

dc_209_11

AKADÉMIAI DOKTORI PÁLYÁZAT

**A depresszió neuroplaszticitás teóriájának vizsgálata
kísérleti állatokban, krónikus stressz paradigmák
felhasználásával**

Dr Czéh Boldizsár



German Primate Center, Leibniz Institute for Primate Research
Clinical Neurobiology Laboratory



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

Max-Planck-Institute of Psychiatry
Molecular Neurobiology

Göttingen / München

2011

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	2
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	14
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	15
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	
4.1. A krónikus stressz hatása a felnőttkori neurogenesisre a gyrus dentatus-ban.....	22
4.2. Prenatális stressz hatása a felnőttkori neurogenesisre főemlősök hippocampusában.....	24
4.3. Képes-e az antidepresszáns kezelés normalizálni a krónikus stressz a felnőttkori neurogenesisre gyakorolt gátló hatását?.....	28
4.4. Új típusú antidepresszáns kezelési stratégiák hatása a felnőttkori neurogenesisre.....	30
4.5. A stressz-indukálta hippocampális térfogat csökkenés sejt szintű mechanizmusai: Okoz-e a stressz neuron pusztulást?.....	35
4.6. Milyen egyéb sejt szintű mechanizmusok csökkentik a stressz kapcsán a hippocampus térfogatát? Számolhatunk-e a glia sejtek vagy a kapillarizáció redukciójával?.....	40
4.7. A krónikus stressz funkcionális következményei:	
I. A CA3 piramis sejtek elektrofiziológiai tulajdonságai.....	45
4.8. A krónikus stressz funkcionális következményei:	
II: A GABAerg interneuronok működésére kifejtett hatás.....	50
4.9. A krónikus stressz funkcionális következményei:	
III: A kognitív funkciókra kifejtett hatás.....	59
4.10. Krónikus stressz indukálta sejt szintű reakciók a prefrontális kortexben.....	62
5. ÖSSZEFOGLALÁS, AZ EREDMÉNYEK JELENTŐSÉGE.....	68
6. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK.....	70
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	73
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	87

1. BEVEZETÉS

1.1. A depresszió neuroplaszticitás elmélete

A major depresszió (MD) egyike a leggyakoribb megbetegedéseknek. Egyes epidemiológiai felmérések szerint, életkori prevalenciája 16%, míg a 12 hónapos előfordulási gyakorisága 6.6% (Kessler et al., 2003). Bár a fent említett adatok az Amerikai Egyesült Államokból származnak, a depresszió az egész világon komoly egészségügyi problémát jelent, és súlyos terheket ró az egészségügyi és szociális szervezetekre. A WHO felmérése szerint a depresszió napjainkban a 4. helyen áll abban a sorban, amelyben a különböző megbetegedéseket a munkaképtelenséget okozó élet-évek szempontjából rangsorolták. A WHO előrejelzése szerint, 2020-ra, ugyanebben a rangsorban a depresszió már a második helyen fog szerepelni. Az MD egy potenciálisan életveszélyes megbetegedésnek tekintendő, mivel a depressziós betegek egy része (10-15%-a) öngyilkosságba menekül. Bizonyított az is, hogy a befejezett öngyilkosságok 50-70%-át kezeletlen vagy nem megfelelően kezelt depressziós állapotban követik el.

A depresszió kóroka mindmáig tisztázatlan. A depressziós epizódokat leggyakrabban valamilyen élethelyzeti stressz hatás váltja ki és a gyermekkorban elszenvedett bántalmazás, érzelmi elhanyagolás képezik a depresszió legjelentősebb rizikó faktorait (Kendler et al., 1999; Kessler, 1997; Heim and Nemeroff, 2001). Ugyanakkor nem mindenki lesz ilyen körülmények között depressziós. A depresszió kialakulásában az említett stressz hatások gyakorisága, időtartama, az egyén genetikai háttere, az őt körülvevő szociális háló, illetve a saját küzdőképessége együttesen határozzák meg azt, hogy valakiben a betegség kifejlődik-e vagy sem. Nyilvánvaló tehát, hogy a betegség kialakulásában úgy a biológiai mint a pszichológiai faktorok fontos szerepet játszanak. Mi a következőkben a biológiai folyamatokra koncentrálunk, de leszögezhetjük, hogy az intenzív kutatómunka ellenére a depresszióhoz vezető neurobiológiai folyamatok részletei éppoly kevésbé ismeretesek, mint az antidepresszánsok terápiás hatásmechanizmusai.

A depresszió patofiziológiájának magyarázatával számos hipotézis próbálkozik. A közelmúlt mintegy 40 éve során Schildkraut (1965) monoamin teóriája volt a legáltalánosabban elfogadott. Ennek értelmében a szerotonin, az adrenalin / noradrenalin és a dopamin rendszerek működési zavarai, illetve e neurotranszmitterek elégtelen mennyisége a szinaptikus jelátviteli folyamatokban felelős a depresszió tüneteier. Időközben kiderült azonban, hogy ez az elképzelés finomításra szorul, mert a monoaminerg rendszerek neurotranszmitter funkciói mellett egyéb sejtszintű és intracelluláris mechanizmusokkal is számolni kell (Manji et al., 2000, 2001, 2003; Nestler et al., 2002a; Fuchs et al., 2004b¹; Castrén, 2005; Berton and Nestler, 2006; Krishnan and Nestler, 2008, 2010). Továbbá a közelmúltban elvégzett számos *in vivo* képalkotó vizsgálat nyilvánvalóvá tette, hogy depressziós betegekben különféle limbikus és egyéb agyi struktúrákat érintő szelektív, morfológiai és funkcionális elváltozások észlelhetők. Például a prefrontális és cinguláris kéreg metabolizmusa és térfogata csökken, valamint a betegség progressziójával párhuzamosan a hippocampusz mérete is kisebb lesz (Manji et al., 2001; Manji and Duman, 2001; Price and Drevets, 2010). Poszt-mortem szövettani vizsgálatok e térfogatcsökkenések hátterében úgy az agykéregben, mint a limbikus rendszer több struktúrájában az ideg- és gliasejtszám

¹ Az értekezés alapjául szolgáló saját közleményekre való hivatkozásokat aláhúzással jelöltem.

csökkenését igazolták (Manji and Duman, 2001; Rajkowska, 2002). Hangsúlyozandó azonban, hogy e finom neuroanatómiai elváltozások ellenére az MD nem tekinthető neurodegeneratív megbetegedésnek. E leletek ugyanakkor nyilvánvalóvá tették, hogy a depresszió patofiziológiájáról a korábban előterjesztett monoamin hipotézis nem képes a depresszió során fellépő idegrendszeri elváltozások kielégítő magyarázatára. Új teóriákra van szükség, és napjaink talán legtöbb figyelmet kapott elképzelése szerint, a MD hátterében a neuroplaszticitás zavara rejlik (Duman et al., 1999; Manji and Duman, 2001; Manji et al., 2001; Fuchs et al., 2004b; Castrén, 2005; Berton and Nestler, 2006; Pittenger and Duman, 2008; Krishnan and Nestler, 2008, 2010).

1.2.1. Állatkísérletes modellek

Depressziós páciensek kísérleti vizsgálata etikai okokból nyilvánvalóan limitált, ezért olyan állatmodellekre van szükség, melyeket a betegség egyik vagy másik aspektusának vizsgálatára célzottan fejlesztettek ki. Ennek megfelelően a főbb szempontok: 1) új antidepresszáns gyógyszerek kifejlesztése, tesztelése, 2) olyan modellek, melyek a már létező antidepresszív hatású beavatkozások neurofarmakológiai mechanizmusainak feltárására alkalmasak és 3) új modellek létrehozása a depressziós betegség neurobiológiájának elemzése céljából (Cryan et al., 2002; Nestler et al., 2002b; Fuchs et al., 2005; Nestler and Hyman, 2010). Felmerül a kérdés, vajon egyetlen modell elegendő lehet-e valamennyi részletkérdés vizsgálatára? Mára a kutatók egyetértenek abban, hogy egyetlen olyan állatkísérleti modell kifejlesztése, amely a fent felsorolt három szempont mindegyikére egyformán használható, valószínűleg lehetetlen vállalkozás. Ugyanis a mentális betegségek, így az MD is, komplex, a humán agyra specifikus működészavar, melyet egyszerűbb organizmusokban modellezni rendkívül nehéz, sőt esetenként lehetetlen feladat. Így például az öngyilkossági törekvések, vagy a súlyos bűntudat, önvád, melyek a betegség jellemző tünetei közé tartoznak, állatkísérletekben nyilvánvalóan nem utánozhatók. Következésképp feltétlenül számolnunk kell az állatkísérleti modellek korlátaival úgy a betegség, mint a terápia szempontjából (McKinney, 1984).

Klinikai vizsgálatok sora igazolja, hogy a depressziós epizódok kialakulásában a stressz az egyik legfontosabb kiváltó tényező (Kendler et al., 1999; Kessler, 1997; Paykel, 2001, Pittenger and Duman, 2008). Egy friss meta-analízis vizsgálat, mely 14,250 személy kórrajzáának elemzésén alapult, egyértelműen bizonyította, hogy a stresszel-teli életmód és az MD kialakulása között szoros összefüggés van (Risch et al., 2009). E klinikai megfigyelések következményeként számos olyan állatmodellt fejlesztettek ki, melyek mindegyike az állatok stresszelésén alapul és így próbál depresszió-szerű állapotot létrehozni (Willner, 1991; Yadid et al., 2000; Nestler et al., 2002b; Fuchs and Flugge G, 2002; Fuchs et al., 2005; Rygula et al., 2008). Számos különböző módszer létezik a kísérleti állatok stresszelésére, ezek közül különösen azok a krónikus stresszen alapuló paradigmák tűnnek hasznosnak, melyek egyszersmind alkalmasak a krónikus stressz hatására kialakuló központi idegrendszeri reakciók feltárására is (Willner, 1991; Nestler et al., 2002b; Fuchs and Flugge, 2002; Fuchs et al., 2005; Rygula et al., 2008). Állatokban, csakúgy mint emberben, a depresszió-betegséghez hasonló állapot létrehozására a társkapcsolatok manipulálása a legalkalmasabb módszer, mert ez a legerősebb stressz faktor. Mára már elfogadott tény, hogy az ember életében a szociális környezet instabilitása, társkapcsolatainak megszakadása, társadalmi pozíciójának elvesztése a legerősebb stressz faktor, mely növeli az MD kialakulásának esélyeit (Brown, 1993). Ennek megfelelően azok az

állatmodellek, melyek a szociális státusz manipulálásával, pl. mesterségesen létrehozott szociális instabilitás illetve alárendeltség létrehozásával stresszelik az állatokat, különösen alkalmasak a pszichopatológiai elváltozások realisztikus “feltérképezésére” (Mitchell and Redfern, 2005).

Munkacsoportunk, a Clinical Neurobiology Laboratory, German Primate Center (Göttingen) az elmúlt évek során számos kísérletben kifejlesztett és validált egy különleges depresszió állatmodellt, mely a főemlősökkel rokon Északi mókuscickány krónikus pszichoszociális stresszhelyzetben tartásán alapul. E modell alkalmasnak tűnik azon neurobiológiai, neuro-endokrin és magatartásbeli elváltozások vizsgálatára, melyek a stressz eredetű pszichés megbetegedések, mint pl. az MD gyakori velejárói (Fuchs and Flugge, 2002; Fuchs et al., 2004a, 2005).

1.2.2. Mókuscickányok krónikus pszichoszociális stresszelésének paradigmája

A mókuscickányok a méhlepényes emlősök alosztályának *Euarchonta* csoportjába tartoznak. A mókuscickányok valójában nem cickányok, de sokáig a rovarévők rendjébe sorolták őket. Később, anatómiai okokból a főemlősök rendjében kaptak helyet, és egy igen primitív félmajomnak tartották őket (Le Gros Clark, 1924). A későbbi genetikai vizsgálatok azonban ezt cáfolták és kiderült, hogy önálló rendet (*Scandentia*) érdemelnek (Martin, 1990). A mókuscickányok fejlődése mintegy 70 millió éve vált külön a főemlősökétől és sajátos érdekességük, hogy a testtömeghez viszonyított agytömegük nemcsak az állatok között a legnagyobb, de még az emberét is meghaladja (Martin, 1990). Igen intelligens és érzékeny állatok.

A húsz ma élő mókuscickány faj közül mi a kísérleteinkben az Északi mókuscickányt (*Tupaia belangeri*) használtuk, mely természetes körülmények között Dél-Kelet Ázsia őserdeiben él. Hímnemű egyedeik magányosan élnek és agresszíven védik területük határait (Kawamichi and Kawamichi, 1979). E tulajdonságaik különösen alkalmasá teszik őket krónikus szociális stressz helyzetben tartásra. A hím mókuscickányok, laboratóriumi körülmények között egymással összezárva, rövid idő alatt kialakítanak egy domináns és alárendelt szociális szerepet (részletesen lásd a Módszerek 3.2. fejezetét). Amennyiben az alárendelt helyzetű hímekeket több héten keresztül, újra és újra, felváltva különböző domináns hímekekkel eresztjük össze, akkor ez az alárendelt hímekek számára rendkívül erős stressz helyzetet jelent, amely krónikussá válva, számos olyan fiziológiai, endokrinológiai, központi idegrendszeri és magatartás-fiziológiai reakciót vált ki, amely a depressziós betegek sok tünetét utánozza (Fuchs and Flugge, 2002; Fuchs et al., 2004a, 2005). Ilyen tünetek például a HPA-tengely (hypothalamikus-agyalapi mirigy-mellékvese tengely), valamint a szimpatikus idegrendszer adaptáció nélküli hiperaktivitása, dexamethasone rezisztencia, alvászavarok és csökkent motorikus tevékenység (Fuchs and Flugge, 2002). Továbbá a krónikusan stresszelt mókuscickányokban a monoaminerg receptorok expressziójában olyan dinamikus változások észlelhetők, melyek a krónikus stressz korai szakaszában a monoaminerg rendszer erőteljes hiperaktivitását tükrözik, míg a későbbi fázisban a noradrenerg és dopaminerg rendszerek deficitje, kimerülése jellemző (Flugge et al., 2004). Ezenkívül számos olyan mikrostrukturális elváltozás is kialakul, mely elsősorban a hippocampusz neuronjait érinti, és a jelen értekezés később majd bővebben is foglalkozik velük. Ilyen például a piramis sejtek dendritfájának sorvadása, vagy a felnőttkori neurogenesis csökkenése (Magariños et al., 1996; Czéh et al., 2001). E tünetek egy része antidepresszáns kezeléssel megelőzhető illetve kivédhető – míg az anxiolitikus diazepam hatástalan (Fuchs et al., 1996; van Kampen et

al., 2000; Czéh et al., 2001; Fuchs et al., 2004a, 2005). Ezek a megfigyelések bizonyítják, hogy a mókuscickány krónikus pszichoszociális stresszelése a depresszió tanulmányozására alkalmas fiziológiai és farmakológiai állatmodell (Fuchs and Flugge, 2002; Fuchs et al., 2004a, 2005).

Kornetzky (1989) definíciója értelmében tehát a mókuscickány krónikus pszichoszociális sztrezz paradigmája a humán depresszió "homológ modelljének" tekinthető, mert leképezi a humán betegség főbb vonásait, a tüneteket azonos faktorok váltják ki mind emberben mind állatkísérletben, és hasonló a farmakológiai reakció is. A homológ modell előnye nemcsak az, hogy segítheti a depresszióval kapcsolatos neurobiológiai elváltozások jobb megértését, hanem az is, hogy segítséget nyújthat új terápiás módszerek kifejlesztéséhez.

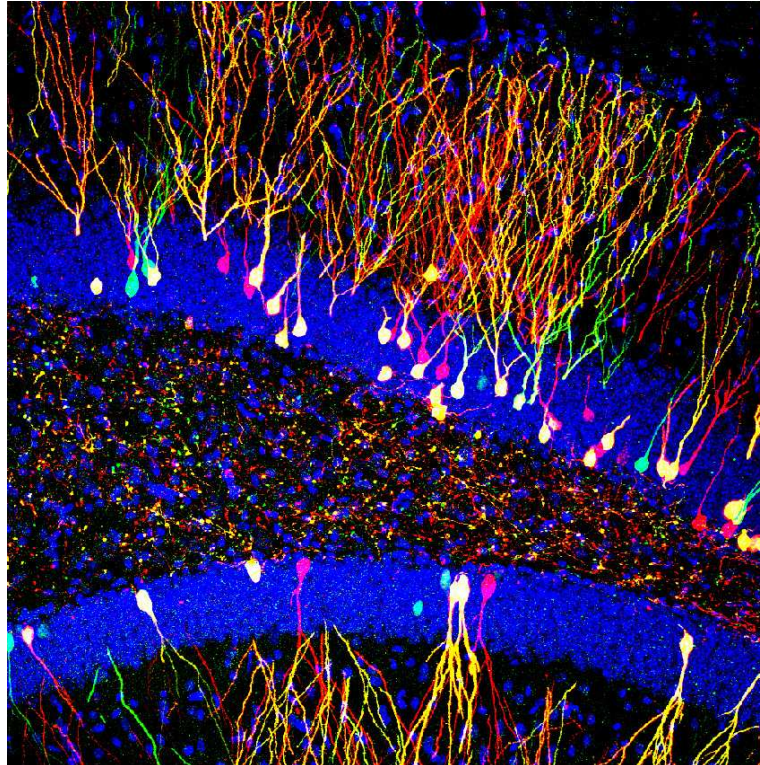
1.3. Neurogenesis felnőtt állatokban

A neuron-tan egyik fő sarokpontja volt (és sokak számára maradt is), amit még Ramon y Cajal fektetett le, hogy az idegsejtek osztódással szaporodása a születéskor véget ér, utána a differenciálódással illetve a kapcsolatok kiépítésével jelzett érési folyamat zajlik. Eközben a neuronok számszerű csökkenése is megkezdődik, mely az élet végéig tart, vagyis agyunk az érlelődés során folyamatosan veszíti a neuronokat, de újak már nem képződnek. E felfogást azonban megkérdőjelezték azok a megfigyelések, melyek neuron képződést írtak le a felnőtt agy különböző régióiban, pl. hippocampusz, neokortex (Kaplan and Hinds, 1977; Kaplan, 1981; Kaplan and Bell, 1984). Ezek a "szórványos" leletek nem ingatták meg a neuron-tan doktrínáit. Az ellenérv az volt, hogy alacsonyabb rendű emlősökben ilyen evolúciós maradvány még szórványosan előfordulhat, de főemlősökben ez már kizárt (Rakic, 1985). Azonban a kilencvenes évek második felétől e kérdéskörben jelentős szemléletbeli fordulat állt be, amely elsősorban az időközben kidolgozott új módszereknek volt köszönhető (Miller and Nowakowski, 1988; Gross, 2000). A kilencvenes évek végétől kezdődően egyre több olyan tanulmány látott napvilágot, melyek a funkcionálisan érett állatok, sőt főemlősök agyában, majd végül az emberi agyban is idegsejt újdonszületést demonstráltak (Gould et al., 1998, 1999b, 1999c; Eriksson et al., 1998; Kornack and Rakic, 1999).

A felnőttkori neurogenesis (*adult neurogenesis*: AN², 1.3.1. Ábra) a kifejlődött agy plaszticitásának egy sajátos típusa. Fiatal, de már ivarérett rágszálók hippocampuszában szemcsesejtek ezrei születnek újonnan naponta (Cameron and McKay, 2001). Sajátos tény, hogy az AN ütemét számos faktor befolyásolja, így például az életkor előrehaladtával előfordulása jelentősen csökken (Kuhn et al., 1996; Heine et al., 2004a; Manganas et al., 2007). Jelenleg évente több száz tudományos közlemény foglalkozik e témával, így az AN az idegtudományok egyik legdinamikusabban fejlődő területévé nőtte ki magát, amelyben azonban számos kérdés továbbra is hevesen vitatott. Nincs egyetértés például abban, hogy vajon neuron képződés csak az agy kitüntetett, neurogén zónáiban zajlik-e, vagy szinte minden régióban. Mára a felnőtt agy számos régiójában írtak le újszülött neuronokat, azonban e "felfedezéseket" mások, különböző módszertani problémákra hivatkozva, továbbra is erős szkepszissel fogadják (Rakic, 2002a,b). Két olyan terület van a kifejlett agyban, ahol az AN egyértelműen bizonyított (emberben is), az egyik a hippocampusz gyrus dentatus-a (Eriksson et al., 1998; Manganas et al., 2007; Boldrini et al., 2009), a másik

² A felnőtt életkorban észlelt idegsejt képződést a továbbiakban annak angol nevéből (*adult neurogenesis*) képzett "AN" rövidítéssel említjük.

az agykamrák falát bélelő szubependimális (vagy szubventrikuláris) zóna (Curtis et al., 2007; Sanai et al., 2007). Említésre méltó még, hogy újszülött neuronokat írtak le főemlősökben az amygdalában, striátumban és a neokortex szövetében is, bár erre nézve negatív közlések is léteznek (Gould et al., 1999c; Bernier et al., 2002; Kornack and Rakic, 2001; Rakic, 2002b; Dayer et al., 2005; Spalding et al., 2005; Bhardwaj et al., 2006; Marlatt et al., 2011). Lehetséges, hogy az ellentmondó adatok magyarázata az a tény, hogy pl. a neokortexben az AN kisméretű interneuronokra vonatkozik, melyek a kortex nagy tömegében oszlanak el így a denzitásuk nagyon alacsony (Cameron and Dayer, 2008).



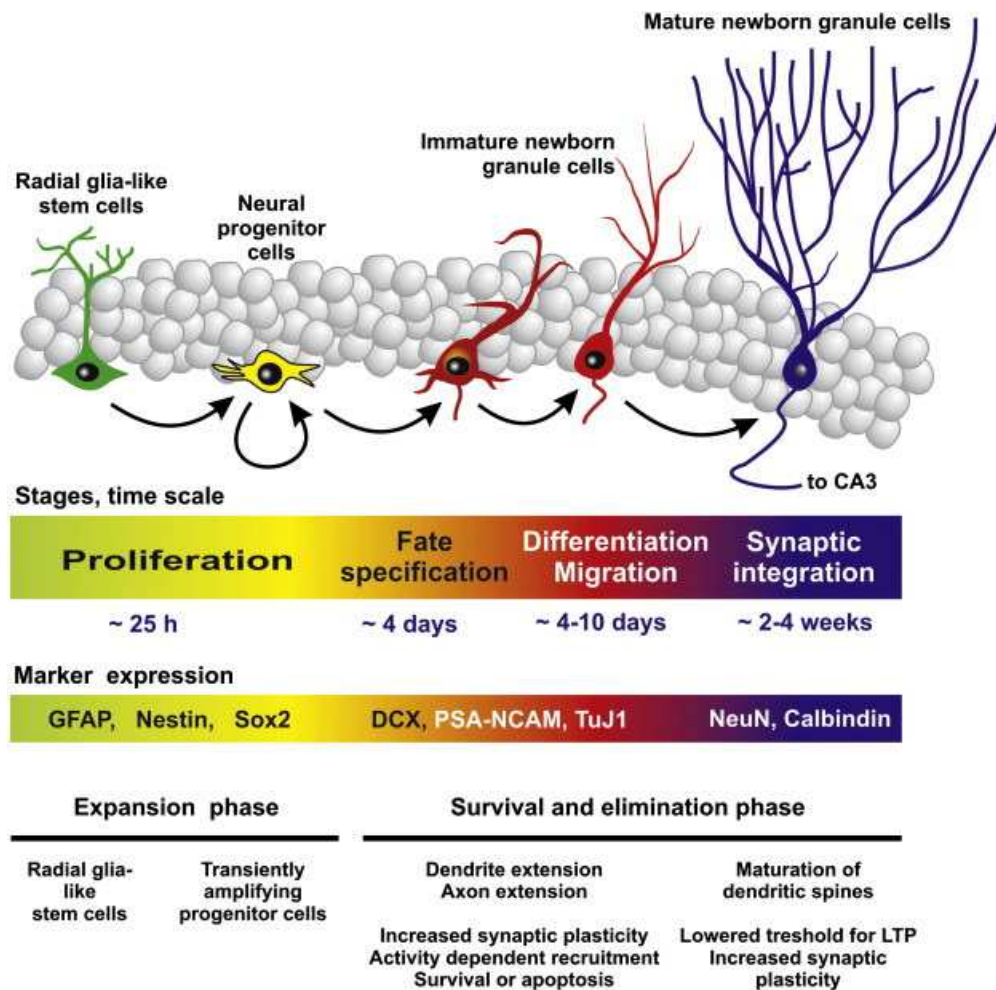
1.3.1. Ábra

Retro-vírral jelölt újszülött szemcsesejtek felnőtt egér gyrus dentatus-ában.

Két vírus keverékét injektáltuk a gyrus dentatus-ba, az egyik zöld a másik piros fluorescens proteint expresszál. Mivel a retro-vírus csak az osztódásban lévő sejteket fertőzi meg így mindkét színnel az újonnan képződött neuronok jelölődtek meg. Az itt látható 2 hónapos neuronok kifejtett dendritfával rendelkeznek és ekkora már feltehetően integrálódtak a már meglévő neuron hálózatba.

Bár a felnőtt hippocampusban az új neuronok képződése sokkal ritkább mint az embrionális élet során, mégis ugyanaz a folyamat figyelhető meg: a progenitor sejtek proliferálnak, amit azután rövid sejt-vándorlás, illetve morfológiai és fiziológiai érés követ (1.3.2. Ábra). Utóbbit gyakran mint túlélési (*survival*) periódust írják le, melynek eredménye az olyan funkcionálisan érett neuron, mely a meglévő neuronális hálózatba integrálódik (Kempermann, 2006; Balu and Lucki, 2009). Mindmáig vitatott, hogy a gyrus dentatus-ban léteznek-e valódi multipotens őssejtek. Az biztos, hogy a szemcsesejt réteg és a hilus között meghúzódó vékony germinatív zónában osztódásra

képes prekursor sejtek találhatók, melyek morfológiailag nagyon hasonlítanak a radiális asztrocitákhoz (1.3.2. Ábra) (Seri et al., 2001).



1.3.2. Ábra

A felnőtt gyrus dentatus-ban képződő neuronok fejlődési stádiumainak sematikus ábrázolása.

Rövidítések: GFAP: *glial fibrillary acidic protein*; Sox2: *sex determining region Y (SRY)-box 2*; DCX: *doublecortin*; PSA-NCAM: *polysialylated form of the neural cell adhesion molecule*; TuJ1: *β -tubulin III*; NeuN: *neuronal nuclear antigen*. (Az ábra Enikolopov and Overstreet-Wadiche, 2008, eredeti ábrájának felhasználásával és kiegészítésével készült.)

Az új, még nem teljesen érett szemcsesejtekre jellemző, hogy bennük alacsonyabb küszöbű és robosztusabb LTP (*long term potentiation*) váltható ki (Schmidt-Hieber et al., 2004), valamint az is, hogy túlélésükhöz bemenet-függő aktivitás szükséges (Tashiro et al., 2006). Ismert ugyanis, hogy az új neuronok többsége (50-60%-a) spontán elpusztul, mivel nem tud beépülni a meglévő neuronhálózatba (Biebl et al., 2000; Dayer et al., 2003; Kempermann et al., 2003). Patkányokban az AN jelentős mértékű (napi 9000 új szemcsesejttel számolnak, Cameron and McKay, 2001), míg primátákban ez a folyamat nagyságrendekkel kisebb

mértékű (Kornack and Rakic, 1999). Előfordulásáról az érett humán agyszövetben nincsen megbízható kvantitatív adat, de feltehetően igen ritka esemény (Eriksson et al., 1998; Czéh and Lucassen, 2007).

Számos tanulmány bizonyítja, hogy az ingergazdag környezet, a fizikai aktivitás és a tanulási folyamatok stimulálóan hatnak az AN mértékére (Kempermann et al., 1997; Gould et al., 1999a; van Praag et al., 1999; Balu and Lucki, 2009; Lucassen et al., 2010). Mindmáig nem ismert, hogy a hippocampusban folyamatosan képződő neuronoknak mi lehet a pontos funkcionális szerepe. Mivel a hippocampus kitüntetett szerepet játszik a tanulás mechanizmusában, ezen belül elsősorban az epizódikus-deklaratív memória konszolidáció folyamatában, így nem meglepő, hogy sok tanulmány igyekszik bizonyítani az AN szerepét e kognitív funkciókban (Bruehl-Jungerman et al., 2007; Imayoshi et al., 2008; Dupret et al., 2007, 2008; Balu and Lucki, 2009; Garthe et al., 2009; Coras et al., 2010; Deng et al., 2010; Sahay et al., 2011).

Az AN feltehetően nem csak fiziológias folyamatokban játszik szerepet, hanem, ahogy azt sokan feltételezik, különböző patofiziológias mechanizmusokban is részt vehet (Balu and Lucki, 2009). Az AN kulcsszerepét számos neuro-pszichiátriai megbetegedésben felvetették és az elmúlt évek egyik legtöbbet vitatott és kutatott elmélete szerint az AN csökkenése szerepet játszhat az MD kialakulásában (Duman et al., 1999, 2001; Jacobs et al., 2000; Duman, 2004; Dranovsky and Hen, 2006; Sahay and Hen, 2007; Kempermann et al., 2008; Balu and Lucki, 2009; Lucassen et al., 2010; Lucassen et al., 2010), továbbá felmerült az is, hogy az effektív antidepresszáns kezelés talán az AN stimulálásán keresztül hat (Malberg et al., 2000; Czéh et al., 2001; Santarelli et al., 2003; Sahay and Hen, 2007; Perera et al., 2011). E feltevések sarokpontjai a következők: 1) Környezeti stressz hatására kísérleti állatok hippocampusában az AN csökken, és ugyanilyen stressz emberben a depresszió legfőbb rizikó faktora; 2) Depressziós betegekben gyakori a kognitív deficit mely többnyire a hippocampusz térfogatának csökkenésével jár együtt (és ez talán a redukált neuron képződés következménye); 3) Antidepresszáns kezelés serkenti az AN jelenségét és blokkolni képes a stressz ezen folyamatra kifejtett gátló hatását; 4) Az effektív antidepresszáns kezeléshez legalább 3-4 héten át tartó kezelés szükséges, és az újszülött neuronoknak épp ennyi időre van szükségük a funkcionális beéréshez; 5) Állatkísérletes adatok bizonyítják, hogy az AN blokkolásával az antidepresszáns kezelés magatartásfiziológiai hatását is gátolni lehet.

Bár e teória sokak számára igen meggyőzően hangzik, mégis számos ennek ellentmondó adat létezik az irodalomban: 1) Kísérleti állatokban a progenitor sejtek elpusztítása például Röntgen besugárzással, gátolja ugyan az AN-t, de mégsem okoz depresszió-szerű magatartási elváltozásokat (Airan et al., 2007); 2) A hippocampusz térfogatának csökkenése nem specifikus a depresszióra, hanem számos más pszichiátriai kórképben is gyakori, mint pl. a skizofrénia, demencia, addikció és szorongásos megbetegedések (Geuze et al., 2005); 3) Bizonyított az is, hogy az antidepresszáns hatás az AN stimulálása nélkül is lehetséges (Sahay and Hen, 2007; David et al., 2009), mely esetekben növekedési faktorok és/vagy gyulladás mediátorok játszhatják a kulcsszerepet (Greene et al., 2009; Koo and Duman, 2008). Mindmáig nem megmagyarázott, sőt erre vonatkozóan még csak teória sem létezik, hogy AN pontosan miként regulálhatja az affektust vagy a hangulatot, illetve az MD egyéb specifikus tüneteit. Lehetséges az is, hogy a csökkent AN csupán a kognitív deficitért felelős, mely a fent említett pszichiátriai kórképek mindegyikére jellemző (Kempermann et al., 2008).

Technikai okok miatt emberben meglehetősen nehéz igazolni az AN depresszióban játszott szerepét. E témában csupán néhány tanulmány ismert. Időrendben az első Reif et al. (2006) depressziós betegek hippocampusában nem találta a csökkent AN jeleit – szemben a skizofrénias betegekből származó szövetmintákkal. Megjegyzendő, hogy e vizsgálat eredményei igen alacsony esetszámból származnak.

Egy újabb humán tanulmány (Boldrini et al., 2009) is kicsi esetszámmal dolgozik: 5 depressziós, de antidepresszánsal nem kezelt és 7 mentális megbetegedéstől mentes kontroll páciens posztmortem adatait hasonlítja össze 7 depressziós, antidepresszánsokkal kezelt beteg adataival. Utóbbiak közül 4 SSRI (*selective serotonin reuptake inhibitor*) a másik 3 pedig TCA (triciklikus antidepresszáns) kezelést kapott. Kiderült, hogy az 5 kezeletlen depressziós betegben a nestin³-pozitív progenitor sejtek száma szignifikánsan kisebb volt a kontroll csoporthoz képest. Ugyancsak kisebb volt (50%-al) a Ki-67⁴-reaktív osztódó sejtek száma, de ez utóbbi lelet statisztikailag nem volt szignifikáns (a nagy individuális szórás miatt). Továbbá mind az SSRI mind a TCA kezelés növelte a nestin-pozitív progenitorok számát, ezenkívül a TCA kezelés kifejezetten stimulálta a Ki-67 reaktív osztódó sejtek mennyiségét, miközben SSRI kezelés ebben nem okozott változást.

A legfrissebb vizsgálat e témában egy holland kutatócsoport munkája, amely 10 idős kontroll és ugyanennyi depressziós beteg szövetmintáját vizsgálta (Lucassen et al., 2010). Összehasonlításukban az MCM2-pozitív⁵ progenitor sejtek és a PH3-pozitív⁶ osztódó sejtek számát vetették össze, és vizsgálták a betegség illetve antidepresszáns kezelés esetleges hatását. Kiderült, hogy az idős MD betegek hippocampusában az MCM2-pozitív progenitor sejtek száma szignifikánsan csökkent, míg a PH3-pozitív osztódó sejtek száma nem változott. Ugyanakkor semmilyen változást nem észleltek az antidepresszáns kezelés következtében. Hangsúlyozandó, hogy az itt felsorolt poszt-mortem vizsgálatok nagyon alacsony esetszámúak miatt további vizsgálatokra van szükség, lehetőség szerint más módszerekkel is, például az AN *in vivo* képalkotó eljárással végzett vizsgálatával (Rueger et al., 2010; Couillard-Despres and Aigner, 2011), vagy más, nem szövettani eljárással történő meghatározással (Spalding et al., 2005; Manganas et al., 2007).

Nyilvánvaló, hogy a depressziós tünetekért több agyi struktúra együttes működési zavara felelős, így a hippocampuson kívül egyéb agyterületek is szerepet játszanak az MD patogenezisében (pl. a prefrontális kéreg, cinguláris areák, amygdala, talamikus, hipotalamikus és egyéb agytörzsi magok) (Nestler et al., 2002a; Berton and Nestler, 2006; Pittenger and Duman, 2008; Krishnan and Nestler, 2008, 2010; Price and Drevets, 2010). Mivel az MD nem köthető kizárólagosan a hippocampusz elváltozásaihoz, ezért – számunkra legalábbis – nyilvánvaló, hogy az AN hiánya nem

³ Nestin: VI-os típusú *intermediate filament* protein, mely a neuronok fejlődésének korai stádiumában expresszálódik, lásd a 1.3.2. Ábrát.

⁴ Ki-67: proliferációs sejt marker. A tumor kutatásban gyakran használt és MIB-1 néven is ismert.

⁵ MCM2: "*mini-chromosome maintenance protein*"-ek családjába tartozó protein, amely a DNS megkettőződésében játszik kulcsszerepet (*DNA replication licensing factor MCM2*). A tumor diagnosztikában használt marker, mely az osztódásban lévő őssejtek *in situ* jelölésére alkalmas. Ezenkívül az MCM2-pozitív sejtek 96%-a *doublecortin*-t is expresszál, ezáltal az MCM2 egy a neurogenesis detektálására is alkalmas marker.

⁶ PH3: "*phosphorylated histone H3*" az osztódásban lévő sejtek egy másik gyakran használt markere. Histone H3 a histone octamer része és így a *nucleosome* egyik alkotóeleme. A histone H3 foszforilált formában a sejtosztódás késői G2 fázisában van jelen, ezáltal az ellene termelt antitest alkalmas a mitózisban lévő sejtek jelölésére.

lehet a depresszió összes szimptomájának egyetlen közös oka. Ugyanakkor a csökkent AN szerepelhet egyes szimptomák okai között. Például a depressziós betegek jellemző azon deficitekben, melyek háttérben a hippocampusz hiányos információ feldolgozása áll. Egy másik deficit ama képesség elvesztése, mely a betegek számára új és bonyolult helyzetek megfelelő kezeléséhez szükséges (Kempermann, 2002).

Összegezve elmondhatjuk, hogy az MD etiológiájában ma még nincsen egyértelműen meggyőző klinikai adat a csökkent AN kritikus szerepéről. Ugyanakkor lehetséges, hogy bár a csökkent AN a klinikai depresszió kifejlődésében nem esszenciális, de az AN stimulálására mégis szükség van a terápiásan hatékony antidepresszáns kezeléshez (Santarelli et al., 2003; Sahay and Hen, 2007; Surget et al., 2008; Lucassen et al., 2010; Perera et al., 2011). Következésképpen az AN stimulálása ígéretes stratégia lehet új típusú antidepresszáns gyógyszerek kifejlesztésében. Mára ismeretes, hogy csaknem valamennyi jelenleg használt antidepresszáns kezelés (SSRIs, TCAs, elektrokonvulzív terápia, atípusos antipszichotikumok) az AN mértékét hatékonyan serkenti (Sahay and Hen, 2007; Warner-Schmidt and Duman 2006). Egyéb, jelenleg még fejlesztési stádiumban lévő készítmények, mint például *corticotropin-releasing factor-1* (CRF1), *vasopressin-1b* (V1b), neurokinin-1 (NK1) vagy glucocorticoid receptor antagonisták valamennyien bizonyított módon blokkolni képesek a stressz AN-gátló hatását (Lucassen et al., 2010). Egyéb nem-farmakológiai próbálkozások (például vagus ideg és mély agytörzsi ingerlés) is biztató eredményeket hoztak az AN stimuláció témakörében (Revesz et al., 2008; Toda et al., 2008). Végül említésre méltó, hogy kísérletes adatok szerint a magatartás terápiák, melyek a “*stress-coping*” mechanizmusokat erősítik serkentik az AN-t (Pollak et al., 2008; Lyons et al., 2010).

1.3.1. Stressz hatása a felnőttkori neurogenézisre

A stressz egyike azon környezeti hatásoknak, melyek erőteljesen gátolják az AN mértékét. Ezt több spéciészben és különféle stressz paradigmák alkalmazásával szerzett egyértelmű eredmények bizonyítják (Mirescu and Gould, 2006; Balu and Lucki, 2009; Lucassen et al., 2010; Schoenfeld and Gould, 2011). Mind az akut, mind pedig a krónikus stressz gátolja az AN mértékét, de csak a hippocampuszban, míg a másik neurogén zónában, a szubventrikuláris rétegben nem okoz ilyen változást. A stressz úgy tűnik az AN minden lényeges fázisát, azaz mind a proliferációt mind pedig a neuron érést, illetve az újonnan képződött neuronok életben maradását is gátolja (Gould et al., 1997; Czéh et al., 2001, 2002; Mirescu and Gould, 2006; Balu and Lucki, 2009; Lucassen et al., 2010).

A stressz-indukálta AN redukció egyik támadáspontja az újszülött neuronok apoptózisa, másik az osztódási ciklus lassítása, leállítása. Akut stressz hatására a proliferáció csökkenésével párhuzamosan több az apoptotikus sejt – de ezek között úgy éretlen újdonszülött mint érett sejtek is szerepelhetnek (Heine et al., 2004c). Krónikus stressz után mind a proliferáció mind pedig az apoptózis csökkent, miközben a p27Kip1 – ismert sejt-ciklus gátló – szintje növekedett (Heine et al., 2004b). Ez jelzi, hogy a szemcse sejtek cserélődési ciklusa azért lassult, mert a ciklus sokukban elakadt (Heine et al., 2004b).

