

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**A stresszválasz és a hangulatzavarok  
hátterében álló neuroptiderg  
mechanizmusok vizsgálata rágcsáló  
modellekben**

Dr. Gaszner Balázs



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Anatómiai Intézet

2023



**Tartalom**

1. Előszó.....	9
2. Bevezetés.....	10
2.1. A stressz fogalma.....	10
2.2. A stresszválasz főbb mechanizmusai.....	11
2.3. A stresszválaszt befolyásoló tényezők .....	12
2.3.1. A stresszor erőssége, típusa és időtartama .....	13
2.3.2. Életkor.....	14
2.3.3. Genetikai háttér .....	16
2.3.4. Az energetikai állapot és stresszválasz kapcsolata .....	17
2.3.5. A stresszadaptációt befolyásoló egyéb tényezők.....	17
2.4. A stresszválasz felsőbbrendű szabályozásának funkcionális neuroanatómiája....	17
2.4.1. Prefrontális kéreg.....	18
2.4.2. Hippocampus.....	19
2.4.3. Amygdala.....	20
2.4.4. Nucleus interstitialis striae terminalis.....	22
2.4.5. Agytörzsi stresszasszociált központok.....	22
2.4.5.1. Edinger-Westphal mag.....	22
2.4.5.2. Ventrális tegmentális área.....	24
2.4.5.3. Nucleus raphe dorsalis.....	25
2.4.5.4. Locus ceruleus és az A5 noradrenerg sejtcsoport.....	25
2.5. A neuropeptidek és receptoraik szerepe a stresszadaptációban és hangulatzavarban.....	26
2.5.1. Corticotropin-releasing hormon.....	26
2.5.2. CRH1 receptor.....	28
2.5.3. CRH2 receptor.....	28
2.5.4. Urocortin 1.....	29
2.6. A PACAP és PAC1 receptor.....	30
Hangulatzavarok.....	32
2.6.1. Depresszióelméletek.....	33
2.6.2. A depresszió háttérében álló genetikai eltérések.....	34
2.6.3. A depresszió epigenetikai háttere.....	35
2.6.4. A környezeti stresszhatás és a depresszió kapcsolata.....	37
2.6.5. A hangulatzavarok alap kutatási modelljei.....	38
2.6.5.1. A depresszió összetett modelljei.....	40
2.6.5.1.1. Match-mismatch hipotézis.....	40
2.6.5.1.2. A három találat elmélet.....	41
2.6.6. A hangulati állapot mérése rácsálós modellekben.....	41
2.6.7. Az állatmodellek megbízhatóságának értékelése.....	42
2.6.8. A Parkinson-kór és a hozzá társuló hangulatzavarok.....	43
3. Célkitűzések és hipotézisek.....	45

4. Módszerek.....	51
4.1. Kísérleti állatok.....	51
4.1.1. Egerek.....	51
4.1.1.1. PACAP KO törzs.....	51
4.1.1.2. TRPA1 KO törzs.....	51
4.1.2. Patkányok.....	51
4.2. Emberből származó agyszövetminták.....	52
4.3. Stressz modellek.....	52
4.3.1. Forced swim teszt, mint akut stressz, egérben.....	52
4.3.2. Akut restraint stressz patkányban.....	52
4.3.3. Krónikus variábilis enyhe stressz egérben és patkányban.....	52
4.3.4. Maternális depriváció a három találat elmélet modell részeként, a konstrukciós és fenomenológiai validitás tesztelésére.....	53
4.3.5. Maternális depriváció a három találat elmélet modell részeként, a modell prediktív validitásának tesztelésére.....	56
4.4. Viselkedési és mozgáskoordinációs tesztek.....	57
4.4.1. Light-dark box teszt.....	57
4.4.2. Marble burying teszt.....	58
4.4.3. Open field teszt.....	58
4.4.4. Tail suspension teszt.....	58
4.4.5. Forced swim teszt.....	58
4.4.6. Cukorpreferencia teszt.....	58
4.4.7. Rotarod performance teszt.....	59
4.5. A Parkinson-kór rotenon modellje.....	59
4.6. Műtétek.....	59
4.6.1. Célzott neuron abláció leptin-szaporin segítségével.....	59
4.6.2. Krónikus intracerebrális kanül implantáció.....	60
4.6.3. Retrográd transzneurális vírus jelölés.....	60
4.6.4. Leptin kezelés.....	60
4.7. Metabolikus és hőszabályozási mérések.....	60
4.8. Szövetmintagyűjtés.....	61
Metszés.....	61
4.9. Hematoxylin-eosin festés.....	62
4.10. Free floating immunfestés diamino-benzidin kromogénnel.....	62
4.11. Free floating egyes és többes immunfluoreszcens jelölések.....	62
4.12. Konvencionális free floating <i>in situ</i> hibridizáció.....	63
4.13. Ultraszenzitív RNAscope <i>in situ</i> hibridizáció és immunfluoreszcens jelölés kombinációja.....	63
4.14. Mikroszkópia, digitális képalkotás, morfometria.....	64
4.15. PCR.....	65
4.16. Reverz-transzkriptáz kvantitatív PCR (RT-qPCR).....	66
4.17. TaqMan RT-qPCR.....	66
4.18. Radioimmunassay.....	66
4.19. Statisztika.....	67

5. Eredmények.....	68
5.I. Génmódosított egértörzsek vizsgálata .....	68
5.I.1. PACAP génkiütött egerek viselkedésének és akut stresszadaptációjának vizsgálata.....	68
5.I.1.1. A PACAP KO egértörzs hangulati állapotának elemzése viselkedési tesztekben.....	68
5.I.1.2. A PACAP KO egértörzs FST után mutatott neuronális FOS aktivációjának mintázata.....	69
5.I.2. PACAP génkiütött egerek viselkedésének és krónikus stresszadaptációjának vizsgálata.....	77
5.I.2.1. A CVMS modell fizikai, endokrinológiai és viselkedési hatásai PACAP KO egerekben.....	77
5.I.2.2. FOSB/ $\Delta$ FOSB neuronális aktivációs mintázat WT és PACAP KO egerek agyában.....	79
5.I.2.2.1. FOSB/ $\Delta$ FOSB aktivációs mintázat a nem kezelt WT és PACAP KO egereknél, CVMS hatására.....	79
5.I.2.2.2. FOSB/ $\Delta$ FOSB aktivációs mintázat imipraminnal vagy oldószerrel kezelt WT és PACAP KO egereknél, CVMS hatására.....	84
5.I.2.2.3. A BNSTov CRH neuronjainak aktivációs mintázata.....	87
5.I.2.2.4. A EWcp UCN1 tartalmú idegsejtjeinek aktivációs mintázata...	89
5.I.2.2.5. Változások a szerotoninergerg DR-ban.....	89
5.I.3. A TRPA1 KO egértörzs vizsgálata a CVMS-ben.....	90
5.I.3.1. Viselkedési tesztek.....	91
5.I.3.2. Endokrin és fizikai paraméterek.....	93
5.I.3.3. A CVMS befolyásolja a <i>Trpa1</i> és az UCN1 expresszióját.....	94
5.I.3.4. A <i>TRPA1</i> mRNS jelen van az emberi EWcp-ben és mennyisége kisebb öngyilkosságok áldozataiban.....	96
5.II. A depresszió három találat elmélet modelljének kifejlesztése és validálása egérben.....	97
5.II.1. A PACAP génmódosított egértörzs a három találat elmélet modelljében...	97
5.II.1.1. Fizikai és endokrin paraméterek.....	97
5.II.1.2. Viselkedési tesztek.....	99
5.II.1.2.1. Forced swim teszt.....	99
5.II.1.2.2. Tail suspension teszt.....	99
5.II.1.2.3. Light-dark box teszt.....	99
5.II.1.2.4. Marble burying teszt.....	100
5.II.1.3. Morfológiai eredmények.....	102
5.II.1.3.1. CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB kolokalizáció a BNSTov-ban.....	102
5.II.1.3.2. CRH immunreaktív neuronok száma a BNSTov-ban.....	102
5.II.1.3.3. UCN1-FOSB/ $\Delta$ FOSB kolokalizáció az EWcp-ben.....	104
5.II.1.3.4. UCN1 specifikus jelzenítés az EWcp-ben.....	104
5.II.1.3.5. Az UCN1 ir sejtek száma a EWcp-ben.....	106
5.II.1.3.6. Szerotonin specifikus jelzenítés a DR-ban.....	106
5.II.1.3.7. 5HT-FOSB/ $\Delta$ FOSB kolokalizáció a DR-ban.....	106

5.II.1.3.8. 5HT ir sejtek száma a DR-ban.....	106
5.II.2. A három találat elméleten alapuló modell prediktív validitásának vizsgálata PACAP HZ egerek segítségével.....	108
5.II.2.1. Fizikai és endokrin validitási paraméterek.....	108
5.II.2.2. A viselkedési tesztek eredményei.....	110
5.II.2.3. Szövettani eredmények.....	110
5.II.2.3.1. Prefrontális kéreg.....	110
5.II.2.3.2. Hippocampus.....	113
5.II.2.3.3. BNSTov.....	117
5.II.2.3.4. CeA.....	119
5.II.2.3.5. VTA .....	121
5.II.2.3.6. EWcp.....	122
5.II.2.3.7. DR.....	125
5.II.2.3.8. Összefüggések a viselkedési tesztek és morfológiai eredmények között.....	127
5.III. A stresszadaptáció életkorfüggő változásainak vizsgálata.....	127
5.III.1. A FOS immunreaktivitás változása az életkor függvényében akut stressz modellben.....	127
5.III.2. A FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás változása az életkor függvényében akut és krónikus variábilis enyhe stressz modellben.....	136
5.III.2.1. Bazális és az ARS által kiváltott FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás az életkor függvényében.....	136
5.III.2.2. A CVMS által kiváltott FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás korfüggő dinamikája.....	145
5.III.3. A CRH tartalmú idegsejtek korfüggő neuronális aktivásmintázata ARS és CVMS modellekben.....	146
5.III.3.1. A CRH tartalmú idegsejtek korfüggő neuronális aktivitás mintázata ARS modellben.....	146
5.III.3.2. A CRH tartalmú idegsejtek korfüggő neuronális aktivitásmintázata CVMS modellben.....	150
5.IV. Az Edinger-Westphal mag, mint a stresszadaptáció energetikájában szerepet játszó központ vizsgálata.....	154
5.IV.1. A melanocortin 4 receptor jelentőségének vizsgálata az Edinger-Westphal magban.....	154
5.IV.1.1. Az EWcp/UCN1 neuronok MC4R-t hordoznak, és alpha-MSH valamint AgRP ir rostok idegzik be őket.....	154
5.IV.1.2. Funkcionális-morfológiai változások 48 órás éhezés hatására a EWcp-ban.....	156
5.IV.1.3. Lokális MC4R agonista és antagonisták kezelése funkcionális- morfológiai hatása az EWcp-ben.....	158
5.IV.1.4. Az EWcp-be adott lokális alpha-MSH kezelés hatása a táplálékfelvételre és anyagcserére.....	159
5.IV.2. Leptin hatása EWcp-ben, és ennek metabolikus jelentősége.....	161
5.IV.2.1. Az EWcp, mint szenzor: a leptin kötődik az UCN1 neuronokhoz...	161

5.IV.2.2. Az EWcp, mint integrátor: a leptin jelátviteli hatása az EWcp/UCN1 neuronokban.....	162
5.IV.2.3. Az EWcp, mint integrátor: a leptin hatása az <i>Ucn1</i> mRNS és UCN1 peptid.....	163
5.IV.2.4. Az EWcp, mint effektor: retrográd jelölés a fehér zsírszövet felől..	164
5.IV.2.5. Az EWcp, mint effektor: az EWcp/LepRb/UCN1 neuronok hatása a fehér zsírszövetre.....	165
5.IV.2.6. Az EWcp, mint effektor: az EWcp/LepRb/UCN1 neuronok hatása a barna zsírszövetre.....	170
5.IV.2.7. Az EWcp/LepRb/UCN1 neuronok hatása a plazma leptinre és a lipidprofilra.....	170
5.IV.2.8. Az EWcp/LepRb/UCN1 neuronok, mint effektor: a táplálékfelvételi és energetikai hatás.....	171
5.V. Az EWcp szerepe a Parkinson-kórhoz társuló hangulatzavarban.....	172
5.V.1. A szisztémás rotenon kezelés a Parkinson-kórhoz hasonló állapotot okoz patkányban, mely motoros és nem motoros tünetekben is megnyilvánul..	172
5.V.1.1. A szisztémás rotenon kezelés a SNpc dopaminerg sejtjei mellett az EWcp peptiderg neuronjait is károsítja.....	173
5.V.1.2. A EWcp a rotenon modellben.....	177
5.V.1.3. A hangulatszabályozásban résztvevő egyéb agyterületek a rotenon modellben.....	182
5.V.2. Szelektív EWcp/UCN1 neuron abláció mozgászavar nélkül váltja ki a PD nem motoros tüneteit.....	184
6. Diszkusszió.....	187
6.I. Génmódosított egértörzsek stresszadaptációjának vizsgálata.....	187
6.I.1. A PACAP KO egerek depressziószerű tüneteket, alacsonyabb szorongási szintet és csökkent FOS aktivációt mutatnak akut stresszben.....	187
6.I.2. A PACAP hiánya agyterületfüggő módon befolyásolja a FOSB/ $\Delta$ FOSB megjelenését a CVMS modellben.....	190
6.I.3. A TRPA1 jelen van a EWcp/UCN1 neuronokban és mennyisége csökken a CVMS egérmodellben valamint öngyilkosság következtében elhunytak EWcp mintáiban.....	192
6.II. A három találat elmélet egérmodelljének kifejlesztése és validálása.....	195
6.II.1. A stresszadaptáció fizikai, endokrinológiai és viselkedési indikátorai, valamint funkcionális-morfológiai eredmények a három találat elmélet konstrukciós és fenomenológiai validitására utalnak PACAP HZ egerekben .....	196
6.II.2. A három találat elmélet egérmodelljének prediktív validitásának tesztelése .....	198
6.III. A stresszválasz korfüggésének vizsgálata.....	205
6.III.1. Az akut stressz hatása a FOS kifejeződésre az életkor függvényében...	205
6.III.2. A FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás életkorfüggő dinamikája.....	207

6.III.2.1. Az ARS által kiváltott FOSB/ $\Delta$ FOSB válasz agyterületspecifikus módon függ az életkortól.....	207
6.III.2.2 A CVMS által kiváltott FOSB/ $\Delta$ FOSB ir agyterületspecifikus módon függ az életkortól.....	208
6.III.3. A CRH tartalmú idegsejtek azonnali gén aktivációjának korfüggő dinamikája akut és krónikus stressz modellekben.....	210
6.III.3.1. CRH neuron aktiváció ARS hatására az életkor függvényében....	210
6.III.3.2. CRH neuron aktiváció CVMS hatására az életkor függvényében...	211
6.IV. Az EWcp, mint az energiaegyensúly szabályozásában szerepet játszó stresszadaptációs központ vizsgálata.....	213
6.IV.1. A MC4R ligandumok modulálják az energiaháztarást az EWcp/UCN1 neuronokon keresztül.....	213
6.IV.2. Kapcsolat az EWcp és a fehér zsírszövet között.....	216
6.IV.2.1. A leptin több jelátviteli utat is aktivál az EWcp neuronjaiban....	216
6.IV.2.2. Az EWcp/LepRb/UCN1 neuronok a vegetatív idegrendszeren keresztül szabályozzák a fehér zsírszövet mennyiségét.....	217
6.IV.2.3. Az EWcp/LepRb/UCN1 neuronok szerepe az energiaegyensúlyban.....	218
6.V. Az EWcp hozzájárul a Parkinson-kór nem motoros tüneteinek patkányban....	219
6.V.1. A szorongás és depresszió, mint a Parkinson-kór nem motoros tüneteinek megjelennek a rotenon modellben.....	219
6.V.2. Az EWcp/UCN1 neuronok neurodegenerációt szenvednek, és a túlélő sejtek funkcionális károsodást mutatnak a rotenon modellben.....	220
6.V.3. A lokális célzott toxikus UCN1 neuron abláció megváltozott hangulati állapotot eredményez.....	221
7. Új tudományos eredmények összegzése .....	223
8. Az értekezés alapját képező dolgozatok listája.....	225
9. A pályázó értekezéséhez fel nem használt lektorált tudományos dolgozatai.....	227
10. Tudománymetriai összefoglaló táblázatok.....	233
11. Köszönetnyilvánítás.....	235
12. Támogatók.....	238
13. Rövidítések jegyzéke.....	239
14. Függelék.....	243
15. Idézett irodalom.....	266



## 1. Előszó

Az itt összefoglalt munka előzményét az a funkcionális neuromorfológiai alap adta, amit PhD képzésem során elsajátíthattam (Gaszner, 2008), és ami a centrális projekciójú Edinger-Westphal mag peptiderg, urocortin 1 tartalmú idegsejtjeinek energiaegyensúly és stresszadaptációban betöltött szerepének megismerésére irányult, elsősorban akut modellekben (Gaszner és mtsai., 2003, 2004, 2007, 2009a,b). Jelen doktori értekezés az elmúlt tizenöt év eredményeit foglalja össze, ahol inkább már a stressz hosszabb távú hatásainak megértését tűztük ki célul. Munkánk során továbbra is vizsgáltuk a peptiderg Edinger-Wespthal mag működését a stresszválaszban és ezzel összefüggésben az energia egyensúly fenntartásában (Füredi és mtsai., 2017, Xu és mtsai., 2022), de tanulmányainkat kiterjesztettük számos további, a stresszadaptációban szerepet játszó agyterületre is, köztük a limbikus előagyi corticotropin-releasing hormon tartalmú régiókra (Gaszner és mtsai., 2012). Munkánk fő célja a depresszió, mint a stressz által kiváltott hangulatzavar hátterének vizsgálata volt. Akut (Kovács és mtsai., 2018) és krónikus (Kovács és mtsai., 2019, 2022, Kovács, 2020) stresszmodelleket alkalmaztunk a stresszválasz életkorfüggő változásának feltérképezésére patkányban, valamint génmódosított egértörzsekben krónikus stresszben vizsgáltuk, hogyan járul hozzá egy hátrányos genetikai változás a hangulatzavarszerű állapot kifejlődéséhez (Kormos és mtsai., 2016, 2022, Kormos, 2018). Egy további lépésben ezt a genetikai predispozíciót és krónikus stresszt epigenetikai változásokat okozó maternális deprivációval is kombináltuk. Így kialakítottunk egy új modellt egérben, mely a depresszió három találat elméletén alapszik (Farkas és mtsai., 2016, 2017, Farkas, 2018). Munkánk során értékeltük a modell validitását a Willner-féle kritériumok szerint (Gaszner és mtsai., 2022a, 2022b, Gaszner, 2023). A legutóbbi időszakban figyelmünk a Parkinson-kórra (PD), pontosabban annak nem motoros tüneteiként jelentkező hangulatzavarok felé irányult. Azt a feltételezést vizsgáltuk meg, hogy a peptiderg Edinger-Westphal mag károsodik-e a betegség állatmodelljeiben, és hogy az hozzájárulhat-e a hangulatzavarhoz (Ujvári és mtsai., 2022, Ujvári, 2022).

Az alábbi értekezés 12 eredeti közlemény (Gaszner és mtsai., 2012, Kormos és mtsai., 2016, 2022, Farkas és mtsai., 2017, Füredi és mtsai., 2017, Kovács és mtsai., 2018, 2019, 2022, Gaszner és mtsai., 2022a,b, Xu és mtsai., 2022, Ujvári és mtsai., 2022), egy lektorált könyvfejezet (Farkas és mtsai., 2016) és egy összefoglaló publikáció (Kormos és Gaszner, 2013), valamint az ezek felhasználásával készült öt PhD disszertáció alapján íródott (Kormos, 2018, Farkas, 2018, Kovács, 2020, Ujvári, 2022, Gaszner, 2023).

## 2. Bevezetés

### 2.1. A stressz fogalma

Claude Bernard (1865) írta le a szervezet belső környezetének állandóságát, majd Walter B. Cannon (1929) vezette be a homeosztázis fogalmát, mely a szervezet belső egyensúlyának az élettani változók szűk határok közti finom változása révén létrejövő állandóságát jelenti. Cannon (1929) ennek fenntartásában a szimpatikus idegrendszer kiemelt jelentőségét hangsúlyozta, melyre jól ismert példa a fenyegető élethelyzetekben fellépő Cannon-féle vészreakció.

A stressz fogalmát Selye János vezette be 1936-ban és úgy határozta meg azt, mint a szervezet nem specifikus válasza valamely fenyegető hatásra (Selye, 1936). Bruce McEwen (2000) ezt a definíciót kiegészítette azzal, hogy a hatás az egyén fiziológiai és/vagy pszichológiai integritását veszélyezteti, és az lehet valós, de lehet csupán valósnak vélt fenyegetés is, mely végső soron fiziológiai és/vagy viselkedésszerű válaszreakcióhoz vezet. A stresszt egy külső inger, a stresszor idézi elő, mely kiválthatja a stresszválaszt. A stresszválasz célja a homeosztázis védelme és helyreállítása (Selye, 1971). Egy adott inger azonban eltérő választ válthat ki egyénenként, és ugyanazon inger az adott egyedben eltérő válaszreakciókat indukálhat (Levine, 2005).

Mivel a homeosztázis fenntartása érdekében a fő élettani paraméterek (vér- és folyadékvolumen, pH érték, oxigén szaturáció, vérnyomás, ionháztartás) folyamatos, finom, de igen szűk határértékek közötti változásokat mutatnak, az egy adott időpillanatban fennálló állapot beszűkítheti a stresszválaszkészséget (McEwen, 2002). A stresszválaszkészség behatároltságának, azaz a megküzdési (coping) kapacitásnak leírásához Sterling és Eyer (1988) vezette be az allostázis fogalmát, mely a szervezet azon képességét jelenti, mely a változások által eléri a stabilitást, így biztosítva szervezetünk megfelelő felkészültségét az adott fenyegetésre. Az allostázis tehát lényegében a homeosztázis fogalmának kiterjesztése, amely magában foglal szélesebb tartományokban változó faktorokat is, melyek nem tartoznak a klasszikus Cannon-féle homeosztatikussal. A vér kémhatását és oxigén telítettségét, mint homeosztatikussal, a szervezet nagyon szűk határok között tartja. Ez annak ellenére is így van, hogy ezeket a nagyon széles tartományban funkcionális váltakozást mutató kardiovaszkuláris-, metabolikus-, immun- és központi idegrendszer is befolyásolja, mivel ezek működését a külső és belső környezet nagyobb mértékű változásai drasztikusan érintik (McEwen, 1998, 2002). Az allostázis mindenkori állapota, más szóval, a szervezet allostatikussal kapacitása határozza meg, hogy egy adott időpillanatban milyen stresszadaptációs

készség áll fenn, milyen mértékű allosztatikus terhelés elviselésére képes a szervezet (McEwen, 2002).

## 2.2. A stresszválasz főbb mechanizmusai

A stresszválasz feladata a túléléshez nélkülözhetetlen adaptáció megindítása és fenntartása. Az új egyensúlyi állapot megtartásához a vegetatív idegrendszer és a neuroendokrin rendszer összehangolt válasza szükséges.

A szervezetet ért stresszor először a vegetatív idegrendszer útján a sympatho-adrenomedullaris tengely azonnali aktivációját indítja el. A hypothalamus a gerincvelő szürkeállományának oldalsó szarvában (nucleus intermediolateralis, IML) elhelyezkedő idegsejteket aktiválja. Ezek a truncus sympathicus ganglionjai és a prevertebrális szimpatikus dúcok útján számos, az azonnali adaptációban fontos szerepet vállaló szerv (pl. szív és keringési rendszer, légzőapparat) működését befolyásolják. Ezen túl, a szimpatikus hatás a mellékvesevelő katekolamin hormonjainak elválasztását fokozva segíti a szervezet rövidtávú alkalmazkodását az energia raktárak mobilizálása révén. A légzési és keringési rendszer működésének változása ekkor a szervezet létfontosságú, és az adaptációban elsőrendű szerepet játszó szervrendszerek felé irányítja a felszabadított tartalékokat (pl. szív, tüdő, vázizomrendszer, központi idegrendszer). Ezzel egyidőben, az azonnali adaptáció idején átmenetileg nélkülözhető funkciójú vagy rövidtávon alárendelt szereppel bíró szervrendszerek vérellátása csökken (pl. emésztőapparat, kiválasztás szervrendszere). Tekintettel arra, hogy e disszertáció témája elsősorban a krónikus stresszadaptáció illetve annak zavarával függ össze, itt az akut stresszválasz katekolaminerg mechanizmusainak további részletezésétől eltekintek. Összefoglaló közlemények a témában: (Carrasco és Van de Kar, 2003, Ulrich-Lai és Herman, 2009).

A vegetatív idegrendszer aktiválódása mellett, a neuroendokrin működés időigényességéből adódóan némileg késleltetve, megfigyelhetjük a hypothalamus-hypophysis-adrenocorticalis (HPA) tengely aktivációját is, melynek feladata a hosszabb távú (órák, napok, hetek) adaptáció szabályozása (összefoglaló közlemény: Chrousos, 2009). A HPA tengely kulcsa a nucleus paraventricularis hypothalami (PVN) parvocellularis (PVNp) divíziójának corticotropin-releasing hormon (CRH) tartalmú hypophyseotroph sejtcsoportja. Ezek az idegsejtek axontranszport útján az eminentia medianába juttatják a CRH-t, mely a neuroszekréció után a kapillárisokból a hypophysis portális vénáiba kerül és az adenohipophysis corticotroph sejtjein az 1-es típusú CRH receptorhoz (CRH1R) kötődik (összefoglaló közlemény: Deussing és Chen, 2018). A CRH1R-on történő jelátvitel hatására megindul a proopiomelanocortin szintézise,

melyből peptidhasítás után egyéb termékek mellett adrenocorticotrop hormon (ACTH) keletkezik. A cortiocotroph sejtek az ACTH-t a véráramba juttatják, mely a mellékvesekéreg zona fasciculata sejtjein, 2. típusú melanocortin receptoron hatva serkenti a glukokortikoid hormonok szintézisét és elválasztását. Az kortizol (emberben) illetve kortikoszteron (CORT) (patkányban, egérben) sokoldalúan segíti a szervezetet a homeosztázis visszaállításában: fokozza a metabolizmust, csökkenti az étvágyat és a gyulladási folyamatokat, hozzájárul a kardiovaszkuláris rendszer adaptációjához (összefoglaló közlemények a témában: Herman és mtsai., 2016, Burford és mtsai., 2017, Bereshchenko és mtsai., 2018, de Kloet és Herman, 2018). A glukokortikoidok a központi idegrendszer stresszadaptációban vitt szerepét is befolyásolják, mert hatásukra fokozódik a figyelem és az emléknymok kialakítása (Goldfarb, 2018). Ugyanakkor a glukokortikoidok befolyásolják a hangulati állapotot és túltermelésük, illetve hosszasan emelkedett vérszintjük gyakran társul hangulatzavarokhoz (Kino, 2015, de Kloet és mtsai., 2016, Albrecht, 2017, Ramot és mtsai., 2017, Juruena és mtsai., 2018; Perrin és Pariante, 2020). Végül, de nem utolsó sorban, a glukokortikoidok a glukokortikoid receptorok (GR) és mineralokortikoid receptorok (MR) útján negatív feedback mechanizmussal szabályozzák önmaguk szintézisét és szekrécióját a limbikus rendszeren, valamint a PVNp CRH neuronjain keresztül (de Kloet és mtsai., 2018).

### **2.3. A stresszválaszt befolyásoló tényezők**

A szervezetet ért külső hatások, melyek kibillentik azt az egyensúlyi állapotából, és adaptációra készítetik, egyazon szervezeten belül eltérő választ válthatnak ki, még akkor is, ha ugyanaz a külső inger vagy stresszor jelentkezik (Levine, 2005). Ez arra utal, hogy a stresszadaptációt számos külső és belső tényező befolyásolja. Valószínűleg lehetetlen vállalkozás lenne egy teljes listát készíteni arról, hogy melyek lehetnek ezek a faktorok. A biológiai rendszerek esetében még a legkörültekintőbb kísérlettervezés és a legjobb tudásunk szerint szükségesnek látszó összes kontroll bevonása mellett sem kapjuk pontosan ugyanazt az eredményt megismételt kísérleteinkben. Ez azt bizonyítja, hogy nem ismerjük az összes olyan faktort, ami befolyásolja egy organizmus működését. Nincs ez másként a stresszadaptáció és zavarainak megértésére irányuló kutatásaink terén sem. Mégis, az alábbiakban néhány olyan, a stresszkutatások során nem mellékes szempontot szeretnék röviden felvillantani, melyek a disszertációban összefoglalt projekteknél a vizsgálatok tárgyát képezték.

### 2.3.1. A stresszor erőssége, típusa és időtartama

Jól ismert jelenség, hogy a HPA tengely aktivációja eltérő mértékű attól függően, hogy milyen hatás váltja ki az aktivációt. Ennek megfelelően, a CRH, az ACTH és a CORT szint emelkedése, valamint a FOS, mint azonnali géntermék és aktivációs marker megjelenése a PVN-ben és corticotroph sejtekben a stresszor típusától függ. A fájdalomstressz például sokkal drámaibb aktivációt okoz a PVN-ben, mint egy immunológiai stresszor, a lipopoliszacharid (LPS) injekciója (Gavrilov és mtsai., 2008). Chowdhury és mtsai. (2000) szintén kimutatták, hogy a stresszor súlyossága és típusa befolyásolja a patkány PVN aktiválódását: a súlyosabb stresszor, az immobilizáció, ahol az állat végtagjait egy sima felülethez abdukált helyzetben rögzítik, sokkal nagyobb mértékű FOS aktivációt okoz, mint az enyhébb restraint stressz, ahol az állatot egy szűk hengerbe zárják. Saját korábbi kísérleteink, ahol az Edinger-Westphal mag peptiderg neuronjait vizsgáltuk, szintén azt mutatták, hogy a terület erős reakciót mutat LPS kezelésre, restraint stresszre, és éter expozícióra, míg hiperozmotikus stressz és a hipotenzio hatása nem volt kifejezett (Gaszner és mtsai., 2004).

Sok, a stresszszabályozásban részt vevő területről ismert, hogy a régió aktivációja függ a vizsgált stresszor attribútumaitól. Többféle megközelítés is megtalálható a szakirodalomban a stresszorok kategorizálására; itt csupán kettőt szeretnék kiemelni ezek közül. Az első klasszifikáció a stresszorokat, talán kissé túlságosan szigorúan, két fő kategóriába sorolja. Eszerint ismerünk egyrészt szisztémás, homeosztatisz vagy más néven fiziológiai stresszorokat, melyek elsősorban kardiovaszkuláris, ozmotikus és immunrendszeri adaptációt váltanak ki. Másrészt, és ez a kör a disszertáció témája szempontjából fontosabb, definiálhatjuk a neurogén, érzelmi vagy pszichológiai stresszorok csoportját. Utóbbi modelljei lehetnek az immobilizáció, a restraint, a fájdalom vagy a lábán alkalmazott elektromos áramütés (összefoglaló közlemények a témában: Sawchenko és mtsai., 2000; Dayas és mtsai., 2001).

A második felosztás a Herman és Cullinan (1997) által javasolt megközelítést alkalmazza. A szisztémás stresszorok azonnali választ kívánnak a túlélés érdekében. Ennek modelljeiben a légzőrendszer (éter inhaláció), a kardiovaszkuláris rendszer (hipotenzív vérzés és hiperozmotikus hatás) vagy az immunrendszer (LPS injekció) működését állítják kihívás alá. Ezzel szemben a processzív stresszorok, mint például a restraint vagy a krónikus fájdalom multimodális hatások, amelyek összetett, ismétlődő ingerek hatására indítanak meg fiziológiai válaszreakciókat. Az idegsejtek stresszorspecifikus aktivációs mintázatának értékelése alapján Dayas és mtsai. (2001) arra a következtetésre jutottak, hogy az agy kategóriaspecifikus neuronhálózatokat használ a stresszválaszok irányítására. Ilyen vizsgálatokban a központi

idegrendszer területén az idegsejtaktiváció morfológiai módszerrel végzett térképezéséhez gyakran alkalmazzák az azonnali gének (immediate early genes) termékeinek kimutatását.

Saját laboratóriumunkban is gyakran használjuk ezeket a módszereket, hogy bizonyítsuk egy idegsejt vagy azok egy csoportjának válaszát a környezetből érkező stimulusra. A disszertáció alapját képező több projektben az aktivátor protein 1 (AP1) transzkripciós faktor egyik alegységét képező fehérjék családjába tartozó FOS és FOSB/ $\Delta$ FOSB fehérjéket vizsgáltuk (Kovács és mtsai., 1998). E fehérjék génjei egy bizonyos küszöbérték feletti stimulus esetén igen rövid időn belül aktiválódnak (Worley és mtsai., 1993), és más, új gének kifejeződését irányítják, melyek összetett adaptációs folyamatokban játszanak szerepet (Kovács, 2008). A FOS fehérje immunreaktivitásának maximumát az inger követően két órával éri el sejtmagban (Kovács, 1998, Nestler, 2008), mely aztán csökken és visszatér alapértékére 4-6 órán belül (Sonnenberg és mtsai., 1989, Nestler, 2008). A FOSB fehérje szintézise a FOS-hoz képest lassabban éri el maximumát és féléletideje (9,5 óra) is hosszabb (Kovács, 1998). A  $\Delta$ FOSB, a FOSB egy splice variánsa, mely később és kisebb mennyiségben jelenik meg az idegsejtekben, mint a FOS vagy a többi FOSB variáns, de igen hosszú féléletideje és ismételt expozíciók során bekövetkező akkumulációja kiváló indikátorrá teszi a krónikus neuronális aktivitás vizsgálatára (Kovács, 2008, Nestler, 2015). Az azonnali géntermékek kimutatása ezért az idegsejtek stresszre adott válaszána és annak időbeli dinamikájának vizsgálatára is alkalmas. Ilyen és egyéb módszerekkel Kwon és mtsai. (2006) kimutatták, hogy a stresszornak való kitettség időtartama fontos a HPA tengely reakciójának módja szempontjából. Egy ismétlődő stresszor hatására a HPA tengely kezdetben aktiválódik, de idővel egy adaptációs folyamat eredményeként a glukokortikoid termelés csökken, és visszatér a bazális szintre. A krónikus stressz, mint például a krónikus variábilis enyhe stressz, végül felborítja a HPA tengely normális működését, ami alkalmazkodási zavarokhoz, és ennek következtében szorongáshoz és stressz által kiváltott hangulatzavarokhoz vezet (Blackburn-Munro és Blackburn-Munro, 2001; Joëls és mtsai., 2003).

Munkánk során ezért akut és krónikus stresszmodelleket használtunk a stresszadaptáció tanulmányozására, melyek hatását az azonnali génkifejeződés szövettani térképezésének módszerével is elemeztünk.

### 2.3.2. Életkor

Az életkor előrehaladtával számos szervrendszer működése megváltozik. Nincs ez másként a HPA tengely stresszválaszával sem (Romeo, 2010, Koenig és mtsai., 2011): a PVN FOS és

CRH reaktivitása, az ACTH és a CORT válasz is függ az életkortól (Sapolsky, 1992, Lupien és mtsai., 2005, Romeo és mtsai., 2006, Koenig és mtsai., 2011, Wulsin és mtsai., 2016). Patkányban az első két posztnatális héten egy stressz hiporeszponzív periódus (SHRP) jellemző. SHRP során a HPA tengely alacsony aktivitást és stresszérzékenységet mutat, melyet csökkent CORT válasz jellemez (Walker és mtsai., 1991, Levine, 1994, Smith és mtsai., 1997). SHRP alatt a stressz expozíció megnöveli a *Crh* mRNS expresszióját a PVN-ben, de azt sem az ACTH, sem a CORT szekréció növekedése nem kíséri. A 20. posztnatális nap után az állatok stresszválaszát már megnövekedett PVN FOS reaktivitás és erőteljes HPA tengely aktiváció jellemzi (Smith és mtsai., 1997, Dent és mtsai., 2000).

Újabb változást a pubertáskor hoz. Akut restraint stressz magasabb CRH aktivitást, gyorsabb PVN FOS reakciót és elnyújtottabb CORT választ okoz pubertás előtt álló patkányokban, mint fiatal felnőtt patkányokban (Romeo és mtsai., 2006, McCormick és mtsai., 2010).

Idős korban ismét változik a HPA tengely működése. 21-23 hónapos hím Lewis patkányok megnövekedett stressz szenzitivitást és FOS expressziót mutatnak a fiatal felnőtt egyedekhez képest (Meyza és mtsai., 2007). A bazális CORT szint emelkedését időskorban több fajban is megerősítették (Lupien és mtsai., 2005, Koenig és mtsai., 2011). A CRH expresszió vizsgálatok eredményei már nem ennyire egybehangzók: egyes tanulmányok szerint a CRH kifejeződése a korrallal csökken (Cizza és mtsai., 1994), nem változik jelentősen (Herman és mtsai., 2001), de arra is van adat, hogy a korrallal növekszik (Khlebnikov és mtsai., 2015, Tenk és mtsai., 2017).

Megjegyzendő, hogy viszonylag kevés tanulmány vizsgálta a stresszkutatásban gyakran alkalmazott aktivációs markerek, a FOS és a FOSB korfüggő expresszióját akut és krónikus modellekben. A rendelkezésre álló adatok (Kellogg és mtsai., 1998, Romeo és mtsai., 2006, Meyza és mtsai., 2007) ellentmondásosak, melyet az magyarázhat, hogy a tanulmányok általában csak két, rendszerint önkényesen kiválasztott és az egyes projektekben eltérő korcsoport összehasonlítása alapján próbálnak következtetéseket levonni arra, hogy miként befolyásolja az életkor a vizsgált változókat, stresszben.

A stresszadaptáció korfüggésének szisztematikus vizsgálatára ezért olyan patkánykísérleteket indítottunk, ahol 8 különböző korcsoportban vizsgáltuk a legfontosabb stresszadaptációban résztvevő agyterületek neuronális aktiváció mintázatát akut és krónikus stressz modellekben (Kovács és mtsai., 2018, 2019, 2022).

Az életkor hatásának egy másik aspektusa az, hogy összefüggésbe hozták a negatív korai életeseményeket a pszichopatológiákkal. Az anyai gondoskodás hiánya, a gyermek

elhanyagolása, esetleg fizikai és/vagy szexuális bántalmazása gyakran okoz az egyén későbbi életében pszichiátriai betegségeket (Bremne és Vermetten, 2001; Gilmer és McKinney, 2003; de Kloet és mtsai., 2005). Rágcsálókön ezt az anyai megvonás segítségével modellezik. Ezek a vizsgálatok azt mutatták, hogy a káros korai életesemények nemcsak a HPA tengelyt befolyásolják, hanem más, a stresszadaptációban részt vevő agyterületekre is hatással vannak (Bremne és Vermetten, 2001; Andersen és Teicher, 2004; Lippmann és mtsai., 2007).

Az Edinger-Wespthal magban korábban patkányban végzett kísérleteink (Gaszner és mtsai., 2009b) tapasztalatai alapján, az anyai megvonás modelljét alkalmaztuk egy összetett depressziómodell kialakításához, hogy egy epigenetikai predispozíciót idézzünk elő egérben (részletesen lásd alább).

### 2.3.3. Genetikai háttér

A stresszválasz létrehozásában számos agyterület, a HPA tengely, és a vegetatív idegrendszer vesz részt. Az ezekben a rendszerekben közreműködő ingerületátvivő anyagok, neuromodulátorok, hormonok és receptoraik (összefoglaló közlemények: Bale és Vale 2004, Kormos és Gaszner, 2013) komplex módon vesznek részt a stresszadaptációban. Ezért könnyen belátható, hogy a stresszadaptáció gépezetének működéséhez szükséges fehérjék génjeit érintő változások befolyásolhatják a stresszadaptációt. Számtalan génmódosított egértörzset hoztak létre azzal a céllal, hogy az adott gén és fehérjetermékének funkcióját megismerjük. A jelen disszertáció alapját képező több projektben vizsgáltuk a hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polypeptid (PACAP) génre nézve knockout mutáns (KO) egértörzset akut (Gaszner és mtsai., 2012) és krónikus (Kormos és mtsai., 2016) stresszadaptációját. A PACAP heterozigóta mutáns egeret összetett depressziómodellünk kialakítására is felhasználtuk, mert ezek az egerek genetikai okból megváltozott stresszadaptációs készséget mutatnak (Farkas és mtsai., 2016, 2017, Gaszner és mtsai., 2022a,b). Ezen túl, a tranziens receptor potenciál ankirin 1 (TRPA1) KO egerek krónikus stresszadaptációját is teszteltük (Kormos és mtsai., 2022).

Nem képezik e disszertáció alapját, de hasonló kísérleteket végeztünk több további kollaborációs projektben is. A szomatosztatin 4. típusú receptorára (sstr4) nézve mutáns (Scheich és mtsai., 2016, 2017, Kecskés és mtsai., 2020), valamint a substance P/neurokinin A (tac1), a hemokinin 1 (tac4) és a neurokinin 1 receptor (tac1r) KO egértörzseteket is vizsgáltuk (Borbély és mtsai., 2016), hogy a mutációk által érintett mediátorok, illetve receptorok stresszadaptációban és a hangulati állapot kialakításában vitt szerepét megértsük.



#### 2.3.4. Az energetikai állapot és stresszválasz kapcsolata

A sikeres stresszválaszhoz is, mint minden biológiai funkcióhoz, energiára van szükség. Az adott stresszhelyzettel történő megküzdéshez a stresszor súlyosságával és az adaptációs energiaigénnyel arányos mennyiségű mozgósítható tartalékra van szükség. A stresszválasz kivitelezésre és a rendelkezésre álló energia mennyisége számos egymással kapcsolatban álló tényezőtől függ, mint a táplálékfelvétel, az emésztés, a tápanyagok, mint energiaforrások feldolgozása, az energia előállítása, tárolása, mobilizálása és felhasználása. A sikeres alkalmazkodáshoz ezeket a folyamatokat össze kell hangolni a stresszre adott válasszal. Ezt a bonyolult feladatot a központi idegrendszer végzi, de az, hogy ez a koordináció anatómiailag pontosan hol történik, még nem teljesen világos. Ahhoz, hogy ezt a szabályozó szerepet egy adott terület be tudja tölteni, egyrészt szükség van a stresszor típusát, erősségét és időtartamát leíró információra, másrészt, az adott integrációs központnak a periférián tárolt energiamennyiségről is információval kell rendelkeznie (összefoglaló közlemény: Xu és mtsai., 2012). Ha a stresszadaptáció zavarát, a depressziót vizsgáljuk, több diagnosztikus kritérium bizonyítja, hogy az energiaegyensúly gyakran érintett (pl. étvágy- és testtömegváltozás, erőtlenesség érzése) (DSM-5, 2013), ezért, munkánk során ebben a kérdésben azt vizsgáltuk, hogy az Edinger-Westphal mag milyen módon vesz részt a stresszválasz és az energiaegyensúly szabályozásában (Füredi és mtsai., 2017, Xu és mtsai., 2022).

#### 2.3.5. A stresszadaptációt befolyásoló egyéb tényezők

Korábbi vizsgálataink során a stresszválasz működésének egyéb befolyásoló tényezőit is vizsgáltuk, mint pl. a napi ritmusból származó stresszadaptációs változások (Gaszner és mtsai., 2009a) vagy a nemi különbségek (Derks és mtsai., 2009, 2010, Bloem és mtsai., 2012), de mivel ezek a projektek nem képezik e disszertáció alapját, részletes bemutatásuktól itt eltekintek.

### **2.4. A stresszválasz felsőbbrendű szabályozásának funkcionális neuroanatómiája**

Az előző szakaszban áttekintettem, hogy a stresszválasz kialakulását milyen sokféle faktor befolyásolhatja. Annak érdekében, hogy a szervezet egy ennyire összetett háttérű biológiai folyamatot sikerrel kontrolláljon, a stresszadaptációban számos agyterület vesz részt, melyek egymással is igen összetett kapcsolatrendszereket tartanak fenn, de befolyásolják a HPA tengely és a vegetatív idegrendszer működését is. E disszertáció kereteit egy, az összes stresszadaptációban résztvevő agyterület átfogó leírása messze meghaladná, ezért az alábbiakban azokat a főbb területeket vezetem be röviden, amelyek a stresszadaptáció háttérét vizsgáló tanulmányaink során górcső alá kerültek.

#### 2.4.1. Prefrontális kéreg

A prefrontális kéreg (PFC) a magasabb rendű kognitív funkciók és a viselkedés-szabályozás egyik legfontosabb központja (összefoglaló közlemény a témában: Treadway és mtsai., 2015). Szerepe a stresszválasz szabályozásában összetett, mivel efferensei révén részt vesz mind a HPA tengely, mind a vegetatív idegrendszer szabályozásában (Ulrich-Lai és Herman, 2009, McKlveen és mtsai., 2015). A PFC sok GR-t és MR-t tartalmaz (de Kloet és mtsai., 2018) és így a hippocampus-hoz hasonlóan részt vesz a HPA tengely feedback gátlásában (Figueiredo és mtsai., 2003). A stresszszabályozásban a PFC prelimbikus (plPFC) és infralimbikus (ilPFC) divíziói a legjelentősebbek (Figueiredo és mtsai., 2003, McKlveen és mtsai., 2015).

A plPFC a nucleus raphe dorsalis-szal (DR), nucleus basolateralis amygdalae-val (BLA) és a nucleus interstitialis striae terminalis (angol nomenklatura szerint: bed nucleus of the stria terminalis, BNST) elülső részével áll közvetlen kapcsolatban. A plPFC glutamáterg neuronjai serkentik az anterior BNST gamma-amino-vajsav tartalmú (GABAerg) neuronjainak gátló hatását a PVN-ben akut stressz során (Radley és mtsai., 2009, McKlveen és mtsai., 2015). Ezért, plPFC irtott állatokban akut immobilizációs stressz hatására a HPA tengely fokozott válasza jellemző (Diorio és mtsai., 1993, Figueiredo és mtsai., 2003), mely emelkedett akut neuronális FOS aktivációban nyilvánul meg a PVN-ben, megnövekedett ACTH és CORT vérszint kíséretében.

Az ilPFC efferens kapcsolatai a nucleus tractus solitarii-hoz (NTS), a posterior hypothalamus-hoz, a nucleus centralis amygdalae-hez (CeA), a nucleus medialis amygdalae-hez (MeA) és a hippocampus-hoz vezetnek (Vertes, 2004, McKlveen és mtsai., 2015, Sampath és mtsai., 2017). Az ilPFC egyrészt gátolja a PVN működését, másrészt, a CeA-n és NTS-en keresztül aktiválja a HPA tengelyt az akut stresszben (McKlveen és mtsai., 2015).

Meglehetősen gazdag irodalma van a PFC hangulatszabályozásban és annak zavaraiiban vitt funkcionális jelentőségének (George és mtsai., 1994; Pizzagalli és Roberts, 2022). Emberen végzett funkcionális mágneses rezonancia vizsgálatok (Mayberg és mtsai., 1999), PFC károsodással elő egyénekről (Ellenbogen és mtsai., 2005), valamint mély agyi stimulációval kezelt betegekről szóló esettanulmányok (Mayberg és mtsai., 2005; Koenigs és Grafman, 2009) bizonyítják a terület károsodásának klinikai jelentőségét. Ezzel összhangban, alapkutatási megfigyelések is alátámasztják a PFC komplex szerepét a hangulatzavarok patofiziológiájában, amelyben szerotoninerger (Albert és mtsai., 2014), GABAerg (Ghosal és mtsai., 2020) és glutamáterg (Veeraiah és mtsai., 2014) mechanizmusok is szerepet játszanak. A depresszió

alapkutatásában gyakran alkalmazott anyai megvonás modelljében, megváltozott kognitív funkciókat és túlzott neuronális plaszticitást találtak a PFC-ben, rágcsálókban (Baudin és mtsai., 2012). Egy másik kedvelt rágcsálómodellben, mely a krónikus stresszen alapul, a fokozott FOSB- és microglia aktivációt írtak le a PFC területén (Hinwood és mtsai., 2012).

#### 2.4.2. Hippocampus

A hippocampus valószínűleg az az agyterület, amelyet a leggyakrabban vizsgálnak a hangulatszabályozás és annak zavarai kapcsán (összefoglaló cikkek a témában: Campbell és MacQueen, 2004; Liu és mtsai., 2017; Belleau és mtsai., 2019). Összetett kapcsolatrendszere a HPA tengellyel, a PFC-vel és a tágabb értelemben vett amygdalával is központi szerepére utal a stresszadaptációban és a hangulatszabályozásban (Fuchs és mtsai., 2004, Masi és Brovedani, 2011). A hippocampus ventrális része, a subiculum, rostokat küld a pPFC és ilPFC-be. Ezen kívül, a hippocampus-ból eredő glutamáterg rostok GABAerg sejtekre vetülnek a BNST magjaiban, a PVN körül elhelyezkedő (periPVN) áréában, valamint a dorsomedialis hypothalamus-ban (DMH) (Canteras és Swanson, 1992, Choi és mtsai., 2007, Herman és mtsai., 2016). Az utóbbi területek tónusos gátlás alatt tartják a PVN-t (Canteras és Swanson, 1992, Choi és mtsai., 2007, Ulrich-Lai és Herman 2009), így a hippocampus a PVN indirekt gátlása útján csökkenti a HPA tengely aktivitását (Herman és mtsai., 1995, 2003). Ezt hippocampus lézió átesett állatokon végzett vizsgálatok is alátámasztják, ahol elnyújtott CORT és ACTH választ figyeltek meg (Herman és mtsai., 1995, 1998, Nettles és mtsai., 2000). A funkció háttérében elsősorban glukokortikoid és kisebb részben a mineralokortikoid hormonok állnak, melyek receptorai a hippocampus-ban nagymértékben kifejeződnek (de Kloet és mtsai., 2018).

Ismert, hogy a stressz befolyásolja a hippocampus neuronális plaszticitását, így hozzájárul a depresszió kialakulásához (Xu és mtsai., 1997; Pittenger és Duman, 2008, Kim és mtsai., 2015 Belleau és mtsai., 2019). A stressz csökkenti a hippocampus térfogatát és aktivitását is (Kim és mtsai., 2015), ahogy az megfigyelhető a depresszióban szenvedő betegek többségénél, azonban nincs egyetértés abban a kérdésben, hogy ez a hangulatzavar következménye-e vagy inkább egy arra hajlamosító tényező, esetleg kiváltó ok (Czéh és mtsai., 2001, 2007). A hippocampus három fő divíziója, a cornu Ammonis (CA) 1, CA3 és a gyrus dentatus (DG) alacsonyabb brain-derived neurotrophic factor (BDNF) szintet mutat az anyai megvonást követően, mely változás antidepresszánskezeléssel visszafordítható. Úgy tűnik, hogy ez a neurotrophin fontos szereppel bír a hangulatzavarok kóroktanában (MacQueen és mtsai., 2003), melyben, saját adataink szerint is, nem csak a hippocampus vesz részt (Gaszner és mtsai., 2009b). Epigenetikai

vizsgálatok is alátámasztják a hippocampus szerepét a hangulatzavarokban. Az egér hippocampus GABAerg interneuronjaiban fokozott mértékű DNS metilációt találtak prenatális stresszt követően, mely az állatok depressziószerű viselkedésével társult (Zhong és mtsai., 2020).

### 2.4.3. Amygdala

Az amygdala és a tágabban értelmezett amygdala (az angol nomenklatura szerint: extended amygdala) heterogén magcsoport, melynek számos divíziója közvetlen kapcsolatban áll a stresszválaszt szabályozó egyéb területekkel és a HPA tengellyel. Az irodalom meglehetősen zavaros az amygdala belső felosztását illetően, melynek a háttérben az áll, hogy az egyes területi klasszifikációk a sejtek fejlődéstani eredetét, míg mások a sejtek citoarchitektúráját, neurokémiai karakterisztikáikáját veszik alapul (Petrovich és mtsai., 2001). A divíziók részletes, szisztematikus leírásától terjedelmi okból ehelyütt eltekintek, csupán a disszertáció témája szempontjából lényeges almagokat említem. McDonald és Mascagni (1998) szerint, három főbb magcsoportot különítünk el: basolateralis-, corticalis- (vagy kéregszerű) és centromedialis területeket.

A basolateralis magcsoport a lateralis-, a basalis- (vagy basolateralis – BLA) és az accessorius basalis magvakra oszlik (Sah és mtsai., 2003). A basolateralis magok egyrészt a hippocampusból, az agranularis insularis, ventralis temporalis, és az orbitofrontalis kérgi területekből, valamint viscerális afferenciájú területekről kapnak információt. A basolateralis magcsoport efferens rostjai a striatum-hoz, a szomatomotoros rendszerekhez futnak, de kiemelendő a CeA-ba vetülő nagyszámú rost is (Petrovich és mtsai., 2001).

Az amygdala corticalis magcsoportja a felszínre türemkedik és az agykéreghez hasonló szövetszerkezettel bír. Itt található az amygdala kérgi magjait, továbbá a nucleus lateralis tractus olfactorii-t. A magcsoport fő feladata a bulbus olfactorius-ból és a bulbus-asszociált területekből származó információ fogadása és feldolgozása (Petrovich és mtsai., 2001). Efferenseinek elsődleges célját hypothalamus magok alkotják, de jelentős mennyiségű rost jut innen a MeA-ba is (Petrovich és mtsai., 2001, Fox és mtsai., 2015).

