nem teljesen ismertek, és további vizsgálatokra van szükség új terápiás lehetőségek feltárásához. A betegség háttérében álló mechanizmusokat állatmodelleken vizsgálhatjuk. A csoportunkban a DSM IV/V követelményei alapján validált kondicionált félelem tesztet alkalmaztuk. A teszt során az első napon elektromos lábsokkot kapnak az állatok, melyet társítanak a környezettel, majd az állatokat kétszer, először rövid idő (1 nap), majd hosszabb idő (7 vagy 28 nap múlva) eltelte után visszahelyezzük ugyanabba a dobozba és vizsgáljuk a magatartásukat. Az elektromos

lábsokk hatására az állatok fajspecifikus magatartási válasza a mozdulatlanná dermedés („freezing”).

Rágcsálókön végzett vizsgálatok alapján a félelmi memória kialakításában elsősorban a prefrontális kéreg, az amigdala és a hippokampusz vesz részt, mely agyterületek megfeleltethetőek a humán idegrendszerben a PTSD-ben szenvedő betegekben megfigyelhető patológiás aktivitásmintázatnak. A PTSD háttérében álló folyamatokat a glutamaterg rendszer vizsgálatán keresztül elemeztük. A glutamát jelátvitel fontos szerepet játszik a szinaptikus plaszticitásban, így a félelmi memória kialakulásában is, melyben az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptor kulcsszerepén kívül az utóbbi időben kalcium permeábilis  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolepropionsav (CP-AMPA) receptor szerepét is feltételezik. A CP-AMPA receptor farmakológiai modulációja specifikusabb beavatkozásra ad lehetőséget, illetve új terápiás lehetőséget is nyit a PTSD kezelésében.

A glutamát rendszer jellemzésére a vezikuláris glutamát transzporterek (VGluT1,2,3) alkalmasak, melyek szelektív befolyásolása szintén finomabb, specifikusabb beavatkozást tesz lehetővé. Génkiűtött egereken a VGluT3 szerepét vizsgáltuk, mivel ennek a típusnak az előfordulása viszonylag korlátozott, így befolyásolása kevésbé általános hatásokkal jár. Erre utal az is, hogy a VGluT1 és 2 kiűtése letális, míg a VGluT3 génkiűtött egerek életképesek. A transzporter sajátossága, hogy főként olyan neuronokban fordul elő, melyek elsődleges neurotransmitterként egy másik ingerületátvivő anyagot használnak kommunikációjuk során. Ezek közül a szerotonerg sejteket tartalmazó raphe-t emelném ki, annak is a mediális részét, melyben a neuronok közel 30%-a tartalmazza ezt a transzporter típust. A figyelmünket a mediális raphe vizsgálatára irányította az is, hogy a PTSD kezelésében leggyakrabban SSRI-ket alkalmaznak, mely a raphe magokból induló szerotonerg rendszer befolyásolásán keresztül fejti ki hatását.

Ezenkívül a stressz tengely (HHM: hipotalamo-hipofízis-mellékvese tengely) szerepét sem szabad figyelmen kívül hagynunk, mivel a stressz adaptáció egyik legfontosabb alkotója, így PTSD-ben szenvedő betegekben is megváltozott működését tapasztalhatjuk. A glutamaterg rendszer számos ponton képes befolyásolni ezt, azonban a VGluT3 tartalmú neuronok kapcsolata a stressz tengellyel még nem tisztázott.