A stressz AN-gátló hatásának pontos celluláris mechanizmusa tisztázatlan. A mellékvese glukokortikoid hormonjai kulcstényezőnek tűnnek (Wong and Herbert, 2004; 2005) és a progenitor sejteken mind a mineralokortikoid, mind a glukokortikoid

receptorok bizonyítottan expresszálnak (Mirescu and Gould, 2006; Balu and Lucki, 2009). Érdekes ugyanakkor, hogy az AN tartós gátlása kifejlődhet akkor is, ha a kezdeti stressz hatására megnőtt glukokortikoid szint már normalizálódott (Czéh et al., 2002; Mirescu and Gould, 2006). Eszerint a glukokortikoid szint emelkedése kritikus az AN gátlás elindításában – különösen korai életkorban, amikor a neurogenézis még erőteljes – de annak fennmaradásához már nem látszik szükségesnek. Érdekes módon idősebb állatokban a stressz AN gátló hatása fokozottan érvényesül (Simon et al., 2005). Egyéb faktorok, például NMDA receptor aktiváció is fontosnak látszanak (Nacher and McEwen, 2006; Gould et al., 1997).

A stressz többféle neurotranszmitter szintjét változtatja (Joëls and Baram, 2009), melyek az AN regulációban szintén fontos szerepet játszanak. Néhány példa: glutamát (Nacher and McEwen, 2006; Gould et al., 1997), GABA (Ge et al., 2007), szerotonin (Djavadian, 2004), noradrenalin (Joca et al., 2007), dopamine (Domínguez-Escriba et al., 2006). Mások a cannabinoid illetve az opioid receptorok, az NO és különféle neuropeptidek jelentőségére hívják fel a figyelmet (Balu and Lucki, 2009). Ismert továbbá, hogy stressz hatására számos növekedési és neurotrófikus faktor szintje csökken, így például a *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), az *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), a *nerve growth factor* (NGF), az *epidermal growth factor* (EGF), és a *vascular endothelial growth factor* (VEGF) mennyisége redukálódik. E faktorok mindegyike képes szabályozni a neuronok képződését valamint érését (Schmidt and Duman, 2007). Ezenkívül a nemi hormonok reguláló szerepe sem elhanyagolandó (Galea, 2008). Végül az asztrociták közreműködése is esszenciális szerepet játszik az újszülött neuronok genezisében és túlélésében (Goldman, 2003; Horner and Palmer, 2003; Nedergaard et al., 2003). Ismert, hogy az asztrociták is expresszálják a glukokortikoid receptorokat, és érzékenyen reagálnak a stresszre (Czéh et al., 2006; Banasr et al., 2010).

1.4. Krónikus stressz hatása a limbikus rendszer strukturális plaszticitására

A krónikus stressz számos betegség kialakulásában fontos szerepet játszik és ismert az is, hogy bizonyos agyi struktúrák – különösen a limbikus rendszer – nemcsak irányítják a szervezet stressz-reakcióját, de hosszú távon meg is szenvedik annak következményeit (McEwen, 2000, 2006, 2007; Fuchs et al., 2006; Joëls et al., 2007; Joëls and Baram 2009; Lupien et al., 2009).

A stressz-kutatás fordulópontja volt az a felfedezés, melyben fény derült a glukokortikoid receptorok expressziójára szerte az agyban, különösen a hippocampusban (de Kloet et al., 1975). Azóta számos vizsgálat bizonyította, hogy a stressz hatására megemelkedett glukokortikoid szint befolyásolja a hippocampus működését és struktúráját (McEwen, 2000, 2006; Fuchs et al., 2004b, 2006; Joëls et al., 2007; Lupien et al., 2009). Funkcionálisan a krónikus stressz hatására romlik a hippocampus ingerlékenysége, az LTP és a memória is (Kim and Diamond, 2002; Joëls et al., 2007). A krónikus stressz morfológiai hatásai közé tartozik a hippocampus össztérfogatának csökkenése, valamint olyan sejtszintű elváltozások, mint a dendritfa átalakulása vagy a redukált AN (Sapolsky, 2000; McEwen, 2006; Fuchs et al., 2004b, 2006; Gianaros et al., 2007; Joëls et al., 2007).

A hippocampusz térfogatának csökkenése az egyik legmeggyőzőbben dokumentált klinikai megfigyelés azon betegség csoportokban, melyek háttérében súlyos vagy krónikus stressz hatás áll, vagy arteficiálisan magas a plazma glukokortikoid szintje: így depressziós betegekben, PTSD (*post-traumatic stress disorder*) betegekben, Cushing szindrómában, szintetikus glukokortikoidokkal való kezelés következményeként (Starkman et al., 1992; Bremner et al., 1997; Sapolsky, 2000; Sheline, 2000; Campbell et al., 2004; Videbech and Ravnkilde, 2004; Bremner, 2007; Gianaros et al., 2007). De az mindmáig nem ismert, hogy pontosan milyen sejtszintű elváltozás(ok) állhat(nak) e térfogat csökkenés háttérében (Czéh and Lucassen, 2007). A '80-as években született nagyhatású tanulmányokat követően általánossá vált az az elképzelés, hogy a hippocampusz stressz okozta zsugorodásának háttérében a neuronok pusztulása áll, mely különösen a CA3 és CA1 régiókat érinti (Sapolsky et al., 1990). Ezt az elképzelést azonban később, precízebb sejtszámolási eljárásokkal, nem sikerült igazolni. Bár több klinikai és állatkísérletes tanulmány vizsgálta, mégsem sikerült masszív neuron pusztulásra utaló jeleket találni sem krónikus stressz, sem tartós (akár 1 évig tartó) szintetikus glukokortikoid kezelés után, sem pedig depressziós betegek agyában (Vollmann-Honsdorf et al., 1997; Sousa et al., 1998; Leverenz et al., 1999; Lucassen et al., 2001, 2004, 2006; Müller et al., 2001; Stockmeier et al., 2004; Czéh and Lucassen, 2007). Azt, hogy a hippocampusz volumen csökkenésének háttérében a neuronok pusztulása állhat, az a tény is megkérdőjelezi, hogy a hippocampusz térfogata spontán normalizálódik, amennyiben a károsító faktorok már elmúltak és alkalom nyílik a regenerálódásra (Starkman et al., 1992). Következésképpen, még ha van is bizonyos mértékű neuron elhalás, a volumen csökkenés akkor sem írható valamiféle irreverzibilis sejtpusztulás rovására. Vagyis a térfogatsökkenésben egyéb celluláris tényezőknek kell szerepet játszania, ilyenek lehetnek például a dendritfa átrendeződése, a csökkent AN, a glia sejtek pusztulása, vagy például a hippocampusz folyadék háztartásában fellépő változások (Czéh and Lucassen, 2007).

A leggyakrabban dokumentált stressz-keltette struktúrális elváltozás a piramis sejteket érintő apikális dendritfa zsugorodás / reorganizáció, melyhez a dendritikus tüskék és a szinapszisok számának csökkenése, valamint a posztzinaptikus denzitás módosulása társul (Watanabe et al., 1992; McEwen, 2000, 2006). A stressz ezen hatásai kísérleti körülmények között mesterségesen magas glukokortikoid szinttel jól reprodukálhatók (McEwen, 2006; Sousa et al., 2008). Típusosan, a CA3 piramis sejtek a legkifejezettebben érintettek, de a CA1 piramis sejtek és a gyrus dentatus szemcsesejtek dendritfáján is észlelhető kisebb fokú elváltozás (Sousa et al., 2000; McEwen, 2006; Fuchs et al., 2006). A dendritfának eme zsugorodása illetve a szinaptikus kapcsolatok csökkenésének feltehető magyarázata az, hogy a neuronok így próbálnak védekezni a magas glutamát szint már toxikus hatásaival szemben. E sejt-morfológiai változások feltehetően közreműködnek a krónikus stressz okozta kognitív zavarokban (Conrad, 2006; Sousa et al., 2008). A piramis sejtek dendritfájának morfológiai elváltozása egy másik funkcionális következményt is okozhat. Ez esetben a hippocampusznak a HPA-tengely szabályozásában játszott szerepe olyan zavart szenved, mely azután szintén kórosan és tartósan magas glukokortikoid szintekhez vezet (Conrad, 2006).

1.5. A prenatális stressz hosszú távú következményei

Mára már általánosan elfogadott az a nézet, hogy számos betegség voltaképp a magzati életkörülményekből ered, vagyis az előnytelen prenatális feltételek kifejezetten hajlamossíthatnak bizonyos betegségek kialakulására. Több retrospektív tanulmány megerősítette, hogy az anya várandós ideje során elszenvedett krónikus stressz állapota szignifikánsan növeli a gyermek fizikai és/vagy pszichológiai fejlődés zavarának esélyeit (Jones and Tauscher, 1978; Meijer, 1985; Lou et al., 1994). Epidemiológiai vizsgálatok eredményei szerint például a terhesség során az anya által elszenvedett stressz hajlamossítja az utódot szkizofrénia kialakulására (Huttunen and Niskanen, 1978; Myhrman et al., 1996; van Os and Selten, 1998). Hasonló összefüggést írtak le a magzati korban átélt anyai stressz és az utódban később kifejlődött MD tünetcsoporthoz (Watson et al., 1999; Brown et al., 2000).

A korai életkorban elszenvedett stressz a később kibontakozó MD legfontosabb hajlamossító tényezője (Heim and Nemeroff, 2001). Korai traumatikus élmények, akár még a magzati élet alatt, akár a neonatalis korban, mind az HPA-tengely tartós aktivációjához vezetnek. Ez végső soron a szervezet stressz reakcióját szabályozó rendszerek patológiás fejlődését okozza, ami azután az MD illetve a szorongásos zavarok kialakulására hajlamossít (Heim et al., 2008).

Kísérletes körülmények között, stressz inzultusnak kitett terhes állatokban, a magzat agyának fejlődése sajátosan megváltozik. Következésképpen az utódokban olyan agyi strukturális elváltozások keletkeznek, melyek a normálistól eltérő emocionális és neuroendokrin reakciókban manifesztálódnak. Az ilyen állatok felnőtt korában szorongó magatartás, a HPA tengely fokozott reaktivitása, és tanulás-memória deficit észlelhető (Welberg and Seckl, 2001; Kofman, 2002; Weinstock, 2008).

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteinkben a következő kérdésekre kerestük a választ:

2.1. Hogyan hat a krónikus stressz a hippocampusz gyrus dentatus-ában zajló felnőttkori neurogenesisre?

2.2. Vajon az élet korai szakaszában – például prenatálisan – alkalmazott stressznek vannak-e hosszú távú következményei a főemlősökben (részus majmokban) észlelt felnőttkori neurogenesisre illetve a hippocampusz térfogatára?

2.3. Képes-e az antidepresszáns kezelés kivédeni a stressz felnőttkori neurogenesiszt gátló hatását? Vajon a felnőttkori neurogenesis kísérleti állatokban végzett vizsgálata alkalmas módszer-e új típusú, potenciálisan antidepresszív hatású terápiás eljárások hatékonyságának ellenőrzésére?

2.4. Befolyásolhatja-e a kísérleti állatok krónikus stresszelése, illetve antidepresszáns kezelése a hippocampusz térfogatát illetve a neuronok pusztulását (apoptózis)?

2.5. Milyen egyéb olyan celluláris reakciókat okoz az a krónikus stressz a hippocampuszban, amely a CA3 piramis sejtek apikális dendritjének sorvadását okozza? Kimutatható-e változás az interneuronok és az asztroglia sejtek számában illetve a lokális mikrokeringésben?

2.6. Melyek a krónikus pszichoszociális stressz funkcionális következményei a hippocampuszban? Változnak-e olyan, a hippocampuszhoz köthető kognitív funkciók, mint pl. a téri tájékozódás? Észlelhető vagy sem a CA3 piramis sejtek – melyekről jól ismert, hogy különösen érzékenyen reagálnak a stressz hatásokra – elektrofiziológiai tulajdonságainak módosulása? Vajon a gátló interneuronok működését hogyan befolyásolja a krónikus stressz?

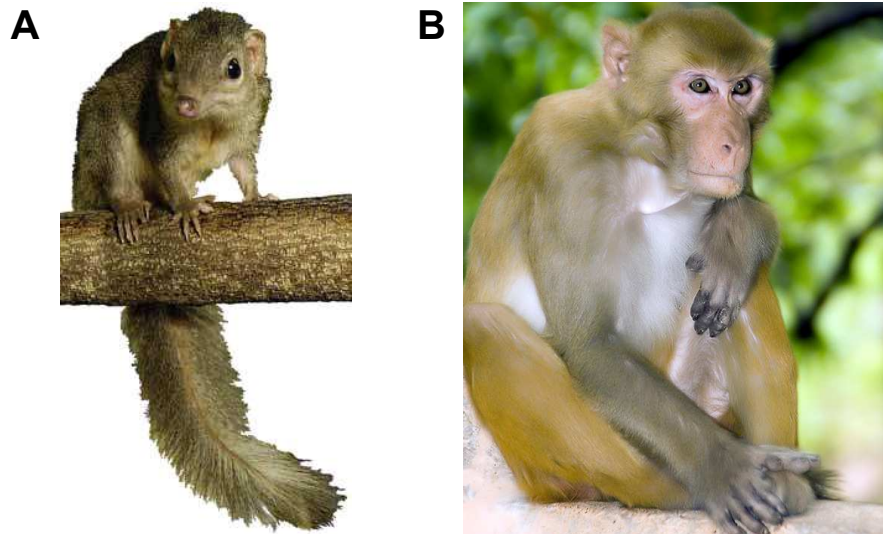
2.7. Vajon a krónikus stressz a hippocampuszban megfigyelhető sejtszintű reakciókat vált-e ki más limbikus struktúrákban, például a prefrontális kortexben is?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Ebben a fejezetben csak a több kísérletben alkalmazott eljárások rövid összefoglalásai szerepelnek. Az egy-egy vizsgálatban használt módszereket az adott eredmények leírásakor részletezzük.

3.1. A kísérletekben használt állatok

Kísérleteinkhez felnőtt, hím patkányokat (Wistar és SpragueDawley), Északi mókuscickányokat (*Tupaia belangeri*) és rézus majmokat (*Macaca mulatta*) használtunk (3.1. Ábra). A mókuscickány egy a primátákhoz filogenetikusán közeli állatfaj (lásd a 1.2.2. fejezetet). A kísérletek a nemzetközi szabványok (National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) helyben jóváhagyott eljárásai szerint folytak.

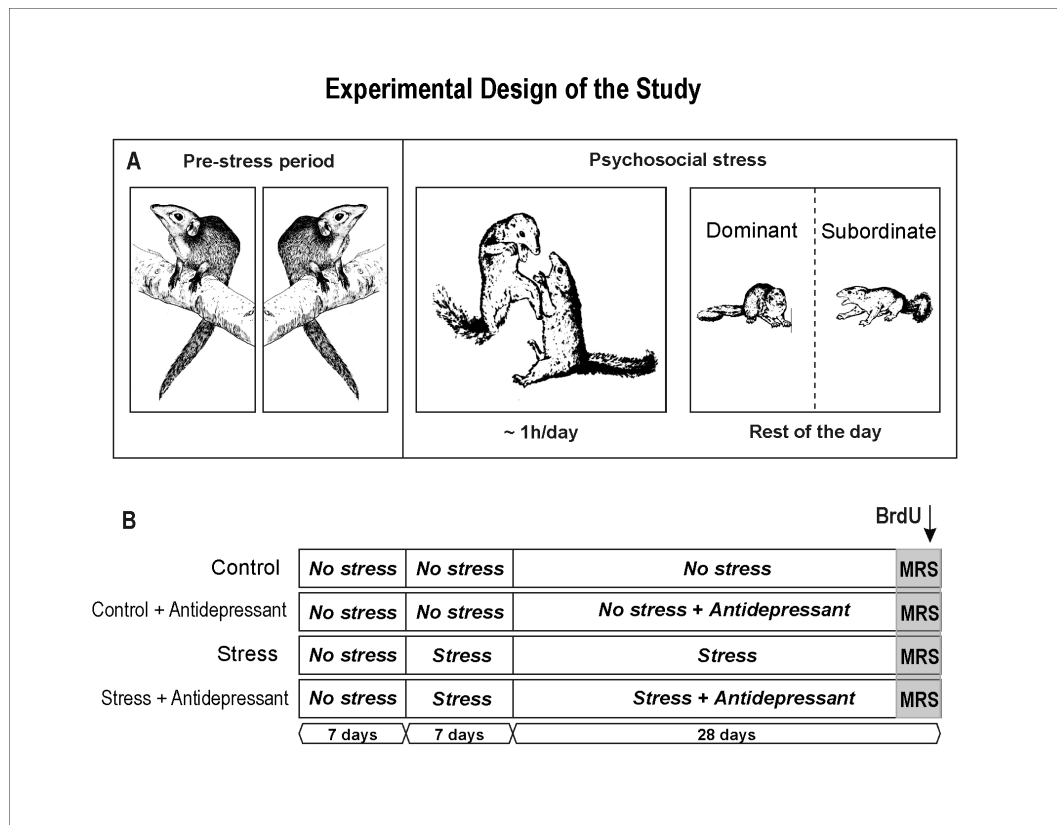


3.1. Ábra

A: Északi mókuscickány (*Tupaia belangeri*) **B:** Rézus majom (*Macaca mulatta*)

3.2. Felnőtt hím mókuscickányok krónikus pszichoszociális stresszelése és antidepresszáns kezelése

Egy tipikus kísérlet vázlata a 3.2. ábrán látható. Az állatokat négy csoportra osztottuk: Kontroll, Kontroll + Antidepresszáns kezelés, Stressz, Stressz + Antidepresszáns kezelés. Az első hét napon az állatok zavartalan körülmények között észlelhető fiziológiai alapadatait gyűjtöttük. A második 7 napos fázisban az állatok két csoportját (Stressz és Stressz + Antidepresszáns kezelés) naponta pszichoszociális stressznek tettük ki. Az antidepresszáns kezelés a kísérlet harmadik hetén kezdődött.



3.2. Ábra

Felnőtt hím mókuscickányok krónikus pszichoszociális stresszelése és antidepresszáns kezelése. Egy tipikus kísérlet vázlata. **A:** Az állatok stresszelése: konfrontáció egy domináns hímrel a hét minden napján. **B:** A kísérleti állatcsoportok. A kísérlet végén az állatok agyát *in vivo* NMR spektroszkópiás mérésnek vetették alá, és BrdU injekciót kaptak az osztódásban lévő sejtek megjelölése céljából.

A stressz ebben az esetben azt jelentette, hogy a kísérleti állatoknak naponta el kellett viselnie egy domináns fajtárs agresszióját (*social defeat*) illetve annak folyamatos jelenlétét. E pszichoszociális stressz protokollt saját laboratóriumunk dolgozta ki (Fuchs et al., 1996). Röviden: egy naív hím állat ketrecét összenyitottuk egy tapasztalt, agresszív, idősebb hím ketrecével. Ez a két állat között a megnagyobbodott élettér feletti aktív territoriális versengést okozott. A domináns - alárendelt viszony kialakulása után a két állatot a ketrecek közötti drótháló-válaszfal visszahelyezésével ismét elkülönítettük egymástól. A drótrácsot ezután naponta változó időpontban, egy-egy órás időtartamra kivettük, és ezzel a két hím harci kontaktusa ismét létrejöhetett. Ez az elrendezés az alárendelt (szubordináns) egyed számára védelmet biztosított a nap túlnyomó részében az ismétlődő fizikai támadásokkal és sérülésekkel szemben, miközben azonban a domináns egyed ottlétét jelző szag, vizuális és akusztikus ingereket folyamatosan észlelhetette. Továbbá az állatok nem tudták, mikor lesz a következő konfrontáció. Ez a bizonytalanság, kiszámíthatatlanság (*unpredictability*) egy további stressz faktor. Ebben a helyzetben a szubordináns egyedekben az alárendelt szerepre jellemző vonásokat figyeltük meg: csökkent mozgási aktivitás, visszahúzódás (menekülés) a ketrec egy, a dominánstól

távol eső részébe, behódoló pozíciók gyakori felvétele, és a vészhelyzetre jellemző hangadások. A kísérlet harmadik időszakában 28 napon át az alárendelt (kísérleti) állatok egy része, orális antidepresszáns kezelést kapott (Stressz + Antidepresszáns kezelés), miközben a naponta ismétlődő stressz (konfliktus) helyzetben továbbra is résztvett. A másik két csoport (Kontroll, és Kontroll + Antidepresszáns kezelés) állatai ugyanezen időszakra zavartalanul, egyedi ketrecekben maradtak, illetve a kísérlet utolsó időszakában 28 napon át az állatok egy része, orális antidepresszáns kezelést kapott (Kontroll + Antidepresszáns kezelés).

3.3. Krónikus mozgás-gátlás (*restraint*) stressz patkányokon

Hím, felnőtt (a kísérletek kezdetekor 170-200 g tömegű) patkányokat (Sprague Dawley, forrás Harlan Winkelmann, Borchon, Németország) használtunk, és 3-4 egyedeket tartottunk egy-egy ketrecben. Az állatokat fordított megvilágítási ciklusokban (vagyis reggel 7 és este 7 óra között sötétben) tartottuk. Ezt azért csináltuk így, hogy a mozgás korlátozás (*restraint*) az állatok aktív napszakában (sötét, nekik éjszaka) történjen. Minden további beavatkozás ebben a napszakban csupán tompított vörös fényben történt, azért, hogy a kísérletező személy is lásson. A Stressz csoport állatainak mozgását 21 napon keresztül reggel 8 és délután 2 óra között (tehát sötét időszakban, az állatok aktív periódusában) 6 órán keresztül csaknem teljesen gátoltuk. Erre a célra jól szellőző polypropylen csöveket használtunk (McLaughlin et al., 2007). A mozgás-gátlás (*restraint*) során a csövek megfelelő tágassága miatt az állatok sem fizikális szorítást, sem fájdalmat nem éreztek. A különböző fiziológiai paraméterek regisztrálásával mértük fel, hogy az állatok milyen intenzíven éltek át az adott stressz helyzetet. Az állatok testsúlyát (tömegét) naponta megmértük, mivel a testsúly változás az elszorított stressz egyik indikátora. A mellékvese súlynövekedése is egy ilyen indikátor, ezért a kísérlet végén az állatokból a mellékveséket kioperáltuk és súlyukat (tömegüket) szintén lemértük.

3.4. Az állatok perfundálása, az agyak metszése, immunohisztológia

A kísérlet utolsó napján az állatokat mély altatásban (xylazin: 50 mg/ml és ketamine: 10 mg/ml keverék) transzkardiálisan perfundáltuk. Először hideg fiziológiás NaCl oldattal két percig, majd 15 percig 4%-os paraformaldehide oldattal, amit 0.1 M foszfát pufferből (PB) készítettünk és a pH-ját 7.2-re korrigáltuk.

A fixált agyakat először több napig krioprotektív oldatban (30% szukróz oldat, 0.1 M foszfát pufferben) áztattuk, majd száraz jégen lefagyasztottuk. A metszés kriosztáttal 50 µm vastagsággal történt és a teljes hippocampuszt, vagy máskor a teljes frontális lebenyt, feldolgoztuk. A metszetek teljes sorozatát későbbi hisztológiai feldolgozás céljából 0.1 M PBS oldatba gyűjtöttük. A patkány és majom agyakat koronálisan metsztük, a mókuscickányok hippocampuszát viszont horizontálisan.

A sorozat metszetek egy részét (pl. minden ötödiket) a következő immunohisztológiai módszerrel festettük meg. Itt csak egy általános leírás következik: Az úsztatott, 50 µm vastag metszeteket 0.1M PBS oldatban mostuk (3 x 10 percig), majd 1% H₂O₂ oldatban áztattuk 20 percig. Újabb PBS mosás után a nem-specifikus antitest kötődést 1 órás blokkoló oldattal gátoltuk meg, mely egy 3 százalékos normál szérum volt olyan állatból, amelyikben a második antitestet termelték (Vector Laboratories, Burlingame, CA). A szérumot 0.1M PBS és 0.5% Triton X-100 keverékében oldottuk. Hasonló

törzsoldatot (1%-os szérum) használtunk később a mosásokhoz illetve ugyanebben oldottuk fel a primér és szekunder antitesteket is. A metszeteket ezután 1-3 éjszakán át valamilyen (többnyire monoklonális) primér antitesttel készült oldatban inkubáltuk 4 °C-on folyamatosan rázva (lásd a 3.1. Táblázatot). A következő napon többszörös mosás után újabb inkubáció következett, ezúttal biotinylált (vagy közvetlenül fluoreszcens) szekunder antitestben (1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 1-2 órán át, majd öblítés után újabb inkubáció következett avidin–biotin–torma peroxidáz (1:200; Vectastaine Elite ABC Kit, Vector) oldatban kettő óra hosszat. Újabb öblítés után következett az előhívás: 5 perc diaminobenzidine (1:200; DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector) oldatban. Végül egy utolsó alapos mosást követően a metszeteket 0,1 százalékos zselatinózott tárgylemezre szárítottuk, dehidráltuk, xylene oldattal derítettük és Eukitt-fedőlemez fedést alkalmaztunk.

3.1. Táblázat A kísérletekben használt primér antitestek

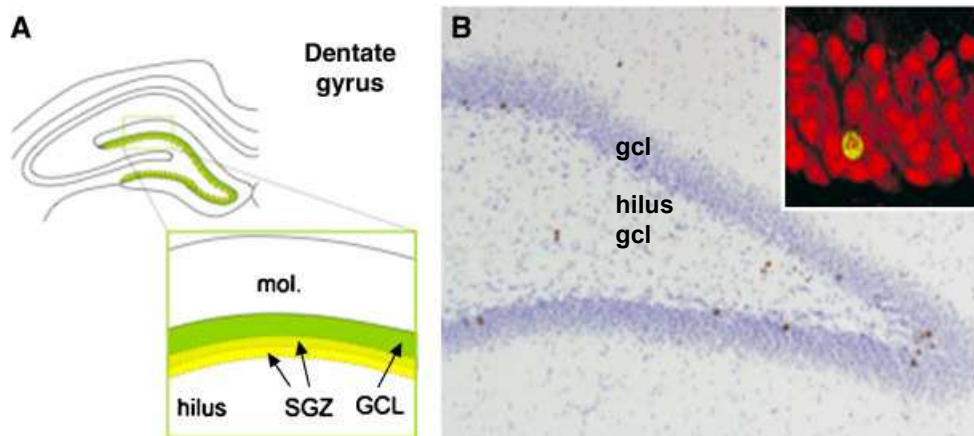
Primér antitest	Gyártó cég	Hígítás	A fejezet, melyben használtuk
egér anti-BrdU	DAKO	1:100	4.1, 4.3., 4.4., 4.9., 4.10.
egér anti-BrdU	Novocastra	1:250	4.2.
patkány anti-BrdU	Accurate	1:200	4.2., 4.4.
patkány anti-BrdU	Genetex	1:200,	4.10.
nyúl anti-cholecystokinin-8 (CCK)	AbCam	1:10000	4.8.
nyúl anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Chemicon	1:4000 vagy 1:10000	4.4., 4.6.
egér anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Sigma	1:10000	4.10.
egér Neuron-Specific Nuclear Protein (NeuN)	Chemicon	1:200 vagy 1:1000	4.2., 4.4., 4.10.
egér anti-NG2 (chondroitin sulphate proteoglycan, NG2)	Chemicon	1:200	4.10.
egér anti-Parvalbumin	Chemicon	1:1000 vagy 1:2000; 1:3000	4.8.
egér antitest patkány endothél sejt elleni antigen-1 (RECA-1)	Serotec	1:200 vagy 1:1000	4.6., 4.10.

3.5. Bromo-deoxiuridin injekció és immunocyto kémia

Az osztódásban lévő neuronok megjelölésére az állatok 5-bromo-2'-deoxiuridine (BrdU, 100-200 mg / testsúly kg; Sigma) injekciót kaptak intraperitoneálisan. A BrdU a sejtosztódás S fázisa során beépül az újonnan szintetizálódó DNS szálba, és ez a beépült BrdU később, immunohisztokémiai eljárással kimutatható. A BrdU jelölés előnye, hogy a jelölt sejtek száma könnyen meghatározható, továbbá identitásuk (idegsejt vagy glia) kettős jelölési módszerrel viszonylag könnyen ellenőrizhető (3.3 és 3.4. Ábra).

Másutt közölt (Czéh et al., 2001, 2002) eljárásunkat követve a BrdU kimutatása röviden a következő lépésekből áll: DNA kicsapás (0.01 M citric acid, pH 6.0, 95 °C,

20 min), membrán permeabilizáció (0.1% trypsin, 10 min), és savanyítás (2 M HCl, 30 min). A primér antitest többnyire (lásd 3.1 Táblázat) egér anti-BrdU (DAKO, 1:200) volt. Az immunocytokémiát végső fázisában a jelölt sejteket a szokásos avidin–biotin/diaminobenzidine eljárással vizualizáltuk.



3.3. Ábra

Újszülött neuronok felnőtt patkány gyrusz dentátusában.

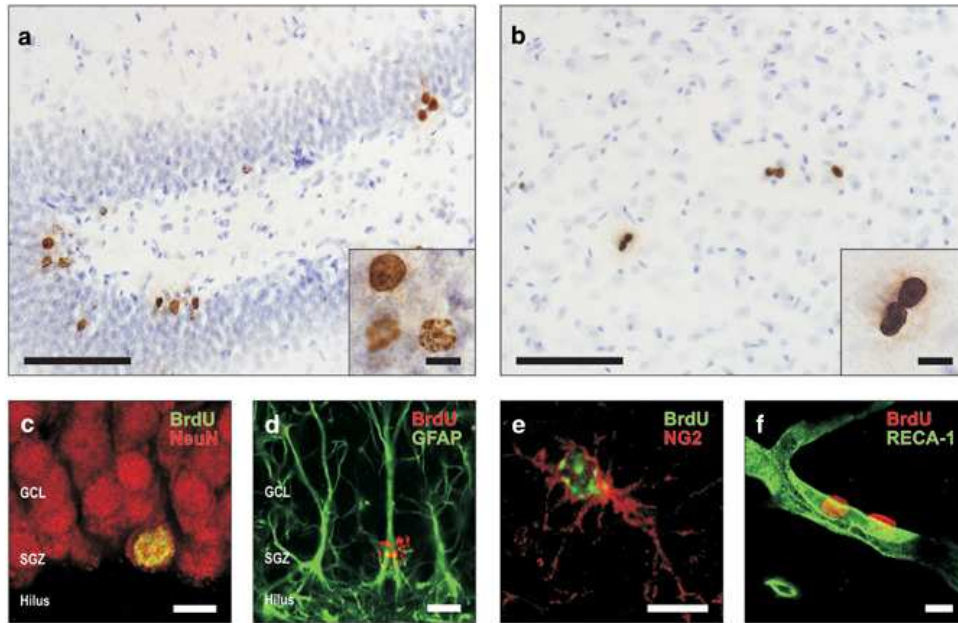
A: A gyrus dentatus azon rétegei, ahol az újonnan képződött BrdU+ sejteket számoltuk: SGZ: szubgranuláris zóna, GCL: szemcsesejt réteg (*granule cell layer*). **B:** BrdU-jelölt (barna), újonnan képződött sejtek felnőtt hím patkány gyrus dentatusában. Inzert: az újszülött neuronok identitását neuronális markerekkel igazoltuk: BrdU+NeuN – sárga, NeuN: piros.

3.5.1. A BrdU-jelölt sejtek számolása a gyrus dentatus-ban

Saját, korábban közölt (Czéh et al., 2001, 2002) eljárásunkat használtuk. A teljes dorzo-ventrális metszet sorozatból minden ötödiket (mókuscickány esetében ez átlag 27 darab metszet) vizsgáltuk. A szemcsesejt réteg és a szubgranuláris zóna BrdU jelölt sejtjeit számoltuk (3.3. Ábra), mely utóbbi egy körülbelül két sejtest-széles virtuális zóna a szemcsesejt réteg és a hilus között. A teljes gyrus dentatus-t analizáltuk. A sejtszámok feloldásához x400 vagy x1000 nagyítást használtunk. Az alsó és felső fókusz-síkokban előforduló egyedeket nem vettük figyelembe. A sejtszám összegét a BrdU jelölt sejtek számának ötszöröse adja.

3.5.2. A BrdU-jelölt sejtek fenotípusának további meghatározása

A BrdU-pozitív sejtek identitását meghatározandó a következő primér antitesteket használtuk: Az idegsejteket egér anti-NeuN inkubálással, a glia sejtjeit pedig egér anti-GFAP vagy egér anti-NG2 oldattal azonosítottuk (3.1. Táblázat, 3.4. Ábra). A szintén BrdU-pozitív endothel sejtek felismerésére egér anti-RECA-1 reakciót használtunk. A primér antitesteket fluoreszcens másodlagos antitestekkel vizualizáltuk (Alexa Fluor család 1:200 Invitrogen, Molecular Probes). A metszetekben a kettős jelölődést konfokális mikroszkóppal igazoltuk (x63 immerziós objektívvel, LSM-5 Pascal, Zeiss, Germany).



3.4. Ábra

Sejtproliferáció a hippocampusban (a), és a prefrontális kéregben (b).

c-f: Az újszülött sejtek identitásának meghatározása. Azt, hogy az újonnan képződött BrdU+ sejtekből neuronok vagy glia sejtek differenciálódnak, kettős jelöléssel és konfokális mikroszkóppal döntöttük el. Neuronok identifikálására NeuN markert, míg a glia sejtek meghatározására GFAP-t vagy NG2-t használtunk. A kapillárisok falát alkotó endothel sejtek kimutatására a RECA-1 antitestet használtuk. (Részleteket lásd a [Czéh et al., 2007](#)).

sérlet vázlata. **A:** Az állatok stresszelése: konfrontáció egy domináns hímmel a hét minden napján. **B:** A kísérleti állatcsoportok. A kísérlet végén az állatok agyát in vivo NMR spektroszkópiás mérésnek vetettük alá majd BrdU-t injektáltunk az állatokba, hogy az osztódásban lévő sejteket megjelöljük.

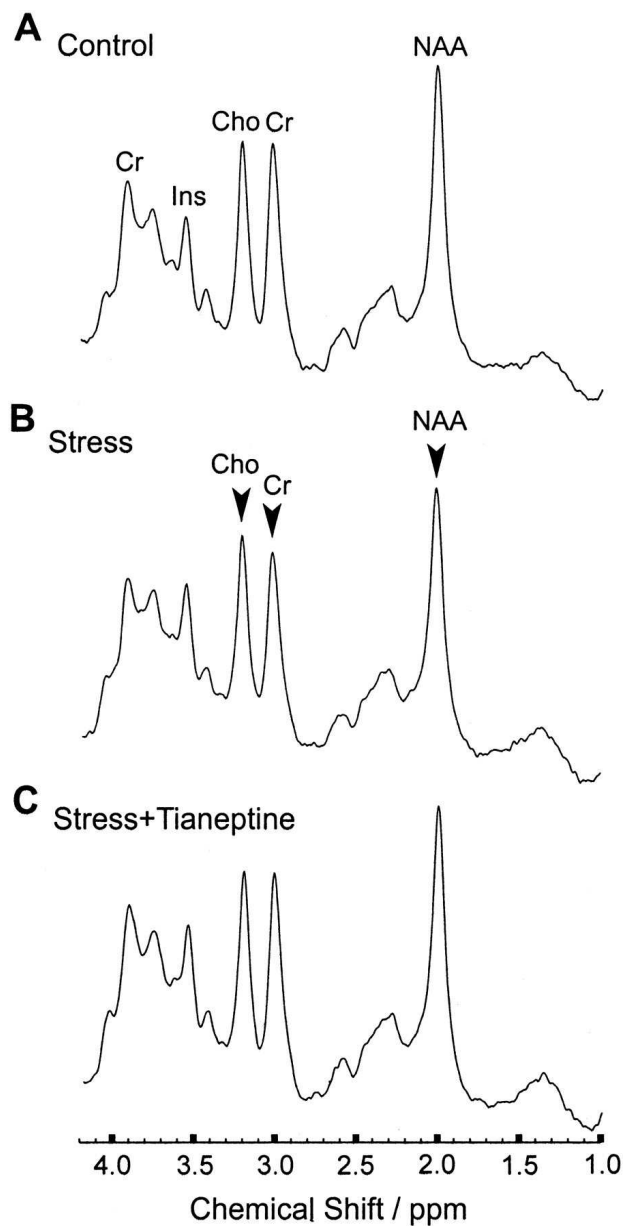
3.6. NMR-spektroszkópia (*proton magnetic resonance spectroscopy, NMRS*)

A krónikus stressz kísérletek utolsó napján a mókuscickányok a fontosabb agyi metabolitok *in vivo* koncentrációjának meghatározása céljából (3.2. és 3.5. Ábra) képelemzéssel társult lokalizált NMRS vizsgálaton estek át Michaelis et al., (2001) eljárása szerint. Az eljárás röviden a következő: MRI és NMRS méréshez 2.35 Tesla erősségű MRBR 4.7/400 mm mágnesset (Magnex Scientific, Abingdon, England) használtunk egy DBX MRI rendszerrel (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) együtt. Rádiófrekvenciás excitációhoz egy 14 cm Helmholtz tekercset, jel-érzékelésre egy 2 centiméteres tekercset használtunk.

Az állatokat halothán narkózisban pronált pozícióban rögzítettük. MRS méréskor a VOI (*volume-of-interest*) mérete 7x5x7 milliméter volt. A VOI gondos kiválasztása szagittális és koronális síkokból vett T1-súlyozott gradiens-echo képekből történt. Az előagyból kiválasztott mező részei a parasagittális neo-kortex, a szomszédos fehér állomány és szubkortikális struktúrák (kaudatusz-putámen, hippocampusz, talamusz és az agykamrák) voltak. NMR spektrumokat (STEAM, TR/TE/TM=6000/20/10 ms, 64

átlag) rövid echo idővel gyűjtöttünk, annak a szignál csökkenésnek kerülése érdekében, melyet a T2 relaxáció okoz, valamint hosszú ismétlési idővel a T1 telítődés kivédése céljából.

A metabolitok mennyiségi meghatározása automatikus spektrum értékelővel (LCModel, Provencher, 1993) történt, az agy folyadék (víz) koncentrációjához illesztett kalibrációt Michaelis et al. (1999) szerint végeztük.



3.5. Ábra

Egy típusos NMR spektrum, kontroll, stresszelt, valamint stresszelt és antidepresszáns kezelt mókuscickányok agyából. Részleteket lásd a [Czéh et al., 2001.](#)

4. EREDMÉNYEK

4.1. A krónikus stressz hatása a felnőttkori neurogenesisre a gyrus dentatus-ban

BEVEZETÉS

Ahogy azt az 1.3. fejezetben már kifejtettük, a felnőttkori neurogenesis (AN) a környezeti hatások, az élettapasztalat (*experience*) befolyásolni képesek. Egy évtizeddel ezelőtt, amikor mi az itt bemutatásra kerülő kísérleteket elkezdtük, még csak néhány adat létezett arra vonatkozóan, hogy a stressz is hat az AN-re.

Elsőként Elizabeth Gould mutatta ki, hogy akut pszichoszociális stressz a felnőtt mókuscickányok gyrus dentatus areájában drámai mértékben gátolja a szemcsesejtek proliferációját (Gould et al., 1997). Egy évvel később látott napvilágot az a tanulmány (Gould et al., 1998), mely bizonyította, hogy ugyanilyen folyamat játszódik le főemlős majmokban is, ami nagymértékben valószínűsíti, hogy ez az emberi hippocampusban is megtörténik. A harmadik tanulmány, mely ekkor már az irodalomban létezett, azt bizonyította, hogy patkányokban a ragadozó (róka) szagának érzékelése már egyetlen alkalom után is képes a szemcsesejtek proliferációját redukálni (Tanapat et al., 2001).

Közismert azonban, hogy az állatok többnyire jól alkalmazkodnak a környezet változásaihoz és ezért számos stressz következtében kialakuló fiziológiai elváltozás spontán visszarendeződik. Emiatt fontos tisztázni, vajon a krónikus stressz befolyásolja-e vagy sem az AN mértékét. Azért is fontos ez a kérdés, mert a krónikus stressz emberben különféle neuropszichiátriai megbetegedések kialakulását idézheti elő.