A centromedialis magok közül a CeA elsődleges bemenetei között találjuk a PFC-t, az agranularis insularis cortex-et és a subiculum-ot, de rostokat kap egyéb amygdala magokból és viscerális afferenciával rendelkező központokból (pl.: NTS, locus ceruleus, LC) is. A CeA főbb kimenetei között agytörzsi vegetatív magok (NTS, LC, DR) és a tágabb értelemben vett amygdala egyéb magjai (pl. BNST) szerepelnek (Sah és mtsai., 2003). A MeA ezzel szemben

elsősorban a járulékos olfactorius kéregből gyűjt információt, és kimenetét főleg hypothalamus magjai alkotják, így funkcionálisan a járulékos szaglókéreg pályarendszeréhez sorolhatjuk (Petrovich és mtsai., 2001, Fox és mtsai., 2015).

A CeA nem rendelkezik közvetlen kapcsolattal a PVN-nel, de a NTS-en és a BNST fusiformis (BNSTfu) magján keresztül szabályozhatja a PVN CRH neuronjainak aktivitását (Herman és mtsai., 2003). A CeA szelektív léziója csökkent szorongáshoz, valamint a depressziószerű viselkedéshez vezet (Kalin és mtsai., 2004). A CeA kiirtása csökkent ACTH és CORT szekrécióval jár immobilizációs stressz (Beaulieu és mtsai., 1986), félelemkondicionálás, valamint vizuális és akusztikus ingerek esetén (van de Kar és mtsai., 1991, Feldman és mtsai., 1994), továbbá, csökken az interleukin 1 által indukált FOS válasz a PVN CRH neuronjaiban (Xu és mtsai., 1999). Kétségtelen, hogy a CeA részt vesz a PVN neuronok CRH szintézisének és szekréciójának szabályozásában, azonban sok tanulmány mutatott rá, hogy a CeA reakciója stresszorszelektív. Jelentősebb reakciót mutat fiziológiai stressz (például citokin infúzió vagy vérzés) során, mint egy pszichogén stressz (lábra alkalmazott áramütés, immobilizáció) alatt (Cullinan és mtsai., 1995, Thrivikraman és mtsai., 1997, 2000, Herman és mtsai., 2003, Callahan és mtsai., 2013).

A MeA nagyon kevés direkt összeköttetéssel rendelkezik a PVN-nel, ugyanakkor sok más területtel (BNST, area preoptica medialis, periPVN) áll szoros kapcsolatban, melyek már közvetlenül hatnak a HPA tengely működésére (Herman és mtsai., 2003, Herman és mtsai., 2016). A MeA efferens rostjai a HPA tengely aktiválását feltehetően a PVN CRH sejtjeire ható gátlás GABAerg gátlása révén érik el (Canteras és mtsai., 1995, Herman és mtsai., 2003). Utóbbit alátámasztja, hogy az area preoptica medialis vagy a BNST léziója, melyeken keresztül a MeA kapcsolatban áll a PVN-nel, csökkenti a CORT választ (Feldman és mtsai., 1990).

A BLA feladata a hippocampus, PFC és érző asszociációs területekről érkező információk integrálása és továbbítása más amygdala magvak (CeA, MeA) és vissza, a hippocampus felé (LeDoux, 2007). A CeA-val ellentétben, a BLA-t olyan pszichológiai stresszorok is jelentősen aktiválják (pl. immobilizáció, úsztatás, lábra adott áramütés), melyek elenyésző hatással bírnak a centromedialis magokban. Ugyanakkor, a BLA válasza kisebb mértékű például erős fiziológiai stressz (citokin stimuláció) során (Cullinan és mtsai., 1995, Sawchenko és mtsai., 2000). A BLA léziója esetén nem változik a CORT szekréciója vizuális-, olfactorius stimulus vagy restraint-, hideg- és éterexpozíció esetén (Feldman és mtsai., 1994, Seggie, 1987). Ismert, hogy krónikus stressz során a BLA piramissejtjei dendritikus hipertrófiát mutatnak, mely szorongásszerű viselkedésmintázattal társult patkányokban (Vyas és mtsai., 2006).

#### 2.4.4. Nucleus interstitialis striae terminalis

Alheid és Heimer (1988) rámutattak, hogy az amygdala fent leírt három fő magcsoportján túl a centromedialis terület kiterjed rostralisán és medialisán is és helyesebb a struktúrát tágabban értelemben vett amygdalának nevezni (Alheid és Heimer 1988). Ide tartozik a BNST is, mely szintén bonyolult belső szerkezettel rendelkezik. A területet két főbb divízióra, anterior és posterior BNST-re oszthatjuk (Dong és mtsai., 2001). Az anterior BNST főbb régiói az ovalis (BNSTov), fusiform (BNSTfu), dorsomedialis (BNSTdm), dorsolateralis (BNSTdl) és ventralis (BNSTv) magok (Dong és mtsai., 2001).

A BNST magjai főleg az amygdala komplexből kapják afferenciájukat. A BNSTov, és BNSTfu elsősorban a CeA-ból és a kéregszerű magok olfactorius részéből; a BNSTv, BNSTdm, BNSTdl inkább a MeA-ból kapnak jelentősebb számú rostot (Dong és mtsai., 2001). A dorsalis BNST sok GABAerg rostot, míg az anterior (főleg a BNSTv és BNSTfu) kisebb számú glutamaterg axont küld a PVN-hez (Cullinan és mtsai., 1993, Choi és mtsai., 2007). Ennek megfelelően, a posterior BNST léziója megnövekedett HPA tengely aktivitással, míg az anterior BNST sértése a HPA tengely aktivitásának csökkenésével párosul (Ulrich-Lai és Herman, 2009). A BNST kettős szerepe a HPA tengely szabályozásában egyrészt ellentétes hatású neuromodulátorok (CRH, enkephalin) és neurotranszmitterek (GABA, glutamát), másrészt efferenseinek direkt vagy indirekt kapcsolatával magyarázható (Ju és mtsai., 1989, Kozicz, 2002, Herman és mtsai., 2003, Kash és Winder, 2006, Choi és mtsai., 2007).

#### 2.4.5. Agytörzsi stresszasszociált központok

Munkánk során több, a hangulatszabályozásban is szerepet játszó agytörzsi területet vizsgáltunk, köztük peptiderg, dopaminerg, szerotoninerg és noradrenerg központokat. Az alábbiakban röviden bevezetem e területeket.

##### 2.4.5.1. Edinger-Westphal mag

A jelen értekezésben taglalt kutatások előzményeit adó vizsgálatok tárgya az Edinger-Westphal mag (EW) peptiderg, centrális projekciójú (EWcp) divíziója volt (Gaszner, 2008). A klasszikusan Edinger (1885) és Westphal (1887) nevével illetett, de 28 évvel előttük már Jacobowich (1857) által leírt idegsejt csoportot az utóbbi évtizedek kutatásai (Szentágothai 1942, Warwick 1956, Loewy és Saper, 1978) nyomán ma már két fő részre osztjuk. Az első divízió egy kolinerg neuronokból álló magrész, mely a preganglionáris EW (EWpg). Ez a mag a nervus oculomotorius paraszimpatikus preganglionáris rostjait adja, melyek a ganglion ciliare útján az akkomodációban és pupilla szűkítésében szerepet játszó belső szemizmok működését

serkentik (összefoglaló közlemény: Kozicz és mtsai., 2011a). A második, a peptiderg sejteket tartalmazó összetett központi kapcsolatokkal bíró divízió, az EWcp. Ez utóbbi terület legjelentősebb bemenetei az amygdala magjaiból (CeA, BLA), a PVN-ből, a DR-ből és a LC-ből (da Silva és mtsai., 2013) származnak. Efferens rostjai lényegében az egész központi idegrendszert behálózzák, de legnagyobb számban a tágabb értelemben vett amygdala magokhoz (CeA, BNSTov), a septum laterale-hoz, PVN-hez, a DR szerotoninerg sejtjeihez, és a NTS-hez húzódnak (Dos Santos Júnior és mtsai., 2015). Az EWcp peptiderg neuronjai elsősorban urocortin1-et (UCN1) (Vaughan és mtsai., 1995, Kozicz és mtsai., 1998), valamint cocaine- and amphetamine-regulated transcript-et (CART) (Douglass és mtsai., 1995; Xu és mtsai., 2010; Cservenka és mtsai., 2010) tartalmaznak,olecisztokinin (CCK) (Innis és Aghajanian, 1986; Rattray és mtsai., 1992, Giardino és mtsai., 2012, Topilko és mtsai., 2022), nefastin-1 (Xu és mtsai., 2009, 2010; Okere és mtsai., 2010) és PACAP (Fehér és mtsai., 2023, Priest és mtsai., 2023) mellett. Korábbi vizsgálataink során kimutattuk, hogy az urocortinerg neuronok FOS és UCN1 expressziója fokozódik akut stressz során, ugyanakkor, a neuronok fokozott aktivitását csak bizonyos stresszorok képesek kiváltani, mint a fájdalom (Kozicz és mtsai., 2001), vagy a restraint stressz, LPS infúzió és éter expozíció (Gaszner és mtsai., 2004). A stressz máladaptáció és hangulatzavarok szempontjából fontos, hogy mind az *UCN1* (Kozicz és mtsai., 2008b) mind a *CART* mRNS-ének expressziója emelkedett volt öngyilkos depressziós férfiak EWcp mintáiban (Bloem és mtsai., 2012).

Az EWcp peptiderg sejtjeinek stresszérzékenysége mellett sok adat szól amellett, hogy az energiaegyensúly szabályozásában is részt vesz. Az UCN1 a CRH1 receptoron elsősorban anorexigén hatású (Skelton és mtsai., 2000) és az éhezés növeli az UCN1 és a CART expresszióját az EWcp-ben (Xu és mtsai., 2009, 2014). Az EWcp területén végzett morfológiai vizsgálatok mind orexigén, mind anorexigén neuropeptidok és receptoraik jelenlétét bizonyították. Az UCN1 tartalmú neuronokat például neuropeptid Y (NPY) immunreaktív (ir) idegrostok innerválják, és a NPY Y1 és Y5 típusú receptorokat hordoznak (Gaszner és mtsai., 2007). Orexin A ir idegrostok is beidegzik az UCN1 neuronokat, melyek orexin receptor mRNS-t is expresszálnak (Emmerzaal és mtsai., 2013). Az UCN1 neuronokban ghrelin receptorokat is találtak, és érdekes, hogy a ghrelin receptor hiánya mellett az UCN1 neuronok akut stresszre adott FOS válasza kisebb (Spencer és mtsai., 2012). A leptin receptor rövid és hosszú formáját (LepRb) is leírták az EWcp (Scott és mtsai., 2009) UCN1 neuronjain (Xu és mtsai., 2009, 2011). Egerekben, az EWcp léziója után az etanol által kiváltott hipotermia

elmaradását látták, ami arra utal, hogy ez a terület az energiahomeosztázist a hőszabályozás szempontjából is befolyásolja (Bachtell és mtsai., 2004).

Az energiaegyensúly szabályozásában szerepet játszó számos neuropeptiderg rendszer közül a talán a melanocortinok jelentősége a legnagyobb. Ide tartozik az erős katabolikus hatással bíró alpha melanocortin stimuláló hormon (alpha-MSH), mely hatását a központi idegrendszerben elsősorban a 4-es típusú melanocortin receptor (MC4R) endogén agonistájaként fejt ki. Ugyanezen a receptoron endogén inverz agonistaként az agouti-related peptid (AgRP) ellentétes hatással bír (Sánchez és mtsai., 2009), és ellensúlyozza az alpha-MSH anorexigén hatását (Fong és mtsai., 1997; Ollmann és mtsai., 1997; Shutter és mtsai., 1997). Mindkét peptid a nucleus arcuatus hypothalamiban, de eltérő sejtcsoportokban fejeződik ki (összefoglaló közlemény: Biebermann és mtsai., 2012). Annak ellenére, hogy az alpha-MSH (Jacobowitz és O'Donohue, 1978; Yoshida és Taniguchi, 1988) és AgRP (Bagnol és mtsai., 1999) tartalmú idegrostok, valamint a MC4R jelenléte (Alvaro és mtsai., 1996; Ke és Wang, 2015) ismert volt a középagyi substantia grisea centralis (PAG) területén, nem találtunk publikált kutatást arra vonatkozóan, hogy az EWcp UCN1 neuronjai interakcióba lépnek-e a melanocortin rendszerrel, és hogy ennek lehet-e szerepe a táplálékfelvétel illetve testhőmérséklet szabályozásában. Ezért, ennek vizsgálatára egy kísérletsorozatot indítottunk (Füredi és mtsai., 2017).

A stresszválasz és az energia egyensúly szabályozásának fontos aspektusa, hogy az ebben résztvevő központok információt kapjanak a hozzáférhető energiaraktárakról és ennek az információnak birtokában be tudjanak avatkozni e raktárak működésébe is. Egy jól ismert, a fehér zsírszövet által termelt endokrin hírvivő a leptin (Zhang és mtsai., 1994), melynek receptorát korábban kimutattuk az EWcp UCN1 neuronjain is (Xu és mtsai., 2011). Annak tisztázására, hogy az EWcp-ben jelen van-e a funkcionális leptin receptor és köti-e ligandját, majd elindul-e ennek hatására az EWcp UCN1 sejten belül a megfelelő jelátviteli folyamat, továbbá, hogy az EWcp-nek lehet-e szerepe a fehér zsírszövet regulációjában, egy kollaborációs projektet indítottunk (Xu és mtsai., 2022).

#### 2.4.5.2. Ventrális tegmentális área

A ventrális tegmentális área (VTA) funkcionálisan a meso-cortico-limbikus rendszerhez sorolható dopaminerg agyterület, mely a kognitív folyamatokban, a motivációban és önjutalmazásban (Bariselli és mtsai., 2016) továbbá a hangulatszabályozásban, valamint annak zavaraiiban is szerepet játszik (Nestler és Carlezon, 2006; Russo és Nestler, 2013, Peña és mtsai., 2017; Sun és mtsai., 2018). A VTA fő afferens beidegzését a laterális habenula (LHb),



a híd dorsalis tegmentális magja adja, számos egyéb terület mellett (Lammel és mtsai., 2012). A VTA az agy számos limbikus területe felé küld rostokat, mint például az amygdalához, a gyrus cingulihoz, a hippocampus-hoz, a bulbus olfactorius-hoz, (Peris és mtsai., 2017), de kiemelendő a PFC-hez futó dopaminerg afferentáció. Többféle krónikus stressz modellben kimutatták, hogy VTA dopaminerg neuronjainak azon alcsoportja, mely a PFC-hez küld rostokat, krónikus stresszexpozíció hatására megváltoztatja a tüzelési aktivitását (Zhong és mtsai., 2018, Koo és mtsai., 2019). Amennyiben ezeknek a sejteknek a tüzelési frekvenciáját optogenetikai módszerekkel stimulálták, az állatok depressziószerű tünetei javultak, míg a sejtek gátlása a tünetek súlyosbodását idézte elő (Tye és mtsai., 2013). Munkánk során több modellben (Gaszner és mtsai., 2022a, Ujvári és mtsai., 2022) vizsgáltuk, hogy az adott kísérleti elrendezésben változik-e a VTA működése és ez hozzájárulhat-e a hangulatzavarokhoz.

#### 2.4.5.3. Nucleus raphe dorsalis

Az agytörzsi szerotonin (5HT) tartalmú magok közül a DR jelentősége a stresszválasz (Bouwknicht és mtsai., 2007; Zhang és mtsai., 2012a) és a hangulatszabályozásban régóta élénken kutatott terület (összefoglaló közlemények a témában: Lowry és mtsai., 2008; Venkatraman és mtsai., 2017). A mag főbb összeköttetéseit áttekintve nyilvánvaló, hogy jelentős szereppel bírhat a hangulatszabályozásban, mert afferenseit a CeA-ból, BNST magjaiból, area preoptica medialis-ból, EWcp-ből és hypothalamus magokból gyűjti össze (Peyron és mtsai., 1998, Lee és mtsai., 2007, Dos Santos Júnior és mtsai., 2015). Kimenő, 5HT tartalmú rostjainak elsődleges célpontjai a BLA, CeA, BNST, a PFC, valamint a periPVN area (Steinbusch és mtsai., 1981, Ma és mtsai., 1991, Herman és mtsai., 2003, Fox és Lowry, 2013, Paul és Lowry, 2013). Az 5HT rostok stimulálják a PVN működését, fokozzák a HPA tengely aktivitását (Myers és mtsai., 2017), továbbá, az 5HT neuronok léziója csökkenti a restraint stressz indukálta ACTH választ patkányban (Jorgensen és mtsai., 1998). A DR/5HT sejtek szintén stressz indukált aktivitást és PACAP mRNS expressziót mutatnak egérben (Lein és mtsai., 2007). A hangulatzavarok tanulmányozása során ezért kísérleteinkben kiemelt figyelmet fordítottunk a DR területére.

#### 2.4.5.4. Locus ceruleus és az A5 noradrenerg sejtcsoport

A LC vagy A6 noradrenerg idegsejtcsoport a híd dorsolateralis tegmentumában helyezkedik el, és szerepe elsősorban az akut stresszválaszban ismert (McCall és mtsai., 2015, Myers és mtsai., 2016). Számos afferentációval rendelkezik stressz asszociált agyterületről, mint a PFC, CeA, a lateralis hypothalamus, a BNST és a DR (McCall és mtsai., 2015, Benarroch, 2018). Efferensei behálózják a szomatoszenzoros és szomatomotoros kérgi területeket, a hippocampus-t a PFC-

t, amygdala magokat (BLA, CeA), entorhinalis cortex-et, thalamus-t és hypothalamus magokat (PVNp, nucleus supraopticus), a bazális előagy kolinerg sejtjeit, a colliculus superior-t, cerebellum-ot (Cunningham és Sawchenko, 1988), a nucleus dorsalis nervi vagi-t, nucleus ambiguus-t, és a gerincvelő szimpatikus preganglionaris neuronjait (Benarroch, 2018). Akut stressz aktiválja az LC neuronjait (McCall és mtsai., 2015, Myers és mtsai., 2016), és léziója csökkenti az ACTH és CORT választ (Ziegler és mtsai., 1999). A LC optogenetikai stimulációja szorongásos viselkedést okoz, míg gátlása ellentétes hatású (McCall és mtsai., 2015).

Az A5 noradrenerg idegsejtcsoport is a híd tegmentumának része, a felső oliva magkomplex szomszédságában. Funkcióját tekintve a LC-hoz hasonló. Az A5 neuronok biztosítják a gerincvelői IML szimpatikus preganglionaris sejtjeinek fő noradrenerg bemenetét, és végső soron a vegetatív idegrendszer útján befolyásolhatja az autonóm funkciókat (Paredes-Rodriguez és mtsai., 2020). Mivel a noradrenerg rendszerek károsodása Parkinson-kórban megjelenik, a betegség hangulati állapotot érintő tüneteit vizsgáló projektünkben ezeket a régiókat is tanulmányoztuk.

## **2.5. A neuropeptidok és receptoraik szerepe a stresszadaptációban és hangulatzavarban**

A jelen disszertáció egyik alapját képező összefoglaló közleményünkben (Kormos és Gaszner, 2013) azokat az elsősorban állatkísérletes, kisebb részben emberen végzett vizsgálatok eredményeit tekintettük át, amelyek a hangulatzavarok hátterének megértését célozták és a neuropeptidok mechanizmusok jelentőségét kutatták. Közleményünkben akkor 11 neuropeptid és az ezek jelátvitelében szerepet játszó 14féle receptor irodalmát összegeztük. Terjedelmi megfontolások miatt itt csupán a jelen disszertáció alapját képező eredeti közlemények témája szempontjából is legkiemeltebb jelentőségű neuropeptidok (CRH, UCN1, PACAP) és receptoraik (CRH1R, CRH2R, PAC1R) jelentőségét tekintem át röviden.

### **2.5.1. Corticotropin-releasing hormon**

A CRH egy 41 aminosavból álló neuropeptid, melyet Wylie W. Vale és munkatársai azonosítottak (Vale és mtsai., 1981). A PVN-ben található CRH peptidet kifejező sejtek egy része a HPA tengely stresszválaszában játszik főszerepet. A HPA tengely fiziológiás működését a 2.2. szakaszban összefoglaltam. Itt csupán a rendszer túlműködését, mint regulációs zavart szeretném kiemelni, mert a depresszióban szenvedő betegeknél gyakran károsodik a feedback mechanizmus: folyamatosan emelkedett HPA tengely aktivitást mutattak ki, mely fokozott CRH kifejeződéssel jár. E jelenség felismerésének már klinikai jelentősége is van, mivel a dexametazon szuppresszió tesztet validálták a HPA tengely funkcionális állapotának

értékelésére annak megítélése, hogy a feedback gátlás károsodott-e depressziós betegeknél (Holsboer, 2000; Hatzinger, 2000, Binder és Nemeroff, 2010, Silverman és Sternberg, 2012).

A HPA tengely túlműködés biológiai jelentőségének megértése érdekében CRH túltermelő egértörzseket hoztak létre, hogy a szorongás és a depresszió genetikai modelljét a megnövekedett CRH szint segítségével hozzák létre. A Stenzel-Poore és mtsai. (1994) által létrehozott első ilyen törzs fokozott szorongást mutatott emelt keresztpalló tesztben, mely CRH1R antagonistá kezeléssel visszafordítható volt. Egy másik törzsben, ahol csak az idegszövetben termelődik túl a CRH (Dirks és mtsai., 2002; Groenink és mtsai., 2002), az egerek emelkedett bazális CORT szintet mutattak, normális stresszválasz mellett. Ez utóbbi modellben a fejlődés során egy kompenzáció is bekövetkezett, mert az UCN1 downregulációját találták mind transzkripciós, mind transzlációs szinten (Kozicz és mtsai., 2004). Ezeket, és más lehetséges kompenzációs folyamatokat figyelembe véve a kondicionális és lokális genetikai manipulációt is alkalmaztak a CRH expressziójának megváltoztatására.

Mint fent említésre került, a CRH az extrahypothalamikus limbikus területeken is kifejeződik. Az előagyi CRH neuronok fiziológiai jelentőségét a stressz és a depresszió neurobiológiájában korábban állatmodellekben többen vizsgálták (Kalin és mtsai., 1994; Hsu és mtsai., 1998; Makino és mtsai., 1999; összefoglaló közlemények a témában: Carrasco és Van de Kar, 2003; Kehne és Cain, 2010; Hammack és mtsai., 2012; Kovács, 2013). Ezen túl, öngyilkos egyének post mortem szövetmintáin is végeztek már tesztek (Nemeroff és mtsai., 1984; Bissette és mtsai., 2003; Merali és mtsai., 2004, 2006). Ezek alapján úgy tűnik, hogy a limbikus CRH szerepe agyterületspecifikus. Regev és mtsai. (2011) kimutatták, hogy a CRH lokális lentivirális túltermeltetése a CeA-ban csökkenti a stresszindukált szorongást, míg ugyanez a manipuláció a BNSTdl-ban növeli a depressziószerű tüneteket, de nem befolyásolja a szorongási szintet egérben (Regev és mtsai., 2011). Ezzel ellentétben, Flandreau és mtsai., (2012) fokozott szorongási szintet találtak patkányban, ha a CeA-ban a CRH-t lentivírus segítségével túltermeltették, mely a PVN-ben is megemelkedett CRH expresszióval járt együtt. Escitalopram kezelés nem fordította vissza CeA-ban a CRH túltermelés hatását (Flandreau és mtsai., 2013). Más laboratóriumok is arra a következtetésre jutottak, hogy a stressz által kiváltott szorongást a limbikus előagyi CRH neuronok szubpopulációi eltérő módon befolyásolják: A CeA/CRH sejtek a rövid távú félelemben, míg a BNSTdl/CRH neuronok a hosszútávú szorongásban játszhatnak szerepet (Walker és mtsai., 2009).

### 2.5.2. CRH1 receptor

A CRH nagy affinitással kötődik a CRH1R-hoz (Perrin és mtsai., 1993), mely az adenohypophysis mellett a neocortex-ben, a hippocampus-ban, BLA-ban, a hallópálya egyes agytörzsi területein és a kisaggyal kapcsolatban álló magokban található meg (Potter és mtsai., 1994). A CRH1R antagonistákat a pszichiátriai betegségek kezelésében ígéretes gyógyszerjelölteknek tekintik (összefoglaló tanulmányok a témában: Kehne és Cain, 2010; Paez-Pereda és mtsai., 2011), mivel a depressziós betegek központi idegrendszerében a CRH fokozott expressziója - legalább az esetek egy részében - jellemző (Nemeroff és mtsai., 1984; Hartline és mtsai., 1996). Binnemann és mtsai. (2008) klinikai vizsgálatukban azonban nem tudták kimutatni egy CRH1R antagonista, a CP-316311 szignifikáns, kedvező hatását. A kezelés hatástalanságát a beteganyag heterogenitása magyarázhatja, a vizsgálatba ugyanis alacsony CRH szintet mutató alanyokat is bevontak (Paez-Pereda és mtsai., 2011), mely azonban csak a depressziós betegek egy részére (Nemeroff és mtsai., 1984) jellemző. A CRH1R-ra ható új alternatív farmakológiai ágensek fejlesztésén túl (Paez-Pereda és mtsai., 2011) szükség lehet az emelkedett CRH szinttel járó esetek kiválasztására, mert a CRH1R antagonista kezelés ebben a populációban ígéretesebb lehet. Az ilyen esetek azonosítására szolgáló biomarkereket még keresik, de már ismert, hogy a magas CRH szintű betegek REM-fázis alatt rögzített EEG regisztrátumában elváltozások vannak (Holsboer és Ising, 2010). Fontos, hogy Held és mtsai. (2004) kimutatták, hogy egy másik CRH1R antagonistával, az R121919-cel végzett kezelés a REM-fázisokat az klasszikus antidepresszáns gyógyszerhez hasonlóan csökkenti (Palagini és mtsai., 2013).

### 2.5.3. CRH2 receptor

A CRH1R-hoz képest a CRH2R receptor jóval kevesebb területen jelenik meg a patkány agyban. Főként a szaglógumóban, a BNST-ben, az amygdalában, az septum laterale-ban, a ventromedialis hypothalamus-ban és a DR-ben fejeződik ki (Van Pett és mtsai., 2000). A CRH2R KO egerekkel végzett vizsgálatokban arra a következtetésre jutottak, hogy az állatok fokozott szorongást mutatnak, szemben a CRH1R receptor KO egerekkel, melyeknél a szorongás csökkent mértékű (Bale és Vale, 2004). Figyelembe véve azt, hogy a CRH affinitása a 2-es típusú receptorhoz sokkal kisebbnek bizonyult, mint a CRH1R-hoz, valamint azt, hogy a CRH2R eloszlása nem fed át teljesen a CRH1R (Chalmers és mtsai., 1995) és a CRH eloszlásával, sejthető volt, hogy egyéb CRH2R ligandumok is léteznek. Az UCN1 (Vaughan és mtsai., 1995), UCN2 (Hsu és mtsai., 2001; Reyes és mtsai., 2001) és UCN3 (Hsu és mtsai.,

2001; Lewis és mtsai., 2001) leírásával beigazolódott, hogy a CRH emlősben sem kizárólagos ligandja a CRH1R és CRH2R-nak.

A CRH2R jelentőségét ezután a három endogén ligandumának genetikai manipulációjával is értékelték. Az UCN1, UCN2 és UCN3 KO egerek előállítására és vizsgálatára, valamint e törzsek keresztezésének eredményeként lehetővé vált, hogy kétszeres (UCN1 és UCN2) (Neufeld-Cohen és mtsai., 2010a) valamint háromszoros (UCN1, UCN2, UCN3) KO törzseket (Neufeld-Cohen és mtsai., 2010b) alakítsanak ki és vizsgáljanak. Az UCN1/UCN2 kettős KO állatok stressz-expozíció hatására kevésbé szorongtak, míg a mindhárom urocortin génre mutáns egerek nem mutattak megváltozott szorongásszintet akut stresszben. Fontos kiemelni, hogy a tripla UCN1/UCN2/UCN3 KO egerek 24 órával az expozíció után sem tudtak megfelelően adaptálódni a stresszhez, vad típusú társaikkal ellentétben. Ez arra utal, hogy az urocortinok és a CRH2R jelátvitel szükséges a normális stresszadaptációhoz (Kozicz és mtsai., 2011a,b; Ryabinin és mtsai., 2012). Janssen és Kozicz (2013) szerint a CRH/CRH1R illetve az urocortinok/CRF2R rendszerek univerzális, minden agyterületre érvényes dualizmusa helyett a CRH rendszerek differenciáltan, funkció- és agyterület specifikusan regulálják a stresszválaszt a környezeti követelményekhez igazodva.

#### 2.5.4. Urocortin 1

Az UCN1 az emlős CRH neuropeptid család tagja (Vaughan és mtsai., 1995), amely főként a EWcp-ben fejeződik ki (Kozicz és mtsai., 2011a) és nagy affinitással kötődik mindkét CRH receptorhoz, ezért fontos szereplője a stresszadaptációnak (összefoglalók a témában: Skelton és mtsai., 2000; Kozicz és mtsai., 2011a,b; Ryabinin és mtsai., 2012; Janssen és Kozicz, 2013, Kormos és Gaszner, 2013). A Vetter és mtsai. (2002) által létrehozott UCN1 KO egértörzs szorongóbbnak bizonyult, mint a vad típusú társaik. Wang és mtsai. (2002) azonban egy másik UCN1 KO törzsben nem mutattak ki ilyen anomáliát. Az UCN1 KO egerekben azt is látták, hogy a HPA tengely stresszválasza normális, de a krónikus restraint stresszhez az egerek nem tudtak alkalmazkodni (Zalutskaya és mtsai., 2007).

Saját akut stressz kísérleteink azt mutatták, hogy az EWcp/UCN1 neuronok érzékenyek a fájdalomra (Kozicz és mtsai., 2001), az éterinhalációra, a LPS expozícióra és restraint stresszre, de az ozmotikus stressz és a hipotenziót okozó vérvesztés nem változtatja meg az UCN1 és a FOS mennyiségét patkány EWcp-ben (Gaszner és mtsai., 2004). Egerekben a krónikus stressz tartósan magas FOS expressziót indukál az UCN1 neuronokban (Korosi és mtsai., 2005), míg a patkánykölykök anyai deprivációja az UCN1 neuronok hosszú távú érzéketlenségét okozza

az akut stresszel szemben a már felnőtt utódokban (Gaszner és mtsai., 2009b). Mókuscickányokban a krónikus stressz csökkenti az EWcp/UCN1 immunreaktív neuronok számát (Kozicz és mtsai., 2008a). Kiemelendő, hogy az *UCN1* mRNS mennyisége emelkedett kezeletlen, depresszióban szenvedett öngyilkos férfiak EWcp mintáiban (Kozicz és mtsai., 2008b), a nem depressziós kontrollokhoz képest. Kétségtelen, hogy a stressz erős hatást fejt ki az UCN1-re. A kérdés, hogy a megfigyelt változások a normális alkalmazkodás eredményei-e, vagy ezek máladaptív folyamatokat tükröznek, még megválaszolásra vár. Összességében az UCN1/CRH2R jelátvitelről feltételeztük, hogy részt vesz a stresszhez való hosszú távú alkalmazkodásban és a stresszből való felépülésben.

#### 2.5.5. A PACAP és PAC1 receptor

A PACAP a secretin glucagon vasoactive intestinal polypeptid (VIP) családba tartozó pleiotróp neuropeptid, melynek kétféle, 27 és 38 aminosavból álló, biológiailag aktív formája ismert (Miyata és mtsai., 1989, 1990). A PACAP széles körű központi és perifériás elterjedése arra utal, hogy számos biológiai folyamatban részt vesz. Hatását három receptor közvetítheti: A PAC1 receptor (PAC1R) nagy affinitással köti a ligandumot, és gyakorlatilag PACAP szelektív, míg a VPAC1 és VPAC2 receptorok hasonló, de jóval alacsonyabb affinitást mutatnak a PACAP-ra, és a VIP-re. A PAC1R széles körű eloszlása jó átfedést mutat a ligandumáéval a központi idegrendszerben, ami a PACAP/PAC1R jelátvitel nagyobb funkcionális jelentőségét sejteti (áttekintő cikkek a témában: Vaudry és mtsai., 2009, Reglodi és mtsai., 2012).

Egyre több bizonyíték támasztja alá azt az elképzelést, hogy a PACAP-nak legalábbis moduláló szerepe van a stresszválaszban, és a stresszel összefüggő hangulatzavarokban (áttekintő munkák a témában: Hammack és mtsai., 2010; Pinhasov és mtsai., 2011; Hashimoto és mtsai., 2011; Stroth és mtsai., 2011; Dias és Ressler, 2013, Kormos és Gaszner, 2013, Hammack és May, 2015, Lutfy és Shankar, 2019, Boucher és mtsai., 2021). A PACAP számos, a stresszadaptációban jelentős szereppel bíró előagyi területen jelen van, beleértve a septum laterale-t, a CeA-t, BLA-t és a BNST-t (Hannibal, 2002). A hypothalamus magok, köztük a PVN, sűrű PACAPerg innervációt kapnak, és a PVN CRH neuronjai PACAP tartalmú rostokkal vannak szoros juxtapozícióban (Das és mtsai., 2007). A PACAP befolyásolja a CRH expresszióját (Agarwal és mtsai., 2005) és a viselkedést a PVN-en keresztül (Norrholm és mtsai., 2005). Az intracerebroventricularis PACAP injekció a CRH-n keresztül anxiogén és depressziófokozó hatással jár (Dore és mtsai., 2013). A PACAP jelen van a legtöbb agytörzsi területen is, beleértve az autonóm szenzoros és motoros rendszerrel kapcsolatos területeket, de

ami még érdekesebb, hogy a stresszadaptációban érintett központok is kapnak PACAPerg terminálisokat (pl. DR, EWcp, VTA, LC) (Hannibal, 2002; Vaudry és mtsai., 2009), és/vagy kifejezik a PACAP mRNS-ét (Lein és mtsai., 2007).

Bár az akut restraint stressz expozíció nem változtatta meg a PACAP mRNS expresszióját a PVN-ben (Hannibal és mtsai., 1995), a krónikus variábilis stressz expozíció növelte a BNST PACAP és PAC1R mRNS transzkriptum tartalmát (Hammack és mtsai., 2009). A PACAP KO egerek csökkent szorongást és fokozott lokomotoros aktivitást mutattak az open field tesztben (Hashimoto és mtsai., 2001, 2009) és krónikus restraint stresszben nem mutattak fokozott CRH mRNS-expressziót a PVN-ben, továbbá, a CORT válaszuk is gyengébb (Stroth és Eiden 2009). Krónikus social defeat stresszben a PACAP KO egerek fokozott FOSB expressziót mutattak a mediális PFC-ben, amelyet a PVN csökkent FOSB immunreaktivitása kísért. A PACAP hiány úgy tűnik, a HPA tengely krónikus aktiválódását megakadályozva véd a krónikus social defeat stressz káros hatásaival szemben (Lehmann és mtsai., 2013).

A PAC1R KO egerek számos fenotípusbeli hasonlóságot mutatnak a PACAP KO egerekkel (Hammack és mtsai., 2010), ami arra utal, hogy a VPAC receptorok kisebb mértékben közvetítik a PACAP hatásait. Ezen kívül, mivel a PACAP KO egerekben nem találtak fejlődési kompenzációt a VIP és a közös receptorok expressziós szintje tekintetében (Girard és mtsai., 2006), a PACAP vagy a PAC1R hiányának jellegzetes viselkedési következményei nem a másodlagos hírvivők vagy receptoraik expressziójának kompenzációs változásaiból adódnak. A PACAP/PAC1R jelátvitel jelentőségét olyan génmódosított egereken is vizsgálták, amelyeknél csak a kéregben, illetve a hippocampus-ban hiányzott a PAC1R. Az eredmények azt sugallták, hogy a PAC1R nem nélkülözhetetlen a szorongásos viselkedéshez ezen a területen, mivel ezek az egerek hasonlóak voltak a vad típushoz, és eltértek a globális PAC1R KO állatoktól, melyek csökkent szorongást mutattak (Otto és mtsai., 2001). Hammack és mtsai. (2010) a PAC1R antagonistá anxiolitikus hatását figyelték meg emelt keresztpalló tesztben.

Humán vizsgálatok is alátámasztják a PACAP és a PAC1R jelentőségét a hangulatzavarokban is. A PACAP a PAC1R-on keresztül növeli a DISC1 (disrupted in schizophrenia 1) fehérje termelését (Hattori és mtsai., 2007) és a disc1 génmutációt skizofrénia mellett (Millar és mtsai., 2000), a depresszióval is összefüggésbe hozták (Blackwood és mtsai., 2001). Hashimoto és mtsai. (2010) a PACAP gén nukleotid polimorfizmusai és a depresszió között találtak lehetséges összefüggéseket, és ismert a kapcsolat a poszttraumás stressz szindróma és a PACAP vérszint, valamint a PAC1R polimorfizmus között nőbetegeknél (Ressler és mtsai., 2011, Almli és mtsai., 2013, Lind és mtsai., 2017).

Mindezek alapján, mivel Intézetünkben a PACAP KO állatokkal régóta folynak kutatások, projekteket indítottunk annak vizsgálatára, hogy az egértörzs akut (Gaszner és mtsai., 2012) és krónikus (Kormos és mtsai., 2016) stresszadaptációja milyen viselkedési és funkcionális-morfológiai jegyeket hordoz. Később, ezeket az egereket egy, a depresszió három találat elméletén alapuló depresszió modell kifejlesztéséhez és validálásához használtuk fel, viselkedési, endokrinológiai és funkcionális-morfológiai módszerek segítségével. (Farkas és mtsai., 2016, 2017, Gaszner és mtsai., 2022a,b).

## 2.6. Hangulatzavarok

A stresszadaptáció összetett biológiai jelenség, melynek szabályozásában számos agyterület, az itt termelődő neurotranszmitterek és neuromodulátorok, valamint azok receptorai vesznek részt, hogy végső soron a vegetatív idegrendszert és a HPA tengely neuroendokrin működését szabályozzák, és így a szervezet sikeresen birkózzon meg a környezet kihívásaival. A stresszadaptáció azonban nemritkán sikertelen, és a máladaptáció eredményeként stressz által kiváltott neuropszichiátriai kórállapotok, hangulatzavarok jelennek meg. Ezek leggyakoribb formája, a major depresszió, mely önmagában több mint 280 millió embert érint világszerte és előfordulási gyakorisága meredeken növekszik (WHO, 2021).

A betegséget a széles spektrumon mozgó, időben is fluktuáló súlyosságú és néha éppen ellentétes tünetek jellemzik, mely megnehezíti a diagnózis felállítását. A Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5. kiadása (DSM-5, 2013) szerint, a major depressziós epizód diagnózisa akkor állítható fel, ha legalább két hétig folyamatosan fennáll az alábbi tünetek közül legalább öt, melyek közül legalább egy az első két, *major* kritérium közé kell, hogy tartozzon: *a) lehangoltság, b) érdeklődés és/vagy az örömrre való képesség elvesztése.* Ezeken túl, jellemző lehet a közösségtől való visszahúzódás, hipo-, vagy hiperfágia, ennek következtében hízás vagy fogyás, inszomnia vagy hiperszomnia, motoros nyugtalanság vagy épp meglassultság, krónikus fáradtság, koncentrációs-, és döntési nehézség. Megjelenhet a tehetetlenség, értéktelenség-érzése, bűntudat, önvád, a halállal kapcsolatos visszatérő gondolatok, szuicid ideák, öngyilkossági szándék vagy kísérlet, befejezett öngyilkosság. Fontos, hogy a tünetek az egyén életét klinikailag jelentős mértékben megnehezítik, mely az egyén szociális, munkahelyi életében vagy egyéb módon hátrányt, károsodást idéz elő. A kritériumok közé tartozik, de gyakran figyelmen kívül hagyott szempont a diagnózis felállításánál, hogy a tüneteket nem magyarázhatja valamely tudatmódosító szer, kábítószer, vagy gyógyszer mellékhatás (DSM-5, 2013). A betegségnek a pszichésen kívül kognitív, vegetatív és szomatikus aspektusai is vannak. A depresszió hosszútávú, akár évekig-



évtizedekig tartó lefolyása miatt az egészségügyi rendszer mellett a társadalmat és a gazdaságot is jelentősen megterheli (Prada, 2014). A betegség, mint a krónikus munkaképtelenség leggyakoribb oka, nagymértékben csökkenti a produktív életévek számát, és mivel gyakran kezdődik fiatal korban, az iskolázottság mértékét is negatívan befolyásolja (Hakulinen és mtsai., 2019). A kórkép fontosságát még jobban kiemeli, hogy az öngyilkossági kísérletek és a befejezett öngyilkosságok száma szoros összefüggést mutat a hangulatzavarok prevalenciájával (Gili és mtsai., 2019).

Fontos azt is hangsúlyozni, hogy a depresszió gyakran jár együtt más neuropszichiátriai kórképekkel, úgy, mint a szorongásos állapotok (Choi és mtsai., 2020), a kóros mértékű alkoholfogyasztás (McHugh és mtsai., 2019), gyógyszerfüggőség (Sullivan, 2018) és kábítószerhasználat (Feingold és mtsai., 2021). A depresszióval küzdő egyének körében számos betegség gyakrabban fordul elő, mint például a kardiovaszkuláris kórállapotok (magasvérnyomás-betegség, koszorúérbetegségek, agyérbetegségek) (Joynt és mtsai., 2003, Castello és mtsai., 2022), gasztrointesztinális betegségek (gyomor- és nyombélfekély, Crohn-betegség, colitis ulcerosa, irritábilis bél szindróma) (Zhang és mtsai., 2012b, Barberio és mtsai., 2021). A depresszió ezen kívül jelentkezhethet úgy is, mint egyéb betegségekhez társult tünet. Itt, a disszertáció egyik alapját képező projektben vizsgált, a Parkinson-kór nem motoros tüneteként manifesztálódó depressziót említtem példaként, de az Alzheimer-kór is gyakran társul hangulatzavarral, vagyis, a két leggyakoribb neurodegeneratív betegségben jellemző lehet a depresszió (Galts és mtsai., 2019).

### 2.6.1. Depresszióelméletek

A legáltalánosabban elfogadott és klinikai relevanciát nyert nézet, a „monoamin teória” szerint a depresszióban fellépő hangulatzavar hátterében a szerotoninerg, noradrenerg és dopaminerg rendszerek kóros működése állhat (review tanulmányok: Mulinari, 2012; Czéh és mtsai., 2016; Harro, 2019). A jelenleg elérhető teljes farmakoterápiai eszköztár ezen az elméleten alapszik. Habár a korábban gyakran használt gyógyszer csoportok (triciklusos antidepresszánsok és monoamin visszavétel gátlók) kissé kezdenek a háttérbe szorulni, jelenleg a dopamin-noradrenalin-, és a szerotonin-noradrenalin visszavétel gátlók mellett az első vonalban leggyakrabban a szelektív szerotonin visszavétel gátlókat (selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI) használják (áttekintő közlemények: Pampallona és mtsai., 2004; Karyotaki és mtsai., 2016; Guidi és mtsai., 2021). Az SSRI csoport leggyakrabban alkalmazott hatóanyagai (fluoxetin, paroxetin, citalopram, escitalopram, sertralin) szinte minden beteg kezelésének alapját képezik. Jól ismert klinikai megfigyelés azonban, hogy a jelenleg elérhető gyógyszeres

kezeléssel a terápiás válasz csak az esetek 70%-ában kielégítő, a többi páciens azonban nem, vagy nem megfelelő mértékben reagál (Catena-Dell'Osso, 2013; Khan és Brown, 2015; Voineskos és mtsai., 2020).

A depresszió hátterének megértése céljából végzett vizsgálatok során egyéb depresszió elméletek is születtek. Mint az fent említésre került, a HPA tengely működésének zavara gyakran társul depresszióval (Nemeroff és mtsai., 1984), ezért felmerült, hogy a betegséget a HPA tengely máladaptációja okozza, és próbálkoztak a CRH1R-on történő gyógyszeres beavatkozásokkal is, amelyek nem jártak sikerrel (összefoglaló cikk: Kormos és Gaszner, 2013). Jól ismert jelenség, hogy a hippocampus és a PFC területén krónikus stresszben és depresszió során térfogatváltozás, atrófia következik be, mely együtt jár a plaszticitásban fellépő változásokkal, és a BDNF illetve más neurotrofinok (Jaggar és mtsai., 2019) mennyiségének változásával. Ezek a megfigyelések a „neurotrofin teória” (Duman és Monteggia, 2006) kialakításához vezettek. Szintén jól dokumentált jelenség, hogy a súlyos és elhúzódó stressz, valamint a depresszió a központi idegrendszerben gyulladáshoz vezet, továbbá a depresszió gyógyszeres és elektrokonvulzív terápiája mellett is megváltozik a vérben a pro- és antiinflammatorikus citokinek mennyisége. Ez a megfigyelés annak a nézetnek a kialakulásához vezetett, hogy a neuroinflammáció áll a betegség hátterében (összefoglaló közlemény: Ellul és mtsai., 2018). Ez utóbbi elv alapján immunmodulátor kezelések (pl. interleukin 2) vannak klinikai kipróbálás alatt annak vizsgálatára, hogy mennyire hatékonyak ezek a depresszió terápiájában (NCT04133233).

A fent röviden említett neurobiológiai eltéréseket vizsgálva többféle megközelítést alkalmaztak az alapkutatásban, melynek során kitűnt, hogy a depressziót eredményező regulációs eltérések hátterében genetikai, epigenetikai és környezeti faktorokat állhatnak.

#### 2.6.2. A depresszió hátterében álló genetikai eltérések

A múlt század óta ismert, hogy a depresszió genetikai háttere lehet (Winokur és Tanna, 1969, Dorzab és mtsai., 1971; Winokur, 1972; Weissman, 1984, Bland és mtsai., 1986; Kendler és mtsai., 1999; Sullivan és mtsai., 2000). Depressziós betegek elsőfokú rokonai fokozott kockázatot mutatnak a betegség kialakulására (Baker és mtsai., 1972). Hasonló következtetésre jutottak az ikervizsgálatok is, ahol a depresszió szempontjából diszkordáns egyipetű ikrek utódainál összefüggést találtak a beteg és az utód depressziója között, valamint, a szülők depressziója esetén, az utódnál gyakrabban alakult ki a betegség, mint a depresszió által nem érintett szülőktől származó unokatestvéreknél (Singh és mtsai., 2011). Az ikervizsgálatok a

major depresszió öröklődésének valószínűségét 40% (Kendler és mtsai., 2006, Sullivan és mtsai., 2000) és 70% (McGuffin és mtsai., 2003) közé teszik.

Számos kísérlet történt a depresszió kialakulásáért felelős génváltozatok azonosítására. A vizsgált gének és géntermékek közül néhánynak közvetlen hatása lehet a HPA tengely működésére. Az SLC6A15 géntermék (NTT73 neurotranszmitter transzporter) például részt vesz az ACTH- és kortizolszekréción, és ezért a gén mutációjának szerepe lehet a depresszióban (Schuhmacher és mtsai., 2013). A monoaminerg rendszerek működésének genetikai eredetű megváltozása is hozzájárulhat a hangulatzavarokhoz, mint például a szerotonin transzporter gén promóter régiójának genetikai polimorfizmusa (Caspi és mtsai., 2003, Iurescia és mtsai., 2016). Számos egyéb, a hangulatszabályozásban fontos szerepet játszó neuronhálózat működését befolyásoló (pl. dopamin-, szerotonin-, GABA receptorokat érintő), genetikai elváltozás is ismert, melyek növelik a betegség kialakulásának valószínűségét (lásd az alábbi összefoglaló közleményeket: Lacerda-Pinheiro és mtsai., 2014; Mullins és Lewis, 2017; Ormel és mtsai., 2019).

A klasszikus neurotranszmitterek mellett a neuromodulátorok szerepe is ismert a depresszió genetikai hátterének kialakításában. Több tanulmány leírta a CRH (Chang és mtsai., 2015), az oxytocin (McQuaid és mtsai., 2014), a galanin (Wang és mtsai., 2013; Unschuld és mtsai., 2010) és a neuropeptid S (Okamura és mtsai., 2007) génjeinek polimorfizmusa és hangulatzavar közötti kapcsolatot. Didaktikailag ide tartozik a PACAP és PAC1R, pontosabban az adcyap1 és az adcyap1r1 gén mutációjának illetve polimorfizmusainak jelentősége is a hangulatzavarokban, melyet a 2.2.4 szakaszban röviden már bevezettem.

A fenti példák a teljesség igénye nélkül világítanak rá a depresszió genetikai hátterének összetettségére. Ennek megfelelően, és mivel a betegség öröklésmenete nem követi a mendeli szabályokat, a major depressziót a poligénes betegségek közé sorolhatjuk. A jelen disszertáció alapját olyan projektjeink is képezik, ahol génkiütött egértörzsekben vizsgáltuk a PACAP (adcyap1) (Gaszner és mtsai., 2012, Kormos és mtsai., 2016) és Trpa1 (Kormos és mtsai., 2022) gén mutációjának hatását az egerek stresszadaptációjára és hangulati állapotára.

### 2.6.3. A depresszió epigenetikai háttere

Az epigenetika az örökítő anyag dinamikus változását írja le, mely alatt olyan szerkezeti módosulásokat kell érteni, ami a bázissorendet nem érinti. Az epigenetikai változások a környezeti ingereknek megfelelően dinamikusan változnak, de hatásuk tartós lehet, sőt, a csírasejtek érintettsége esetén, átöröklődhetnek a következő generációkra (Perroud és mtsai.,

2014). Ezek a változások a génszabályozást és a génexpressziót irányítják és magukban foglalhatják a DNS metilációt és hidroximetilációt. A módosulásoknak több további fajtája van, mint például az ubikvitináció, a szulfoniláció és a nem kódoló RNS-ek. Ezen túl, a hisztonfehérjék kémiai módosulása is befolyásolja a génműködést. A leggyakrabban vizsgált epigenetikai változások a hiszton-, illetve DNS metiláció mellett a hisztonfehérjék acetilációja (Strahl és Allis, 2000; Kouzarides, 2007). A hisztonacetilációs mintázatot a hiszton-acetiltransferáz és a hiszton-deacetiláz enzimsaládok közötti egyensúly szabályozza (Kuo és Allis, 1998). A hiszton fehérjéken bekövetkező acetiláció hatására a DNS szál lazábban tekeredik a fehérjére, mely így jobb hozzáférést biztosít az RNS polimeráz enzim számára, és így, az adaptációban fontos fehérjék mRNS-ének transzkripciója, majd azok translációja megindulhat. A deacetiláció hatása fordított: a DNS szál szorosabban tekeredik fel a hisztonfehérjére, így csökken az RNS-polimeráz hozzáférése, és a génexpresszió-változást megkívánó adaptációs folyamatok dinamikája lassul (Kuo és Allis, 1998). Ilyen epigenetikai változások a stresszadaptáció során is fellépnek. Korábban kimutattuk, hogy a krónikus variábilis enyhe stressz a hisztonacetiláció és metiláció szintjén változtatja meg az epigenetikai mintázatot, mely befolyásolja a stresszválasz szempontjából kulcsfontosságú crh gén expresszióját is (Sterrenburg és mtsai., 2011). Ezzel szemben, a hiszton-deacetiláz gátló kezelés enyhíti a depressziószerű viselkedést (Covington és mtsai., 2015), illetve az antidepresszáns-kezelésre adott válasz is javul (Levine és mtsai., 2012; Schmauss, 2015). A crh gén epigenetikai szabályozásán túl (Elliott és mtsai., 2010, Sterrenburg és mtsai., 2011), a crh1r gén metilációja szintén változásokon megy keresztül (Wan és mtsai., 2014). A HPA tengely negatív feedback szabályozásának is van epigenetikai aspektusa, mivel a GR-t kódoló gén, az nr3c1 hipermetilációja a GR expressziójának csökkenését okozza depresszióban (Webster és mtsai., 2002; Yehuda és mtsai., 1993), de ismert a MR génjének, az nr3c2 epigenetikai módosulása is (Sober és mtsai., 2010).

Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az epigenetikai változások hozzájárulhatnak a hangulatzavarokhoz azzal, hogy a stresszorokra adott válaszkészséget a génműködés szintjén befolyásolják. Az egyedre specifikus epigenom kialakulása leginkább az élet korai szakában zajlik, mint például a születés utáni időszak, de ide sorolható az adolescens kor is. Ezeket az időszakokat az epigenom szempontjából vulnerábilis fázisoknak tekintik (Lange és Schneider, 2010; Ng és Gurdon, 2008). Az ekkor átélt negatív életesemények növelik a depressziószerű állapot kialakulásának kockázatát állatmodellekben (Nestler, 2012, Raabe és Spengler, 2013, Nishi és mtsai., 2014) és emberben is (Heim és Binder, 2012, Kim és mtsai., 2021).

A fenti példák rávilágítanak arra, hogy az epigenetikai hatások több ponton befolyásolják a stresszadaptációt, és így a hangulatzavarok szempontjából is figyelmet érdemelnek, mind klinikai, mind alapkutatósi szinten.

#### 2.6.4. A környezeti stresszhatás és a depresszió kapcsolata

A hangulatzavarok megjelenésében a szervezetet érő tartós környezeti stressz játsza a legfontosabb szerepet (review-k a témában: McEwen és mtsai., 2015; Deussing és Chen, 2018). Gyakori klinikai megfigyelés az, hogy a depressziós epizódok kialakulását egy fokozott stresszel járó esemény, eseménysor, életszakasz előzi meg. Számtalan példát lehet erre állítani. Környezeti katasztrófák, terrorcselekmények vagy egyéb fizikai erőszak túlélői gyakran érintettek depressziós epizódban. Hosszabb távú stresszhatást okoz és ezáltal a depresszió kialakulásához hozzájárulhat a családon belüli erőszak, a szexuális abúzus, rossz munkahelyi körülmények, párkapcsolati feszültségek, krónikus egészségügyi problémák, a munkahely elvesztése, az elmagányosodás, a pénzügyi instabilitás, a gyász (Li és mtsai., 2016). Ezt alapul véve, a major depresszió számos modellje a környezeti stresszt használja a pszichopatológiát kiváltó eszközként, mely felborítva a HPA tengely normális működését szorongáshoz és depresszióhoz vezet (Blackburn-Munro és Blackburn-Munro, 2001; Joëls és mtsai., 2003, Harvey és mtsai., 2006; Glover és mtsai., 2010; Ramot és mtsai., 2017). Ennek megfelelően, jól dokumentált humán vizsgálatokban is a HPA tengely diszregulációja depresszióban (Nemeroff és mtsai., 1984; Juruena és mtsai., 2018; áttekintő cikk a témában: Perrin és Pariante, 2020).