## **2. CÉLKITŰZÉSEK**

---

Egyes vizsgálataink célja a következő kérdések megválaszolása volt:

- 1. A félelmi kondicionálás rövid és hosszabb távú hatásainak vizsgálata patkányokban és egerekben**
  - a. A PTSD emberekre megfigyelhető magatartási tüneteinek jellemzése rágcsálókban
  - b. A félelmi kondicionálás hatásainak vizsgálata a HHM tengelyre (stressz hormon szintek elemzésével)
  - c. A félelmi memória kialakításában részt vevő agyterületek vizsgálata c-Fos immunhisztokémiával
  
- 2. A glutamaterg rendszer szerepének vizsgálata**
  - a. Az 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 fiziológiai tulajdonságok mérése
    - ii. Szorongás és stresszreaktivitás vizsgálata fiatal állatokban
    - iii. VGluT3 hiány hatása a félelmi kondicionálásban
    - 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

## **3. MÓDSZEREK**

---

### **3.1. Állatok**

A vizsgálatban résztvevő állatok Wistar patkányok (körülbelül 10 hetesek; MTA Kísérleti Orvostudományi Intézetben tenyésztett törzsből származnak) és C57BL/6J vagy C57BL/6N egerek (fiatal állatok 7-8, felnőtt állatok 14-18 hetesek; Charles River Laboratórium, Budapest,

Magyarország) voltak. A genetikailag módosított egerek (C57BL/6J háttérű) közül csak homozigóta egyedeket használtunk (VGluT3<sup>+/+</sup> vad típusú (WT) és VGluT3<sup>-/-</sup> génkiütött (KO)), szaporításuk az MTA Kísérleti Orvostudományi Intézetben tenyésztett törzsből heterozigóta tenézsparokkal történt. A genotipizálásuk qPCR módszerrel történt 2-3 napos korukban farokból vett mintával. Az állatházban és a kísérleti szobákban egységesen a hőmérséklet  $22 \pm 2$  °C és a páratartalom  $60 \pm 10\%$  közötti volt. Vízzel és a rágcsáló táplálék *ad libitum* hozzáférhető volt az összes kísérletben. Az állatokat 12 órás fény-sötét ciklusban tartottuk, és egyesével helyeztük el az állattartó ketrecekben, és a 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.

## **3.2. Magatartás tesztek és elemzésük**

A magatartás teszteket egy külön erre a célra kijelölt kísérleti szobában végeztük, ahol az állattartó szobára jellemző feltételek voltak adottak. A teszteket videokamerával 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).

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

A tesztek minden esetben 5 percig tartottak, egy fém rácsos aljzatú műanyag dobozba (30 x 30 x 30 cm) helyeztük az állatokat és félpercenként kaptak egy 1 másodperc hosszú sokkorsorozatot (50Hz), így mindegyik állat 10 db elektromos impulzusnak volt kitéve a teszt első napján. A patkányok 3 mA, az egerek 0,8 mA erősségű lábsokkot kaptak. A kontroll állatokat csak a sokkoló dobozba helyeztük 5 percre. A teszt második részében már nem alkalmaztunk elektromos lábsokkot, csak időről időre (egér: 1 és 7 nap; patkány: 1 és 28 nap) visszahelyeztük az állatokat ugyanabba a környezetbe 5 percre (kontextus függő félelmi kondicionálás). A vizsgálati dobozokat a

tesztelt állatok között szappanos vízzel, majd csapvízzel átmostuk és szárazra töröltük.

Megfigyelt magatartásbeli változók: *(le)dermedés* („freezing”), teljes mozdulatlanyságot jelent, a légzéshez szükséges mozgást leszámítva; *exploráció*, a környezet felderítését célozza, mely során az állat érdeklődve szagolhatja a környezetét; *önápolás* („grooming”), tisztálkodó mozdulatokat végez a mellső lábával vagy vakarózik; *pihenés* („resting”) nem változtatja a helyét, kis pozícióbeli változtatások lehetségesek. Az optogenetikai vizsgálat során meghatároztunk egy *ambuláció* paramétert, mely lényegében az állat lokomóciója, de elkülönül az explorációtól. Ehhez a teszt doboz alját virtuálisan felosztottuk és a vonalátlépés mennyiségéből határoztuk meg a megtett utat. A *megrohanás* (run) során az állatot nem célorientált gyors mozgás jellemzi és legalább egy doboz hossznyi utat megtesz pár másodpercen belül. Az optogenetikai vizsgálat során az 5 perces tesztet további 10 („ON response”) és 20 másodpercre („OFF response”) bontottuk az optogenetikai stimulálásnak megfelelően.