Ennek megfelelően, elsőként az irodalomban, egy krónikus (több hetes) stressz paradigmát használtunk, amely a szociális rangsorban elszorított veszteségen, „alárendelődésen” (*social defeat*) alapszik, és azt vizsgáltuk, hogyan hat ez az AN különböző aspektusaira. A kísérletben értékeltünk több olyan fiziológiai mutatót is, melyek jelzik a stressz mértékét, hiszen a krónikus stresszt alkalmazó kísérletekben bizonyítani kell, hogy az állatok valóban folyamatos fenyegetettségben éltek (Czeh et al., 2001, 2002). Mint ahogy azt a Bevezetőben (1.3. fejezet) kifejtettük az AN-nek több stádiuma van, mely a sejt-proliferációval kezdődik, és amelyet az újonnan született sejtek érési és differenciálódási szakaszai követnek. Célunk annak tisztázása volt, hogy a krónikus stressz mennyiben változtatja meg a sejtproliferációt majd pedig az újszülött sejtek több hetes túlélését. Az egyik kísérletünkben a krónikus szociális stressz (*social defeat*) paradigmát felnőtt hím patkányokban használtuk, mivel úgy tűnik ez a paradigma patkányoknál is beválik mint a depresszió-állatmodellje (Rygula et al., 2005, 2008; Becker et al., 2008).

EREDMÉNYEK

Az úgynevezett „túlélési állatcsoportok” kettő BrdU injekciót kaptak, két egymást követő napon, még a stresszelés megkezdése előtt. Ezután a patkányoknak több héten keresztül minden nap át kellett élniük a szociális konfrontációt, majd végül leöltük őket és az agyukból készült metszeteket immunocitokémiai eljárással feldolgoztuk. Ez az eljárás alkalmas a stressz azon sejtekre gyakorolt hatásának specifikus elemzésére,

melyek éppen a stresszelés megkezdése előtt képződtek. Egy másik eljárással a progenitor sejtek proliferáció-rátájának mértékét ellenőriztük. Az ebbe a csoportba tartozó állatok a stresszelési időszak utolsó napján, leölésük előtt 24 órával kaptak egyetlen BrdU injekciót, melynek segítségével a progenitor sejtek aktuálisan meglévő proliferációs aktivitását értékeltük. Ezzel a protokollal kontroll patkányok gyurus dentatus-ában 2500-2700 frissen képződött sejtet számoltunk (*proliferation rate*), míg a „túlélési állatcsoportokban” a BrdU-pozitív sejtek száma 2800-3000 volt (*survival rate*) (2. ábra, Czéh et al., 2002).

Hogy a tartós stressznek kitett állatok ezt valóban folyamatos fenyegetettségnek élték át azt az bizonyítja, hogy a kísérlet végén is megemelkedett kortikoszteron (+94%) és ACTH (+97%) koncentrációt mértünk a vérükben, vagyis az állatokban a HPA-tengely tartósan aktiválódott (1. ábra, Czéh et al., 2002). A naponta ismételt pszichoszociális stressz mintegy 30 százalékkal csökkentette a szemcsesejtek proliferációját, és hasonló mértékben redukálódott az újonnan született sejtek túlélésének rátája is (2. ábra, Czéh et al., 2002). Az újszülött sejtek identitás vizsgálata kimutatta, hogy a BrdU-pozitív sejtek ~70 százalékból idegsejt fejlődött, míg nagyjából 20 százalékból asztrocita lett. A maradék 10 százalék identitását nem sikerült meghatároznunk. Ezt a glia:neuron arányt a krónikus stressz nem befolyásolta (1. táblázat és 3. ábra Czéh et al., 2002).

Hasonló eredményeket kaptunk egy másik kísérletben is, ahol mókuscickányokat stresszeltünk krónikusan, szintén a pszichoszociális stressz paradigmában (Czéh et al., 2001). Továbbá, érdekes módon úgy tűnik, az életkor előrehaladtával az idősebb állatok érzékenyebben reagálnak a stressz hatásra, legalábbis bennük stressz után jobban csökken a sejt proliferáció (Simon et al., 2005).

MEGBESZÉLÉS

Ezekkel az adatokkal mi voltunk az elsők, akik a krónikus stressznek a hippocampusban zajló felnőttkori neurogenesisre gyakorolt hatásáról beszámoltunk. Eredményeinket azóta számos más munkacsoport, különböző állatfajban, különböző krónikus stressz paradigmát alkalmazva sikeresen reprodukálta (néhány összefoglaló review közlemény, mely ezeket az eredményeket diszktálja: Dranovsky and Hen, 2006; Mirescu and Gould, 2006; Lucassen et al., 2010)

Meglepő volt számunkra az a tény, hogy az akut stressz robosztusabb szemcsesejt proliferáció gátlást okoz (Gould et al., 1997), mint a krónikus. Ennek egyik lehetséges oka, hogy a proliferáló sejtek valamiképpen „habituálódnak” a krónikusan ismétlődő stressz hatásához és ennél fogva kevésbé reagálnak a stressz hormonok rovására írható AN-t gátló effektusokra. Stressz-indukált proliferáció csökkenés a progenitor sejtek apoptózisából és a sejt-érési ciklus elakadásából származhat. Amint a bevezető 1.3.1. fejezetében írtuk számos olyan neurotranszmitter és hormon van, melyek szintje stressz hatására emelkedik és amelyek az AN-t befolyásolni képesek.

4.2. Prenatális stressz hatása a felnőttkori neurogenezisre főemlősök hippocampusában

BEVEZETÉS

Mai felfogásunk értelmében számos betegség gyökerét, oki tényezőjét a magzati életkorban kell keresnünk, hiszen ma már tudjuk, hogy a prenatális események „élmények” képesek fejlődésünket és későbbi életünket a betegség útjára terelni. A legegységertelműbb bizonyítéka ennek a felfogásnak az a tény, hogy milyen súlyos hatást képesek gyakorolni a magzat fejlődésére a különféle teratogen szerek, gyógyszerek, az alkohol, vagy akár a stressz is (Lou et al., 1994; Wadhwa et al., 2001). Retrospektív tanulmányok adatai szerint az anyát a terhesség alatt érő stressz következményeként gyakoribbak a koraszülések, és a korukhoz képest kis testsúllyal született újszülöttek (Hedegaard et al., 1993, 1996). Ráadásul, az ilyen terhességből származó utódok fizikai és/vagy pszichikai fejlődése is zavart szenved (Clements, 1992; Jones and Tauscher, 1978; Meijer, 1985). Régóta gyanítják, hogy a súlyos stressznek kitett terhes anyák utódai között gyakoribb a szkizofrénia és az affektív zavarok is (Huttunen and Niskanen, 1978; Myhrman et al., 1996; van Os and Selten, 1998; Brown et al., 2000).

Nagyszámú preklinikai tanulmány bizonyítja, hogy még a relative enyhe prenatális inzultusok is, melyek nem vezetnek koraszüléshez, vagyis sem a terhesség időtartamát, sem a fötusz fejlődését durván nem befolyásolják, képesek az utód agyának biokémiáját, neuro-endokrin funkcióit, emocionális életét és tanulási képességeit negatív irányban változtatni (lásd Weinstock, 2008 áttekintő munkáját). Ezek a tanulmányok arra utalnak, hogy a magzat számára, az anyaméh nem jelent tökéletes védelmet, és nem marad érintetlenül a várandós anya stressznek kitett életmódjának következményeitől. Ezért szükséges tisztázni azt, hogy mi az, amit a magzat még tolerálni képes, és mi az, ami egészségére már ártalmas.

Kíváncsiak lettünk a fentiek miatt arra, hogy vajon a prenatális stressznek vannak-e hosszú távú következményei az AN-re vonatkozóan. Kísérleti munkánk megkezdésekor még csak egyetlen tanulmány létezett az irodalomban, amely ezt a problémát kutatta (Lemaire et al., 2000). Ez egy patkányokon végzett kísérletes tanulmány volt, melynek eredménye szerint az intenzív és tartós prenatális stressz következményeként az utódok egész életkorára kiterjedően csökkent a hippocampális neurogenesis, a gyrus dentatus érett szemcsesejtjeinek száma is kisebb maradt, és az állatok a hippocampuszhoz köthető téri tájékozódási és tanulási zavarokat mutattak (Lemaire et al., 2000).

Mi azt kívántuk tisztázni, vajon a prenatális stressznek hasonló következményei vannak-e főemlősökben is, vagy sem. Ennek tisztázása azért fontos, mert ha ilyen hatást észlelünk majmokban is, akkor nagyon valószínű, hogy ezek a kóros folyamatok emberben is hasonlóképp játszódnak le. Kísérletünkben terhes rézusz majmokat stresszeltünk és vizsgáltuk az utódok pszicho-motoros fejlődését, a HPA-tengely aktivitását, valamint a hippocampusz térfogatát és az AN mértékét. Kísérletünkben három állatcsoport volt: egy kontroll, amely zavartalan terhességből származó utódokból állt, és két prenatálisan stresszelt majmokból szervezett csoport, ahol az anyákat vagy a terhességük korai vagy pedig késői időszakában, 6 héten át stresszeltünk (lásd alább a „Prenatális manipulációk” leírását). Az utódokat 2-2.5 éves korukban vizsgáltuk, ez rézusz majmok esetében a pubertás előtti életszakasznak felel meg.

EREDMÉNYEK

Magatartási vizsgálataink eredményei szerint a stresszelt terhességből származó utódok pszicho-motoros fejlődése zavart volt, mivel ezek az állatok ritkábban végeztek fókuszált figyelmet követelő tevékenységet és viselkedésük gyakrabban volt céltalan, mint a kontroll terhességből származó utódoké (Coe et al., 2003, 1. Ábra).

A HPA-tengely aktivitását elemezve azt találtuk, hogy mind a korai mind a késői magzati életkorban elszenvedett inzultus után született állatokban magasabb volt a kortizol szint (Coe et al., 2003, 2.A Ábra). Ez a tünet két lehetséges okra vezethető vissza. Egyik a magasabb bazális hormonszint reggel, amikor a tesztet csináltuk, a másik az, hogy talán a vérvétellel járó manipuláció okozott fokozottabb stressz-reakciót ezekben az utódokban. Vizsgáltuk azt is, hogy ezek az állatok hogyan reagálnak DEX (*dexamethasone*) adására (DEX-szupressziós-teszt). Közismert, hogy DEX adása, normális esetben negatív-feedback útján gátolja a HPA-tengely aktivitását. Tizenkét órával a DEX beadása után mind a korai mind a késői terhességi korban stresszelt anyáktól származó utódokban a kortizol szint szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll majmokban (Coe et al., 2003, 2.B Ábra). Másszóval ezekben az állatokban, a DEX-indukálta negatív-feedback nem működött megfelelően. Ezek az adatok tehát azt jelzik, hogy a prenatálisan stresszelt állatokban az HPA-tengely működése kóros volt.

A poszt-mortem szövettani analízis eredményei szerint a hippocampusz gyrus dentatus-ában a BrdU-jelölt (újszülött) sejtek száma ~30%-os csökkenést mutatott, mind a korai, mind a késői magzati periódusban stresszelt állatokban (Coe et al., 2003, 3. ábra). A korai és késői terhességi időszakban stresszelt majmok utódai között ebből a szempontból nem volt szignifikáns különbség. A hilusban hasonló jelenség volt megfigyelhető: a magzati élet során mind a korai mind a késői inzultusnak kitett utód majmokban 23 illetve 21%-al csökkent a BrdU-pozitív sejtek száma, bár ez nem volt szignifikáns. Ugyanakkor, szignifikáns korrelációt figyeltünk meg a DEX után mért plazma kortizol szint és a gyrus dentatus-ban talált BrdU-pozitív sejtek száma között.

A kettős immunofluoreszcens jelölés adatai szerint, a kontroll majmokban származó mintákban a BrdU-jelölt sejtek 80% $\pm$ 7%-a jelölődött NeuN-nel is, vagyis ennyiből lett neuron. A prenatálisan stresszelt állatokban ez az arány azonos volt a kontroll értékekkel: korai stressz: 82% $\pm$ 8%, késői stressz: 87% $\pm$ 7% (Coe et al., 2003, 4. ábra). Vagyis a prenatális stressz azon nem változtatott, hogy az újonnan képződött sejtek hány százalékából lesz neuron.

A poszt-mortem szövettani analízis a hippocampusz térfogatának meghatározására is kiterjedt. A prenatálisan stresszelt állatokban a hippocampusz térfogata is szignifikánsan kisebb volt, és ez a csökkenés is független volt attól, hogy az állatokat mikor stresszeltük (Coe et al., 2003, 3. ábra).

MEGBESZÉLÉS

Ezek az eredmények korábbi adatokat egészítenek ki, és meggyőzően bizonyítják, hogy a prenatális stressz főemlősökben is hosszantartó következményekkel jár, kihat az utódok magatartására, hormon funkcióira, és neuroanatómiai következményei is vannak (Takahashi, 1998; Weinstock, 2008).

Érdemes kiemelni, hogy mi ebben a kísérletben egy relatíve enyhe stresszort használtunk. A terhes anyát érintő manipuláció csak napi 10 percig tartott és a terhesség időtartamának csak 25%-ban alkalmaztuk. Mégis ez a relatíve enyhe

prenatális stressz is jelentős és hosszú távú hatást gyakorolt az utódok pszicho-motoros és neuro-endokrin fejlődésére, valamint a hippocampusz anatómiájára. Egy korábbi kísérletben, hasonló körülmények között a corpus callosumot érintő fejlődési zavarok voltak kimutathatóak (Coe et al 2002a).

Jelen munkánkban a prenatális stressz eredményeként a hippocampusz térfogatának 10-12%-os csökkenését találtuk. Igaz ugyan, hogy ez a térfogat csökkenés aránylag kicsi, de megjegyzendő, hogy az *in vivo* MRI vizsgálatok hasonló mértékű hippocampusz zsugorodást mutatnak pszichiátriai betegekben (e.g., Bremner et al., 1995, 1997, 2000; Gur et al., 2000). Továbbá, egyes adatok szerint a veleszületetten kisebb méretű hippocampusz mint vulnerabilitás faktor szerepel egyes pszichiátriai megbetegedésekben (Gilbertson et al., 2002).

Meglepetésünkre, a gesztációs peridus különböző (korai és késői) időszakaiban alkalmazott stressz a felnőttkori neurogenesis szempontjából nem eredményezett különbséget. Ez azért is meglepő, mert az agy normál fejlődése szempontjából e két kiválasztott gesztációs periódus lényegesen különbözik egymástól (Berger et al., 1993; Bourgeois et al., 2000; Rakic and Nowakowski, 1981). Ebből arra következtetünk, hogy a prenatális stressz – függetlenül annak pontos időpontjától – inkább egy hibás fejlődési pályára tereli a hippocampuszt, mintsem hogy egy körülírt, „pont-szerű” defektust okozna.

A gyrus dentatus fejlődése rézusz majomokban és emberben nagyjából megegyező módon megy végbe (Berger et al., 1993; Seress et al., 2001), habár nehéz pontosan egybevetni a főtális fejlődés ütemét és a születéskori pontos érési stádiumot. A gyrus dentatus kialakulása rézusz majomokban már az E38. napon megkezdődik, de a szemcsesejtek többsége az E60. és E120. közti időszakban képződik (Rakic and Nowakowski, 1981). Emberben a szemcsesejt réteg legkorábban a gesztáció 13-14. heteinek időszakában alakul ki (Humphrey, 1967) és, hasonlóan a rézusz majomhoz, a szemcsesejtek többsége a második trimeszterben keletkezik (Seress et al., 2001). A születés pillanatában rézusz majomokban a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek mintegy 50-60%-a van jelen, (Keuker et al., 2003), míg emberben ez a szám 70-85% (Seress L. személyes információ, Február 27, 2003). Mind emberben, mind a főemlősökben a szemcsesejtek keletkezése és érése jelentős mértékben folytatódik a korai posztnatális időszakban (Seress, 1992; Seress et al., 2001). Azonban az emberi agy egy igen kifejezett posztnatális érési folyamaton megy keresztül. Születéskor a majom agy, felnőttkori méretének 60 százaléka, ezzel szemben az emberi agy születéskor a felnőttkori tömegének csak 24%-a. Ebből fakadóan emberben a poszt partum regeneráció (prenatális stressz után) talán sokkal jelentősebb, mint majmokban. Ennek ellenére, mint az itt bemutatott kísérlet demonstrálja, célszerű arra törekedni, hogy a magzati élet lehetőség szerint stressz mentesen teljen, mivel ezzel részben megelőzhető, hogy később kognitív vagy pszichológiai (netán pszichiátriai) rendellenességek alakuljanak ki.

AZ ITT BEMUTATOTT KÍSÉRLETBEN HASZNÁLT MÓDSZEREK

Az állatok tartása

Ebben a kísérletben fiatal rézusz majmokat (*Macaca mulatta*) használtunk. Három kísérleti csoport volt, egy kontroll, és két prenatálisan stresszelt. A prenatális stresszelést a gesztációs periódus két különböző szakaszában végeztük, az egyiket a terhesség korai, míg a másikat a terhesség késői stádiumában (lásd alább). Kezdetben 20 egészséges hím és nőstény kölyköt választottunk hormon-meghatározásra és magatartási tesztekre, mégpedig akkor, mikor az egyedek elérték a 2-2.5 éves kort. Rézusz majmokban ez a pubertás előtti életkor. Később ezekből 12 egyedet választottunk neuroanatómiai értékelésére, tekintettel arra, hogy ez a vizsgálat értelemszerűen euthánázia után történik. A megölt állatok életkor, testtömeg (súly) és szex (két-két hím illetve nőstény) paraméterek szempontjából azonos volt a három csoportban. Születés után a kicsi kölyköket az anyjuk nevelte – csakúgy mint normális körülmények között – az első 7 posztnatális hónapban, majd pedig 4-8 tagú, a kétféle prenatálisan stresszelt anyákból származó utódokból kevert kisebb szociális csoportokban nevelkedtek.

Prenatális manipulációk

A kontroll csoport egyedeit zavartalan terhességből származó utódokból válogattuk. Ezeket hasonlítottuk olyan utódokhoz, melyek anyját a 24 hetes gesztációs periódus korai vagy késői szakaszában 6 héten át stresszeltük. A korai stressz periódus a megtermékenyítés utáni 50. napon kezdődött és a 92. napig tartott. A késői stressz periódus a 105-147. napok közötti időszakra esett. Ez a két időszak a majom-agykéreg sejtfejlődése és szinaptogenezise szempontjából egymástól jelentősen eltér (Bourgeois et al., 2000). Különösen fontos itt az a tény, hogy majom magzatokban a hippocampusz cytoarchitektúrája és neurokémiája a 90. napra nagyrészt kifejlődik (Berger et al., 1993). Az emberi magzat fejlődése is hasonló ütemben zajlik és a gesztációs idő közepén a sejt proliferáció jelentősen lelassul a gyrus dentatus-ban (Seress et al., 2001). A kísérleti csoportokba sorolt terhes nőstény majmokat hetente 5 napon keresztül stresszeltük. Ez abból állt, hogy hétfőtől péntekig naponta átvittük őket egy sötét szobába, délután 14:30-16:00 óra között. Itt 10 percig maradtak a szállító ketrecükben, majd pedig egy váratlanul felcsattanó erős hang (autókürt) ijesztette meg őket háromszor. Egy standard protokoll szerint három, egyenként 1 másodpercig tartó 110 dB erősségű kúrhangot alkalmaztunk, melyek között random 1-4 perces időintervallum telt el. A kísérlet megkezdése előtt már tisztáztuk, hogy ez a paradigma szignifikánsan növeli a terhes anyák vérében a kortizol szintet, és befolyásolja az utódok posztpartum magatartási válaszkészségét valamint immunoreakcióit (Clarke and Schneider, 1993; Coe et al., 1996, 2002b). A 6 hetes stresszelést megelőző, és az azt követő időszakokban a terhes majmok zavartalanul éltek saját ketrecükben, amíg magzataikat természetes úton megszülték majd nevelték.

4.3. Képes-e az antidepresszáns kezelés normalizálni a krónikus stressz a felnőttkori neurogenesisre gyakorolt gátló hatását?

BEVEZETÉS

1999-ben egy olyan göttingeni laboratórium munkájába volt alkalmam bekapcsolódni, amely akkor az elsők között kezdte aktívan kutatni a felnőttkori hippocampális neurogenesisnek a depressziós hangulatzavarok etiológiájában játszott lehetséges szerepét. Akkoriban néhány amerikai kutató már felvetette ennek a lehetőségét (Duman et al., 1999; Jacobs et al., 2000; Manji and Duman, 2001; Manji et al., 2000, 2001), de még nagyon kevés kísérletes adat állt rendelkezésre ennek az elméletnek bizonyítására vagy cáfolatára.

Akkor már ismert volt, hogy akut stressz a gyrus dentatus-ban felnőttkorban is gátolja a szemcsesejtek proliferációját (Gould et al., 1997, 1998). Továbbá tudható volt, hogy több különböző típusú antidepresszáns kezelés, mint például az antidepresszív hatású gyógyszerek, de az elektrokonvulzív terápia, és a lithium is, serkentik a gyrus dentatus-ban zajló neurogenesiszt (Chen et al., 2000; Madsen et al., 2000; Malberg et al., 2000; Scott et al., 2000). Említésre méltó, hogy ezeknek a terápiás beavatkozásoknak jótékony hatását csak krónikus kezelés után észlelték, akut kezelés hatástalannak bizonyult (Malberg et al., 2000). Ugyanakkor fontos kiemelni azt is, hogy ezekben a korai tanulmányokban az antidepresszánsok AN-re gyakorolt hatását csak egészséges (normál) állatokban vizsgálták (Madsen et al., 2000; Malberg et al., 2000; Scott et al., 2000), holott a klinikai gyakorlatban az antidepresszánsokat affektív zavarokban szenvedő pácienseknek adják. A depresszió neurobiológiájának felderítéséhez tehát a valóságos (klinikai) helyzetet jobban megközelítő állatkísérletek szükségesek. Mi ezt az igényt úgy próbáltuk kielégíteni, hogy olyan állatokat kezeltünk antidepresszívumokkal, amelyek közben egy krónikus pszichoszociális stressz (*social defeat stress*) paradigmában is résztvesznek. Úgy véltük, hogy a klinikai szituációt legjobban úgy közelítjük meg, hogy ha az antidepresszáns kezelést csak a stressz-indukálta változások kialakulása után kezdjük. Nálunk az állatok stresszelése egy héttel korábban kezdődött, mint a gyógyszeres terápia, (3.2. Ábra). Első kísérletünkben antidepresszánsként tianeptint használtunk, mely ismeret módon megelőzi, illetve blokkolja a hippocampusban leírt stressz-indukálta morfológiai elváltozásokat (McEwen et al., 2010). A tianeptin kezelést 4 héten át orálisan alkalmaztuk, miközben az pszichoszociális stresszt folyamatosan fenntartottuk. A kísérlet végén NMR-spektroszkópiával megmértük az agyi metabolitok koncentrációját *in vivo* (3.2. és 3.5. Ábra). Ezenkívül poszt-mortem megmértük a hippocampus volumenét és a gyrus dentatus-ban tapasztalt sejt-proliferáció mértékét (Czeh et al., 2001).

EREDMÉNYEK

Az itt bemutatásra kerülő kísérletünkben, nekünk sikerült a világon elsőként bizonyítanunk azt, hogy a hippocampusban a stressz hatására kialakuló sejtosztódás gátlása az állatok antidepresszáns kezelésével megakadályozható, (Czeh et al., 2001). Az 5 héten keresztül tartó, krónikus pszichoszociális stressz szignifikánsan csökkentette a BrdU-pozitív sejtek számát a gyrus dentatus-ban (2. Ábra Czeh et al., 2001). Azokban az állatokban viszont, amelyek a stressz mellett négy hetes tianeptin kezelésben is részesültek, a gyrus dentatus BrdU-pozitív sejteinek száma a kontroll értékkel azonos volt, szignifikánsan több, mint a stresszelt állatokban. Eszerint az AN krónikus stressz esetén jelentősen csökken DG-ban, de ezt a csökkenést antidepresszáns

kezeléssel ki lehet védeni. Ugyanakkor a tianeptin kezelés kontroll (nem stresszelt) állatokban lényegében hatástalan maradt (2. Ábra Czéh et al., 2001). Korábbi kísérletekből tudjuk, hogy szubordináns mókuscickányok akut pszichoszociális stresszelése is drasztikusan csökkenti az AN-t (Gould et al., 1997). Mivel saját kísérleteinkben az állatokat a tianeptin kezelés megkezdése előtt már egy hétig naponta stresszeltük, ezért nagyon valószínű, hogy a sejtproliferáció mértéke a stressz miatt eleinte csökkent, majd a 28 napos antidepresszáns kezelés eredményeként visszarendeződött.

Ugyanebben a kísérletsorozatban igazoltuk azt is, hogy az agyi metabolitok stressz-indukálta változását tianeptin kezeléssel szintén normalizálni lehet. A kísérlet utolsó napjaiban NMR-spektroszkópiás méréssel több agyi metabolit értékét (3.5. Ábra) meghatároztuk. A mért metabolitok a következők voltak: 1) a neuro-axonális *N*-acetyl-aszpartát (NAA) marker, amely csak az idegsejtekben található, ennél fogva jól jelzi a neuronok élet- és funkcióképességét; 2) kreatin és foszfo kreatin (Cr), melyek fontos energia metabolitok markerei; 3) kolin-tartalmú (Cho) komponensek, melyek a sejtmembránok képződésének illetve degradációjának jelző anyagai, mint például a (glycero-)phosphocholine; 4) és egy glia sejt marker a *myo*-inositol (Ins). A kontroll csoporthoz képest a krónikusan stresszelt állatokban szignifikánsan csökkent az NAA, Cr, valamint a Cho-tartalmú komponensek szintjei (1. Ábra és 1. Táblázat Czéh et al., 2001). Ugyanakkor a glia-marker Ins koncentráció változatlan maradt. A stresszelt állatok tianeptin kezelése (stressz + tianeptin csoport) normális agyi metabolit koncentrációkat eredményezett. Antidepresszáns kezelés önmagában (kontroll + tianeptin) nem változtatta meg a mért agyi metabolitok szintjét. Konklúzióink szerint tianeptin kezelés alkalmas arra, hogy a pszichoszociális stressz kapcsán megváltozott agyi metabolizmust helyreállítsa.

Azt is demonstráltuk, hogy tianeptin kezeléssel visszafordítható a hippocampusz stressz-indukálta volumen-csökkenése. Az 5 hétig tartó stressz egy nem szignifikáns, 7%-os térfogat csökkenést eredményezett (3. Ábra Czéh et al., 2001). Ezzel szemben a tianeptin-kezelt stresszelt állatokban a hippocampusz volumene szignifikánsan nagyobb volt, mint a csak stresszelt egyedekben.

Végül azt vizsgáltuk, hogy a stressz-indukálta sejtproliferáció csökkenés vajon oly mértékű-e, hogy az a szemcsesejt rétegének volumen csökkenéséhez is vezet, és ezáltal az AN csökkenése hozzájárul-e a hippocampusz egészének volumen csökkenéséhez. Meglepetésünkre, a szemcsesejt réteg térfogatát változatlanul találtuk. Ebből arra következtettünk, hogy a csökkent AN a gyrus dentatus-ban nem lehet a hippocampusz volumen csökkenésének közvetlen oka.

MEGBESZÉLÉS

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy meggyőző eredményeink szerint krónikus pszichoszociális stressz során az agyi metabolitok *in vivo* mért koncentrációja a gyrus dentatus-ban a szemcsesejtek proliferációjának ütemével együtt csökken. A krónikusan stresszelt állatokban észlelt mindkét változás antidepresszáns kezeléssel kivédhető. Ugyanez a kezelés megelőzi azt a kisfokú (nem szignifikáns) zsugorodási trendet, melyet a hippocampusz volumenében krónikus stressz hatására észleltünk. Mindent egybevetve ezek az eredmények megerősítik és lényegesen bővítik azt az új teóriát, mely szerint a neuronális hálózatok sejtes és molekuláris szinten létező plaszticitásának pozitív előjelű védelme antidepresszáns hatású lehet.

4.4. Új típusú antidepresszáns kezelési stratégiák hatása a felnőttkori neurogenezisre

Ez az alfejezet azt a kérdést vizsgálja, hogy azok a terápiás beavatkozások, melyek potenciálisan új antidepresszáns kezelést jelenthetnek, vajon hasonlóképp stimulálják-e a felnőttkori neurogenezist, mint a hagyományos antidepresszív hatású gyógyszerek. Tettük ezt azért, mert a gyógyszerkutatásban nagy reményekkel tekintenek a felnőttkori neurogenezisre (DeCarolis and Eisch, 2010). Egyfelől felvetődött az az elképzelés, hogy az AN vizsgálata új, még fejlesztés alatt álló antidepresszívumok tesztelésére, validálására alkalmas módszer lehet. Másfelől elképzelhető az is, hogy vegyületek, melyeket célzottan arra fejlesztenek ki, hogy az AN-t stimulálják, egy merőben új típusú gyógyszer családot képviselhetnének a neuropszichiátriában. Szerencsés esetben ezek a szerek antidepresszív, illetve kognitív funkciókat javító hatással bírnának.

Mi két, új típusú kezelési stratégiát teszteltünk. Egyik egy fizikai terápiás beavatkozás, a transzkraniális magnetikus stimuláció (TMS), a másik pedig egy a neurokinin-1 receptor antagonisták családjába tartozó vegyület kipróbálása volt. Fel akartuk deríteni, hogy lehet-e vagy sem ezekkel a kísérleti fázisban lévő terápiás eljárásokkal ellensúlyozni a stressz AN-re gyakorolt gátló hatását.

4.4.1. Transzkraniális magnetikus stimuláció (TMS)

BEVEZETÉS

A TMS egy fizikai eljárás, mely az elektrokonvulzív terápia lehetséges non-invazív alternatívája. A baloldali prefrontális kéregre irányított, naponta ismételt TMS kezelést a depresszió leküzdésére először 1993-ban javasolták (Hoflich et al., 1993). Azóta számos állatkísérlet és klinikai vizsgálat tesztelte hatékonyságát és hatásmechanizmusát (George, 2010). Mi állatkísérleteket végeztünk, és e megközelítésnek a fő célja annak felderítése volt, hogy vajon mi lehet a TMS pontos hatásmechanizmusa. Ez ugyanis mindmáig tisztázatlan. Ennek az eljárásnak sok előnye van, mert a TMS biztonságos, non-invazív, fokális agyi ingerlésre alapozott beavatkozás, mely nem okoz epilepsziás görcsöket (mint az elektrokonvulzív terápia), stimuláló elektródák beültetésére nincsen szükség (mint a *deep brain stimulation* esetében), és nincsenek kölcsönhatási problémák más gyógyszerekkel, sem pedig szisztémás mellékhatások (mint a legtöbb antidepresszív gyógyszer esetében).

Ismereteink azonban még mindig hiányosak e kezelés azon celluláris és / vagy molekuláris hatásairól, melyek a klinikai hatékonyság hátterében rejlenek. Ezek felderítésére az állatkísérletek hasznos segítséget nyújthatnak. Korábbi pre-klinikai kutatások szerint bizonyos körülmények között a bal frontális agyi régió tartós TMS kezelése neuroprotektív hatásúnak bizonyult. Észrevették, hogy hosszabb ideig ismételt TMS a BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) és a cholecystokinin expresszálsát megváltoztatja. Ez a hatás hasonló azokhoz a korábban leírt effektusokhoz, melyeket az antidepresszáns gyógyszeres kezelés és / vagy elektrokonvulziós terápia esetén figyeltek meg (Post et al 1999; Müller et al 2000).

Saját munkánkban (Czéh et al., 2002) a TMS hatását vizsgáltuk a krónikus pszichoszociális stressz (*social defeat*) paradigmában és elemeztük a stressz hormonok, illetve az AN változását.

EREDMÉNYEK

Felnőtt hím patkányok TMS kezelése 18 napig tartott, 20 Hz-es ingerléssel, összesen 5400 stimulust adtunk le. A DG-ban képződő új neuronok számát a korábban ismertetett BrdU immunohisztokémiai eljárásunkkal kvantifikáltuk. Az AN két stádiumát vizsgáltuk: egyik a progenitor sejtek proliferációs aktivitása volt, a másik pedig az, hogy a kísérletes beavatkozások hogyan befolyásolták a BrdU-pozitív sejtek túlélésének arányát. A HPA-tengely aktivitásának jellemzése céljából az állatokban megmértük a plazma ACTH és kortikoszteron koncentrációit.

A következőket figyeltük meg: Várakozásunknak megfelelően, a krónikus stressz szignifikánsan növelte a vér a stressz-hormon szintjét és hatékonyan gátolta a neuronok képződését és túlélését a DG-ban (1. és 2. Ábra, Czéh et al., 2002). TMS kezelés hatására azonban a stressz hormonok koncentrációja a stresszelt állatokban normalizálódott (1. Ábra Czéh et al., 2002). Ezzel szemben a szemcsejst proliferáció redukciójának mértékét csak gyengén sikerült a TMS kezeléssel ellensúlyozni, miközben az újszülött neuronok túlélési aránya a TMS kezelés hatására tovább csökkent (2. Ábra Czéh et al., 2002).

MEGBESZÉLÉS

Ezekből az eredményekből azt a következtetést vontuk le, hogy a TMS kezelés klinikailag is megfigyelt antidepresszáns hatásában a HPA-tengely működésére kifejtett effektus játszhat szerepet. Ugyanakkor, várakozásainkkal ellentétben a TMS kezelés - az általunk alkalmazott kísérleti elrendezésben - nem volt képes normalizálni a stressz-indukálta hippokampális AN csökkenést. Így ez a mechanizmus valószínűleg nem játszik szerepet a TMS antidepresszáns hatásában. Említésre méltó, hogy egy japán kutatócsoport nemrég arról számolt be, hogy TMS megiscsak képes az AN-t serkenteni. Igaz, hogy ők csak kontroll (nem stresszelt) állatokat kezeltek TMS-val, és a paramétereik is egészen mások voltak, mert ők nagyobb tekercset használtak, magasabb frekvenciával ingereltek (25 Hz), és összességében majdnem háromszor annyi (14 000) stimulust adtak le mint mi (Ueyama et al., 2011). Lehetséges tehát, hogy a pozitív hatás kiváltása érdekében erős ingerlésre van szükség.

Ahogy azt a Bevezetés 1.3.1. fejezetében részletesen bemutattuk, számos faktor befolyásolja az AN aktuális mértékét. E faktorok közül az egyik legerősebb hatással a glukokortikoid hormonok rendelkeznek. Meglepő módon, e kísérletünkben a naponta alkalmazott TMS a stressz hormonok szintjét (így a plazma kortikoszteron szintjét is) normalizálta, ezzel szemben az AN előfordulása nem követte azt és nem rendeződött vissza. Hasonlót figyeltünk meg a 4.3.-as fejezetben bemutatott kísérletben is. Ott a tianeptin kezelés hatására az AN normalizálódott, míg a stressz hormonok szintje változatlanul magas maradt (Czéh et al., 2001, 2. Táblázat). Erre a paradoxonra mások is felfigyeltek (Schoenfeld and Gould, 2011). Nyilvánvalóan, egyrészt a tianeptin, másrészt a TMS nyilvánvalóan más reguláló pl. neurotrofikus faktorokra, vagy neurotranszmitterekre (mint pl. a szerotonin vagy glutamát) is hatott és ezek közös effektusa e kísérletek eredményei szerint a mellékvese kéreg glukokortikoid gátló hatásánál erősebbnek bizonyult (Schoenfeld and Gould, 2011).

Az idő távatában elgondolkodtató, hogy bár a mi kísérletünkben a TMS nem volt képes pozitívan stimulálni az AN-t, ugyanakkor antidepresszív hatása azóta már bebizonyosodott, és 2008-ban az US FDA engedélyezte a klinikai gyakorlatban való alkalmazását (George, 2010).

4.4.2. Neurokinin-1 (NK₁) receptor antagonisták

BEVEZETÉS

A Substance P és az NK₁ receptor-neurotransmitter rendszerről többen felvetették, hogy fontos szerepet játszhatnak az érzelmi reakciók szabályozásában, illetve az affektív zavarok patofiziológiájában (Mclean, 2005; Herpfer and Lieb, 2005; Czéh et al., 2006). A humán agyban is bőséges NK₁ receptor expresszió figyelhető meg (Rigby et al., 2005), mégpedig éppen azokban a régiókban, melyeket fontosnak tartunk mind az érzelmi, mind pedig a stressz reakciók szabályozásában. Sok, állatkísérletekből származó bizonyíték támasztja alá azt a feltevést, miszerint a szelektív NK₁ receptor antagonisták hatásos terápiát jelenthetnek a szorongásos megbetegedések bizonyos formáira és a depressziós hangulatzavarok kezelésére (Mclean, 2005; Herpfer and Lieb, 2005; Czéh et al., 2006). Mivel az NK₁ receptor antagonisták a fájdalom kutatásban is, mint lehetséges analgetikumok, ígéretes vegyületeknek számítottak, ezért sok NK₁ receptor antagonistát szintetizáltak, melyek egy része klinikai kipróbálás fázisában van, sőt némelyik már át is esett a klinikai tesztelés stádiumán és mint lehetséges antidepresszívum szerepel (Kramer et al., 1998, 2004; Mclean, 2005; Herpfer and Lieb, 2005; Czéh et al., 2006).

Mi az L-760,735 kódjelű molekula (Merck) hatását vizsgáltuk a mókuscickányok magatartására és a hippocampusz plaszticitására a krónikus pszichoszociális stressz paradigmában (van der Hart et al., 2002, 2005). Az L-760,735 a célzott preklinikai kutatás eszköze és az ismertebb MK-869 molekula szerkezeti analógja. Ez utóbbi molekula ígéretesen hatékonnak bizonyult egy randomizált, kettős vak, placebo-kontrollált, klinikai vizsgálatban (Kramer et al., 1998). Saját kísérletünkben, az L-760,735 központi idegrendszeri hatását hasonlítottuk össze a klinikai gyakorlatban jól bevált triciklikus antidepresszáns clomipramin (McTavish and Benfield, 1990) hatásával. Célunk az volt, hogy lehetőség szerint minél jobban utánozzuk a klinikai gyakorlatban alkalmazott antidepresszáns kezelés gyakorlatát. Ennek érdekében, a gyógyszerek adagolását csak akkor kezdtük el, amikor az állatok már egy teljes hete részt vettek a pszichoszociális stressz paradigmában, és ezáltal ekkorra bennük a stressz-indukálta elváltozások már meggyőzően kialakultak. A gyógyszereket, a klinikai gyakorlathoz hasonlóan orálisan adagoltuk, naponta, és a kezelések következményeit a klinikai gyakorlatban releváns 4 hetes időszakban követtük, miközben az állatok továbbra is részt vettek a pszichoszociális stressz paradigmában. A kísérlet végén NMR spektroszkópia segítségével vizsgáltuk néhány agyi metabolit *in vivo* koncentrációját (3.2. Ábra), és poszt-mortem meghatároztuk a hippocampusz volumenét valamint a szemcsesejt-proliferációt a DG-ban. E kísérlet célja annak eldöntése volt, hogy vajon az NK₁ receptorok szelektív blokkolása képes-e ugyanolyan hatást kiváltani, mint amelyet a már bevált triciklikus antidepresszívummal (clomipramin) el lehet érni.

EREDMÉNYEK

Az Eredmények 4.3. fejezetében leírt kísérletéhez hasonlóan mind a stressz, mind az antidepresszáns kezelés szignifikáns hatást gyakorolt az agyi metabolitok koncentrációjára, mely adatokat tanulmányunk ([van der Hart et al., 2002](#)) 1.sz Táblázatában foglaltuk össze. Az *in vivo* NMR spektroszkópiás mérés igazolta, hogy stresszelt állatokban az *N*-acetyl-aszpartát (NAA), kreatin és foszfo kreatin (Cr), valamint a kolin-tartalmú (Cho) komponensek koncentrációi szignifikánsan csökkentek, miközben a *myo*-inositol (Ins) a normális szinten maradt. A Stressz-csoporthoz viszonyítva a Stressz + L-760,735 állatokban az NAA, Cr és Cho metabolitok szintje a normális tartományban maradt, azaz hasonlított a Kontroll csoportból származó adatokhoz. A várakozásoknak megfelelően a stresszelt állatok clomipramin kezelése hasonló hatást eredményezett, vagyis az NAA, Cr és Cho szintek a normális tartományban maradtak. Továbbá szignifikánsan emelkedett Ins koncentrációt figyeltünk meg úgy L-760,735, mint clomipramin kezelés után.