Annak ellenére, hogy az elmúlt évtizedekben a fenti elméletek mentén mélyreható kutatások folytak az etiológia és a patomechanizmus feltárására, rendkívüli összetettsége miatt még mindig csak néhány részletét ismerjük a betegség hátterének. Ennek egyik oka az lehet, hogy habár ismerjük a többféle elméletet a kialakulás hátterére, a betegségre még mindig, mint egy egységes entitásra tekintünk. Tesszük ezt annak ellenére, hogy a klinikai kép meglehetősen heterogén: a fent felsorolt tünetek (DSM-5, 2013), amelyek ugyanazon diagnózist, a major depressziót, támasztják alá, szöges ellentétben álló tüneti jelenségek is lehetnek (pl. insomia és hypersomnia, fogyás és hízás, nyugtalanság és meglassultság). Ezek az ellentétpárok a tünettanban arra engednek következtetni, hogy a major depresszió és a gyakran társuló egyéb neuropszichiátriai betegségek valójában egy betegségcsoportot képeznek, ahol a különböző tünettani jellemzőket mutató depressziós esetek háttérben eltérő idegrendszeri kórfolyamatok bújnak meg (Kormos és Gaszner, 2013). Annak érdekében, hogy a kutatásban és végső soron a betegségcsoport terápiájában érdemben előre tudjunk lépni, arra lenne szükség, hogy

definiáljuk a kórkép alcsoportjait, és megértsük ezek -minden bizonnyal- meglehetősen különböző neurobiológiai hátterét. Sajnos ennek, és általában a depresszió, mint betegség alapkutatásának és ezáltal a gyógyszerfejlesztésnek is egy fontos kerékkötője, hogy a mai napig nincsen általánosan elfogadott állatmodell, melyet a betegség neurobiológiai hátterének feltérképezésére alkalmazhatnánk, és tesztelhetnénk azokat a gyógyszerjelölt hatóanyagokat, amelyeket az újonnan feltárt mechanizmusok alapján fejlesztünk.

#### 2.6.5. A hangulatzavarok alapkutatási modelljei

Az olyan összetett neurobiológiájú, multifaktoriális állapotok kutatásában, mint amilyen a depresszió is, szükség van az állatmodellek alkalmazására. A fent röviden említett depresszióelméletek alapján számos modellt fejlesztettek ki azzal a céllal, hogy egy depressziószerű állapotot, és fokozott szorongást idézzenek elő. A betegség genetikai hátterét alapul véve, számos génmódosított egérentenyészetet állítottak elő, ahol a stresszadaptációban részt vevő hírvivők, vagy azok receptorainak működését manipulálták. A CRH és receptorai, az UCN1, a PACAP és PAC1R stresszadaptációban és a hangulatszabályozásban vitt szerepét fent (2.5. fejezet) már összefoglaltam. Tekintettel arra, hogy a PACAP szerepe a hangulati állapot szabályozásában jelentősnek tűnt, akut (Gaszner és mtsai., 2012) és krónikus (Kormos és mtsai., 2016) stressz modelleket használva vizsgáltuk azt, hogy az engodén PACAP hiánya miként befolyásolja a stresszadaptációt. Az akut stressz kiváltására számos módszer áll rendelkezésre, ahogy azt fent a 2.3.1 szakaszban összefoglaltam. A PACAP KO állat akut stresszválaszának karakterizálása után az állat krónikus variábilis enyhe stressz adaptációját is teszteltük. Kollaborációs projektjeink során felmerült, hogy a TRPA1 KO egerekben a stresszadaptáció zavart szenved, ezért ezt a génmódosított egérentörzset is vizsgáltuk a krónikus variábilis enyhe stressz modellben. Ez a stressz paradigma az angol szakirodalomban, mint chronic variable mild stress (CVMS) szerepel, de a források egy része, mint chronic unpredictable mild stress (CUMS) hivatkozik rá. Ez a módszer gyakran alkalmazott eszköze a depresszió vizsgálatának, ahol a környezetből állandóan érkező, limitált erősségű, de váltakozó formában fellépő stresszhatásnak tesszük ki az állatokat. A CVMS-t immár majdnem 40 éve használjuk a stresszkutatásban. Könnyen belátható a módszer transzlációs jelentősége, mely magyarázza a paradigma népszerűségét a preklinikai kutatók körében. A modell során a kísérleti állatokban megfigyelt anhedónia, depressziószerű tünetek és szorongás megfeleltethető az embert a hétköznapi életben érő enyhébb, de hosszan fennálló és nem megjósolható stresszorok által kiváltott állapotnak (áttekintő közlemények: Czéh és mtsai., 2016; Willner és mtsai., 2019; Czéh és Simon, 2021; Strekalova és mtsai., 2022).

Természetesen, mint minden modellnek, a CVMS-nek is vannak hátrányos tulajdonságai. Jellemző, hogy patkányok és egerek, sőt, az egyes egértörzsek között is jelentős különbség van abban a tekintetben, hogy milyen mértékben reagálnak érzékenyen a CVMS-re (Monteiro és mtsai., 2015). A másik fontos szempont, ami limitálja a CVMS modellt, hogy az önmagában nem képes az esetleges genetikai különbségek kimutatására, amelyek a stresszadaptáció-képesség különbözőségeit okozhatják. Ezért, kísérleteinkben kombináltuk a génmódosított egértörzsek használatát a CVMS modellel (Gaszner és mtsai., 2012, Kormos és mtsai., 2016, 2022). Egy további hátrány, és ennek translációs és konstrukciós validitási jelentősége is van, hogy nem minden krónikus stresszben élő ember mutatja a depresszió tüneteit, mert egyes emberek adaptációs készsége nagyobb. Hasonlóan, a kísérletek során találhatunk a CVMS-re rezisztens állatokkal, amelyek sikerrel adaptálódnak, és nem mutatják a depressziószerű állapot kialakulását, és a megnövekedett szorongás jelét. Ennek lehet genetikai háttere, de amennyiben beltenyésztett törzseket használunk az állatkísérletekben, ennek igen kicsi a valószínűsége.

E problémára az epigenetikai program megváltozása adhat magyarázatot, ahogy azt a 2.6.3 fejezetben kifejtettem. Számos tanulmány talált kapcsolatot a jelentős korai negatív életesemények (significant early life adversity) és a depresszió között. Az ilyen perinatális és gyermekkori események emberben szoros összefüggést mutatnak a pszichoszociális fejlődéssel. A gyermekkori bántalmazás például potenciálisan növeli a depresszió és más mentális és szomatikus betegségek későbbi életkorban történő kialakulásának kockázatát. Szociális intézményben, és bentlakásos iskolarendszerben felnövő gyermekek esetében kimutathatóan magasabb a HPA tengely aktivitása, de a személyzet támogatóbb attitűdje esetén a HPA tengely működése normalizálódik (Li és mtsai., 2016). Az újszülöttkori stressz állatmodelljeiben (pl. maternális depriváció) tett megfigyelések figyelemre méltó hasonlóságokat mutatnak az ember pszichiátriai zavaraiival, mint a skizofrénia, a kábítószerabúzus és hangulatzavarok (Brake és mtsai., 2004, Kalinichev és mtsai., 2002, 2003; Finamore és mtsai., 2000; Ellenbroek és mtsai., 1998). Kimutatták, hogy a patkánykölykök ismételt elválasztása az anyjuktól növeli a szorongást, és a HPA tengely stresszre adott válaszát. Az is ismert, hogy az anyai depriváció hosszú távú változásokat idéz elő az új környezethez való alkalmazkodásban (Kalinichev és mtsai., 2002). Az anyai depriváció modelljeiben sokféle neurokémiai változást feltártak, köztük a mezolimbikus dopaminerg rendszerben bekövetkező változásokat és a neuropeptidek (Brake és mtsai., 2004; Husum és mtsai., 2002), mint például az UCN1 expressziójának változásait (Gaszner és mtsai., 2009b). A depriváció ezen túl a neurotrofinok és más plaszticitási markerek expresszióját (Burton és mtsai., 2007, Gaszner és

mtsai., 2009b) és a hippocampalis neurogenezist (Mirescu és mtsai., 2004) is megváltoztatja. Az anyai megvonás, mint modell esetében megjegyzendő, hogy a rövid távú, napi 15 perces szeparáció (MS15) kifejezetten jótékony hatással van a stresszadaptációra, a súlyos, napi 180 perces maternális deprivációval (MD180) ellentétben (Jans és Woodside, 1990, Plotsky és mtsai., 2005). Ennek magyarázata az lehet, hogy a természetben a rágcsálók esetében az anyaállat a kölyköket tartalmazó fészket saját táplálékszerzésének és egyéb biológiai szükségleteinek kielégítése idejére, rövid időre magára hagyja (Jans és Woodside, 1990). Ez az időtartam, mint egy adaptációt kiváltó enyhe stresszor jelenik meg a kölykök szempontjából. Visszatérése után aztán az anyaállat egyfajta fokozott anyai magatartást gyakorol (megtisztogatja, megeteti a kölyköket), mely szintén az utódok adaptációját segíti (Plotsky és mtsai., 2005).

Ahogy az a CVMS modell esetében említésre került, a maternális depriváció paradigma esetében is tekintetbe kell venni, hogy nem minden állat esetében alakul ki hangulatzavar, amelyet kölyökként anyai megvonásnak tettünk ki, ahogy az is nyilvánvaló, hogy sok, nehéz gyermekkort megélt ember él felnőtt korában hangulatzavar nélkül. Fordítva, számos példa van arra, hogy kifejezetten ideális körülmények között felnőtt emberek súlyos hangulatzavarral és függőséggel élnek felnőtt korukban. Ez azt mutatja, hogy az averzív korai életesemények, illetve a maternális depriváció önmagában, mint epigenetikai faktor, nem feltétlenül okoz hangulatzavart, de ha más faktorokkal együtt van jelen, akkor kialakulhat a manifeszt kór állapot. Ennek magyarázatát a depresszió két további összetett hipotézise adhatja meg.

#### 2.6.5.1. A depresszió összetett modelljei

Mint az e fejezetben látható, a hangulatzavarok, köztük a depresszió, multifaktoriális betegség(csoport). Annak érdekében, hogy a depresszió kialakulásához hozzájáruló faktorok (genetikai predispozíció, fiatalkori, az epigenetikai programot befolyásoló stresszhatás, az élet későbbi szakaszában átélt krónikus környezeti stressz) együttes hatását is vizsgálni tudjuk, és az önmagukban nem limitációk nélkül álló egyszerű modellek hiányosságait ki tudjuk küszöbölni, arra van szükség, hogy a modelleket kombináljuk.

##### 2.6.5.1.1. Match-mismatch hipotézis

Az egyik modell, ahol a fiatalkorban átélt stressz és a már felnőttkorban jelentkező stresszor hatását egyazon összetett rendszerben vizsgálják, a match-mismatch hipotézis (Schmidt, 2010, Santarelli és mtsai., 2014). Az elmélet alapja az a feltételezés, hogy a stresszadaptációs rendszerek epigenetikai „beállítása” fiatalkorban történik meg, és ez hosszútávon meghatározza a rendszer adaptációs kapacitását. Amennyiben viszonylag nehéz élethelyzethez kell



alkalmazkodnia a gyermeknek, és ebben sikeres, akkor amennyiben az életét később is komoly kihívásokkal megküzdve éli (*match*), sikeresen adaptálódik, és nem jelenik meg hangulatzavar. Hasonlóképpen, a jó anyagi és családi körülmények között ideális környezetben felnövő gyermek, amennyiben életét úgy tudja vezetni, hogy életkörülményei ideálisak maradnak, a hangulati állapota általában normális marad (*match*). Az elmélet szerint akkor számítunk hangulatzavar kialakulására, ha a gyermekkori igen nehéz életkörülmények, később váratlanul, összehasonlíthatatlanul jobbra fordulnak (*mismatch*), és az új helyzethez a nehéz életkörülményekre beállított stresszadaptációs rendszer nem tud sikeresen alkalmazkodni. Fordítva, az is előfordul, hogy az ideális életkörülmények között szocializálódott egyén valamilyen okból később nehéz helyzetbe kerül, amivel nem tud megküzdeni, és végül hangulatzavar alakul ki. A match-mismatch hipotézis vizsgálatára saját laboratóriumunkban is történtek patkánykísérletek, de eredményeink e disszertáció benyújtásának idején még közlés előtt állnak, ezért ennek az elméletnek a részletes további taglalásától eltekintek.

#### 2.6.5.2.2. A három találat elmélet

A depresszió, mint multifaktoriális betegség, magában hordozza a) a genetikai predispozíció, b) a fiatalkori, az epigenetikai programozódást módosító stresszhatás, és c) az élet későbbi szakaszában átélt krónikus környezeti stressz együttes hatását. Ezen alapszik a Mill és Petronis (2007) által kidolgozott elmélet, melynek lényege, hogy az öröklött genetikai hajlam, egy az élet korai szakaszában átélt averzív élethelyzet, és a későbbi környezeti stressz egymással interakcióba lépve okoznak adaptációs zavart, és ezáltal depressziót (Daskalakis és mtsai., 2013). A jelen disszertáció alapját képező több közlemény abba a projektbe illeszkedik, amelyben a három találat elmélet alapján egy új, összetett depresszió modellt hoztunk létre. PACAP KO, heterozigóta (HZ) egereket (genetikai predispozíció) és vad típusú (WT) társaikat, anyai depriváció modellben averzív környezetnek tettünk ki újszülött korban, majd, az állatokat már felnőtt korukban CVMS-nek vetettük alá, a megfelelő kontrollokkal szemben (Farkas és mtsai., 2016, 2017). Egy újabb kísérletsorozatban a modell megbízhatóságát antidepresszánskezeléssel is teszteltük (Gaszner és mtsai., 2022a,b) és vizsgáltuk az állatok hangulati állapotát és az ennek hátterében fellelhető agyi funkcionális-morfológiai változásokat.

#### 2.6.6. A hangulati állapot mérése rágcsáló modellekben

Annak megítélésére, hogy az állatok milyen hangulati állapotban vannak, viselkedési tesztek alkalmazunk. Ezek részletes leírása helyett, mely a Módszerek fejezetben található, ehelyütt ezek céljának felsorolásszerű összefoglalására szorítkozom. Az állatok depressziószerű

viselkedésének mérésére a forced swim tesztet (FST) (Porsolt és mtsai., 1977, Ghasemi és mtsai., 2009) és a tail suspension tesztet (TST) (Steru és mtsai., 1985), használjuk, ahol az állat előbbi esetben egy vízzel töltött hengerből, második esetben az egér a farkánál fogva felfüggesztett helyzetéből próbál szabadulni. Azt az időt regisztráljuk, amit az állat passzívan tölt el a teszt ideje alatt, vagyis azt az időtartamot, amikor nem kísérel meg szorult helyzetéből kiszabadulni. Ez az állat immobilitási ideje, és arányos a depresszió szintjével. További, a depresszióra utaló tünet az anhedónia, melyet a cukorpreferencia tesztel (SPT) mértünk (Willner és mtsai., 1987, Liu és mtsai., 2018b). Ebben a tesztben azt vizsgáljuk, hogy a rágcsálók által kedvelt édes, cukrozott vizet milyen arányban részesítik előnyben az egyidőben felkínált tiszta ivóvízzel szemben. Az állat cukorpreferenciája fordítottan arányos az anhedónia szintjével. Az állatok szorongásos állapotát és lokomotoros aktivitását open field tesztben (OFT) mértük (Kudryavtseva és mtsai., 1991). Itt az állat egy dobozban mozog, és azt az időt mérjük, amelyet az állat a doboz védettebb, fal menti és sarki részeiben tölt, elkerülve a nyílt terepet, mely averzív. Ez az idő arányos a szorongás mértékével. A vizsgálat során megtett út hossza egyben mutatja az állat lokomotoros aktivitását is. A tesztet ezért az állat mozgáskoordinációnak és hipokinéziájának mérésére is használtuk a Parkinson-kór modelljeink validálása céljából. Ugyanilyen célt szolgált a rotarod teszt (RPT) is (Zhang és mtsai., 2017), de mivel ezt a tesztet a hangulati állapot mérésére nem használjuk, leírása a Módszerek fejezetben lesz olvasható. A szorongási szint megítélésére a light-dark box (LDT) tesztet is alkalmaztuk (Crawley és Goodwin, 1980). Ebben a tesztben az állat egy olyan, két térfélből álló dobozba kerül, amelynek egyik fele fehér falú, és erős fény világítja meg, míg a másik oldal sötét. Az állat szabadon eldöntheti, hogy az alapvetően rejtőzködő életmódú rágcsálók számára általában averzív, világos, vagy a biztonságosabb sötét kompartmentbe lép be egy átjárón keresztül. A szorongási szint a sötét oldalon töltött idővel arányos. A szorongás mérésére alkalmaztuk a marble burying tesztet (MBT) is (Njung'e és Handley, 1991). Ebben a paradigmában az állat olyan ketrecbe kerül, melybe előzőleg az állat számára idegen tárgyakat, üveggolyókat helyezünk az alom tetejére. Az állat a rendelkezésre álló fél óra alatt a szorongási szintjével arányos számú üveggolyót temet el az alomforgácsba.

#### 2.6.7. Az állatmodellek megbízhatóságának értékelése

Önmagában az a tény, hogy egy emberi betegséget vagy inkább egy ahhoz hasonló állapotot próbálunk meg egy állatban előidézni, magában hordozza azt a lehetőséget, hogy a fajok közti különbségek okán, nem feltétlenül alkalmazhatók az állatmodellben tett megfigyelések az

emberi viszonyokra. Éppen ezért, az állatkísérletek eredményeit, és az állatmodellek megbízhatóságát alaposan meg kell vizsgálni.

A hangulatzavarok kutatásában használatos állatmodelleket a három klasszikus validitási kritérium szerint értékeljük, Willner (1984) szerint. Az első kritérium a konstrukciós validitás, mely szerint a modellnek a betegség ismert rizikófaktoraira, kiváltó tényezőire kell épülnie. Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy amennyiben a kísérleti állatot kitesszük a betegség hátterében álló ismert kóroki tényezőnek, akkor az állatban ez tüneteket okoz. A második, a fenomenológiai validitási kritérium, mely szerint az állat az emberi betegség során megfigyelt, (vagy azokkal analóg) tüneteket kell mutatnia. A harmadik, a prediktív validitási kritérium. Eszerint, a betegség kezelésére emberben már sikerrel használt terápiás eljárásoknak, gyógyszereknek, hatásosnak kell lenniük abban a tekintetben, hogy a betegségre jellemző tüneteket mutató kísérleti állatokban a terápiás beavatkozás javulást idézzen elő. E három validitási kritérium teljesülése alapján mondható ki, hogy a modell használható arra, hogy a jövőbeli kezelések hatékonyságát teszteljük rajta. Munkánk egyik fő célja ezért az volt, hogy az általunk kidolgozott, a három találat elméleten alapuló egérmodellt teszteljük a willneri kritériumok szerint.

#### 2.6.8. A Parkinson-kór és a hozzá társuló hangulatzavarok

A Parkinson-kór világszerte az Alzheimer-kór után a második leggyakoribb progresszív neurodegeneratív kórkép. A Föld lakosságának megközelítőleg 0,1-0,2%-át érinti, Európában a PD prevalenciája és incidenciája 108-257/100000 fő, illetve 11-19 eset/100000 fő évente. A betegség gyakorisága az életkorral meredeken nő: prevalenciája az 50-59 éves korosztályban 17/100000 fő, mely a 70-79 éves korcsoportban 90/100000 főre emelkedik (Komoly és Palkovits, 2018). Magyarországon 20-40 ezer főre tehető a Parkinson-kórban szenvedők száma (Szatmári és mtsai., 2019). Megjelenése hazánkban és globálisan egyaránt lassú, de folyamatos növekedést mutat (Balestrino és Schapira, 2020). A rizikótényezők közé az előrehaladott életkor, a férfi nem, környezeti hatások és egyes genetikai variációk sorolhatók, de az öröklődő formái becslések szerint az esetek 5-15%-át teszik ki. A PD egészségügyi, pszichológiai és szociális aspektusán túl nagy gazdasági terhet is ró a társadalomra. A Parkinson-kórral összefüggésben, Európában évi 13,9 milliárd eurós direkt egészségügyi és indirekt, nem egészségügyi költség keletkezett (Gustavsson és mtsai., 2011), ami az elmúlt 10 évben tovább növekedett. A tüneteket két csoportra tudjuk osztani. Ennek értelmében beszélhetünk a mozgási rendszert érintő *motoros*, illetve a vegetatív funkciókat és a hangulati életet befolyásoló *nem motoros* tünetekről.

A külső szemlélő számára a betegség során a motoros funkciók szemmel látható romlása a legfeltűnőbb. A PD vezető tünetei közé a vázizommerevség, a rigor; a nyugalmi, nagy amplitúdójú és frekvenciájú remegés, a tremor; valamint a mozgásszegénység, a bradykinesia tartozik (Poewe és mtsai., 2017). Utóbbi meglassult mozgást jelent, melyet apróléptű, csoszogó járás, kifejezéstelenné váló arc, monoton, nehezen érthető, elhalkuló beszéd jellemez. Jól ismert tünet a mozgások elindításának és megállításának zavara, a hypokinesis (Komoly és Palkovits, 2018).

A PD-ban szenvedő betegekben a motoros rendszer érintettsége mellett a nem motoros tünetek is megjelennek. Amióta egyértelművé vált, hogy ezek is a kórkép részét képezik, a PD-ra már nem, mint pusztán motoros kórképre tekintünk, hanem multiszisztémás betegségként értelmezzük (Obeso és mtsai., 2017). A nem motoros tünetek közül a leggyakrabban a szorongás és a depresszió fordulnak elő, melyek a betegek felében akár évekkkel, sőt évtizedekkel a motoros tünetek kialakulása előtt is megjelenhetnek és a betegség progressziójával arányosan súlyosbodhatnak (Borgonovo és mtsai., 2017). Ezekkel egy időben, vagy akár izoláltan is, megjelenhetnek impulzuskontroll zavarok, apátia és alvászavar. Kiemelendő, hogy a betegek saját megítélése szerint a hangulatzavarok nagyobb mértékben rontják az életminőségüket, mint a betegségről a köztudatban élő képet jobban meghatározó motoros rendszer érintettségéből adódó mozgási deficit (Balestrino és Martinez-Martin, 2017).

A motoros tünetek hisztopatológiai és funkcionális háttere viszonylag jól ismert. PD-ban a substantia nigra pars compacta (SNpc) dopaminerg idegsejtjei degenerálódnak. Az neuronok mintegy 70%-ának pusztulása után a striatum dopaminerg afferenciájának olyan mértékű károsodása következik be, amelyben a striatum-ban a direkt út és az indirekt út dopamin 1 illetve dopamin 2 receptoron keresztüli szabályozása dopamin hiányában felborul, és fellépnek a jellegzetes motoros tünetek. A SNpc területén a dopaminerg neuronokban alpha-synuclein tartalmú eosinophil zárványokat, úgynevezett Lewy testek (LB) és Lewy neuritek is megjelennek (összefoglaló közlemény: Schneider és Obeso, 2015).

A nem motoros tünetek hátterének kutatása is több évtizedre tekint vissza, mégis, még mindig nagyon keveset tudunk ezek neuropatológiai hátteréről (Rodríguez és mtsai., 2017). Jól ismert, gyakori bevezető tünet a szaglászavar, valamint a vegetatív idegrendszer károsodása (Jankovic, 2008). Az enterális idegrendszer neuronjai és az enteroendokrin sejtek is károsodnak PD-ban (Chaudhuri és mtsai., 2006). Ezzel összefüggésben, a nucleus dorsalis nervi vagi-ban neurodegenerációt találtak (Beach és mtsai., 2010) és a nervus vagus atrófiáját is megfigyelték,

mely az emésztőrendszer érintő tüneteket magyarázhatja (Liddle, 2018), de alvászavarok, kóros fáradékonyság is jellemző (Kim és Jeon, 2014).

A hangulatszabályozással kapcsolatba hozható területek közül ismert a VTA (Brichta és Greengard, 2014), LC (Gesi és mtsai., 2000), és a DR érintettsége (Borgonovo és mtsai., 2017) PD-ban. Kézenfekvő, hogy ezek a területek hozzájárulhatnak a neurodegeneratív folyamathoz társuló hangulatzavarhoz. A károsodott agyterületek listáján szerepel az Edinger-Westphal mag (Goedert és mtsai., 2001) is. Már egy 1985-ben megjelent vizsgálatban 54%-os neuronpusztulást találtak az EW mag rostralis részén, és a sejtek 3%-ában Lewy testeket írtak le a PD-ban elhunytak mintáiban (Hunter, 1985). További vizsgálatokat akkor és azóta sem végeztek e megállapítások jelentőségének feltárása érdekében. A klasszikus értelemben vett Edinger-Westphal mag, belső szemizmokat érintő szabályozó funkciójából kiindulva, PD-ban a pupillomotoros és akkomodációs zavarokat várnánk. Ezzel ellentétben, Parkinson-kórban nem jellemző a pupillomotoros funkciózavar és nem jár együtt az akkomodáció gyakoribb vagy jelentősebb mértékű gyengeségével sem (Stanković és mtsai., 2019). Ez alapján fogalmazódott meg bennünk az a feltételezés, hogy az 1985-ben Hunter által felfedezett neurodegeneráció az EW területén nem az EW preganglionáris, kolinerg divízióját, hanem a később definiált (Kozicz és mtsai., 2011a) peptiderg, UCN1 tartalmú EWcp neuroncsoportot érintheti, és ennek hatása ilyen módon nem a szemműködés zavarában, hanem a PD nem motoros, a hangulati állapotot érintő tüneteiben, mint a depresszió és szorongás nyilvánulhat meg. Ennek a feltételezésnek a vizsgálatára patkányban szisztémás rotenon kezeléssel PD-szerű állapotot idéztünk elő, és lokális szelektív neuron ablációt is végeztünk az EWcp területén, hogy megvizsgáltuk milyen hangulati, mozgáskoordinációs változások lépnek fel, és ez miként állítható párhuzamba a neurodegeneratív és neuroinflammatorikus változásokkal (Ujvári és mtsai., 2022).

### 3. Célkitűzések és hipotézisek

Az eddigiekben felvázolt tudományos problémákat öt fő témakörbe csoportosíthatjuk. A kérdések megválaszolása érdekében az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg a disszertáció alapját képező projektjeinkben. Az áttekinthetőség kedvéért, az Eredmények és Diskusszió fejezetben is az alábbi fő- és altémakörök szerinti felosztást követem.

#### **I. Az akut és krónikus stresszadaptáció valamint, a krónikus stressz, mint depresszió modell vizsgálata génmódosított egértörzsekben**

##### I.1. PACAP génkiütött egerek viselkedésének és akut stresszadaptációjának vizsgálata

Saját előkísérletes megfigyeléseink és irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy a PACAP moduláló hatással bír az állatok viselkedésére és a stresszadaptáció központok neuronális aktivitására. Hipotézisünk vizsgálatára PACAP KO és WT egereket vetettünk alá viselkedési teszteknek (OFT, LDT, MBT, FST). A FST kivitelezése után az agyban neuronális aktivitás térképezést végeztünk a FOS fehérje, mint azonnali génaktivációs marker immunjelölése útján, a BNSTdl, BNSTdm, BNSTov, BNSTv, CeA, BLA, MeA a PVNp és magnocelluláris PVN (PVNm); a ventralis (vLS) és dorsalis (dLS) septum laterale, a dorsalis (dPAG) és lateralis (lPAG) periaqueductalis szürkeállomány valamint, az EWcp-t és a DR-t területén.

##### I.2. PACAP génkiütött egerek viselkedésének és krónikus stresszadaptációjának vizsgálata

Az I.1. célkitűzés megvalósítása során nyilvánvalóvá vált, hogy a PACAP hiány befolyásolja a stresszadaptációt az akut modellben, ezért azt feltételeztük, hogy a krónikus stresszadaptáció is érintett. A CVMS modellt alkalmaztuk és antidepresszáns-kezelés hatását is teszteltük. A modell validitását FST, továbbá fizikai (test- és mellékvesetömeg) és endokrinológiai (CORT) paraméterek segítségével igazoltuk. A CVMS hatásának vizsgálatára a krónikus neuronális aktivációt jelző FOSB markert jelöltük az akut modellben vizsgált területeken, de vizsgálatunkat ezúttal kiterjesztettük a hippocampus CA1, CA3 és DG területeire is, majd szemikvantitatív kettős jelölések segítségével vizsgáltuk a BNSTov/CRH, EWcp/UCN1, illetve a DR/5HT rendszerek működését.

##### I.3. TRPA1 génkiütött egerek viselkedésének és az EWcp krónikus stresszadaptációban fellépő funkcionális-morfológiai változásainak vizsgálata

Kollaborációs munkánk részeként végzett előkísérletek és az Allen Brain Atlas adatbázisban végzett keresés során úgy látszott, hogy a TRPA1 fehérje mRNS-e a központi idegrendszer területén meglehetősen limitált régiókban van jelen és csekély az mRNS expressziójának

mértéke. Kivétel ez alól csupán az EWcp volt, ahol viszonylag erős *Trpa1* mRNS expressziót találtunk. Mivel korábbi munkáink során láttuk az EWcp hangulatszabályozásban vitt fontos szerepét, azt feltételeztük, hogy a TRPA1 hiánya megváltozott stresszadaptációt okoz, illetve, hogy az EWcp CVMS modellben mutatott funkcionális-morfológiai változásai a TRPA1 hiányában megváltoznak. Hogy eredményeink translációs értékét is meg tudjuk ítélni, öngyilkos egének EWcp mintáit is vizsgáltuk azzal a feltételezéssel, hogy a *TRPA1* mRNS mennyisége a hangulatzavarban szenvedett elhunytaknál kisebbnek bizonyul.

## II. A három találat elmélet egérmódeljének kifejlesztése és validálása

### II.1. A PACAP génmódosított egértörzs a három találat elmélet modelljében

A genetikai predispozíció és a krónikus stresszhatáson túl, maternális depriváció hatását is vizsgáltuk, hogy így létrehozzuk a három találat egérmódeljét. Első lépésben azt a célt tűztük ki, hogy kialakítsuk, és a Willner-féle kritériumok szerint teszteljük a három találat elmélet konstrukciós és fenomenológiai validitását. PACAP HZ pároktól származó almokat (1. találat, genetikai predispozíció) maternális deprivációnak (2. találat, epigenetikai hatású korai averzív életesemény) tettünk ki, majd a felnőtt utódokat CVMS modellnek is alávetettük (3. találat, környezeti stressz), megfelelő kontrollok mellett. Azt feltételeztük, hogy azok az egerek, amelyek mindhárom rizikófaktort hordozzák, a máladaptáció fizikai, endokrinológiai, viselkedési és funkcionális-morfológiai jegyeit hordozzák.

### II.2. A három találat elméleten alapuló modell prediktív validitásának vizsgálata PACAP HZ egerek segítségével

Második lépésben PACAP HZ kölyköket ismét maternális deprivációnak és később CVMS-nek tettünk ki, és fluoxetin kezelés segítségével megkíséreltük visszafordítani a depressziószerű állapotot, hogy így a Willner-féle prediktív validitási kritériumot is megvizsgáljuk, és bizonyítsuk a modell megbízhatóságát. Itt is az első lépésben alkalmazott módszereket használtuk, kiterjesztve a vizsgálatokat a PFC, a hippocampus (CA1, CA3, és DG régiók), továbbá az előagy CRH-, a középagyi UCN1-t tartalmazó, a DR szerotoninerg és a VTA dopaminerg rendszereire, és megvizsgáltuk a neuronális aktivitási mintázatokat és az epigenetikai változásokat a három találat modellben. Azt feltételeztük, hogy a találatok, mint kockázati tényezők kölcsönhatásba lépnek egymással és a fluoxetin kezeléssel, amit a megváltozott CRH, UCN1, 5HT és TH immunreaktivitás, valamint H3 hiszton acetilációjának, és a FOSB/ $\Delta$ FOSB neuronális aktivitási mintázatának változása is tükröz.

### III. A stresszadaptáció életkorfüggő változásainak vizsgálata

#### III.1. Az akut stressz hatására fellépő FOS aktiváció életkorfüggő változásának vizsgálata

Néhány irodalmi adat arra utalt, hogy a FOS aktivációs marker kifejeződése akut restraint stressz (ARS) expozíciót követően függ az életkortól a stressz szabályozásában szerepet játszó agyterületeken. Nem találtunk azonban a teljes élettartamot felölelő tanulmányt az akut stresszre adott FOS válasz mértékéről patkányban. Ezért, azt a célt tűztük magunk elé, hogy nyolc korcsoportban (1; 1,5; 2; 3; 6; 12; 18 és 24 hónapos) teszteljük az ARS hatását a FOS immunreaktivásra és a HPA tengely működésére. Feltételezésünk az volt, hogy a HPA tengely és 12, a stresszadaptációban közreműködő kiválasztott agyterület (PVNp, PVNm, MeA, CeA, BLA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, BNSTv, BNSTfu, EWcp, DR) FOS immunreaktivása korfüggő dinamikát mutat. További célunk volt az elsődleges szomatoszenzoros kéreg (barrel cortex, S1) FOS expressziójának vizsgálata. Azt feltételeztük, hogy az S1 FOS válasz dinamikája eltér a stresszérzékeny régióktól.

#### III.2. A FOSB/ $\Delta$ FOSB korfüggő dinamikájának vizsgálata akut és krónikus stresszmodellben, patkányban

Nem találtunk az irodalomban olyan a teljes élettartamra kiterjedő szisztematikus vizsgálatot, amely leírta volna az ARS és CVMS által előidézett FOSB/ $\Delta$ FOSB választ. Ezért, azt a célt tűztük ki, hogy megvizsgáljuk ezt a stresszadaptáció és hangulatszabályozás szempontjából lényeges szerepet játszó területeken [MeA, BLA, CeA, BNSTdl, BNSTov, BNSTdm, BNSTv, BNSTfu, laterális (LHb) és mediális (MHb) habenula magok, PVN, EWcp, és DR]. Annak vizsgálatára, hogy a korfüggő változások specifikusak-e a stresszadaptációs központokra, az S1 területét is vizsgáltuk. Azt feltételeztük, hogy az ARS illetve CVMS következtében fellépő FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás-növekedés mértéke a korral agyterületspecifikus dinamikát mutat.

#### III.3. A CRH tartalmú idegsejtek akut és krónikus stresszben a korral változó aktivációs dinamikát mutatnak

Nyilvánvalóvá vált az ARS hatásának FOS térképezése során, hogy számos agyterületen a korral változik a FOS aktiváció mértéke. A korfüggést mutató agyterületek közé tartoztak CRH tartalmú területek is (PVN, BNSTov és CeA). Ennek alapján, azt a célt tűztük ki, hogy karakterizáljuk a CRH neuronok aktivitásmintázatát az életkor függvényében a fent részletezett nyolc korcsoportban a FOS és FOSB markerek segítségével. A CRH sejtek az akut, és a krónikus stresszadaptációban is fontos szerepet játszanak, így a kísérleti elrendezést a CVMS modellel 6 korcsoport bevonásával egészítettük ki. Feltételezésünk az volt, hogy a CRH



neuronok krónikus aktivációja ( $\Delta$ FOSB) életkor függő dinamikát mutat a PVN, BNSTov és CeA területén.

#### **IV. Az Edinger-Wespthal mag, mint a stresszadaptáció energetikájában szerepet játszó központ vizsgálata**

##### IV.1. A melanocortin 4 receptor jelentőségének vizsgálata az Edinger-Westphal magban

Mivel nem találtunk arra vonatkozó irodalmi adatot, hogy van-e kapcsolat a melanocortin rendszer és az EWcp peptiderg idegsejtjei között, azt a célt tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, van-e neuroanatómiai alapja annak, hogy funkcionális összefüggést keressünk e két rendszer között.

Azt feltételeztük, hogy alpha-MSH és AgRP ir idegrostok közelítik meg az EWcp/UCN1 sejtjeit, és ezek MC4R-t hordoznak. Második hipotézisünk az volt ebben a projektben, hogy a táplálékmegevonás az EWcp/UCN1 neuronok FOSB immunreaktivitását és a sejtek körüli terminálisok alpha-MSH és AgRP tartalmát megváltoztatja. Harmadszor, azt feltételeztük, hogy az EWcp-be injektált exogén alpha-MSH befolyásolja az UCN1 neuronok működésén túl a táplálékfelvételt, az alapanyagcserét és a testhőmérsékletet, és hogy ezek a változások a MC4R antagonista, HS024 kezeléssel visszafordíthatók.

##### IV.2. A leptin hatásának vizsgálata EWcp működésére

Annak tesztelésére, hogy az EWcp kap-e információt a hozzáférhető energiaraktárakról és hogy van-e efferens kapcsolat a mag és a fehér zsírszövet között, azt a célt tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, képes-e a leptin kötődni az EWcp sejtjeihez, és hogy megindul-e a leptin receptorról a jelátvitel a másodlagos hírvivőkön keresztül. További célunk volt, hogy pályajelölés útján kapcsolatot találjunk az EWcp és a zsírszövet között, és hogy megvizsgáljuk, miként hat az EWcp neuronjainak szelektív ablációjára a zsírszövetre és a metabolikus paraméterekre.

Azt feltételeztük, hogy a leptin kötődése az EWcp neuronjaiban aktiválja a JAK2-STAT3, MAPK/ERK, és PI3K/AKT útvonalakat, és megváltoztatja az *Ucn1* mRNS expresszióját. Pályajelöléses vizsgálatunk hipotézise az volt, hogy a szimpatikus idegrendszeren keresztül áll az EWcp összeköttetésben a fehér zsírszövettel. Amennyiben ez a kapcsolat valóban fennáll, adódik az a feltételezés, hogy a mag irtása a zsírszövet szabályozásában változásokat okoz, mely a főbb energetikai paraméterek tekintetében (zsírtartalékok, oxigénfogyasztás, széndioxid termelés, légzési hányados) változásokat kell, hogy okozzon.

## **V. Az EWcp szerepének vizsgálata a Parkinson-kórhoz kapcsolódó hangulatzavarokban**

### **V.1. Az EWcp érintettségének vizsgálata a PD rotenon modelljében, patkányban**

Szisztémás rotenon kezeléssel PD-szerű állapotot idéztünk elő patkányokban, hogy megvizsgáljuk, fellépnek-e a SNpc területén jellemző változások az EWcp területén is. Azt feltételeztük, hogy a rotenon az SNpc mellett elsősorban az EWcp neuronjainak károsodásával és a magban létrejövő gyulladási elváltozásokkal járhat együtt, mely kapcsolatban áll a PD nem motoros tüneteinek tekintett szorongás és depressziószerű állapot megjelenésével.

Annak indirekt bizonyítására, hogy az EWcp játszik fontos szerepet a hangulatzavarban, több egyéb, a hangulatszabályozásban involvált agyterületet is megvizsgáltunk, mert azt feltételeztük, hogy egyéb területen nem lép fel jelentős változás, amennyiben az EWcp játssza a főszerepet ezekben a hangulatzavarokban.

### **V.2. Szelektív EWcp/UCN1 neuron abláció hatása a hangulati állapotra patkányban**

Annak érdekében, hogy direkt módon is bizonyítsuk az EWcp/UCN1 neuronjainak szerepét a nem motoros tünetek létrejöttében, szelektív lokális neuronablációt végeztünk. Azt feltételeztük, hogy a leptin konjugált szaporin a motoros tünetek megjelenése nélkül depressziószerű állapotot és szorongást idéz elő az EWcp/UCN1 sejtjeinek károsítása útján.

## 4. Módszerek

### 4.1. Kísérleti állatok

A disszertáció alapját képező kutatások állatkísérletes részét kétféle génmódosított házi egér (*Mus musculus*) törzsön és a Wistar törzsbe tartozó vándorpatkányokon (*Rattus norvegicus*) végeztük.

#### 4.1.1. Egerek

Mindkét egértörzs a Pécsi Tudományegyetem (PTE) Anatómiai Intézetének és Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének tenyészetéből származott.

##### 4.1.1.1. PACAP KO törzs

Az PACAP KO állatok heterozigóta tenyészegyedeit Prof. Hitoshi Hashimoto munkacsoportja (Hashimoto és mtsai., 2006) állította elő CD1 törzsben. Az akut és a krónikus stresszadaptáció vizsgálatához KO és vad egerek pároztatása útján egy heterozigóta generációt hoztunk létre, majd PACAP heterozigóta nőstény egeret pároztattunk heterozigóta hímekkel. Krónikus kísérleteinkhez és a három találat elmélet modellezéséhez minden esetben egy 36 órás perióduson belül született almok egyedeit használtuk fel, genotipizálás után. A kísérleteket PTE Munkahelyi Állatetikai Bizottság és az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács támogatta és Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal engedélyezte (Engedélyszámok: BA 02/2000-11-2006, BA 02/2000-25/2011, BA 02/2000-39/2016).

##### 4.1.1.2. TRPA1 KO törzs

A TRPA1 KO egértörzset (Bautista és mtsai., 2006) C57BL/6J alapon tenyésztettük PACAP KO törzsnél leírtakhoz hasonlóan. A krónikus stresszadaptáció vizsgálatához 32db hím TRPA1 KO és WT állatot választottunk ki random módon, csoportonként 4-5 alomból (Engedélyszám: BA02/2000-33/2018).

#### 4.1.2. Patkányok

A patkányok a PTE ÁOK Anatómiai Intézetének Wistar tenyészetéből származtak. A stresszadaptáció életkorfüggésének vizsgálatára 1, 1,5, 2, 3, 6, 12, 18 és 24 hónapos hím Wistar patkányokat használtunk fel, melyeket ARS-nek vagy CVMS-nek tettünk ki, kontrollokkal szemben (engedély száma: BA02/2000-25/2011). Az EWcp energiaegyensúly szabályozásában betöltött szerepének vizsgálatába 3-5 hónapos patkányokat vontunk be (engedélyszámok: BA 02/2000-11/2011, BA 02/2000-25/2011, BA02/2000-26/2011, BA02/2000-22/2017). A

Parkinson-kór rotenon modelljében 11 hónapos, a lokális neuron abláció hatásának vizsgálata során 4 hónapos Wistar patkányokat használtunk (BA02/2000-49/2017).

#### **4.2. Emberből származó agyszövetminták**

A vizsgálatainkban használt, az EWcp-t is magában foglaló ventrális PAG-ból eltávolított emberi mikrodisszekciós szövethengerek a Semmelweis Egyetem Humán Agyszövet Bankjából származtak, olyan egyénekből, akik öngyilkosság következtében vagy gyors lefolyású akut betegségben hunytak el és nem szenvedtek a hangulatzavaron túl központi idegrendszeri kórállapottól (Etikai engedélyszámok: ETT-TUKEB 5912-2/2018/EKU; 55699-2/2017/EKU; 2446-2/2016/EKU).

#### **4.3. Stressz modellek**

##### 4.3.1. Forced swim teszt, mint akut stressz, egérben

Az akut stressz hatását a PACAP KO egerek esetében a viszonylag erős stresszorként is ismert viselkedési tesztben értékeltük. A FST (ld. alább) után 2 órával terminált állatok agymintáin vizsgáltuk, olyan kézhez szoktatott kontroll állatokkal szemben, melyeket nem tettünk ki a FST-nek.

##### 4.3.2. Akut restraint stressz patkányban

Az állatokat általunk készített, perforált, kónuszos, műanyag hengerbe helyeztük 1 órára, melynek méretét úgy választottuk ki, hogy az állat ne tudjon a csőben megfordulni. Egy óra elteltével az állatokat kivettük a restrainer-ből és visszahelyeztük saját ketrecükbe további egy órára, majd perfundáltuk őket.

##### 4.3.3. Krónikus variábilis enyhe stressz egérben és patkányban

A CVMS modellt (Willner, 2005) a patkányok és a PACAP KO állatok esetében 2 hétig, a TRPA1 KO állatok vizsgálatánál 3 hétig alkalmaztuk. A CVMS paradigma egy napközbeni random módon kiválasztott rövid időtartamú (döntött ketrecállás, sötét szoba, rázógép vagy rövid időtartamú restraint stressz) és egy hosszabb éjszakai stresszorból (megnedvesített forgácsalom, szociális izoláció) állt. Utóbbi esetében random módon beiktattunk stresszmentes éjjeleket is, ahol az állatokat nem izoláltuk és egyéb módon sem stresszeltük (group holding). Az állatok testtömegváltozását a stresszperiódus során rendszeresen regisztráltuk. A viselkedési teszteket (ld. alább) nappali stresszorként beillesztettük a CVMS modellbe. A kontroll állatokat, hogy a tesztelés rövidtávú stresszhatása ne befolyásolja az eredményeket, 10-14 nappal a leölés

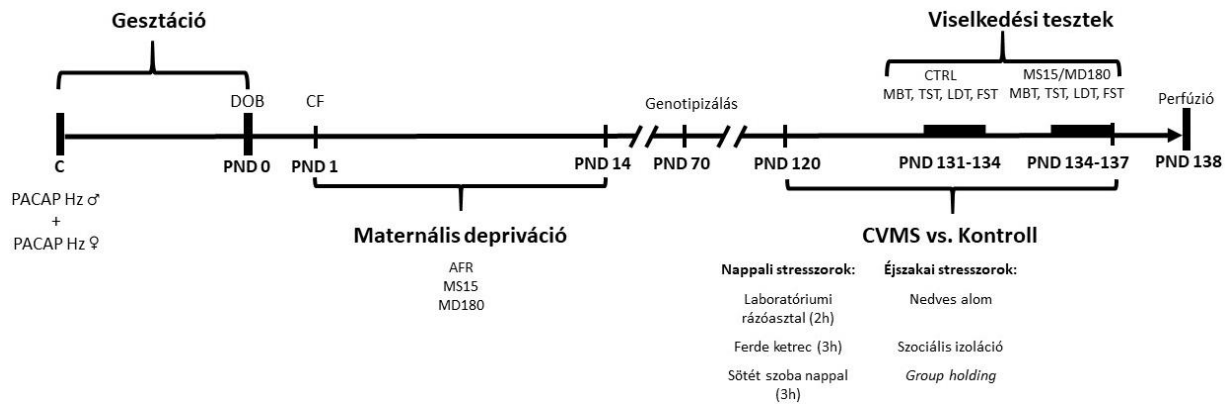
előtt teszteltük. A PACAP KO állatok CVMS adaptációját a triciklikus antidepresszáns imipraminnal kezelt csoportokban is megvizsgáltuk. Ebben a kísérletben, az injekciós kezelés, mint stresszor is szerepet játszhatott a hangulati állapot alakításában. Ezért, az injekciós kezelésben nem részesült (nem kezelt) csoportok és a naponta injekciózásnak alávetett egerekből származó adathalmazokat külön értékeltük, a 4.1. táblázat szerint.

Nem kezelt (1. adatsor)				Kezelt (2. adatsor)							
Kontroll		CVMS		Kontroll				CVMS			
Nem történt injekciós kezelés				Oldószer injekció		Imipramin injekció		Oldószer injekció		Imipramin injekció	
WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO
n=6	n=5	n=6	n=5	n=6	n=5	n=4	n=6	n=5	n=4	n=6	n=5

**4.1. táblázat.** Kísérleti elrendezés a PACAP KO állatok vizsgálatára a krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) modellben. Az injekciós kezelésnek ki nem tett csoportok (1. adatsor) és az intraperitoneális injekciókkal kezelt csoport eredményeit (2. adatsor), külön értékeltük.

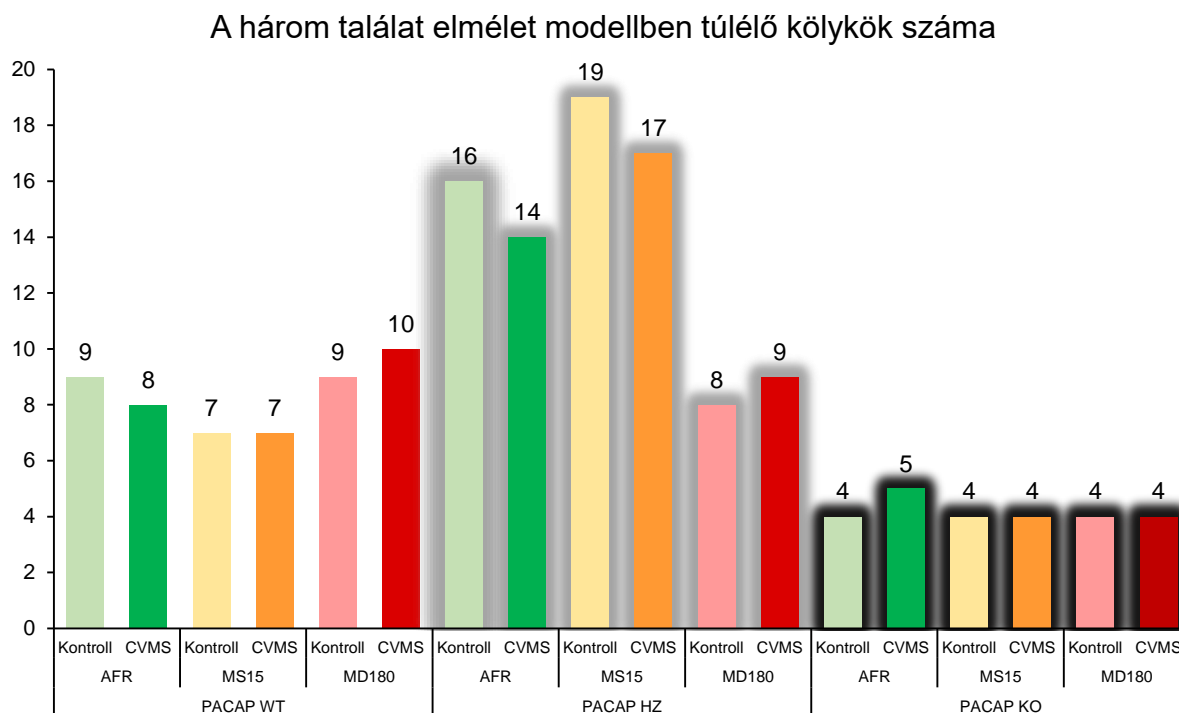
4.3.4. Maternális depriváció a három találat elmélet modell részeként, a konstrukciós és fenomenológiai validitás tesztelésére

Első lépésben hetven PACAP HZ nőstény egeret pároztattunk PACAP HZ hímekkel. A kísérletben 37 olyan almot használtunk fel, amelyek egy 36 órás időintervallumon belül születtek. Az első posztnatális napon (PND 1) az alomkülönbségeket megszüntetendő összekevertük a kölyköket, majd random módon visszaosztottuk az anyákhoz (crossfostering) (4.1. ábra). Az anyai gondoskodás minősége alapján három főcsoportot alakítottunk ki: 12 almot a standard állatházi protokoll által előírt körülmények között tartottunk (animal facility rearing, AFR); 12 almot a PND 1-14 között naponta rövid időre (15 perc) szeparáltunk az anyjuktól (MS15). 13 alom esetében ugyanezekben a napokon 180 percre távolítottuk el az anyát az alomból, ezzel súlyos maternális deprivációt okozva (MD180). Az anyjuktól átmenetileg elszeparált almokat egy 32°C-ra beállított melegítőlapra helyeztük.



**4.1. ábra.** A három találat elmélet modell kísérleti elrendezése. PACAP heterozigóta egereket pároztattunk (C - conceptio). A születés napját (DOB) a születés utáni nulladik napként (PND) határoztuk meg. Az 1. PND-n történt a crossfostering (CF). A PND1 és PND14 között 15 perces anyai szeparációt (MS15) vagy 180 perces anyai deprivációt (MD180) alkalmaztunk. A harmadik csoportot háborítatlanul hagytuk (animal facility rearing, AFR). A PND70-en a genotipizáláshoz farokszövetmintát vettünk. A PND120-on az AFR, MS15 és MD180 csoportok hím állatait krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) és a kontroll csoportokba osztottuk. A CVMS a felsorolt nappali és éjszakai stresszorokból állt, melyeket random módon váltogattunk. A kontroll (CTRL) csoportokat a PND131 és a PND134 között viselkedési teszteknek vetettük alá (naponta egy teszt): marble burying teszt (MBT), tail suspension teszt (TST), light-dark box teszt (LDT) és forced swim teszt (FST). Ugyanezeket a teszteket a CVMS csoportokban a PND134 és PND137 között végeztük, mint nappali stresszor. A PND138-on az állatokat elaltattuk és transzkardiálisan perfundáltuk (módosítva, Farkas és mtsai., 2016 alapján).

A leválasztás után csak hím utódokkal (AFR: n=56; MS15: n=58; MD180: n=44) dolgoztunk tovább és felnőtt korukban kontroll, illetve CVMS csoportot hoztunk létre. Végül, figyelembe véve az anyai gondoskodás minőségét, a stressztényezőt és a genotípust, melyet farokmintákból határoztunk meg polimeráz láncreakcióval (PCR), összesen 18 egércsoport jött létre, melyek négy-tizenkilenc alanyból álltak (4.2. ábra).



**4.2. ábra.** A három találat elmélet modelljében túlélő egerek száma. A genotipizálás alapján megállapítottuk, hogy PACAP KO egerek aránya (14.7%) alacsonyabb volt, mint azt a mendeli törvények (25%) alapján vártuk volna. Az MD180-nak kitett PACAP HZ egerek aránya is alacsonyabb volt, mint az AFR és MS15 csoportban. Ez arra utal, hogy a HZ egerek érzékenyebbek, de túlélési arányuk magasabb, mint a PACAP KO állatoké (módosítva, Farkas és mtsai., 2016 alapján).