### **3.2.2. Fiatal egerek vizsgálata**

#### *3.2.2.1. Bakteriális fertőzés modellezése*

Az egereknek posztnatálisan, 14-15 naponan 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 (adrenokortikotrop hormon (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.

#### *3.2.2.2. Ultrahangos vokalizáció (ultrasonic vocalization, USV)*

A fiatal állatokat az anyjuktól elválasztva egy hangszigetelt szobába vittük és egy 600 ml üveg főzőpohárba helyeztük alom nélkül 10 percre. 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 ultrahang szakaszok számát és a hangok hosszát (összes hang / 10 perc) vizsgáltuk.

### **3.2.3. Felnőtt egerek vizsgálata**

#### *3.2.3.1. Motoros koordináció vizsgálata (forgó rúd (rotarod test))*

Kísérletünkben az egereket egy 6 darab 3 cm átmérőjű forgó rudat tartalmazó szerkezetre helyeztük (IITC Life Science, Woodland Hills, USA), azonban kísérleteinkben 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. Minél előbb leesik a rúdról, annál valószínűbb, hogy valamilyen mozgáskoordinációs problémája van az állatnak.

#### *3.2.3.2. Fájdalomküszöb vizsgálata (hot plate, flinch-jump test)*

A termális fájdalomküszöböt egy elektromosan melegíthető padon teszteltük. A teszt napján az állatokat először hozzászoktattuk a szerkezethez (10 perc; 35 °C), amely egy melegíthető fém lapból és hozzá tartozó műanyag keretből állt (IITC Life Science, Woodland Hills, USA). A teszt során a fémlap 6°C/perc sebességgel folyamatosan melegedett addig a pontig, amíg az állat látható jelét nem adta a fájdalom érzékelésének (lábemelgetést, annak nyalogatását). A tesztet háromszor megismételtük egy perces szünetekkel. A hőérzékelés fájdalomküszöbét - ahol a lábemelő magatartást megfigyeltük - a három alkalom átlagában, °C-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. A fájdalomküszöböt, az állat ugrálásának kezdetében határoztuk meg. Az eredményeket az áramerősség mértékegységében, mA-ben fejeztük ki.

### 3.2.3.3. *Megküzdési stratégia vizsgálata (kényszerített úszás (forced swim test))*

Porsolt tesztje alapján 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. Vizsgáltuk a lebegés, 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.

### 3.2.3.4. *Hallás vizsgálata (startle válasz)*

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 összerenzenési választ.

### 3.2.3.5. *Megemelt keresztpalló teszt (elevated plus maze test)*

A teszt során az állatokat egy fekete, fém, két egymást keresztező karral rendelkező apparátusra helyeztük, melynek két szemben lévő karját fal vette körül (70 cm magasan, karok 50cm hosszúak 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. 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.

### 3.2.3.6. *Nyílt tér teszt (open field test)*

Az állatokat egyenként egy fehér műanyag arénába (40 cm x 36 cm x 19 cm) helyeztük 5 percre. Két részre osztottuk az arénát: perifériára és 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.