Az agyi metabolitok változásához nagyon hasonló eredményeket hozott a stressz és antidepresszáns kezelés a DG-ban zajló sejtosztódásra és a hippocampusz térfogatára gyakorolt hatása is. Stressz hatására a BrdU-pozitív sejtek száma kifejezett (–45%-os) csökkenést mutatott. Ehhez képest a stresszelt állatok L-760,735 kezelése szignifikánsan magasabb BrdU-pozitív sejtszámot eredményezett a gyrus dentatus szemcsesejt rétegében. Hasonlóan, magasabb BrdU jelölt sejtszámokat kaptunk a Stressz + Clomipramin csoport egyedeiben is a csak stresszelt állatokhoz képest ([van der Hart et al., 2002](#) 4.Ábra). Ezek az eredmények bizonyítják, hogy mindkét szer képes a stressz AN-t gátló hatását kivédeni. Ezenkívül, a hippocampusz térfogata szignifikánsan (–14%-al) csökkent a Kontroll csoporthoz képest a stresszelt állatokban ([van der Hart et al., 2002](#) második táblázat). Stresszelt állatokban a kétféle antidepresszáns kezelés egymáshoz hasonlóan részben megakadályozta a térfogat csökkenést (Stressz + L-760,735: +10%; illetve Stressz + Clomipramin: +7% hippocampusz térfogat növekedés a nem kezelt, stresszelt állatokhoz képest) – ez a trend a kontroll csoport adataihoz hasonló értékeket eredményezett. A hippocampusz szemcsesejt réteg volumene nem különbözött az öt hétig stresszelt állatokban a stressz+antidepresszánsokkal kezelt állatok adataitól ([van der Hart et al., 2002](#) második táblázat). Ez a megfigyelés arra utal, hogy a stresszelt állatcsoportokban a gyrus dentatus-ban észlelt sejtosztódás csökkenése nem volt olyan kifejezett, hogy ez a szemcsesejt réteg térfogatát megváltoztatta volna.

További fontos adat, hogy az ugyanebben a kísérletben végzett magatartási vizsgálatok szerint a krónikusan stresszelt állatok több paramétere szignifikánsan változott, így pl. csökkent a lokomotoros aktivitásuk és a territoriális szagjelölő (*scent-marking*) magatartásuk is. Ezeket a stressz-indukálta magatartási változásokat a L-760,735 kezelés részben normalizálta ([van der Hart et al., 2005](#)).

Végül említésre méltó, hogy egy további a fentihez nagyon hasonló kísérletben, egy másik NK₁ receptor antagonist (SLV-323, Solvay) tesztelésekor nagyon hasonló eredményeket kaptunk ([Czéh et al., 2005a](#)).

MEGBESZÉLÉS

Összefoglalva, a mi kísérletünkben az NK₁ receptor antagonisták központi idegrendszerre kifejtett hatásprofilja nagyon hasonlított a jól bevált triciklikus antidepresszáns clomipramin hatásprofiljához.

A klinikai tesztekben a betegek az NK₁ receptor antagonistákat mindig nagyon jól tolerálták, sajnos azonban a kezdeti biztató elvárásokat később több kijózanító, a hatástalanságot bizonyító eredmény hűtötte le (McLean, 2005; Czéh et al., 2006; Keller et al., 2006). Ennek következtében a szkepszis felerősödött, és több nagy gyógyszergyár leállította erőteljes, már a végstádiumban lévő fejlesztési programját. Az NK₁ receptor antagonisták, éppúgy mint a fájdalom kutatásban, úgy tűnik most is kudarcot vallottak. A kutatás azonban napjainkban is folytatódik. Jelenleg a cél újabb rokon-molekulák kifejlesztése, melyek jobb farmako-kinetikai és farmako-dinamikai tulajdonságokkal rendelkeznek, és ezen tulajdonságaik remélhetően valós terápiás sikert eredményeznek. Egy további esély, hogy az NK₁ receptor antagonisták, melyek a depresszió (MD) kezelésére önmagukban alkalmatlanok, még mindig hatásosak lehetnek mint a más antidepresszívummal együtt alkalmazott kiegészítő terápia (McLean, 2005; Czéh et al., 2006). Szóba jöhetnek más pszichiátriai megbetegedések, mint pl. szorongásos problémák kezelésében (Furmark et al., 2005) vagy esetleg a PTSD-ben (*post-traumatic stress disorder*) szenvedő betegek esetében (Mathew et al., 2011).

4.5. A stressz-indukálta hippocampális térfogat csökkenés sejtszintű mechanizmusai: Okoz-e a stressz neuron pusztulást?

BEVEZETÉS

A klinikai, *in vivo* agyi képalkotó vizsgálatokban gyakorta megfigyelhető a hippocampusz térfogatának szelektív csökkenése azon betegség csoportokban, melyek háttérében súlyos és / vagy krónikus stressz áll. Közismert tünet az agysorvadás, mely pl. az előrehaladt életkor, kóros pl. hypoxiás állapotok, vagy neurodegeneratív kórképek gyakori melléktünete és az agy egészét érinti, de különösen szembetűnő a neokortex kéregállományában. Az alábbiakban természetesen nem ezt a generalizált agysorvadást elemezzük, hanem kizárólag a limbikus struktúrákra, leginkább a hippocampuszra szorítókozó, szelektív térfogat csökkenéssel foglalkozunk. Ez a szelektív hippocampusz zsugorodás olyan betegségekben érvényesül, melyek közös vonása a súlyos, vagy hosszan tartó stressz, illetve az arteficiálisan magas a plazma glukokortikoid szint: pl. MD, PTSD (*post-traumatic stress disorder*), Cushing szindróma, tartós szintetikus glukokortikoid kezelés (pl. immunosuppresszív terápia kapcsán), vagy egyszerűen maga a krónikus stressz (Starkman et al., 1992; Bremner et al., 1997; Sapolsky, 2000; Sheline, 2000; Campbell et al., 2004; Videbech and Ravnkilde, 2004; Bremner, 2007; Gianaros et al., 2007).

Mindmáig nem ismert, hogy milyen sejtszintű elváltozás(ok) áll(nak) e térfogat változás mögött (Czeh and Lucassen, 2007). A tradicionális elképzelés szerint a fenti betegségekben a hippocampusz térfogat csökkenésének oka a glukokortikoidok neurotoxikus hatása (Sapolsky, 2000; Conrad, 2008). Ez a teória a nyolcvanas években született, amikor ezt a kérdést először kezdték behatóbban vizsgálni. Akkor megjelent több tanulmány, melyek súlyos stressznek kitett állatokban a hippocampusz CA1 és CA3 szubrégióiban fellépő neuron pusztulást dokumentáltak (Sapolsky, 1985, 2000; Sapolsky et al., 1985, 1988, 1990; Conrad, 2008). Ezeket az eredményeket később, a kilencvenes évek végén, és az ezredforduló tájékán több tanulmány újra megvizsgálta, azonban a stressz-indukálta neuron pusztulást egyik sem tudta reprodukálni. A kritikai utánvizsgálatot egyrészt az időközben kifejlesztett újabb módszerek (pl. precízebb sejtszámolási eljárások, illetve szenzitívebb szövettani technikák) indokolják, másrészt az adatgyűjtés megismétlése során célszerűnek látszik a korábbiaknál szigorúbb kontrollált kísérleti körülményeket használni. Mi is ezt tettük és a két alább ismertetendő tanulmány egyikében azt vizsgáltuk, vajon emelkedik-e a sejtpusztulás, vagyis az apoptotikus sejtek száma a több hetes szociális stressznek kitett mókuscickányok hippocampuszában (Lucassen et al., 2001). Később ugyanezt a problémát tovább vizsgáltuk és ellenőriztük, hogy vajon antidepresszáns kezelés befolyásolni képes-e a stressz-indukálta apoptózist felnőtt mókuscickányok hippocampuszában és temporális kérgében (Lucassen et al., 2004). Kérdésünk az volt, vajon az apoptózis útján pusztuló sejtek tömege magyarázhatja-e vagy sem az észlelt hippocampális volumen redukciót.

EREDMÉNYEK

Kísérleteinkben az apoptózis kimutatására az úgynevezett *in situ end labelling* (ISEL) technikát alkalmaztuk. Az ISEL technika segítségével azonosítani tudtuk a ritkán előforduló, de egyértelműen jelölődött sejteket az összes vizsgált állat hippocampális és kortikális régióiban (Lucassen et al., 2001, 2. Ábra). Ez a technika ugyan megbízhatóan

felismeri az agyszövetben az apoptotikus sejteket, de nem talál belőlük sokat. Ennek a legfőbb oka az, hogy a sejtek gyorsan keresztül mennek az apoptózis stádiumain, emiatt meglehetősen rövid az az időtartomány, amikor az apoptózisban levő sejtek kimutathatóak. Ebben a kísérletben négy héten keresztül naponta stresszelt mókuscickányok hippocampusát és temporális kérgét vizsgáltuk és hasonlítottunk össze egészséges, nem stresszelt állatokéval. Meglepetésünkre a hippocampusz egészét tekintve az apoptotikus sejtek számának szignifikáns csökkenését találtuk a stresszelt csoportban, miközben az entorhinális kéregben krónikus stressz növelte az apoptotikus sejtszámot (Lucassen et al., 2001, 3. Ábra). A hippocampusz CA1 area, *stratum radiatum*-ában (mely térfogatiilag a legnagyobb régió a hippocampuszon belül) az apoptotikus sejtek száma szignifikánsan csökkent, míg a hilusban az ilyen sejtek száma növekedett (Lucassen et al., 2001, 3. Ábra). A sejtpusztulás a CA1 area *stratum oriens* rétegében és a CA3 area piramis sejt rétegében (*stratum pyramidale*) csupán gyenge (nem is szignifikáns) sejtszám csökkenést mutatott. A CA1 piramis sejtek rétegében apoptózis nyomait ezzel a technikával nem is észleltük és a CA3 piramis sejtek rétegében – ahol a leginkább számítottunk az apoptózis növekedésére –, szintén csökkent az apoptotikus sejtek száma. Bár ez a csökkenés jelentős mértékű volt, a nagy individuális szórás miatt nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét.

A második kísérletben ugyanezt a problémát tovább vizsgáltuk és ellenőriztük, vajon az antidepresszáns kezelés képes-e a stressz-indukálta apoptózist befolyásolni. Szokás szerint négy kísérleti csoportot vizsgáltunk (3.2. Ábra): Kontroll, Kontroll + Antidepresszáns (Tianeptine) kezelés, Stressz, Stressz + Antidepresszáns (Tianeptine) kezelés. Az apoptózis kimutatására ismét a megbízható ISEL technikát használtuk. Ezzel a módszerrel nyert adatok szerint az apoptotikus sejtek száma igen alacsony, metszetenként egy-egy régióban átlagosan 4-6 ISEL-pozitív sejtet láttunk jelentős egyedi szórásokkal (Lucassen et al., 2004, 2. Ábra). Egybehangzóan az előző kísérlet adataival, a temporális és entorhinális kéregben az apoptotikus sejtek gyakrabban fordultak elő, mint a hippocampuszban. A temporális kéregben a stressz növelte az apoptotikus sejtek számát (Lucassen et al., 2004, 5. Ábra) míg a tianeptin kezelés egyértelmű anti-apoptotikus hatást mutatott úgy a stresszelt mint a nem stresszelt állatokban (Lucassen et al., 2004, 5.A Ábra). Az Ammon szarvi CA1 és CA3 régióik egyes rétegeinek (*strata radiatum, pyramidale, oriens*) célzott analízise nem tárt fel statisztikailag szignifikáns eltéréseket. Ugyanakkor azonban az Ammon szarv rétegeinek és régióinak összesített adatai szerint stressz hatására az ISEL pozitív sejtek aránya szignifikánsan csökkent, míg a tianeptin kezelés semmiféle szignifikáns eltérést nem okozott egyik csoportban sem (Lucassen et al., 2004, 5.B Ábra). A DG szemcsesejt rétegében a stressz enyhén fokozta az apoptotikus sejtek számát (+30%, nem szignifikáns), miközben a tianeptin kezelés hatására az apoptotikus sejtek száma csökkent úgy a Kontroll + Tianeptin, mint a Stressz + Tianeptin csoportban (Lucassen et al., 2004, 5.C Ábra). A gyrus dentatus szub-granuláris rétegében (ahol az új szemcsesejtek képződnek) stressz hatására nem változott az apoptotikus sejtek száma, míg a tianeptin kezelés hatására az apoptotikus sejtek populációja szignifikánsan csökkent úgy a Kontroll + Tianeptin, mint a Stressz + Tianeptin csoportban (Lucassen et al., 2004, 5.D ábra).

Mivel az ISEL technika semmilyen információt sem nyújt arra vonatkozóan, hogy a pusztuló sejtek neuronok avagy más fenotípusú sejtek, ezért fontos legalább annak a felderítése, hogy az apoptotikus egyedek többsége eredetileg glia avagy idegsejt volt vagy sem. Erre a célra az ISEL leletek mellé az úgynevezett Fluoro-Jade

(FJ) sejt-degenerációs markerrel próbáltuk meghatározni az apoptotikus sejtek eredeti fenotípusát.

A sejtek identitását eredetileg kettős (Neu-N, stb) immunofluoreszcens festéssel próbáltuk meghatározni, de ez gyakorlatilag lehetetlennek bizonyult az alábbi okok miatt: 1) A pusztulás stádiumában lévő sejtek bomlásuk során fokozatosan elveszítik a fenotípusukra jellemző fehérje markereiket, 2) számuk az általunk használt állatmodellben amúgy is nagyon alacsony, 3) az ISEL protokollban használatos protenáz K kezelés feltehetően elemésztí a szokásos glia és neuron fehérje markereket. Ezért tértünk át a Fluoro-Jade B (FJ) festésre. A Fluoro-Jade B festési eljárás segítséget nyújt az apoptózis útján elpusztult sejtek fenotípusának azonosítására, mert Schmued and Hopkins (2000) szerint az FJ egy olyan anionos fluoreszcens származék, mely általában csakis a neuronok pusztulása során keletkezik és több állatfaj idegrendszerének vizsgálatában egyaránt jól bevált marker. Pozitív kontrollként adrenalektomizált patkányokból származó hippocampusz metszeteket használtunk, mivel ismert, hogy adrenalektómia után a neuronok pusztulása jelentősen növekszik (Lucassen et al., 2004, 3.A Ábra). Ezt észleltük is, de ezzel szemben a stresszelt mókuscickányokban csak kevés FJ-pozitív profilt láttunk (Lucassen et al., 2004, 3.C Ábra). A FJ-pozitív sejtek ritka előfordulása jól illeszkedik az ISEL technikával kapott leletekhez. Alkalmanként találtunk jelölt sejteket a DG szemcsesejt rétegében vagy az agykéregben, de szinte egyet sem a *Cornu Ammonis*-ban. A FJ pozitív sejtek ritka előfordulása miatt – összesen 10 FJ-pozitív sejt 36 metszetben – a négy állatcsoportból származó minták bármiféle statisztikai összehasonlítása értelmetlen lett volna.

MEGBESZÉLÉS

E kísérletnek az eredményei nem támogatták azt a koncepciót, miszerint a krónikus stressz a hippocampuszban növeli a sejtpusztulás mértékét. Hangsúlyoznunk kell, hogy ebben a kísérletben csupán egyetlen időpontban (4-5 hetes stresszelés után) vizsgáltuk az apoptotikus sejtek számát. Ezek az eredmények semmilyen információt nem adnak arra vonatkozóan, hogy mi történt a stresszelés első heteiben. Elvileg nem kizárt, hogy egy korábbi időpontban jelentős mértékű sejtpusztulás történt, vagy az is lehetséges, hogy ha tovább folytatjuk az állatok stresszelését, akkor láttunk volna jelentősebb sejtpusztulásra utaló jeleket.

A második kísérlet legfőbb eredménye az volt, hogy kiderült, a tianeptin kezelés anti-apoptotikus hatású, mind a stresszelt, mind pedig a csak gyógyszerrel kezelt kontroll állatok temporális agykérgében. Továbbá FJ analízis használatával megállapíthattuk, hogy csak nagyon kevés pusztuló neuron akad a hippocampuszban 5 hetes stressz után. Vagyis 5 hét stressz után az apoptotikus sejthalállal pusztuló sejtek többsége gliasejt és nem neuron. Így ezek az eredményeink nem támogatják azt a tradicionális felfogást, mely szerint krónikus stressz hatására a neuronok nagy számban pusztulnak.

AZ ITT BEMUTATOTT KÍSÉRLETEKBEN HASZNÁLT MÓDSZEREK

In Situ End Labeling (ISEL)

Az ISEL festés elve hasonlít a terminális transzferáz mediált *nick end* jelöléshez. Az ISEL jelölést, korábban leírt módszerünk szerint végeztük (Lucassen et al., 1995, 1997). A különböző kísérleti csoportból származó mintákat mindig egyszerre, egymással párhuzamosan processzáltuk, hogy az esetleges festési műtermékeket kiküszöböljük. Paraffinba beágyazott blokkokat metszettünk. A metszetek deparaffinálására xylen szolgált, majd 50%-os etanol és desztillált víz keverékkel hidratáltunk, ami után proteináz K (PK)-pufferben (10 mmol/L Tris/hydrochloride [HCl], 2.6 mmol/L kalcium klorid [CaCl_2]; pH 7.5) 10 perces előemésztés következett. Ezután további 15 percig, szobahőn inkubáltunk PK (Sigma) 20 $\mu\text{g/mL}$ koncentrációs oldatában. Háromszor 5-5 perces desztillált vizes mosás után újabb inkubációt alkalmaztunk a következő oldatban: terminal deoxynucleotidyl transzferáz (TdT) puffer (0.2 mol/L nátrium kakodilát, 0.025 mol/L Tris/HCl, és 0.25 mg/mL borjú szérum albumin [BSA]; pH 6.6) összesen 15 percre, szobahőn, majd 60 percre 37°C fokon. Ezután a metszetek egy újabb reagens oldatba kerültek: 0.1 μL TdT (Boehringer Mannheim) per 100 μL hatóanyag, 1.0 μL biotin-16-dUTP (Boehringer Mannheim) per 100 μL hatóanyag és kobalt klorid (25 mmol/L; 5% a végső oldatmennyiségre számolva).

A jelzett oligonukleotidok további beépülését gyors öblítéssel (desztillált víz és PBS) állítottuk le. Az endogen peroxidáz aktivitást 0.3 % hidrogén peroxid (H_2O_2) PBS oldatával gátoltuk, aztán pedig a metszeteket újra mostuk és pre-inkubáltuk PBS+1%BSA oldattal. A következő lépés, egy újabb inkubáció, peroxidáz konjugált avidin oldatban (1:1000, ABC-Elite Kit; Vector Laboratories) egy éjszakára 4°C fokon. Másnap újabb PBS mosás után a metszetek 0.5 mg/mL di-amino-benzidine (DAB, Sigma) 0.05 mol/L Tris/HCl (pH 7.5) 0.02% H_2O_2 keverékébe kerültek 10 percre mielőtt a két végső desztillált vizes mosásra került sor. Halvány metil-zöld kontraszt festés majd lefedés zárta a kezelést. Az ISEL reakció pozitív kontrolljaként minden egyes festéskor együtt futtattunk néhány olyan metszetet is, melyek patkány prosztatából 3 nappal a kasztráció után készültek, amikor jellemzően igen magas az apoptotikus sejtek száma.

Az ISEL módszerrel kapott adatok kiértékelése

Kizárólag olyan ISEL pozitív profilokat vettünk figyelembe, melyekben az apoptózis egyéb jelei is meggyőzően felismerhetők voltak. A következő kritériumokat használtuk: Izoláltan jelölt sejt, barna DAB precipitátum, mint a jelentős DNA fragmentáció tünete, erős kromatin reorganizáció, nyilvánvaló sejt és sejtmag kondenzáció, piknózis vagy pedig apoptotikus sejttest (Lucassen et al., 2004, 2. Ábra). Kritériumainknak megfelelő ISEL pozitív sejteket találtunk a hippocampusz következő részeiben: a gyrus dentatus szemcsesejt és molekuláris réteg, (GCL), szub-granuláris zóna (SGZ), hilus, az Ammon szarv (*hippocampus proper*) *stratum radiatum*, a piramis sejt réteg, a *stratum oriens* valamint a szomszédos entorhinális kortex illetve a temporális kortex közeli részei.

Kvantitatív kiértékelés: Az ISEL technikával jelölt metszeteket először kóddal láttuk el, így a kiértékeléskor ismeretlen volt, hogy milyen kezeléssel átesett állatból származnak. Az ISEL-pozitív sejtek számolását a sztereológiai sejtyszámlálás kritériumainak megfelelően végeztük. Minden egyes állatból, a teljes sorozat minden 25.-ik metszetét analizáltuk (ez átlagosan 8 metszet / állat), melyek egymástól 250 mikron távolságban voltak és a hippocampusz teljes rosztro-kaudális terjedelmét lefedték. Az apoptotikus sejteket módszeresen kerestük minden egyes metszetben 400x és 1000x nagyításban. A számolt értékek huszonötszörösét vettük és a szubrégiók illetve az egyes állatok szerint átlagoltuk.

Fluoro-Jade (FJ) festés

A Fluoro-Jade B egy olyan marker, mely a degenerálódó neuronokat mutatja ki, viszont más sejttypust nem jelöl, így segítséget nyújt a degenerálódó sejtek fenotípusának meghatározásában (Schmued and Hopkins, 2000). Affinitása a neuron minden egyes részletéhez magas, ezért a sejttest és a dendritok mellett az axont is megjelöli. Korábban végzett vizsgálatunkban jó átfedést találtunk az FJ festett és az ISEL pozitív sejtek megoszlásában, egy olyan epilepszia állatmodellben, melyben masszív hippocampális degenerációt idéztünk elő (Gorter et al., 2003). A FJ B nem festi meg sem az egészséges neuronokat, sem a neuropil egészséges részeit, sem a myelin hüvelyt, sőt a vaszkuláris elemeket sem.

A módszer rövid leírása: az irodalomban korábban közölt eljárást alkalmaztuk (Schmued and Hopkins, 2000; Gorter et al., 2003). Pozitív kontrollként a teszt metszetekkel párhuzamosan mindig festettünk olyan metszeteket is, melyekben biztosan nagyszámú apoptotikus neuront lehet találni. Ilyen szövet például az olyan gyrus dentatus metszet, melyet 3 nappal az adrenalectomia után leölt állatokból készítettünk. Ez a beavatkozás (adrenalectomia) közzismerten erőteljes apoptózist okoz (Sloviter et al 1993). A tárgylemezre terített paraffinos metszeteket xylen oldatban deparaffináltuk, majd 3 percre abszolút és újabb 1 percre 70 százalékos alkoholban hidratáltuk. A metszetek ezután kálium permanganát oldatba (0.06%) kerültek 15 percre, majd 1 perces desztillált vizes mosás következett. Ezután jött a festés fő mozzanata 0.001 százalékos Fluoro-Jade (Histo-Chem Inc, Jefferson, Arkansas, USA) oldatban, melyet 0.1 százalékos ecetsavban készítettünk. A metszeteket vizes öblítés után a tárgylemezre szárítottuk (37°C fokon), aztán xylen és Vectashield fedés (Vector Laboratories) következett. A hippocampális régiók alapos átvizsgálása x40 illetve x100 objektívekkel történt konvencionális fluoreszcens mikroszkóp segítségével, majd ezt követően a jelölt sejteket tartalmazó metszeteket egy Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss, Jena, Germany) konfokális laser-scanning mikroszkóppal is átvizsgáltuk (Plan-Neofluar 100x/1.3-olajos objektív lencse).

4.6. Milyen egyéb sejtszintű mechanizmusok csökkentik a stressz kapcsán a hippocampusz térfogatát? Számolhatunk-e a glia sejtek vagy a kapillarizáció redukciójával?

GLIA - BEVEZETÉS

Ahogy azt a 4.5. fejezetben bemutatott munkánk is bizonyítja, a hippocampusz térfogat csökkenésének hátterében nem a neuronok pusztulása áll. Mivel ezt számos egyéb kísérleti eredmény is alátámasztja, ezért a további kísérleteinkben a többi sejt típusra koncentráltunk. Az agy szövetében a neuronokon kívül gliasejtek fordulnak elő nagy számban, illetve a vaszkularizáció képvisel jelentős tömeget. Ezért azt vizsgáltuk, vajon a krónikus stressz érinti-e az asztrocitákat, illetve a hippocampusz kapillarizációját.

Az első kísérlet célja az volt, hogy ellenőrizzük, vajon az asztrociták száma változik-e (Czéh et al., 2006). Tankönyvi adatok szerint a gliasejtek száma jóval meghaladja a neuronokét, pl. Kandel (2000) szerint 10-50x több a gliasejt, mint a neuron. A frissebb (és precízebb) sejtszámolási adatok szerint ez az arány jóval kisebb, így az emberi hippocampuszban a neuron : glia arány 1:1.3 – 1:1.5 (Pelvig et al., 2008). Vagyis a gliasejtek az eredeti elképzelésekhez képest jóval kevesebben vannak, de a hippocampusz szövetében mégis jelentős térfogatot foglalnak el. Mi több okból úgy döntöttünk, hogy elsőként az asztrocitákkal foglalkozunk: 1) mert ezek a leggyakoribb gliasejtek 2) könnyen és egyértelműen azonosíthatók a GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) antitesttel; 3) ma már nyilvánvaló, hogy az általános gliasejt funkciók (*housekeeping*) mellett az asztrociták a szinaptogenezis, a szinaptikus határfok és a felnőttkori neurogenesis dinamikus regulátorai (Goldman, 2003; Horner and Palmer, 2003; Nedergaard et al., 2003; Newman, 2003; Slezak and Pfrieder, 2003). Több poszt-mortem szövettani vizsgálat bizonyítja a gliasejtek számának redukcióját depressziós betegekben (Öngür et al., 1998; Rajkowska, 2000; Cotter et al., 2001a, 2002; Rajkowska and Miguel-Hidalgo, 2007). Ezekre az eredményekre alapozva született meg egy hipotézis, mely szerint a gliasejtek funkciózavara fontos szerepet játszik az affektív zavarok patogenezisében (Coyle and Schwarcz, 2000; Cotter et al., 2001b).

Akkor, amikor mi ezt a kísérletet elvégeztük, még nem létezett más olyan tanulmány, mely krónikusan stresszelt kísérleti állatokban elemezte volna a gliasejtek számszerű változását. Ezért kezdtük el vizsgálni, hogy vajon a tartós pszichoszociális stressz megváltoztatja vagy sem a gliasejtek számát. A stressz hatásán kívül arra is kíváncsiak voltunk, vajon az antidepresszáns kezelés hat-e az asztrociták számára. Ezért a mókuscickányokat fluoxetinnel kezeltük, mely egy a klinikumban jól ismert szelektív szerotonin reuptake gátló (SSRI) szer (Stokes and Holtz, 1997). Ezenkívül bizonyított az is, hogy a fluoxetin közvetlenül hat az asztrocitákra (Schipke et al., 2011). Munkánkban a hippocampusz GFAP immunopozitív sejtjeinek számát és morfológiáját vizsgáltuk tartós stressz és antidepresszáns kezelés után (3.2. Ábra).

GLIA - EREDMÉNYEK

A mókuscickányok hippocampuszának anti-GFAP jelölése után az immunjelölődés intenzitásának markáns különbségét figyeltük meg, mégpedig a stresszelt állatokban mutatkozott a jelölődés szemmel láthatóan gyengébbnek (Czéh et al., 2006, 3. Ábra). Ennek hátterében valószínűleg a GFAP protein expressziójában létrejött különbségek állhattak. Mi azonban a GFAP-pozitív sejtek számára voltunk kíváncsiak és a sztereológias sejtszámlálás után azt találtuk, hogy a krónikus stressz szignifikánsan,

25%-al csökkentette a GFAP-immunopozitív sejtek számát (Czéh et al., 2006, 1. Táblázat és 4A Ábra). Ezzel szemben, a fluoxetinnel kezelt (és stresszelt) állatokban a GFAP-pozitív sejtek száma alig csökkent. Másszóval a csak stresszelt állatok és a stressz + fluoxetinnel kezelt csoport között a GFAP-pozitív asztrociták száma szignifikánsan különbözött a fluoxetin kezelés protektív hatásának köszönhetően (Czéh et al., 2006, 1. Táblázat és 4A Ábra). Ezzel szemben a kontroll és kontroll + fluoxetinnel kezelt állatok között nem volt eltérés, vagyis a nem stresszelt állatokban a fluoxetin kezelés nem változtatta meg a GFAP-pozitív asztrociták számát (Czéh et al., 2006, 1. Táblázat és 4A Ábra). Hogy további információt nyerjünk a GFAP-pozitív sejtek morfológiájáról, módszeresen megmértük azok sejttestének nagyságát is. Ennek eredményeként azt találtuk, hogy mind a stressz mind a fluoxetin kezelés csökkentette a GFAP-pozitív sejtek számájának méretét, mi több e két kezelés hatása összeadódott (4B Ábra és 1. Táblázat, Czéh et al., 2006). Továbbá, ezekben az állatokban is enyhe, 5%-os (nem szignifikáns) hippocampusz térfogat csökkenést észleltünk a krónikus stressz eredményeként (5A Ábra, Czéh et al., 2006). Ez az adat annyiban érdekes, hogy a korreláció analízis szignifikáns összefüggést mutatott a hippocampusz térfogata és az asztrociták száma között, éppúgy mint a hippocampusz térfogata és az asztrociták sejttestének térfogatai között (5B and C Ábrák, Czéh et al., 2006).

GLIA - MEGBESZÉLÉS

Az irodalomban elsőként közzétett adatokat a krónikus stressznek és az antidepresszáns kezelésnek az asztrociták számbeli és morfológiai változásaira gyakorolt hatásairól. Bemutattuk, hogy tartós stressz után szignifikánsan kevesebb asztrocitát látni, és hogy a stressznek ezt a hatását fluoxetin kezelés blokkolni képes. Továbbá mind a stressz, mind a fluoxetin kezelés csökkentette a GFAP-immunopozitív sejttestek térfogatát és e két kezelés hatása összeadódott. Szintén megfigyeltük, hogy a hippocampusz térfogata egyenes arányban korrelál az asztrociták számával és a sejttestek méretével. Ezek az eredmények ugyan „csak” morfológiai adatok, melyeknek azonban szükségszerű funkcionális következményei is vannak, hiszen ismert, hogy az asztrociták a szinaptogenezis és a szinaptikus határfok dinamikus regulátorai, ezért az asztrociták számbeli és morfológiai eltérései a glia–neuron, és ezen keresztül végső soron a neuron–neuron kommunikációra is minden bizonnyal kihatnak.

KAPILLARIZÁCIÓ - BEVEZETÉS

A második kísérletben azt vizsgáltuk, hogy vajon a krónikus stressz megváltoztatja-e a patkány hippocampusz kapillarizációját (Czéh et al., 2010). Az irodalomból jól ismert az a tény, hogy a hippocampusz kifejezetten sérülékeny olyan inzultusokkal szemben, mint az epileptiform aktivitás, hypoxia-ischemia illetve hypoglikémia, továbbá ismert az is, hogy ha valamilyen stressz hatás megelőz egy ilyen inzultust vagy társul hozzá, akkor a károsító hatás még kifejezettebb (Lee et al., 2002; Conrad et al., 2004, 2007; McDonald et al., 2008). Az azonban tisztázatlan, hogy a stressz pontosan milyen mechanizmus útján súlyosbítja ezeknek az inzultusoknak a neuronokra gyakorolt hatását. Egyik lehetséges magyarázat az, hogy a stressz a fokozottan felszabaduló glukokortikoidok révén csökkenti a neuronok regenerációs kapacitását (Sapolsky, 1996; Lee et al., 2002; Conrad et al., 2007). Egy másik, eddig nem vizsgált lehetőség az, hogy a stressz a hippocampusz vérellátását gátolja, és ezáltal fokozza annak további

inzultusokkal szembeni sérülékenységet. Ez utóbbi elképzelést támogatja pl. az a funkcionális vizsgálat, mely szerint kísérleti patkányokban 12 héten át tartó krónikus stressz csökkentette az agyi vérátáramlást (Endo et al., 1999). Mikor mi ezt a vizsgálatot elvégeztük, még nem létezett az irodalomban arra vonatkozó morfometriás adat, hogy krónikus stressz hogyan hat a hippocampusz kapillarizációjára.

Munkánkban a krónikus szociális stressz (*social defeat*) paradigmát használtuk, ezúttal felnőtt hím patkányokban, mivel úgy tűnik ez a paradigma patkányokban is beválik mint a depresszió-állatmodellje (Rygula et al., 2005, 2008; Becker et al., 2008). A konkrét kérdésfelvetésünk az volt, hogy vajon a krónikus stressz és antidepresszáns kezelés képes-e a vaszkularizáció olyan elváltozását okozni, melyet poszt mortem kvantitatív szövettani eljárással detektálni lehet. Antidepresszáns kezelésként ismétcsak fluoxetint használtunk. Azt az elképzelésünket, hogy antidepresszáns kezelés változtathat a kapillárisok számán, azok az irodalmi adatok támogatták, melyek szerint az elektrokonvulzív kezelés patkányokban stimulálja az angiogenezist a hippocampuszban (Hellsten et al., 2005; Newton et al., 2006).

Kitüntetett figyelemben részesítettük a gyrus dentatus szubgranuláris zónájának mikrovaszkularizációját. Ezt azért tettük, mert ebben a zónában történik a felnőttkori neurogenesis, és a kapillárisoknak különösen fontos szerepe van annak a mikrokörnyezetnek a kialakításában, mely ezt a folyamatot szabályozza (*vascular niche*) (Palmer et al., 2000; Heine et al., 2005). Mint azt a korábbi fejezetekben már taglaltuk, a stressz gátolja a felnőttkori neurogenézist, és ismert az is, hogy a stressznek ez a negatív hatása különösen feltűnő a kapillárisok közvetlen szomszédságában zajló sejtprolifерációra (Heine et al., 2005). Továbbá ismert az is, hogy az antidepresszáns kezelés ugyanebben a zónában nem csak a felnőttkori neurogenézist stimulálja, hanem a VEGF (*vascular endothelial growth factor*) expresszióját is (Dranovsky and Hen, 2006; Warner-Schmidt and Duman, 2007). Mindezek alapján feltételeztük, hogy ebben a zónában mind a stressz, mind az antidepresszáns kezelés hatással lesz a kapillárisok számára.

KAPILLARIZÁCIÓ - EREDMÉNYEK

A krónikus stressznek alávetett patkányok a típusos magatartás-fiziológiai tüneteket produkáltak, vagyis csökkent a lokomotoros és exploratív aktivitásuk, szukróz preferenciájuk, testsúly növekedésük lelassult, alacsonyabb lett a vérük tesztoszteron szintje, miközben a mellékvesekéreg súlya megnőtt (Rygula et al., 2006). Ugyanezekből az állatokból származó szövettani eredmények bizonyították egyrészt, hogy a krónikus stressz szignifikánsan csökkentette a felnőttkori neurogenesis mértékét a gyrus dentatus-ban (Czéh et al., 2007), másrészt azt is, hogy a fluoxetin kezelés normalizálta a stressz-indukált effektusok többségét (Rygula et al., 2006; Czéh et al., 2007).

A megfelelő szövettani eljárást követően a hippocampusz minden régiójában sűrűn elágazódó RECA-1 (*rat endothelial cell antigen-1*) immunopozitív kapilláris hálózatot lehet látni (2. Ábra, Czéh et al., 2010). A szubgranuláris zónában is számos kapilláris látszik, melyek lefutása nagyrészt követi a szemcsesejt réteg és a szubgranuláris zóna határvonalának irányát, de csak kevés ér hatol be a szemcsesejtek közé. A kvantitatív szövettani eredményeink igazolták, hogy stressz hatására a kapillárisok száma, a hippocampusz mindhárom fő régiójában (DG, CA2-3, CA1) azonos mértékben csökkent, és ezt a fluoxetin kezelés nem befolyásolta (3. Ábra, Czéh

et al., 2010). A stressz a szubgranuláris zóna mikrovaskularizációjára is hasonló hatást gyakorolt (4. Ábra, Czéh et al., 2010).

Analízisünk során azt is összehasonlítottuk, vajon a hippocampusz dorzális és ventrális régiói között van-e különbség. Ugyanis irodalmi adatok bizonyítják, hogy a krónikus stressz és az antidepresszáns kezelés a ventrális hippocampuszban fokozottabb mértékben hat a felnőttkori neurogenesisre (Jayatissa et al., 2006, 2008). Eredményeink szerint ugyan a dorzális hippocampusz szubgranuláris zónájának érhalózata sűrűbb, de a stressz, illetve az antidepresszáns kezelés szempontjából nem találtunk eltérést a dorzális és ventrális hippocampusz szubgranuláris zónái között (4. Ábra, Czéh et al., 2010).

Várakozásunkkal ellentétben a fluoxetin kezelés semmilyen hatással sem volt a hippocampusz kapilláris hálózatára, pedig több irodalmi lelet sugall efféle indirect effektust. Ugyanis ismert, hogy több növekedési faktor szintje emelkedik antidepresszáns kezelést követően, így pl. a *fibroblast growth factor-2* (FGF-2, Mallei et al., 2002), a *vascular endothelial growth factor* (VEGF, Warner-Schmidt and Duman, 2007), és a *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF, Duman and Monteggia, 2006). Ugyanakkor ezek a trófikus faktorok mind egyformán stimulálják úgy az angiogenezist mint a felnőttkori neurogenesiszt. Ismert továbbá az is, hogy lithium kezelés után helyreáll a stressz-indukált VEGF expresszió csökkenés a hippocampuszban (Silva et al., 2007). Az itt bemutatott eredményeink szerint a fluoxetin nem hat a hippocampusz kapilláris hálózatára és így kizárható, hogy ezen keresztül stimulálja a felnőttkori neurogenesiszt.

KAPILLARIZÁCIÓ - MEGBESZÉLÉS

Munkánk demonstrálja, hogy a krónikus pszichoszociális stressz a kapilláris hálózat kvantitativ változását okozza a hippocampuszban. E változás lényege a kapilláris ágak számszerű csökkenése és ez egyformán érvényes minden régióra. Ezt a stressz-indukált morfológiai elváltozást az antidepresszáns fluoxetin kezelés nem befolyásolta. Hasonló stressz hatást figyeltük meg a szubgranuláris zónában is. Ebben a zónában a kapillárisok kulcsszerepet játszanak a felnőttkori neurogenesisz mikrokörnyezetének kialakításában (*vascular niche*). A stressz-indukált kapillarizáció csökkenés egyforma mértékű volt a dorzális és a ventrális hippocampuszban és a fluoxetin kezelés egyikben sem hatott. E munkánk az irodalomban elsőként számolt be a hippocampális mikrovaskularizáció stressz-indukálta redukciójáról.

Napjainkban már kiterjedt irodalma van azoknak a megfigyeléseknek, melyek mind azt bizonyítják, hogy a különféle típusú erőteljes vagy épp krónikus stressz szignifikánsan megváltoztatja a hippocampusz neuronjainak integritását és funkcionális kapacitását (McEwen, 2000, 2006, 2007). Mindezidáig azonban az ezt vizsgáló tanulmányok szinte mind a neuronokkal foglalkoztak, és céljuk azok morfológiai, számbeli és funkcionális változásainak leírása volt (Czéh and Lucassen, 2007; Joëls et al., 2007). A neuronok normális működésének feltételeit megteremtő gliasejtek és vaszkularizáció viszonyai e vizsgálatokból teljesen kimaradtak. A krónikus stressz során tartósan megemelkedett glukokortikoid szint több szempontból is árt a neuronok működésének, főleg a hippocampuszban (Sapolsky, 1996; Lee et al., 2002; Conrad et al., 2007; McEwen, 2006). Mindmáig tisztázatlan azonban az, hogy pontosan milyen mértékűek ezek a sejt szintű elváltozások, és milyen mechanizmusok azok, amelyek révén a glukokortikoidok befolyásolják a neuronok funkcióját és morfológiáját. A mi itt

bemutatott eredményeink azt sugallják, hogy a stressz talán az agyszövet kapilláris-vérrellátásán keresztül is hat. Ez az elképzelésünk jól összecseng azzal a nemrég publikált, nagy populáción végzett prospektív klinikai tanulmánnyal, melynek eredményei szerint a fokozott pszichológiai terhelés gyakoribb agyi történésekkel (stroke) jár együtt (Surtees et al., 2008).