A mendeli arányok és a PACAP KO egerek csökkent adaptációs képessége miatt a csoportméretet ebben a kísérletben minimálisan négy egérre korlátoztuk. Mivel a statisztikai tesztek érzékenyek a csoportméretek közti különbségekre, és mivel a morfológiai összehasonlításhoz 4-6 állat is elégséges lehet csoportonként, összesen kilencvennyolc egeret vontunk be a szövettani értékelésekbe a 4.2. táblázat szerint.

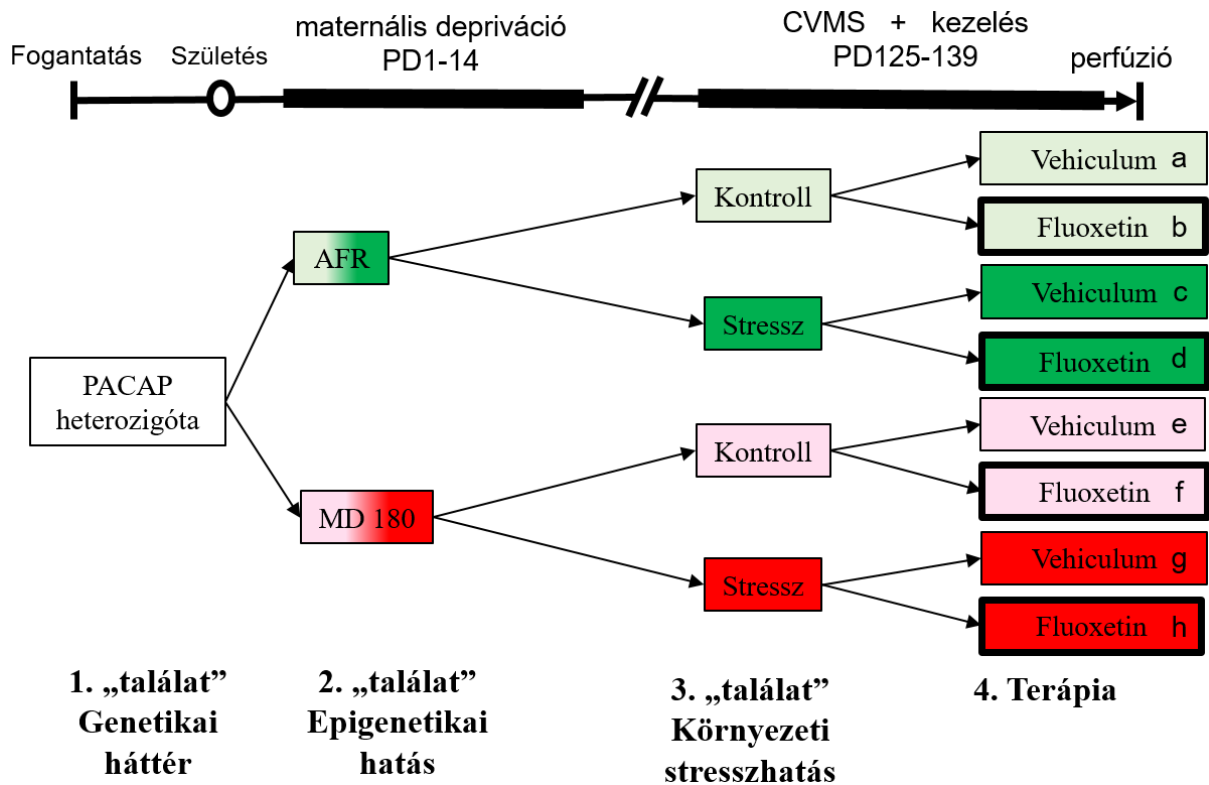
AFR						MS15						MD180					
KTRL			CVMS			KTRL			CVMS			KTRL			CVMS		
WT	HZ	KO	WT	HZ	KO	WT	HZ	KO	WT	HZ	KO	WT	HZ	KO	WT	HZ	KO
6	6	4	6	6	5	6	6	5	6	6	4	6	6	4	6	6	4

**4.2. táblázat.** Kísérleti elrendezés és a szövettani vizsgálatokba bevont elemszám, csoportonként. AFR: a normál állatházi protokoll szerint nevelt (animal facility rearing) állat (zöld háttér) MS: 15 perces anyai megvonásnak kitett (sárga háttér) és 3 órás anyai megvonásnak kitett (MD180, piros háttér) állatok. A sötét árnyalatok a krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) expozícióra utalnak a világos árnyalatú kontroll (KTRL) csoportokkal szemben. A szürke keret a PACAP heterozigóta (HZ), a fekete a PACAP KO csoportokat jelöli. (Módosítva, Farkas és mtsai., 2017 alapján.)

4.3.5. Maternális depriváció a három találat elmélet modell részeként, a modell prediktív validitásának tesztelésére

A fenti három találat modellben elvégzett projekt tapasztalatai alapján egy újabb kísérletet hajtottunk végre, melynek elrendezése hasonló volt, de ebben már csak a PACAP HZ genotípusú hím egerekkel dolgoztunk tovább a 4.3. ábra szerint. A kísérleti elrendezést kiegészítettük azzal, hogy az állatok felét fluoxetin terápiának vetettük alá, hogy megvizsgáljuk, visszafordíthatók-e a három rizikófaktor együttes megjelenése esetén kialakuló változások. Ezzel a modell prediktív validitását szeretnénk volna kimutatni.





**4.3. ábra.** Kísérleti elrendezés a három találat elmélet modell prediktív validitásának tesztelésére. Fent az *in vivo* kísérlet idővonala látható. Az ezen az ábrán használatos betűjelölést (a-h) és a színek az *Eredmények* fejezet 5.25-5.34. ábráin következetesen használjuk, a könnyebb átláthatóság érdekében. Zöld háttér: normál állatházi körülmények között tartott (AFR), piros háttér: napi háromórás anyai megvonáson átesett (MD180) csoportok. Ezekben belül, a sötétebb árnyalat a krónikus variábilis enyhe stresszt (CVMS) elszenvedett, a világosabb árnyalat a krónikus stressznek ki nem tett, kontroll állatok csoportjaira utal. A vastag fekete keret a fluoxetin kezelést jelképezi, a vivőanyagot kapott állatokkal szemben. PND: születés utáni nap (módosítva, Gaszner és mtsai., 2022a alapján).

#### 4.4. Viselkedési és mozgáskoordinációs tesztek

##### 4.4.1. Light-dark box teszt

A LDT-et egy 40x20x27 cm-es doboz segítségével végeztük, melyet egy 7x7 cm-es nyílással ellátott, átlátszatlan fal választott el két egyenlő méretű részre. A doboz egyik oldala fehérre volt festve és 100 W-os lámpával világítottuk meg, míg a másik rekesz fekete falú és sötét volt (Crawley és Goodwin, 1980). Az egereket arccal a nyílás felé a megvilágított rekeszbe helyeztük, és 5 percig videokamerával rögzítettük viselkedésüket. A világos területen töltött időt mértük, mely fordítottan arányos a szorongási szinttel, ahogy a világos kompartmentbe történő megszakított átlépések és az oda történő kitekintések is erre utalnak.

#### 4.4.2. Marble burying teszt

Az állatokat egyenként ketrecekbe (30x30x28 cm) helyeztük, amelyekbe előzőleg 24 db színes, 15 mm átmérőjű üveggolyót tettünk a friss, 4 cm vastagságú forgácsalom tetejére. Az egereknek 30 perc állt rendelkezésére, hogy bejárják a ketrecet az üveggolyókkal. Az állatok szorongásszintjének meghatározására az elrejtett (azaz legalább 2/3 részükig az alomba temetett) golyók számát rögzítettük (Njung'e és Handley, 1991).

#### 4.4.3. Open field teszt

Az OFT segítségével a rágcsálók motoros aktivitását és szorongási szintjét tudjuk megítélni. Az állat egy homogén megvilágítású dobozt (50 x 50 x 25 cm) explorál 5 percig, melyet egy négyzetháló centrális és fal melletti régiókra oszt. A felvételek kiértékelése Smart Junior Tracking Programmal (PanLab, Barcelona, Spanyolország) történt, és a megtett út hosszát, sebességét, valamint a fal mellett eltöltött időtartamot értékeltük. Előbbi az állat motoros aktivitásáról ad információt, utóbbi a szorongás mértékét mutatja (Kudryavtseva és mtsai., 1991).

#### 4.4.4. Tail suspension teszt

Az egereket 6 percre 50 cm-rel egy asztallap felett a farkuknál fogva ragasztószalag segítségével felfüggesztettük. Mozgásukról videófelvétel készült, és a teszt utolsó 4 percében a mozdulatlanul töltött (immobilitási) időt értékeltük (Steru és mtsai., 1985).

#### 4.4.5. Forced swim teszt

A vizsgálat a Porsolt és mtsai. (1977) által kidolgozott, de Ghasemi és mtsai. (2009) által módosított protokollja szerint történt. Az egereket 11,5 cm átmérőjű, 25 cm magas üveghengerekbe helyeztük, melyeket előzőleg 23 °C-os csapvízzel töltöttünk fel 19 cm-ig. Az immobilitási időt a 6 perces felvételek utolsó 4 percében értékeltük, mely arányos a depresszió szinttel.

#### 4.4.6. Cukorpreferencia teszt

A SPT az állatok anhedónia szintjére enged következtetni (Willner és mtsai., 1987). A teszt előtti szoktatás alatt (48 óra) a csapvíz mellé 1 m/v%-os szacharózzal töltött itatósüveget helyeztünk. A teszt napján folyadékmegegyeztetést alkalmaztunk. A teszteléskor az aktív periódus elején az állatok ismét két itatót kaptak répacukoroldattal, ill. csapvízzel töltve, 3 órára. Az

elfogyasztott oldatok tömegét regisztráltuk és a cukorpreferencia értékét az alábbi képlet szerint számoltuk: cukorpreferencia (%) =  $100 \times (\text{szacharóz oldat} / \text{a teljes folyadékfogyasztás})$ .

#### 4.4.7. Rotarod performance teszt

A RPT segítségével az állatok mozgáskoordinációját vizsgáltuk. A rotarod eszköz egy gyorsuló forgást végző hengerből áll (47750, Ugo Basile, Gemonio, Olaszország). Az állatoknak a méréseket megelőzően megtanítottuk, hogyan tudnak az eszközön fennmaradni. A tengely forgásának sebessége 30 másodpercenként nő, 5 percig. Az eszköz azt az időtartamot regisztrálja, amíg az állat a mozgó hengeren képes fennmaradni (Zhang és mtsai., 2017).

### 4.5. A Parkinson-kór rotenon modellje

A rotenon szélesspektrumú lipofil rovarölőszer. A mitochondrium-okban az elektrontranszport lánc gátlása útján, a komplex I és az ubiquinon között történő elektronátvitelt gátolja, és ATP hiányt okoz. A felhalmozódó reaktív oxigén szabadgyökök mitochondrium és sejtkárosodást, végül apoptózist okoznak. A PD tüneteinek állatkísérletes kialakítására azért előnyös az alkalmazása egyéb modellekkel szemben, mert produkálja a PD-ra jellemző szövettani elváltozásokat (Blesa és mtsai., 2014). A patkányok 6 héten át szubkután 1,5 mg/kg/nap rotenont (R8875-1G, Sigma) kaptak, napraforgóolaj és dimetil-szulfoxid vivőanyagban, azonos mennyiségű oldószerrel injektált kontrollokkal szemben.

### 4.6. Műtétek

#### 4.6.1. Célzott neuron abláció leptin-szaporin segítségével

A szaporin egy riboszóma inaktivációt okozó stabil fehérje, mely önmagában nem képes átlépni az idegsejtek membránján, de megfelelő receptorligandumhoz konjugálva, receptormediált endocitózis révén a citoplazmába kerül, és apoptózist okoz (Wiley és mtsai., 2000). Korábbi eredményeink alapján tudtuk, hogy az EWcp urocortinerg neuronjainak közel 50%-a leptin receptort hordoz (Xu és mtsai., 2011), de egyéb sejtek a közelebbi anatómiai régióban nem expresszálják azt. Ezt használtuk ki az EWcp/UCN1 sejtek célzott, szelektív ablációjára leptin konjugált szaporin (#KIT-47, ATS INC, Carlsbad, CA, USA) segítségével. Intraperitoneális (ip) ketamin (78 mg/kg) xylazin (13 mg/kg) altatásban az állatok fejét sztereotaxiás eszközbe fogattuk, és a Bregmától 1,5 mm-rel balra, 4,8 mm-rel caudalis irányban egy kb. 3x3 mm-es ablakot nyitottunk a koponyán. Ettől a ponttól kiindulva, a középvonallal 19°-os szöveget bezárva, Hamilton tű segítségével a dura mater felszínétől 5,8 mm-re 0,08 µl leptin konjugált szaporint vagy konjugálatlan szaporin (n=16) oldatot injektáltunk az EWcp területére. Az injekció

beadása után a tűt 1 percig a helyén hagytuk, majd lassan 0,5 mm-rel feljebb húztuk, és újabb 1 perc elteltével eltávolítottuk, végül, a bőrt csomós öltésekkel zártuk.

#### 4.6.2. Krónikus intracerebrális kanül implantáció

Az EWcp energiaegyensúly szabályozásban vitt szerepének vizsgálata kapcsán a lokális intracerebrális injekciók beadásának stresszhatását minimalizálendő, krónikus vezetőkanült ültettünk be a mag fölé. A műtéti technika megegyezett a leptin-szaporin kezeléssel leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy a koponyába csavarokat is behelyeztünk, és ezekhez fogászati cement segítségével rögzítettük a vezetőkanült, melybe az injekciózáskor bevezettük a tűt (Pétervári és mtsai., 2010). A kanül manipulálásához az állatokat hozzászoktattuk.

#### 4.6.3. Retrográd transzneurális vírus jelölés

Altatott patkányokon medián hasi metszésből az epididymalis zsírt látótérbe hoztuk, és 5 helyre szétosztva 2 µl Ba-DupGreen (BDG) vírust (Dr. Boldogkői Zsolt, Szegedi Tudományegyetem) injektáltunk, mely zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) fejez ki humán citomegalovírus (CMV) promóter segítségével. A hasfalat ezután rétegesen zártuk, majd 5 nap múlva az állatokat perfundáltuk.

#### 4.6.4. Leptin kezelés

Altatott patkányok ip rekombináns leptin (3 mg/kg steril PBS-ben, Dr. A.F. Parlow, Los Angeles, CA, USA) vagy ip oldószer injekciót kaptak, majd 0, 1, 2 vagy 4 óra elteltével túlaltatásban perfundáltuk őket.

### 4.7. Metabolikus és hőszabályozási mérések

Az anyagcsere-méréseket az Oxymax indirekt kaloriméterrendszer (Balaskó és mtsai., 2010) metabolikus kamráiban végeztük, melyekhez a patkányokat előzőleg hozzászoktattuk. A vizsgálatok során a nyugalmi oxigénfogyasztást ( $VO_2$ ) rögzítettük. Termoelemeket használtunk a colon-ban mérhető maghőmérséklet ( $T_c$ ) és a farokbőr hőmérsékletének ( $T_s$ ) egyidejű regisztrálására. A  $VO_2$ -t ( $O_2$  ml/kg/perc) 10 perces időközönként regisztráltuk 3 órán keresztül a következő anyagok 1 µl volumenben történő, EWcp-be injektálását követően: pirogénmentes oldószer (PFS) kontroll, alpha-MSH (1 µg) vagy HS024 (1 µg) vagy alpha-MSH (1 µg) és HS024 (1 µg) koktélja.

Az EWcp/UCN1 neuron abláció hatásának vizsgálatokor a műtét előtt egy 5 napos időtartamú kontroll vizsgálat történt, majd a műtét után 1, 3 és 5 héttel mértük az  $VO_2$ -t és a  $CO_2$  termelést

10 perces időközönként és ez alapján a 12 órás nappali és éjszakai átlagértékek felhasználásával a légzési hányadost (RQ) számoltuk ki. A testtömeget és a táplálékfogyasztást is naponta mértük.

Az alpha-MSH beadás anorexigén hatásának vizsgálatára a Feed-Scale rendszer (Columbus, OH) segítségével vizsgáltuk, porított táp segítségével. Első lépésben a 24 órás kumulatív táplálékfelvételt mértük alpha-MSH vagy PFS injekció után. Második lépésben, 48 órás éhezés után, 3 órás újratáplálási időszakban mértük az EWcp-be injektált alpha-MSH hatását a táplálékfelvételre.

#### **4.8. Szövetmintagyűjtés**

Az *in vivo* kísérletek végén az állatokat ip uretán (2,4g/kg) vagy nátrium-pentobarbitál (100mg/kg) segítségével elaltattuk. A mellkas és a szív megnyitása után vérmintát vettünk, majd transzkardiális perfúziót végeztünk. Patkányoknál 50 ml, egérnél 25ml 0,1M nátrium-foszfát pufferelt fiziológiás sóoldattal (PBS, pH=7,4), majd patkánynál 250ml, egérnél 100ml 4%-os paraformaldehid oldattal (Millonig pufferben) történt a perfúzió. Az állatok agyát eltávolítottuk, utófixáltuk és a metszésig 4°C-on tároltuk. Egyes projekteknél a mellékvesét, a thymust, az inguinális és epididymális fehér, és az interscapuláris barna zsírszövetet is eltávolítottuk, tömegüket Sartorius precíziós mérleggel lemértük, és további vizsgálatok céljából tároltuk. Néhány kísérletben a zsírszöveti mintákat a perfúzió előtt kipreparáltuk, tömegmérés után elfeleztük, egyik darabjukat PCR vizsgálatokhoz fagyasztva tároltuk, másik részüket immerziós fixálásnak vetettük alá. Egyes esetekben az állatokat dekapitáltuk és a szövetmintákat gyors preparálás után szárazjégen fagyasztottuk későbbi RNS izolálás céljára.

A vérmintákat a perfúzió előtt szívpunkció útján nyertük, vagy a dekapitáció után gyűjtöttük, alvadásban gátoltuk, centrifugáltuk, és a plazmát további vizsgálatig fagyasztva tároltuk. A vérszírprofil és plazma leptin koncentráció meghatározása a klinikai gyakorlatban használt automata rendszerrel történt a Radboud Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében.

#### **4.9. Metszés**

A morfometriai vizsgálatokhoz Leica VT1000 S vibratom (Leica Biosystems, Wetzlar, Németország) segítségével a fixált agyakból free floating technikával 30µm-es koronális metszeteket készítettünk, majd azokat rövidtávon 0,01%-os nátrium-azidot tartalmazó PBS oldatban 4°C-on, hosszabb időre -20°C-on anti-freeze oldatban tároltuk. Az egér agyakból 5, a patkány agyakból 6 reprezentatív sorozatot gyűjtöttünk. Egyes térképezésekhez (pl. FOS,

FOSB festések) a teljes agyat reprezentáló sorozatokat festettünk meg. Egyéb esetekben, a vizsgálni kívánt agyterületek reprezentatív metszeteit manuálisan válogattuk ki a Paxinos és Watson (2007) illetve Paxinos és Franklin (2001) atlaszok alapján.

A minták egy részét a rutin szövettani eljárásban alkalmazott protokoll alapján paraffinba ágyasztuk, és 5 $\mu$ m-es metszeteket készítettünk.

#### **4.10. Hematoxylin-eosin festés**

Xilolos deparaffinálás és leszálló alkoholsorral történő rehidrálás után standard hematoxylin-eosin festést végeztünk a zsírszöveti preparátumok egy részén.

#### **4.11. Free floating immunfestés diamino-benzidin kromogénnel**

A festésekhez kiválasztott metszeteket PBS-ben mostuk, 30 percig 0,5%-os Triton X-100 detergenssel kezeltük majd a 2%-os normál kecske szérumot (NGS, Jackson ImmunoResearch, Europe Ltd. Suffolk, Egyesült Királyság) használtunk 60 percig. Metszeteinket ezután a primer szérum megfelelően hígított oldatában (ld. F1. táblázat, a Függelékben) 16 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. PBS mosások után a metszeteket 60 percre biotinilált kecske anti-nyúl gammaglobulinnal (1:200, Vectastain ABC Elite Kit, Vector Labs. Burlingame, CA, Egyesült Államok) kezeltük. 2x15 perc PBS mosás után a metszeteket 60 percre torma-peroxidáz enzimmal konjugált avidin-biotin komplexszel (Vectastain ABC Elite Kit, Vector) inkubáltuk. Újabb PBS öblítést követően az immunreakciót 0,02 m/m% 3,3' diamino-benzidin (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) kromogént és 0,03 m/v% hidrogén-peroxidot tartalmazó Tris puffer (pH=7,4) oldatban hívtuk elő szemkontroll mellett, és a reakciót 7 perc elteltével PBS oldattal leállítottuk. A metszeteket zselatinos lemezre húztuk, szárítottuk, majd felszálló alkoholsorban dehidráltuk, 2x10 percig xilolban derítettük, végül Depex-szel (Fluka, Heidelberg, Németország) fedtük.

#### **4.12. Free floating egyes és többes immunfluoreszcens jelölések**

Metszeteinket 4x15 percig PBS-ben mostuk, majd 10 percig 90 °C-on nátrium-citrát pufferben (pH=6,0) feltártuk, 2x15 percig PBS-ben öblítettük, majd 0,5%-os Triton X-100 detergens kezeléssel permeabilizáltuk. A nem-specifikus kötőhelyek gátlására ebben az esetben 2%-os normál szamar szérumot használtunk (NDS, Jackson) 60 percig. A metszeteket a primer antitesteket tartalmazó oldatban (F1. táblázat) a festéstől függően 16 órán keresztül szobahőmérsékleten, vagy 48 órán át, 4°C-on inkubáltuk. 2x15 perc PBS-mosás után fluorofór-konjugált és/vagy biotinilált szekunder antitesteket (F2. táblázat) tartalmazó PBS oldatba

helyeztük a metszeteket festéstől függően 3 vagy 16 órára. A biotinnal jelölt szekunder antitestek detektálására sztreptavidin konjugált fluoreszcens festéket (F2. táblázat) alkalmaztunk (3 óra). Végül, 2x15 perc PBS mosás után a metszeteket zselatinos tárgylemezre húztuk, szobahőn szárítottuk, majd a PBS és glicerin egyenlő arányú keverékével fedtünk.

Az immunfestésekhez felhasznált antitestek specificitását ellenőriztük. Az elsődleges illetve másodlagos antiszérumok elhagyása vagy nem immunizált (normál) szérummal való helyettesítése nem eredményezett felismerhető immunjelölődést. A szintetikus blokkoló peptidekkel, amennyiben azok elérhetőek voltak, elvégeztük a preadszorpció kontrollt, és az után nem kaptunk detektálható jelet. A szérumokra vonatkozó referenciákat az F1. táblázat tartalmazza.

#### **4.13. Konvencionális free floating *in situ* hibridizáció**

Az *Ucn1* mRNS detektálására DIG-11-UTP-vel jelölt antiszenz és szenz (kontroll) RNS-próbákat használtunk. A metszeteket 0,1M bórax-pufferelt 4%-os PFA-ban fixáltuk 4°C-on, majd PBS-ben öblítettük. Steril MilliQ vizes (MQ) öblítés után 0,25%-os ecetsav-anhidriddel acetiláltuk a metszeteket 10 percig, majd öblítést követően kétszeres (2×) töménységű standard sóoldat-citrát pufferben (SSC; pH=7,0) inkubáltuk 5 percig. A hibridizációs mixet 0,5mg/ml tRNS-sel és az mRNS-digoxigenin (DIG) próbával (2,5 ng/ml) együtt 5 percre 80 °C-os vízfürdőbe, majd 5 percre jégre helyeztük. A metszeteket hibridizációs oldatban 16 órán át 60°C-on inkubáltuk. Ezt követően 4×7 perc 4× SSC öblítést végeztünk, ezután 30 percig 37°C-on előmelegített RNase A médiumban inkubáltunk, majd 30 percig 58°C-on, fokozatosan csökkenő koncentrációjú SSC oldatokban (2×, 1×, 0,5×, 0,1×) öblítettünk. A DIG jelölést alkalikus foszfatáz reakcióval mutattuk ki NBT/BCIP szubsztrát segítségével. 4×5 perces A puffer mosás után a metszeteket 0,5% blokkolószer (Roche) tartalmazó A pufferben 1 órán át előinkubáltuk, majd 3 órán át juh anti-DIG-AP-vel (Roche; 1:5000) inkubáltuk 0,5%-os blokkolószer tartalmazó A pufferben. Újabb, A puffer mosások után 2×5 percig B pufferben öblítettük a metszeteket, majd 16 órás NBT/BCIP médium (Roche) inkubáció után a reakciót C pufferben állítottuk le és a metszeteket glicerin zselatinnal fedtük le.

#### **4.14. Ultraszenzitív RNAscope *in situ* hibridizáció és immunfluoreszcens jelölés kombinációja**

Az RNAscope technika különösen érzékeny, egymolekula detekcióra és multiplex jelölésre alkalmas *in situ* hibridizációs (ISH) vizsgálati módszer, melyet paraffinba ágyazott blokkokból készített 5 µm vastag metszetek vizsgálatára optimalizáltak (Wang és mtsai., 2012). PTE-ÁOK

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet munkatársaival kidolgoztunk egy olyan módosított protokollt, melyben optimalizáltuk a technikát 30 µm vastag metszetekre. Ennek lényege, hogy a metszetek előkezelése még free floating technikával kezdődik, 1v/v% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot tartalmazó PBS-ben (30 min), majd PBS mosás után a metszeteket Superfrost Ultra Plus tárgylemezre húzzuk, levegőn megszárítjuk, és 60 percig 60°C-on tartjuk. 2×10 perc MQ vízzel végzett mosás után 10%-os neutrális pufferelt formalin (NBF) kezelés történik 4°C-on 2 percig. 3×10 perc MQ mosás után proteinase K oldatban emésztés történik (37°C, 15 perc, 0,01mg/ml proteinase K, in 0,1 M Tris/HCl, 0,05 M EDTA, pH=8). MQ vizes öblítést követően, a metszeteket újabb 10% NBF (4°C, 2 perc) fixálásnak vetjük alá, majd 3×10 perc MQ vizes mosást végzünk (Nemes és mtsai., 2021). Az eljárás ezt követő, a hibridizációt, szignál amplifikációt és csatorna előhívást felölelő részei mindenben megfelelnek a gyártó protokolljának. Tekintettel a lépések nagy számára, terjedelmi megfontolásból ennek ismertetésétől itt eltekintek, utalva a cég által publikált protokollra (<https://acdbio.com>, Advanced Cell Diagnostics Inc.).

Az immunfluoreszcens jelölést a sejtmagfestés (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) előtt végeztük. Az elsődleges antitesteket egy éjszakára szobahőn alkalmaztuk, majd PBS mosások után a szekunder szérumokkal inkubáltunk 3 órára (F2. táblázat). Végül, PBS mosás és DAPI jelölés után a metszeteket ProLong Diamond Antifade lefedő szerrel fedtük le.

A munkánk során a *Trpa1* mRNS detektálására az 400211, az *Ucn1* jelölésére az 466261 katalógusszámú oligonukleotid Z próbákat alkalmaztuk. Véletlenszerűen kiválasztott metszeteket triplex pozitív kontroll (320891) vagy triplex negatív kontroll próbákkal (320871, (ACD Inc.) is hibridizáltunk. A jelamplifikáció után a pozitív kontrollok jól detektálható jelet adtak, míg a negatív kontrollok esetén fluoreszcencia nem volt látható.

#### **4.15. Mikroszkópia, digitális képalkotás, morфомetria**

A DAB jelölt metszetek digitalizálásához a PTE ÁOK Anatómiai Intézet Nikon Microphot FXA fénymikroszkópját és Nikon Spot RT digitális kameráját használtuk. 1600 × 1200 pixel felbontású képeket készítettünk, a sejtek számolása manuálisan (Multipoint tool) vagy automatikus módszerrel (Find maxima / Point selection) eszközzel történt az ImageJ szoftverrel, állatonként és agyterületenként 4-6 reprezentatív felvételen.

A fluoreszcensen jelölt metszetek vizsgálatához a PTE ÁOK Orvosi Biológiai Intézetében található Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkópot vettük igénybe. Automatikus konfokális apertúra beállítás mellett a 20x (NA:0.5), 40x (NA:0.8) és 60x (NA:1.49, olaj)



objektíveket használtunk. A képek  $1024 \times 1024$  pixel felbontással kerültek mentésre. A használt fluorofórok gerjesztéséhez különböző hullámhosszú lézereket (DAPI: 405 nm, Alexa 488: 488 nm, Cy3: 550 nm, Cy5 és Alexa 647: 647 nm) használtunk, és a gyártók által megadott emissziós maximumon (DAPI: 457 nm, Alexa 488: 525 nm, Cy3: 570 nm, Cy5 és Alexa 647: 665 nm) regisztráltuk a jeleket. Kék (DAPI), piros (Cy3), zöld (Alexa 488) és fehér (Cy5 valamint Alexa 647) virtuális színeket rendeltünk a festékekhez.

Állatonként és agyterületenként 4-6 reprezentatív felvétel készült. A képek kiértékeléséhez ebben az esetben is ImageJ programot használtunk. Kvantitatív eljárásokkal az egyes agyterületeken a sejtek, axon terminálisok vagy az mRNA transzkriptumok sejttagonkénti vagy sejtnekénti számát határoztuk meg. A SNpc dopaminerg neuronjait 6 darab egymástól  $180\mu\text{m}$ -re elhelyezkedő reprezentatív metszési síkban számoltuk meg és a sejtszámok összegét adtuk meg. Egyes neuronok esetében a sejt méretet is meghatároztuk ImageJ szoftver segítségével történt területmérések útján. Az astrocyta és microglia aktivitást a gliasejtek morfológiájának értékelésére alkalmazott pontrendszer szerint értékeltük (Harrison és mtsai., 2019). Az immunjel és a konfluens RNAscope szignál esetén a jel erősségének mérésével meghatároztuk a specifikus jel denzitást (SSD), ami a citoplazmában jelenlévő jel és a háttér intenzitás ImageJ szoftverrel mért különbségéből számítottunk, és önkényes egységben fejeztünk ki. A reprezentatív képeket publikációs és prezentációs célokra Adobe Photoshop szoftverrel kontrasztosítottuk és szerkesztettük.

#### 4.16. PCR

A génmódosított állatok genotípusának meghatározása PCR segítségével (Phire Animal Tissue Direct PCR Kit) történt, a gyártó (Thermo) utasításai szerint. A vad típusú és a PACAP KO DNS kimutatására használt primer szekvenciák a következők voltak: 5'-ACC GAA AAC AAA TGG CTG TC-3' (szenz) és 5'-GGT CCA CAA AGT ATA TCT GTG CAT TCT-3' (antiszenz) a PACAP WT esetében, és 5'-ATC TCC TGT CAT CTC ACC TTG CTC CT-3' (szenz) és 5'-GAA GAA CTC GTC AAG AGA GGC GAT AG-3' (antiszenz) KO egerek esetében. A TRPA1 génkiütött állatok azonosítására az alábbi primereket használtuk: ASM2: ATC ACC TAC CAG TAA GTT CAT; ASP2: AGC TGC ATG TGT GAA TTA AAT. A PCR-reakciót 5 percig  $98^{\circ}\text{C}$ -on futtattuk, majd 36 ciklus következett:  $98^{\circ}\text{C}$  5 másodperc;  $61^{\circ}\text{C}$  5 másodperc;  $72^{\circ}\text{C}$  20 másodperc; és végül  $72^{\circ}\text{C}$  1 perc. Az agaróz gélelektroforézis után a termékeket Sybr Green I (Thermo) festékkel jelöltük, és a DNS-sávokat a PCR reakcióban megerősített kontrollok (heterozigóta kontroll, templát nélküli kontroll) segítségével értékeltük.

#### 4.17. Reverz transzkriptáz kvantitatív PCR (RT-qPCR)

A gyorsfagyasztott szövetmintákat TRI Reagensben (Zymo Research, Irvine, CA, USA) homogenizáltuk és össz RNS-t izoláltunk Direct-zol RNA Miniprep kit (Zymo) segítségével, és az oszlopon DNase I (Zymo) kezelést végeztünk. Az RNS koncentrációt és tisztaságot spektrofotométer segítségével vizsgáltuk. A mintákat -80°C-on tároltuk. Egy µg RNS-t felhasználva reverz transzkripciót végeztünk Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo) segítségével. Az Applied Biosystems QuantStudio 5 Real-Time PCR rendszert (Thermo) és SensiFast SYBR Lo-ROX Kit-et (Bioline, Taunton, USA) használtunk az a gyártó által ajánlott protokoll szerint. A vizsgált gének és az alkalmazott primerek listája az F3. táblázatban található. Az RT-qPCR méréseket duplikátumok formájában kiviteleztük, és melting curve elemzést végeztünk. A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel azonosítottuk. A reverz transzkriptáz nélküli kontroll a genomi DNS szennyezést kizárta. Az alkalmazott referencia gének esetében mért Ct értékeket a statisztikai értékelés során konstansnak találtuk.

#### 4.18. TaqMan RT-qPCR

A humán TRPA1 génexpresszió vizsgálatát Applied Biosystems QuantStudio 5 Real-Time PCR rendszerrel (Thermo) SensiFAST™ Probe Lo-ROX mix (Meridiane Bioscience, Memphis, USA) felhasználásával a gyártói protokoll szerint végeztük. A referencia gén a Ribonukleáz P fehérje p29 alegység (POP4) volt, melynek expressziója nem tért el a kontroll és öngyilkos áldozatok összehasonlításában. FAM konjugált TaqMan™ Gene Expression Assay-t (Thermo) használtunk a céllókuszok, a TRPA1: Hs00175798\_m1 és a POP4: Hs00198357\_m1 felerősítésére. A triplikátumok Ct értékeinek átlagát meghatároztuk, és a relatív génexpressziót az  $A=2^{-\Delta\Delta Ct}$  képlet segítségével számoltuk ki.

#### 4.19. Radioimmunassay

A CORT radioimmunassay során 5 µl szérum és 100 µl assay puffer (0,5 M PBS, ami 1g/l zselatint és 1g/l nátrium-azid keverékből, pH=7,4) elegyét extraháltuk 1ml dietil-éterrel. 1,25ml assay pufferrel rekonstruáltuk a száraz extraktumot, amiből két párhuzamos mérést végeztünk. A csövek 500 µl extraktumot és triciált CORT-t (12000 cpm; NEN, NET-399,90-120 Ci/mmol), illetve 15 nl/cső CS-RCS-57 antitestet 1:47000 munkahígításban tartalmaztak, összesen 700µl volumenben. Standard mintaként 9 hígításban CORT-t (Calbiochem, San Diego, CA, USA) használtunk. A csöveket egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk, ezt követően aktív szén segítségével szeparáltuk a dextránnal borított szabad szteroidokat. Kétfázisú

folyadék szcintillációs rendszerrel állapítottuk meg a minták aktivitását. Az assay szenzitivitása 30fmol/cső volt.

Az ACTH radioimmunassay a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben történt, a korábban közölt protokollnak mindenben megfelelően (Zelena és mtsai., 1999).

#### **4.20. Statisztika**

A statisztikai elemzést Statistica szoftverrel (v8.0; Statsoft, Tulsa, OK, USA) végeztük. Minden adatot a csoport átlagaként adtuk meg, és ábráztuk az átlag standard hibáját. A két szigma tartományon túli adatokat kizártuk az értékelésből. Két csoport összehasonlítására az adatok normál eloszlása esetében kétmintás Student-féle t próbát, ellenkező esetben Mann-Whitney-féle U próbát alkalmaztunk. A viselkedési tesztek egyes nyers adatsorait Z score-ra számoltuk át, a  $Z=(X-\mu)/\sigma$  képlet segítségével, ahol az  $X$  az állatok nyers adatát, a  $\mu$  a kontrollcsoport átlagát, a  $\sigma$  pedig a standard deviációt jelöli (Guilloux és mtsai., 2011). Az adatok normalitását Shapiro-Wilk teszttel (Shapiro és Wilk, 1965), míg a variancia homogenitását Bartlett Chi-négyzet próbával (Snedecor és Cochran, 1989) vizsgáltuk. Szükség esetén az adatsorok normalitása érdekében matematikai transzformációt végeztünk. Kettőnél több csoport összehasonlítása esetén az adatokat egyutas, kétutas varianciaanalízisnek (ANOVA) vagy multifaktoriális ANOVÁ-nak (MANOVA) vetettük alá. Az ugyanazon állatokon történt ismételt mérések eredményeinek elemzése repeated measures (RM) ANOVA segítségével történt. Amennyiben ezek szignifikáns hatást találtak, az összehasonlítandó csoportok számától függően, Fisher vagy Tukey-féle post hoc tesztet végeztünk. (Az ANOVA teszteredmények jelentős részét a Függelék táblázataiban foglaltam össze, hogy a szövegbe illesztett nagymennyiségű számadat ne rontsa az Eredmények fejezet követhetőségét.)

Az egyes változók közötti összefüggések keresésére Spearman-féle korrelációanalízist is végeztünk. Az alpha értéke minden teszt esetben 5% volt.

## 5. Eredmények

Ebben a fejezetben a Célkitűzések és hipotézisek szakaszban megadott öt fő témakör szerinti csoportosításban foglalom össze az elért eredményeinket.

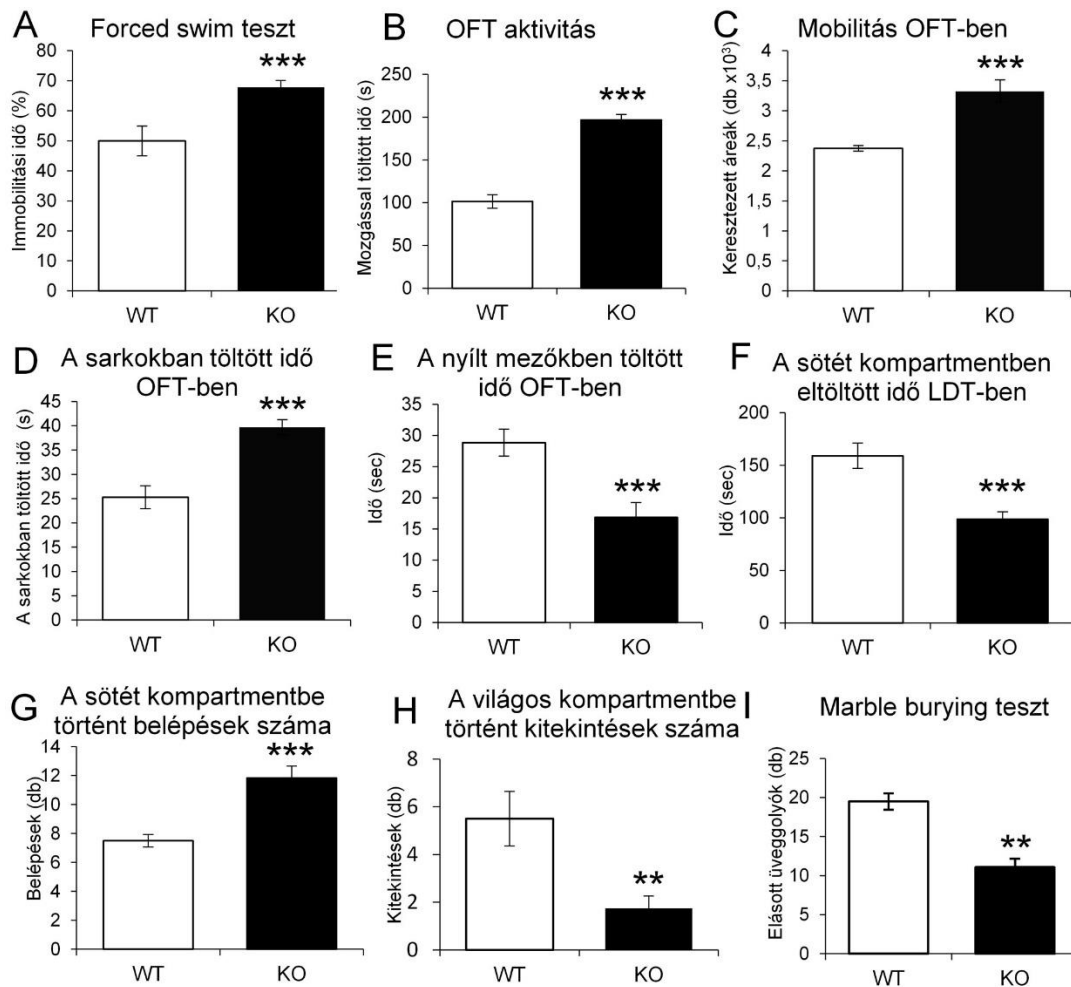
### 5.I. Génmódosított egértörzsek vizsgálata

#### 5.I.1. PACAP génkiütött egerek viselkedésének és akut stresszadaptációjának vizsgálata

Saját előkísérleti eredményeink és irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy a PACAP befolyásolja az állatok viselkedését és a stresszadaptáció központjainak neuronális aktivitását, ezért WT és PACAP KO állatokat viselkedési teszteknek vetettünk alá, majd a FST, mint akut stresszexpozíció után, megvizsgáltuk a neuronális FOS aktivációs mintázatot.

##### 5.I.1.1. A PACAP KO egértörzs hangulati állapotának elemzése viselkedési tesztekben

A PACAP KO állatok szignifikánsan hosszabb immobilitási ideje (5.1.A ábra) FST-ben depressziószerű viselkedésre utalt, mely nagyobb OFT aktivitással (5.1.B-C ábra) járt. A PACAP KO egerek 37%-kal hosszabb ideig tartózkodtak a sarkokban (5.1D ábra) és 58%-kal kevesebb időt töltöttek az aréna nyílt mezőiben (5.1.E ábra), mint a WT állatok. A hét vizsgált KO egér közül négyenél láttunk ugráló magatartást ( $1,00 \pm 0,43$  ugrás/állat), míg a vad típusú állatok közül egyiknél sem ( $p < 0.05$ ). A LDT-ben a PACAP KO egerek 37,50%-kal kevesebb időt töltöttek a sötét kompartmentben, mint a WT társaik (5.1.F ábra), mely PACAP hiányában csökkent szorongási szintre utal. A KO állatok azonban gyakrabban léptek be a sötét kompartmentbe, mint a WT egerek (5.1.G ábra), melynek hátterében a KO egerek fokozott lokomotoros aktivitása állhat. A világos kompartmentbe való kitekintések száma 3,14-szer több volt a vad típusú egerek esetében, mint a KO társaiknál (5.1.H ábra). A KO egerek kevesebb üveggolyót ástak el, mint a WT társaik (5.1.I ábra), amely szintén arra utal, hogy PACAP hiányában a szorongási szint kisebb.

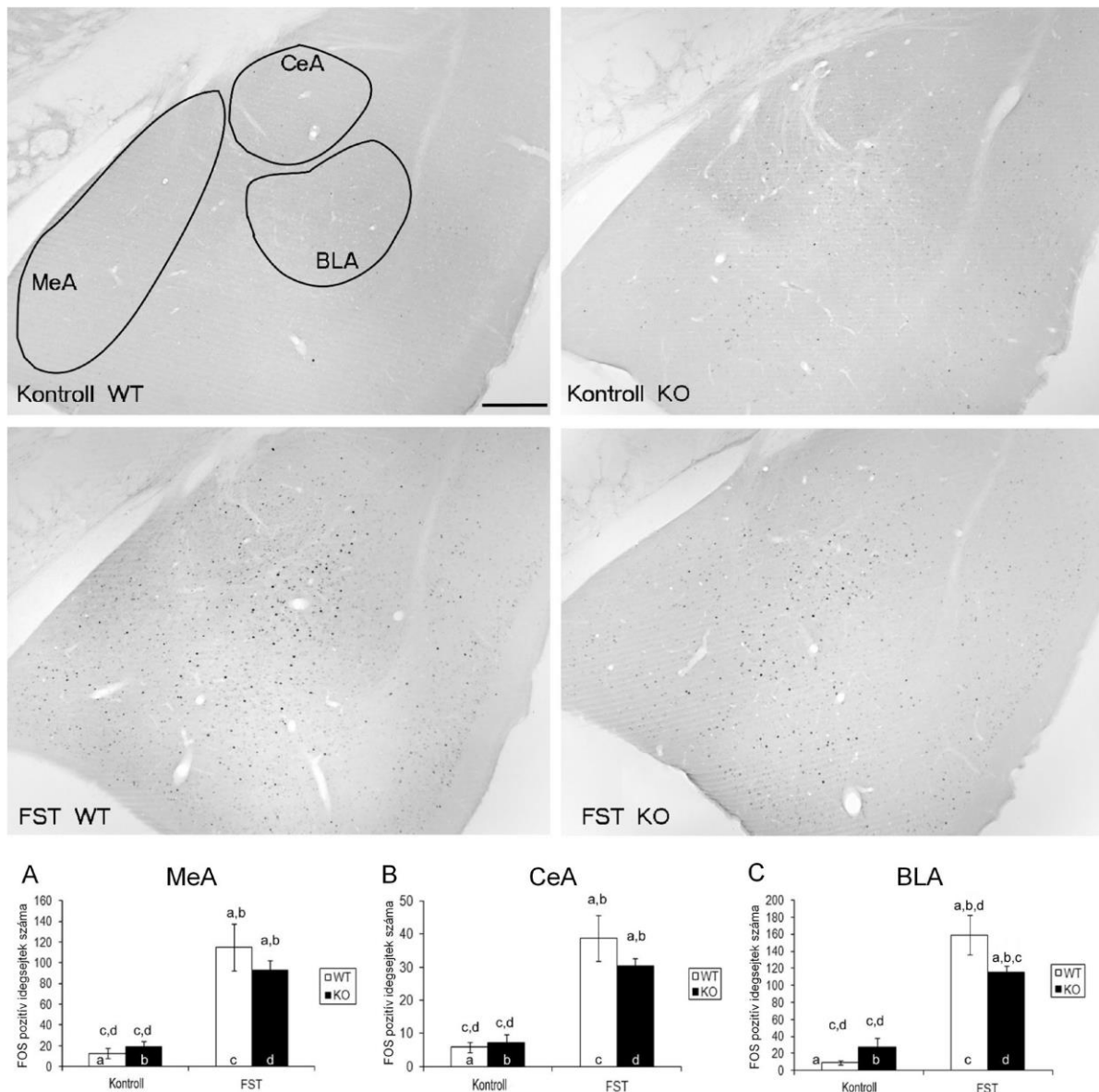


**5.1. ábra.** Viselkedésvizsgáló tesztek eredményei a PACAP KO és WT egerek vizsgálatából. Forced swim tesztben mért immobilizációs idő (A). Open field teszt (OFT) aktivitás (B), OFT-ben megtett út (C), a sarkokban (D) és nyílt területen töltött idő (E). A light-dark box tesztben (LDT) a sötét térében töltött időt (F) és az oda történt belépések (G), valamint a világos kompartmentbe történt kitekintések számát (H) ábrázoltuk. Az (I) panel az elrejtett üveggolyók számát mutatja marble burying tesztben. Világos oszlopok: PACAP vad típusú egér (WT), sötét oszlopok: PACAP géniűtött (KO) egér. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , Student-féle  $t$  próba.

#### 5.1.1.2. A PACAP KO egértörzs FST után mutatott neuronális FOS aktivációjának mintázata

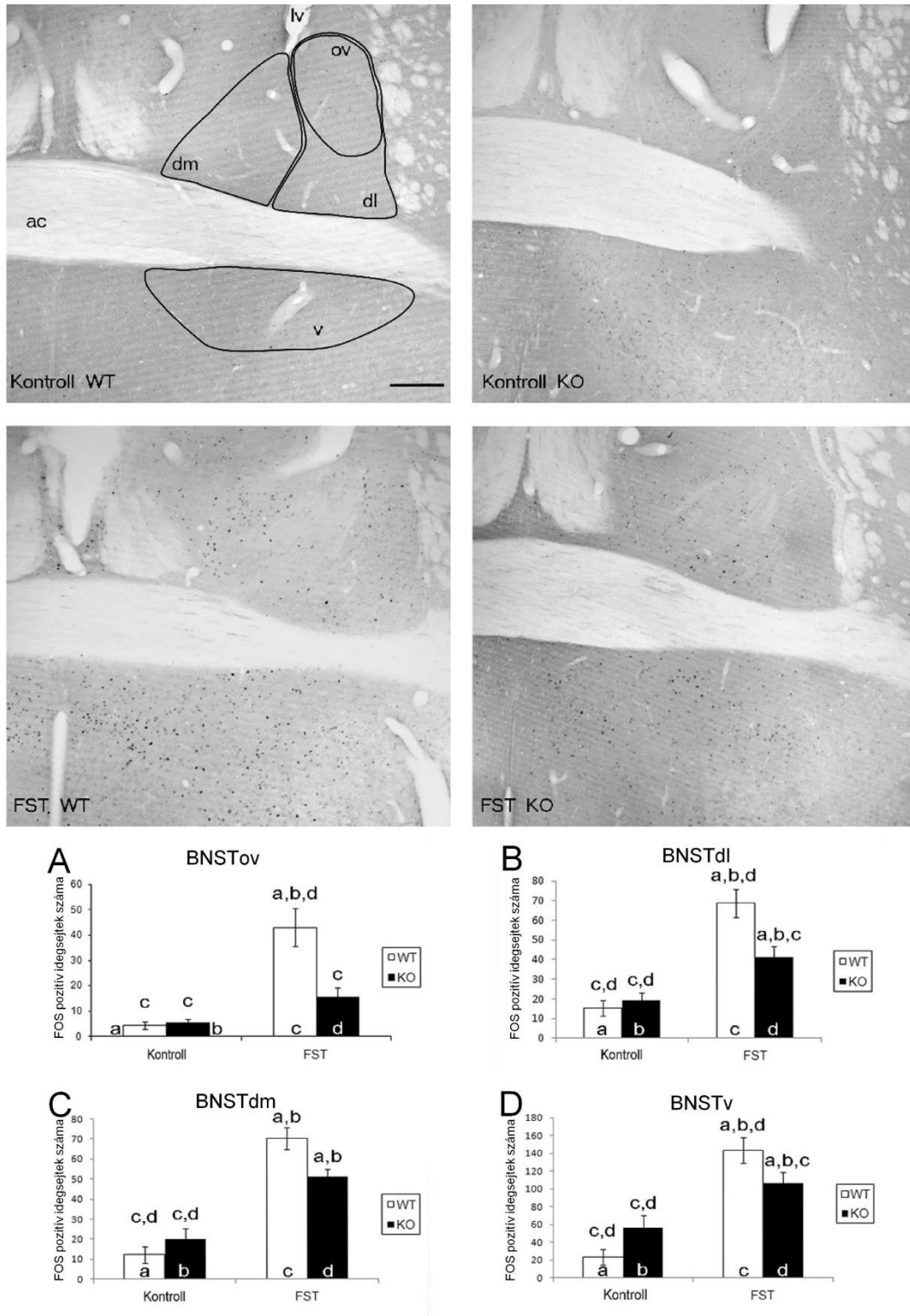
A stresszadaptációban résztvevő néhány agyterületen megvizsgáltuk az akut FST expozíció által kiváltott FOS aktiváció mértékét, és összevetettük a PACAP KO és WT állatokban megfigyelhető változást (F4. táblázat).

Az amygdala divíziói közül a MeA (5.2.A ábra) és CeA (5.2.B ábra) területén csak a stressznek volt szignifikáns hatása, a genotípusnak és az interakciónak azonban nem (F4. táblázat). A BLA területén a stressz és a stressz  $\times$  genotípus interakció hatása is szignifikáns volt a FOS immunreaktivitásra, és a post hoc teszt szerint a PACAP KO egerek szignifikánsan kisebb FOS választ adtak (5.2.C ábra).