### 3.2.3.7. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Immunhisztokémiai módszer segítségével határoztuk meg az optogenetikai vizsgálat során használt vírus és optikai szál helyét, illetve becsültük meg a magtartási tesztek követően az aktiválódott idegsejtek mennyiségét a c-Fos pozitív sejtek száma alapján. A magtartás tesztek kezdete után 90 perccel az állatokat elaltattuk (ketamin-xylazin koktéllal), majd ezt követően transzkardiális perfúzióval fixáltuk az agyukat. A patkányok esetén a prefrontális kéreg (cinguláris (Cg1), infralimbikus (IL), prelimbikus (PrL)), az amigdala (centrális (CeA), mediális (MeA), bazolaterális (BLA)) és a hippokampusz (HC: CA1,2,3) három területét elemeztük. Az optogenetikai vizsgálat során az egereknél a raphe régiókat (mediális (MR) és dorzális (DR)), PFC területeit (Cg1, IL, PrL), paraventriculáris magot (PVN), periakveduktális szürkeállományt (PAG) és a bed nucleus of stria terminalis (BNST)-t vizsgáltuk.

### 3.2.3.8. Génexpresszió vizsgálata (rtPCR)

A vizsgálni kívánt agyterületeket RNáz mentes környezetben szárazjégen gyűjtöttük. A feldolgozás során először a szövet darabokat homogenizáltuk, majd az RNS-t izoláltuk a mintákból. A cDNS gyártását nagy kapacitású cDNS reverz transzkriptázt tartalmazó oldattal végeztük. A génexpresszió mennyiségét *real-time* PCR segítségével határoztuk meg a megfelelő *primer* használatával.

### 3.2.3.9. Hormonkoncentrációk mérése vérmintákból

A mintavétel után a vérmintákat +4°C-on lecentrifugáltuk (2500rpm, 25 perc), majd a különvált szérumot -20°C-on tároltuk radioimmunoassayvel (RIA) történt feldolgozásig. A méréshez az intézetünk által kifejlesztett specifikus antitesteket (nyúlban termeltetett, ACTH mérés esetén h-ACTH1-39 (no. 8514), kortikoszteron mérésnél kortikoszteron-3-karboximetiloxim-bovin szérum albumin ellen) használtunk. 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.

### 3.2.3.10. 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, 2ml/kg fiziológiás sóoldatban oldva) adtuk, illetve kontrollként egy másik csoport állat fiziológiás sóoldatot (0,9% NaCl) kapott.

### 3.2.3.11. Optogenetikai vizsgálat

A vizsgálat során először az MR régió területére vírust injektáltunk (40 nL; channelrhodopsint; AAV2.5.hSyn. hChR2 (H134R) eYFP.WPRE.hGH; 1.3e13 GC/ml; Addgene26973 vagy halorodopsint (AAV9.hSyn.eNpHR3.0-eYFP.WPRE.hGH; 2.04e13 GC/ml; Addgene26972) tartalmazó adenoasszociált vírus (AAV)) a következő koordinátákra: AP: -4.10 mm Bregma-tól; laterálisan: 0.0 mm a középvonaltól; DV: -4.60 mm a koponyafelszíntől. Két hét eltelte után megtörtént az optikai szál (105 µm magátmérőjű multimodális optikai szálát tartalmazó csatlakozót akril ragasztó és két csavar segítségével rögzítettük a koponyafelszínhez; koordináták: 10° hátra döntve; AP: -4.80 mm Bregma-tól; laterálisan: 0.0 mm a középvonaltól; DV: -4.10 mm a koponyafelszíntől) beültetése és az állatok átkerültek egy vírus injektált állatok tartására szolgáló helyiségbe. Az operációk során az állatokat ketamin-xylozin koktéllal (i.p. 25mg/kg xylozine-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, mely során a lézeres stimulálás és gátlás esetén is a nettó energiát folyamatos fényáram mellett mértük és állítottuk be 10-20 mW közötti értékre. A magatartás tesztek után az állatok agyát transzkardiális perfúzióval fixáltuk és immunhisztokémiai vizsgálattal elemeztük a vírus és a beültetett optikai szál helyét. A lézeres stimulációt elektromos lábsokk nélkül alkalmaztuk, vagy 20 Hz-es vagy 50Hz-es theta burst ritmusban. Egy másik kísérletben pedig folyamatos gátlást alkalmaztunk az elektromos lábsokkolás alatt, melyet további 30 percig még fenntartottunk.