Ebből a kísérletből nem tudjuk megállapítani, hogy a stressz miképpen változtatja meg a kapillárisok számát. *In vitro* adatok szerint a kis erek morfogenezisét a szteroid hormonok gátolják (Wolff et al., 1992; Lansink et al., 1998), és mesterséges glukokortikoid adagolás megváltoztatja a vér-agy gát barrier funkcióját is (Heiss et al., 1996; Förster et al., 2006). Ismert továbbá, hogy a nagy dózisban használt krónikus kortikoszteron kezelés drámai mértékben csökkenti az endothel sejtek proliferációját mind hippocampusz, mind neokortex ereiben (Ekstrand et al., 2008). Ezért a kortikoszteroidokat az angiogenesis potens gátlóanyagainak tekintik és ezt a hatásukat fel is használják tumorok vérrellátásának csökkentésére (Auerbach and Auerbach, 1994; Folkman, 1995).

Végül le kell szögeznünk, hogy ez a kísérlet nem ad semmiféle információt arra vonatkozóan, hogy krónikus stresszt követően valójában milyen is a hippocampusz szövetének valóságos vérrellátása. Ebben a tanulmányunkban egy igen kifejezett ~30%-os kapilláris hálózat csökkenést / egyszerűsödést találtunk. Nagyon valószínű, hogy egy ilyen mértékű csökkenést a szervezet valamiképpen kompenzál, például fokozott vérátáramlással. Azonban, mégha meg is valósul egy ilyen fokozott kompenzatórikus vérátáramlás, a kapillárisoktól távolabb eső sejtek még akkor is oxigén és tápanyag ellátási zavart szenvednek. Mivel a stressz hatására kevesebb kapilláris lát el egy ugyanakkora szövetdarabot, a hiányt szenvedő sejtek száma nő.

A kapillárisok számolása voltaképp a kapilláris-hálózat elágazódásait számszerűsíti. Ebből az adatból következtettünk vissza kapillárisok számára (részleteket lásd a Czéh et al., 2010 módszertani leírásában). Elvileg az is lehetséges, hogy az érrendszer az anasztomózisok számának csökkenését hosszabban kanyargó kapillárisokkal kompenzálja (6. Ábra, Czéh et al., 2010). Ezt a lehetőséget mi sem tudjuk kizárni, de ennek a feltevésnek ellentmond az a megfigyelésünk, miszerint a szubgranuláris zónában, ahol viszont azt mértük, hogy egységnyi szövet terület hány százalékát alkotják a kapillárisok, szintén a kapillarizáció csökkenését láttuk (6. Ábra, Czéh et al., 2010).

4.7. A krónikus stressz funkcionális következményei:

I. A CA3 piramis sejtek elektrofiziológiai tulajdonságai

BEVEZETÉS

Amint azt korábban már említettük, a tartós stressz több, a limbikus rendszerhez tartozó agyi struktúra működését befolyásolja, és elsősorban a hippokampusz, a prefrontális kéreg és az amygdala neuroplaszticitása érintett (McEwen, 2000, 2006, 2007; Fuchs et al., 2004b, 2006; Joëls et al., 2007; Czéh et al., 2008; Pittenger and Duman, 2008). Talán a legalaposabban vizsgált stressz-indukált anatómiai elváltozás a hippokampusz piramis sejtek apikális dendritfájának reorganizációja, mely a dendritek geometriai hosszának regressziójával és a dendritfa komplexitásának egyszerűsödésével jár (Watanabe et al., 1992). Ezt a fajta elváltozást először a CA3 régióban írták le, de azóta számos utóvizsgálat reprodukálta, illetve kiegészítette azzal, hogy e hatást a glukokortikoid hormonok mediálják, és nem csak a CA3 régióra igaz, hanem a CA1 piramis sejtjeire is (Woolley et al., 1990; Magariños et al., 1996; Sousa et al., 2000; Conrad, 2006). Sőt a gyrus dentatus szemcsesejtjei is, kisebb mértékben ugyan, de hasonlóan reagálnak (Sousa et al., 2000). A dendritfa ilyen reorganizációját többnyire úgy szokták interpretálni, hogy ez voltaképp a neuronok „védekező” reakciója, mert az egyszerűsödött, megrövidült dendritfa az excitatorikus (excitotoxikus) szinaptikus bemenetek számára kisebb felszínt nyújt (Conrad, 2006). Ezzel az elképzeléssel összhangban, a krónikusan stresszelt, illetve kortikoszteron kezelt állatokban a CA3 piramis sejtek dendritfáján a szinapszisok szignifikáns csökkenését és az afferens moharostok végződéseinek morfológiai változásait is észlelték (Magariños et al., 1997; Sousa et al., 2000; Sandi et al., 2003).

Feltételezhető, hogy efféle dendritfa reorganizációnak – sokan ezt kifejezetten atrofíának tartják – funkcionális következményi is vannak. Elképzelhető, hogy egy ilyen fokú dendritikus átrendeződés (vagy sorvadás) funkcionális változásokat okoz a CA3 piramis sejtekben, és közvetve szerepet játszik azokban a kognitív zavarokban, melyeket tartós stressz után oly gyakran megfigyeltek (Conrad, 2006). Egy ilyen neuron sorvadás másik lehetséges következménye az, hogy a hippokampusz HPA-tengelyt szabályozó funkciója szenved zavart (Conrad, 2006). Ennek a funkcionális deficitnek a hosszabb távú következménye egy glukokortikoid hormon háztartási zavar lehet – tartósan emelkedett glukokortikoid szintekkel – amit pl. depressziós betegekben gyakran leírnak (Conrad, 2006).

Az is köztudott, hogy a dendrit-struktúra aránylag kisebb mértékű módosulása már befolyásolja a neuronok sejttestéből elvezethető tüzelési mintázatot. Érdekes példa, hogy habár a hippokampális piramis sejtek tüzelési gyakorisága az apikális dendritfa hosszával egyenes arányban csökken (Bilkey and Schwartzkroin, 1990; Mainen and Sejnowski, 1996; Krichmar et al., 2002), mégis, a membránfeszültség változások terjedése, az akciós potenciál és a burst tüzelés küszöbe facilitálódik (Henze et al., 1996; Golding et al., 2001; Vetter et al., 2001; Krichmar et al., 2002; McDonagh et al., 2002). Ésszerűnek tűnik feltételezni, hogy a tüzelési mintázatnak a dendritfa morfológiai változásával együtt járó funkcionális változás jelentősen befolyásolhatja az információ feldolgozást a neuronhálózaton belül. Ugyanis a CA3 piramis sejtek sajátos (*intrinsic*) és a neuron hálózat által szabályozott burst tüzelésének paraméterei kritikus jelentőséggel bírnak mind a rekurrens kollaterálisok közreműködésével létrejövő tartós (*long term*) potenciációban (LTP, Bains et al., 1999), mind pedig az úgynevezett éles hullám (*sharp-spike waves*) keletkezésében (Buzsáki, 1986).

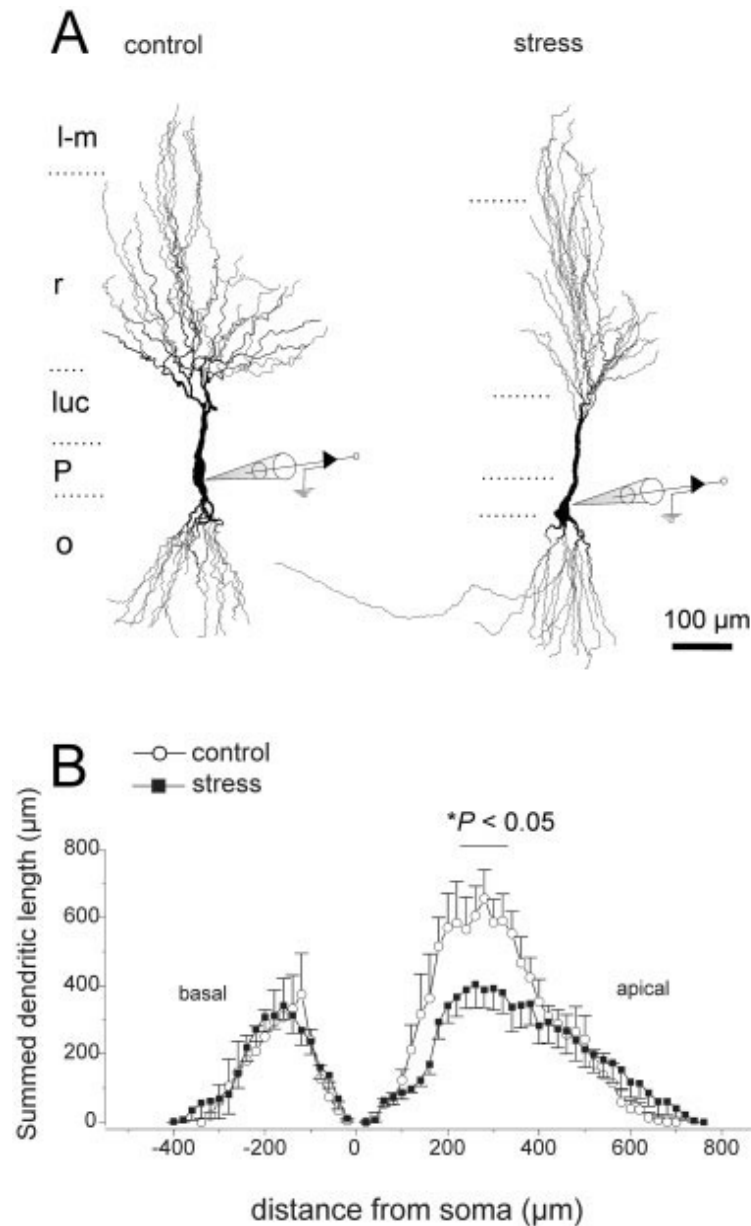
A piramis sejtek stressz élményekhez társult fenti adaptációja feltehetően a kortikoszteroid szint emelkedésének következménye, mert ismert, hogy a glukokortikoidok befolyásolják úgy a feszültség-függő vezetőképességet, mint a tüzelés jellegét, mind a CA1 piramis sejtekben, mind pedig a szemcsesejtekben (Joëls, 2008). A CA3 piramis sejtekből végzett intracelluláris elvezetések bizonyítják, hogy 2 hetes kortikoszteron kezelés után az intrinsic módon burst tüzelő sejtek relatív száma csökken (Okuhara and Beck, 1998). A CA3 areából származó mező (*field*) potenciál elvezetések tanúsága szerint ilyenkor a szóma-dendritikus tengely mentén számolt áram sűrűség (*current source densities*) megváltozik, és alaposan csökken az az LTP is, melyet a perforáns pálya illetve a commissurális-asszociációs (C/A) rostok felőli bemenet ingerlésével lehet kelteni (Pavlidis et al., 2002).

Kísérletünkben azt akartuk vizsgálni, hogy vajon az a krónikus stressz, mely köztudottan megváltoztatja a CA3 piramis sejtek dendritfáját, befolyásolja vagy sem ezeknek a neuronoknak az input-output jellegét vagy az ingerlékenységét. Felnőtt, hím mókuscickányok hippocampusz szelet preparátumaiban „*whole-cell current-clamp*” módszerrel analizáltuk a CA3 piramis sejtek elektrofiziológiai tulajdonságait, majd az elvezetéseket utólagos biocytin jelölés és részletes morfometriai feldolgozás követte. A vizsgált sejtek egyrészt kontroll állatokból, másrészt olyanokból származtak, melyeket előzőleg 28 napos pszichoszociális stressznek vetettük alá.

EREDMÉNYEK

Várakozásunknak megfelelően a kísérleti mókuscickányok az egész stresszelési periódus alatt a fokozott stressz-reakció jeleit mutatták: tartósan aktivált HPA-axis és csökkent testsúly, majd a kísérlet végén, az állatok leölésekor mért emelkedett mellékvese és a csökkent testtíz súly jelezte (Kole et al., 2004, 1. Ábra és 1. Táblázat).

A stresszelt állatok hippocampuszában, a CA3 piramis sejtek apikális dendritfája szignifikánsan leegyszerűsödött és megrövidült (4.7.1. Ábra). Öt kontroll és hat stresszelt mókuscickány hippocampuszából gyűjtöttünk adatokat. A stresszelt állatok hippocampuszából származó szeletekben 23, a kontrollokéban 16 CA3 piramis sejt szómájából nyertünk stabil patch-clamp adatokat, majd mindegyiket morfometriai célokra digitálisan rekonstruáltuk (4.7.1. Ábra). Először azt ellenőriztük, hogy vajon a szelet készítés önmagában nem deformálja-e a neuronok dendritfáját. Ehhez 10 biocytin-jelölt, láthatóan teljes egészében feltöltődött, jól festődött, és ezért jól rekonstruálható CA3 sejtet analizáltunk. Azt találtuk, hogy a szelet készítés önmagában nem eredményez változást a neuronok dendritfájának hosszában és komplexitásában. Ezt egy részletes morfometriai analízis követte, amelynek eredményei szerint a bazális dendritek tulajdonságai (hosszúság és elágazódási pontok) a stressz hatására nem változtak. Az apikális dendritfa esetében is csak relatíve enyhe változást észleltünk. A csúcscsúcsdendritek teljes geometriai hossza és komplexitása (elágazódási pontok száma) nem változott lényegesen. Ezután a sejteket egy részletes Sholl analízisnek vetettük alá, amiből kiderült, hogy a stresszelt neuronokban dendritágak száma és hossza mégiscsak csökkent, de ez az elváltozás csak a szómától mért 280 - 340 mikron távol eső rövid szakaszon volt észlelhető (4.7.1. Ábra).



4.7.1. Ábra

Felnőtt mókuscickányok 4 hetes pszichoszociális stresszelése után a CA3 piramis sejtek apikális dendritfája átrendeződik. **A:** Az elektrofiziológia elvezetéseket biocytin jelölés követte, majd a dendritfákat digitálisan rekonstruáltuk. **B:** A Sholl analizisből látható, hogy a „stresszelt” neuronokban az apikális dendritfa csak egy meghatározott szakaszon rövidült, míg a bazális dendritfa nem változott.

A másik, funkcionális mérésekből származó fontos leletünk, hogy ugyan a stressz csökkenti a CA3 piramis sejtek küszöb alatti ingerlékenységét, az aktív membrántulajdonságok mégis épen maradnak. A *whole-cell* elvezetéseink tanúsága szerint a stresszelt sejtek membránjának idő-állandója és bemenő ellenállása 20-25%-al csökkent (Kole et al., 2004, 3. Ábra). Ugyanezen sejtekben a hiperpolarizáló feszültséggel keltett “sag” komponens amplitúdója viszont megnőtt (Kole et al., 2004,

3. Ábra). A membrán aktív tulajdonságai, nevezetesen a depolarizációval keltett akciós potenciálok kinetikája, a komplex (rövid burst) tüzelési mintázatok paraméterei és egyéb tulajdonságai, mint például az utóhiperpolarizációs feszültség értékei nem tértek el egymástól a kontroll és a stresszelt CA3 sejtekben (Kole et al., 2004, 4. és 5. Ábrák, 2. Táblázat). Habár a lineáris asszociáció korreláció analizisének (két oldali parametrikus Pearson teszt) eredménye megerősítette azt, hogy az olyan enyhe sejtgeometriai különbségek, mint a dendritfa fentebb leírt, csak egy rövidebb szakaszra érvényes atrófiája, korrelál azzal a funkcionális módosulással, melyet az akciós áram és annak feszültség küszöbe mutatott, e változások mértéke túl kicsi volt és valószínűleg ezért nem tükrözött a kísérleti állatcsoportok közötti eltérést.

MEGBESZÉLÉS

Az irodalomban először vizsgáltuk a krónikusan stresszelt állatokból származó CA3 piramis sejtek elektrofiziológiai tulajdonságait. Patch-clamp elemzés segítségével demonstráltuk, hogy a mi esetünkben használt 4 hetes stressz megváltoztatta ugyan a membrán küszöbalatti feszültség tartományában mért mutatóit, de az aktív membrán tulajdonságok változatlanok maradtak. Úgy tűnik a CA3 sejtek apikális dendritfáján észlelt strukturális redukció csak enyhe változást okoz az akciós potenciálok keletkezésében, és tulajdonképp a kortizol szint az, amely meghatározza a CA3 piramis sejtek küszöb alatti ingerlékenységét. Így, habár adataink támogatják azt a széles körben elfogadott feltevést, hogy a neuronok morfológiája összefügg azok tüzelési küszöbével, mégis a mi esetünkben észlelt stressz-indukálta dendritfa módosulások túl kicsik voltak a CA3 piramis sejtek tüzelési tulajdonságainak intracelluláris elvezetéssel mérhető megváltoztatásához.

AZ ITT BEMUTATOTT KÍSÉRLETEKBEN HASZNÁLT MÓDSZEREK

Szelet készítés

Reggel 08:30 and 09:00 óra között, vagyis az aktivitási fázis kezdetén, a mókuscickányokat letális adagban mért ketamine/xylazine/atropine keverékkel bealtattuk, majd transzkardiálisan 2 percig perfundáltuk jéghideg, karbogénnel (95% O₂ / 5% CO₂) telített szukróz alapú arteficiális cerebrospinális oldattal (ACSF). Ennek összetétele: (in mmol/L): 206 szukróz, 1 MgCl₂, 2.5 KCl, 2 MgSO₄, 1.25 Na₂H₂PO₄, 26 NaHCO₃, 14 D-glukóz, 1 kynurenic sav, és 1.3 CaCl₂. Ez az eljárás a toxikus mértékű Cl⁻ és Na⁺ sejtekbe áramlását minimalizálja, hűti az agyat és növeli az agyszelet túlélési mutatóit (Moyer and Brown, 1998). A jobboldali féltekéből származó hippocampuszból gyorsan 400 mikronos transzverzális metszeteket készítettünk, amelyeket azonnal hideg, karbogénnel telített normál ACSF oldatba: (in mmol/L): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 Na₂HPO₄, 2 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 1.5 CaCl₂, 1 L(+)-aszkorbin sav, és 14 D(+)-glukóz, ~300 mOsm és pH 7.4. tettünk át. Az oldatot ezután egy óra időtartamra 33°C fokra melegítettük, majd a szeleteket szobahőn tartottuk maximum 12 óra hosszat.

Patch clamp elvezetés

Az úgynevezett „submerged” (a karbogénnel telített ACSF oldatban alámerített) szeleteket használtuk 1-2 ml/min átáramlási sebesség mellett. A sejttesteket Axioskop 2 FS mikroszkóp segítségével kerestük fel (infrared differential interference contrast - IR-DIC – optika, Zeiss, Göttingen, Germany). Patch-pipettáink ellenállása 3–5MΩ, töltete (in mmol/L): 120 KMeSO₄,

2MgCl₂, 20 KCl, 10 HEPES, 0.1 EGTA, 3 sodium-ATP, 10 foszfokreatin, és 0.3 sodium-GTP, melynek ozmolaritását 290 mOsm-ra és pH 7.3-ra állítottuk be KOH-dal. Az adatgyűjtés szobahőn ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) történt. Szomatikus whole-cell elvezetések (*seal resistances* $> 1 \text{ G}\Omega$) végeztünk current-clamp üzemmódban egy Axopatch 200B erősítővel (Axon Instruments, Union City, CA). Filter: *low-pass* 5.0 KHz, digitalizáció ITC-16 interface (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany). Az adatgyűjtést PULSE software (HEKA) vezérelte. A soros ellenállást 20 M Ω alatt tartottuk. A spontán aktivitás blokkolására 20 μM 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3(1H,4H)-dione (CNQX) és 10 $\mu\text{mol/L}$ bicuculline szolgált. Az elvezetésre választott sejtek mindig a CA3b areában, szorosan a piramis sejrétegben voltak.

Adatfeldolgozás

Sejtválogatásunk kritériumai és a mérendő passzív tulajdonságai a következők voltak: legalább -55 mV membránpotenciál, stabil soros ellenállás legalább 30 percig. A membrán bemenő ellenállás mérése a küszöb alatti lineáris tartományban 4-6 lépcsővel, majd az I-V reláció meghatározásával és abból lineáris regressziós függvény illesztésével történt (Spruston and Johnston, 1992). A membrán idő-állandó (τ_m) becslése a -50 to $+50 \text{ pA}$ áram-pulzus ingerekre kapott feszültség válaszokból elsőfokú exponenciális függvény illesztéssel, külön a pozitív és a negatív feszültségekre, valamint külön az on és off fázisokra (τ_{on}) és (τ_{off}) történt.

Az akciós potenciál (AP) tulajdonságokat egyedi (nem burst) tüskepotenciálokon mértük, külön a fast, medium, és delayed (fAHP, mAHP, and dAHP) szerint, melyek nagyságát az AP küszöbéhez viszonyítva határoztuk meg. Az elsőfokú exponenciális függvények generálására és illesztésére PULSEFIT v8.11 (HEKA) szolgált.

Biocytin jelölés és morfometriás dendritfa rekonstrukció

A patch pipettában 3 mg/ml biocytin (w/v; Sigma-Aldrich) is volt (Horikawa and Armstrong, 1988). Az elvezetés végeztével a szeletet azonnal 0.1 M foszfát puffer (PB) 4%-os paraformaldehid (pH 7.4) oldatában 4-7 napig 4°C hőmérsékleten inkubáltuk. A sejtek vizualizálása standard eljárás (Pyapali et al., 1998) szerint történt. A kontroll és stresszelt állapotokból származó mintákat azonos oldatsorokon párhuzamosan futtattuk. Mivel patch-elvezetésre leginkább a szelet felső 100 mikron vastag része alkalmas, ezért az emiatt nyilvánvalóan csonkolt neuronokat kihagytuk a feldolgozásból. Különben pedig a legdisztálisabb dendritvégekig erőteljesen jelölődött sejtek közül is csak azokat dolgoztuk fel, melyek bazális és csúcsdendritje a szelet síkjával nagyjából párhuzamosan futott.

A neuronok digitalizált rekonstrukciója a Neurolucida (Microbrightfield, Colchester, VT) szoftver segítségével történt, egy Zeiss III RS mikroszkóppal, és 40/0.75 objektívvel, amely a komputer monitorán végülis 40.000x-es végső nagyítást eredményezett. A 3 dimenziós digitális neuron rajzok dendritfáját Sholl analízisnek vetettük alá, amit Neuroexplorer szoftver (3.2. verzió, Microbrightfield) végzett el.

Az etanol dehidráció miatti zsugorodás mértéke minden esetben azonos (Pyapali et al., 1998), ezért ez elhanyagolható mert nem befolyásolja a csoportokon belüli összehasonlítást. Mások korábbi közölt adataival egybevetéskor 1.6 súlyozott lineáris korrekciós faktort alkalmaztunk mind a három tengely mentén.

4.8. A krónikus stressz funkcionális következményei: II: A GABAerg interneuronok működésére kifejtett hatás

BEVEZETÉS

Stressz hatására emelkedik a vérben a kortikoszteroidok szintje, és ezek hatását a mineralokortikoid és glukokortikoid receptorok (MR és GR) közvetítik. E receptorok az agyszövetben is bőven előfordulnak, és úgy az emocionális, mint a kognitív funkciókat szabályozzák (de Kloet et al., 1975, 2005; McEwen et al., 1986; Joëls et al., 2007). Mivel az MR és GR elsősorban a principális neuronokban expresszálnak, így érthető, hogy a korábbi, a kortikoszteroidok hippocampusban kifejtett neuronális hatásaival foglalkozó tanulmányok is ezekre az idegsejtekre fókuszáltak (Karst et al., 2005; Joëls et al., 2007; Joëls, 2008). Emiatt a GABAerg interneuronok elhanyagolódtak, pedig ismert, hogy pszichológiai stresszorok hatására patkány hippocampusában megnő a GABA felszabadulás (de Groote and Linthorst, 2007). Úgy a stressz, mint a mestéségesen megemelt glukokortikoid szintek, melyekről tudjuk, hogy a GAD⁷ expressziót is regulálják (Bowers et al, 1998; Stone et al, 2001), növelik a hippocampusban az IPSC⁸ nagyságát (Maggio and Segal, 2009). E leletekkel párhuzamba állíthatók azok a szaporodó klinikai megfigyelések, melyek depressziós betegekben a GABAerg szabályozás részleges széteséséről számolnak be (Sanacora et al, 1999; Krystal et al, 2002; Brambilla et al, 2003; Hasler et al, 2007; Luscher et al., 2011).

A GABAerg interneuronok különféle fajtái olyan gátló hálózatokat alkotnak, melyek a piramis sejtek tüzelési mintázatát formálják és ezen keresztül a határozottan elkülönült agyi állapotokra jellemző oszcillációkat organizálják (Buzsáki and Draguhn, 2004; Somogyi and Klausberger, 2005). Például, a GABAerg interneuronok egy specifikus fajtája a principális neuronok periszomatikus régióját innerválja és kritikus szerepet játszik a hálózat oszcillációjának szinkronizálásában (Somogyi and Klausberger, 2005; Klausberger et al, 2005). Ezek az úgynevezett periszomatikus gátló sejtek külső és belső erőktől hajtva a principális sejtek periszomatikus régiójára gyakorolnak ritmikus gátlást, és bőséges axonelágazódásukon keresztül a piramis sejtek százait, ezreit precízen időzített tüzelésre szinkronizálják (Somogyi and Klausberger, 2005; Klausberger et al, 2005; Sohal et al, 2009). Ezek a különböző frekvenciájú oszcillációk képezik az olyan komplikált, magasabb rendű agyműködések neuronális alapját, mint például a percepció vagy a tanulás és memória (Buzsáki and Draguhn, 2004; Somogyi and Klausberger, 2005).

Jelen tanulmányunk a két legfontosabb periszomatikus régióra projiciáló interneuron csoportra koncentrál, ezek a parvalbumin (PV) és cholecystokinin (CCK) pozitív gátló idegsejtek. E két alcsoport működése funkcionális dihotómiát alkot, mert egymástól élesen különböző membrán tulajdonságaik, expresszált receptor-készletük és a preszinaptikus modulációik ezt lehetővé teszik (Klausberger et al., 2005; Freund and Katona, 2003). A PV-pozitív (PV+) neuronhálózatot az oszcilláció precíz, de nem plasztikus óraművének tekintik, szemben a CCK-pozitív (CCK+) neuronokkal, melyek plasztikus, finoman hangolható eszközt alkotnak, ez pedig a szinkron aktivitást a szubkortikális bemenetek függvényében modulálja (Freund and Katona, 2003). E funkcionális dihotómia alapján feltételezik, hogy a CCK+ neuron hálózat hibás

⁷ GAD: *glutamic acid decarboxylase*, enzim, mely a glutamát dekarboxilálását katalizálja GABA-vá

⁸ IPSC: *inhibitory postsynaptic current*

működése szerepet játszik az emocionális zavarok, mint például a szorongás mechanizmusában (Freund and Katona, 2003). Tudomásunk szerint azonban ennek a koncepciónak kísérletes tesztelése még nem történt meg.

Mindezek ismeretében célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, hogyan változik a hippocampusban a GABAerg transzmisszió krónikus stressz után. Annak felderítésére, hogy a stressznek a GABAerg transzmisszióra gyakorolt hatását vajon a glukokortikoidok mediálják-e, egy potens GR agonistát, (DEX⁹), használtunk. A GABAerg transzmissziót a CA1 area piramis sejtjeiből történő *whole cell patch-clamp* elvezetéssel vizsgáltuk. Ezen túlmenően azt is elemeztük, hogy a PV+ és CCK+ neuronok funkcionális dihotómiája miként érvényesül a krónikus stressz körülményei között. Pontosítva, kerestük a krónikus stressz eltérő hatásait a PV és CCK interneuronok IPSC képző hatásaiban.

EREDMÉNYEK

DEX kezelés a GABAerg ingerület átvitelt egy gyors, nem klasszikus GR mechanizmuson keresztül facilitálja

Mint említettük, a stressz a glukokortikoidokon keresztül befolyásolja az excitátoros ingerület átvitelt. Munkahipotézisünk szerint GR aktiváció a gátló neuronhálózatok működését is módosítja. E feltevés helyességének közvetlen ellenőrzése céljából egy potens és szelektív GR agonistával (DEX) kezeltünk patkány hippocampusz szeleteket. Huszonöt nM DEX kezelés után mind az sIPSC¹⁰ frekvencia (Hu et al., 2010, 1A és C1 Ábra) mind az sIPSC amplitudó (Hu et al., 2010, 1A és C2 Ábra) gyors növekedését figyeltük meg. Meglepő módon a DEX facilitáló hatása minden esetben gyorsan, már öt perc után érvényesült. Ez a hatás a következő mintegy öt perc során tovább erősödött, majd ezután fokozatosan elenyészett (Hu et al., 2010, 1B1 és B2 ábra). Mi több, a vizsgált kilenc sejtől hatban DEX hatására burst-tüzelés fejlődött ki, melynek nyomait a DEX kezelés előtt nem észleltük (Hu et al., 2010, 1Aa Ábra alsó nyomvonal, nyíl). Efféle gyors DEX hatásról egy korábbi közlés nem tesz említést (Maggio and Segal, 2009). Az sIPSC facilitálásával ellentétben DEX hatására a miniature IPSC (mIPSC) nem változott szignifikánsan (Hu et al., 2010, 1D1 és D2 Ábra). Ez a megfigyelésünk arra utal, hogy a korábbi, lassú DEX hatásról beszámoló közléssel (Maggio and Segal, 2009) ellentétben, az általunk megfigyelt gyors DEX hatás nem a szinaptikus végződéseken érvényesül.

Számunkra is váratlan volt a DEX-nak e meglepően gyorsan¹¹ kifejlődő hatása, amely a GABA ingerület átvitelt fokozta. Igaz, ismert az irodalomból, hogy a glukokortikoidok képesek a hippocampusz piramis sejtjeinek aktivitását fokozni valószínűleg a „sejtmembránban lévő GR receptorok”¹² stimulálása útján (Karst et al, 2005). A mi esetünkben azonban ez a közvetett úton - először a piramis sejtek, majd rajtuk keresztül a GABAerg neuronok - történő aktivitás fokozódás azonban valószínűleg, mert a GABAerg neuronokra irányuló excitátoros hajtóerőt mediáló

⁹ DEX: *dexamethasone*, szintetikus glukokortikoid, mely igen nagy affinitással kötődik a GR-hoz, míg affinitása a MR-hoz ~0

¹⁰ sIPSC: spontaneous inhibitory postsynaptic currents

¹¹ Ismert, hogy a glukokortikoidok típusosan az intracellulárisan elhelyezkedő GR-hoz kötődnek és a génextpressziót illetve a protein szintézist befolyásolják, ami egy időigényesebb (>25 min) mechanizmus.

¹² „membrane-bound GR”

glutamaterg ingerület átvitelt CNQX¹³ és APV¹⁴ gátlás alatt tartottuk éppen az sIPSC tiszta megfigyelése érdekében.

Ezért egy külön kísérletsorozatban próbáltuk felderíteni, hogy itt a DEX pontosan milyen fajta receptoron hat. Egyfelől kiderült, hogy a DEX fent leírt gyors stimuláló effektusa megmaradt akkor is, ha az intracelluláris MR antagonista spiro lactont (10mM) vagy a szintén intracelluláris GR antagonista mifepristont (10mM) mostuk rá a szeletre (Hu et al., 2010, 1E Ábra.). Ezek az antagonisták önmagukban nem változtatták meg szignifikánsan az sIPSC egyik vizsgált paraméterét sem. Másfelől, a DEX-nak a GABA felszabadulást stimuláló hatását reprodukálni tudtuk egy membrán impermeabilis BSA-DEX konjugátum (250nM) tápoldatba keverésével is (Hu et al., 2010, 1F Ábra). Harmadszor, egy G-protein gátlószer (GDP-b-S, 0,5 mM) a patch pipetta töltő folyadékába keverésével intracellulárisan blokkolni tudtuk a DEX-indukálta sIPSC frekvencia növekedést (Hu et al., 2010, 1G. Ábra). Mindezek együtt határozottan alátámasztják azt a feltevésünket, miszerint a mi esetünkben megfigyelt gyors DEX hatást egy *non-genomic*, membránhoz kötött GR közvetíti, mely azután egy G-protein dependens szignáltranszdukciós effektor rendszeren keresztül hat. Ez a gyors mechanizmus tehát lényegesen eltér a tradicionális, genomic GR-mediálta lassú (>25 min, Maggio and Segal, 2009) folyamattól. Továbbá, mivel a GDP-b-S kezelés csak abban az egyetlen poszt-szinaptikus (a patch pipettával megfigyelt) piramis sejtben érvényesült, amelyből éppen elvezettünk, így eredményeink arra utalnak, hogy a DEX legalábbis részben a poszt-szinaptikus sejtekre hat és a GABA felszabadulást stimuláló effektust egy retrográd messenger közvetíti.

A GABAerg ingerület átvitel DEX-keltette facilitációját retrográd Nitric-Oxid (NO) szignál közvetíti

A következő célunk annak tisztázása volt, vajon melyik retrográd messenger rendszer közvetíti a DEX GABA felszabadulást stimuláló hatását. Ismert, hogy a hippocampusban az endocannabinoidok a GABA felszabadulás gátlását CB1 receptorokon keresztül közvetítik, melyek kizárólag a CCK+ interneuronokon expresszálódnak (Freund and Katona, 2003). Ezért nagyon valószínűtlen, hogy ugyanaz az endocannabinoid-CB1 retrográd messenger rendszer lenne felelős mind a GABAerg ingerület átvitel facilitációjáért, mind pedig annak gátlásáért. Továbbá, ismert az is, hogy egy NO-szenzitív guanylyl cycláz van mind a PV+, mind a CCK+ neuronok axon terminálisában (Szabadits et al, 2007). Ezért figyelmünk az NO (nitric oxide) retrográd messenger rendszerre terelődött.

Létezik egy szelektív NO-synthase gátló hatóanyag, a 7-nitroindazole (7-NI). Ennek az intracelluláris adagolása (100mM) önmagában nem hatott a hippocampális sIPSC jelekre, viszont teljes mértékben blokkolta a DEX-indukálta sIPSC frekvencia és amplitudó növekedést (Hu et al., 2010, 2A Ábra). Hasonlóan, a szeletek 30 perces inkubálása egy szelektív NO-szenzitív guanylyl cyclase (NOsGC) gátlóban (ODQ, 50 mM a tápoldatban), teljesen blokkolta a DEX hatását a GABA felszabadulásra (Hu et al., 2010, 2B Ábra). Ezek az eredmények azt demonstrálják, hogy úgy az NO szintézis gátlása, mint az NO kiváltotta szignál blokkolása teljes egészében felfüggeszti a DEX rapid, az sIPSC jelekre gyakorolt hatását. Ugyanakkor a DEX kiváltotta effektust jól reprodukálta az NO donor SNAP adagolása (Hu et al., 2010, 2C ábra). A SNAP (100

¹³ CNQX: kompetitív AMPA/kainate receptor antagonista

¹⁴ APV: szelektív NMDA receptor antagonista

mM) nemcsak hogy facilitálja az sIPSC-k frekvenciáját és amplitudóját, de még a DEX gyorsan kialakuló hatását is teljes mértékben utánozta (Hu et al., 2010, 2C2 és C3 és az 1B1 és B2 Ábrák). Mindezek az eredmények azt jelzik, hogy a DEX-indukálta rapid GABAerg ingerület átvitel facilitációt retrográd NO szignál közvetíti.

A GABAerg ingerület átvitel DEX-keltette facilitációját, legalábbis részben, NO-indukált CCK felszabadulás közvetíti

Az irodalomból jól ismert, hogy az agyban a CCK neuropeptid szerepet játszik a stressz válaszok szabályozásában (Hebb et al., 2005; Becker et al., 2008). Ebből kiindulva ellenőriztük, hogy vajon a DEX-keltette gátlás facilitációkor növekszik vagy sem a CCK felszabadulás a CCK interneuronokból, hiszen ismert, hogy egy ilyen effektus tovább modulálhatná a periszomatikus GABA felszabadulást (Földy et al., 2007). Ezért a hippocampusz szeleteket az elvezetések megkezdése előtt 30 percig inkubáltuk egy szelektív CCK2 receptor antagonistában (LY225910, 20 mM a tápoldatban). Ez az antagonistista önmagában nem befolyásolta az sIPSC jeleket, de blokkolja a kívülről bevitt CCK keltette reakciót. Az inkubálás után 25 nM DEX adásakor a már ismert módon megnőtt az sIPSC frekvencia és amplitudó (Hu et al., 2010, 3A és C1 Ábra). Fontos azonban, hogy az ezen inkubáció nélkül észlelt adatokhoz képest az LY225910 inkubált szeletekben a DEX hatására észlelt sIPSC frekvencia és amplitudó facilitáció mértéke feltűnően kisebb volt (Hu et al., 2010, 3C2 Ábra). Érdemes megjegyezni azt is, hogy az LY225910 jelenlétében a DEX hatása 5 helyett 3 percre rövidült, de annak kezdeti időpontja nem változott (Hu et al., 2010, 3B Ábra). Ezenkívül, LY225910 inkubálás után, az NO donor SNAP a GABAerg ingerület átvitelt stimuláló hatása is szignifikánsan csökkent (Hu et al., 2010, 3D és E Ábra). Az a tény, hogy a CCK2 receptor antagonistista képes volt részben blokkolni a rapid DEX és az SNAP hatást, két következtetést enged. Egyik, hogy a CCK felszabadulás részt vesz a DEX keltette reakcióban, a másik hogy az NO szignál endogén CCK felszabadulást okoz, mely viszont tovább facilitálja a GABAerg ingerület átvitelt.

Akut stressz fokozza a GABAerg ingerület átvitelt a hippocampuszban

A fenti eredmények azt mutatják, hogy DEX akut adagolása egy *non-genomic* GR mechanizmuson keresztül a hippocampusz CA1 régiójában a GABAerg ingerület átvitel rapid facilitációját okozza. Mivel a glukokortikoidok nem csupán a stressz reakciókban szerepelnek, fontos tisztázni, hogy vajon a valós stressz helyzetek is növelik-e a GABAerg gátló ingerület átvitelét. Ezt a kérdést patkányok akut stressz reakciójának vizsgálatával közelítettük meg. Az akut stressz ez esetben egy 30 perces mozgás korlátozás (*restraint*) volt, ami után az állatokat azonnal leöltük és a hippocampuszukból nyert szeleteket vizsgáltuk a fentiekkel azonos módon.

Akut stressz után az sIPSC frekvencia megnőtt a kontroll (nem stresszelt) állatokhoz képest, ugyanakkor az sIPSC amplitudó változatlan maradt (Hu et al., 2010, 4A B1 és B2 Ábra). Továbbá a stresszelt állatokból készült szeletekben vizsgált 10 sejt közül hétben észleltünk burst aktivitást, míg ugyanez a jelenség a kontroll állatokból készült szeletekben sokkal ritkább (7 sejt közül 2) volt. Ezek az adatok azt mutatják, hogy habár akut stressz hatására növekszik ugyan a GABAerg ingerület átvitel a hippocampusz CA1 régiójában, ez a jelenség csak hasonló, de nem egészen azonos a DEX-keltette effektussal (Hu et al., 2010, 1. Ábra és Maggio and Segal, 2009).

Krónikus stressz a GABAerg ingerület átvitel Ca^{2+} dependens emelkedését okozza

A következő kérdésünk az volt, hogy vajon az akut stressz után észlelt sIPSC facilitáció fennmarad vagy sem tartós stressz közben is, amikor az idegrendszer hosszú időn át kénytelen a stressz hormonok, köztük a kortikoszteron hatását elviselni. Erre a célra olyan patkányokat használtunk, melyek 3 héten át, naponta, *restraint* stresszt szenvedtek el. A stressz fiziológiai hatásait naponkénti testsúly mérésével és a leölés napján a mellékvese súlyának meghatározásával követtük nyomon. Mint várható volt, stressz hatására redukálódott a testsúly növekedés üteme és megnőtt a mellékvesék súlya (Hu et al., 2010, 5A és 5B Ábra). Ez utóbbi egybevág azzal a korábbi megfigyeléssel, hogy a mellékvesék tömege a tartós HPA-tengely hiperaktivitás megbízható indikátora (Magariños and McEwen, 1995; McLaughlin et al., 2007).

A következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy hogyan változik a GABAerg transzmisszió a tartós stressznek kitett állatok hippocampuszában. Szignifikáns sIPSC frekvencia emelkedést, de csak gyenge (nem szignifikáns) amplitúdó növekedést észleltünk (Hu et al., 2010, 6 A,B és C Ábra). Burst tüzelést ebben a csoportban is gyakran (16 sejt közül 10 esetben) figyeltünk meg.