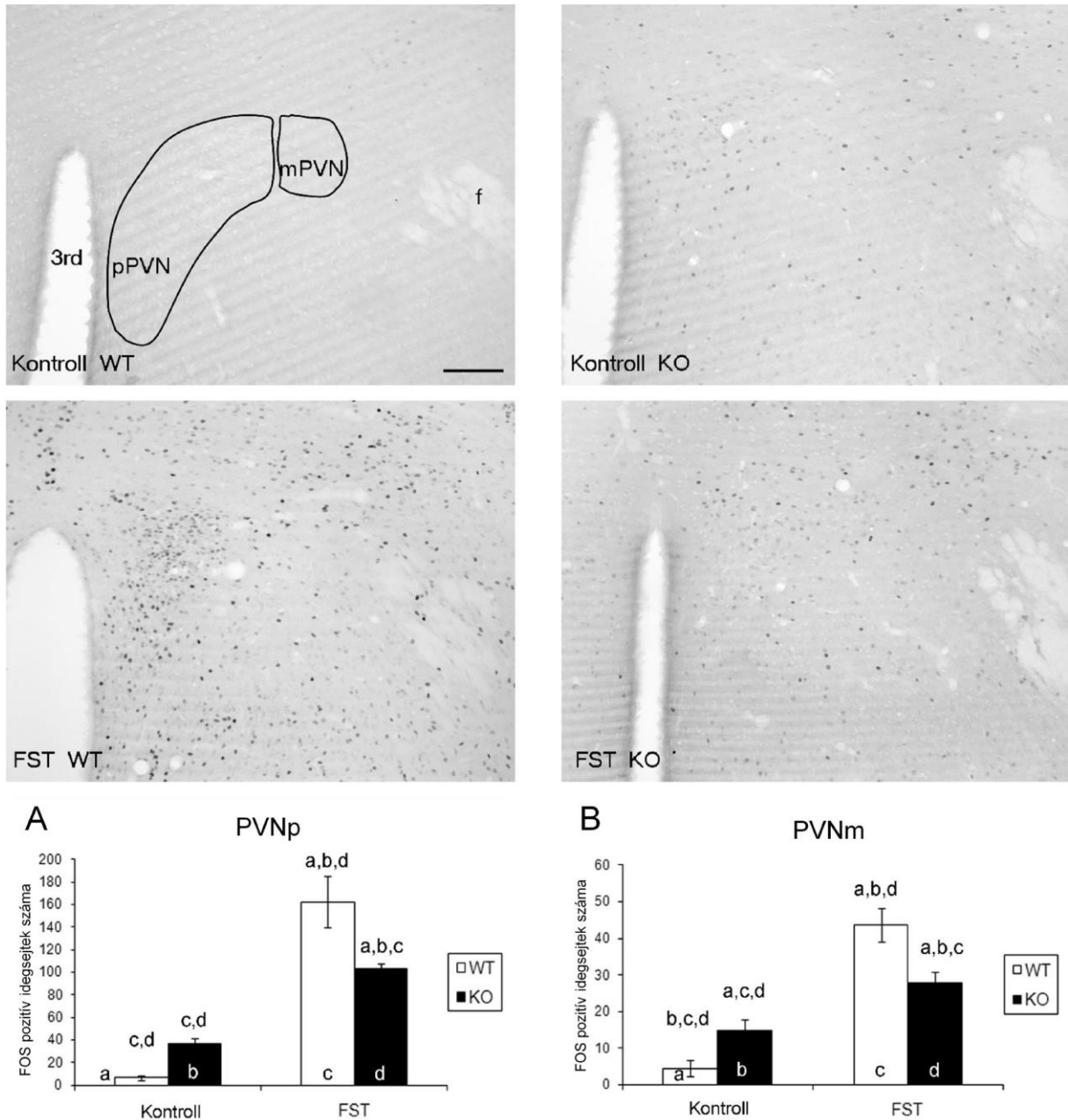
**5.2. ábra.** FOS immunhisztokémia az amygdala területén. Kontroll WT: nem stresszelt vad típusú állat; Kontroll KO: nem stresszelt PACAP génkiütött (knockout, KO) állat; FST WT: forced swim teszten átesett vad típusú állat; FST KO: forced swim teszten átesett PACAP KO állat. Az oszlopdiagrammok a FOS immunreaktív idegsejtek számát mutatják (A) mediális (MeA), a (B) centrális (CeA) és a (C) basolaterális amygdala (BLA) területén. A betűk a csoportpárok közötti szignifikáns különbségeket mutatják, a post hoc teszt szerint ( $p < 0.05$ ). Lépték:  $200\mu\text{m}$ .

A BNSTov, a BNSTdl és a BNSTv területén stressz hatására jelentős FOS immunreaktivitást tapasztaltunk a WT állatoknál, mely a stresszelt KO egereknél szignifikánsan kisebb mértékű volt, a stresszelt vad típusúakhoz viszonyítva (5.3. ábra). A BNSTov esetében a PACAP KO egerekben a FOS sejtszám növekedése el sem érte el szignifikáns mértéket. A BNSTdm területén a stressz erőteljes hatást fejtett ki a FOS immunreaktivitásra, de genotípus főhatást és a stressz  $\times$  genotípus interakciót nem találtunk.



**5.3. ábra.** FOS immunhisztokémia a nucleus interstitialis striae terminalis (BNST) területén. Kontroll WT: nem stresszelt vad típusú állat; Kontroll KO: nem stresszelt PACAP génkiütött (knockout, KO) állat; FST WT: forced swim teszten átesett vad típusú állat; FST KO: forced swim teszten átesett PACAP KO állat. Az oszlopdiaagrammok a BNST (A) ovális (BNSTov), (B) dorsolaterális (BNSTdl), (C) dorsomedialis (BNSTdm) és (D) ventrális (BNSTv) almagjaiban talált FOS immunreaktív (ir) idegsejtek számát mutatják. Rövidítések: ac: comissura anterior, lv: ventriculus lateralis, ov: BNSTov, dl: BNSTdl, dm: BNSTdm, v: BNSTv. A betűk a csoportpárok közötti szignifikáns különbségeket mutatják a post hoc teszt szerint ( $p < 0.05$ ). Lépték: 200 $\mu$ m.

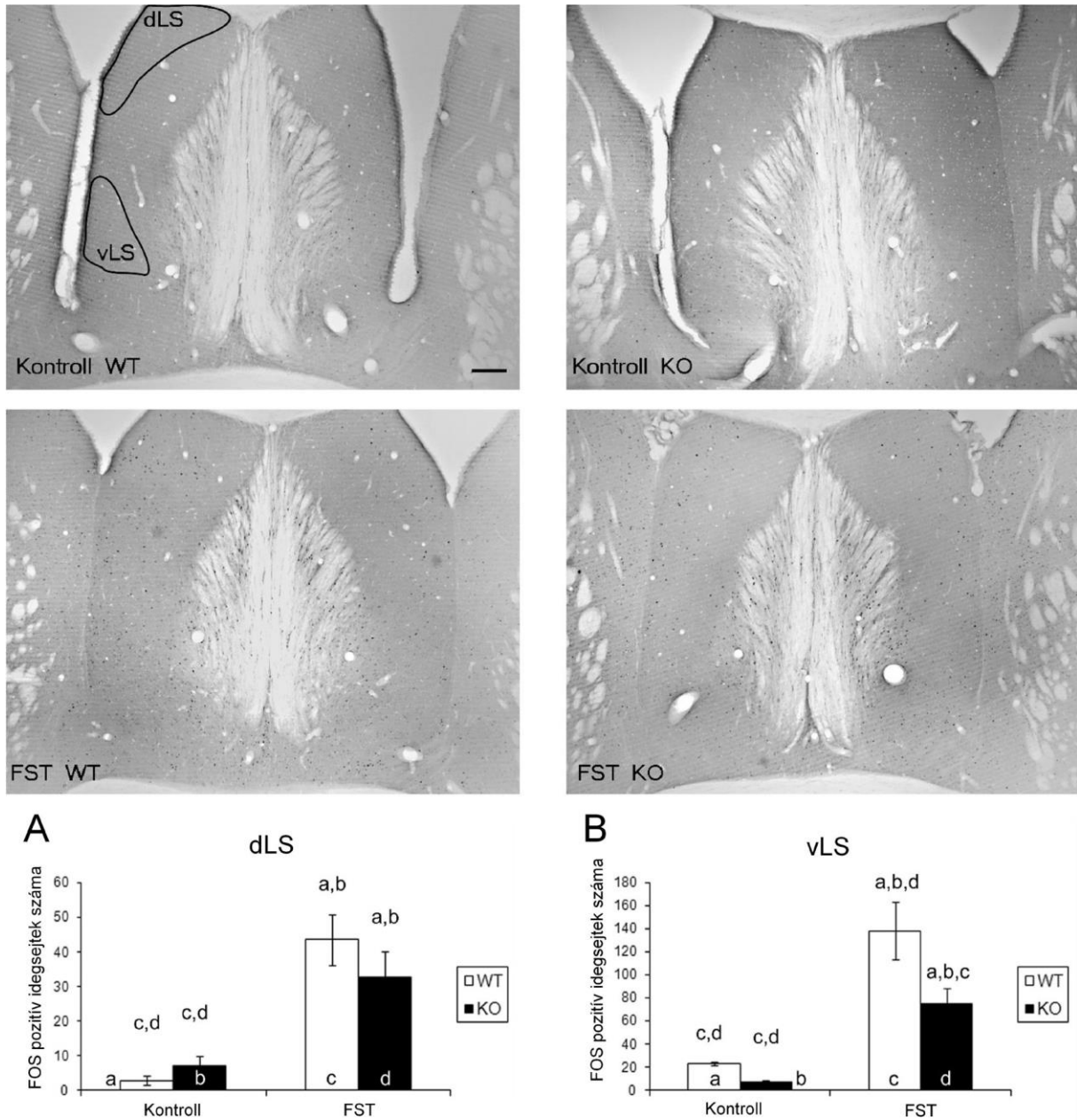
A PVN parvo- és magnocelluláris divízióiban is azt láttuk, hogy a stressz és a stressz  $\times$  genotípus interakció is szignifikánsan befolyásolta a FOS immunreaktivitást (5.4. ábra). A PACAP KO egerek esetében szignifikánsan kisebb FOS aktivációt tapasztaltunk, mint WT társaiknál.



**5.4. ábra.** FOS immunhisztokémia a nucleus paraventricularis hypothalami (PVN) területén. Kontroll WT: nem stresszelt vad típusú állat; Kontroll KO: nem stresszelt PACAP génkiütött (knockout, KO) állat; FST WT: forced swim teszten átesett vad típusú állat; FST KO: forced swim teszten átesett PACAP KO állat. A hisztogramok FOS pozitív sejtek számát mutatják a PVN (A) parvocelluláris (PVNp), és (B) magnocelluláris (PVNm) almagjaiban. 3<sup>rd</sup>: ventriculus tertius; f: fornix. A betűk a csoportpárok közötti szignifikáns különbségeket mutatják post hoc tesztek szerint ( $p < 0.05$ ). Lépték: 100 $\mu$ m.

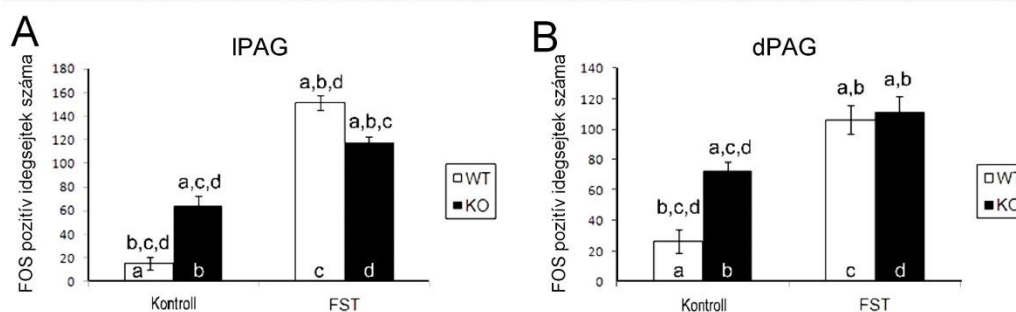
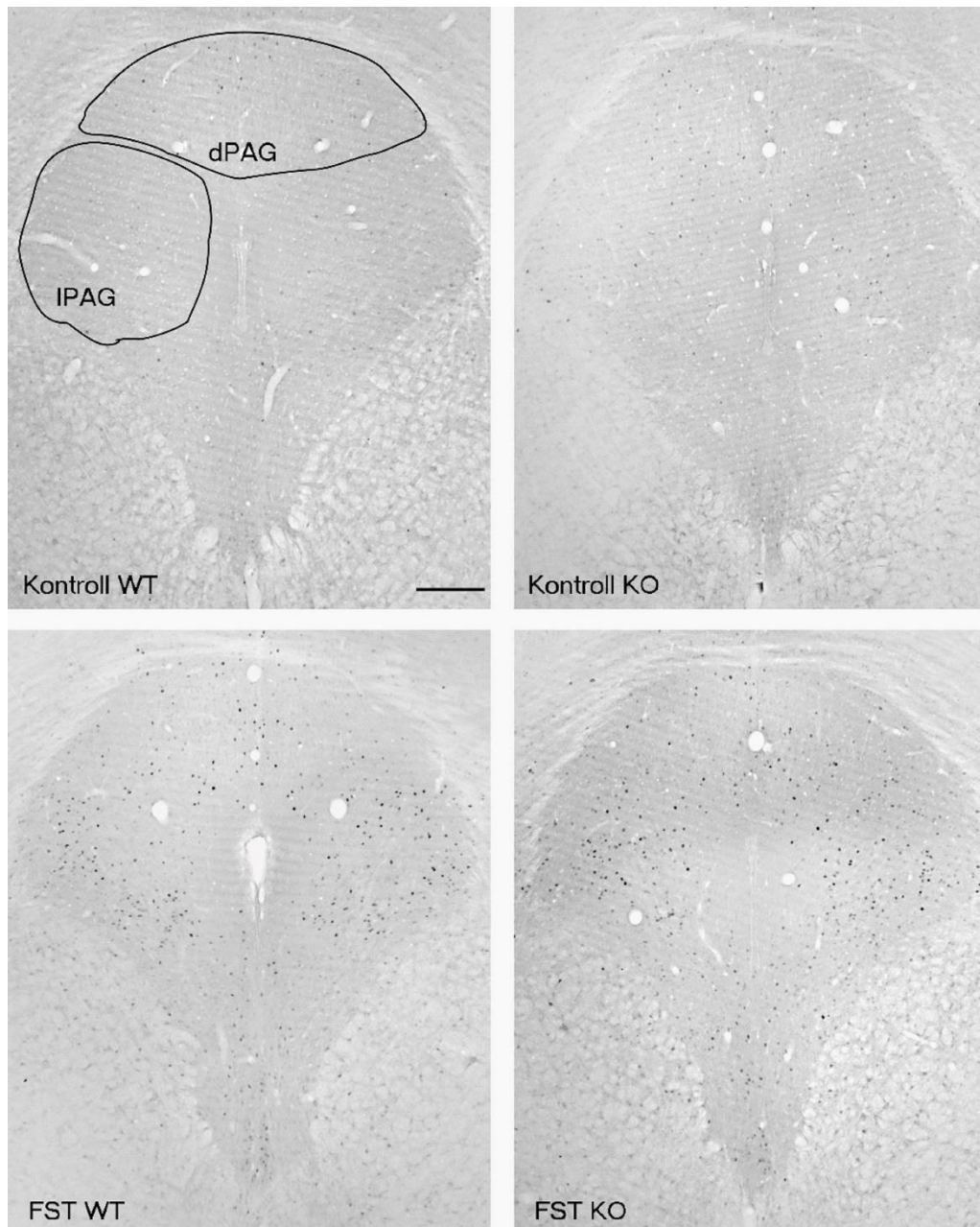


A dLS-ban a stressz hatott a FOS immunreaktivitásra (5.5.A ábra), de a genotípus és a stressz-genotípus interakció nem befolyásolta annak mértékét. Ezzel szemben, a vLS területén (5.5.B ábra) a stressz és a genotípus hatása is befolyásolta FOS jelet, interakció nélkül (F4. táblázat).



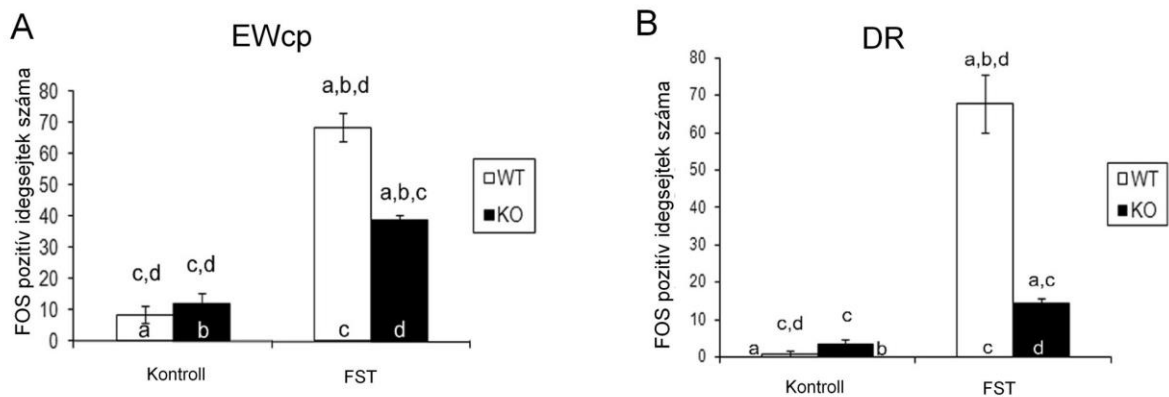
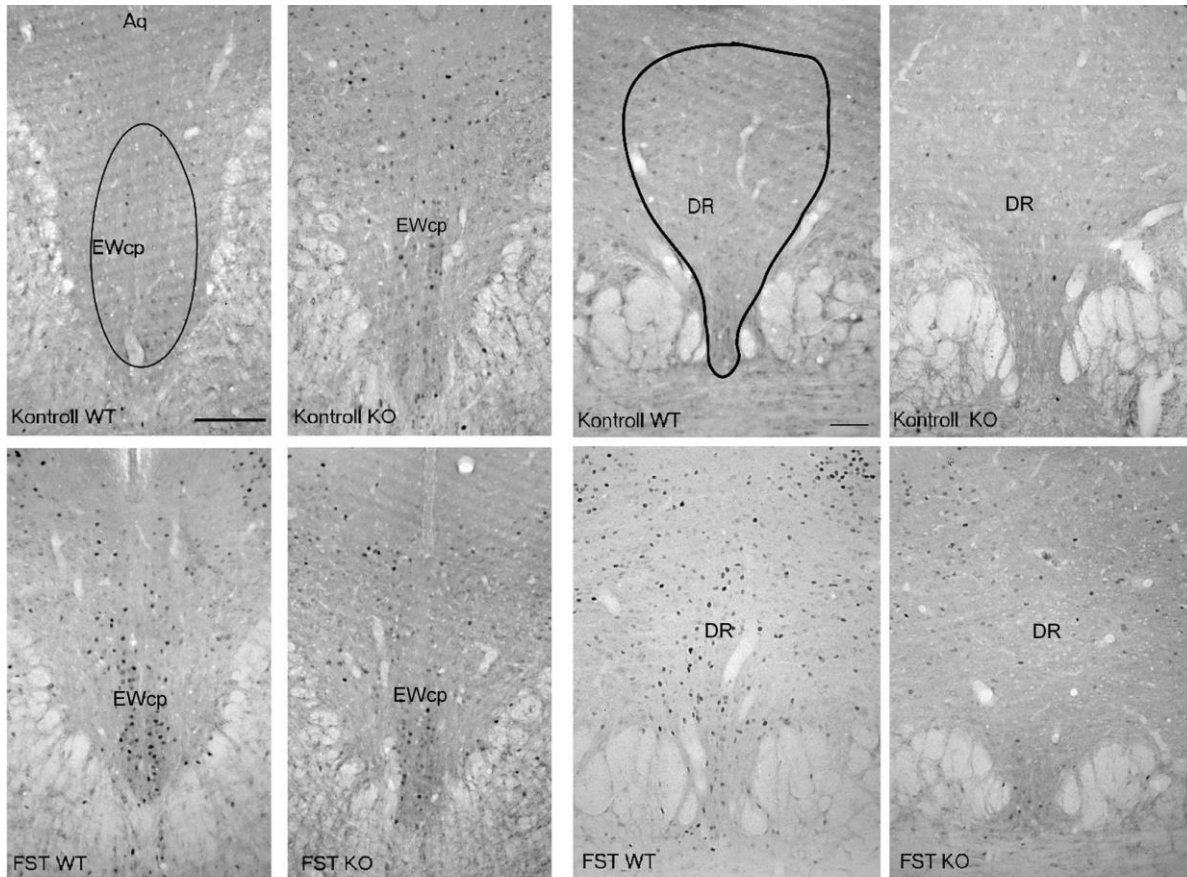
**5.5. ábra.** FOS immunhisztokémia a laterális septum (LS) területén. Kontroll WT: nem stresszelt vad típusú állat; Kontroll KO: nem stresszelt PACAP génkiütött (knockout, KO) állat; FST WT: forced swim teszten átesett vad típusú állat; FST KO: forced swim teszten átesett PACAP KO állat. Az oszlopdiaagramm a FOS aktiváció mértékét mutatja a (A) dorsális (dLS), és a (B) ventrális LS (vLS) területén. A betűk a csoportpárok közötti szignifikáns különbségeket mutatják a post hoc teszt szerint ( $p < 0.05$ ). Lépték: 200 $\mu$ m.

A IPAG FOS immunreaktivitása a stressztől és a stressz-genotípus interakciótól is függött. FST hatására mindkét genotípusban láttunk FOS immunjel erősödést, de a KO állatoknál ez kisebb mértékű volt. Érdekes, hogy a kontroll KO állatok, mintegy négyszer magasabb FOS immunreaktivitással rendelkeztek, mint vad típusú társaik (5.6.A ábra). A PAG dorsális részében a stressz, a genotípus és ezek interakciója is hatással volt a FOS mennyiségére. A kontroll PACAP KO csoportban több FOS pozitív neuront találtunk, mint a vad típusnál. FST hatására a WT csoportban közel négyszeresére növekedett a FOS immunreaktivitás, míg a KO csoportban csupán 50%-os növekedést láttunk (5.6.B ábra).



**5.6. ábra.** FOS immunhisztokémia a (A) laterális (IPAG) a (B) dorsális (dPAG) periaqueductális szürkeállományban. Kontroll WT: nem stresszelt vad típusú állat; Kontroll KO: nem stresszelt PACAP génkiütött (knockout, KO) állat; FST WT: forced swim teszten átesett vad típusú állat; FST KO: forced swim teszten átesett PACAP KO állat. A betűk a csoportpárok közötti szignifikáns különbségeket mutatják a post hoc teszt szerint ( $p < 0.01$ ). Lépték:  $100\mu\text{m}$ .

Az EWcp-ben és a DR területén a stressznek, a genotípusnak és ezek interakciójának hatása egyaránt szignifikáns volt (F4. táblázat). A WT állatok esetében megfigyelt markáns FST által kiváltott FOS aktiváció a PACAP KO állatok csoportjában jóval diszkrétebb mértékű volt. (5.7. ábra).

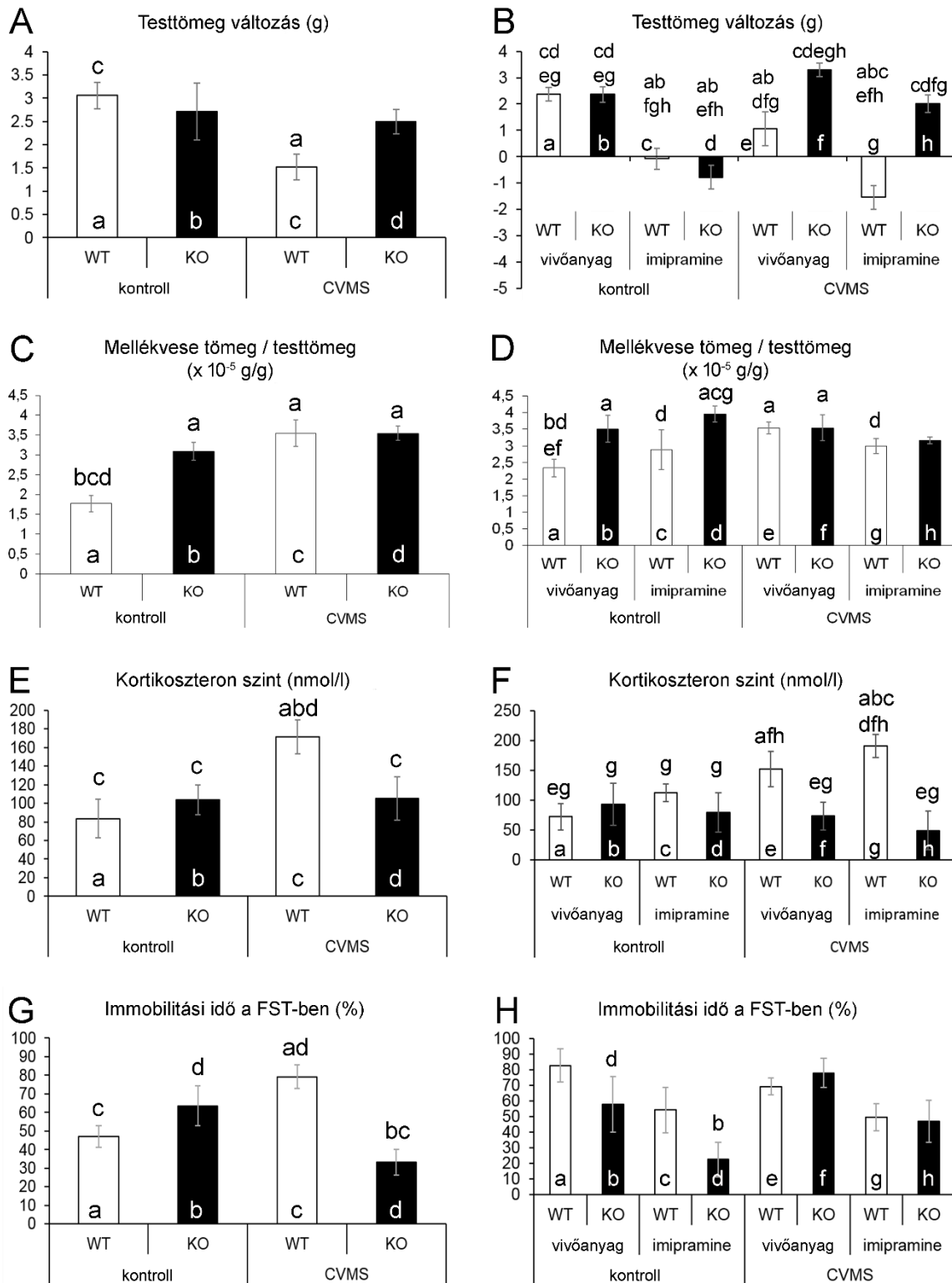


**5.7. ábra.** FOS immunhisztokémia a centrális projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp, bal oldal) és a nucleus raphe dorsalis (DR, jobb oldal) területén. Kontroll KO: nem stresszelt PACAP génkiütött (knockout, KO) állat; FST WT: forced swim teszten átesett vad típusú állat; FST KO: forced swim teszten átesett PACAP KO állat. Az oszlopdiagrammok a FOS aktiváció mértékét mutatják az (A) EWcp és a (B) DR területén. Aq: aqueductus cerebri. Az oszlopok felett látható betűk a szignifikáns különbségeket mutatják a hoc tesztek szerint ( $p < 0.05$ ). Léptékek: EWcp: 200 $\mu$ m; DR: 100 $\mu$ m.

### 5.1.2. PACAP génkiütött egerek viselkedésének és krónikus stresszadaptációjának vizsgálata

Ebben a projektben két lépésben történt a PACAP KO egerek vizsgálata, mivel a CVMS, mint depressziómodell által kiváltott változások antidepresszáns-kezeléssel történő visszafordíthatóságára is kíváncsiak voltunk. Első lépésben a CVMS modellben vizsgáltunk olyan egércsoportokat, ahol nem történt injekciós kezelés. Erre, mint „nem kezelt csoport” hivatkozom az alábbiakban, és az innen származó eredmények az első adathalmazt képezték (3.1. táblázat). Második lépésben antidepresszáns (imipramin) injekciókkal kezelt csoportokkal összehasonlítva is elvégeztük a vizsgálatokat, de ebben az esetben a kontroll állatok is kaptak injekciókat, oldószerrel. Mivel ez egy további krónikus stresszfaktor, a két adathalmazt (3.1. táblázat) külön vizsgáltuk meg statisztikailag, melynek eredményeit az F5-8. táblázatok tartalmazzák, a függelékben.

5.1.2.1. A CVMS modell fizikai, endokrinológiai és viselkedési hatásai PACAP KO egerekben  
Nem kezelt (5.8.A ábra a és c oszlop;  $p < 0,02$ ) és injekciózott WT állatoknál (5.8.B ábra a és e oszlop;  $p < 0,05$ ) a CVMS hatékonyan csökkentette a testtömeget, míg a KO állatok nem fogytak (5.8.A ábra, b és d oszlop;  $p = 0,67$  és 5.8.B ábra b és f oszlop;  $p = 0,11$ ). Az imipramin nem fordította vissza a CVMS testtömeg változásra kifejtett hatását a WT egerekben, a vivőanyaggal kezelt, stresszelt WT egerekkel összehasonlítva (e és g oszlop;  $p < 10^{-4}$ ). Érdekes, hogy az imipraminnal kezelt CVMS-nek kitett KO egerek (5.8.B ábra h oszlop) 2 grammot híztak, míg a nem stresszelt imipraminnal kezelt KO állatok (5.8.B ábra d oszlop;  $p < 0,001$ ) és a stresszelt imipraminnal kezelt WT állatok (5.8.B ábra g oszlop;  $p < 10^{-5}$ ) veszítettek a testtömegükből. A testtömeg adatok bizonyítják a stresszor hatékonyságát a WT egerekben, a PACAP KO állatokkal ellentétben.



**5.8. ábra.** A krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) modell validitását alátámasztó eredmények. Az (A), (C), (E), és (G) diagramm az injekciós kezelésben nem részesült a (B), (D), (F) és (H) grafikonok a kezelt állatok eredményeit mutatják. Az (A) és (B) grafikon a testtömegváltozást mutatja be grammban (g) kifejezve. A (C) és a (D) ábra a testtömegre vonatkoztatott mellékvese tömeget ábrázolja (g/g). Az (E) és (F) hisztogramok a plazma kortikoszteron szintjét mutatják (nmol/l). A (G) és a (H) ábra a forced swim tesztben (FST) immobilitással töltött időt (%) adja meg. Az oszlopok feletti betűk a csoportpárok közötti szignifikáns különbséget jelölik a post hoc tesztek szerint ( $p < 0,05$ ). Világos oszlopok: PACAP vad típusú (WT), sötét: PACAP géntünetű (KO) egerek.

A kontroll PACAP KO egerek mellékvesetömege 57%-kal nagyobb volt a vad típusúakénál (5.8.C ábra a és b oszlop;  $p < 0,01$ ), melyre sem a kezelésnek sem pedig a CVMS-nek nem volt hatása. CVMS után, a WT egerek esetében magasabb mellékvesetömeget mértünk a kezeletlen (5.8.C ábra a és c oszlop;  $p < 10^{-3}$ ) és a vivőanyaggal kezelt (5.8.D. ábra a és e oszlop;  $p < 0,02$ ) csoportokban is, mely modellünk hatékonyságát támasztja alá. Az imipraminnal kezelt állatoknál, a CVMS nem befolyásolta a mellékvesetömeget (5.8.D ábra e és g oszlop;  $p = 0,38$ ).

A WT egereknél CVMS hatására szignifikáns CORT titer emelkedést találtunk: 5.8.E ábra a és c oszlop ( $p < 0,02$ ), illetve a 5.8.F ábra a és e oszlop ( $p < 0,04$ ), valamint a c és g oszlop ( $p < 0,03$ ). Ezzel ellentétben, a KO egerek esetében a stresszelt és nem stresszelt csoportok összehasonlításánál nem találtunk szignifikáns CORT változást (5.8.E ábra).

FST-ben, a CVMS növelte a depressziószerű viselkedést a WT egerek esetében (5.8.G ábra a és c oszlop;  $p < 0,02$ ), ami alátámasztja CVMS hatékonyságát. Meglepetésünkre, a kontroll KO egerek nem mutattak depressziószerű viselkedést (5.8.G ábra a és b oszlop;  $p = 0,15$ ). Paradox módon, a CVMS expozíció a KO egerekben alacsonyabb ( $p < 0,02$ ) depressziószintet eredményezett, mint a nem stresszelt KO állatok esetében. A kontroll KO egereknél, az imipramin csökkentette az immobilitási időt a vivőanyaggal kezelt csoporttal összehasonlítva (5.8.H ábra b és d oszlop), de a stresszelt csoportoknál ez a hatás nem ért el statisztikailag szignifikáns mértéket.

#### 5.1.2.2. FOSB/ $\Delta$ FOSB neuronális aktivációs mintázat WT és PACAP KO egerek agyában

A FOSB/ $\Delta$ FOSB neuronális aktivációt összesen 12 kísérleti csoportban, 18 agyterületen vizsgáltuk. Az eredményeket a fentieknek megfelelően két adathalmazba csoportosítva (lásd 3.1. táblázat) alább két alfejezetben foglalom össze. Itt szöveges formában az eredményeket a post hoc tesztek alapján írom le, és az ezek alapjául szolgáló ANOVA tesztek eredményei a függelék F5. és F6. táblázataiban található.

##### 5.1.2.2.1. FOSB/ $\Delta$ FOSB aktivációs mintázat a nem kezelt WT és PACAP KO egereknél, CVMS hatására

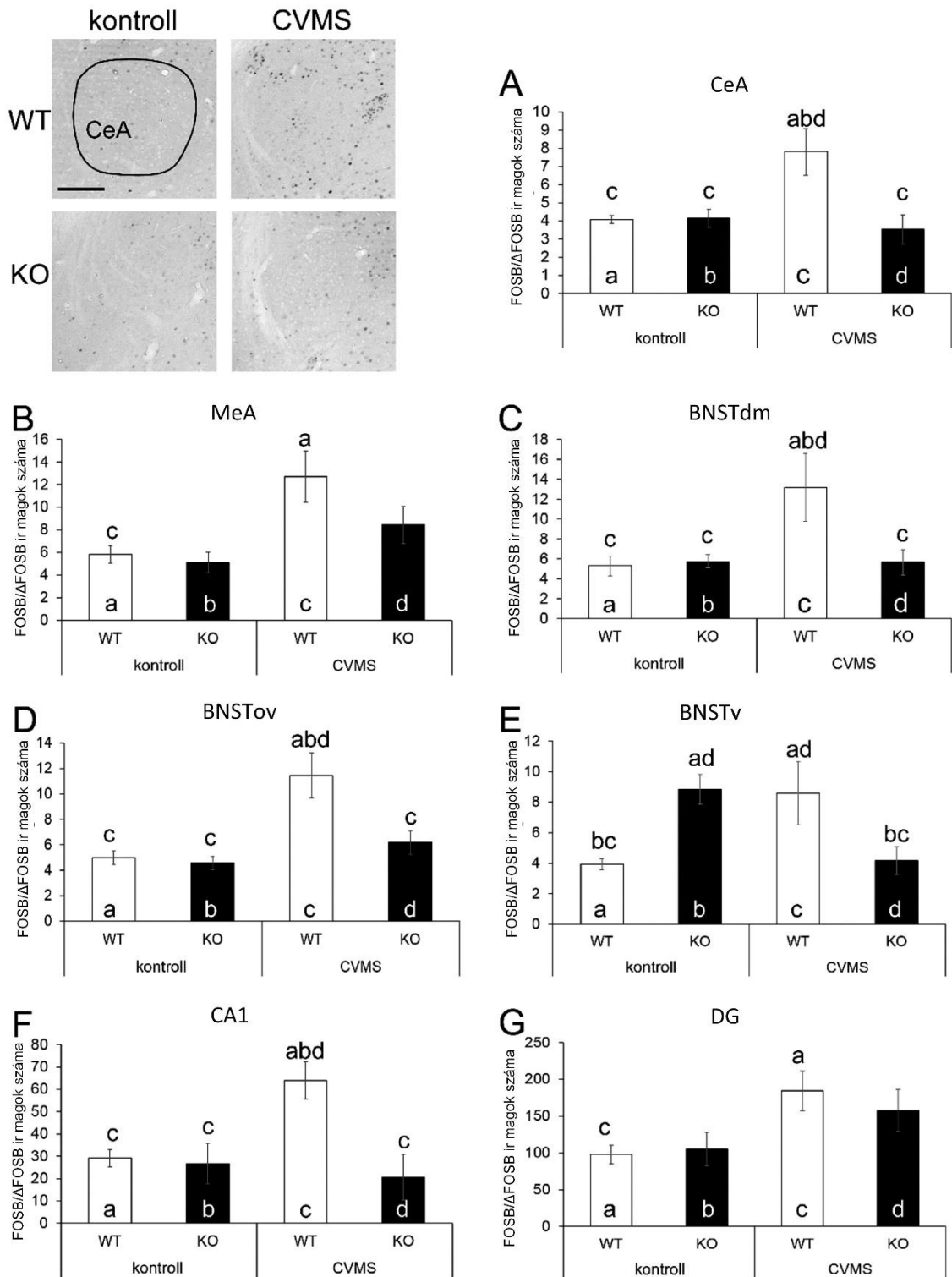
A CeA területén a WT egereknél CVMS hatására mintegy kétszeresére nőtt a FOSB/ $\Delta$ FOSB ir sejtek száma (5.9.A ábra a és c oszlop;  $p < 0,01$ ), mely növekedés a PACAP KO állatoknál elmaradt. A MeA területén (5.9.B ábra) a WT egerek esetében láttunk FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás növekedés CVMS után. A BLA területén nem láttunk szignifikáns hatást, ezért az eredményeket nem is ábráztuk. A CeA-hoz hasonló képet adott a BNSTdm és

BNSTov vizsgálata is (5.9.C-D ábra). A post hoc tesztek szerint itt is elmaradt a PACAP KO egerek CVMS-re adott válasza (5.9.C-D ábra).

A BNSTv területén magasabb bazális FOSB/ $\Delta$ FOSB jelet találtunk a PACAP KO egerek esetében, mint a WT állatoknál (5.9.E. ábra a és b oszlop;  $p < 0,04$ ). WT egereknél a CVMS FOSB/ $\Delta$ FOSB immunjel emelkedést okozott (a és c oszlop). Ezzel ellentétben, KO egereknél CVMS hatására a sejtszám csökkent, bár megjegyzendő, hogy meglehetősen kevés sejt volt aktív e területen.

A hippocampus CA1 és DG régiójában a WT egerek hozzávetőlegesen kétszeres FOSB/ $\Delta$ FOSB immunjel növekedéssel reagáltak CVMS-re (CA1: 5.9.F ábra a és c oszlop;  $p < 0,03$ . DG: 5.9.G ábra a és c oszlop;  $p < 0,03$ ), míg a KO egereknél nem láttunk választ. A CA3 régió területén csak negatív eredményeket találtunk, ezért az adatokat nem ábrázoltuk.





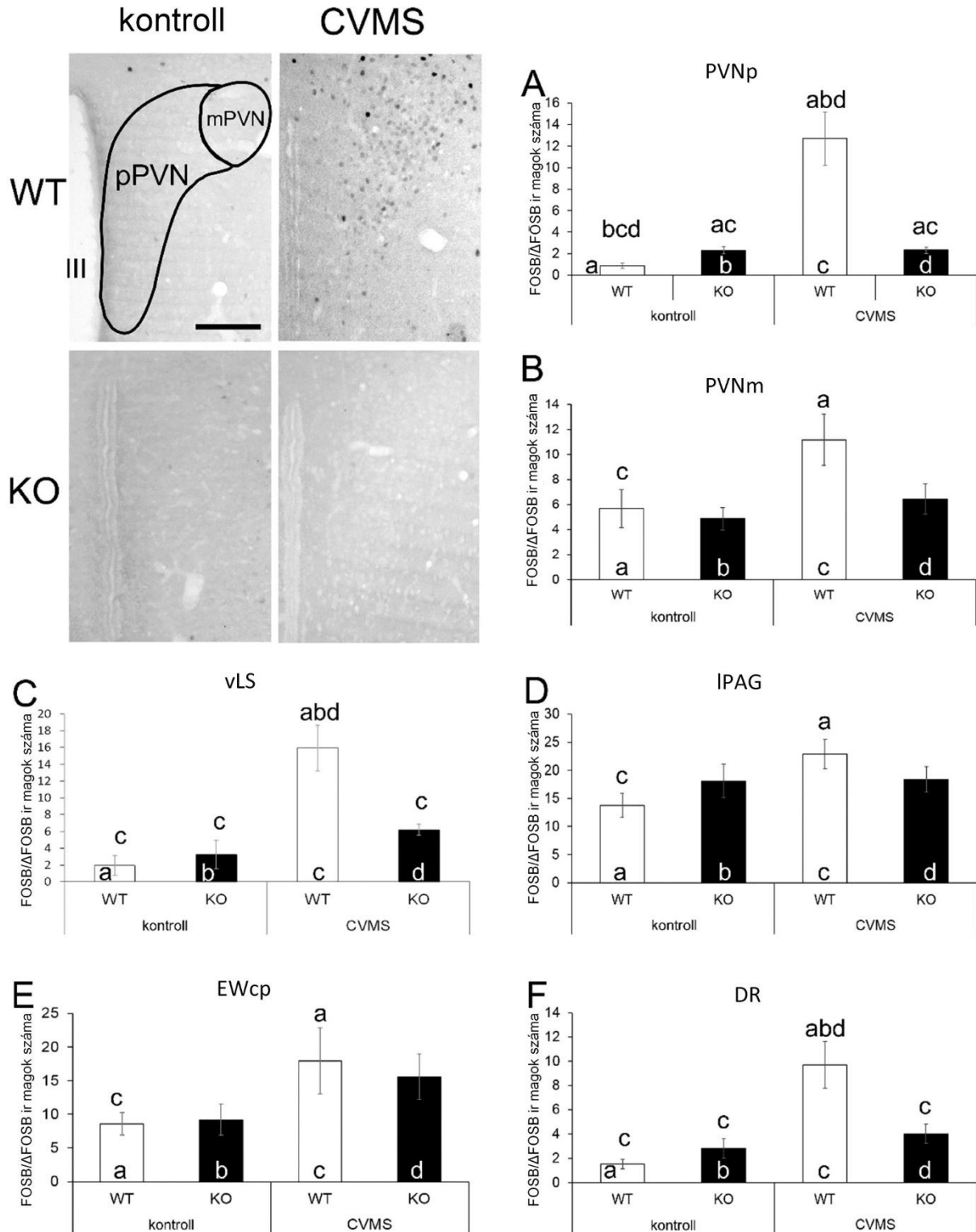
**5.9. ábra.** FOSB/ΔFOSB immunhisztokémia injekciós kezelésben nem részesült egereken. A nucleus centralis amygdalae (CeA) reprezentatív fotói. A hisztogramok a FOSB/ΔFOSB immunreaktív (ir) neuronok számát mutatják, rendre a CeA (A), a nucleus medialis amygdalae (MeA) (B), a nucleus interstitialis striae terminalis dorsomediális (BNSTdm) (C), ovális (BNSTov) (D), ventrális (BNSTv) (E) divíziói, a hippocampus CA1 áréája (F) és a gyrus dentatus (DG) (G) területén. Az oszlopok feletti betűk a csoportpárok közötti szignifikáns különbséget jelölik, a post hoc tesztek szerint ( $p < 0,05$ ). Világos oszlopok: PACAP vad típusú (WT), sötét: PACAP géntünetű (KO) egerek. CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz. Lépték:  $100\mu\text{m}$ .

A PVNp területén a WT egerek CVMS hatására közel 14-szeres FOSB/ $\Delta$ FOSB pozitív sejtszám növekedést mutattak (5.10.A ábra a és c oszlop;  $p < 10^{-6}$ ), ellentétben a PACAP KO állatokkal, melyek nem reagáltak a CVMS-re. Hasonló megfigyelést tettünk a PVNm területén (5.10.B ábra) is.

A vLS területén (5.10.C ábra) a WT egerekben a CVMS növelte a FOSB/ $\Delta$ FOSB ir sejtek számát (5.10.C ábra a és c oszlop;  $p < 0,001$ ), míg KO egereknél ezt nem láttuk. Mivel a dLS területén nem láttunk statisztikailag szignifikáns változást, az adatokat nem mutatom be.

A IPAG területén (5.10.D ábra) a CVMS hatására csak WT egérben láttunk szignifikáns FOSB/ $\Delta$ FOSB választ (5.10.D ábra a és c oszlop;  $p < 0,01$ ). A dPAG területén (F5. táblázat) csak negatív eredményeket találtunk.

CVMS hatására az EWcp területén a FOSB/ $\Delta$ FOSB immunjel csak a WT egerekben emelkedett szignifikáns mértékben (5.10.E ábra a és c oszlop;  $p < 0,05$ ), hasonlóan a DR-hoz, ahol a WT egerek mintegy hatszoros FOSB/ $\Delta$ FOSB immunjel növekedéssel reagáltak a CVMS-re (5.10.F ábra a és c oszlop;  $p < 10^{-3}$ ).



**5.10. ábra.** *FOSB/ΔFOSB* immunhisztokémia injekciós kezelésben nem részesült egerek nucleus paraventricularis hypothalami parvocelluláris (PVNp) és magnocelluláris (PVNm) divízióiban. A hisztogramok a *FOSB/ΔFOSB* immunreaktív (ir) neuronok számát mutatják, a PVNp (A), PVNm (B), a nucleus ventralis septi lateralis (vLS) (C), a periaqueductalis szürkeállomány laterális divíziója (IPAG) (D), a centrális projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp) (E) és a nucleus raphe dorsalis (DR) (F) területén. Világos oszlopok: PACAP vad típusú (WT), sötét: PACAP génkiütött (KO) egerek. Az oszlopok feletti betűk a csoportpárok közötti szignifikáns különbséget jelölik, a post hoc tesztek szerint ( $p < 0,05$ ). CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz. III: harmadik agykamra. Lépték: 200 $\mu$ m.

5.1.2.2.2. FOSB/ $\Delta$ FOSB aktivációs mintázat imipraminnal vagy oldószerrel kezelt WT és PACAP KO egereknél, CVMS hatására

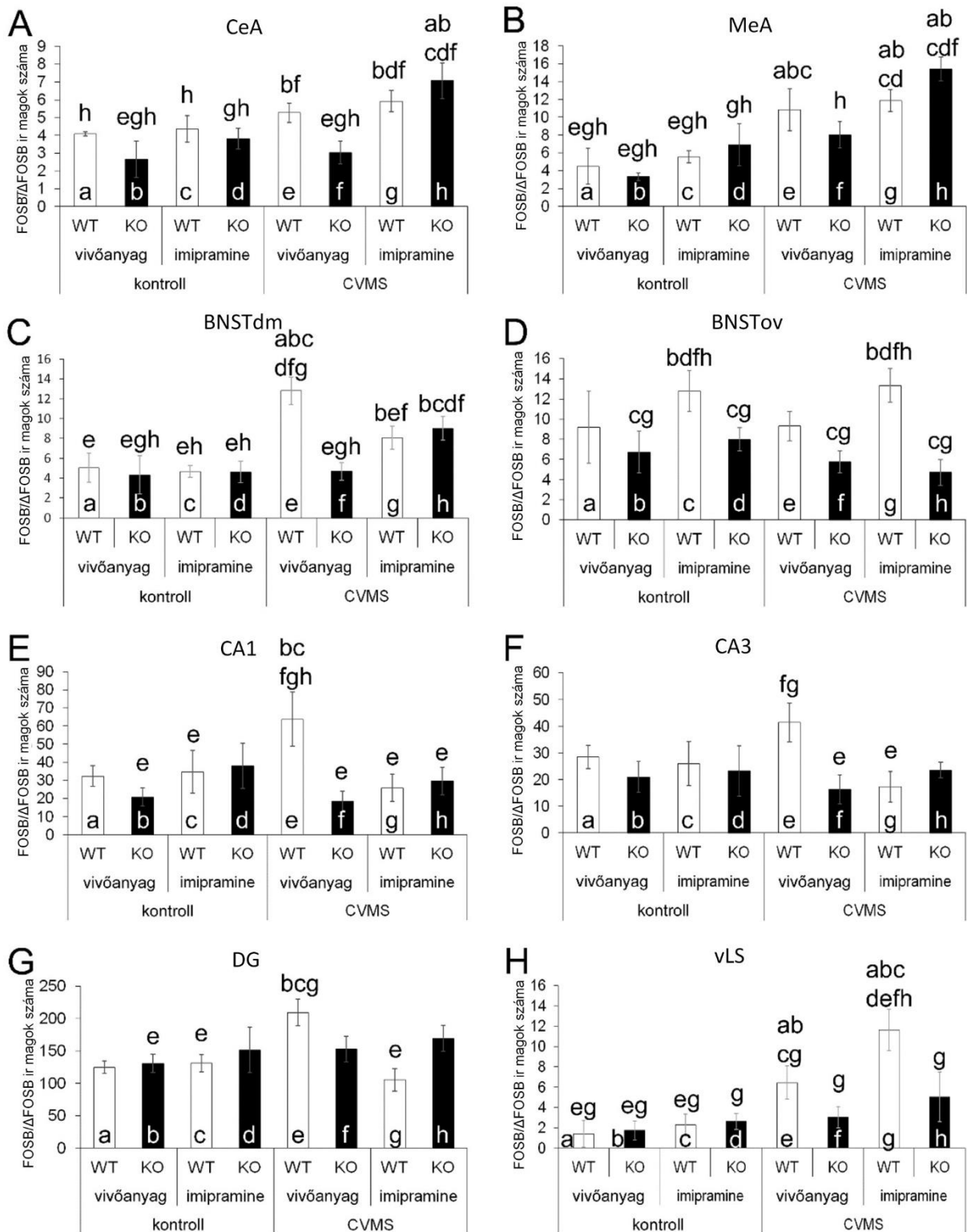
A CeA területén (F6. táblázat, 5.11.A ábra) a vivőanyag (a és e oszlop;  $p=0.38$ ) és az imipramin kezelés (c és g oszlop) a WT egerekben CVMS után nem okozott FOSB/ $\Delta$ FOSB immunjel növekedést. Ezzel ellentétben, a KO egereknél az imipramin növelte a FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitást a CeA területén (f és h oszlop;  $p<0,001$ ). A FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás növekedés mértéke szignifikánsan kisebb volt a KO egereknél, mint a WT állatoknál, a vivőanyaggal kezelt csoportpárok esetén (e és f oszlop;  $p<0,03$ ). Nem láttunk azonban szignifikáns különbség az imipraminnal kezelt stresszelt KO és WT egerek között (g és h oszlop;  $p=0,28$ ).

A MeA területén (5.11.B ábra) a CVMS hozzávetőlegesen kétszeresére növelte FOSB/ $\Delta$ FOSB immunjelet a vivőanyaggal (a és e oszlop;  $p<0,03$ ) és az imipraminnal kezelt (c és g oszlop;  $p<0,01$ ) WT állatok esetén is. A PACAP KO egereknél, a FOSB/ $\Delta$ FOSB jel szignifikánsan erősebb volt stressz hatására, ha az egereket imipraminnal kezeltük (d és h oszlop;  $p<0,01$ ), míg a vivőanyaggal kezelt KO állatok csak tendenciózus FOSB/ $\Delta$ FOSB immunjel növekedést mutattak (b és f oszlop;  $p=0,069$ ) CVMS hatására. A BLA területén semelyik faktor sem befolyásolta a FOSB/ $\Delta$ FOSB jelet (F6. táblázat).

A BNSTdm területén (5.11.C ábra) CVMS hatására FOSB/ $\Delta$ FOSB immunjel közel kétszeresére növekedett a vivőanyagkezelt WT egerek esetében, (vö. az a és e oszlop;  $p<0,001$ ), melyet az imipramin kezelés (g oszlop) visszafordított. A BNSTov területén a KO állatokban az imipramin hatása elmaradt (5.11.D ábra). A BNSTdl és a BNSTv területén nem találtunk szignifikáns statisztikai hatást (F6. táblázat).

A hippocampus-ban, CVMS-nek kitett WT egereknél az imipramin kezelés hatására szignifikánsan kevesebb sejt mutatott FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitást, mindhárom divízióban (e és g oszlopok az 5.11.E-G ábrákon).

A vLS területén (5.11.H ábra) a CVMS csak a WT egereken növelte a FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszámot. A dLS területén nem találtunk szignifikáns hatást.

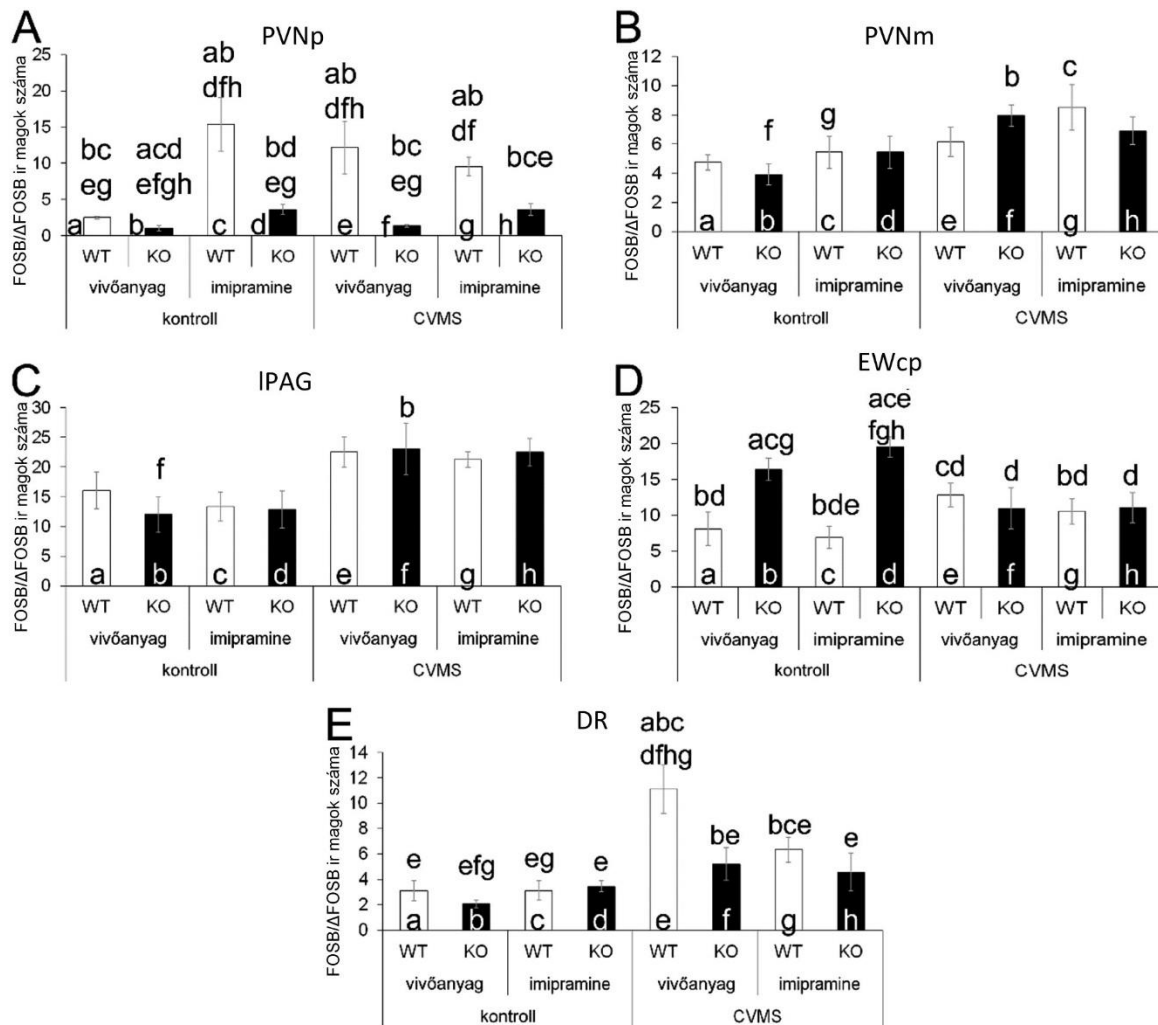


**5.11. ábra.** FOSB/ΔFOSB immunreaktivitás injekciós kezelésben részesült egereknél a nucleus centralis (CeA) (A) és medialis amygdalae (MeA) (B) a nucleus interstitialis striae terminalis dorsomedialis (BNSTdm) (C), ovalis (BNSTov) (D) divíziói, a hippocampus CA1 (E) és CA3 áréája (F), a gyrus dentatus (DG) (G), valamint a nucleus ventralis septi lateralis (vLS) (H) területén. Világos oszlopok: PACAP vad típusú (WT), sötét: PACAP génkiütött (KO) egerek. Az oszlopok feletti betűk a csoportpárok közötti szignifikáns különbséget jelölik, a post hoc tesztek szerint ( $p < 0,05$ ). CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz.