### 3.2.3.12. 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 méréseket (*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.

## 4. EREDMÉNYEK

---

### 4.1. A félelmi kondicionálás rövid és hosszabb távú hatásainak vizsgálata patkányokban és egerekben

#### 4.1.1. 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 sokkoláson 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 egerben vizsgáltuk a jelenséget. 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, és hosszabb távon fennmaradt. Azaz előállítottuk a PTSD tüneteinek magatartási állatmodelljét, melyben a neurális és hormonális változások vizsgálhatók.

#### 4.1.2. Stresszhormonok

Érdekes módon a lábsokk magatartásváltozást előidéző stresszkeltő hatása nem egyértelműen követhető nyomon a HHM tengelyt jellemző hormon szintekben. 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 és csökkenésre PTSD-ben szenvedő betegekben. A glükokortikoid szint változásai nemcsak a HHM tengelyre hatnak negatív visszacsatolással, hanem más agyterületeken elhelyezkedő receptoraik révén, - például növelhetik a neuronális aktivitást a BLA-ban is -, más neuronális útvonalakat használva fejthetik ki hatásukat.

### ***4.1.3. Agyi aktivitás mérése c-Fos immunhisztokémiával***

A félelmi kondicionálást követő magatartási változásokkal szemben - patkány kísérleteinkben - nem volt mindegy, hogy a neuronális aktivitást a sokkolást követő napon vagy 28 nappal később vizsgáltuk. Kísérletünk során 1 nappal a félelmi kondicionálást követően, a BLA és a HC csökkent aktivitást mutatott, míg a többi agyterület nem különbözött a kontrolltól. 28 nap múlva csökkent aktivitást láthatunk a PFC, illetve növekedést az amigdala területein a kontroll állatokhoz képest. Eredményeinkkel némileg összhangban a PTSD-ben szenvedő betegben 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. Részben ez magyarázhatja a PFC csökkent aktivitását is, mely a tanulási folyamat zavarát, azaz az asszociáció kialakulásának hiányát jelzi.

## **4.2. A glutamaterg rendszer szerepének vizsgálata**

### ***4.2.1. 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. 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. A GluA1/GluA2 receptor-alegység arány növekedéséből - közvetett módon - következtethetünk CP-AMPA típus mennyiségének növekedésére. A vizsgálatunk során látott GluA1/GluA2 arány változása alátámasztja, hogy neuronális plaszticitás révén az amigdaláris CP-AMPA receptornak szerepe van a félelmi tanulásban, azonban a PFC esetén más folyamatok állhatnak a háttérben. Eredményeink arra utalnak, hogy CP-AMPA receptor határozott befolyással bír a félelmi memória kialakulására, bár szerepének súlya eltérő az egyes agyterületek között. Farmakológiai kezelés során CP-AMPA receptor antagonistá IEM-1460 alkalmazásával már egyszerű alkalommal elősegítettük a félelmi reakció csökkenését. Ez ígéretes terápiás lehetőség lehet, hiszen szinte az egész agyat behálózó glutamát rendszert specifikusabban tudjuk vele befolyásolni.

#### **4.2.2. VGluT3 hiány hatásainak vizsgálata**

##### **4.2.2.1.. Korai posztnatális kor**

Kísérleteink alátámasztották, hogy a szorongó fenotípus már a fejlődés korai szakaszában is megfigyelhető, ugyanis az anyai szeparációt követően a fiatal VGluT3 hiányos állatok több ultrahangot bocsátottak ki a vad típusúakhoz képest. Mivel a szorongás stressz-függő betegség, a magatartási változások háttérében 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. A HHM tengely különböző szintjein 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.