Továbbá kiderült, hogy a stressz rovására írható sIPSC frekvencia növekedés a szabad Ca^{2+} szint függvénye, mert a frekvencia emelkedés elmaradt a membrán permeabilis Ca^{2+} kelátor EGTA-AM jelenlétében. Az EGTA-AM kelátort 100 mM koncentrációban kevertük a tápoldatba és habár ilyen körülmények között a stresszelt állatokból készült szeletekben elmaradt a sIPSC frekvencia növekedés, ugyanez az oldat a kontroll állatokból készült szeletekben az ott észlelt sIPSC jelekre nem hatott (Hu et al., 2010, 6A,B,C Ábra). Ez a lelet jelzi, hogy a hippocampális interneuronokban a krónikus stressz rovására írható GABAerg ingerület átvitel facilitáció az intracelluláris szabad Ca^{2+} koncentráció függvénye.

Fontos kiemelni, hogy a krónikusan stresszelt patkányok hippocampusz szeleteinek tápoldatába adagolt 25nM DEX a CA1 piramis sejtekben észlelt sIPSC paraméterek semmiféle szignifikáns változását nem okozta (Hu et al., 2010, 7. Ábra). Még tisztázatlan, hogy a DEX miért hatástalan a krónikusan stresszelt állatokban.

Krónikus stressz hatására csökken a PV-immunoreaktív neuronok száma, miközben a CCK-pozitív sejteké változatlan marad

Két megfigyelést kell megfontolni. Egyik, a PV+ és CCK+ neuronok funkcionális dihotómiája (Freud and Katona, 2003), a másik pedig, hogy a DEX facilitálja az endogén CCK felszabadulást (Hu et al., 2010, 3. Ábra). Ez utóbbi viszont specifikusan stimulálja a PV+ sejteket. Ezek fényében merül fel a kérdés, hogy vajon a krónikus stressz egyformán hat-e erre a két periszomatikus gátlósejt csoportra. Először azt vizsgáltuk, hogyan hat a krónikus stressz a PV+ és CCK+ sejtek strukturális integritására. Tettük ezt azért is, mert egy korábbi tanulmányunkban már kiderült, hogy krónikus stressz után csökken a PV+ sejtek száma a mókuscickányok hippocampuszában (Czéh et al., 2005b). Ezért a jelen kísérletben is kvantifikáltunk a PV+ és CCK+ sejtek számát a patkányok dorzális hippocampuszában. Ahogy azt vártuk, a krónikus stressz szignifikánsan csökkentette a PV+ sejtek számát az összes hippocampális szubrégióban: -31%-os csökkenés a gyrus dentatus-ban, -23%-os a CA2-CA3 areákban és végül -36%-os redukció a CA1 szubrégióban (Hu et al., 2010,

8A1, A2 és C Ábra). Ezzel szemben a CCK+ neuronok száma változatlan maradt (Hu et al., 2010, 8B1, B2 és D Ábra).

Krónikus stressz hatására a PV+ interneuronok ritmikus aktivitást generáló képessége károsodik

A következőkben arra kerestük a választ, vajon a krónikus stressz fent észlelt eltérő hatása a PV+ és CCK+ sejtek strukturális integritására, jár vagy sem valamilyen funkcionális következménnyel. Ismeretes, hogy egyfajta finoman regulált Ca^{2+} szignalizáció szükséges az interneuronok kimenetét jellemző időbeli precizitáshoz (Hefft and Jonas, 2005). Mint eredményeinkből kiderült, krónikus stressz az interneuronokban fölös mennyiségben teremt intracelluláris szabad kalcium iont. Ezért elhatároztuk annak ellenőrzését, hogy vajon a krónikus stressz befolyásolja-e a periszomatikus interneuronok ritmikus tüzelést generáló funkcióját, mely a piramis sejtekben ébredő akciós potenciálok időzítésének igen fontos meghatározója. Ismeretes, hogy *in vitro* hippocampusz szeletben mind a CCK analógok mind pedig a carbachol¹⁵ alkalmas ritmikus sIPSC-k keltésére. A carbachol-keltette ritmikus IPSC jeleket endocannabinoidok, N-típusú kalcium csatorna blokkolók, valamint a GABA-B receptorok aktivációi gátolják (Karson et al, 2008). Ezzel szemben a CCK-triggerelt ritmikus IPSC jeleket a P/Q kalcium csatorna blokkolók gátolják, de ezek a jelek nem endocannabinoid érzékenyek (Karson et al, 2008). Tekintettel arra, hogy a CCK+ és a PV+ interneuronok celluláris tulajdonságaik szempontjából határozottan elkülönült sejtcsoportokat alkotnak, feltehető, hogy a carbachol a CCK+ sejtek aktiválásán keresztül indít ritmikus sIPSC jeleket, míg a CCK a PV+ sejtek stimulálásán keresztül váltja ki azokat (Karson et al, 2008).

Jelen tanulmányunkban először a kontroll patkányok hippocampuszából metszett szeletek tápoldatába kevert 5 mM carbacholt használtunk a ritmikus sIPSC jelek keltésére (Hu et al., 2010, 9A1 és A2 Ábra). Röviddel a ritmikus aktivitás beindulása után választott tíz másodperces sIPSC aktivitási szakaszokon végzett autokorrelációs analízis eredménye szerint a 8 vizsgált sejtől 8 esetben láttunk szabályosan ismétlődő függvény csúcsokat. Ugyanezen carbachol adása utáni sIPSC aktivitási szakaszokon végzett *power spektrum* analízis szerint minden sejtben szignifikánsan nőtt a *total power* és ezen belül egy éles *power* csúcs fejlődött ki a 4-14 Hz-es téta frekvencia tartományban (Hu et al., 2010, 9A2 és E Ábra). Hasonlóképpen, a tápoldatba kevert 1 mM CCK8-S kódnevű CCK analóg is ritmikus sIPSC aktivitást keltett, melyet szintén manifeszt, regulárisan ismétlődő autokorrelációs csúcsok kialakulása és a *power spektrum* szignifikáns növekedése jellemez, különösen a téta frekvencia tartományban, mind a 8 vizsgált neuronban (Hu et al., 2010, 9C1, C2 és E Ábra). A publikált megfigyelésekkel egybehangzóan a CCK analóggal keltett ritmus kevésbé volt variábilis és az aktivitás tartósabb volt, mint a carbachollal keltett aktivitás.

A krónikusan stresszelt állatokból metszett szeletekben a carbachollal keltett reakció mindenben hasonlított a kontroll állatokból származó adatokhoz (Hu et al., 2010, 9B1, B2 és E Ábra). Ezzel szemben a CCK8-S adásakor megvizsgált 10 stresszelt sejt közül egyikben sem alakult ki ritmikus sIPSC tevékenység. A kontroll állatokban észlelt leletektől eltérően a stresszelt állatokban a CCK agonista csak aritmiás tevékenységet generált, melyet a belőle szerkesztett lapos autokorrelációs

¹⁵ Carbachol: egy muszkarin acetilkolin receptor agonista

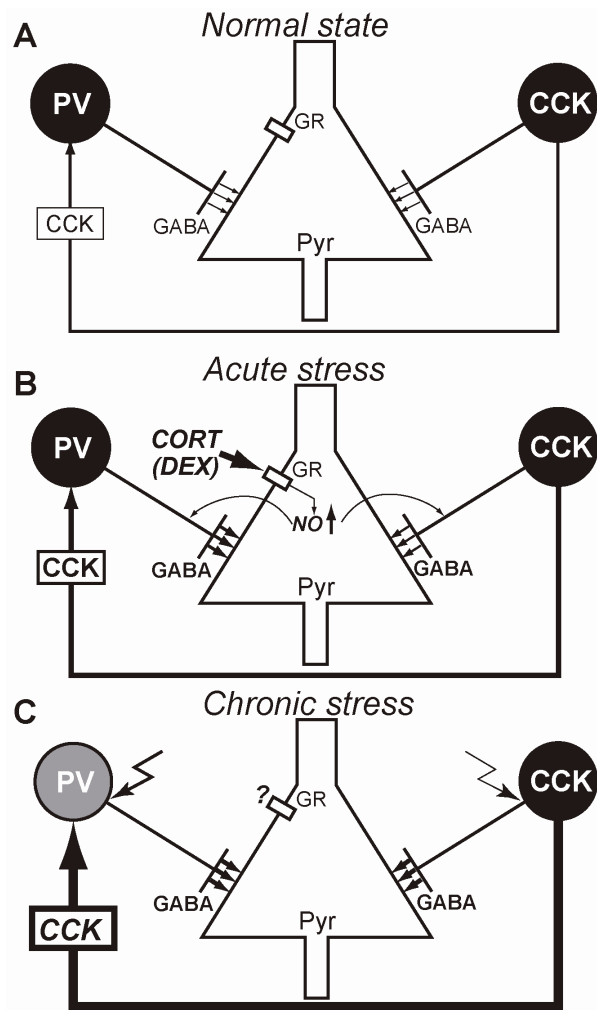
függvény igazolt. Hasonlóan, CCK8-S hatására a stresszelt állatokban a *relativ theta power* sem változott (Hu et al., 2010, 9D1, D2 és E Ábra), annak ellenére hogy a *total power* erőteljesen megnőtt. Ez azt mutatja, hogy a GABAerg ingerületátvitel facilitációja mellett a tüzelés időbeli precizitása a krónikusan stresszelt állatok CCK szenzitív PV+ sejteiben súlyosan zavart, miközben ugyanezek a paraméterek a carbachol érzékeny CCK+ sejtekben nem változnak.

MEGBESZÉLÉS

Tanulmányunkból négy teljesen új megfigyelés körvonalazható:

- 1) akut GR agonista adagolás a hippocampusz szeletben rapid sIPSC aktivitás növekedést okoz, melyet membránhoz kötött GR-ok és retrográd NO szignál közvetít
- 2) valós akut stressz a fentihez hasonló hippocampális sIPSC facilitációt okoz
- 3) krónikus stressz szintén fokozza a hippocampális GABAerg ingerület átvitelt, ez a mechanizmus Ca^{2+} dependens, és DEX kezeléssel nem lehet tovább növelni, legalábbis az sIPSC jelek tovább már nem facilitálódnak
- 4) a krónikus stressz specifikusan a PV+ sejtekből származó ritmikus sIPSC aktivitást zavarja.

Eredményeink összefoglalását és az ezekre alapozott teóriánkat a 4.8.1. Ábra mutatja. Adatainkból kiderül, hogy rövid ideig tartó DEX kezelés a hippocampális interneuronok aktivitását retrográd NO és CCK szignálok útján növeli, és pedig a piramis sejtek membránjához kötött GR molekulák közreműködésével. Feltételezzük, hogy ezeknek a membránhoz kötött glukokortikoid receptoroknak folyamatos aktivációja részt vesz a GABAerg ingerület átvitel krónikus stressz-indukált, Ca^{2+} dependens növekedésének kifejlődésében. Továbbá, mivel a hippocampális PV+ interneuronokat mind az NO mind a CCK befolyásolja, e sejtek intenzív ingerlésének eredménye előbb utóbb valamiféle celluláris és funkcionális deficit kialakulása. Tekintettel a PV+ sejteknek a hálózati oszcillációban játszott vitális szerepére (Somogyi and Klausberger, 2005; Sohal et al., 2009), e sejtekben a stressz következtében létrejött deficit rejtőzhet azoknak a megváltozott oszcillációs mintázatoknak a hátterében, melyeket gyakran látni páciensek stresszel kapcsolatos pszichiátriai betegségeiben. Ehhez hasonló mechanizmust írtak le skizofréniás betegekben, akiknél feltételezik, hogy a PV+ interneuronok működésében észlelt funkcionális deficithez megváltozott gamma-oszcillációk társulnak és ez képezné a betegségekre oly jellemző working-memória-deficit sejt szintű mechanizmusát (Lewis et al., 2005; Lodge et al., 2009).



4.8.1. Ábra

Az eredmények összefoglalása és a teoretikus következtetések.

A: Normális körülmények között, a PV+ és CCK+ sejtek két parallel, funkcionálisan eltérő, a piramis (pyr) sejtekre vetülő periszomatikus gátló sejtálózatot képeznek.

B: Akut stressz esetén, a glukokortikoid felszabadulás (CORT), egy a sejtmembránban lévő glukokortikoid receptort (GR) aktivál, és ez nitrogén monoxid (NO) felszabaduláshoz vezet. Az NO, *retrograd messenger*-ként hatva, a GABAerg axon-terminálisokból GABA felszabadulást indít. Továbbá, az NO cholecystokinin (CCK) felszabadulást is indukál, mely azután a PV+ sejteket tovább stimulálja (mivel a CCK+ sejtek a PV+ sejtekre is vetülnek).

C: Krónikus stressz során a fent vázolt mechanizmusok folyamatosan aktívak, ami folyamatos GABA felszabaduláshoz és tartós Ca^{2+} beáramláshoz vezet. Ebben az esetben a PV+ neuronok sérülékenyebb pozícióban vannak, mert őket az NO és a CCK is stimulálja. A tartósan emelkedett intracelluláris Ca^{2+} a PV+ neuronokat sérülékenyvé teszi és talán el is pusztítja őket, mindenesetre a PV+ sejtek ritmikus aktivitást generáló képessége súlyos zavart szenved. Összefoglalva, a PV+ és CCK+ sejtek közül a PV+ sejtek azok, melyek strukturális és funkcionális károsodást szenvednek a krónikus stressz hatására.

AZ ITT BEMUTATOTT KÍSÉRLETEKBEN HASZNÁLT MÓDSZEREK

Erre a célra akut, koronálisan metszett hippocampusz szeletekben (350 μm vastagság), a dorzális hippocampuszban felkeresett CA1 piramis sejteket használtunk. A fürdő összetétele (milliM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 Na_2HPO_4 , 2 MgSO_4 , 26 NaHCO_3 , 1.5 CaCl_2 , 1 aszkorbinsav, 14 glukóz. A pH 7.4, a gáz 95% O_2 - 5% CO_2 , a hőmérséklet 30°C volt. A pipetta oldat (milliM): 140 KCl, 1 CaCl_2 , 10 EGTA, 2 MgCl_2 , 0.5 $\text{Na}_2\text{-GTP}$, 4 $\text{Na}_2\text{-ATP}$, 10 HEPES, pH 7.2 értékre állítva KOH segítségével. Spontán GABAerg gátló posztzinaptikus áramokat (sIPSCs) vezettünk el -70mV tartófeszültségen 10 μM AMPA antagonistá 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (CNQX), 40 μM NMDA antagonistá 2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) és 1 μM glycine receptor antagonistá strychnine jelenlétében. Miniatur IPSC (mIPSCs) regisztráláskor 0.5 μM tetrodotoxin (TTX) is volt a tápoldatban. Csak a háttérzaj kétszeresét meghaladó jeleket értékeltük. Kontroll és stressz állatokban a zajszint nem különbözött szignifikánsan. Adatértéklésre nem használtuk azokat a sejteket, melyekben a soros ellenállás $>20\text{ M}\Omega$, a membrán ellenállás $<0.8\text{ G}\Omega$, illetve a szivárgó áram $>150\text{ pA}$ értékeket mutatott. A membrán áramokat négyfázisú Bessel filterrel (2 kHz *corner frequency*) szűrtük és 5 kHz mintavételi gyakorisággal digitalizáltuk (DigiData 1322A interface, Axon Instruments/Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Adatgyűjtésre a széles körben használt pClamp 10.1 (Axon Instruments/Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) programot használtuk. A sIPSC és mIPSC adatok amplitúdó és frekvencia analízise MiniAnalysis 6.0.9 (Synaptosoft Inc., Decatur, GA, USA) segítségével történt.

Mivel az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ befolyásolhatja a krónikus stressz hatását, a szeleteket sejt-permeabilis Ca^{2+} kelátorral (EGTA-AM, 100 μM a tápoldatban) inkubáltuk, szobahőn 30 percig. Az EGTA-AM kimosása az elvezetés megkezdése előtt történt.

A téta hullámok analízisére (*power spectrum* és autokorreláció) a Clampfit 10.1 szolgált, ez a pClamp rendszer része. Kiszámoltuk a „*relative theta power*” értékét és pedig minden egyes sejtben a 4 és 14 Hz értékekre meghatározott power spektrumot elosztva a totális 1-50 Hz power spektrummal, 10-10 másodperces sIPSC mintákban (Karson et al., 2008).

4.9. A krónikus stressz funkcionális következményei:

III: A kognitív funkciókra kifejtett hatás

BEVEZETÉS

A krónikus stressznek a kognitív funkciókra gyakorolt hatása élen vitatott téma és egymással ellentétes álláspontokat találunk az irodalomban. A leginkább elfogadott nézet szerint a kognitív funkciók egyik fontos összetevője, a memória, stressz hatására romlik (Lupien and McEwen, 1997; Lupien et al., 1998, 2007, 2009; Ohl and Fuchs, 1999), miközben más adatok szerint a memória javul, vagy legalábbis nem romlik (Conrad et al., 1999; Bowman et al., 2001; Grant et al., 2001). Ezek a megfigyelések különféle tesztek eredményein alapulnak, melyek között hippocampusz-függő feladatok is szerepelnek. Ismert, hogy a hippocampusz fontos szerepet játszik az epizódikus-deklaratív memória beíró és konszolidáló mozzanataiban (Squire, 1992; Eichenbaum, 1999, 2000). Ebben az alfejezetben azt vizsgáltuk, hogy az a krónikus stressz paradigma, amely a már korábban bemutatott kísérletekben egyértelmű morfológiai elváltozásokat okoz a felnőtt mókuscickányok hippocampuszában (4.1., 4.3.-4.7.), vajon károsítja-e a kognitív funkciókat is. Az állatoknak különböző tanulási teszteket kellett megoldaniuk, majd a kísérlet végén ellenőriztük a sejt proliferáció mértékét a hippocampusz gyrus dentatusában.

E kísérletben hat kontroll és ugyanennyi stresszelt állat szerepelt. Egy hetes szoktatási idő (0. hét) után a stressz csoport állatait 35 napon keresztül (1-5. hetek) naponta pszichoszociális stressznek vetettük alá. A kognitív teljesítményt a 0, 1, 2, és negyedik héten ellenőriztük (Bartolomucci et al., 2002, 1.A. Ábra) egy olyan tesztrel, amelyben az állatoknak egy lefedett üregekkel rendelkező táblán (*holeboard*) különböző térbeli rendszerben elrejtett ételdarabokat kellett megtalálniuk (Ohl et al., 1998).

EREDMÉNYEK

A stresszelt csoport állatai a hetek előrehaladtával a hippocampusz-függő feladatban egyre kevesebb hibát ejtettek (azaz teljesítményük az idő függvényében javult) a kontroll csoport állatainak teljesítményéhez képest (Bartolomucci et al 2002, 1.B. Ábra). Ugyanebben a feladatban a stressz nem okozott változást az ismételt próbálkozások (az előzőleg már kiürített, jutalmazott üreg újra felnyitása) számában (Bartolomucci et al 2002, 1.B. Ábra). A hippocampusz-független tanulási tesztben semmilyen változást nem észleltünk sem a stressz eredményeként, sem pedig az idő függvényében (Bartolomucci et al 2002, 1.C. Ábra). A kísérlet végén elvégzett BrdU-jelölés tanúsága szerint a stresszelt csoport állatainak gyrus dentatusában az újonnan képződött sejtek száma szignifikánsan csökkent (Bartolomucci et al 2002, 2.B. Ábra).

MEGBESZÉLÉS

Az itt bemutatott eredményeink, némiképp meglepő módon egy nagyon specifikus memória funkció markáns javulását demonstrálják olyan mókuscickányokban, melyeket 5 héten át naponta stresszeltünk. Kiemelendő, hogy ez a tanulási teljesítmény javulás csak a hippocampusz-függő feladatban és csak a referencia-memóriában

mutatkozott. Ezzel szemben, az úgynevezett munka-memória (*working memory*), azaz az ismételt próbálkozások száma nem változott egyik csoportban illetve egyik feladatban sem.

Ezek az eredmények ellentmondanak azoknak a megfigyeléseknek, melyek a stressz okozta memória zavarokról számolnak be (Lupien and McEwen, 1997; Lupien et al., 2007, 2009). Egy lehetséges magyarázat erre az ellentmondásra a különböző kísérletekben használt lényegesen eltérő metodikai megközelítésekől származhat. Ideális esetben a kognitív teljesítmény mérésére olyan tesztet kellene használni, ahol a feladat nem jelent újabb akut stresszt a már krónikusan stresszelt állatoknak, hiszen ezek másként reagálnak, mint a naív egyedek. Sajnos ez a követelmény a legtöbb korábbi kísérletben nem teljesült (Holscher, 1999; Metz et al., 2001). Például a leggyakrabban használt kognitív tesztben (a Morris féle *water-maze*) az állatok hirtelen egy számukra életveszélyes helyzetbe kerülnek, és azt várják el tőlük, hogy megjegyezzék azt az egy bizonyos pontot a térben, ahol a víz alatti sziget van (Holscher, 1999). Mi a kísérletünkben olyan tesztelési módszereket alkalmaztunk, melyek segítségével az állatokat saját ketrecükben lehetett vizsgálni, elkerülve a nem kívánatos újabb stressz faktorokat, és táplálék megvonást sem kellett alkalmazni (ami szintén gyakori eljárás az állatok tesztelésénél). A *holeboard* teszt apparátus nem igényli az állatok kézbevitelét, sem idegen környezetbe helyezését, továbbá fontos az is, hogy kísérletünkben az állatok már a stresszelés megkezdése előtt találkoztak a feladattal. Ezzel szemben a legtöbb korábbi kísérlet több hetes stressz után kezdte el tanítani az állatokat egy számukra teljesen idegen, új feladatra (Holscher, 1999; Metz et al., 2001).

Ebben a kísérletben a stresszelt állatok hippocampusának gyrus dentatusában csökkent a neuronok proliferációja, ennek ellenére ugyanezek az állatok a hippocampus függő tesztben jól teljesítettek, sőt jobban, mint a kontroll állatok. Mindmáig nem ismert a felnőtt hippocampusban folyamatosan képződő neuronok pontos funkcionális szerepe. Nagyon sok tanulmány igyekszik bizonyítani az újszülött szemcsesejtek szerepét a hippocampusra jellemző tanulási és memória funkciókban (Bruehl-Jungerman et al., 2007; Imayoshi et al., 2008; Dupret et al., 2007, 2008; Balu and Lucki, 2009; Garthe et al., 2009; Coras et al., 2010; Deng et al., 2010; Sahay et al., 2011). A mi itt bemutatott eredményeink közvetlenül nem támogatják ezt a hipotézist. Ennek az ellentmondásnak a feloldására több lehetséges magyarázat létezik. A számos korábbi kísérletben a felnőttkori neurogenesis aktív szerepe nem mindenfajta tanulási tesztben mutatható ki, hanem úgy tűnik, hogy ez az összefüggés bizonyos mértékig teszt-függő. Továbbá, a felnőttkori neurogenesis feltehetően a tanulási folyamatok csak bizonyos specifikus fázisában játszik szerepet, illetve csak specifikus információk tárolásában kritikus (Aimone et al., 2006, 2010; Balu and Lucki, 2009; Deng et al., 2010).

AZ ITT BEMUTATOTT KÍSÉRLETEKBEN HASZNÁLT MÓDSZEREK

A kognitív készséget egy olyan teszttel vizsgáltuk, amelynek lényege, hogy az állatoknak egy fedett üregekkel rendelkező táblán (*holeboard*) különböző térbeli rendszerben elrejtett ételdarabokat kellett megtalálniuk (Ohl et al., 1998). A teszt eszközt specifikusan a mókuscickányok saját ketrecére méreteztük és minden egyednek saját táblája volt (a szag ingerek miatt).

A tesztelésre szolgáló eszköz matt PVC táblából készült (mérete: 65 x 20 x 1 cm). Rajta, illetve benne három párhuzamos sorban elrendezett 23, egyenként 2 x 0.7 cm méretű, könnyen mozdítható fedővel ellátott kis körkörös lyuk (gödör / üreg) volt. Ezekbe a gödrökbe helyeztük azokat a mandula darabokat, amelyeket az állatoknak meg kellett találniuk. Az eszköz a mókuscickányok természetes táplálékkereső magatartásához igazodott azzal, hogy az állatokat öt, fedett, de nyitható, táplálékot tartalmazó üreg felkeresésére készítette, melyeket a többi, jutalmat nem tartalmazó üreg között véletlenszerű (random) módon helyeztünk el.

Kétféle tesztet alkalmaztunk. Egyikben, melyet hippocampusz-dependensnek (Ohl et al., 1998), tartunk, minden egyes napon új, random térbeli elrendezésű, öt, mandulával töltött üregben kellett az állatoknak a mandula darabokat megtalálni. Egymás után két próbát futtattunk. Az első próbában (*cue-directed*) a mandulát tartalmazó lyukakat színezett fedővel jelöltük, míg a másodikban (*non cue-directed*) a színes jelölést elhagytuk. Ezzel szemben a hippocampusz független teszt esetén a két próbában a jutalmazott lyukak mindig egy sorban, az egész kísérletsorozat során konstans elrendezésben helyezkedtek el. Továbbá ebben a feladatban a jutalmazott lyukakat mindig színes fedőlappal jelöltük.

A kísérlet előtt négy felkészítő napot tartottunk, melynek során a jutalmazott üregek helyét és számát random módon variáltuk. Ennek célja az állatoknak a teszt feladathoz szoktatása és betanítása volt anélkül, hogy számukra kiderült volna a rákövetkező valós tesztben használandó információ. A tesztelő eszközöket (táblákat) csak a teszt idejére tettük a ketrecbe, mindig a szélességük és hosszúságuk szerint azonos helyzetben, az üregekbe előre berakott szárított mandula darabakkal. Az egyes próbák időtartamát 15 percre korlátoztuk és a két feladat között konstans, 30 perces szünetet tartottunk. A tesztek napi időpontját, végig a kísérlet során, random módon variáltuk.

A feladat közben sikeresen megtalált és kiürített (jutalmazott) üregeket a próbák közti időben nem töltöttük fel újra. Minden feladat során számoltuk a rossz választásokat (nem jutalmazott üregek felnyitása) és az ismételt próbálkozásokat (előzőleg már kiürített, jutalmazott üreg újra felnyitása). Ezeket az adatokat az úgynevezett referencia és munka (*working*) memóriák specifikus mérőszámainak tekintettük. Ez a kétféle memória típus különböző agyi központok aktív közreműködését igényli (van der Staay, 1999).

4.10. Krónikus stressz indukálta sejtszintű reakciók a prefrontális kortexben

BEVEZETÉS

Korábbi alfejezetek foglalkoztak azzal, hogy az átélt stressz epizódok jelentősen és hátrányosan befolyásolják a hippocampusz neuronjainak plaszticitását. Habár ebből a szempontból a hippocampusz a legintenzívebben vizsgált struktúra, ismeretes, hogy a krónikus stressz befolyásolja a limbikus rendszer egyéb részeinek (pl. prefrontális kortex, amygdala) plaszticitását is (Vyas et al., 2002; Fuchs et al., 2004b; Radley and Morrison, 2005; Czéh et al., 2008; Holmes and Wellman, 2009). Ebben az utolsó alfejezetben foglaljuk össze azokat a kísérleteinket, melyekben az állatok prefrontális kortexét vizsgáltuk.

A prefrontális kortex (PFC) számos magasabbrendű kognitív funkció szabályozásáért felelős. Ilyenek például a tanulás, memória, esemény-társítás, a feladatok időbeliségének rendezése, bizonyos lokomotoros aktivitások regulálása, térbeli tájékozódás, döntéshozó képesség és célorientált magatartás (Thierry et al., 1994; Vertes, 2006). A PFC közismerten kulcsszerepet játszik az olyan magatartások koordinálásában, melyekhez a munka-memória (*working memory*) funkciói szükségesek. Ilyenkor az aktuális magatartási mintázatok megtervezéséhez a hosszú távra tárolt emlényomok visszahívása, és a rövidtávú emlényomok együttes hasznosítása történik, miközben az irreleváns információkat és a felesleges reakciókat a PFC kiszűri és legátolja (Robbins et al., 1996; Ramos et al., 2007). A PFC fontos szerepet játszik a stressz-keltette autonóm és endokrin reakciók szabályozásában is. A hippocampuszhoz hasonlóan, a PFC szintén negatív visszacsatolással befolyásolja a HPA-tengelyt (Herman, et al., 2003), valamint más agyi struktúrák stressz-reakcióit is (Amat et al., 2005; Pascucci et al., 2007). Ismert, hogy a PFC areákban a glukokortikoid receptorok nagy számban vannak jelen, mind főemlősökben, mind pedig kísérleti patkányokban (Meaney and Aitken, 1985; McEwen et al., 1986; Diorio et al., 1993; Sanchez et al., 2000). Patkány PFC régiójába ültetett kortikoszteron implantátumok csökkentik a stressz-keltette ACTH felszabadulást a hypofízisben valamint a mellékvese kéreg kortikoszteron szekrécióját akut vagy ismételt stressz hatására (Akana et al., 2001; Diorio et al., 1993). Végül említésre méltó, hogy emberben a PFC emóciókban játszott szerepe lateralizált vagyis féltekére specifikus (Davidson, 1998). Kevésbé köztudott, hogy alacsonyabbrendű emlősökben is észlelhető a PFC funkcióinak lateralizációja (Carlson et al., 1991, 1993; Sullivan and Gratton, 1999; Gratton and Sullivan, 2005).

Kísérletünkben elsősorban arra voltunk kíváncsiak, vajon a krónikus stressz illetve az antidepresszáns kezelés, hogyan hat a sejtek – esetleg neuronok – képződésére a PFC-ben. Mint azt korábban említettük, újszülött neuronokat írtak le még főemlősök több kortikális régiójában is, bár erre nézve negatív közlések is léteznek (Gould et al., 1999c; Bernier et al., 2002; Kornack and Rakic, 2001; Rakic, 2002b; Cameron and Dayer, 2008). Továbbá korábbi tanulmányok szerint az antidepresszáns kezelések (fluoxetin, elektrokonvulzív shock) nemcsak a gyrus dentatus (DG) sejtjeinek proliferációját fokozzák, hanem felnőtt patkány mediális PFC (mPFC) strukturájában is hasonló változás jelenik meg (Kodama et al., 2004; Madsen et al., 2005). Az antidepresszánsoknak a PFC strukturájára kifejtett hatását az idézett szerzők csak egészséges (kontroll) állatokban vizsgálták (Kodama et al., 2004; Madsen et al., 2005). Ez a megközelítés ellentmond a klinikai gyakorlatnak, ahol az antidepresszáns kezelés és az elektrokonvulzív terápia a depresszióban nem szenvedő a

páciensekben majdnem biztosan nem kelti azokat az idegrendszeri változásokat, melyeket ugyanezen kezelések kapcsán depressziós betegekben lehet megfigyelni.

Az itt tárgyalandó munkánkban a patkányokban kidolgozott krónikus pszichoszociális alárendelődés stressz (*social defeat stress*) paradigmát használtuk, mint a depresszió egyik lehetséges állapotmodelljét (Rygula et al., 2005, 2006, 2008). Állatainkat 5 héten át stresszeltük, de egy részük a kísérlet második hetétől kezdődően 4 héten át naponta, orálisan, 10 mg/kg fluoxetin kezelést kapott. Mint korábban is, az osztódó sejteket BrdU-val jelöltük, és a sejtek proliferációját, illetve az újszülött sejtek túlélését kvantitatív sztereológiai módszerekkel határoztuk meg. Kísérletünk fókuszában az mPFC volt, de analizáltuk a hippokampuszt mint pozitív kontroll struktúrát és két nem limbikus agyrészt, azaz a primer motoros kérget és a szubventrikuláris zónát is, melyek mint negatív kontroll régiók szerepeltek. E kísérlet tervének pontos részleteit a Czéh et al., 2007 első ábrája mutatja.

EREDMÉNYEK

Stressz és antidepresszáns kezelés a hippokampuszban ellentétesen hat a sejt proliferációra

Kísérletünkben az idegsejtek proliferációs aktivitását úgy határoztuk meg, hogy az állatokba a kísérlet utolsó napján BrdU-t injektáltunk, majd 24 órával később az állatokat megöltük és megszámoltuk a BrdU pozitív (BrdU+) sejteket a DG-ban (Czéh et al., 2007, 1a Ábra). A szövettani elemzés azt mutatta, hogy krónikus pszichoszociális stressz után a BrdU+ sejtek száma mintegy 25%-al csökkent a kontroll állatok adataihoz képest (Czéh et al., 2007, 3a. Ábra). A stresszelt állatok fluoxetin kezelése kivédte a stressz hatását. Az ilyen kezelésen átesett állatokban a BrdU-immunoreaktív sejtek száma a normál értékkel volt azonos, viszont a csak stresszelt csoporthoz képest szignifikáns különbség mutatkozott (Czéh et al., 2007, 3a Ábra). Csak fluoxetin kezelés (stressz nélkül) a kontroll állatokban nem okozott szignifikáns proliferáció növekedést (Czéh et al., 2007, 3a Ábra).

Stressz és antidepresszáns kezelés a hippokampuszban ellentétesen hat az újszülött sejtek túlélésére is

A stressz illetve a fluoxetin kezelése az újszülött sejtek azon csoportjának túlélésére gyakorolt hatásait ellenőriztük, melyek a beavatkozások korai időszakában generálódtak és így a fluoxetin kezelés első hetének végén beadott BrdU injekcióval jelölhetők (Czéh et al., 2007, 1a Ábra). A vizsgált csoportokban a DG szövetében túlélő BrdU+ sejtek száma a Czéh et al. (2007) 3b Ábráján látható. Stressz hatására a BrdU jelölt sejtek száma 55 százalékkal szignifikánsan csökkent. Stresszelt állatok fluoxetin kezelése a BrdU+ sejtek számának szignifikáns növekedését eredményezte (a csak stresszelt állatokéhoz képest), miközben a kontroll állatokban alkalmazott fluoxetin kezelés nem hatott az újszülött sejtek túlélésére (Czéh et al., 2007, 3b Ábra).

Stressz és antidepresszáns kezelés ellentétesen regulálja a sejtproliferációt az mPFC szövetében is

A hippokampuszhoz hasonlóan, krónikus stressz gátolta a sejtproliferációt az mPFC-ben is. A bal féltekében –55%-os, a jobboldaliban –32%-os csökkenést észleltünk (Czéh et al., 2007, 4A és B Ábra). A stresszelt állatok fluoxetin kezelése mindkét féltekében növelte a proliferációs aktivitást, melynek eredményeként szignifikáns különbség volt a stressz és stressz + fluoxetin csoportok között (Czéh et al., 2007, 4A és B Ábra). Kontroll állatokban a fluoxetin kezelés csupán gyenge (+16%-os) növekedést okozott, mely nem volt szignifikáns.

Stressz és antidepresszáns kezelés ellentétesen hat az mPFC újszülött sejtjeinek túlélésére

A stressz csökkentette mind a bal (–49%), mind a jobb (–29%) féltekében az újonnan született sejtek túlélő hányadát (Czéh et al., 2007, 4C és D Ábra). A stresszelt állatok fluoxetin kezelése kivédte a stressz hatását, míg kontroll állatok fluoxetin kezelése nem okozott szignifikáns változást (Czéh et al., 2007, 4D Ábra).

Az agyféltekék aszimmetriája a prefrontális kéregben

Jó oka van annak, hogy a kétoldali mPFC areát egymástól megkülönböztetve tanulmányoztuk, hiszen e részek funkcionális aszimmetriáját még patkányban is fel lehet ismerni (Sullivan and Gratton, 1999, 2002). Amint az közleményünk (Czéh et al., 2007) 5. ábráján látszik, a féltekék eltérései már a kezeletlen (kontroll) állatok kétoldali mPFC agyrészeiben észlelt cytogenezis összehasonlításakor észlelhetők. Az ilyen állatokban úgy a proliferatív aktivitás, mint az újonnan született sejtek túlélése a bal féltekében magasabbnak mutatkozott, mint a jobboldaliban. Krónikus pszichoszociális stressz e két jelenséget (proliferatív aktivitás és az újonnan született sejtek túlélése) a baloldali féltekében fokozottabb mértékben csökkentette. Ennek eredményeként az aszimmetria megfordult, mert most a jobboldali mPFC agyrészben észleltük a (megmaradt) cytogenetikus jelek magasabb értékeit. A kezeletlen kontroll állatokban észlelt adatokkal ellentétben, fluoxetin kezelés csökkenti illetve eltünteti a féltekék közti aszimmetriát úgy a kontroll, mint a stresszelt állatokban (Czéh et al., 2007, 5.Ábra).

Érdekes módon ez a veleszületettnek vélt féltekei aszimmetria nemcsak a cytogenezis szempontjából jelentkezett, hanem egy másik morfológiai vizsgálatban, mégpedig az mPFC piramis sejteinek dendritelágazódásának elemzésekor is feltűnt (Czéh et al., 2008; Perez-Cruz et al., 2009). Elemzésünk nemcsak az mPFC szubáreái között, hanem a hemiszfériumok összehasonlításakor is szignifikáns különbségeket tárt fel. Amint azt munkánk (Czéh et al., 2008) 2. ábráján bemutatjuk, a kontroll állatokban az felső-elülső (*dorsalis anterior*) cinguláris kéreg részben lévő III. rétegi piramis sejtek dendritelágazódási mintázata nem különbözött a két félteke között. Ezzel szemben, ha a pre-limbikus areát elemeztük, akkor a jobboldali kéregben az apikális dendritek középső és disztális része hosszabbnak mutatkozott, mint a baloldaliaké. Hasonlóan, a jobboldali infralimbikus kéregben is a piramis sejtek apikális dendritjei voltak hosszabbak, de ezúttal a szómához közeli régióban (Czéh et al., 2008, 2. Ábra). Huszenegy napig tartó immobilizációs (*restraint*) stressz elsősorban a jobboldali féltekében okozott elváltozást és ennek folytán redukálódott a sajátos féltekei aszimmetria (Czéh et al., 2008, 2. Ábra). Féltekei különbséget a prelimbikus kéreg

piramis sejtjeinek a bazális dendritfájában, valamint annak túske számában is ki tudtunk mutatni (Perez-Cruz et al., 2009).

Az újonnan képződött sejtek fenotípusának elemzése

Amint közleményünk (Czéh et al., 2007) hatodik ábráján látni lehet, a DG-ban BrdU+ sejtek többsége (70-77%) egy neuron specifikus markerrel (NeuN) is jelölődött, míg egy kisebb részük (5-13%) az asztroglia specifikus markerrel (GFAP) mutatott kettős jelölődést. Ezek az arányok nem különböztek a különböző kezeléseken átesett állatcsoportokban. Más glia markereket is kipróbáltunk, de a dentátuszban a GFAP jelölte meg a BrdU+ glia sejtek többségét, és ez az eredmény megegyezik a korábbi megfigyelésekkel (pl. Malberg et al., 2000; Czéh et al., 2002).

Szemben a DG-ban megfigyeltékkel, a prefrontális kéregben egyáltalán nem találtunk olyan újszülött sejteket, melyek neuronális markert expresszáltak volna. Ebben az areában a BrdU+ sejtek többsége (63-80%-a) NG2-pozitívnak mutatkozott, mely egy oligodendroglia prekursor marker. A BrdU+ sejtek egy kisebb hányada (16-21%-a) endothél sejtnek mutatkozott, mivel ezek a RECA-1 antitesttel jelölődtek. A kettősen jelölt sejtcsoportok aránya a különböző kezeléseknél átvett állatok között nem volt szignifikánsan eltérő. Próbáltunk még egyéb markereket is, de ezek nem jelölték a BrdU+ sejteket. A sok negatív lelet illusztrálását feleslegesnek véljük.

A nem limbikus agyrészekben észlelt cytogenezist alig befolyásolja a stressz illetve a fluoxetin kezelés

Még két további agyrészben is ellenőriztük a sejtosztódás ütemét. A primer motoros kéregből és a szubventrikuláris zóna / rostrális migrációs vonal mentén lévő szövetből származó mintákban vizsgáltuk, hogy vajon változik-e bennük a cytogenezis mértéke a stressz illetve fluoxetin kezelés hatására. Amint azt munkánk (Czéh et al., 2007) hetedik ábrája mutatja, sem a stressz sem a fluoxetin kezelés után, sem a proliferációs aktivitásban sem pedig a túlélési arányban nem alakult ki statisztikailag szignifikáns effektus.