A PVNp területén a CVMS közel ötszörös FOSB/ $\Delta$ FOSB immunjel növekedést okozott a vivőanyaggal kezelt WT csoportban (5.12.A ábra a és e oszlop;  $p < 0,01$ ). Az imipramin kezelés is hasonló FOSB/ $\Delta$ FOSB növekedést okozott a WT egereknél, (a és c oszlop;  $p < 0,001$ ). A PACAP KO egerek nem reagáltak a CVMS-re. Az imipramin hatása a KO egerek esetében is szignifikánsnak, de kisebbnek bizonyult. A PVNm területén (5.12.B ábra) csak a stressznek volt szignifikáns hatása, a kezelésnek és a genotípusnak nem.

A IPAG területén (5.12.C ábra) CVMS hatására KO egereknél erősödött a FOSB/ $\Delta$ FOSB immunjel (b és f oszlop,  $p < 0,05$ ). A dPAG területén (F6. táblázat) csak negatív eredményeket kaptunk.

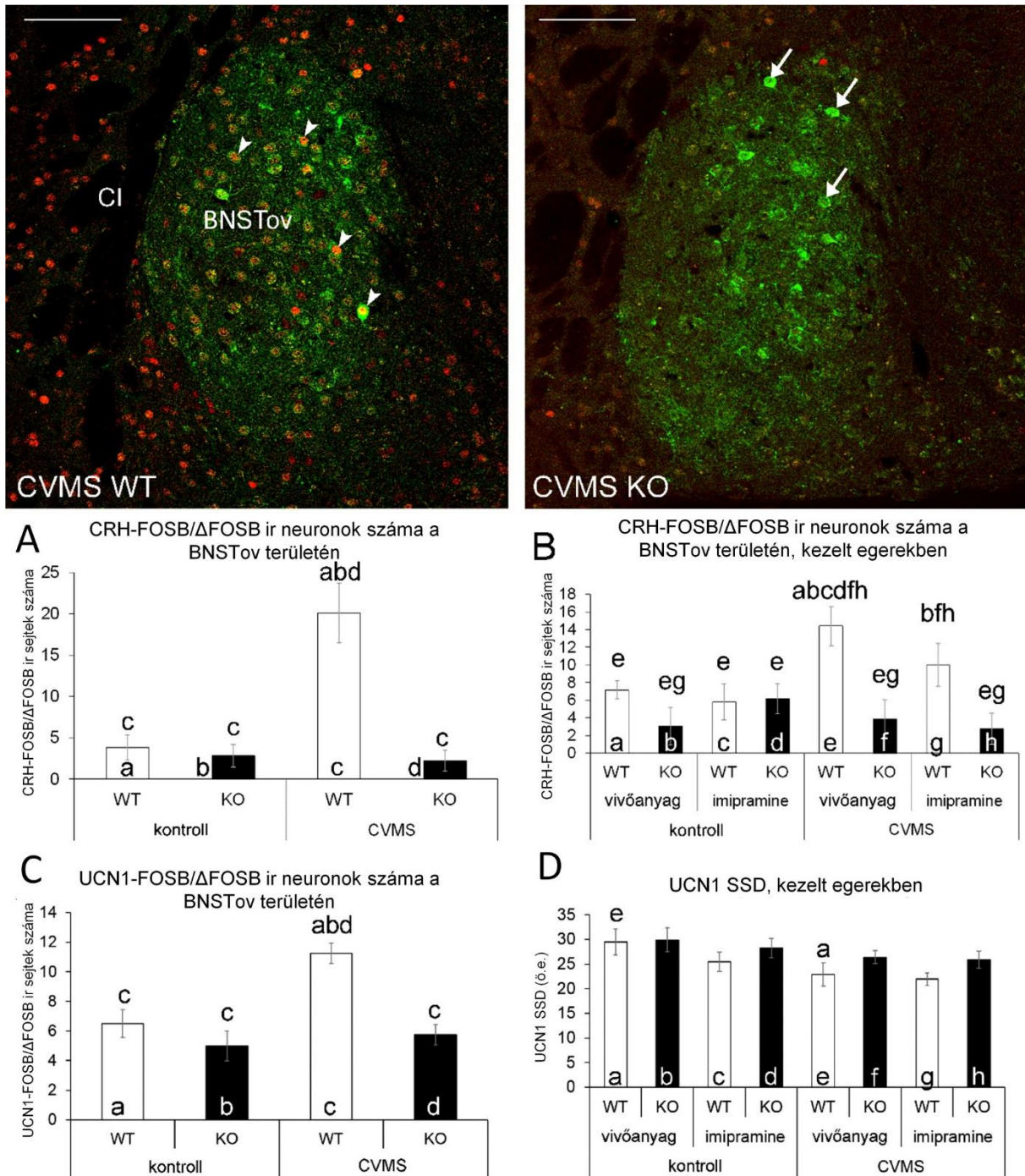
Az EWcp területén, a KO állatok magasabb bazális FOSB/ $\Delta$ FOSB jelet mutattak, melyet a stresszexpozíció nem növelt meg (5.12.D ábra a és b ill. c és d oszlop;  $p < 0,04$ ). A DR területén a vivőanyaggal kezelt WT egereknél a CVMS háromszorosára növelte a FOSB/ $\Delta$ FOSB ir neuronok számát (5.12.E ábra a és e oszlop;  $p < 0,001$ ). Az imipraminnal kezelt WT állatok esetében a FOSB/ $\Delta$ FOSB jelnövekedés kisebb mértékű volt (5.12.E ábra e és g oszlop;  $p < 0,01$ ). KO egereknél a CVMS nem növelte a FOSB/ $\Delta$ FOSB mennyiségét a DR területén.



**5.12. ábra.** FOSB/ΔFOSB immunreaktivitás injekciós kezelésben részesült egereknél, a nucleus paraventricularis hypothalami parvocelluláris (PVNp) (A) és magnocelluláris (PVNm) (B) részében, a periaqueductalis szürkeállomány laterális divíziójában (IPAG) (C), a centrális projekciójú Edinger-Westphal magban (EWcp) (D) és a nucleus raphe dorsalis (DR) (E) területén. Világos oszlopok: PACAP vad típusú (WT), sötét: PACAP géntünetű (KO) egerek. Az oszlopok feletti betűk a csoportpárok közötti szignifikáns különbséget jelölik, a post hoc tesztek szerint ( $p < 0,05$ ). CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz.

### 5.1.2.2.3. A BNSTov CRH neuronjainak aktivációs mintázata

A BNSTov területén a CRH neuronok FOSB/ΔFOSB aktivációját is megvizsgáltuk (5.13. ábra). A nem kezelt egerek esetében (F7. táblázat), CVMS hatására, a WT állatok CRH sejtjeiben (5.13.A ábra  $p < 10^{-4}$ ) FOSB/ΔFOSB immunreaktivitás-növekedést találtunk, míg a KO egerek esetében ez nem volt jellemző (5.13.A ábra;  $p = 0,89$ ). A kezelt csoportokban (F8. táblázat), a vivőanyaggal kezelt WT csoportok esetében, a CVMS FOSB/ΔFOSB jelnövekedést okozott a CRH neuronokban (5.13.B ábra a és e oszlop;  $p < 0,04$ ). Imipramin kezelt WT egereknél ez nem érte el a szignifikancia szintjét (c és g oszlop;  $p = 0,16$ ). A KO állatok BNSTov/CRH neuronjai egyáltalán nem mutattak FOSB/ΔFOSB választ.



**5.13. ábra.** Kettős immunfluoreszcens jelölés a nucleus interstitialis striae terminalis ovális magjában (BNSTov) krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) után. A zöld jel a corticotropin-releasing hormon (CRH), a piros a FOSB/ΔFOSB immunreaktivitást mutatja CVMS hatására vad típusú (WT) és PACAP géniüött (KO) egerekben. A nyílhegyek FOSB/ΔFOSB immunreaktív (ir) magokat mutatnak a CRH neuronokban. A nyilak olyan CRH neuronokat jelölnek, melyek nem mutatnak FOSB/ΔFOSB immunreaktivitást. A CRH-FOSB/ΔFOSB kolokalizációt mutató neuronok száma az injekciós kezelésben nem részesült (A) illetve a kezelt egerek csoportjaiban (B). Urocortin 1 (UCN1) és FOSB/ΔFOSB kolokalizációt mutató neuronok száma a centrális projekciójú Edinger-Westphal magban (EWcp) a kezeletlen csoportokban (C). A (D) panel az UCN1 neuronok specifikus jeldenzítését (SSD) mutatja kezelt egerekben az EWcp területén, önkényes egységben (ö.e.) kifejezve. Világos oszlopok: PACAP vad típusú (WT), sötét: PACAP géniüött (KO) egerek. Az oszlopok feletti betűk a csoportpárok közötti szignifikáns különbséget jelölik, a post hoc tesztek szerint ( $p < 0,05$ ). CI: capsula interna, CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz. Lépték: 100 $\mu$ m.



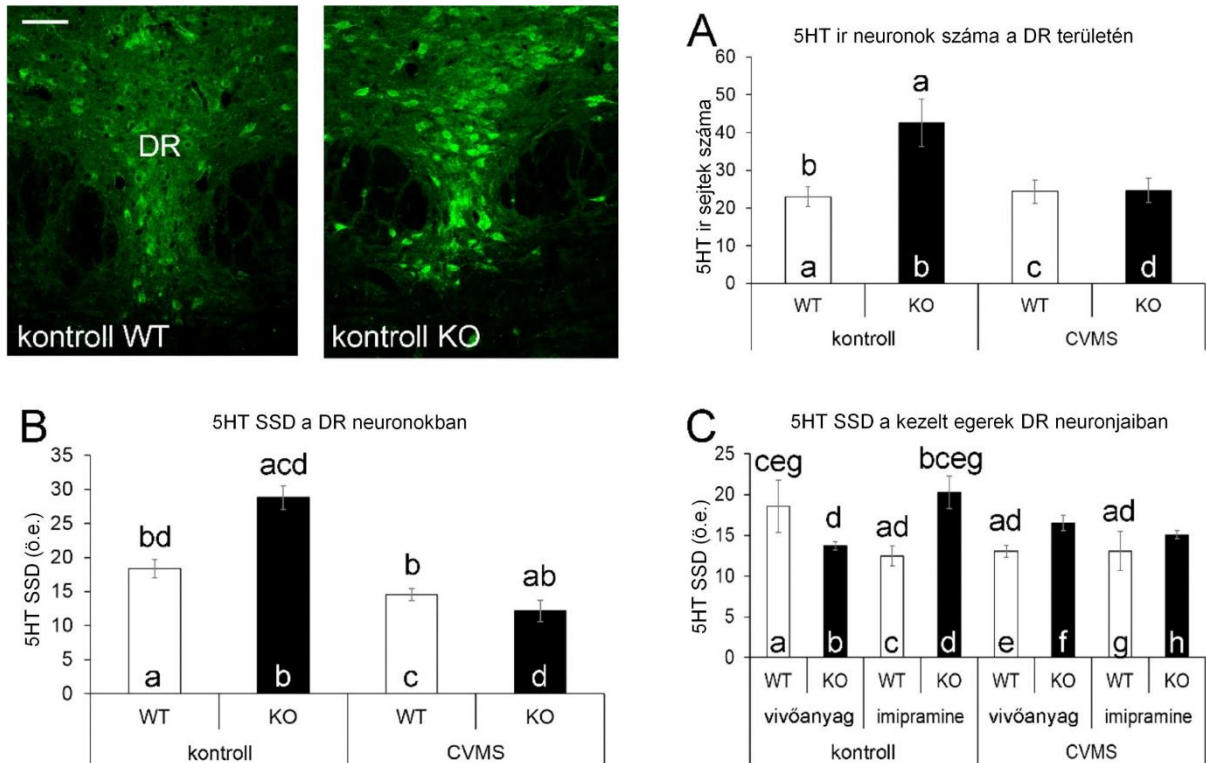
#### 5.1.2.2.4. A EW<sub>cp</sub> UCN1 tartalmú idegsejtjeinek aktivációs mintázata

Az UCN1-FOSB/ $\Delta$ FOSB (F7-8. táblázat) pozitív sejtek száma mintegy kétszer magasabb volt a CVMS-nek kitett WT egereknél (5.13.C ábra a és c oszlop;  $p < 0,01$ ), míg a KO állatok nem reagáltak (c és d oszlop;  $p = 0,57$ ). Stressz hatása az UCN1 immunjel intenzitása vivőanyaggal kezelt WT egereknél 22%-kal alacsonyabb volt, mint a nem stresszelt csoportban (5.13.D ábra a és e oszlop;  $p < 0,04$ ).

#### 5.1.2.2.5. Változások a szerotoninerg DR-ban

A kontroll KO egerekben majdnem kétszer több 5HT/DR neuront számoltunk, mint a WT állatoknál (F7. táblázat, 5.14.A ábra a és b oszlop;  $p < 0,01$ ), mely különbség CVMS hatására eltűnt. Az 5HT SSD-t (5.14.B ábra) a nem kezelt kontroll KO egerek esetében 36,22%-kal magasabb volt, mint a WT állatoknál (5.14.B ábra a és b oszlop;  $p < 0,001$ ), mely eltérés CVMS után eltűnt.

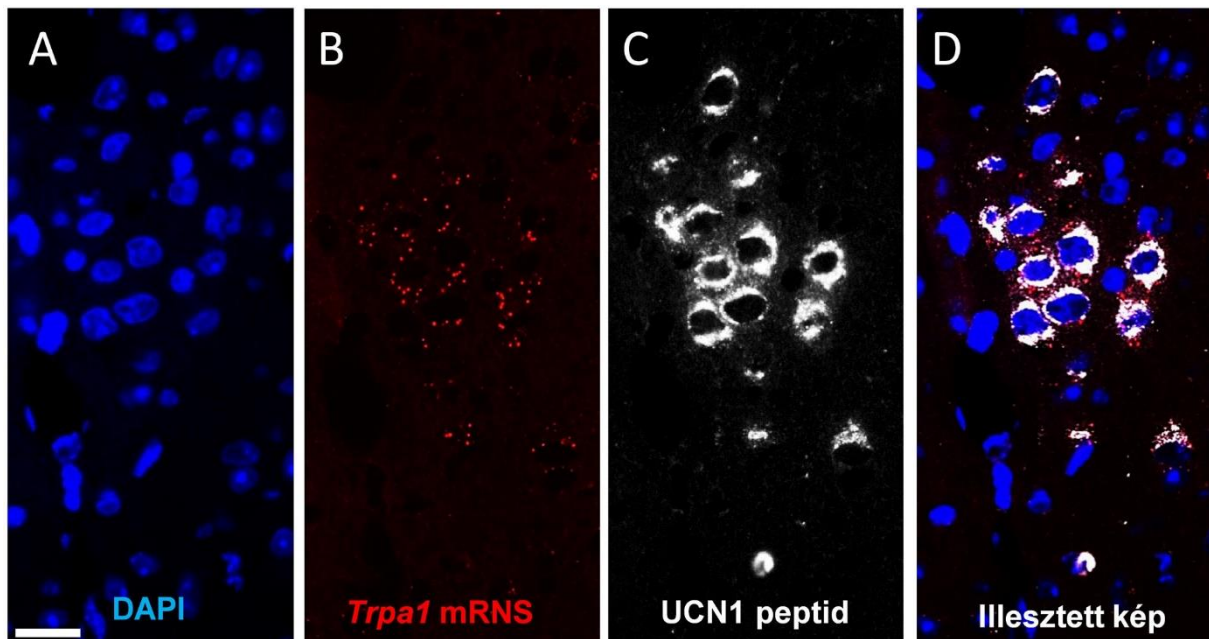
A kezelt WT csoportoknál (F8. táblázat) az imipramin csökkentette az 5HT SSD-t (5.14.C ábra a és c oszlop;  $p < 0,02$ ) míg a KO kontroll egereknél növekedést eredményezett (b és d oszlop;  $p < 0,02$ ). A CVMS csökkentette az 5HT SSD-t a vivőanyaggal kezelt WT egereknél (a és e oszlop;  $p < 0,03$ ), míg KO egereknél nem találtunk ilyen különbséget (b és f oszlop;  $p = 0,27$ ). A CVMS nem csökkentette az 5HT SSD-t az imipraminnal kezelt (e és g oszlop;  $p = 0,93$ ) WT állatoknál. A stresszelt csoportpárok között nem találtunk szignifikáns különbséget a kezelés és a genotípus alapján ( $p > 0,05$ ).



**5.14. ábra.** Szerotonin (5HT, zöld) immunfluoreszcens jelölés a nucleus raphe dorsalis (DR) területén kontroll, nem kezelt vad típusú (WT) és PACAP génkiütött (KO) egerekben. Az (A) hisztogram a szerotonin immunreaktív (ir) neuronok számát és azok specifikus jeldenzítését (B) (SSD) mutatja önkényes egységben (ö.e.) kifejezve, kezeletlen egerekben. A (C) panel az 5HT SSD értéket kezelt egerekben mutatja. Világos oszlopok: PACAP vad típusú (WT), sötét: PACAP génkiütött (KO) egerek. Az oszlopok feletti betűk a csoportpárok közötti szignifikáns különbséget jelölik, a post hoc tesztek szerint ( $p < 0,05$ ). CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz. Lépték:  $50\mu\text{m}$ .

### 5.I.3. A TRPA1 KO egértörzs vizsgálata a CVMS-ben

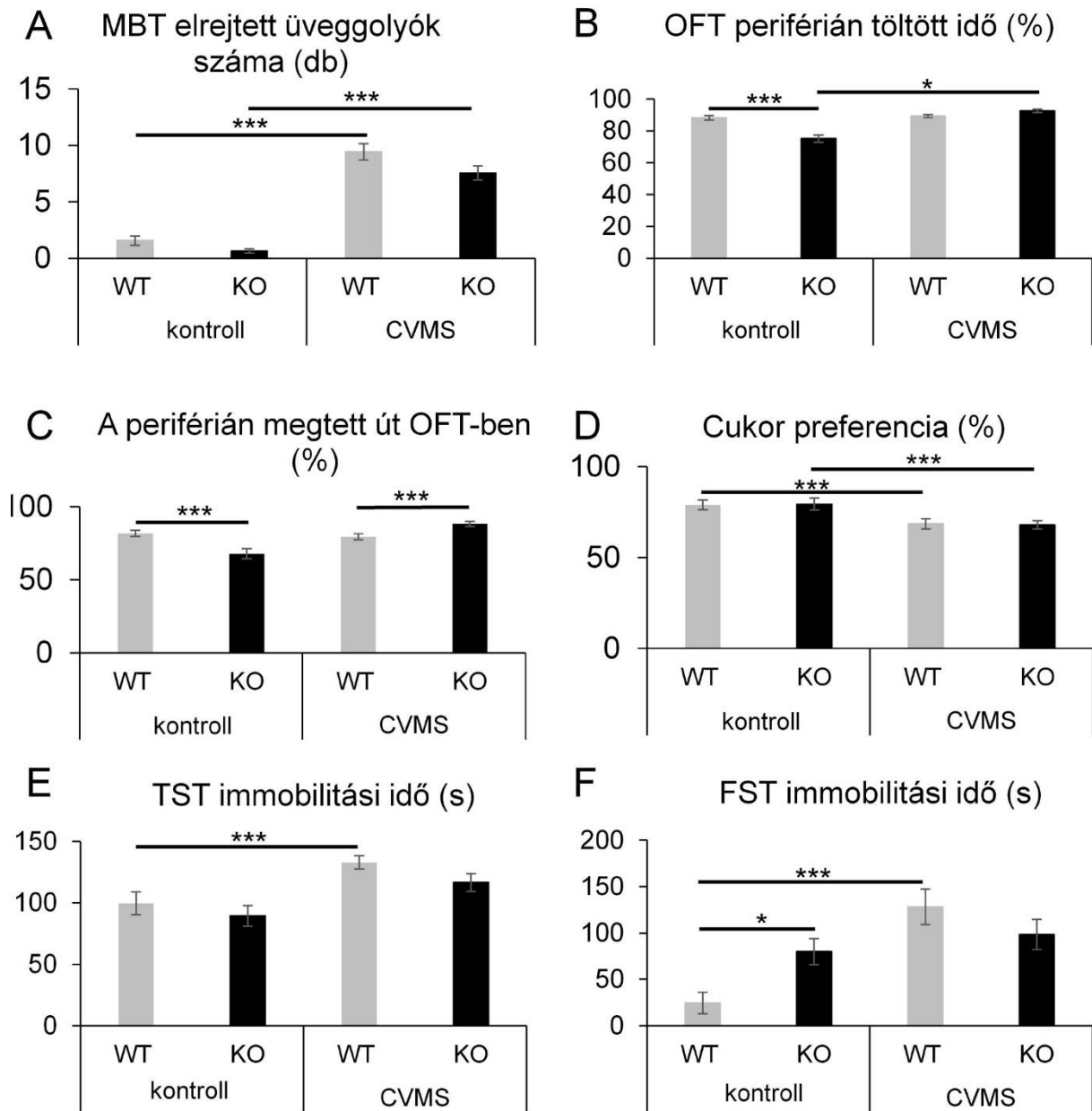
Előkísérleti eredmények és a génexpresszió-térkép adatbázisának információi alapján felmerült, hogy a *Trpa1* mRNS jelen van az EW mag területén. Annak érdekében, hogy ezt bizonyítsuk, RNAscope ISH-t kombináltunk immunfluoreszcens jelöléssel, és azt találtuk, hogy a *Trpa1* mRNS az EWcp/UCN1 neuronjaiban fejeződik ki. Kiemelendő, hogy az agyterület más (azaz nem UCN1 ir) neuronjaiban nem találtunk jelentős mennyiségű *Trpa1* mRNS-t (5.15. ábra). Ebből arra következtettünk, hogy a TRPA1 hozzájárulhat a hangulat és a stresszadaptáció modulációjához az EWcp/UCN1 neuronokon keresztül, ezért a TRPA1 KO egereket is megvizsgáltuk a CVMS modellben. Az eredmények leírása a post hoc tesztek alapján történt, az ezek alapjául szolgáló ANOVA eredmények az F9. táblázatban találhatóak.



**5.15. ábra.** A centrális projekciójú Edinger-Westphal mag urocortin 1 (C, UCN1, fehér immunjel) tartalmú idegsejtjeiben *Trpa1* mRNS (B, vörös jel, RNAscope ISH) fejeződik ki. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, kék az A panelen) magfestés. A D illesztett képen látható a teljes kolokalizáció. Lépték: 25 $\mu$ m.

#### 5.1.3.1. Viselkedési tesztek

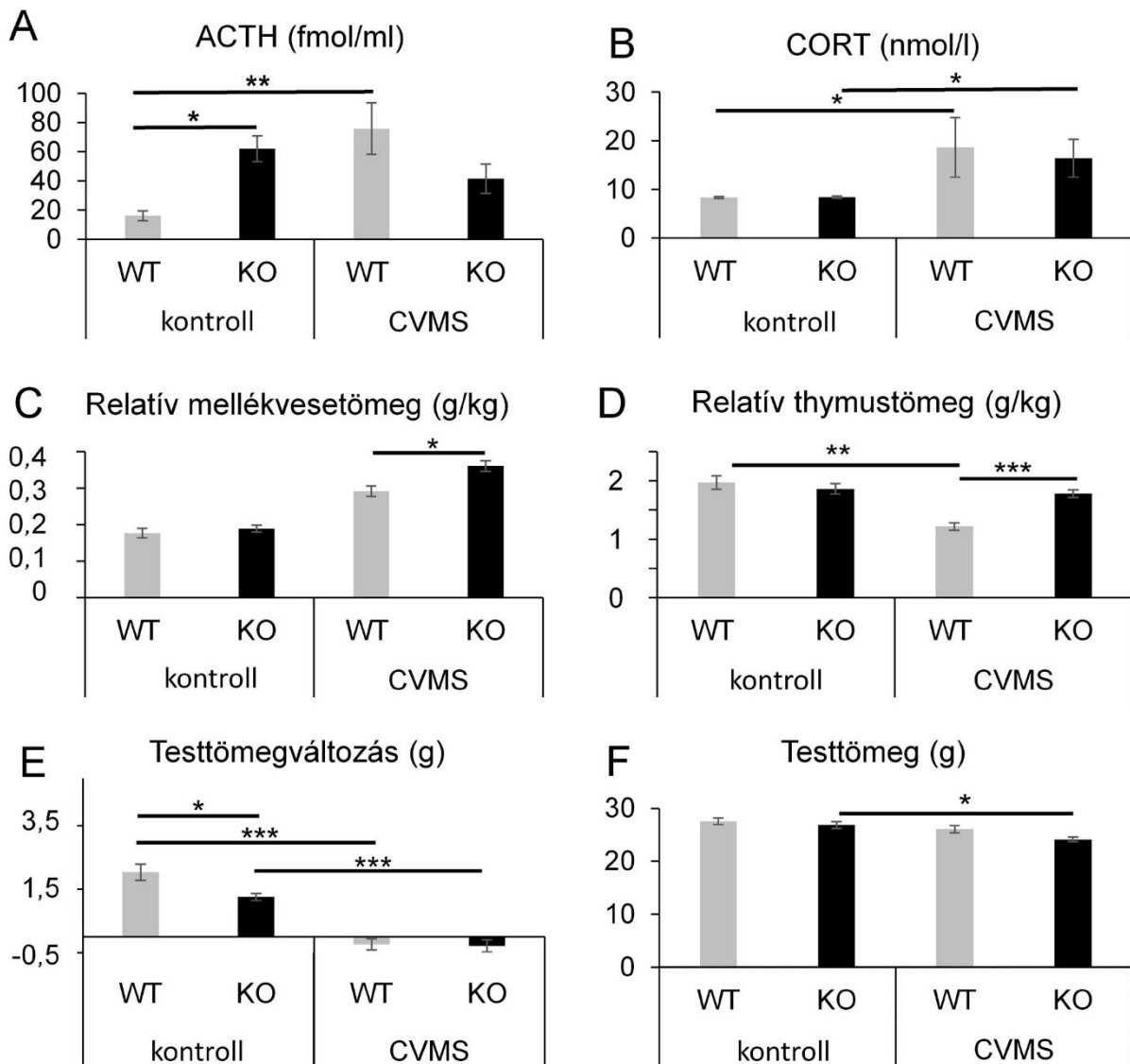
A MBT-ben a CVMS növelte az elrejtett golyók számát mind a WT, mind a TRPA1 KO egerekben. A TRPA1 KO egerek kevesebb golyót temettek el, mint a WT-ak (5.16.A ábra). OFT-ben a TRPA1 KO egerek kevesebbet mozogtak a periférián (5.16.B ábra,  $p=10^{-4}$ ). Ezzel szemben, CVMS expozíció hatására a KO egerek többet mozogtak a széli részen, mint a WT egerek ( $p=0,008$ ). Az OFT-ben a periférián töltött időre, mint fő szorongási paraméterre, a CVMS eltérő hatással volt a két genotípusban: kontroll KO egerek kevesebb időt töltöttek (5.16.C ábra) az eszköz falai mellett, mint a WT-ak ( $p<10^{-6}$ ), és érdekes módon a CVMS csak a KO egerekben növelte a szorongás szintjét (5.16.C ábra,  $p<10^{-6}$ ). SPT-ben CVMS hatására mind a WT ( $p=0,01$ ) mind a TRPA1 KO ( $p=0,01$ ) genotípusban csökkent az édes íz preferencia (5.16.D ábra), azaz, nőtt az anhedónia. TST-ben CVMS expozíció után mind a WT ( $p=0,003$ ), mind a TRPA1 KO ( $p=0,014$ ) egerekben nőtt az immobilitási idő (5.16.E ábra). FST-ben, a CVMS a két genotípusban eltérően befolyásolta az immobilitást, mivel a kontroll TRPA1 KO egereknél eleve magasabb volt az immobilitási szint, mint a WT egereknél ( $p=0,02$ ). A TRPA1 KO egerek e fokozott depressziószerű viselkedését a CVMS nem változtatta meg ( $p=0,82$ ), míg a WT egereknél drámaian ( $p<10^{-3}$ ) megnövelte azt (5.16.F ábra).



**5.16. ábra.** A *TRPA1* génkiütött (*KO*) egértörzs vizsgálata során végzett viselkedési tesztek eredményei. **(A)** A szorongási szint felméréséhez marble burying tesztben (*MBT*) az elrejtett golyók számát, **(B)** open field tesztben (*OFT*) az aréna perifériás részén töltött idő arányát mértük. A lokomotoros aktivitást **(C)** az *OFT*-ben megtett távolság alapján értékeltük. **(D)** Az anhedónia szintet cukorpreferencia tesztel határoztuk meg. A depressziószerű viselkedést a tail suspension (*TST*, **E**) és a forced swim tesztekben (*FST*, **F**) az immobilitási idő formájában értékeltük. Fisher-féle post hoc teszt: \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .  $n = 14-16$ /csoport. A szürke oszlopok: vad típusú (*WT*) egerek; fekete oszlopok: *TRPA1 KO*. *CVMS*: krónikus variábilis enyhe stressz.

### 5.1.3.2. Endokrin és fizikai paraméterek

A CVMS hatékonyan ( $p=0,001$ ) növelte az ACTH mennyiségét a WT egerekben ( $p=0,001$ ). A KO egerek kiindulási ACTH szintje jelentősen magasabb volt, mint a WT egereké ( $p=0,015$ ), és a CVMS nem okozott további emelkedést ( $p=0,26$ ) (5.17.A ábra). A CVMS genotípustól függetlenül szignifikánsan növelte a CORT koncentrációt (5.17.B ábra). Ennek megfelelően, a relatív mellékvesetömeg nagyobb volt krónikus stresszt követően. A CORT-nal ellentétben, a CVMS hatása a mellékvesetömegre eltérő volt a WT és a TRPA1 KO egerekben. A stressznek kitett TRPA1 KO egerek mellékvesetömege szignifikánsan nagyobb volt ( $p=0,004$ ), mint a CVMS-nek kitett WT egereké. A CVMS jelentősen csökkentette a relatív thymustömeget (5.17.D ábra). Ez a hatás azonban csak a WT egereknél volt szignifikáns. Ezzel szemben, a thymus tömege nem változott a stresszelt TRPA1 KO csoportban ( $p=0,48$ ). A testtömegadatok értékelése azt mutatta, hogy a CVMS mind a WT ( $p<10^{-6}$ ), mind a TRPA1 KO egerekben ( $p<10^{-6}$ ) megállította a gyarapodást (5.17.E ábra). A TRPA1 KO egerek szignifikánsan kevesebbet híztak, mint WT társaik. A CVMS expozíció előtt a testtömeg adatok nem mutattak statisztikai különbségeket, de azt követően (5.17.F ábra) a TRPA1 KO egerek tömege alacsonyabb volt, mint a kontroll egereké ( $p=0,013$ ), míg a WT egereknél ez a különbség tendenciózus volt csupán ( $p=0,095$ ). A stressznek kitett WT és TRPA1 KO állatok abszolút testtömegadatai sem különböztek szignifikánsan ( $p=0,117$ ).

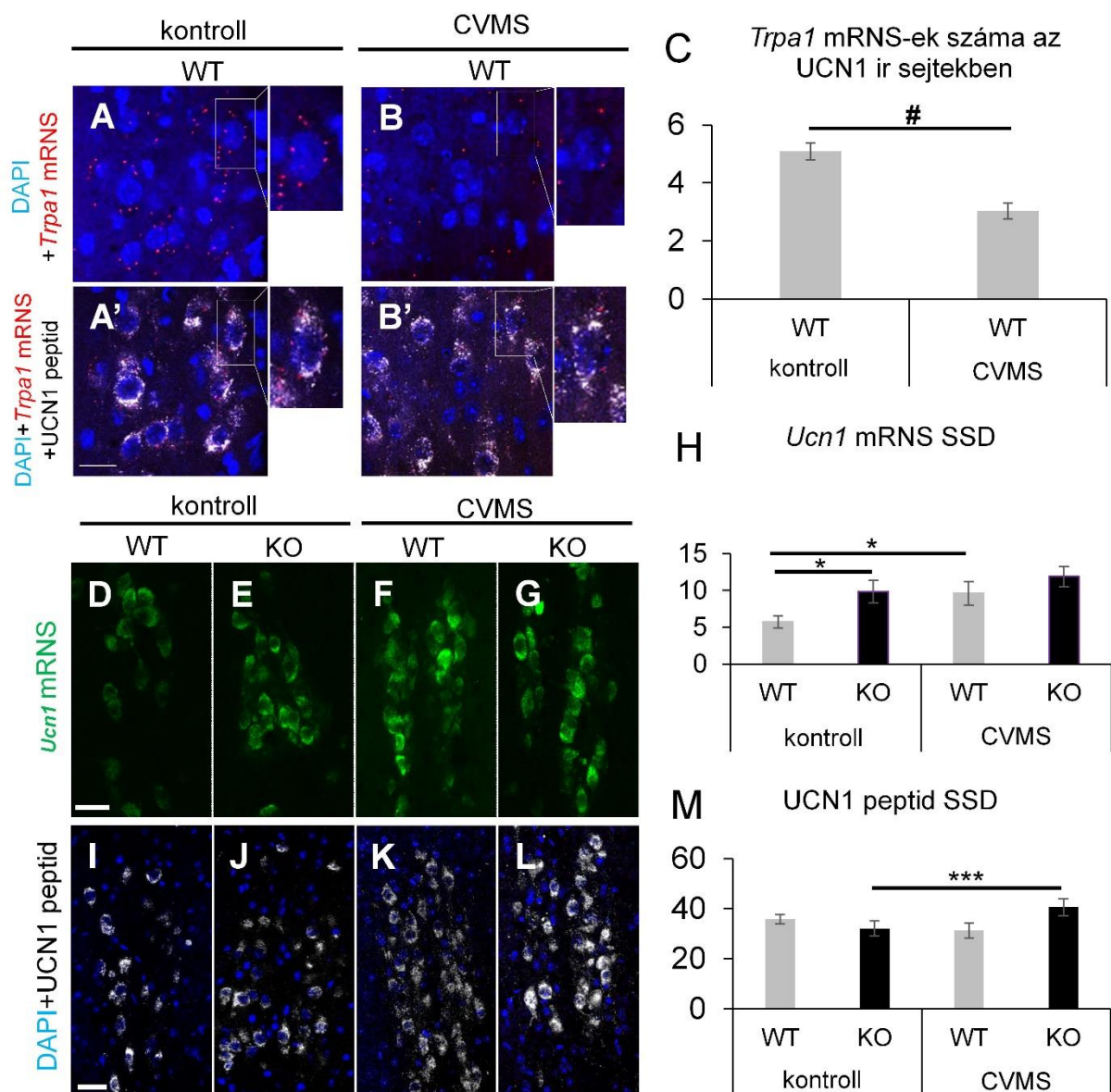


**5.17. ábra.** A krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) modell hatékonyságának indikátorai. A hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengely aktivitását (A) szérumban adrenocorticotrop hormon (ACTH) és (B) kortikoszteron (CORT) titer meghatározásával értékeltük. Megállapítottuk, hogy (C) a relatív mellékvesetömeg, (D) a relatív thymustömeg és (E) a testtömegváltozás tükrözte a krónikus stressz által kiváltott szomatikus változásokat. Az egerek abszolút testtömege (F) az *in vivo* kísérlet végén. Fisher-féle post hoc teszt: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .  $n = 14-16$ /csoport. A szürke oszlopok a vad típusú, a feketék a *TRPA1* génkiütött (KO) egereket jelölik.

### 5.1.3.3. A CVMS befolyásolja a *Trpa1* és az UCN1 expresszióját

Annak felmérésére, hogy a CVMS hogyan befolyásolja a *Trpa1* transzkriptumok számát az EWcp/UCN1 sejtekben, a WT állatokon RNAscope ISH-t végeztünk a *Trpa1* kimutatására, UCN1 immunfestéssel kombinálva. Újra megerősítettük a *Trpa1* mRNS jelenlétét az UCN1 neuronokban, és a szemikvantitáció kimutatta, hogy a CVMS 40%-kal csökkentette a *Trpa1* transzkriptumok számát az UCN1 neuronokban (5.18.A-C ábra,  $t(11) = 5,09$ ;  $p = 0,003$ ). Ezután, a sejtek *Ucn1* mRNS-tartalmát RNAscope segítségével, az UCN1 peptidtartalmát pedig

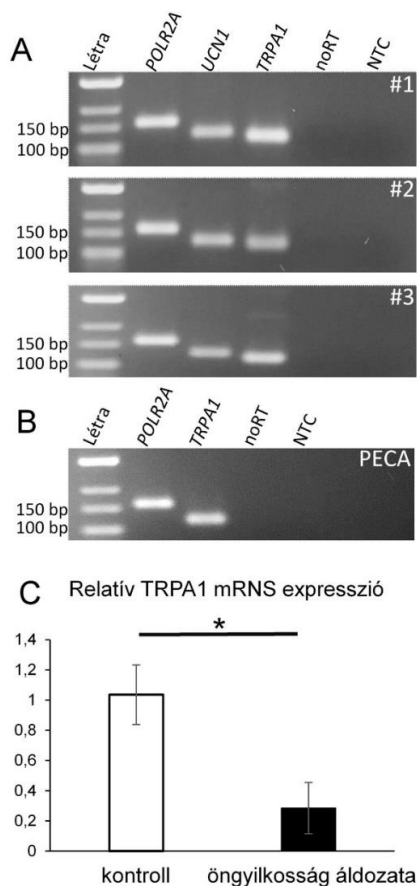
immunjelölés segítségével vizsgáltuk, mindkét genotípusban. A kontroll TRPA1 KO egerekben a kontroll WT egerekhez képest emelkedett *Ucn1* mRNS tartalmat figyeltünk meg (5.18.D-H ábra). CVMS hatására a WT egerekben az *Ucn1* mRNS erős növekedési tendenciát mutatott ( $p=0,059$ ), míg a TRPA1 KO egerekben nem észleltünk jelentős változást ( $p=0,31$ ). Peptidszinten, a genotípus módosította a stressz hatását. A post hoc összehasonlítások kimutatták, hogy a TRPA1 KO egerek EWcp sejtjei CVMS hatására több UCN1 peptidet tároltak, mint a kontroll TRPA1 KO egereké ( $p=0,047$ , 5.18.I-M ábra). Annak tesztelésére, hogy a CVMS globális hatással van-e a *Trpa1* expressziójára, ganglion trigeminale mintákon RT-qPCR mérést végeztünk. A kontroll ( $1,03\pm 0,10$ ) és a CVMS ( $1,01\pm 0,04$ ) csoportok között nem észleltünk különbséget ( $t(13)=0,11$ ;  $p=0,91$ ).



**5.18. ábra.** (95. oldal) *Trpa1*, *Ucn1* mRNS és *UCN1* peptid expressziója a centrális projekciójú Eninger-Westphal magban (EWcp) krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) hatására. (A és B) A *Trpa1* mRNS (piros) a CVMS-nek kitett vad típusú (WT) egerekben csökkent (C). A *Trpa1* mRNS transzkriptumok az *UCN1* peptidet (fehér, A' és B') tartalmazó sejtekben jelennek meg. (D-H) Az *Ucn1* mRNS (zöld) nagyobb mennyiségben fejeződött ki a kontroll *TRPA1* knockout (KO) egerekben (fekete oszlopok). A CVMS csak a WT egerekben növelte az *Ucn1* mRNS expresszióját (szürke oszlopok). (I-M) Az *UCN1* peptid (fehér) specifikus jeldenzitása (SSD) a *TRPA1* KO egerekben CVMS hatására emelkedett. 4',6-diamidino 2-fenilindol (DAPI, kék) sejtmagjelölés. # $p < 0,05$  Student-féle *t* próba. \* $p < 0,05$ , Fisher-féle *post hoc* teszt. Lépték: A-B' 20 $\mu$ m; D-G ill. I-L 50 $\mu$ m.

5.1.3.4. A *TRPA1* mRNS jelen van az emberi EWcp-ben és mennyisége kisebb öngyilkosságok áldozataiban

Hogy egerben tett megfigyeléseink translációs értékét megvizsgáljuk, emberi mintákon is végeztünk vizsgálatokat. A *TRPA1* és a *POLR2A* háztartási gén mRNS-e mindhárom kontroll emberi EWcp mintában kimutatható volt. Az *UCN1* transzkriptumok jelenléte megerősítette, hogy minden minta tartalmazta az EWcp területét (5.19.A ábra). Három kontroll és 3 öngyilkos elhunyt EWcp mintájában mind a *TRPA1*, mind a *POP4* referencia gén mRNS-e kimutatható volt TaqMan teszt segítségével. A kontrollokhoz képest a *TRPA1* mRNS szignifikánsan downregulált volt ( $t(4)=2,88$ ;  $p=0,044$ ) (5.19.B ábra).



**5.19. ábra** A *TRPA1* kimutatása RT-PCR segítségével. A RT-PCR termékek elektroforetogramjai. Három (1-3) ember centrális projekciójú Eninger-Westphal mag (EWcp) mintáit vizsgáltuk meg (A), és *TRPA1* expresszáló humán szájüregi laphámsejt karcinóma tenyészetet (PECA; PE/CAPJ41; D2 klón) használtunk pozitív kontrollként (B). A referencia gén (DNS-függő RNS polimeráz II *RPB1* alegység; *POLR2A*, a termék mérete 152 bázispár, bp) és a vizsgált gén (*TRPA1*, a termék mérete 115 bp) minden EWcp mintában és a PECA sejt kultúrában is kifejeződött. Az urocortin 1 (*UCN1*; a termék mérete 123 bp) RT-PCR termék jelenléte bizonyította, hogy minden agymintában megtalálható volt az EWcp területe. Reverz transzkriptáz nélküli (noRT) és templát nélküli kontrollt (NTC) használtunk. (C) TaqMan RT-qPCR-rel meghatározott relatív *TRPA1* génexpresszió kontroll ( $n=3$ ) és öngyilkosság következtében elhunyt ( $n=3$ ) férfiak EWcp mintáiban (\* $p < 0,05$ ; Student-féle *t* próba).



## 5.II. A depresszió három találat elmélet modelljének kifejlesztése és validálása egérben

Ebben a fejezetben a depresszió három találat elméletén alapuló új egérmodellünk konstrukciós és fenomenológiai validitását vizsgáló munkánk eredményeit foglalom össze röviden. A modell megbízhatóságát fizikai, endokrinológiai és viselkedési tesztek segítségével vizsgáltuk, valamint a funkcionális-morfológiai tesztek végeztünk a BNSTov/CRH, EWcp/UCN1 és DR/5HT rendszereken. Ahogy azt a Módszerek fejezetben részleteztem, hím PACAP WT, HZ és KO egereket vizsgáltunk, amelyek eltérő minőségű anyai gondoskodásban részesültek (AFR, MS15 vagy MD180), majd CVMS-nek tettük ki őket, kontrollokkal szemben.

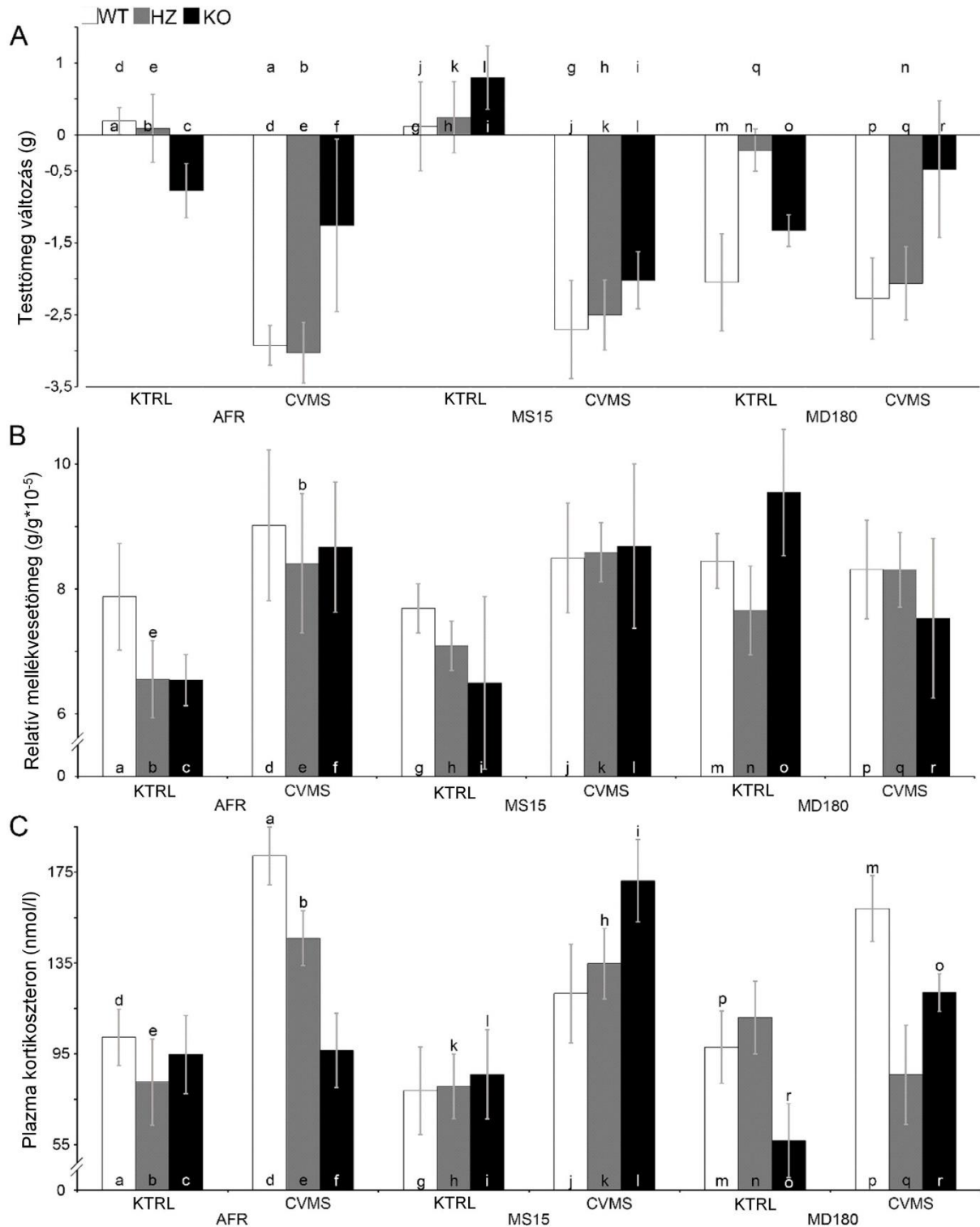
### 5.II.1. A PACAP génmódosított egértörzs a három találat elmélet modelljében

#### 5.II.1.1. Fizikai és endokrin paraméterek

A CVMS expozíció a WT ( $p < 10^{-3}$ ) és HZ ( $p < 10^{-5}$ ) AFR állatokban szignifikáns (F10. táblázat) testsúlycsökkenést okozott (5.20.A ábra, a és d oszlop, illetve b és e oszlop). Az MS15 egereknél, a CVMS minden genotípusban csökkentette a testtömeget (WT:  $p < 0,01$ ; HZ:  $p < 10^{-4}$ ; KO:  $p < 0,01$ ; vö. a g, h, i oszlopokat a j, k és l oszlopokkal). Az MD180 HZ egerek testtömeget a CVMS csökkentette (n és q oszlopok;  $p < 0,05$ ).

A mellékvesetömeg adatok igazolták a CVMS paradigmánk hatékonyságát (MANOVA:  $F_{17,98} = 4,443$   $p < 0,05$ , F10. táblázat). Bár a CVMS által kiváltott mellékvesetömeg emelkedés nem érte el a szignifikáns értéket minden csoportpárban, a HZ AFR egerek CVMS expozíciója a mellékvesetömeg 28%-os emelkedését eredményezte (5.20.B ábra, b és e oszlop;  $p < 0,05$ ).

A plazma CORT értékek szintén alátámasztották a CVMS hatékonyságát (F10. táblázat). A WT és HZ AFR állatok a CVMS-re 78%-os (5.20.C ábra, a és d oszlop;  $p < 0,005$ ), illetve 76,7%-os (b és e oszlop;  $p < 0,005$ ) CORT szint növekedéssel reagáltak, míg a KO egerek elhanyagolható változást mutattak (c és f oszlop;  $p = 0,95$ ). Az MS15 egerek CVMS expozíciója 67,01%-os CORT titer növekedést okozott a HZ (h és k oszlop;  $p < 0,05$ ) és 99,13%-os emelkedést a KO állatokban (i és l oszlop;  $p < 0,01$ ), míg a WT állatok 54,41%-os CORT emelkedése nem érte el a statisztikai szignifikanciát ( $p = 0,10$ ). Mind az MD180 WT, mind a KO állatok szignifikáns CORT emelkedéssel reagáltak (m és p ill. o és r oszlopok;  $p < 0,05$ ). Meglepő módon, az MD180 HZ állatok a CORT érték tekintetében nem reagáltak (n és q oszlop;  $p = 0,31$ ).



**5.20. ábra.** Fizikai és endokrin paraméterek a stresszmodell hatékonyságának vizsgálatára. Testtömegváltozást (A) grammban (g) kifejezve a krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) időtartama alatt. (B) A testtömegre vonatkoztatott mellékvesetömeg ( $\times 10^{-5}$  g/g). (C) Plazma kortikoszteron szint (nmol/l). Fehér oszlopok: vad típusú (WT), szürke oszlopok: PACAP heterozigóta (HZ), fekete oszlopok: PACAP génkiütött (KO) állatok. AFR: normál állatházi tartás, MS15 és MD180: 15 ill. 180 perces anyai megvonás. KTRL: kontroll, CVMS expozíció nélkül. Az oszlopok feletti betűk a csoportpárok közötti leglényegesebb szignifikáns statisztikai különbségeket jelölik, a post hoc tesztek szerint ( $p < 0,05$ ).

## 5.II.1.2. Viselkedési tesztek

## 5.II.1.2.1. Forced swim teszt

Az anyai gondoskodás minőségének hatása (F10. táblázat) a depressziósintre az AFR KTRL WT és MD180 KTRL WT állatok összehasonlításában szembetűnő volt (5.21.A ábra, a és m oszlop;  $p < 0,01$ ). CVMS hatására az MD180 HZ egerek 130%-os immobilitási idő növekedést mutattak (n és q oszlopok;  $p < 0,005$ ). Az AFR és MS15 HZ egereknél az immobilitási idő nem változott CVMS hatására (b és e ill. h és k oszlopok). Az AFR WT állatok szignifikáns immobilitási idő növekedéssel reagáltak CVMS-re (a és d oszlopok;  $p < 0,05$ ). Érdekes módon, az AFR KO állatoknál, paradox módon, csökkent az immobilitási idő a CVMS-t követően (f és c oszlop;  $p < 0,001$ ).

## 5.II.1.2.2. Tail suspension teszt

A CVMS nem befolyásolta a MD180-n átesett WT és HZ állatok immobilitását (F10. táblázat). Ezzel szemben, a KO állatoknál szignifikánsan ( $p < 0,05$ ), 60,9%-kal csökkent a mozdulatlanságban töltött idő.