##### **4.2.2.2. Félelmi kondicionálás felnőtt egérben**

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 a félelmi kondicionálás során, illetve a megemelt keresztpalló tesztben szinte egyáltalán nem töltöttek időt a nyílt karban. Sőt, érdekes módon a nyílt tér tesztben a VGluT3 hiányos állatok

csökkent mozgékonyaságot mutattak a vad típusúakhoz képest, és kevesebbszer léptek a centrumba is. Megvizsgáltuk, hogy a megfigyelt magatartásbeli változásoknak nem lehet-e más, tartós VGlut3 hiányból származó fiziológiai oka (pl. mozgáskoordináció, fájdalomküszöb), azonban nem találtunk ilyen különbséget a genotípusok között.

#### *4.2.2.3. HHM tengely felnőtt állatokban*

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, mely egy lehetőséget vet fel a módosult HHM tengely működésével kapcsolatban, azonban a nyugalmi hormon szintekben már nem találtunk különbségeket. Ha az indukált hormonszinteket tekintjük elektromos lábsokk, nyílt tér teszt után, azt láthatjuk, hogy bár mindkét genotípus esetén emelkedett a kortikoszteron szint, ez az emelkedés mindig alacsonyabb volt a VGlut3 hiányos állatok esetén.

Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a VGlut3 hiánya elsősorban nem a félelmi memória vagy PTSD-szerű tünetek hosszabb távú kialakításáért felelős, hanem egyfajta belső félelem kialakításában játszik szerepet, melynek érzékenyítő hatása van a jövőben előforduló negatív életeseményekkel szemben. A VGlut3 expressziójának hiánya befolyásolja a HHM tengely működését, mely csökkent hormonválasszal járul hozzá az imént említett érzékeny fenotípushoz.

### **4.3. Az erőteljes VGlut3 jelenléttel rendelkező MR régió vizsgálata optogenetikával**

Kísérletünk során az elektromos lábsokk alatt alkalmazott MR régió optogenetikai gátlása néhány paraméterben képes volt ellensúlyozni a sokkolás hatását (csökkentette az állatok dermedéssel töltött idejét és növelte az exploráció mennyiségét). Azonban az MR régió optogenetikai stimulációja - elektromos lábsokk nélkül - nem indukált dermedést akután, ezzel arra utalva, hogy ez az agyterület nem tagja a közvetlen félelmi reakció kialakításáért felelős hálózatnak (mint pl. PAG). Bár az igaz, hogy a stimuláció hatására az állatoknál agitációt figyelhattunk meg, mely egyfajta kényelmetlen 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. Sőt, ha a félelmi kondicionálás napján az 5 perces tesztet még részletesebb elemezzük, ritmust figyelhetünk meg, mind az elektromos, 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. Ez is alátámasztja, hogy a jól ismert tónikusan felszabaduló szerotoninnal ellentétben az MR régió stimulálás során egy gyors, fázikusan ürülő neurotranszmitter szerepe kerülhet előtérbe. Az MR régió esetén számításba kell vennünk, hogy idesejtjeinek összetétele elég változatos - csak kisebb százalékba egyedül szerotonerg, más része glutamátal kolokalizált (*VGluT3 jelenléte figyelhető meg*) vagy glutamaterg -, így ezen ingerlése során sokkal összetettebb neurotranszmitter összetételt és funkciót kell feltételeznünk. 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. A vizsgálatunkból úgy tűnik, hogy az MR régió önmagában, valamilyen moduláció hatására direkt módon képes befolyásolni a távoli félelmi memória kialakulását.

Az optogenetikai stimuláció hatására akutan c-Fos aktivációt mértünk a MR-ben, sőt DR-ben is, így úgy tűnik valamilyen módon a raphe egészére hatással voltunk. A raphe kiterjedt és összetett kapcsolatokkal bír, és efferensei behálózják az egész előagyat, köztük olyan területeket, melyek fontosak a memória nyom kialakításában, például a prefrontális, entorhinális kérget, hippokampuszt. 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, 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, mely az averzív stimulus feldolgozásában és a PAG régiókban, melyek a viselkedésbeli válasz közvetlen kialakításában vesznek részt. Azonban az MR régió optogenetikai stimulációja nem volt elegendő ahhoz, hogy tényleges félelmi reakciót, dermedést kiváltson, ennek

megfelelően akután a félelmi kondicionálás alatt nem láttunk c-Fos aktivációt sem az amigdalában, sem pedig a hippokampuszban, melyek kiemelten fontos szerepet játszanak félelmi válasz kialakításában.