MEGBESZÉLÉS

Munkánk három új eredményt hozott felszínre. Először is demonstráltuk, hogy a krónikus stressz nemcsak a hippocampusban gátolja a cytogenezist, hanem az mPFC areában is. Másodszor demonstráltuk, hogy a stressz fenti gátló hatását mindkét struktúrában (gyrus dentatus és mPFC) antidepresszáns kezeléssel blokkolni lehet. Továbbá, mind a stressz, mind az antidepresszáns kezelés hatása specifikus volt a limbikus struktúrákra, mivel sem a primer motoros kéregben, sem a szubventrikuláris zónában ezek a kezelések nem okoztak lényeges változást. Harmadszor, úgy véljük, hogy jelen vizsgálatunk hozta felszínre a felnőtt patkány mPFC areáiban az első adatokat arról, hogy a cytogenezis mértéke az agyféltekék közt sajátos aszimmetriát mutat. Egészséges kontroll állatokban úgy a proliferációs aktivitás, mint az újonnan született sejtek túlélésének aránya a baloldali mPFC areában mindig kifejezettebb, mint a jobboldaliban. Krónikus stressz a baloldali mPFC areában okozott hatásosabb gátlást, és ennek eredményeként a féltekei aszimmetria megfordult. Érdekes megfigyelésünk,

hogy a fluoxetin kezelés megszüntetni látszik ezt a fajta féltekei aszimmetriát úgy a kontroll, mint a stresszelt állatokban.

Napjaink stressz kutatásaiban a PFC jelentős figyelmet kapott, elsősorban ennek az agyterületnek az affektusok szabályozásában, illetve a hangulatzavarokban játszott szerepe miatt (Drevets, 2000). Az állatkísérletek tanúsága szerint krónikus stressz kapcsán az mPFC areában megváltozik a piramis sejtek dendritfájának morfológiája, csökken az apikális dendritfán a tüskék sűrűsége, hasonlóan, mint ahogy azt a hippocampus CA3 régiójában korábban leírták (Cook and Wellman, 2004; Radley et al., 2004, 2006). Éppúgy mint a hippocampus esetében, szintetikus glukokortikoid kezelés az mPFC atrófiáját és benne a neuronok számának csökkenését okozza (Cerqueira et al., 2005). Eredményeink ezeket az ismereteket azzal egészítik ki, hogy a krónikus pszichés stressz kapcsán az mPFC areában észlelt cytogenezis nagymértékben csökken. Mivel a stressz a depresszió kifejlődésének fontos rizikó faktora (Kessler, 1997; Kendler et al., 1999), a stresszelt állatok agyában detektálható sejtszintű morfológiai elváltozások feltehetően azonosak azzal, amit depressziós páciensek agyában is észlelhetnénk, ha azok vizsgálata nem lenne olyan problematikus. Igaz, a közelmúltban jelentek meg adatok arra vonatkozóan, hogy azok a piramis sejt dendritfáját érintő elváltozások, amelyeket krónikusan stresszelt állatokban leírtak, depressziós betegekben is kimutathatók (Hercher et al., 2010; Soetanto et al., 2010). Jól ismert az is, hogy az ilyen betegekben a PFC area térfogata is szelektíven csökken (lásd az *in vivo* képkalkító eljárások adatait pl. Drevets, 2000). Ezenkívül e páciensek frontális agykérgének specifikus régióiból nyert poszt-mortem szövettani leletek a neuronok méretének és a gliasejtek számának redukciónak mutatják (Öngür et al., 1998; Rajkowska et al., 1999; Cotter et al., 2001a, 2002; Uranova et al., 2004). Nem kizárt, hogy a mi saját, a krónikus stressz után észlelt határozott gliagenezis csökkenésre vonatkozó leleteink esetleg kapcsolatba hozhatók azokkal a glia sejtszám abnormalitásokkal, melyeket depressziós páciensek agyának fronto-limbikus részeiben figyeltek meg (Rajkowska and Miguel-Hidalgo, 2007).

Mint ahogy azt a Bevezetőben (1.3.) taglaltuk máig sincs egyetértés abban, hogy vajon a kifejlett neokortexben képződnek-e új neuronok (Gould et al., 1999c; Bernier et al., 2002; Kornack and Rakic, 2001; Rakic, 2002b; Dayer et al., 2005; Cameron and Dayer, 2008). Jelen munkánk egyik fontos célja volt az mPFC areában képződő sejtek fenotípusának meghatározása. Leleteink szerint ebben a kortikális régióban az újszülött sejtek többségéből a differenciálódás után NG2+ glia, míg egy kisebb hányadából endothel sejt lett. Hasonló leletekről számoltak be korábban mások is így Kodama et al. (2004) és Madsen et al. (2005). Habár több neuron specifikusnak ismert sejtmarkert is kipróbáltunk, nem találtunk arra utaló jeleket, hogy a neokortexben újszülött neuronok lennének. Negatív leletünk talán annak rovására írható, hogy mások, így Dayer et al. (2005) sokkal több BrdU jelölő anyagot injektáltak az állatokba és jóval hosszabb túlélési idővel dolgoztak. Ismert, hogy különböző BrdU adagolási protokollok, szignifikánsan eltérő eredményeket hozhatnak.

Az emberi agy féltekei specializációja jól ismert, és számos tanulmány igazolja, hogy más emlősökben, köztük rágcsálókban is létezik bizonyos fokú lateralizáció (Sullivan and Gratton, 2002; Sullivan, 2004). Az emberi agy frontális lebenyének funkcionális aszimmetriája nemcsak normális körülmények között észlelhető, hanem különféle pszichopatológiai állapotokban is megfigyelték a féltekei lateralizáció módosulását (Bench et al., 1992; Davidson, 1992). Az emocionális folyamatokra vonatkozó újabbkori agymodellek feltételezései szerint, a pozitív (megközelítéssel kapcsolatos) emóciók elsősorban a bal féltekei aktivitáshoz köthetők, míg a negatív

(visszahúzóással, inger kerüléssel kapcsolatos) emóciók “képviselte” inkább a jobboldali féltekében van (Rotenberg, 2004). Ez az elképzelés – mely ugyan sokak szerint túlságosan is leegyszerűsített – azokon a klinikai megfigyeléseken alapszik, melyek a bal félteke sérülése után depressziós tüneteket, míg a jobb félteke sérüléseit követően eufóriás állapotot írnak le (pl. Starkstein and Robinson, 1988; Rotenberg, 2004; Shenal et al., 2003). Még nem tudjuk, hogy a mi leletünknek, mely szerint a mPFC areában zajló cytonezis sajátos lateralizációt mutat, van-e funkcionális jelentősége, de vonzó az a gondolat, hogy e jelenségnek valami köze lehet az emocionális folyamatok klinikumban leírt lateralizációjához. Elképzelhető, hogy a miáltalunk feltárt sejtszintű anatómiai különbségek a kétoldali mPFC-ben a féltekék funkcionális aszimmetriájának tükröződései. Eredményink szerint kontroll patkányok baloldali mPFC areájában magasabb a sejtkepződési aktivitás, és ez talán annak a tünete, hogy normális körülmények között a baloldali a “domináns” félteke. Mivel krónikus stressz kapcsán a bal mPFC areában erősebb a cytogenezis gátlása, emiatt az aszimmetria végül megfordul. A stresszelt állatokban a jobboldalon magasabb a cytogenezis, amely ennek az agyrésznek a tartós stressz közben érvényesülő hiperaktíválódását tükrözheti. Ez az elképzelés azon alapszik, hogy emberben az elektroencefalográfiás (EEG) vizsgálatok depressziós állapotokban a bal félteke csökkent aktivitását dokumentálják (Sullivan and Gratton, 2002; Shenal et al., 2003). Ezzel párhuzamosan, szorongásos kórképekben jobb féltekéi hiperfunkciót írnak le (Sullivan and Gratton, 2002; Shenal et al., 2003). Hipometabolizmus és a baloldali PFC area térfogatának csökkenése is társul a depressziós hangulatzavarokhoz (Drevets et al., 1997; Drevets, 2000). E humán leletekkel kapcsolatba hozhatóak azok az állatkísérletes adatok, melyek az PFC area funkcionális lateralizációjáról szólnak úgy stressz kapcsán mint erőteljesen emocionális helyzetekben (Sullivan and Gratton, 2002). Például, majmokban végzett EEG vizsgálatok bizonyítják, hogy a jobb oldali frontális kéreg fokozott aktivitásához magasabb szérumban kortizol szint társul, és az ilyen állatok különösen félénk magatartást mutatnak (Kalin et al., 1998). Mindez arra utal, hogy a jobb frontális lebeny fokozott aktivitása a stresszként megélt, szorongásos állapotokban fordul elő. Kísérleti patkányokból származó adatok bizonyítják azt is, hogy a jobboldali mPFC közvetlen anatómiai kapcsolatban áll más, a stressz-reakciót reguláló agyi központokkal (Sullivan and Gratton, 1999, 2002; Sullivan, 2004). Összegezve, azt gondoljuk, hogy a fent ismertetett sejtszintű elváltozások szerepet játszhatnak a depressziós páciensek frontális kérgében leírt strukturális és funkcionális abnormalitások kialakulásában.

5. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS AZ EREDMÉNYEK

JELENTŐSÉGE

Igaz ugyan, hogy kísérleteink többségét egy olyan egzotikus állatfajban végeztük, mellyel többségünk talán soha életében nem találkozik, kutatási témaválasztásunk mégis egy nagyon is valóságos problémát érint, hiszen a mai felgyorsult világban a krónikus stressztől mentes életet csak nagyon kevesen engedhetik meg maguknak.

Hangsúlyozni szeretnénk, hogy kísérleti eredményeink többsége a maga idejében az irodalomban első közlés volt. Munkánk értékét aláhúzza, hogy megfigyeléseinket több laboratóriumban utánvizsgálták és sikeresen reprodukálták.

A következő főbb eredményeket tártuk fel:

5.1. Kimutattuk, hogy a krónikus stressz a felnőtt hippocampusban zajló neurogenézist gátolja. Ez a gátló hatás mind a sejtek proliferációs aktivitására, mind pedig az újszülött neuronok túlélési esélyeire egyformán érvényesül.

5.2. Meghatároztuk az életkor egészen korai szakaszában, akár prenatálisan is, elszenvedett stressznek a felnőttkori neurogenézisre illetve a hippocampusz térfogatára gyakorolt hosszú távú következményeit. Eredményeink szerint a prenatális stressz rézus majmokban pszicho-motoros és neuro-endokrin fejlődési zavarokhoz vezet. Ugyenezen spécieszben a hippocampusz fejlődése is sérül, mert a krónikusan stresszelt állatokban a hippocampusz térfogata kisebb marad és ugyanitt a felnőttkori neurogenézis előfordulása is szignifikánsan ritkul. Mivel ezek az adatok főemlősökből származnak, ezért ezek a folyamatok emberben is nagy valószínűséggel hasonlóképpen játszódnak le.

5.3. Kimutattuk, hogy antidepresszáns kezelés ellensúlyozni képes a stressz hippocampális felnőttkori neurogenézisre gyakorolt gátló hatását. Az antidepresszánsok eme hatását azóta számos kutatócsoport fejlesztés alatt álló antidepresszáns kezelések tesztelésére próbálja használni. Saját kísérleteink eredményei azonban óvatosságra intenek, mert tapasztalatunk szerint pl. a TMS nem képes az AN-t stimulálni, pedig ez az eljárás időközben hivatalosan, az US FDA által is elfogadott és engedélyezett antidepresszáns kezelés lett. Ugyanakkor, habár mi az NK₁-receptor antagonisták AN-t stimuláló hatása szempontjából pozitív eredményeket értünk el, mégis a klinikai tesztekben ezek a szerek később sorra elbuktak.

5.4. Kimutattuk, hogy az a hippocampális térfogat csökkenés, melyet a humán klinikai vizsgálatok gyakran igazolnak, például depressziós betegekben, vagy egyéb stressz élményekkel kapcsolatos pszichiátriai megbetegedésekben, kísérleti állatokban tartós stressz következményeként is jelen van. Eredményeink szerint azonban e térfogat csökkenés hátterében nem a hippocampusz neuronjainak tömeges pusztulása áll. Érdekes módon úgy tűnik, hogy az antidepresszáns kezelésnek mind a hippocampusz térfogatára, mind az apoptotikus sejtek előfordulási valószínűségére gyakorolt effektusa a stressz hatását ellensúlyozhatja.

5.5. Eredményeink szerint, a hippocampusz stressz-indukálta zsugorodása háttérben többek között a gliasejtek (asztrociták) pusztulása, illetve a hippocampusz kapillarizációjának csökkenése is szerepelhet.

5.6. A krónikus stressz funkcionális következményeit vizsgálva meglepő eredményeket kaptunk. Például a hippocampusz CA3 piramis sejtjeinek aktív elektrofiziológiai tulajdonságai csak kismértékben változnak, pedig ezek a neuronok krónikus stressz hatására szignifikáns dendritfa átrendeződéssel reagálnak. Várakozásunkkal ellentétben, krónikusan stresszelt mókuscickányok hippocampusz-dependens memória feladatokban való tesztelésekor nem láttunk kognitív deficitre utaló jeleket. Végül, a krónikus stressz GABAerg neuronok hálózatára gyakorolt hatásának vizsgálata közben, meglepetésünkre, azt találtuk, hogy a stressz elsősorban a csak kevésbé plasztikusnak tartott parvalbumin-pozitív sejtek működését befolyásolja. Érdekes módon ez utóbbi kísérletünk mintegy „mellékleletként” a „*membrane-bound*” glukokortikoid receptorok létezésének további bizonyítékait találtuk.

5.7. Kimutattuk, hogy a prefrontális kortexben tartós stressz, illetve antidepresszáns kezelés hatására a hippocampuszhoz nagyon hasonló sejtszintű elváltozások keletkeznek. Ugyanakkor, eredményeink szerint a kifejlett prefrontális kortexben képződő sejtek többsége glia, vagyis ebben a régióban a stressz és az antidepresszáns kezelés elsősorban a gliogenezist regulálja. Ezenkívül további bizonyítékokat találtunk a prefrontális kéreg féltekei lateralizációjára nézve, mely a neuronok dendritfájának morfológiájában és a kortexben zajló gliogenezis mértékében jelenik meg.

Két megjegyzés munkásságunk jelentőségének kiemelésére:

A kilencvenes évek végén mi voltunk az egyetlen kutatócsoport, mely krónikus pszichoszociális (*social defeat*) stresszel próbálta modellezni a major depressziós megbetegedést. Paradigmánkat eredetileg mókuscickányokra dolgoztuk ki és alkalmasságát kísérletek sorában bizonyítottuk. Eljárásunkat később több kutatócsoport átvette. Mókuscickányok hiányában, kellő körültekintéssel, paradigmánk patkányokban és egerekben is jól használhatónak bizonyult, mely tény ma, a transzgenikus egerek korszakában, különösen fontos.

Úgy véljük, hogy a depresszió patofiziológiájának feltárását elősegítő állatmodell kidolgozása érdekében tett erőfeszítésünk sikeres volt. Munkánk során abban bízunk, hogy azok a sejtszintű elváltozások, melyeket mi és mások a krónikusan stresszelt és antidepresszánsal kezelt állatok hippocampuszában illetve prefrontális kérgében látunk, a depressziós betegek agyában lejátszódó elváltozásokhoz hasonlóak. A közelmúltban napvilágot látott klinikai vizsgálatok szerint igazunk volt, mert ezek a közlések az emberi agyban is hasonló sejtszintű elváltozásokra utaló bizonyítékokról számoltak be, így például Boldrini et al. (2009), MacQueen and Frodl (2010), Hercher et al. (2010), Soetanto et al. (2010). Mindezek a megfigyelések a depresszió neuroplaszticitás-teóriájának alapját képezik (Pittenger and Duman, 2008).

6. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

A szövegben az értekezés alapjául szolgáló közleményekre való hivatkozásokat aláhúzással jelöltem!

Bartolomucci A, de Biurrun G, **Czéh B**, van Kampen M, Fuchs E (2002) Selective enhancement of spatial learning under chronic psychosocial stress.
European Journal of Neuroscience **15**: 1863-1866.

Coe CL, Kramer M, **Czéh B**, Gould E, Reeves AJ, Kirschbaum C, Fuchs E (2003) Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile rhesus monkeys.
Biological Psychiatry **54**: 1025-1034.

Czéh B, Lucassen PJ (2007) What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated?
European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience **257**: 250-260.
Invited review

Czéh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A, Fuchs E (2001) Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **98**: 12796-12801.

Czéh B, Welt T, Fischer AK, Erhardt A, Schmitt W, Muller MB, Toschi N, Fuchs E, Keck ME (2002) Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis.
Biological Psychiatry **52**: 1057-1065.

Czéh B, Pudovkina O, van der Hart MG, Simon M, Heilbronner U, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, Fuchs E (2005a) Examining SLV-323, a novel NK1 receptor antagonist, in a chronic psychosocial stress model for depression.
Psychopharmacology (Berlin) **180**: 548-57.

Czéh B, Simon M, van der Hart MG, Schmelting B, Hesselink MB, Fuchs E (2005b) Chronic stress decreases the number of parvalbumin-immunoreactive interneurons in the hippocampus: prevention by treatment with a substance P receptor (NK1) antagonist.
Neuropsychopharmacology **30**: 67-79.

Czéh B, Fuchs E, Simon M (2006) NK1 receptor antagonists under investigation for the treatment of affective disorders.
Expert Opinion on Investigational Drugs **15**: 479-486. Invited review

- Czéh B, Simon M, Schmelting B, Hiemke C, Fuchs E** (2006) Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment.
Neuropsychopharmacology **31**: 1616-1626.
- Czéh B, Muller-Keuker JI, Rygula R, Abumaria N, Hiemke C, Domenici E, Fuchs E** (2007) Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment.
Neuropsychopharmacology **32**: 1490-1503.
- Czéh B, Abumaria N, Rygula R, Fuchs E** (2010) Quantitative changes in hippocampal microvasculature of chronically stressed rats: No effect of fluoxetine treatment.
Hippocampus. **20**: 174-185.
- Czéh B, Perez-Cruz C, Fuchs E, Flügge G** (2008) Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: does hemisphere location matter?
Behavioural Brain Research **190**: 1-13. **Invited review**
- Fuchs E, Czéh B** (2005) Adult neurogenesis in rodents and primates: Functional Implications In: Steckler T, Kalin NH, Reul JMHM (eds) **“Handbook of stress and the brain.” Volume 15 of Techniques in the Behavioral and Neural Sciences. Part 1: The neurobiology of stress.** Elsevier, Amsterdam, 2005. pp. 711-727.
- Fuchs E, Czéh B, Flügge G** (2004a) Examining novel concepts of the pathophysiology of depression in the chronic psychosocial stress paradigm in tree shrews.
Behavioural Pharmacology **15**: 315-325. **Invited review**
- Fuchs E, Czéh B, Kole MH, Michaelis T, Lucassen PJ** (2004b) Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond.
European Neuropsychopharmacol **14 (Suppl 5)**: S481-S490. **Invited review**
- Fuchs E, Czéh B, Flügge G** (2005) Preclinical approaches to examine novel concepts of the pathophysiology of depressive disorders: lessons learned from tree shrews. *Drug Development Research* **65**: 309-317. **Invited review**
- Fuchs E, Flügge G, Czéh B** (2006) Remodeling of neuronal networks by stress.
Frontiers in Bioscience **11**: 2746-2758. **Invited review**
- Hu W, Zhang M, Czéh B, Flügge G, Zhang W** (2010) Stress impairs GABAergic network function in the hippocampus by activating nongenomic glucocorticoid receptors and affecting the integrity of the parvalbumin-expressing neuronal network.
Neuropsychopharmacology **35**: 1693-1707.
- Kole MH, Czéh B, Fuchs E** (2004) Homeostatic maintenance in excitability of tree shrew hippocampal CA3 pyramidal neurons after chronic stress.
Hippocampus **14**: 742-751.

- Lucassen PJ, Vollmann-Honsdorf GK, Gleisberg M, **Czéh B**, De Kloet ER, Fuchs E (2001) Chronic psychosocial stress differentially affects apoptosis in hippocampal subregions and cortex of the adult tree shrew. *European Journal of Neuroscience* **14**: 161-166.
- Lucassen PJ, Fuchs E, **Czéh B** (2004) Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex. *Biological Psychiatry* **55**: 789-796.
- Lucassen PJ, Heine VM, Muller MB, van der Beek EM, Wiegant VM, De Kloet ER, Joels M, Fuchs E, Swaab DF, **Czéh B** (2006) Stress, depression and hippocampal apoptosis. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets* **5**: 531-546. **Invited review**
- Lucassen PJ, Meerlo P, Naylor AS, van Dam AM, Dayer AG, Fuchs E, Oomen CA, **Czéh B** (2010) Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action. *European Neuropsychopharmacology* **20**: 1-17. **Invited review**
- Marlatt MW, Philippens I, Manders E, **Czéh B**, Joëls M, Krugers H, Lucassen PJ (2011) Distinct structural plasticity in the hippocampus and amygdala of the middle-aged common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Experimental Neurology* **230**: 291-301.
- Perez-Cruz C, Simon M, **Czéh B**, Flügge G, Fuchs E (2009) Hemispheric differences in basilar dendrites and spines of pyramidal neurons in the rat prelimbic cortex: activity- and stress-induced changes. *European Journal of Neuroscience* **29**: 738-747.
- Simon M, **Czéh B**, Fuchs E (2005) Age-dependent susceptibility of adult hippocampal cell proliferation to chronic psychosocial stress. *Brain Research* **1049**: 244-248.
- van der Hart MG*, **Czéh B***, de Biurrun G, Michaelis T, Watanabe T, Natt O, Frahm J, Fuchs E (2002) Substance P receptor antagonist and clomipramine prevent stress-induced alterations in cerebral metabolites, cytogenesis in the dentate gyrus and hippocampal volume. *Molecular Psychiatry* **7**: 933-941.
*Should be considered co-first authors by virtue of their contribution to this work.
- van der Hart MG, de Biurrun G, **Czéh B**, Rupniak NM, den Boer JA, Fuchs E (2005) Chronic psychosocial stress in tree shrews: effect of the substance P (NK1 receptor) antagonist L-760735 and clomipramine on endocrine and behavioral parameters. *Psychopharmacology (Berlin)* **181**: 207-216.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Aimone JB, Deng W, Gage FH. 2010. Adult neurogenesis: integrating theories and separating functions. *Trends Cogn Sci* 14: 325-37.
- Aimone JB, Wiles J, Gage FH. 2006. Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat Neurosci* 9:723-7.
- Airan RD, Meltzer LA, Roy M, Gong Y, Chen H, Deisseroth K. 2007. High-speed imaging reveals neurophysiological links to behavior in an animal model of depression. *Science* 317: 819-23.
- Akana SF, Chu A, Soriano L, Dallman MF. 2001. Corticosterone exerts site-specific and state-dependent effects in prefrontal cortex and amygdala on regulation of adrenocorticotropic hormone, insulin and fat depots. *J Neuroendocrinol* 13: 625–37.
- Amat J, Baratta MV, Paul E, Bland ST, Watkins LR, Maier SF. 2005. Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat Neurosci* 8: 365–71.
- Auerbach W, Auerbach R. 1994. Angiogenesis inhibition: A review. *Pharmacol Ther* 63: 265–311.
- Bains JS, Longacher JM, Staley KJ. 1999. Reciprocal interactions between CA3 network activity and strength of recurrent collateral synapses. *Nat Neurosci* 2: 720 –726.
- Balu DT, Lucki I. 2009. Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci Biobehav Rev* 33: 232–252.
- Banasr M, Chowdhury GM, Terwilliger R, Newton SS, Duman RS, Behar KL, Sanacora G. 2010. Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. *Mol Psychiatry* 15: 501-11.
- Becker C, Zeau B, Rivat C, Blugeot A, Hamon M, Benoliel JJ. 2008. Repeated social defeat-induced depression-like behavioral and biological alterations in rats: involvement of cholecystokinin. *Mol Psychiatry* 13: 1079-92.
- Bench CJ, Friston KJ, Brown RG, Scott LC, Frackowiak RS, Dolan RJ. 1992. The anatomy of melancholia-focal abnormalities of cerebral blood flow in major depression. *Psychol Med* 22: 607–615.
- Berger B, Alvarez C, Goldman-Rakic PS. 1993. Neurochemical development of the hippocampal region in the fetal rhesus monkey. I. Early appearance of pepties, calcium-binding protines, DARPP-32, and monoamine innervation in the entorhinal cortex during the first half of gestation (E47-90). *Hippocampus* 3: 279–305.
- Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A. 2002. Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11464–11469.
- Berton O, Nestler EJ. 2006. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* 7: 137-51.
- Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG. 2000. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 291: 17– 20.
- Bilkey DK, Schwartzkroin PA. 1990. Variation in electrophysiology and morphology of hippocampal CA3 pyramidal cells. *Brain Res* 514: 77–83.
- Bhardwaj RD, Curtis MA, Spalding KL, Buchholz BA, Fink D, Björk-Eriksson T, Nordborg C, Gage FH, Druid H, Eriksson PS, Frisén J. 2006. Neocortical neurogenesis in humans is restricted to development. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 12564-8.
- Boldrini M, Underwood MD, Hen R, Rosoklija GB, Dwork AJ, John Mann J, Arango V. 2009. Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 34: 2376-89.
- Bourgeois JP, Goldman-Rakic PS, Rakic P. 2000. Formation, elimination and stabilization of synapses in the primate cerebral cortex. In: Gazzaniga M, editor. *The New Cognitive Neurosciences*. Cambridge, MA: MIT Press, 45–54.
- Bowers G, Cullinan WE, Herman JP. 1998. Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuits. *J Neurosci* 18: 5938–5947.
- Bowman RE, Zrull MC, Luine VN. 2001. Chronic restraint stress enhances radial arm maze performance in female rats. *Brain Res* 904: 279-289.
- Brambilla P, Perez J, Barale F, Schettini G, Soares JC. 2003. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatry* 8: 721–737, 715.
- Bremner JD. 2007. Neuroimaging in posttraumatic stress disorder and other stress-related disorders. *Neuroimaging Clin N Am* 17: 523-38.
- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS. 2000. Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry* 157: 115–118.

- Bremner JD, Randall P, Scott TM, Bronen RA, Seibyl JP, Southwick SM, Delaney RC, McCarthy G, Charney DS, Innis RB. 1995. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 152: 973–981.
- Bremner JD, Randall P, Vermetten E, Staib L, Bronen RA, Mazure C, Capelli S, McCarthy G, Innis RB, Charney DS. 1997. Magnetic resonance imaging-based measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder related to childhood physical and sexual abuse - a preliminary report. *Biol Psychiatry* 41: 23–32.
- Brown G. 1993. Life events and illness. In: Stabford SC, Salamon P, editors. *Stress: from synapse to syndrome*. London: Academic Press. pp 20–40.
- Brown AS, van Os J, Driessens C, Hoek HW, Susser ES. 2000. Further evidence of relation between prenatal famine and major affective disorder. *Am J Psychiatry* 157: 190–195.
- Bruel-Jungerman E, Rampon C, Laroche S. 2007. Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses. *Rev Neurosci* 18: 93–114.
- Buzsáki G. 1986. Hippocampal sharp waves: their origin and significance. *Brain Res* 29: 242–52.
- Buzsáki G, Draguhn A. 2004. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304: 1926–1929.
- Cameron HA, Dayer AG. 2008. New interneurons in the adult neocortex: small, sparse, but significant? *Biol Psychiatry* 63: 650–655.
- Cameron HA, McKay RD. 2001. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435: 406–417.
- Campbell S, Marriott M, Nahmias C, MacQueen GM. 2004. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry* 161: 598–607.
- Carlson JN, Fitzgerald LW, Keller Jr RW, Glick SD. 1991. Side and region dependent changes in dopamine activation with various durations of restraint stress. *Brain Res* 550: 313–8.
- Carlson JN, Fitzgerald LW, Keller Jr RW, Glick SD. 1993. Lateralized changes in prefrontal cortical dopamine activity induced by controllable and uncontrollable stress in the rat. *Brain Res* 630: 178–87.
- Castrén E. 2005. Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci* 6: 241–246.
- Cerqueira JJ, Pego JM, Taipa R, Bessa JM, Almeida OF, Sousa N. 2005. Morphological correlates of corticosteroid-induced changes in prefrontal cortex-dependent behaviors. *J Neurosci* 25: 7792–7800.
- Chen G, Rajkowska G, Du F, Seraji-Bozorgzad N, Manji HK. 2000. Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium. *J Neurochem* 75: 1729–1734.
- Clarke AS, Schneider ML. 1993. Prenatal stress has long-term effects on behavioral responses to stress in juvenile rhesus monkeys. *Dev Psychobiol* 26: 293–304.
- Clements AD. 1992. The incidence of attention deficit-hyperactivity disorder in children whose mothers experienced extreme psychological stress during pregnancy, *Georgia Educational Researcher* 9: 1–14.
- Coe CL, Lubach GR, Karaszewski JW, Ershler WB. 1996. Prenatal endocrine activation alters postnatal cellular immunity in infant monkeys. *Brain Behav Immun* 10: 221–234.
- Coe CL, Lubach GR, Schneider M. 2002a. Prenatal stress alters the size of the corpus callosum in the infant monkey. *Dev Psychobiol* 41: 178–185.
- Coe CL, Kramer M, Kirschbaum C, Netter P, Fuchs E. 2002b. Prenatal stress diminishes the cytokine response of leukocytes to endotoxin stimulation in juvenile monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 675–681.
- Cook SC, Wellman CL. 2004. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol* 60: 236–248.
- Conrad CD. 2006. What is the functional significance of chronic stress-induced CA3 dendritic retraction within the hippocampus? *Behav Cogn Neurosci Rev* 5: 41–60.
- Conrad CD. 2008. Chronic stress-induced hippocampal vulnerability: the glucocorticoid vulnerability hypothesis. *Rev Neurosci* 19: 395–411.
- Conrad CD, LeDoux JE, Magarinos AM, McEwen BS. 1999. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav Neurosci* 113: 902–913.
- Conrad CD, Jackson JL, Wise LS. 2004. Chronic stress enhances ibotenic acid-induced damage selectively within the hippocampal CA3 region of male, but not female rats. *Neuroscience* 125: 759–767.
- Conrad CD, McLaughlin KJ, Harman JS, Foltz C, Wiczorek L, Lightner E, Wright RL. 2007. Chronic glucocorticoids increase hippocampal vulnerability to neurotoxicity under conditions that produce CA3 dendritic retraction but fail to impair spatial recognition memory. *J Neurosci* 27: 8278–8285.

- Coras R, Siebzehnrbuhl FA, Pauli E, Huttner HB, Njunting M, Kobow K, Villmann C, Hahnen E, Neuherber W, Weigel D, Buchfelder M, Stefan H, Beck H, Steindler DA, Blümcke I. 2010. Low proliferation and differentiation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory dysfunction in humans. *Brain* 133: 3359-72.
- Cotter D, Mackay D, Chana G, Beasley C, Landau S, Everall IP. 2002. Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. *Cereb Cortex* 12: 386-394.
- Cotter D, Mackay D, Landau S, Kerwin R, Everall I. 2001a. Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 58: 545-553.
- Cotter DR, Pariante CM, Everall IP. 2001b. Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: the evidence and implications. *Brain Res Bull* 55: 585-595.
- Couillard-Despres S, Aigner L. 2011. In vivo imaging of adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 33: 1037-44.
- Coyle JT, Schwarcz R. 2000. Mind glue: implications of glial cell biology for psychiatry. *Arch Gen Psychiatry* 57: 90-93.
- Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelsö C, Holtas S, van Roon-Mom WM, Bjork-Eriksson T, Nordborg C, Frisen J, Dragunow M, Faull RL, Eriksson PS. 2007. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* 315: 1243-1249.
- Cryan JF, Markou A, Lucki I. 2002. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 23: 238-245.
- David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, Marsteller D, Mendez I, Drew M, Craig DA, Guiard BP, Guilloux JP, Artymyshyn RP, Gardier AM, Gerald C, Antonijevic IA, Leonardo ED, Hen R. 2009. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62: 479-93.
- Davidson RJ. 1992. Anterior cerebral asymmetry and the nature of emotion. *Brain Cogn* 20: 125-151.
- Davidson RJ. 1998. Cerebral asymmetry, emotions and affective style. In: Davidson RJ, Hugdahl K, editors. *Brain asymmetry*. Cambridge: MIT Press; 1998. pp 361-87.
- Dayer AG, Cleaver KM, Abouantoun T, Cameron HA. 2005. New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J Cell Biol* 168: 415-427.
- Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA. 2003. Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 460: 563-572.
- DeCarolis NA, Eisch AJ. 2010. Hippocampal neurogenesis as a target for the treatment of mental illness: a critical evaluation. *Neuropharmacology* 58: 884-93.
- de Groote L, Linthorst AC. 2007. Exposure to novelty and forced swimming evoke stressor-dependent changes in extracellular GABA in the rat hippocampus. *Neuroscience* 148: 794-805.
- de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6: 463-75.
- de Kloet R, Wallach G, McEwen BS. 1975. Differences in corticosterone and dexamethasone binding to rat brain and pituitary. *Endocrinology* 96: 598-609.
- Deng W, Aimone JB, Gage FH. 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11: 339-50.
- Diorio D, Viau V, Meaney MJ. 1993. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci* 13: 3839-47.
- Djavadian RL. 2004. Serotonin and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adult mammals. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 64: 189-200.
- Domínguez-Escriba L, Hernández-Rabaza V, Soriano-Navarro M, Barcia JA, Romero FJ, García-Verdugo JM, Canales JJ. 2006. Chronic cocaine exposure impairs progenitor proliferation but spares survival and maturation of neural precursors in adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 24: 586-594.
- Dranovsky A, Hen R. 2006. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. *Biol Psychiatry* 59: 1136-43.
- Drevets WC. 2000. Functional anatomical abnormalities in limbic and prefrontal cortical structures in major depression. *Prog Brain Res* 126: 413-431.
- Drevets WC, Price JL, Simpson JR Jr, Todd RD, Reich T, Vannier M, Raichle ME. 1997. Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature* 386: 824-7.
- Duman RS. 2004. Depression: a case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry* 56: 140-145.
- Duman RS, Monteggia LM. 2006. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59: 1116-1127.

- Duman RS, Malberg J, Thome J. 1999. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* 46: 1181-91.
- Duman RS, Malberg J, Nakagawa S. 2001. Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress. *J Pharmacol Exp Ther* 299: 401-7.
- Dupret D, Fabre A, Döbrösy MD, Panatier A, Rodríguez JJ, Lamarque S, Lemaire V, Olié SH, Piazza PV, Abrous DN. 2007. Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLOS Biol* 5: e214.
- Dupret D, Revest JM, Koehl M, Ihas F, De Giorgi F, Costet P, Abrous DN, Piazza PV. 2008. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS ONE* 3: e1959.
- Eichenbaum H. 1999. The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behav Brain Res* 103: 123-133.
- Eichenbaum H. 2000. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nature Rev Neurosci* 1: 41-50.
- Ekstrand J, Hellsten J, Tingström A. 2008. Environmental enrichment, exercise and corticosterone affect endothelial cell proliferation in adult rat hippocampus and prefrontal cortex. *Neurosci Lett* 442: 203-207.
- Endo Y, Nishimura JJ, Kobayashi S, Kimura F. 1999. Chronic stress exposure influences local cerebral blood flow in the rat hippocampus. *Neuroscience* 93: 551-555.
- Enikolopov G, Overstreet-Wadiche L. 2008. The use of reporter mouse lines to study adult neurogenesis. In: Gage FH, Kempermann G, Song H (Eds.), *Adult Neurogenesis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp 81-100.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4: 1313-1317.
- Flugge G, van Kampen M, Mijster MJ. 2004. Perturbations in brain monoamine systems during stress. *Cell Tissue Res* 315: 1-14.
- Folkman J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1: 27-31.
- Földy C, Lee SY, Szabadics J, Neu A, Soltész I. 2007. Cell typespecific gating of perisomatic inhibition by cholecystinin. *Nat Neurosci* 10: 1128-1130.
- Förster C, Waschke J, Burek M, Leers J, Drenckhahn D. 2006. Glucocorticoid effects on mouse microvascular endothelial barrier permeability are brain specific. *J Physiol* 573: 413-425.
- Freund TF, Katona I. 2003. Perisomatic Inhibition. *Neuron* 56: 33-42.
- Fuchs E, Flugge G. 2002. Social stress in tree shrews: effects on physiology, brain function and behavior of subordinate individuals. *Pharmacol Biochem Behav* 73: 247-258.
- Fuchs E, Kramer M, Hermes B, Netter P, Hiemke C. 1996. Psychosocial stress in tree shrews: clomipramine counteracts behavioral and endocrine changes. *Pharmacol Biochem Behav* 54: 219-228.
- Furmark T, Appel L, Michelgård A, Wahlstedt K, Ahs F, Zancan S, Jacobsson E, Flyckt K, Groh M, Bergström M, Pich EM, Nilsson LG, Bani M, Långström B, Fredrikson M. 2005. Cerebral blood flow changes after treatment of social phobia with the neurokinin-1 antagonist GR205171, citalopram, or placebo. *Biol Psychiatry* 58: 132-42.
- Galea LA. 2008. Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents. *Brain Res Rev* 57: 332-341.
- Garthe A, Behr J, Kempermann G. 2009. Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS ONE* 4: e5464.
- Ge S, Pradhan DA, Ming GL, Song H. 2007. GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends Neurosci* 30: 1-8.
- George MS. 2010. Transcranial magnetic stimulation for the treatment of depression. *Expert Rev Neurother* 10: 1761-72.
- Geuze E, Vermetten E, Bremner JD. 2005. MR-based in vivo hippocampal volumetrics: 2. Findings in neuropsychiatric disorders. *Mol Psychiatry* 10: 160-184.
- Gianaros PJ, Jennings JR, Sheu LK, Greer PJ, Kuller LH, Matthews KA. 2007. Prospective reports of chronic life stress predict decreased grey matter volume in the hippocampus. *Neuroimage* 35: 795-803.
- Gilbertson MW, Shenton ME, Ciszewski A, Kasai K, Lasko NB, Orr SP, Pitman RK. 2002. Smaller hippocampal volume predicts pathologic vulnerability to psychological trauma. *Nat Neurosci* 5: 1242-1247.
- Golding NL, Kath WL, Spruston N. 2001. Dichotomy of action-potential backpropagation in CA1 pyramidal neuron dendrites. *J Neurophysiol* 86: 2998-3010.
- Goldman S. 2003. Glia as neural progenitor cells. *Trends Neurosci* 26: 590-596.