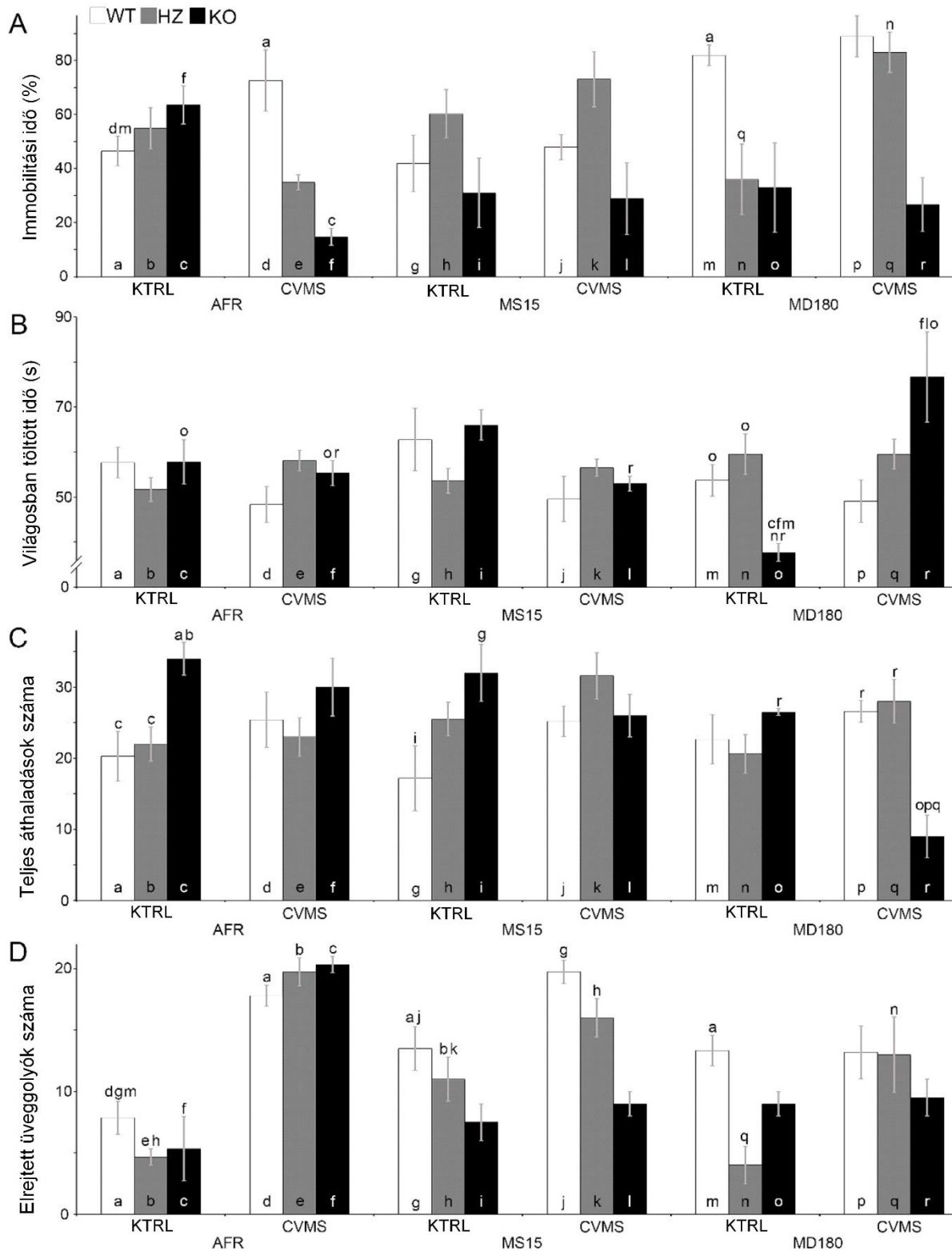
## 5.II.1.2.3. Light-dark box teszt

*A megvilágított térrészben töltött idő.* A genotípusok összehasonlítása (F10. táblázat) az MD180 KTRL csoporton belül kimutatta, hogy a KO állatok magasabb szorongási szintet mutattak, mint a WT (5.21.B ábra, o és m oszlopok;  $p < 0,05$ ) és HZ (o és n oszlop;  $p < 0,01$ ) egerek. Az anyai gondoskodás minőségének a szorongás szintre gyakorolt hatásának vizsgálata a CVMS-nek kitett KO egerekben azt mutatta, hogy a súlyos anyai depriváció fokozott szorongást okozott mind az AFR (f és o oszlop;  $p < 0,05$ ), mind az MS15 (l és r oszlop;  $p < 0,005$ ) KO egerekhez képest. Az MD180 csoportban a CVMS szignifikáns, 103%-os növekedést okozott a KO állatok esetében az MD180 KTRL társaikhoz képest (o és r oszlop;  $p < 0,001$ ). Az MD180 CVMS KO állatok több időt töltöttek a megvilágított térben, mind az AFR CVMS (r és f oszlop;  $p < 0,05$ ), mind az MS15 CVMS KO egereknél (r és l;  $p < 0,05$ ).

*Teljes áthaladások száma.* Az AFR KTRL csoportban a KO állatok többször léptek át a két kompartment között, mint a WT (5.21.C ábra, c és a oszlop;  $p < 0,05$ ) és HZ (c és b oszlop;  $p < 0,05$ ) társaik. A CVMS nem okozott szignifikáns változást az AFR csoportban. Az MS15 KTRL csoportban a KO állatok a WT csoportéhoz képest többször haladtak át a térfelek között (g és i oszlop;  $p < 0,05$ ). Az MD180 csoportban a CVMS csökkentette a KO egerek átlépéseinek számát (o és r oszlop;  $p < 0,05$ ). Az MD180 CVMS KO állatok az MD180 CVMS WT (p és r oszlop;  $p < 0,01$ ) és HZ egerekhez képest kevesebbszer haladtak át a térrészek között (q és r oszlop;  $p < 0,01$ ).

#### 5.II.1.2.4. Marble burying teszt

A CVMS-t követően (F10. táblázat), az AFR állatok minden genotípusban több üveggolyót temettek el (5.21.D ábra, WT: a és d oszlop,  $p < 10^{-4}$ ; HZ: b és e oszlop,  $p < 10^{-4}$ ; KO: c és f oszlop,  $p < 10^{-4}$ ). Az MS15 KTRL csoportban a WT állatok 71,97%-kal (g és a oszlop;  $p < 0,05$ ), míg a HZ állatok 135,54%-kal (h és b oszlop;  $p < 0,001$ ) több golyót ástak el, mint AFR KTRL társaik. A KO állatok esetében az eltemetett golyók száma nem változott. A WT és HZ MS15 állatok is hasonló reakciót mutattak a CVMS-re, mint az AFR csoportok. A CVMS KO csoportban nem észleltünk változást. Az MD180 KTRL csoportban a WT állatok szignifikánsan több golyót temettek el, mint AFR KTRL WT társaik (m és a oszlop;  $p < 0,05$ ). A CVMS-t követően, az MD180 WT állatok nem mutattak semmilyen változást. Az MD180 HZ állatok 225%-kal több golyót rejtettek el a CVMS után (n és q oszlopok;  $p < 0,001$ ). Az MD180 KO állatokban alkalmazott CVMS nem befolyásolta az elrejtett golyók számát.



**5.21. ábra.** Viselkedésteredmények a három találat elmélet modellben. (A) Immobilitási idő forced swim tesztben. (B) A light-dark box teszt megvilágított térében töltött idő és (C) a térrészek közötti áthaladások száma. (D) Az elrejtett üveggolyók száma a marble burying tesztben. Fehér oszlopok: vad típusú (WT), szürke oszlopok: PACAP heterozigóta (HZ), fekete oszlopok: PACAP génkiütött (KO) állatok. AFR: normál állatházi tartás, MS15 és MD180 kezelés 15 ill. 180 perces anyai megvonás. KTRL: kontroll állatok, krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) expozíció nélkül. Az oszlopok feletti betűk a csoportpárok közötti leglényegesebb szignifikáns statisztikai különbségeket jelölik, a post hoc tesztek szerint ( $p < 0,05$ ).

### 5.II.1.3. Morfológiai eredmények

#### 5.II.1.3.1. CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB kolokalizáció a BNSTov-ban

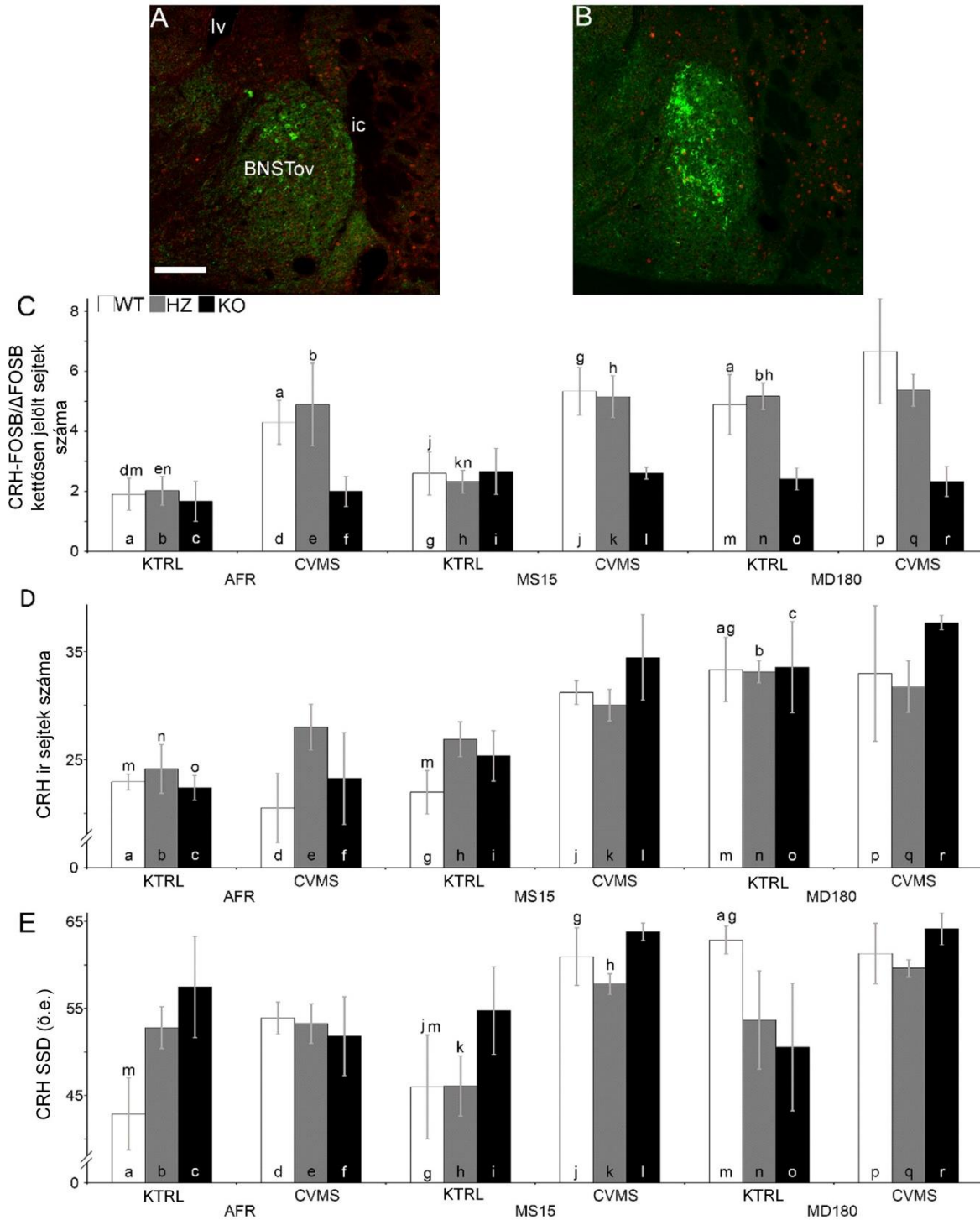
Az AFR csoportban a CVMS expozíció a CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB kolokalizáció szignifikáns (F11. táblázat) növekedését okozta mind a WT (5.22.C ábra, a és d oszlop;  $p < 0,05$ ), mind a HZ (b és e oszlop;  $p < 0,01$ ) állatokban. Az MS15 egerek hasonló dinamikát mutattak a CVMS-re mind a WT (g és j oszlop;  $p < 0,05$ ), mind a HZ (h és k oszlop;  $p < 0,005$ ) genotípusokban. Az MD180 KTRL WT (a és m oszlop;  $p < 0,01$ ) és HZ (b és n oszlop;  $p < 0,01$ ) állatok szignifikánsan magasabb kontrollértékeket mutattak, mint AFR KTRL társaik.

Az MD180 KTRL HZ állatcsoportban több CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB immunpozitív sejtet észleltünk az MS15 KTRL HZ csoportokhoz képest (n és h oszlop;  $p < 0,05$ ). A KO állatok nem mutattak semmilyen változást a CRF-FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtek számában a BNSTov-ban.

#### 5.II.1.3.2. CRH immunreaktív neuronok száma a BNSTov-ban

A BNSTov/CRH sejtek számát illetően a post hoc tesztek nem bizonyították, hogy a CVMS szignifikáns mértékben megváltoztatná a sejtsszámot (F11. táblázat). Érdekes módon, a CRH ir sejtek száma az MD180 KTRL WT állatokban szignifikánsan magasabb volt, mint az AFR KTRL WT (5.22.D ábra, a és m oszlop;  $p < 0,01$ ) és az MS15 WT egerekben (g és m oszlop;  $p < 0,01$ ). Hasonlóképpen, az MD180 KTRL HZ (b és n;  $p < 0,05$ ) és KO (c és o;  $p < 0,05$ ) állatoknak több CRH sejtjük volt detektálható a BNSTov-ban, mint AFR KTRL társaiknak.

A BNSTov/CRH sejtek jelenlétének az AFR és az MD180 csoportban nem változott CVMS expozíció hatására. Az MS15 WT egerekben, a CVMS a CRH SSD növekedését eredményezte (5.22.E ábra, g és j oszlop;  $p < 0,01$ ), hasonlóan a HZ állatokhoz (h és k oszlop;  $p < 0,005$ ). Az MS15 KO állatok a CVMS-t követően nem mutattak statisztikailag szignifikáns CRH SSD változást. Az MD180 KTRL WT állatok szignifikánsan nagyobb CRH SSD-t mutattak az AFR KTRL (m és a oszlop;  $p < 10^{-4}$ ) és MS15 KTRL (m és g oszlop;  $p < 0,005$ ) állatokhoz képest.



**5.22. ábra** Morfológiai eredmények a nucleus interstitialis striae terminalis ovális divíziójában (BNSTov) a három találat elmélet modelljében. (A) és (B): Corticotropin-releasing hormon (CRH, zöld) és FOSB/ΔFOSB (piros) kettős jelölés a BNSTov-ban. Normál állathatházi tartás protokollja szerint (AFR) nevelt kontroll (KTRL) PACAP heterozigóta (HZ) (A) és egy AFR krónikus variábilis enyhe stressznek (CVMS) kitett HZ egér (B) mintájának reprezentatív fotója. (C) A CRH és FOSB/ΔFOSB kettős pozitív sejtek száma a BNSTov-ban. (D) A CRH immunreaktív (ir) sejtek száma a BNSTov-ban. (E) CRH specifikus jeldenzítés (SSD). Fehér oszlopok: vad típusú (WT), szürke oszlopok: PACAP heterozigóta (HZ), fekete oszlopok: PACAP génkiütött (KO) állatok. AFR: normál állatházi tartás, MS15 és MD180 kezelés 15 ill. 180 perces anyai megvonás. Az oszlopok feletti betűk a csoportpárok közötti leglényegesebb szignifikáns statisztikai különbségeket jelölik, a post hoc tesztek szerint ( $p < 0,05$ ). lv: ventriculus lateralis, ic: capsula interna. Lépték: 100 $\mu$ m.

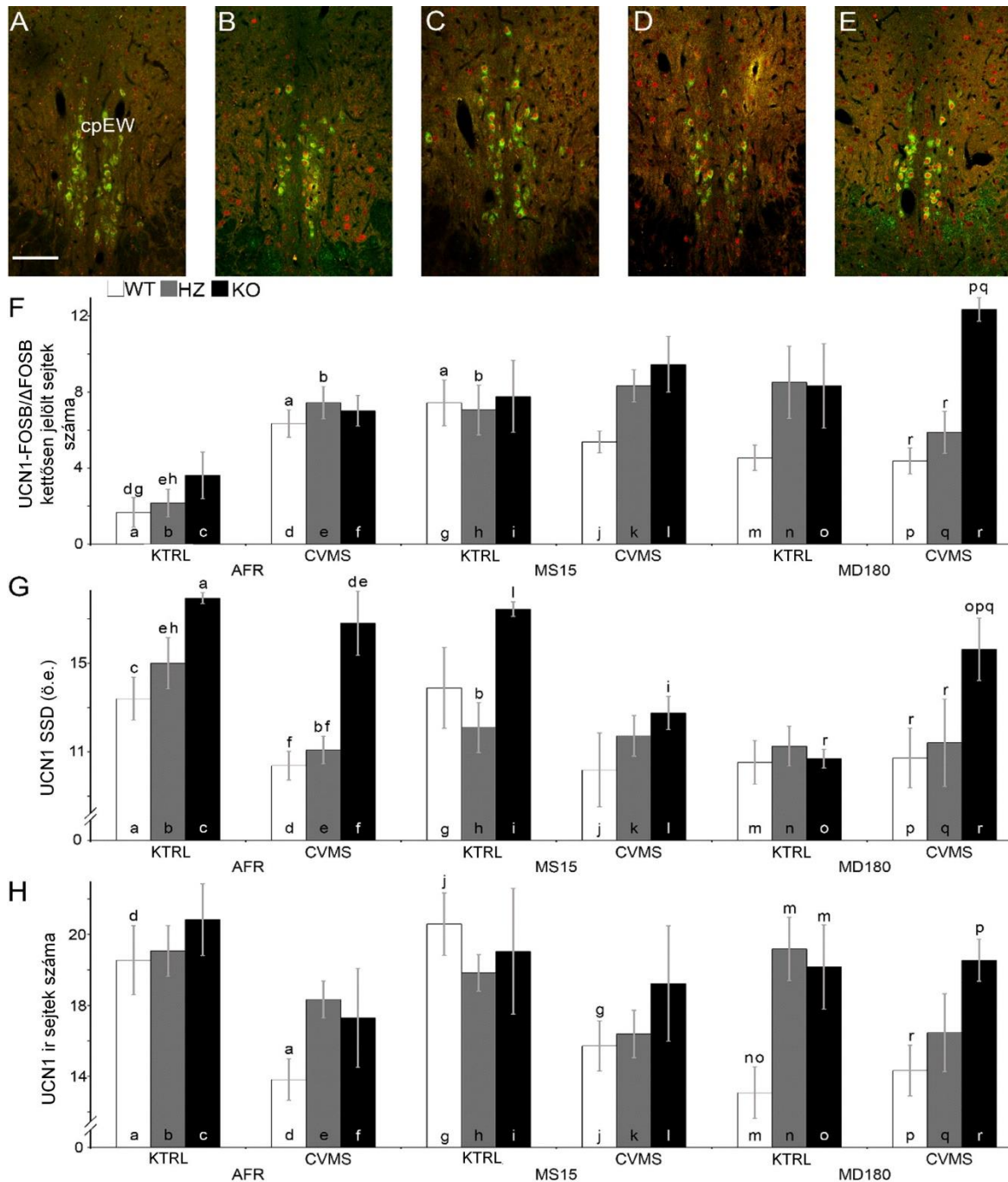
#### 5.II.1.3.3. UCN1-FOSB/ $\Delta$ FOSB kolokalizáció az EWcp-ben

Az AFR csoportban a CVMS (F11. táblázat) szignifikánsan növelte az UCN1-FOSB/ $\Delta$ FOSB kolokalizációt mutató sejtek számát a WT (5.23.F ábra, a és d oszlop;  $p < 0,01$ ) és a HZ (b és e oszlop;  $p < 0,001$ ) állatokban a KTRL társaikhoz képest. Az MS15 csoportban a WT (a és d oszlop;  $p < 0,001$ ) és a HZ egerek (b és e;  $p < 0,001$ ) magasabb UCN1-FOSB/ $\Delta$ FOSB alapszintet mutattak, mint az AFR KTRL állatok. Az MS15 KTRL KO egereknél a növekedés nem érte el a szignifikáns statisztikai értéket ( $p = 0,054$ ). A CVMS-nek kitett MS15 állatok nem mutattak szignifikáns UCN1-FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszám változást a kontroll társaikhoz képest. A CVMS a WT és HZ MD180 egerekben sem okozott szignifikáns változásokat az UCN1-FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszámban. Érdekes módon, a KO állatok a CVMS-re az UCN1-FOSB/ $\Delta$ FOSB ir neuronok számának 48%-os emelkedésével reagáltak, bár ez éppen a szignifikáns érték alatt maradt (o és r oszlop;  $p = 0,06$ ). A CVMS-nek kitett MD180 KO egerek 2,8-szor magasabb UCN1-FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszámot mutattak, mint a WT-ak (p és r oszlop;  $p < 10^{-4}$ ), míg a HZ-hoz képest a különbség 2,10-szeres volt (q és r oszlop;  $p < 0,01$ ).

#### 5.II.1.3.4. UCN1 specifikus jelzenítés az EWcp-ban

Az AFR KTRL csoportban a KO állatok (F11. táblázat) szignifikánsan magasabb UCN SSD-t mutattak, mint az AFR KTRL WT társaik (5.23.G ábra, a és c oszlop;  $p < 0,05$ ). A CVMS az AFR HZ állatokban 22,53%-kal csökkentette az UCN1 SSD-t (b és e oszlop;  $p < 0,01$ ). Az AFR CVMS KO állatok szignifikánsan magasabb UCN1 SSD szintet mutattak HZ (e és f oszlop;  $p < 0,01$ ) és WT (d és f oszlop;  $p < 0,05$ ) társaiknál. A KTRL HZ MS15 állatokban szignifikánsan alacsonyabb UCN1 SSD-t figyeltünk meg az AFR KTRL HZ társaikhoz képest (b és h oszlopok;  $p < 0,05$ ). Az MS15 egereknél a CVMS alkalmazása után az UCN1 SSD értéke csak a KO egerekben csökkent (i és l oszlop;  $p < 0,05$ ). A CVMS-nek alávetett MD180 WT és HZ állatok nem mutattak szignifikáns változást az UCN1 SSD értékében az MD180 KTRL társaikhoz képest. Az MD180 KO csoportban a CVMS 46%-os növekedést eredményezett az UCN1 SSD értékében az MD180 KTRL KO állatokhoz képest (o és r oszlopok;  $p < 0,05$ ). Az UCN1 SSD az MD180 CVMS KO állatokban (r oszlop) magasabb volt, mint az MD180 CVMS WT (p oszlop;  $p < 0,05$ ) és a HZ (q oszlop;  $p < 0,05$ ) csoportban.





**5.23. ábra.** Morfológiai eredmények a centrális projekciójú Edinger-Westphal magban (EWcp) a három találat elmélet modelljében. (A-E): UCN1 (zöld) és FOSB/ΔFOSB (piros) kettős jelölés. (A) Normál állatházi protokoll szerint nevelt (AFR) kontroll (KTRL) PACAP heterozigóta (HZ) egér (B) AFR krónikus variábilis enyhe stressznek (CVMS) kitett HZ egér. Kiemelendő, hogy a CVMS expozíció FOSB/ΔFOSB immunreaktivitást indukált az UCN1 neuronok magjában. (C) Reprezentatív kép egy KTRL HZ egérből, mely korábban 180 perces anyai depriváción esett át (MD180). A MD180 megnövelte a FOSB/ΔFOSB immunreaktivitást CVMS expozíciótól függetlenül. (D) MD180-nak és CVMS-nek kitett HZ egér. (E) MD180 és CVMS-nek kitett PACAP génkiütött (KO) egér. Kiemelendő, hogy a legerősebb FOSB/ΔFOSB immunreaktivitást ebben a csoportban láttuk. (F) A histogram az UCN1 és FOSB/ΔFOSB koexpresszáló neuronok számát (N) ábrázolja. (G) UCN1 specifikus jeldenzítást (SSD) önkényes egységekben (ö.e.) kifejezve. (H) UCN1 immunreaktív (ir) neuronok száma. Fehér oszlopok: vad típus (WT), szürke: HZ, fekete: PACAP génkiütött (KO) állatok. MS15: 15 perces anyai megvonás. Az oszlopok feletti betűk a csoportpárok közötti leglényegesebb szignifikáns statisztikai különbségeket jelölik, a post hoc tesztek szerint ( $p < 0,05$ ). Lépték: 100 $\mu$ m.

#### 5.II.1.3.5. Az UCN1 ir sejtek száma a EWcp-ban

A WT AFR állatokban a CVMS csökkentette az UCN1 pozitív sejtek számát (5.23.H ábra, a és d oszlop;  $p<0,01$ ). A HZ és KO állatokban ez a csökkenés nem érte el a szignifikáns szintet ( $p=0,16$ , illetve  $p=0,07$ ). Hasonlóképpen, az MS15 egerekben a CVMS csökkentette az UCN1 sejtek számát a WT egerekben (g és j oszlop;  $p<0,01$ ), míg a változás nem érte el a statisztikai szignifikancia értékét a HZ vagy KO egerekben ( $p=0,058$ , illetve  $p=0,58$ ). Érdekes módon, az MD180 KTRL WT egereknél szignifikánsan kevesebb UCN1 neuron volt található az EWcp-ban, mint HZ (m és n oszlop;  $p<0,005$ ) és KO (m és o oszlop;  $p<0,05$ ) társaiknál. Ezzel összhangban a CVMS exponált PACAP KO egerek MD180 előzményekkel magasabb UCN1 sejtsszámmal rendelkeznek, mint WT társaik (p és r oszlop;  $p<0,05$ ).

#### 5.II.1.3.6. Szerotonin specifikus jelzenítés a DR-ban

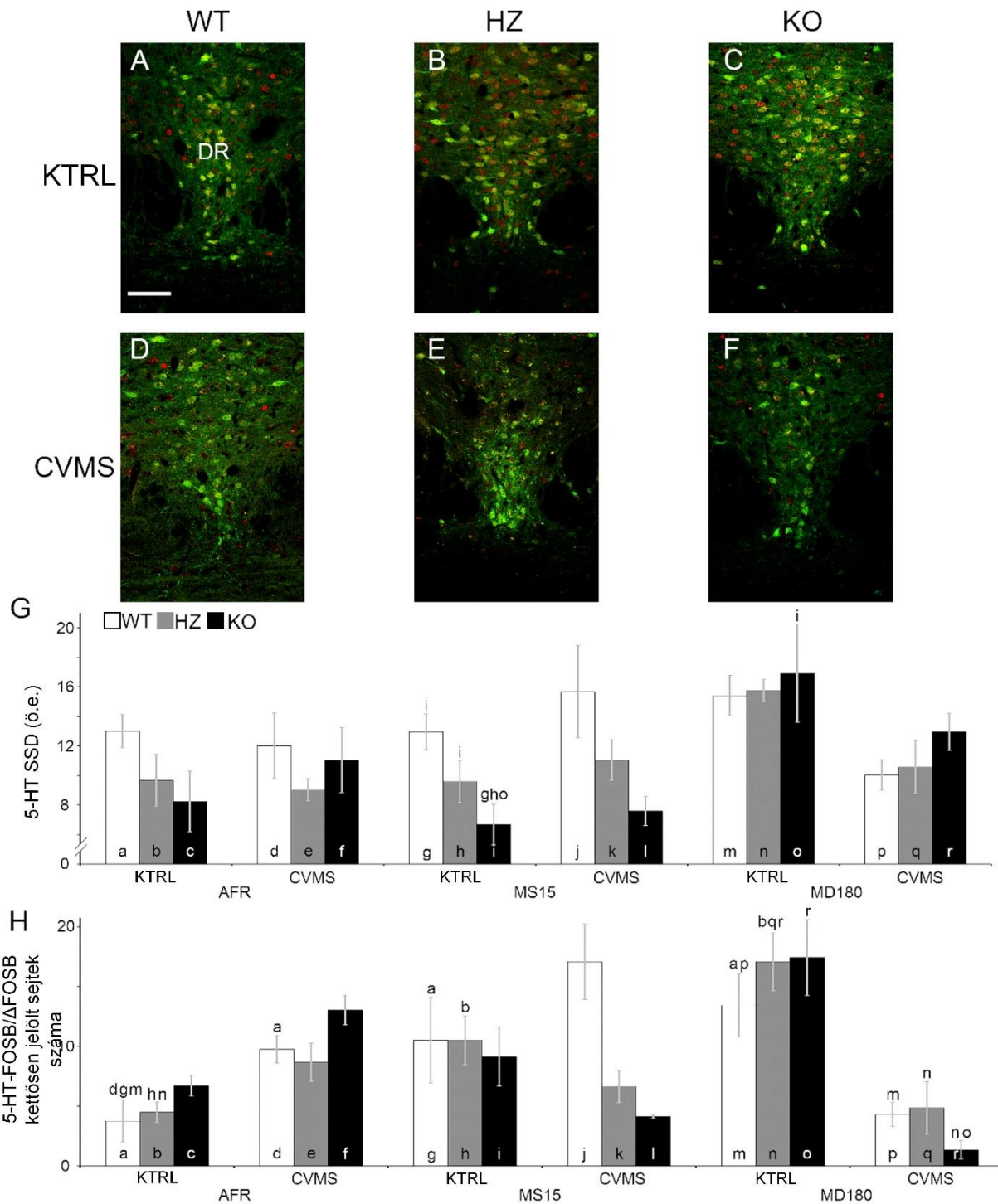
Az AFR csoportok között nem találtunk szignifikáns különbségeket. Az MS15 KO egerek alacsonyabb 5HT SSD-t mutattak (F11. táblázat), mint az ennek megfelelő WT és HZ egerek (5.24.G ábra, g és i oszlop;  $p<0,02$  ill. h és i oszlop;  $p<0,03$ ). Érdekes módon, az MD180 KTRL KO egerekben az 5HT SSD hasonló volt a WT és HZ egerekéhez, és magasabb volt, mint az MS15 KTRL KO egerekben (o és i oszlop;  $p<0,01$ ).

#### 5.II.1.3.7. 5HT-FOSB/ $\Delta$ FOSB kolokalizáció a DR-ban

Az AFR csoportban a CVMS expozíció (F11. táblázat) csak a WT állatokban növelte szignifikánsan a kolokalizáló sejtek számát (5.24.H ábra, a és d oszlop;  $p<0,05$ ). Az MS15 csoportban a WT és HZ állatok kontrollértékei szignifikánsan magasabbak voltak, mint az AFR KTRL WT (a és g oszlop;  $p<0,05$ ) és HZ egerek (b és h oszlop;  $p<0,05$ ) értékei. Az MS15 állatok egyik genotípusban sem reagáltak szignifikánsan a CVMS-re. Az MD180 KTRL csoport 5HT-FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtsszáma az AFR társaikhoz képest mind a WT (a és m oszlopok;  $p<10^{-4}$ ), mind a HZ (b és n oszlop;  $p<10^{-5}$ ) állatokban szignifikánsan emelkedett alapértékeket mutatott. A CVMS az MD180 csoportban mindhárom genotípusban csökkentette az 5HT-FOSB/ $\Delta$ FOSB ir sejtek számát. A 5HT/DR sejtaktiváció 68,08%-kal csökkent a WT (m és p oszlop;  $p<0,005$ ), 71,52%-kal a HZ (n és q oszlop;  $p<10^{-3}$ ) és 92,26%-kal KO állatokban (o és r;  $p<10^{-4}$ ).

#### 5.II.1.3.8. 5HT ir sejtek száma a DR-ban

Az MS15 csoportban a szerotonin pozitív sejtek száma csökkent a KTRL HZ és a CVMS HZ állatok összehasonlításában ( $p<0,05$ ). Az MD180 csoportban hasonló tendencia volt megfigyelhető, azonban a változások nem érték el a szignifikanciát. A MANOVA (F11. táblázat) csak a stressz fő hatását ( $F_{17,98}=4,49$ ;  $p<0,05$ ) találta szignifikánsnak.



**5.24. ábra.** A nucleus raphe dorsalis (DR) a három találat elmélet egérmódeljében. (A-F) DR szerotonin (5HT, zöld) FOSB/ΔFOSB (piros) kettősen jelölt preparátumokban, krónikus variábilis enyhe stressznek (CVMS) kitett, 3 órás anyai megvonáson átesett (MD180) egerekben, CVMS-nek ki nem tett kontrollokkal (KTRL) összehasonlítva. Kiemelendő, hogy a CVMS minden csoportban csökkentette a 5HT jelet, sőt, a KTRL csoportban több FOSB/ΔFOSB sejt volt megfigyelhető, mint a CVMS-nek kitett egerekben. (G) 5HT specifikus jelenség (SSD) önkényes egységben (ö.e.) kifejezve. (H) 5HT-FOSB/ΔFOSB immunreaktív neuronok száma a DR-ban. Fehér oszlopok: vad típus (WT), szürke: PACAP heterozigóta (HZ), fekete: PACAP génkiütött (KO) állatok. MS15: 15 perces anyai megvonás. Az oszlopok feletti betűk a csoportpárok közötti leglényegesebb szignifikáns statisztikai különbségeket jelölik, a post hoc tesztek szerint ( $p < 0,05$ ). Lépték: 100 μm.

5.II.2. A három találat elméleten alapuló modell prediktív validitásának vizsgálata PACAP HZ egerek segítségével

Az előzőekben tárgyalt eredmények alapján a kísérletet immár csak a PACAP HZ állatokra fókuszálva ismételtük meg, és kiegészítettük a kísérleti elrendezést fluoxetin kezeléssel is. Ennek az volt a célja, hogy teszteljük a modell prediktív validitását, azaz, megvizsgáljuk, mennyiben fordíthatók vissza a modellben megfigyelt viselkedési és funkcionális-morfológiai változások.

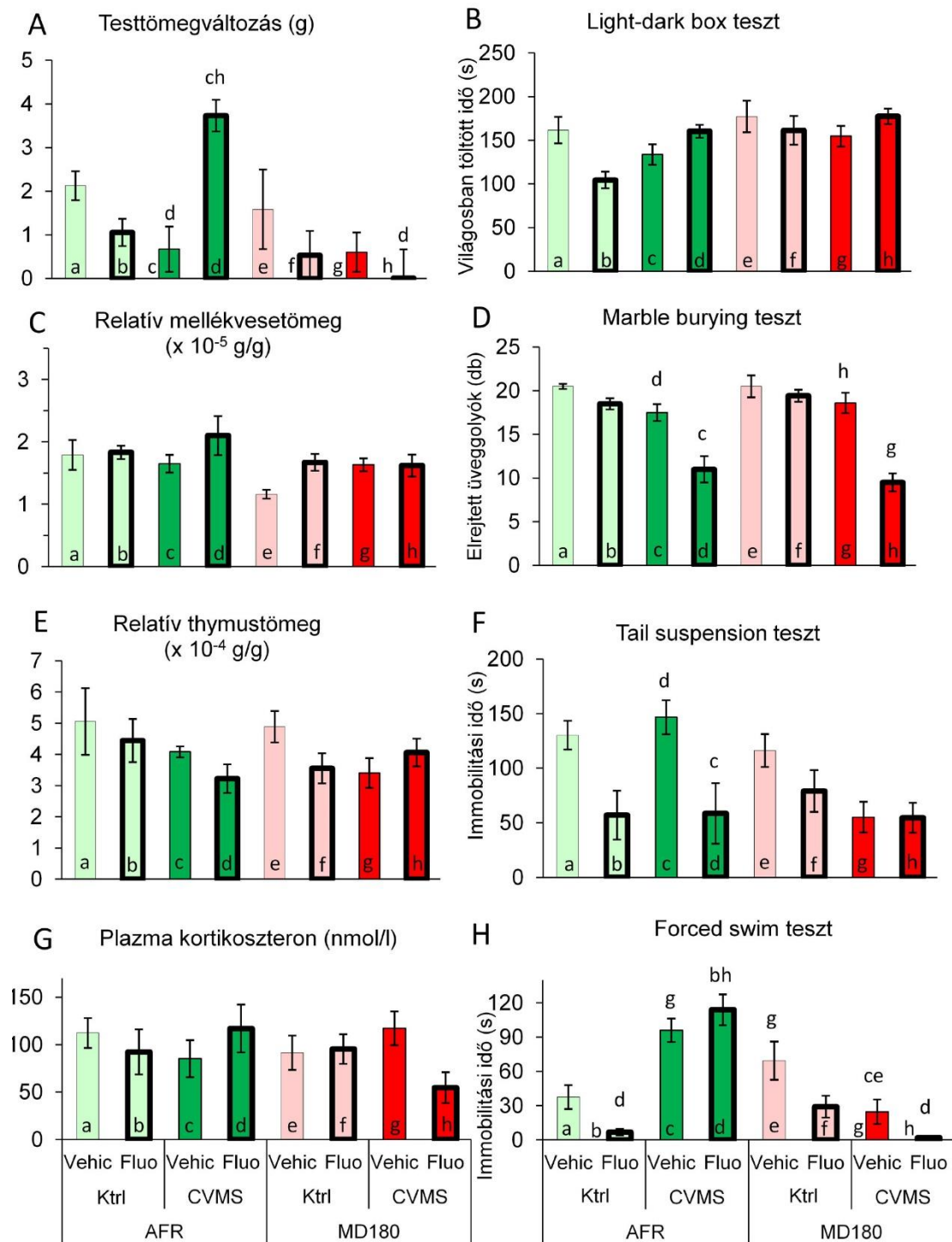
5.II.2.1. Fizikai és endokrin validitási paraméterek

A CVMS hatása az AFR egerekben nem érte el a szignifikáns mértéket a testtömeggyarapodásra (5.25.A ábra, a és c oszlop  $p=0.1$ ), de fluoxetin kezelés mellett az AFR stresszelt egerek erős testtömegnövekedést mutattak (5.25.A ábra, c és d oszlop;  $p<0,05$ ). Ezzel szemben, az anyai megvonáson átesett, CVMS-t elszenvedett egerekben az SSRI kezelés hatástalan maradt a testtömeggyarapodás szempontjából (g és h oszlop). Kiemelendő a markáns különbség a stresszelt és fluoxetin kezelt MD180, illetve AFR állatok testtömeggyarapodása között (d és h oszlop;  $p<0,01$ ).

Habár a MANOVA az anyai megvonás főhatását önmagában és a faktorok harmadrendű kölcsönhatását is szignifikánsnak találta (F12. táblázat) a relatív mellékvesetömegre nézve, a post hoc teszt nem mutatott ki szignifikáns különbségeket egyik csoportpár között sem (5.25.C ábra).

A stressz tendenciózusan csökkentette a thymus tömegét az AFR, fluoxetinnel kezelt egerekben a kontrollhoz képest (5.25.E ábra, b és d oszlop;  $p=0.08$ ). A Spearman-féle korrelációanalízis is alátámasztotta CVMS paradigma megbízhatóságát, a test-, és a thymustömeg adatok közötti kapcsolat alapján ( $\rho=-0,36$ ;  $p<0,03$ ).

A HPA tengely aktivitásának értékelése a CORT plazmakoncentrációját is meghatároztuk (5.25.G ábra). A MANOVA a faktorok hármas kölcsönhatását mutatta (F12. táblázat). A post hoc teszt eredményei alapján a stresszt elszenvedett, fluoxetinnel kezelt, MD180 állatok tendenciózusan csökkent CORT szintet mutattak, a vivőanyaggal kezelt egerekkel összehasonlítva (h és g oszlop;  $p=0,1$ ).



**5.25. ábra:** A fizikai-, és endokrin paraméterek, illetve a viselkedéstezt-eredmények. (A) A csoportok testtömegének változása a krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) időszakában a PND125 és a perfúzió (PND140) között, grammban (g) kifejezve. (C) A relatív mellékvesetömeg ( $\times 10^{-5}$  g/g) és a (E) thymus relatív (testtömegre vonatkoztatott) tömege ( $\times 10^{-4}$  g/g). (G) Vérplazma kortikoszteron titer (nmol/l). (B) A megvilágított kompartmentben töltött idő a light-dark box teszt során, másodpercekben (s) kifejezve. (D) A marble burying teszt során elrejtett üveggolyók darabszáma (db). Immobilitási idő a (F) tail suspension és (H) a forced swim tesztekben. AFR: normál állatházi protokoll szerint nevelt állat, MD180: 180 perces anyai megvonás, Ktrl: kontroll, CVMS-nek nem kitet); Vehic: fiziológiás sóoldatot kapott; Fluo: fluoxetin kezelésben részesült. Az oszlopok feletti betűk a csoportpárok közötti legrelevánsabb post hoc statisztikai különbségeket jelölik, amelyek szignifikánsnak bizonyultak ( $p < 0,05$ ).

### 5.II.2.2. A viselkedési tesztek eredményei

LDT-ben a MANOVA eredményei alapján az anyai megvonás hatása önmagában, illetve a stressz  $\times$  kezelés interakció szignifikánsnak mutatkozott (F12. táblázat) a doboz világos kompartmentjében töltött időtartamra nézve. Habár a post hoc tesztek nem mutattak szignifikáns különbséget, a fluoxetinnel kezelt, kontroll, nem deprivált állatok tendenciózusan kevesebb időt töltöttek a megvilágított rekeszben, mint a vehikulummal kezelt egerek (5.25.B ábra, a és b oszlop). Stresszt követően, ez a jelenség megfordult (5.25.B ábra, b és d oszlop). Az anyai deprivációt elszenvedett csoportok között semmilyen különbség sem mutatkozott (5.25.B ábra, e-h oszlopok).

A MBT-ben a stresszelt és fluoxetinnel kezelt állatok esetében csökkent az elrejtett üveggolyók száma a vivőanyaggal kezelt egerekhez képest (F12. táblázat), függetlenül az anyai gondoskodás minőségétől (5.25.D ábra, c és d oszlop;  $p < 0,001$  ill. g és h oszlop;  $p < 10^{-6}$ ).

TST-ben az AFR egereknél a fluoxetin kezelés csökkentette az immobilitási időt a CVMS csoportban (5.25.F ábra, c és d oszlop;  $p < 0,05$ ), míg a kontrolloknál a fluoxetin hatása tendencia szintű maradt (a és b oszlop). Ezzel szemben, az MD180 egerekben a fluoxetin kezelés hatása elveszett a post hoc tesztek szerint.

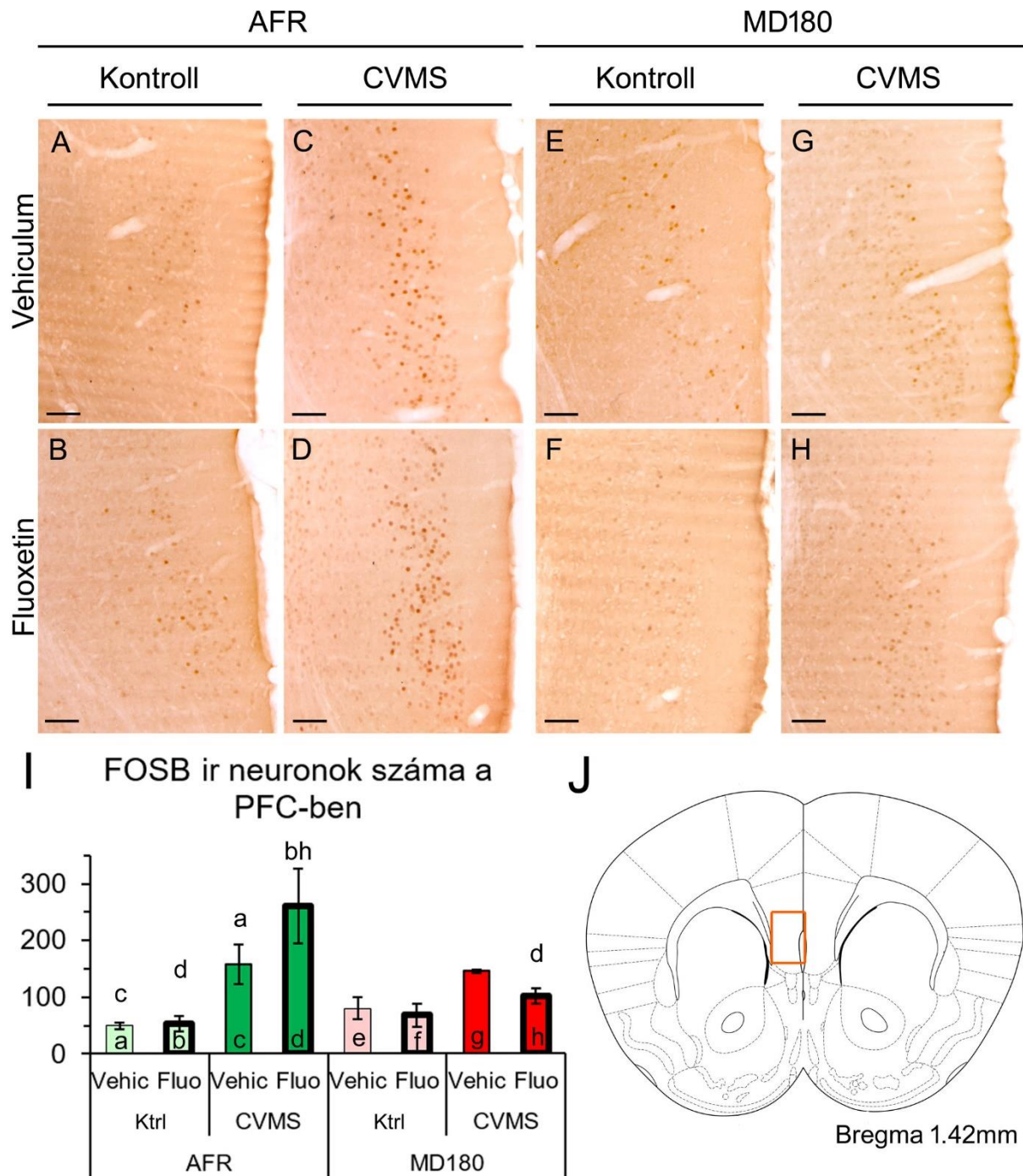
FST-ben a CVMS tendenciózusan növelte az AFR egerek immobilitási idejét (5.25.H ábra, a és c oszlop;  $p = 0,11$ ), a stressz e hatása fluoxetin kezelés mellett is megfigyelhető volt (5.25.H ábra, b és d oszlop;  $p < 0,05$ ). Az anyai megvonás nemcsak a stressz hatását változtatta meg (vö. a és c illetve e és g oszloppárok), hanem a fluoxetin kezelés hatékonyságát is a stresszelt állatokban: SSRI kezelés mellett az AFR egerekben magas (d oszlop), míg az MD180 egerekben igen alacsony immobilitási időt láttunk (h oszlop;  $p < 10^{-4}$ ).

### 5.II.2.3. Szöveti eredmények

#### 5.II.2.3.1. Prefrontális kéreg

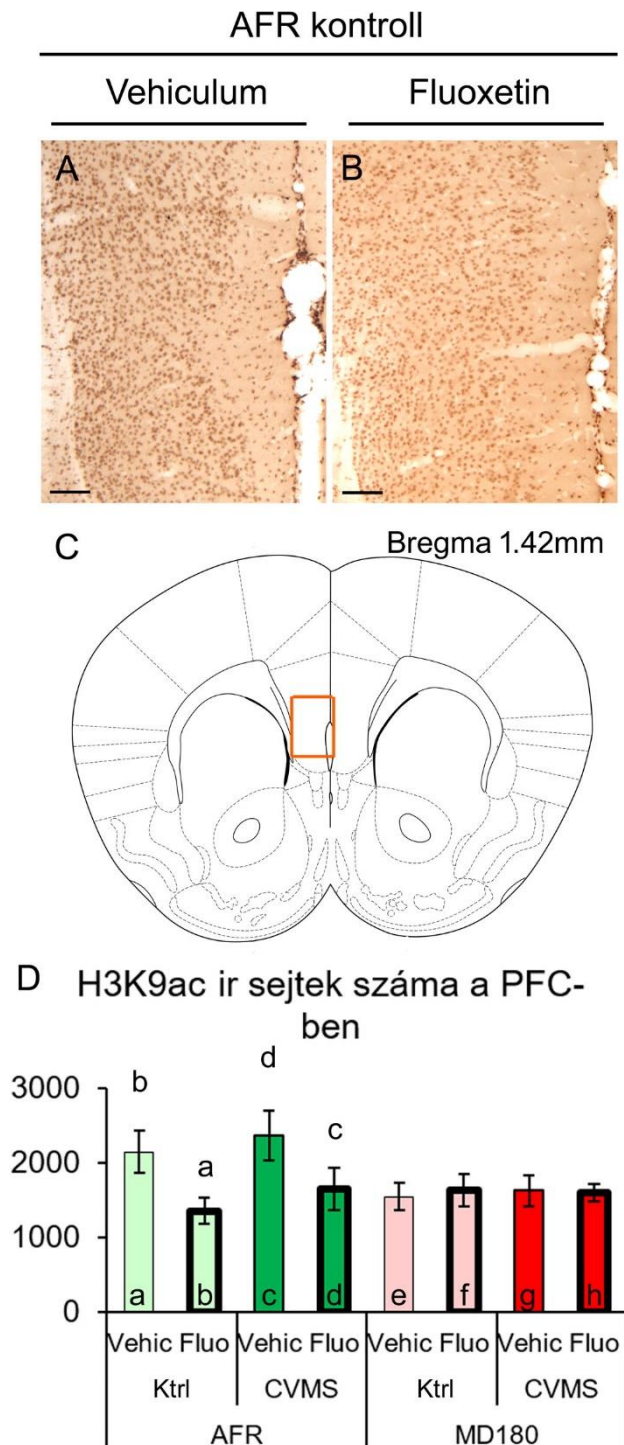
A FOSB/ $\Delta$ FOSB aktivitási markert vizsgálva (F12. táblázat) azt láttuk, hogy az AFR egerekben a CVMS a sejtszám szignifikáns emelkedését okozta, mind a vivőanyaggal (5.26.A és C ill. I ábra a és c oszlop;  $p < 0,001$ ), mind a fluoxetinnel kezelt egerekben (5.26.B és D ill. I ábra b és d oszlop;  $p < 0,001$ ). Ha a CVMS-nek kitett AFR egerek fluoxetint kaptak (5.26.D és I ábra d oszlop), magasabb ( $p < 10^{-4}$ ) FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszámot láttunk, a kontroll, fluoxetinnel kezelt, AFR egerekkel összehasonlítva (5.26.B és I ábra b oszlop). Anyai megvonás után sem a CVMS, sem a fluoxetin kezelés nem befolyásolta a FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszámot a PFC-ben (5.26.E-H ábra ill. 5.26.I ábra e-h oszlopai). A FOSB/ $\Delta$ FOSB pozitív sejtek száma a stresszelt és

fluoxetinnel kezelt MD180 egerekben sokkal alacsonyabb volt ( $p < 0,01$ ), a megfelelő AFR csoportokban megfigyelteknél (5.26.D és H ill. I ábra d és h oszlop).



**5.26. ábra.** FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás a prefrontális kéregben (PFC). Reprezentatív képek illusztrálják FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitást a PFC-ben a vivőanyaggal (Vehic) (A) és fluoxetinnel (Fluo) kezelt (B) kontroll (Ktrl), valamint a krónikus variábilis enyhe stressznek kitett (CVMS) és a vivőanyaggal (C) vagy fluoxetinnel (D) injektált AFR egerek esetében. Az anyai megvonás (MD180) befolyásolta a FOSB/ $\Delta$ FOSB jelet (E-H). Az (A-H) képeken látható terület megfelel a PFC kiemelt régiójának a (J) ábrán, módosítva Paxinos és Franklin (2001) nyomán. Az (I) diagramm a FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktív (ir) sejtszámot szemlélteti. Az oszlopok feletti betűk a csoportpárok közötti leglényegesebb szignifikáns különbségeket jelölik, a post hoc tesztek alapján. AFR: normál állatházi protokoll szerint nevelt állat. Lépték: 100 $\mu$ m.

A acetil-lizin 9 H3 hiszton (H3K9ac) festés azt mutatta, hogy a fluoxetin kezelés csökkentette a pozitív sejtek számát az AFR csoportban, mind a kontroll (5.27.A, B, D ábra, a és b oszlop;  $p < 0,04$ ), mind a CVMS-nek kitett egerekben (5.27.D ábra, c és d oszlop;  $p < 0,05$ ). Fontos, hogy az anyai megvonáson átesett, kontroll, vivőanyaggal kezelt egerekben tendenciózusan alacsonyabb sejtszámot észleltünk (5.27.D ábra, a és e oszlop;  $p = 0,068$ ), illetve, hogy a fluoxetin kezelés nem befolyásolta a sejtszámot az anyai megvonáson átesett egerekben (e-h oszlopok a 5.27.D ábrán).



**5.27. ábra:** Acetil-lizin 9 H3 hiszton (H3K9ac) immunreaktivitás a prefrontális kéregben (PFC). Reprezentatív képek, amelyek a H3K9ac immunreaktív (ir) magokat szemléltetik a PFC-ben a vivőanyaggal (Vehic) (A) és a fluoxetinnel (Fluo) kezelt PACAP heterozigóta, kontroll (Ktrl) normál állatházi protokoll szerint nevelt (AFR) egerekből. Az (A, B) képeken látható terület megfelel a kiemelt PFC régióknak (C) a sémás ábrán. Módosítva, Paxinos és Franklin (2001) nyomán. (D) A H3K9ac immunreaktív (ir) sejtek száma a PFC-ben. A betűk az oszlopok felett a csoportpárok közötti legrelevánsabb szignifikáns különbségeket jelölik, a post hoc tesztek alapján. CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz, MD180: 180 perces anyai megvonás. Lépték: 100 $\mu$ m.