## **5. 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 embereknél megfigyelhető PTSD tüneteinek előidézésére
- 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 neuronális plaszticitás révén az amigdalis CP-AMPA receptornak szerepe van a félelmi tanulásban, azonban a PFC 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 hiánya felnőtt állatban 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 gátlása néhány paraméterben sikeresen ellensúlyozta az elektromos lábsokk hatását. MR régió stimulációja 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
- b. Az MR régió optogenetikai ingerlése rövid távon (1 nap múlva) nem, hosszabb távon (1 hét múlva) azonban képes volt befolyásolni a távoli félelmi memória kialakulását

## **SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE**

---

### **A disszertációhoz kapcsolódó közlemények**

1. **Balázsfi D**, Fodor A, Török B, Ferenczi S, Kovács KJ, Haller J, Zelena D. Enhanced innate fear and altered stress axis regulation in VGluT3 knockout mice. *Stress*. 2018 Mar;21(2):151-161. doi: 10.1080/10253890.2017.1423053. IF:2,590
2. Horvath HR, Fazekas CL, **Balázsfi 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* 2018 Jan;38(1):37-52.doi: 10.1007/s10571-017-0528-7; IF:2,93
3. **Balázsfi 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) doi: 10.1371/journal.pone.0181264; IF:2,806
4. Göloncsér F, Baranyi M, **Balázsfi D**, Demeter K, Haller J, Freund TFF, Zelena D, Sperlág B. Regulation of Hippocampal 5-HT Release by P2X7 Receptors in Response to Optogenetic Stimulation of Median Raphe Terminals of Mice. *Front Mol Neurosci*. 2017 Oct 12;10:325. doi: 10.3389/fnmol.2017.00325. IF:3,902
5. **Balázsfi D**, Farkas L, Csikota P, Fodor A, Zsebók 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. doi: 10.1080/10253890.2016.1203413; IF: 2,590
6. 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. doi: 10.1007/s00213-016-4255-4; IF:3,308

### A szerző egyéb közleményei

1. Biro L, Sipos E, Bruzsik B, Farkas I, Zelena D, **Balázsfi D**, Toth M, Haller J. Task Division within the Prefrontal Cortex: Distinct Neuron Populations Selectively Control Different Aspects of Aggressive Behavior via the Hypothalamus. *J Neurosci*. 2018 Apr 25;38(17):4065-4075. doi:10.1523/JNEUROSCI.3234-17.2018; IF:5,970
2. Zelena D, Demeter K, Haller J, **Balázsfi D**. Considerations for the use of virally delivered genetic tools for in-vivo circuit analysis and behavior in mutant mice: a practical guide to optogenetics. *Behav Pharmacol*. 2017 Dec;28(8):598-609. doi: 10.1097/FBP.0000000000000361; IF:1,854
3. Mikics E, Guirado R, Umemori J, Toth M, Biro L, Miskolczi C, **Balázsfi 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) doi: 10.1038/npp.2017.142; IF:6,403

4. 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*.2016Jul;19(4):349-61. doi:10.1080/10253890.2016.1183117; IF:2,590
5. 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. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.02.041; IF:2,341
6. 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. doi: 10.1007/s00726-015-2026-x; IF:3,173
7. **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. doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.09.011; IF:4,788
8. Fodor A, Klausz B, Pintér O, Daviu N, Rabasa C, Rotllant D, **Balázsfi D**, Kovacs 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. doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.09.003; IF:3,378