- Gorter JA, Goncalves Pereira PM, van Vliet EA, Aronica E, Lopes da Silva FH, Lucassen PJ. 2003. Neuronal cell death in a rat model for mesial temporal lobe epilepsy is induced by the initial status epilepticus and not by later repeated spontaneous seizures. *Epilepsia* 44: 647–658.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. 1999a. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2: 260–5.
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. 1997. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 17: 2492–2498.
- Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E. 1999b. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5263–5267.
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. 1999c. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286: 548–552.
- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. 1998. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3168–3171.
- Grant MM, Thase ME, Sweeney JA. 2001. Cognitive disturbance in outpatient depressed younger adults: evidence of modest impairment. *Biol Psychiatry* 50: 35–43.
- Gratton A, Sullivan RM. 2005. Role of prefrontal cortex in stress responsivity. In: Steckler T, Kalin NH, Reul JMHM, editors. *Techniques in the behavioral and neural sciences*, no. 1, vol. 15. Amsterdam: Elsevier. pp 807–17.
- Greene J, Banasr M, Lee B, Warner-Schmidt J, Duman RS. 2009. Vascular endothelial growth factor signaling is required for the behavioral actions of antidepressant treatment: Pharmacological and cellular characterization. *Neuropsychopharmacology* 34: 2459–2468.
- Gross CG. 2000. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* 1: 67–73.
- Gur RE, Turetsky BI, Cowell PE, Finkelman C, Maany V, Grossman RI, Arnold SE, Bilker WB, Gur RC. 2000. Temporolimbic volume reductions in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 57: 769–775.
- Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itoharu S, Kageyama R. 2008. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 11: 1153–1161.
- Jacobs BL, Praag H, Gage FH. 2000. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry* 5: 262–269.
- Jayatissa MN, Bisgaard C, Tingstrom A, Papp M, Wiborg O. 2006. Hippocampal cytogenesis correlates to escitalopram-mediated recovery in a chronic mild stress rat model of depression. *Neuropsychopharmacology* 31: 2395–2404.
- Jayatissa MN, Bisgaard CF, West MJ, Wiborg O. 2008. The number of granule cells in rat hippocampus is reduced after chronic mild stress and re-established after chronic escitalopram treatment. *Neuropharmacology* 54: 530–541.
- Joca SR, Ferreira FR, Guimaraes FS. 2007. Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrgic neurotransmitter systems. *Stress* 10: 227–249.
- Joëls M. 2008. Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *Eur J Pharmacol* 583: 312–21.
- Joëls M, Baram TZ. 2009. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci* 10: 459–66.
- Joëls M, Karst H, Krugers HJ, Lucassen PJ. 2007. Chronic stress; implications for neuron morphology, function and neurogenesis. *Front Neuroendocrinol* 28: 72–96.
- Jones F, Tauscher J. 1978. Residence under an airport-landing pattern as a factor in teratism. *Arch Environ Health* 33: 10–12.
- Hasler G, van der Veen JW, Tuminis T, Meyers N, Shen J, Drevets WC. 2007. Reduced prefrontal glutamate/glutamine and gamma-aminobutyric acid levels in major depression determined using proton magnetic resonance spectroscopy. *Arch Gen Psychiatry* 64: 193–200.
- Hebb AL, Poulin JF, Roach SP, Zacharko RM, Drolet G. 2005. Cholecystokinin and endogenous opioid peptides: interactive influence on pain, cognition, and emotion. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 1225–1238.
- Hedegaard M, Henriksen TB, Sabroe S, Secher NJ. 1993. Psychological distress in pregnancy and preterm delivery. *BMJ* 307: 234–239.
- Hedegaard M, Henriksen TB, Secher NJ, Hatch MC, Sabroe S. 1996. Do stressful life events affect duration of gestation and risk of preterm delivery? *Epidemiology* 7: 339–345.
- Hefft S, Jonas P. 2005. Asynchronous GABA release generates long-lasting inhibition at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. *Nat Neurosci* 8: 1319–1328.

- Heim C, Nemeroff CB. 2001. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 49: 1023-39.
- Heim C, Newport DJ, Mletzko T, Miller AH, Nemeroff CB. 2008. The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology* 33: 693-710.
- Heine VM, Maslam S, Joels M, Lucassen PJ. 2004a. Prominent decline of newborn cell proliferation, differentiation, and apoptosis in the aging dentate gyrus, in absence of an age-related hypothalamus-pituitary-adrenal axis activation. *Neurobiol Aging* 25: 361-375.
- Heine VM, Maslam S, Joels M, Lucassen PJ. 2004b. Increased P27KIP1 protein expression in the dentate gyrus of chronically stressed rats indicates G1 arrest involvement. *Neuroscience* 129: 593-601.
- Heine VM, Maslam S, Zareno J, Joels M, Lucassen PJ. 2004c. Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible. *Eur J Neurosci* 19: 131-144.
- Heine VM, Zareno J, Maslam S, Joels M, Lucassen PJ. 2005. Chronic stress in the adult dentate gyrus reduces cell proliferation near the vasculature and VEGF and Flk-1 protein expression. *Eur J Neurosci* 21: 1304-1314.
- Heiss JD, Papavassiliou E, Merrill MJ, Nieman L, Knightly JJ, Walbridge S, Edwards NA, Oldfield EH. 1996. Mechanism of dexamethasone suppression of brain tumor-associated vascular permeability in rats. Involvement of the glucocorticoid receptor and vascular permeability factor. *J Clin Invest* 98: 1400-1408.
- Hellsten J, West MJ, Arvidsson A, Ekstrand J, Jansson L, Wennström M, Tingström A. 2005. Electroconvulsive seizures induce angiogenesis in adult rat hippocampus. *Biol Psychiatry* 58: 871-878.
- Henze DA, Cameron WE, Barrionuevo G. 1996. Dendritic morphology and its effects on the amplitude and rise-time of synaptic signals in hippocampal CA3 pyramidal cells. *J Comp Neurol* 369: 331-344.
- Hercher C, Canetti L, Turecki G, Mechawar N. 2010. Anterior cingulate pyramidal neurons display altered dendritic branching in depressed suicides. *J Psychiatr Res* 44: 286-93.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, et al. 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24: 151-80.
- Herpfer I, Lieb K. 2005. Substance P receptor antagonists in psychiatry: rationale for development and therapeutic potential. *CNS Drugs* 19: 275-93.
- Hoflich G, Kasper S, Hufnagel A, Ruhrmann S, Moller HJ. 1993. Application of transcranial magnetic stimulation in the treatment of drug-resistant major depression. *Hum. Psychopharmacol.* 8: 361-365.
- Holmes A, Wellman CL. 2009. Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 33: 773-83.
- Holscher C. 1999. Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behav Brain Res* 100: 225-235.
- Horikawa K, Armstrong WE. 1988. A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J Neurosci Methods* 25: 1-11.
- Horner PJ, Palmer TD. 2003. New roles for astrocytes: the nightlife of an 'astrocyte' La vida loca!. *Trends Neurosci* 26: 597-603.
- Humphrey T. 1967. The development of the human hippocampal fissure. *J Anat* 101: 655-676.
- Huttunen MO, Niskanen P. 1978. Prenatal loss of father and psychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 35: 429-431.
- Kalin NH, Larson C, Shelton SE, Davidson RJ. 1998. Asymmetric frontal brain activity, cortisol, and behavior associated with fearful temperament in rhesus monkeys. *Behav Neurosci* 112: 286-292.
- Kandel ER. 2000. Glial cells are support cells. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell T.: *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill, Publ. Comp., New York, 4th edition. pp 20-21.
- Kaplan MS. 1981. Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex. *J Comp Neurol* 195: 323-338.
- Kaplan MS, Bell DH. 1984. Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci* 4: 1429-1441.
- Kaplan MS, Hinds JW. 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197: 1092-1094.
- Karson MA, Whittington KC, Alger BE. 2008. Cholecystokinin inhibits endocannabinoid-sensitive hippocampal IPSPs and stimulates others. *Neuropharmacology* 54: 117-128.

- Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schütz G, Joëls M. 2005. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 19204–19207.
- Kawamichi T, Kawamichi M. 1979. Spatial organization and territory of tree shrews (*Tupaia glis*). *Animal Behav* 27: 381–393.
- Keller M, Montgomery S, Ball W, Morrison M, Snively D, Liu G, Hargreaves R, Hietala J, Lines C, Beebe K, Reines S. 2006. Lack of efficacy of the substance p (neurokinin1 receptor) antagonist aprepitant in the treatment of major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 59: 216–23.
- Kempermann G. 2002. Regulation of adult hippocampal neurogenesis - implications for novel theories of major depression. *Bipolar Disord* 4: 17–33.
- Kempermann G. 2006. Adult hippocampal neurogenesis. *Adult neurogenesis: Stem cells and neuronal development in the adult brain*. Oxford University Press. New York. pp 168–191.
- Kempermann G, Kronenberg G. 2003. Depressed new neurons--adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biol Psychiatry* 54(5):499–503.
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH. 2003. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130: 391–9.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386: 493–495.
- Kempermann G, Krebs J, Fabel K. 2008. The contribution of failing adult hippocampal neurogenesis to psychiatric disorders. *Curr Opin Psychiatry* 21: 290–5.
- Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA. 1999. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry* 156: 837–841.
- Kessler RC. 1997. The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol* 48: 191–214.
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, Rush AJ, Walters EE, Wang PS; National Comorbidity Survey Replication. 2003. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA* 289: 3095–105.
- Keuker JJ, Luiten PG, Fuchs E. 2003. Preservation of hippocampal neuron numbers in aged rhesus monkeys. *Neurobiol Aging* 24: 157–165.
- Kim JJ, Diamond DM. 2002. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* 3: 453–462.
- Klausberger T, Marton LF, O'Neill J, Huck JH, Dalezios Y, Fuentealba P, Suen WY, Papp E, Kaneko T, Watanabe M, Csicsvari J, Somogyi P. 2005. Complementary roles of cholecystokinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations. *J Neurosci* 25: 9782–9793.
- Kodama M, Fujioka T, Duman RS. 2004. Chronic olanzapine or fluoxetine administration increases cell proliferation in hippocampus and prefrontal cortex of adult rat. *Biol Psychiatry* 56: 570–580.
- Kofman O. 2002. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 457–470.
- Koo JW, Duman RS. 2008. IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 751–756.
- Krichmar JL, Nasuto SJ, Scorcioni R, Washington SD, Ascoli GA. 2002. Effects of dendritic morphology on CA3 pyramidal cell electrophysiology: a simulation study. *Brain Res* 941: 11–28.
- Krishnan V, Nestler EJ. 2008. The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455: 894–902.
- Krishnan V, Nestler EJ. 2010. Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. *Am J Psychiatry* 167: 1305–20.
- Kornack DR, Rakic P. 1999. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5768–5773.
- Kornack DR, Rakic P. 2001. Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. *Science* 294: 2127–2130.
- Kornetzky C. 1989. Animal models: promises and problems. In: Koop GF, Ehlers CL, Kupfer DJ, editors. *Animal models of depression*. Boston: Birkhauser. pp 18–29.
- Kramer MS, Cutler N, Feighner J, Shrivastava R, Carman J, Sramek JJ, Reines SA, Liu G, Snively D, Wyatt-Knowles E, Hale JJ, Mills SG, MacCoss M, Swain CJ, Harrison T, Hill RG, Hefti F, Scolnick EM, Cascieri MA, Chicchi GG, Sadowski S, Williams AR, Hewson L, Smith D, Rupniak NM. 1998. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science* 281: 1640–1645.

- Kramer MS, Winokur A, Kelsey J, Preskorn SH, Rothschild AJ, Snively D, Ghosh K, Ball WA, Reines SA, Munjack D, Apter JT, Cunningham L, Kling M, Bari M, Getson A, Lee Y. 2004. Demonstration of the efficacy and safety of a novel substance P (NK(1)) receptor antagonist in major depression. *Neuropsychopharmacology* 29: 385–392.
- Krystal JH, Sanacora G, Blumberg H, Anand A, Charney DS, Marek G, Epperson CN, Goddard A, Mason GF. 2002. Glutamate and GABA systems as targets for novel antidepressant and mood-stabilizing treatments. *Mol Psychiatry* 7: S71–S80.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. 1996. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16: 2027–33.
- Lansink M, Koolwijk P, van Hinsbergh V, Kooistra T. 1998. Effect of steroid hormones and retinoids on the formation of capillary-like tubular structures of human microvascular endothelial cells in fibrin matrices is related to urokinase expression. *Blood* 92: 927–938.
- Lee AL, Ogle WO, Sapolsky RM. 2002. Stress and depression: Possible links to neuron death in the hippocampus. *Bipolar Disord* 4: 117–128.
- Le Gros Clark WE. 1924. On the brain of the tree shrew (*Tupaia minor*). *Proc Zool Soc London* pp 1053–1074.
- Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN. 2000. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11032–11037.
- Leverenz JB, Wilkinson CW, Wamble M, Corbin S, Grabber JE, Raskind MA, Peskind ER. 1999. Effect of chronic high-dose exogenous cortisol on hippocampal neuronal number in aged nonhuman primates. *J Neurosci* 19: 2356–61.
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. 2005. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6: 312–324.
- Lodge DJ, Behrens MM, Grace AA. 2009. A loss of parvalbumin containing interneurons is associated with diminished oscillatory activity in an animal model of schizophrenia. *J Neurosci* 29: 2344–2354.
- Lou HC, Hansen D, Nordentoft M, Pryds O, Jensen F, Nim J, Hemmingsen R. 1994. Prenatal stressors of human life affect fetal brain development. *Dev Med Child Neurol* 36: 826–32.
- Lucassen PJ, Chung WC, Kamphorst W, Swaab DF. 1997. DNA damage distribution in the human brain as shown by in situ end labeling; areaspecific differences in aging and Alzheimer disease in the absence of apoptotic morphology. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 887–900.
- Lucassen PJ, Chung WC, Vermeulen JP, Van Lookeren Campagne M, Van Dierendonck JH, Swaab DF. 1995. Microwave-enhanced in situ endlabeling of fragmented DNA: Parametric studies in relation to postmortem delay and fixation of rat and human brain. *J Histochem Cytochem* 43: 1163–1171.
- Lucassen PJ, Stumpel MW, Wang Q, Aronica E. 2010. Decreased numbers of progenitor cells but no response to antidepressant drugs in the hippocampus of elderly depressed patients. *Neuropharmacology* 58: 940–9.
- Lupien SJ, McEwen BS. 1997. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Brain Res Rev* 24: 1–27.
- Lupien SJ, de Leon M, de Santi S, Convit A, Tarshish C, Nair NP, Thakur M, McEwen BS, Hauger RL, Meaney MJ. 1998. Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nature Neurosci* 1: 69–73.
- Lupien SJ, Maheu F, Tu M, Fiocco A, Schramek TE. 2007. The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain Cogn* 65: 209–37.
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. 2009. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci* 10: 434–45.
- Luscher B, Shen Q, Sahir N. 2011. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Mol Psychiatry* 16: 383–406.
- Lyons DM, Buckmaster PS, Lee AG, Wu C, Mitra R, Duffey LM, Buckmaster CL, Her S, Patel PD, Schatzberg AF. 2010. Stress coping stimulates hippocampal neurogenesis in adult monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 14823–7.
- MacQueen G, Frodl T. 2011. The hippocampus in major depression: evidence for the convergence of the bench and bedside in psychiatric research? *Mol Psychiatry* 16: 252–64.
- Madsen TM, Treschow A, Bengzon J, Bolwig TG, Lindvall O, Tingstrom A. 2000. Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry* 47: 1043–1049.
- Madsen TM, Yeh DD, Valentine GW, Duman RS. 2005. Electroconvulsive seizure treatment increases cell proliferation in rat frontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 30: 27–34.

- Magariños AM, McEwen BS. 1995. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience* 69: 89–98.
- Magariños AM, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E. 1996. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci* 16: 3534–3540.
- Magariños AM, Verdugo JM, McEwen BS. 1997. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14002–14008.
- Maggio N, Segal M. 2009. Differential corticosteroid modulation of inhibitory synaptic currents in the dorsal and ventral hippocampus. *J Neurosci* 29: 2857–2866.
- Mainen ZF, Sejnowski TJ. 1996. Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. *Nature* 382: 363–366.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20: 9104–10.
- Mallei A, Shi B, Mochetti I. 2002. Antidepressant treatments induce the expression of basic fibroblast growth factor in cortical and hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* 61: 1017–1024.
- Manganas LN, Zhang X, Li Y, Hazel RD, Smith SD, Wagshul ME, Henn F, Benveniste H, Djuric PM, Enikolopov G, Maletic-Savatic M. 2007. Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. *Science* 318: 980–985.
- Manji HK, Duman RS. 2001. Impairments of neuroplasticity and cellular resilience in severe mood disorders: implications for the development of novel therapeutics. *Psychopharmacol Bull* 35: 5–49.
- Manji HK, Drevets WC, Charney DS. 2001. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med* 7: 541–547.
- Manji HK, Moore GJ, Rajkowska G, Chen G. 2000. Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders. *Mol Psychiatry* 5: 578–593.
- Manji HK, Quiroz JA, Sporn J, Payne JL, Denicoff KA, Gray N, Zarate Jr CA, Charney DS. 2003. Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression. *Biol Psychiatry* 53: 707–742.
- Martin RD. 1990. Primate origins and evolution. London: Chapman and Hall.
- Mathew SJ, Vythilingam M, Murrough JW, Zarate CA Jr, Feder A, Luckenbaugh DA, Kinkead B, Parides MK, Trist DG, Bani MS, Bettica PU, Ratti EM, Charney DS. 2011. A selective neurokinin-1 receptor antagonist in chronic PTSD: A randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept trial. *Eur Neuropsychopharmacol* 21: 221–229.
- McDonagh JC, Hornby G, Reinking RM, Stuart DG. 2002. Associations between the morphology and physiology of ventral-horn neurons in the adult turtle. *J Comp Neurol* 454: 177–191.
- McDonald RJ, Craig LA, Hong NS. 2008. Enhanced cell death in hippocampus and emergence of cognitive impairments following a localized mini-stroke in hippocampus if preceded by a previous episode of acute stress. *Eur J Neurosci* 27: 2197–2209.
- McEwen BS. 2000. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res* 886: 172–189.
- McEwen BS. 2006. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues Clin. Neurosci* 8: 367–381.
- McEwen BS. 2007. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* 87: 873–904.
- McEwen BS, Chattarji S, Diamond DM, Jay TM, Reagan LP, Svenningsson P, Fuchs E. 2010. The neurobiological properties of tianeptine (Stablon): from monoamine hypothesis to glutamatergic modulation. *Mol Psychiatry* 15: 237–49.
- McEwen BS, de Kloet ER, Rostene W. 1986. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol Rev* 66: 1121–88.
- McKinney WT. 1984. Animal models of depression: an overview. *Psychiatr Dev* 2: 77–96.
- McLaughlin KJ, Gomez JL, Baran SE, Conrad CD. 2007. The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: an evaluation of chronic restraint paradigms. *Brain Res* 1161: 56–64.
- McLean S. 2005. Do substance P and the NK1 receptor have a role in depression and anxiety? *Curr Pharm Des* 11: 1529–47.
- McTavish D, Benfield P. 1990. Clomipramine: an overview of its pharmacological properties and a review of its therapeutic use in obsessive compulsive disorder and panic disorder. *Drugs* 39: 136–153.
- Meaney MJ, Aitken DH. 1985. [3H]Dexamethasone binding in rat frontal cortex. *Brain Res* 328: 176–80.
- Meijer A. 1985. Child psychiatric sequelae of maternal war stress. *Acta Psychiatr Scand* 72: 505–511.

- Metz GA, Schwab ME, Welzl H. 2001. The effects of acute and chronic stress on motor and sensory performance in male Lewis rats. *Physiol Behav* 72: 29-35.
- Michaelis T, de Biurrun G, Watanabe T, Frahm J, Ohl F, Fuchs E. 2001. Genderspecific alterations of cerebral metabolites with aging and cortisol treatment. *J Psychiatr Res* 35: 231-271.
- Michaelis T, Wick M, Fujimori H, Matsumura A, Frahm J. 1999. Proton MRS of oral creatine supplementation in rats. Cerebral metabolite concentrations and ischemic challenge. *NMR Biomed* 12: 309-314.
- Miller MW, Nowakowski RS. 1988. Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res* 457: 44-52.
- Mirescu C, Gould E. 2006. Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus* 16: 233-238.
- Mitchell PJ, Redfern PH. 2005. Animal models of depressive illness: The importance of chronic drug treatment. *Curr Pharm Des* 11: 171-203.
- Moyer JR Jr, Brown TH. 1998. Methods for whole-cell recording from visually preselected neurons of perirhinal cortex in brain slices from young and aging rats. *J Neurosci Methods* 86: 35-54.
- Müller MB, Toschi N, Kresse AE, Post A, Keck ME. 2000. Long-term repetitive transcranial magnetic stimulation increases the expression of brain-derived neurotrophic factor and cholecystokinin mRNA, but not neuropeptide tyrosine mRNA in specific areas of rat brain. *Neuropsychopharmacology* 23: 205-215.
- Müller MB, Lucassen PJ, Yassouridis A, Hoogendijk WJ, Holsboer F, Swaab DF. 2001. Neither major depression nor glucocorticoid treatment affects the cellular integrity of the human hippocampus. *Eur J Neurosci* 14: 1603-1612.
- Myhrman A, Rantakallio P, Isohanni M, Jones P, Partanen U. 1996. Unwantedness of a pregnancy and schizophrenia in the child. *Br J Psychiatry* 169: 637-640.
- Nacher J, McEwen BS. 2006. The role of N-methyl-D-aspartate receptors in neurogenesis. *Hippocampus* 16: 267-270.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. 2003. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26: 523-530.
- Nestler EJ, Hyman SE. 2010. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 13: 1161-9.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. 2002a. Neurobiology of depression. *Neuron* 34: 13-25.
- Nestler EJ, Gould E, Manji H, Bucan M, Duman RS, Gershenfeld HK, Hen R, Koester S, Lederhendler I, Meaney MJ, Robbins T, Winsky L, Zalcman S. 2002b. Preclinical models: status of basic research in depression. *Biol Psychiatry* 52: 503-528.
- Newman EA. 2003. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* 26: 536-542.
- Newton SS, Girgenti MJ, Collier EF, Duman RS. 2006. Electroconvulsive seizure increases adult hippocampal angiogenesis in rats. *Eur J Neurosci* 24: 819-828.
- Ohl F, Fuchs E. 1999. Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew. *Brain Res Cogn Brain Res* 7: 379-387.
- Ohl F, Oitzl MS, Fuchs E. 1998. Assessing cognitive functions in tree shrews: visuo-spatial and spatial learning in the home cage. *J Neurosci Meth* 81: 35-40.
- Okuhara DG, Beck SG. 1998. Corticosteroids influence the action potential firing pattern of hippocampal subfield CA3 pyramidal cells. *Neuroendocrinology* 67: 58-66.
- Öngür D, Drevets WC, Price JL. 1998. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13290-13295.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425: 479-494.
- Pascucci T, Ventura R, Latagliata EC, Cabib S, Puglisi-Allegra S. 2007. The medial prefrontal cortex determines the accumbens dopamine response to stress through the opposing influences of norepinephrine and dopamine. *Cereb Cortex* 17: 2796-804.
- Pavlidis C, Nivon LG, McEwen BS. 2002. Effects of chronic stress on hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus* 12: 245-257.
- Pyapali GK, Sik A, Penttonen M, Buzsáki G, Turner DA. 1998. Dendritic properties of hippocampal pyramidal neurons in the rat: intracellular staining in vivo and in vitro. *J Comp Neurol* 391: 335-352.
- Paykel ES. 2001. Stress and affective disorders in humans. *Semin Clin Neuropsychiatry* 6: 4-11.
- Pelvig DP, Pakkenberg H, Stark AK, Pakkenberg B. 2008. Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiol Aging* 29: 1754-62.

- Pelvig DP, Pakkenberg H, Stark AK, Pakkenberg B. 2008. Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiol Aging* 29: 1754-62.
- Perera TD, Dwork AJ, Keegan KA, Thirumangalakudi L, Lipira CM, Lange C, Higley JD, Rosoklija G, Hen R, Sackeim HA, Coplan JD. 2011. Necessity of hippocampal neurogenesis for the therapeutic action of antidepressants in adult nonhuman primates. *PLoS One* 6: e17600.
- Pittenger C, Duman RS. 2008. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33: 88-109.
- Pollak DD, Monje FJ, Zuckerman L, Denny CA, Drew MR, Kandel ER. 2008. An animal model of a behavioral intervention for depression. *Neuron* 60: 149-61.
- Post A, Müller MB, Engelmann M, Keck ME. 1999. Repetitive transcranial magnetic stimulation in rats: Evidence for a neuroprotective effect in vitro and in vivo. *Eur J Neurosci* 11: 3247-3254.
- Price JL, Drevets WC. 2010. Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 35: 192-216.
- Provencher SW. 1993. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med* 30: 672-679.
- Radley JJ, Morrison JH. 2005. Repeated stress and structural plasticity in the brain. *Ageing Res Rev* 4: 271-287.
- Radley JJ, Rocher AB, Miller M, Janssen WG, Liston C, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH. 2006. Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 16: 313-20.
- Radley JJ, Sisti HM, Hao J, Rocher AB, McCall T, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH. 2004. Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 125: 1-6.
- Rajkowska G. 2000. Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. *Biol Psychiatry* 48: 766-77.
- Rajkowska G. 2002. Cell pathology in bipolar disorder. *Bipolar Disord* 4: 105-16.
- Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ. 2007. Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6: 219-33.
- Rakic P. 1985. Limits of neurogenesis in primates. *Science* 227: 1054-1056.
- Rakic P. 2002a. Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J Neurosci* 22: 614-8.
- Rakic P. 2002b. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nat Rev Neurosci* 3: 65-71.
- Rakic P, Nowakowski RS. 1981. The time of origin of neurons in the hippocampal region of the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 196: 99-128.
- Ramos BP, Arnsten AF. 2007. Adrenergic pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex. *Pharmacol Ther* 113: 523-36.
- Reif A, Fritzen S, Finger M, Strobel A, Lauer M, Schmitt A, Lesch KP. 2006. Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Mol Psychiatry* 11: 514-22.
- Revesz D, Tjernstrom M, Ben-Menachem E, Thorlin T. 2008. Effects of vagus nerve stimulation on rat hippocampal progenitor proliferation. *Exp Neurol* 214: 259-265.
- Rigby M, O'Donnell R, Rupniak NM. 2005. Species differences in tachykinin receptor distribution: further evidence that the substance P (NK1) receptor predominates in human brain. *J Comp Neurol* 490: 335-53.
- Risch N, Herrell R, Lehner T, Liang KY, Eaves L, Hoh J, Griem A, Kovacs M, Ott J, Merikangas KR. 2009. Interaction between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression: a meta-analysis. *JAMA* 301: 2462-71.
- Robbins TW. 1996. Dissociating executive functions of the prefrontal cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351: 1463-70.
- Rotenberg VS. 2004. The peculiarity of the right-hemisphere function in depression: solving the paradoxes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28: 1-13.
- Rueger MA, Backes H, Walberer M, Neumaier B, Ullrich R, Simard ML, Emig B, Fink GR, Hoehn M, Graf R, Schroeter M. 2010. Noninvasive imaging of endogenous neural stem cell mobilization in vivo using positron emission tomography. *J Neurosci* 30: 6454-60.
- Rygula R, Abumaria N, Flüge G, Fuchs E, Rütter E, Havemann-Reinecke U. 2005. Anhedonia and motivational deficits in rats: Impact of chronic social stress. *Behav Brain Res* 162: 127-134.
- Rygula R, Abumaria N, Domenici E, Hiemke C, Fuchs E. 2006. Effects of fluoxetine on behavioral deficits evoked by chronic social stress in rats. *Behav Brain Res* 174: 188-192.
- Rygula R, Abumaria N, Havemann-Reinecke U, Rütter E, Hiemke C, Zernig G, Fuchs E, Flüge G. 2008. Pharmacological validation of a chronic social stress model of depression in rats: effects of reboxetine, haloperidol and diazepam. *Behav Pharmacol* 19: 183-96.
- Sahay A, Hen R. 2007. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat Neurosci* 10: 1110-5.

- Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R. 2011. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472(7344): 466-70.
- Sanacora G, Mason GF, Rothman DL, Behar KL, Hyder F, Petroff OA, Berman RM, Charney DS, Krystal JH. 1999. Reduced cortical gamma-aminobutyric acid levels in depressed patients determined by proton magnetic resonance spectroscopy. *Arch Gen Psychiatry* 56: 1043-1047.
- Sanai N, Berger MS, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 2007. Comment on "Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension". *Science* 318: 393.
- Sanchez MM, Young LJ, Plotsky PM, Insel TR. 2000. Distribution of corticosteroid receptors in the rhesus brain: relative absence of glucocorticoid receptors in the hippocampal formation. *J Neurosci* 20: 4657-68.
- Sandi CH, Davies A, Cordero MI, Rodriguez JJ, Popov VI, Stewart MG. 2003. Rapid reversal of stress induced loss of synapses in CA3 of rat hippocampus following water maze training. *Eur J Neurosci* 17: 2447-256.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301: 805-9.
- Sapolsky RM. 1985. A mechanism for glucocorticoid toxicity in the hippocampus: Increased neuronal vulnerability to metabolic insults. *J Neurosci* 5: 1228-1232.
- Sapolsky RM. 1996. Stress, glucocorticoids, and damage to the nervous system: The current state of confusion. *Stress* 1: 1-19.
- Sapolsky RM. 2000. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 57: 925-935.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. 1985. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. *J Neurosci* 5: 1222-1227.
- Sapolsky RM, Packan DR, Vale WW. 1988. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: In vitro demonstration. *Brain Res* 453: 367-371.
- Sapolsky RM, Uno H, Rebert CS, Finch CE. 1990. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci* 10: 2897-2902.
- Schildkraut JJ. 1965. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122: 509-522.
- Schipke CG, Heuser I, Peters O. 2011. Antidepressants act on glial cells: SSRIs and serotonin elicit astrocyte calcium signaling in the mouse prefrontal cortex. *J Psychiatr Res* 45: 242-8.
- Schoenfeld T, Gould E. 2011. Stress, Stress Hormones, and Adult Neurogenesis. *Exp Neurol*. 2011 Jan 28. [Epub ahead of print]
- Scott BW, Wojtowicz JM, Burnham WM. 2000. Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat following electroconvulsive shock seizures. *Exp Neurol*. 165: 231-236.
- Schmidt HD, Duman RS. 2007. The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. *Behav Pharmacol* 18: 391-418.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. 2004. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429: 184-187.
- Schmued LC, Hopkins KJ. 2000. Fluoro-Jade B: A high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 874: 123-130.
- Seress L. 1992. Morphological variability and developmental aspects of monkey and human granule cells: Differences between the rodent and primate dentate gyrus. *Epilepsy Res Suppl* 7: 3-28.
- Seress L, Abraham H, Tornoczky T, Kosztolanyi G. 2001. Cell formation in the human hippocampal formation from midgestation to the late postnatal period. *Neuroscience* 105: 831-843.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21: 7153-7160.
- Sheline YI. 2000. 3D MRI studies of neuroanatomic changes in unipolar major depression: the role of stress and medical comorbidity. *Biol Psychiatry* 48: 791-800.
- Shenav BV, Harrison DW, Demaree HA. 2003. The neuropsychology of depression: a literature review and preliminary model. *Neuropsychol Rev* 13: 33-42.
- Silva R, Martins L, Longatto-Filho A, Almeida OF, Sousa N. 2007. Lithium prevents stress-induced reduction of vascular endothelium growth factor levels. *Neurosci Lett* 429: 33-38.
- Slezak M, Pfrieger FW. 2003. New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci* 26: 531-535.

- Sloviter RS, Sollas AL, Dean E, Neubort S. 1993. Adrenalectomy-induced granule cell degeneration in the rat hippocampal dentate gyrus: Characterization of an in vivo model of controlled neuronal death. *J Comp Neurol* 330: 324–336.
- Soetanto A, Wilson RS, Talbot K, Un A, Schneider JA, Sobiesk M, Kelly J, Leurgans S, Bennett DA, Arnold SE. 2010. Association of anxiety and depression with microtubule-associated protein 2- and synaptopodin-immunolabeled dendrite and spine densities in hippocampal CA3 of older humans. *Arch Gen Psychiatry* 67: 448–57.
- Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K. 2009. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459: 698–702.
- Somogyi P, Klausberger T. 2005. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562: 9–26.
- Sousa N, Almeida OF, Holsboer F, Paula-Barbosa MM, Madeira MD. 1998. Maintenance of hippocampal cell numbers in young and aged rats submitted to chronic unpredictable stress. Comparison with the effects of corticosterone treatment. *Stress* 2: 237–249.
- Sousa N, Cerqueira JJ, Almeida OF. 2008. Corticosteroid receptors and neuroplasticity. *Brain Res Rev* 57: 561–570.
- Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OFX, Paula-Barbosa MM. 2000. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience* 97: 253–266.
- Spalding KL, Bhardwaj RD, Buchholz BA, Druid H, Frisén J. 2005. Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell* 122: 133–43.
- Spruston N, Johnston D. 1992. Perforated patch-clamp analysis of the passive membrane properties of three classes of hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 67: 508–529.
- Squire LR. 1992. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99: 195–231.
- Starkman MN, Gebarski SS, Berent S, Schteingart DE. 1992. Hippocampal formation volume, memory dysfunction, and cortisol levels in patients with Cushing's syndrome. *Biol Psychiatry* 32: 756–765.
- Starkstein SE, Robinson RG. 1988. Lateralized emotional response following stroke. In: Kinsbourne M (ed). *Cerebral Hemisphere Function in Depression*. American Psychiatric Press: Washington, DC. pp 25–47.
- Stockmeier CA, Mahajan GJ, Konick LC, Overholser JC, Jurjus GJ, Meltzer HY, Uylings HB, Friedman L, Rajkowska G. 2004. Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol Psychiatry* 56: 640–650.
- Stone DJ, Walsh JP, Sebro R, Stevens R, Pantazopolous H, Benes FM. 2001. Effects of pre- and postnatal corticosterone exposure on the rat hippocampal GABA system. *Hippocampus* 11: 492–507.
- Stokes PE, Holtz A. 1997. Fluoxetine tenth anniversary update: the progress continues. *Clin Ther* 19: 1135–1250.
- Sullivan RM. 2004. Hemispheric asymmetry in stress processing in rat prefrontal cortex and the role of mesocortical dopamine. *Stress* 7: 131–143.
- Sullivan RM, Gratton A. 1999. Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. *J Neurosci* 19: 2834–40.
- Sullivan RM, Gratton A. 2002. Prefrontal cortical regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal function in the rat and implications for psychopathology: side matters. *Psychoneuroendocrinology* 27: 99–114.
- Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, Hen R, Belzung C. 2008. Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry* 64: 293–301.
- Surtees PG, Wainwright NW, Luben RN, Wareham NJ, Bingham SA, Khaw KT. 2008. Psychological distress, major depressive disorder, and risk of stroke. *Neurology* 70: 788–794.
- Szabadits E, Cserép C, Ludányi A, Katona I, Gracia-Llanes J, Freund TF, Nyíri G. 2007. Hippocampal GABAergic synapses possess the molecular machinery for retrograde nitric oxide signaling. *J Neurosci* 27: 8101–8111.
- Takahashi LK. 1998. Prenatal stress: Consequences of glucocorticoids on hippocampal development and function. *Int J Dev Neurosci* 16: 199–207.
- Tanapat P, Hastings NB, Rydel TA, Galea LA, Gould E. 2001. Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J Comp Neurol* 437: 496–504.

- Tashiro A, Sandler VM, Toni N, Zhao C, Gage FH. 2006. NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 442: 929–933.
- Thierry AM, Glowinski J, Goldman-Rakic PS, Christen Y. 1994. Motor and cognitive functions of the prefrontal cortex. Berlin: Springer-Verlag.
- Toda H, Hamani C, Fawcett AP, Hutchison WD, Lozano AM. 2008. The regulation of adult rodent hippocampal neurogenesis by deep brain stimulation. *J Neurosurg* 108: 132–138.
- Ueyama E, Ukai S, Ogawa A, Yamamoto M, Kawaguchi S, Ishii R, Shinosaki K. 2011. Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation increases hippocampal neurogenesis in rats. *Psychiatry Clin Neurosci* 65: 77–81.
- Uranova NA, Vostrikov VM, Orlovskaya DD, Rachmanova VI. 2004. Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophr Res* 67: 269–275.
- van der Staay FJ. 1999. Spatial working memory and reference memory of Brown Norway and WAG rats in a holeboard discrimination task. *Neurobiol Learn Mem* 71: 113–125.
- van Kampen M, Schmitt U, Hiemke C, Fuchs E. 2000. Diazepam has no beneficial effects on stress-induced behavioral and endocrine changes in male tree shrews. *Biochem Pharmacol Behav* 65: 539–546.
- van Os J, Selten JP. 1998. Prenatal exposure to maternal stress and subsequent schizophrenia. The May 1940 invasion of The Netherlands. *Br J Psychiatry* 172: 324–326.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. 1999. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13427–13431.
- Vertes RP. 2006. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142: 1–20.
- Vetter P, Roth A, Häusser M. 2001. Propagation of action potentials in dendrites depends on dendritic morphology. *J Neurophysiol* 85: 926–937.
- Videbech P, Ravnkilde B. 2004. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am J Psychiatry* 161: 1957–1966.
- Vollmann-Honsdorf GK, Flügge G, Fuchs E. 1997. Chronic psychosocial stress does not affect the number of pyramidal neurons in tree shrew hippocampus. *Neurosci. Lett* 233: 121–124.
- Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S. 2002. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci* 22: 6810–6818.
- Wadhwa PD, Sandman CA, Garite T. 2001. The neurobiology of stress in human pregnancy: Implications for development of the fetal central nervous system. *Prog Brain Res* 133: 131–142.
- Warner-Schmidt JL, Duman RS. 2006. Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* 16: 239–249.
- Warner-Schmidt JL, Duman RS. 2007. VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 4647–4652.
- Watanabe Y, Gould E, McEwen BS. 1992. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res* 588: 341–345.
- Watson JB, Mednick SA, Huttunen M, Wang X. 1999. Prenatal teratogens and the development of adult mental illness. *Dev Psychopathol* 11: 457–466.
- Weinstock M. 2008. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev* 32: 1073–1086.
- Welberg LA, Seckl JR. 2001. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol* 13: 113–128.
- Willner P. 1991. Behavioral models in psychopharmacology: theoretical, industrial and clinical perspectives. Cambridge: Cambridge University Press.
- Wolff JE, Laterra J, Goldstein GW. 1992. Steroid inhibition of neural microvessel morphogenesis in vitro: Receptor mediation and astroglial dependence. *J Neurochem* 58: 1023–1032.
- Woolley CS, Gould E, McEwen BS. 1990. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res* 531: 225–231.
- Wong EY, Herbert J. 2004. The corticoid environment: a determining factor for neural progenitors' survival in the adult hippocampus. *Eur J Neurosci* 20: 2491–2498.
- Wong EY, Herbert J. 2005. Roles of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the regulation of progenitor proliferation in the adult hippocampus. *Eur J Neurosci* 22: 785–792.
- Yadid G, Nakash R, Deri I, Tamar G, Kinor N, Gispan I, Zangen A. 2000. Elucidation of the neurobiology of depression: insights from a novel genetic animal model. *Prog Neurobiol* 62: 353–378.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönettel tartozom mentoraimnak, akik munkámban támogattak: **Prof. Dr. Eberhard Fuchs** (Clinical Neurobiology Laboratory, German Primate Center, Leibniz Institute for Primate Research, Göttingen, Germany), **Prof. Dr. Gabriele Flügge** (Clinical Neurobiology Laboratory, German Primate Center, Leibniz Institute for Primate Research, Göttingen, Germany), **Prof. Dr. Seress László** (Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium, Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Pécs).

Köszönöm a gyümölcsöző együttműködést kollaborációs partnereinknek: **Prof. Dr. Christopher L. Coe** (Harlow Primate Laboratory, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA); **Prof. Dr. Jens Frahm** (Biomedizinische NMR Forschungs GmbH am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen, Germany), **Prof. Dr. Elizabeth Gould** (Department of Psychology, Princeton University, Princeton, New Jersey, USA); **Prof. Dr. Christoph Hiemke** (Department of Psychiatry, University of Mainz, Mainz, Germany); **Prof. Dr. Martin E. Keck** (Max Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany); **Prof. Dr. Paul J. Lucassen** (Centre for Neuroscience, Swammerdam Institute of Life Sciences, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands); **Prof. Dr. Weiqi Zhang** (Laboratory of Molecular Psychiatry, Department of Psychiatry, Westfälische Wilhelms University, Münster, Germany).

Köszönet illeti a kísérletekben közreműködő kollégáimat a közös erőfeszítésekért és a gondolatébresztő beszélgetésekért, vitákért: Nashat Abumaria, Alessandro Bartolomucci, Gabriel de Biurrun, Dr. Anja K. Fischer, Marieke G.C. van der Hart, Dr. Urs Heilbronner, Wen Hu, Claire Herzog, Marja van Kampen, Jeanine I.H. Keuker, Maarten H.P. Kole, Marian Kramer, Dr. Thomas Michaelis, Claudia Perez-Cruz, Olga Pudovkina, Rafal Rygula, Barthel Schmelting, Dr. Mária Simon, Takashi Watanabe, Tobias Welt.

A kutatási támogatásért az alábbi szervezeteknek tartozom hálával: German Primate Center, Leibniz Institute for Primate Research; DFG Research Center Molecular Physiology of the Brain (CMPB); Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie; I.R.I. Servier (Courbevoie, France); Solvay Pharmaceuticals (Weesp, the Netherlands); GlaxoSmithKline (Verona, Italy); Merck, Sharp and Dohme Research Laboratories; Max Planck Institute of Psychiatry.

Külön köszönet illeti mindazokat, akik lelkiismeretes munkájukkal munkánkhoz technikai segítséget nyújtottak, illetve a kísérleti állatok gondozásában résztvettek: Susanne Bauch, Simone Barsky, Sandra Donath, Cornelia Heckmann, Andreas Heutz, Simone Lüert.

Végezetül, de nem utolsósorban köszönöm családom megértő támogatását és türelmét.