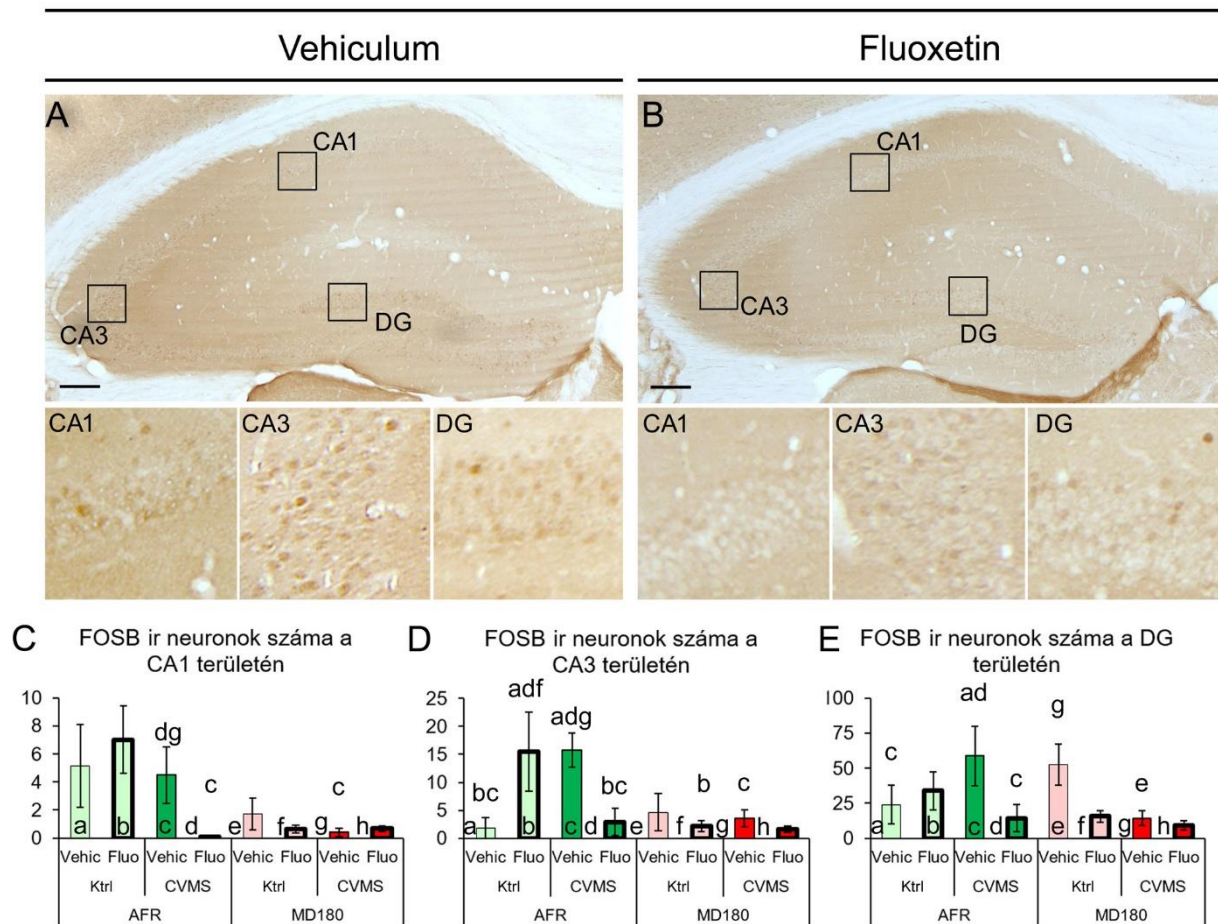
#### 4.II.2.3.2. Hippocampus

A FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás a hippocampus-ban gyengébb volt, mint amit a PFC-ben megfigyeltünk. Míg az AFR csoportokban alacsony, de még jól detektálható sejtszámot láttunk, addig az MD180 egerekben a jel minden alcsoportban szinte kimutathatatlanná vált. A CA1 területen a CVMS-nek kitett AFR egerekben a fluoxetin kezelés majdnem detektálhatatlan szintre csökkentette a sejtszámot (5.28.A, B, ill. C ábra c és d oszlop;  $p < 0,01$ ). A vivőanyagkezelt, CVMS-en átesett, MD180 egerekben a FOSB/ $\Delta$ FOSB jel szintén nagyon alacsony volt (c és g oszlop;  $p < 0,05$ ), melyet a fluoxetin kezelés nem tudott tovább csökkenteni (g és h oszlop;  $p = 0,51$ ).

A CA3 területen (F12. táblázat), a kontroll AFR egerekben a fluoxetin növelte a FOSB/ $\Delta$ FOSB pozitív sejtek számát (5.28.D ábra, a és b oszlop;  $p < 0,05$ ), csakúgy, mint a CVMS expozíció (a és c oszlopok;  $p < 0,01$ ). A fluoxetin kezelés ezt azután szinte nullára csökkentette (5.28.A, B, ill. D ábra, c és d oszlop;  $p < 0,01$ ). A maternális depriváció a fluoxetinre (5.28.D ábra, b és f oszlop;  $p < 0,01$ ) és a stresszre (5.28.D ábra c és g oszlop;  $p < 0,05$ ) adott FOSB/ $\Delta$ FOSB választ megszüntette.

A DG területén (F12. táblázat) az AFR egerekben a stresszexpozíció szintén növelte a FOSB/ $\Delta$ FOSB pozitív sejtek számát (5.28.E ábra a és c oszlop;  $p < 0,05$ ), melyet a fluoxetinkezelés visszafordított (5.28.A, B, E ábra, c és d oszlop;  $p < 0,01$ ). Az MD180 egerekben némi FOSB/ $\Delta$ FOSB pozitivitás kimutatható volt a vivőanyagkezelt, kontroll állatokban, de ha az egereket CVMS-nek tettük ki, a FOSB/ $\Delta$ FOSB jel kimutathatatlanná vált (e és g oszlop;  $p < 0,05$ ), így a fluoxetin kezelés ezt nem csökkenthette tovább (g és h oszlop;  $p = 0,5$ ).

## AFR CVMS



**5.28. ábra.** FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás a hippocampus cornu Ammonis (CA) 1, CA3 és a gyrus dentatus (DG) területein. Reprezentatív képek, amelyek a FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitást mutató magokat szemléltetik a vivőanyaggal (Vehic) (A) és fluoxetinnel (Fluo) kezelt (B) krónikus variábilis enyhe stressznek (CVMS) kitétt, normál állatházi protokoll szerint nevelt (AFR) egerek hippocampusában. Jól megfigyelhető a viszonylag gyenge jel, amely gyakorlatilag kimutathatatlanná válik, ha az állat korábban háromórás anyai megvonásban részesült (MD180). A bekeretezett területek a megfelelő kis nagyítású képek alatti nagyobb nagyítású betétekben láthatók. A diagrammok a FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktív (ir) sejtmagok számát szemléltetik a hippocampus CA1 (C), CA3 (D) és DG (E) régióiban. Az oszlopok feletti betűk a diagrammokon a csoportok közötti leglényegesebb szignifikáns különbségeket jelzik, a post hoc tesztek alapján. Ktrl: kontroll, Lépték: 200 $\mu$ m

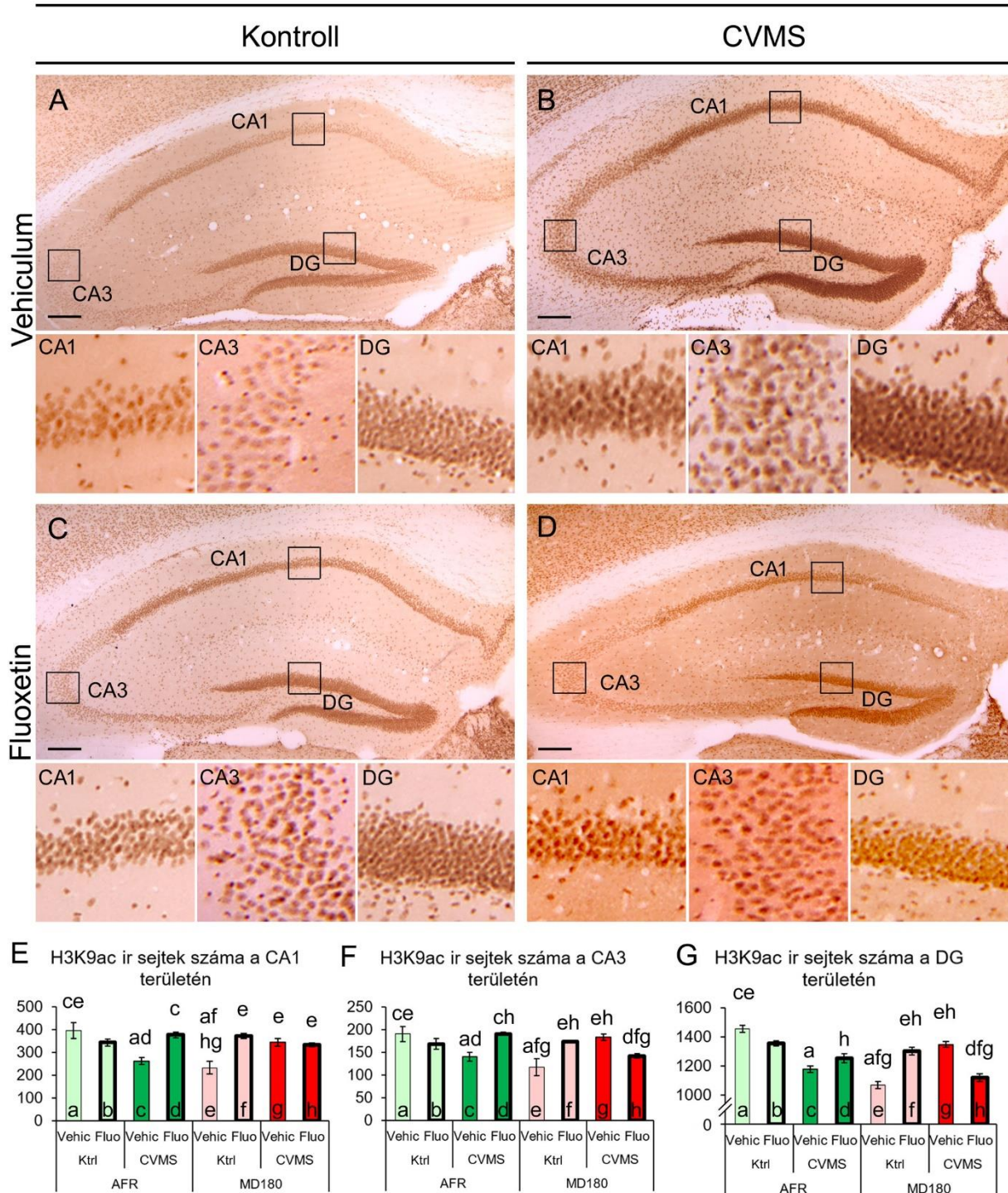
A következő lépésben a hippocampus régióinak H3K9ac immunreaktivitását értékeltük. A CA1 területen AFR egerekben a CVMS (5.29.E ábra, a és c oszlop;  $p < 0,001$ ) csökkentette a H3K9ac jelet, melyet a fluoxetin kezelés visszafordított (c és d oszlop;  $p < 0,001$ ). Az anyai megvonás alacsonyabb H3K9ac immunreaktivitást okozott a kontroll egerekben (5.29.E ábra, a és e oszlop;  $p < 10^{-4}$ ). Érdekes módon, a CA1 régióban a fluoxetin kezelés (5.29.A, C, E ábra e és f oszlop;  $p < 10^{-4}$ ) és a CVMS is (5.29.A, B, E ábra, e és g oszlop;  $p < 0,001$ ) növelte a H3K9ac

sejtszámot. A CVMS-nek kitett, MD180 egerek fluoxetin kezelése nem befolyásolta a hisztonacetiláció mértékét a CA1 régióban (5.29.B, D, E ábra, g és h oszlop;  $p=0,66$ ).

A CA3 régióban, CA1-hez hasonlóan, a CVMS hatására (5.29.F ábra, a és c oszlop;  $p<0,01$ ) az AFR egerek alacsonyabb H3K9ac immunjelet mutattak, de ha fluoxetinnel kezeltük őket (c és d oszlop;  $p<0,01$ ), az acetiláció mértéke ismét magasabb volt. Az anyai megvonás viszonylag alacsony jelet eredményezett a vehikulummal kezelt, kontroll egerekben az AFR-hez képest (5.29.F ábra, a és e oszlop;  $p<10^{-4}$ ). A fluoxetin kezelés növelte a hisztonacetilációt az MD180, kontroll egerekben (5.29.F ábra, e és f oszlop;  $p<0,001$ ). A CVMS pedig szintén növelte az acetilációt (5.29.F ábra, e és g oszlop;  $p<0,001$ ), de ha a fluoxetin kezelést az MD180 egerek a CVMS expozíciót követően kapták, azaz mindhárom találat bekövetkezett, a hisztonacetiláció alacsonyabbnak mutatkozott (5.29.F ábra, g és h;  $p<0,01$ ).

A DG-ban, az AFR állatokban a H3K9ac immunreaktivitás dinamikája hasonló volt, mint amit a CA1 és CA3 régiókban megfigyeltünk: a CVMS csökkentette a sejtszámot (5.29.G ábra, a és c oszlop;  $p<10^{-6}$ ), amit a fluoxetin adagolása tendenciózusan megfordított (5.29.G ábra c és d oszlop;  $p=0,079$ ). A MD180-t átélt, kontroll, vivőanyaggal kezelt egereknél az acetiláció mértéke csökkent (5.29.G ábra, a és e oszlop;  $p<10^{-6}$ ). A fluoxetin kezelés hatása a sejtszámra a CVMS expozíciótól függött az MD180 egerekben: a kontroll állatokban a fluoxetin kezelés megemelte az acetilált sejtek számát (e és f oszlop,  $p<10^{-5}$ ), míg a stresszelt egerekben az SSRI csökkentette a hisztonacetilációt (g és h oszlop;  $p<10^{-6}$ ).

MD180



**5.29. ábra.** Acetil-lizin 9 H3 hiszton (H3K9ac) immunreaktivitás a hippocampus cornu Ammonis (CA) I, CA3 és gyrus dentatus (DG) szubdivízióiban. Reprezentatív képek illusztrálják a H3K9ac immunreaktivitást háromórás anyai megvonásnak kitett (MD180) állatok alcsoportjaiban: vivőanyaggal (Vehic) (A) és fluoxetinnel (Fluo) kezelt (C) kontroll (Ktrl), valamint vivőanyaggal (B) és fluoxetinnel kezelt (D) krónikus variábilis enyhe stressznek (CVMS) kitett egerek hippocampus-át láthatjuk. A kisebb nagyítású képeken bekeretezett területek nagyobb nagyítású képzetekben is láthatók, a megfelelő kép alatt. A H3K9ac immunreaktivitás dinamikáját szemléltető diagrammok a CA1 (E), CA3 (F) és DG (G) területén mutatják a sejtszámok átlagát, csoportonként. Az oszlopok feletti betűjelek a csoportpárok közötti leglényegesebb szignifikáns különbségeket jelzik, a post hoc tesztek eredményei alapján. AFR: normál állatházi protokoll szerint nevelt állat. Lépték: 200 $\mu$ m.

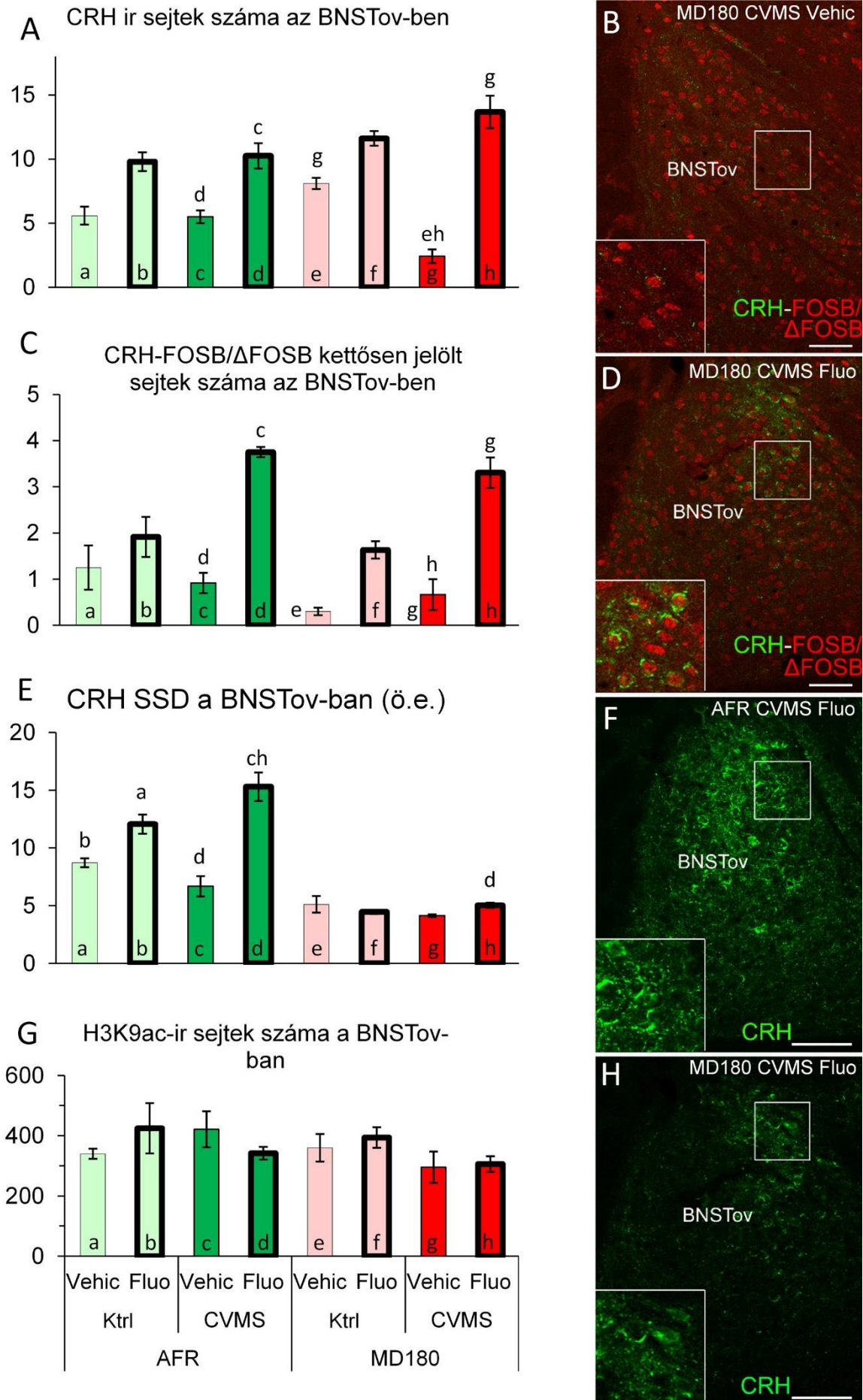
### 5.II.2.3.3. BNSTov

A CRH neuronok (F13. táblázat) száma az SSRI kezelés hatására tendenciózusan emelkedett az AFR kontroll csoportban (5.30.A ábra, a és b oszlop;  $p=0,06$ ). A stressznek kitett állatok esetében már a szignifikanciaszintet meghaladó növekedést láttunk (c és d oszlop;  $p<0,05$ ), összhangban az MD180, kontroll állatokban megfigyelhető tendenciával (e és f oszlop;  $p=0,09$ ) és az MD180, stresszelt egereknél látható erős hatással (g és h oszlop;  $p<10^{-3}$ ). Fontos, hogy ha az egerek korábban átestek anyai megvonáson, akkor a stresszelt állatok CRH sejtszáma kisebb volt a kontrollokénál (g és e oszlop;  $p<0,01$ ), ellentétben az AFR egerekkel, ahol nem volt változás (a és c oszlop).

A CRH neuronok FOSB/ $\Delta$ FOSB aktivitása tekintetében kiemelendő, hogy a fluoxetin kezelés növelte a CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB kettősen pozitív sejtek számát, függetlenül attól, hogy az egerek normál anyai gondoskodást kaptak (5.30.C ábra, c és d oszlop;  $p<0,001$ ) vagy anyai megvonásban részesültek (g és h oszlop;  $p<0,001$ ). Megjegyzendő, hogy a CRH sejteknek csak 20-30%-a mutatott FOSB/ $\Delta$ FOSB pozitivitást.

A CRH SSD-t az SSRI kezelés növelte mind a kontroll (5.30.E ábra; a és b oszlop;  $p<0,05$ ), mind a stressznek kitett (c és d oszlop;  $p<10^{-3}$ ) egereknél. Érdekes módon, az anyai megvonás teljesen megszüntette a fluoxetin hatását a CRH SSD-re (vö. 5.30.F, H ábra és a 5.30.E ábra, d és h oszlop;  $p<0,01$ ).

Bár a BNSTov H3K9ac immunreaktivitásában az anyai gondoskodás minőségének főhatásán (F13. táblázat) túl nem láttunk releváns különbségeket a csoportpárok között (5.30.G ábra), megemlítendő, hogy az állatok CORT szintje szignifikáns korrelációt mutatott a hisztonfehérje acetilációjának mértékével ( $\rho=0,51$ ;  $p<0,01$ ).



**5.30. ábra.** (118. oldal) A *nucleus interstitialis striae terminalis ovális almagjának* (BNSTov) vizsgálatából származó morfológiai eredmények összefoglalása. (A) A corticotropin-releasing hormon (CRH) immunreaktív (ir) sejtek száma a BNSTov-ben. (C) A CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB kettősen jelölt sejtek száma a BNSTov-ben. A (B) és (D) szövettani képek a CRH (zöld) és FOSB/ $\Delta$ FOSB (piros) kettős immunfluoreszcenciáját mutatják a BNSTov-ben. A reprezentatív képeken háromórás anyai megvonást elszenvedett (MD180), krónikus variábilis enyhe stressznek (CVMS) kitett, fiziológiás sóoldattal (Vehic) (B), illetve fluoxetinnel (Fluo) injektált (D) állatok metszeteit láthatjuk. (E) A CRH specifikus jeldenzitása (SSD) a BNSTov-ben, önkényes egységekben (ö.e.) kifejezve. A CRH (zöld) jelölés mikrofotóin (F) normál állatházi protokoll szerint nevelt (AFR) és (H) háromórás anyai megvonásban részesült (MD180), krónikus variábilis enyhe stressznek (CVMS) kitett, fluoxetinnel (Fluo) kezelt állatok BNSTov-jét láthatjuk. A (G) diagramm az acetil-lizin 9 H3 hiszton (H3K9ac) pozitív sejtek számának átlagát mutatja a BNSTov-ben. Az oszlopok tetején lévő betűk a csoportpárok közötti legjelentősebb szignifikáns statisztikai különbségeket jelölik, a post hoc tesztek szerint ( $p < 0,05$ ). Ktrl: kontroll (azaz CVMS-nek nem kitett). Lépték: 100 $\mu$ m.

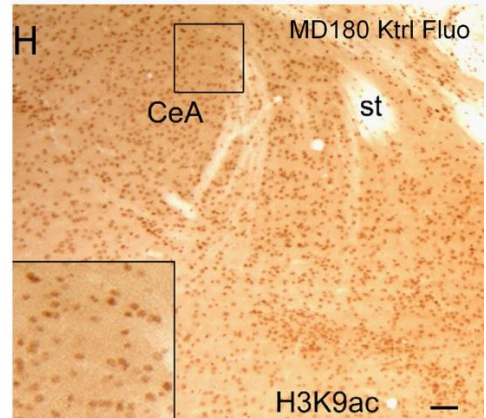
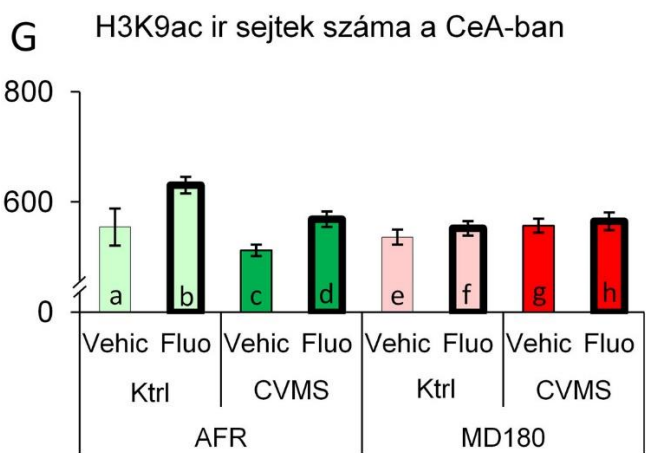
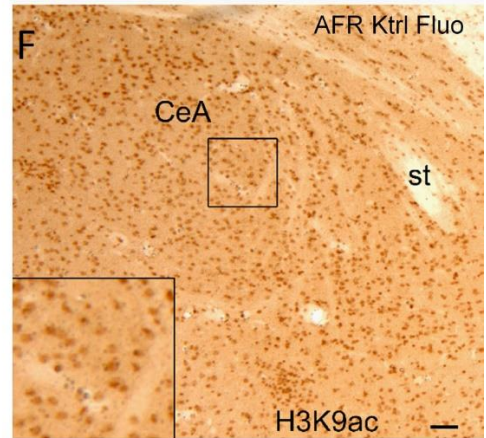
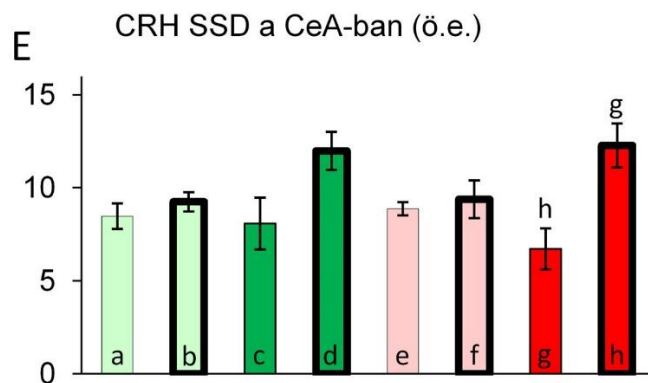
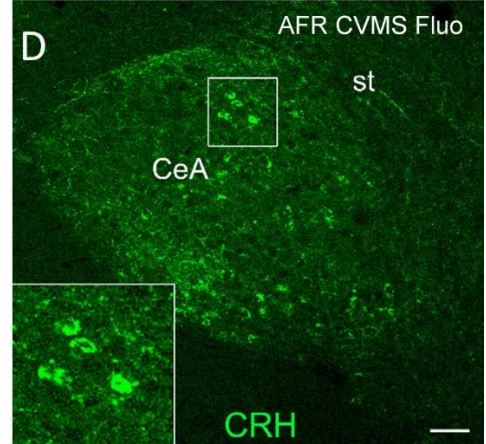
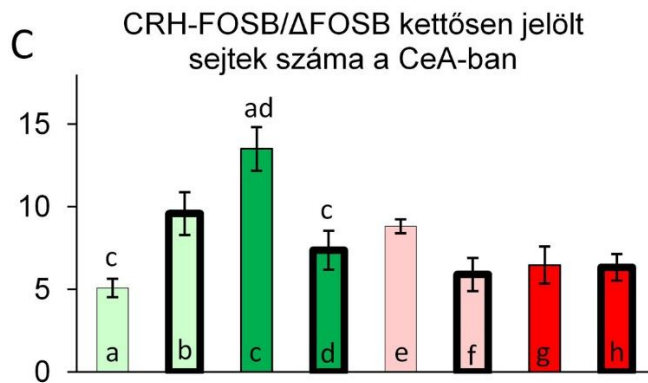
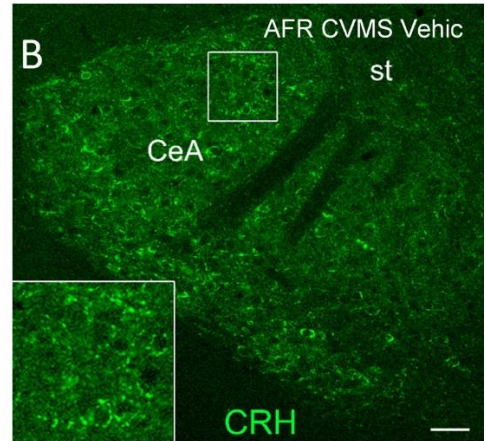
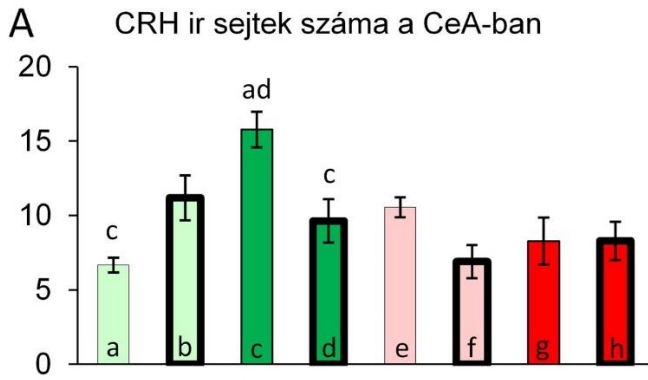
#### 5.II.2.3.4. CeA

A CeA/CRH sejtek számában (F13. táblázat) a CVMS az AFR állatokban körülbelül háromszoros emelkedést okozott (5.31.A ábra, a és c oszlop;  $p < 0,01$ ). Ha ezek a stresszelt állatok fluoxetin kezelést kaptak, a CRH sejtek száma csökkent (5.31.A ábra, c és d oszlop;  $p < 0,05$ ). Teljesen más mintázat volt megfigyelhető az MD180 egerekben: sem a stressz, sem a fluoxetin kezelés nem volt hatással a sejtek számára (e-h oszlopok).

A CeA/CRH neuronok FOSB/ $\Delta$ FOSB aktivitása tekintetében azt láttuk, hogy az SSRI kezelés az AFR állatokban tendenciózusan megemelte a kettősen jelölt sejtek számát (5.31.C ábra, a és b oszlop;  $p = 0,06$ ), míg a stressz statisztikailag erősebb hatást gyakorolt (a és c oszlop;  $p < 0,01$ ). Ha azonban ezek a stressznek kitett egerek fluoxetin kezelést kaptak, a CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszám csökkent (c és d oszlop;  $p < 0,01$ ). Az anyai megvonás teljesen megszüntette az SSRI-kezelés hatását a kontroll egerekben (e és f oszlop;  $p = 0,33$ ). Az előzőekhez hasonlóan, ha a stresszexpozíciót az anyai megvonással együtt kapták az állatok, a fluoxetin kezelésnek nem volt hatása a CeA/CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtek számára.

A CeA/CRH SSD-ban a post hoc tesztek szerint a SSRI-kezelés a CVMS-ben részesült AFR állatoknál tendenciózus (5.31.E ábra, c és d oszlop;  $p = 0,12$ ), a korábban anyai megvonást kapott egerekben pedig szignifikáns emelkedést (5.31.E ábra, g és h oszlop;  $p < 0,01$ ) okozott.

Az SSRI-kezelés az acetil-lizin 9 H3 hiszton pozitív sejtek számának tendenciaszerű növekedését okozta az AFR, kontroll állatoknál (5.31.G ábra, a és b oszlop;  $p = 0,09$ ), ami nem volt kimutatható az anyai megvonásban részesült egereknél.



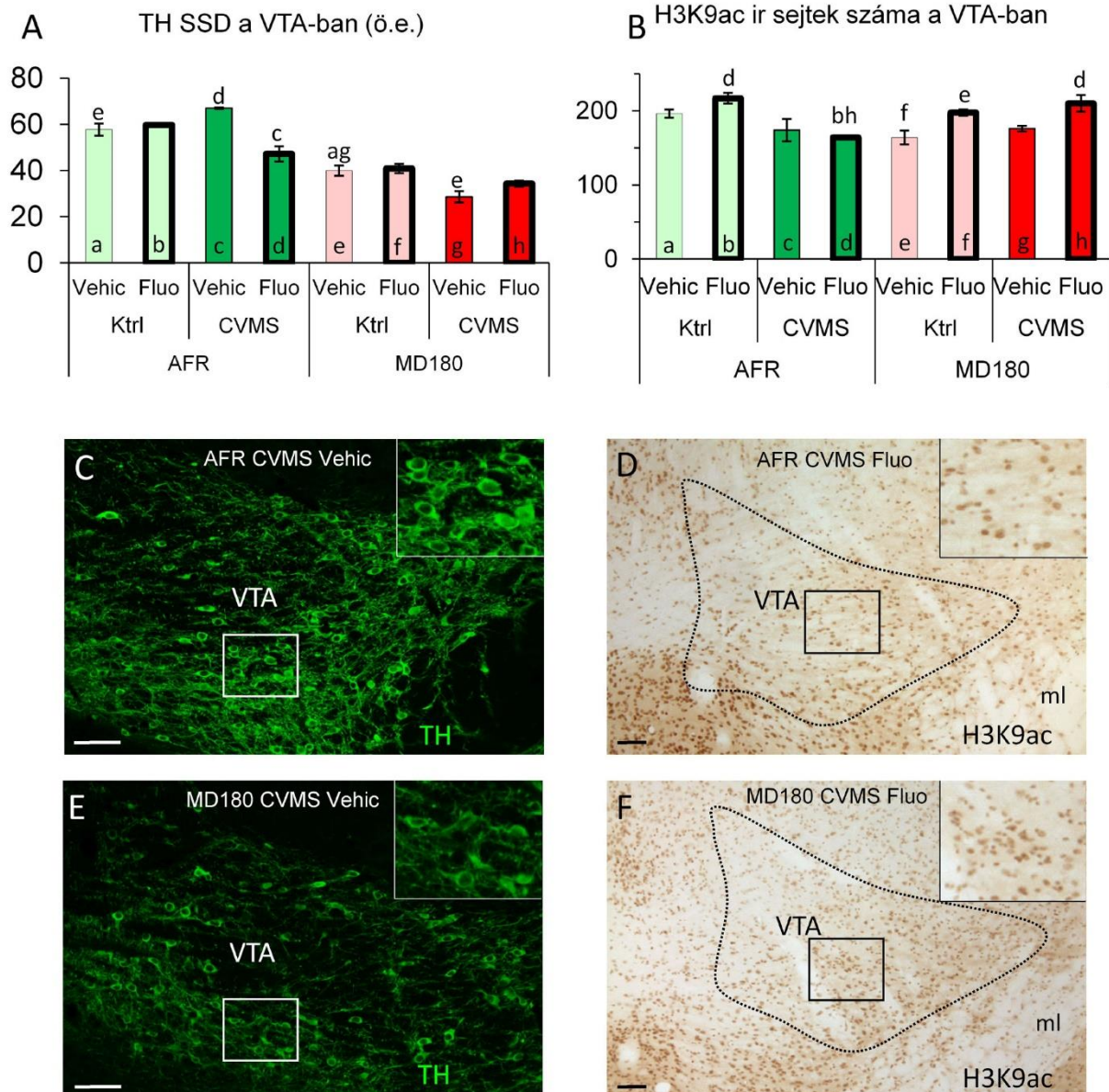


**5.31. ábra.** (120. oldal) *A morfológiai eredmények összefoglalása az amygdala centrális almagijában (CeA). (A) A corticotropin-releasing hormon (CRH) immunreaktív (ir) sejtek száma a CeA-ban. (C) A CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB kettősen jelölt sejtek száma a CeA-ban. A reprezentatív felvételeken CRH (zöld) immunfluoreszcencia látható normál állatházi protokoll szerint nevelt állat (AFR), krónikus variábilis enyhe stressznek kitett (CVMS), (B) fizioiógias sóoldattal (Vehic) vagy (D) fluoxetinnel kezelt (Fluo) egér CeA-jában. (E) A CRH specifikus jeldenzitás (SSD) a CeA-ban, önkényes egységekben (ö.e.) kifejezve. (G) Az acetil-lizin 9 H3 hiszton (H3K9ac) ir sejtek száma a CeA-ban. Reprezentatív mikrofotók, melyeken H3K9ac immunpozitív sejtek láthatók egy (F) AFR és egy (H) háromórás anyai megvonásnak kitett (MD180), kontroll (Ktrl), Fluo egér CeA-jából. Az oszlopok feletti betűjelek a csoportpárok közötti legrelevánsabb szignifikáns statisztikai különbségeket jelölik, a post hoc tesztek szerint ( $p < 0,05$ ). st: stria terminalis. Lépték: 100 $\mu$ m.*

#### 5.II.2.3.5. VTA

A VTA TH SSD (F13. táblázat) az AFR egerekben a fluoxetin adása csökkent (5.32.A ábra, c és d oszlop;  $p < 0,001$ ). Mind a kontroll (a és e oszlop;  $p < 0,001$ ), mind a CVMS-nek kitett (c és g oszlop;  $p < 0,001$ , és 5.32.C és E ábra) egerek alacsonyabb TH SSD-t mutattak, ha korábban anyai megvonáson estek át, amit az SSRI-kezelés nem befolyásolt. Ezt az eleve alacsonyabb TH SSD-t tovább csökkentette a CVMS (5.32.A ábra, e és g oszlop;  $p < 0,05$ ). Érdekes módon, ez éppen az ellenkezője annak, amit az AFR egereknél megfigyeltünk (vö. a és c ill. e és g oszlop).

A VTA H3K9ac immunreaktivitást illetően, a fluoxetin kezelt AFR egerekben a stressz csökkentette a pozitív sejtek számát (5.32.B ábra, b és d oszlop;  $p < 0,01$ ). Az anyai megvonás tendenciaszerűen csökkentette az acetil-lizin 9 H3 pozitív sejtek számát (5.32.B ábra, a és e oszlop;  $p = 0,11$ ). Ezt az SSRI visszafordította a kontrollok esetében (5.32.B ábra, e és f oszlop;  $p < 0,05$ ), de a CVMS-t elszendedett egerekben nem (d vs. h oszlop;  $p < 0,01$  és vö. 5.32.D és F ábra). A stressznek alávetett, MD180 állatokban nem volt szignifikáns változás a kontrollokhoz képest (5.32.B. ábra, e és g oszlop) és a fluoxetin acetilációnövelő hatása is a stresszelt, MD180 egerekben a szignifikanciaszint alatt maradt (5.32.B ábra, g és h oszlop;  $p = 0,13$ ).



**5.32. ábra.** Morfológiai eredmények összefoglalása a ventrális tegmentális áréában (VTA). (A) A tirozin-hidroxiláz (TH) specifikus jeldentitása (SSD) a VTA-ban, önkényes egységeken (ö.e.) kifejezve. (B) Az acetil-lizin 9 H3 hiszton (H3K9ac) immunreaktív (ir) sejtek száma a VTA-ban. Reprerentatív mikrofotók a TH (zöld) immunfluoreszcencia egy (C) normál állatházi protokoll szerint nevelt állat (AFR) és egy (E) háromórás anyai megvonásban részesült (MD180), krónikus variábilis enyhe stressznek kitett (CVMS), fiziológiás sóoldattal injektált (Vehic) állat VTÁ-jából. Reprerentatív felvételek az H3K9ac ir sejtekről egy (D) AFR, CVMS, Fluo és egy (F) MD180, CVMS, Fluo állat VTÁ-jából. Az oszlopok feletti betűk a legjelentősebb szignifikáns statisztikai különbségeket jelölik a csoportpárok között, a post hoc tesztek alapján ( $p < 0,05$ ). Ktrl: kontroll (azaz CVMS-nek nem kitett); ml: lemniscus medialis. Lépték: 100 $\mu$ m.

#### 5.II.2.3.6. EWcp

Az UCN1 ir sejtszámot (F14. táblázat) a fluoxetin kezelés csökkentette a megfelelő vivőanyagkezelt csoportokkal összevetve az AFR kontroll (5.33.A ábra, a és b oszlop;  $p < 0,01$ ),

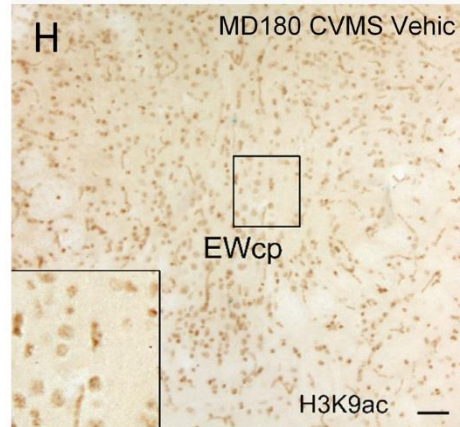
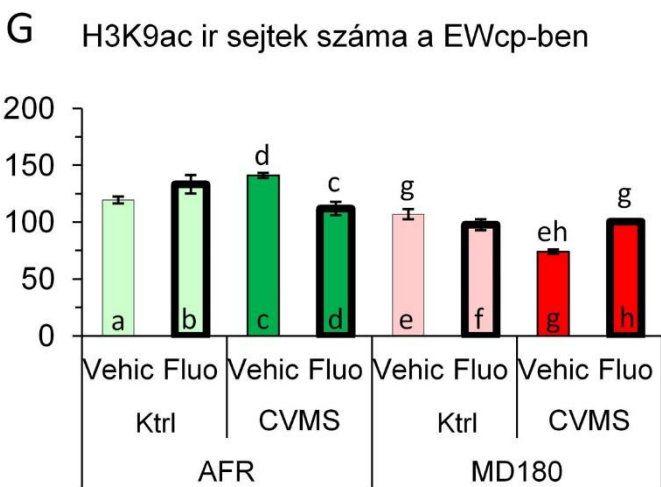
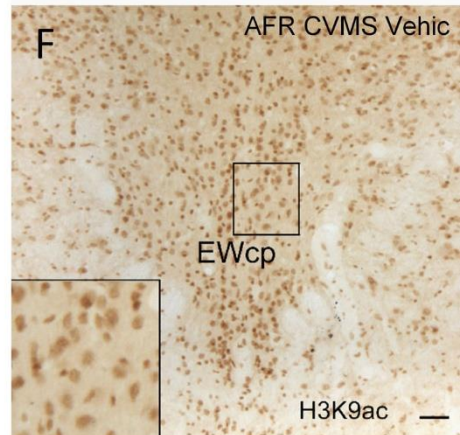
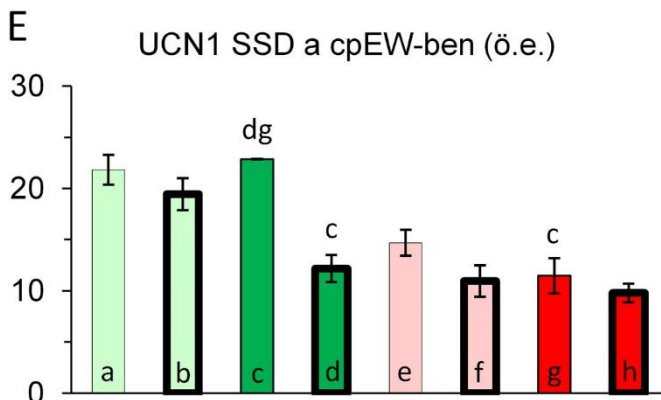
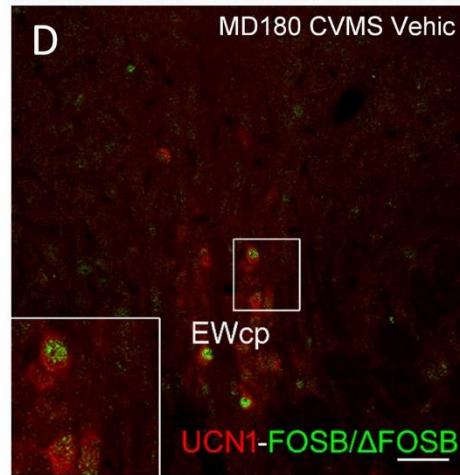
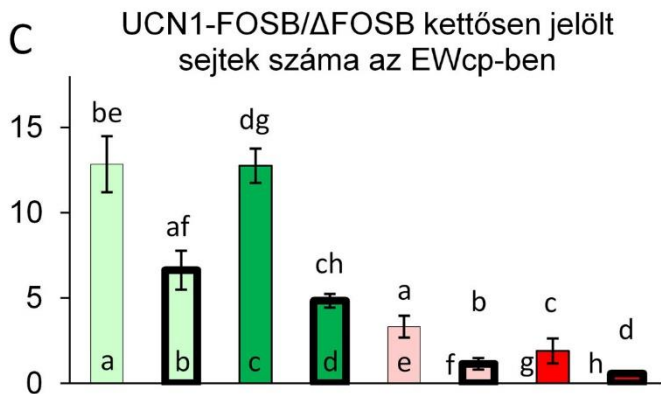
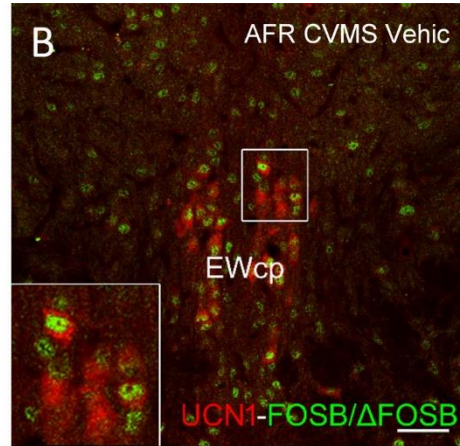
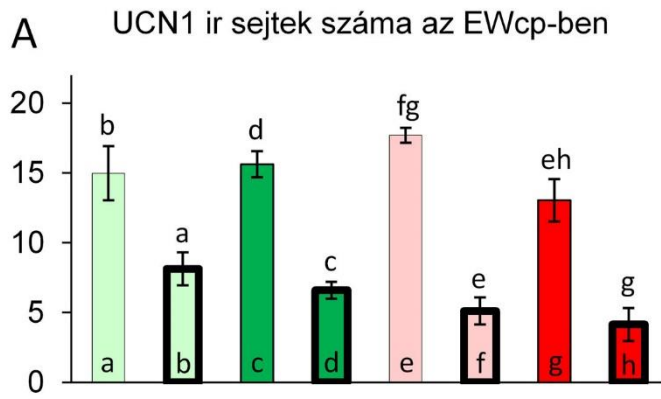
az AFR stressz (c és d oszlop;  $p < 0,001$ ), az MD180 kontroll (e és f oszlop;  $p < 0,001$ ) és MD180 stressz (g és h oszlop;  $p < 0,001$ ) csoportokban is. Az anyai megvonást elszenvedett állatoknál szintén alacsonyabb volt a sejtek száma a stressz után (5.32.A ábra, e és g oszlop;  $p < 0,05$ ), azonban ez a különbség nem volt látható az AFR egereknél (a és c ill. e és g oszlop).

Az UCN1-FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszám a fluoxetin kezelés hatására csökkent, mind a kontroll (5.33.C ábra, a és b oszlop;  $p < 0,05$ ), mind a CVMS-en átesett (c és d oszlop;  $p < 0,001$ ) AFR egerekben. Az anyai megvonás pedig szintén csökkentette a sejtszámot minden összehasonlításban, a megfelelő AFR kontrollal szemben (a és e oszlop;  $p < 0,001$ , b és f oszlop;  $p < 0,001$ , c és g oszlop;  $p < 0,001$ , d és h oszlop;  $p < 0,001$ , valamint a 5.33.B és D ábra).

Az UCN1 SSD-t a fluoxetin kezelés a CVMS-t kapott AFR állatokban (5.33.E ábra, c és d oszlop;  $p < 0,01$ ) csökkentette. A CVMS-t elszenvedett csoportok anyai megvonása esetén az UCN1 SSD 50%-kal csökkent az AFR-hez képest (c és g oszlop;  $p < 0,001$ ).

Az EWcp területén a hisztonacetilációt (F14. táblázat) az SSRI-kezelés csökkentette az AFR egerekben (5.33.G ábra, c és d oszlop;  $p < 0,05$ ). Az MD180 állatokban a CVMS csökkentette a H3K9ac ir sejtszámot (e és g oszlop;  $p < 0,01$  és 5.33.F és H ábra), melyet a fluoxetin kezelést visszafordított (g és h oszlop;  $p < 0,05$ ).

Érdekes korrelációs kapcsolatokat találtunk a EWcp-ben kimutatott funkcionális neuromorfológiai változóknál: a EWcp/H3K9ac ir sejtszám erős pozitív korrelációt mutatott az BNSTov CRH denzitásával ( $\rho = 0,56$ ;  $p < 0,01$ ), az UCN1-FOSB/ $\Delta$ FOSB ir sejtszámmal ( $\rho = 0,74$ ;  $p < 10^{-4}$ ) és az UCN1 SSD-vel ( $\rho = 0,64$ ;  $p < 10^{-3}$ ).

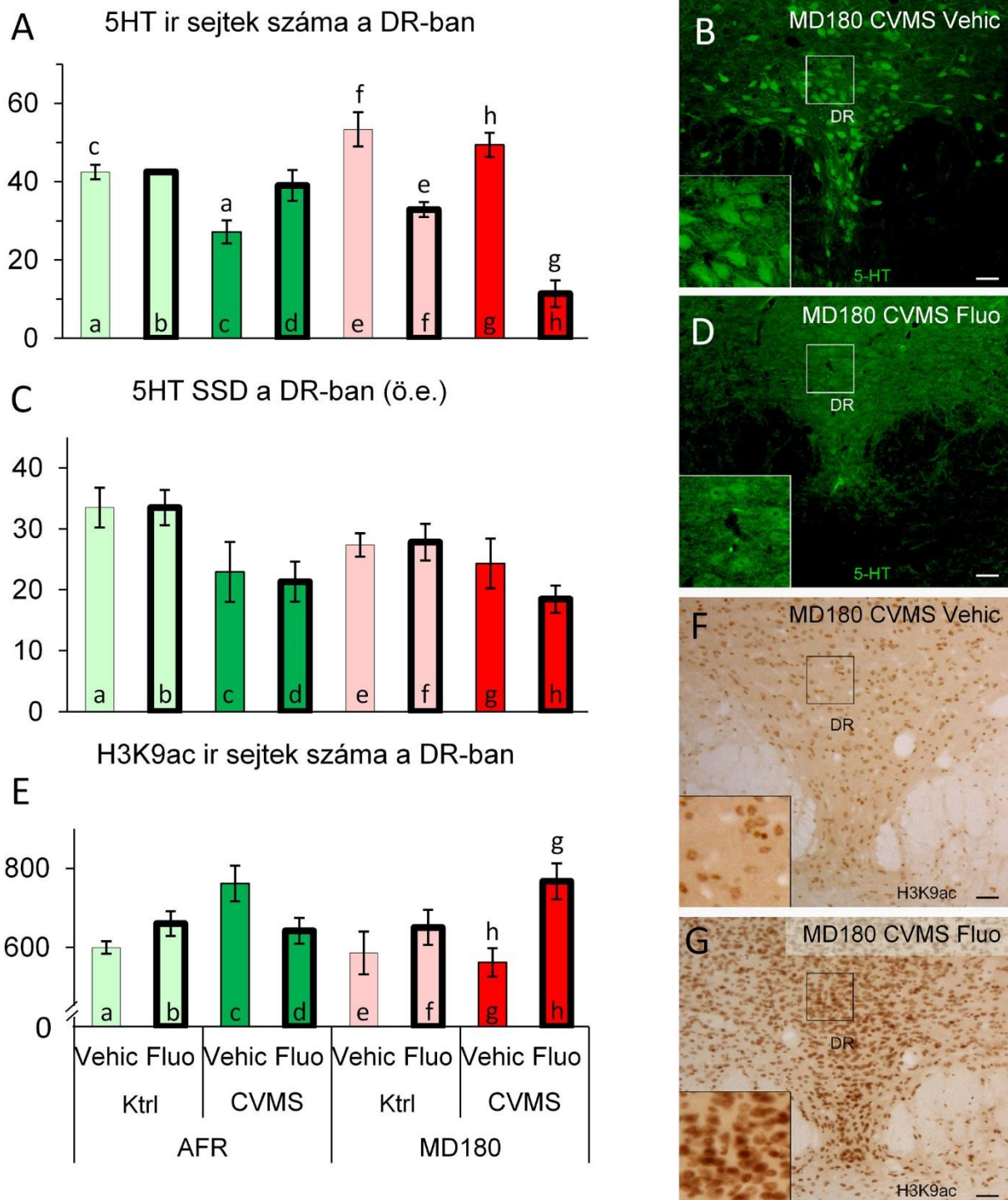


**5.33. ábra.** (124. oldal) Morfológiai eredmények összefoglalása a centrális projekciójú Edinger-Westphal magban (EWcp). **(A)** Az urocortin1 (UCN1) immunreaktív (ir) sejtek száma a EWcp-ben. **(C)** UCN1-FOSB/ $\Delta$ FOSB kettősen jelölt sejtek száma az EWcp-ben. **(B, D)** Reprezentatív mikrofotókon látható az UCN1 (piros) és FOSB/ $\Delta$ FOSB (zöld) kettős jelölés az EWcp-ben egy **(B)** normál állatházi protokoll szerint nevelt (AFR) és egy **(D)** háromórás anyai megvonásban részesült (MD180), krónikus variábilis enyhe stressznek kitett (CVMS), fiziológias sóoldattal injektált (Vehic) állatból. **(E)** Az UCN1 specifikus jeldenzitása (SSD) az EWcp területén, önkényes egységekben (ö.e.) kifejezve. **(G)** Acetil-lizin 9 H3 hiszton (H3K9ac) ir sejtek száma az EWcp-ben. **(F, H)** Reprezentatív mikrofelveleek az EWcp-ben jelölődött H3K9ac ir sejtekről egy **(F)** AFR, CVMS, Vehic és egy **(H)** MD180, CVMS, Vehic állatból. A betűjelek az oszlopok felett a csoportpárok közötti legjelentősebb statisztikai különbségeket jelölik, a post hoc tesztek alapján ( $p < 0,05$ ). Ktrl: kontroll (azaz CVMS-nek nem kitett); Lépték: 100 $\mu$ m.

#### 5.II.2.3.7. DR

A DR/5HT ir sejtek száma (F14. táblázat) a stressz hatására csökkent az AFR állatokban (5.34.A ábra, a és c oszlop;  $p < 0,05$ ), mely SSRI kezelt állatokban nem volt megfigyelhető (a és d oszlop;  $p = 0,99$ ). A fluoxetin kezelés csökkentette az 5HT neuronok számát az MD180 egerekben (e és f oszlop;  $p < 0,01$ ). A stressznek önmagában nem volt további hatása az MD180 egerekben, azonban a fluoxetin kezelés erősen csökkentette az 5HT pozitív neuronok számát a korábban stresszt kapott állatokban (g és h oszlop;  $p < 0,001$ , valamint 5.34.B és D ábra). Az anyai megvonás tehát megfordította az SSRI-kezelés hatását CVMS állatokban (vö. c és d ill. g és h oszlopokat). Habár a MANOVA a stressz fő hatását kimutatta (F14. táblázat) az DR/5HT SSD-re, a post hoc tesztek nem azonosítottak e tekintetben szignifikánsan különböző csoportpárokat (5.34.C ábra).

Az acetilált H3 hiszton tartalmazó sejtek száma magasabb volt az MD180 CVMS-t kapott egerekben az SSRI-kezelést követően a kontrollhoz képest (5.34.E ábra, g és h oszlop,  $p < 0,05$  és 5.34. F és G ábra). A DR/H3K9ac ir sejtek száma pozitívan korrelált a BNSTov/CRH ir ( $\rho = 0,47$ ;  $p < 0,01$ ), a BNSTov/CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtek ( $\rho = 0,46$ ;  $p < 0,01$ ) és a DR/5HT sejtek számával ( $\rho = -0,40$ ;  $p < 0,04$ ), míg negatív korreláció állt fenn az EWcp/UCN1 ir neuronok számával ( $\rho = -0,46$ ;  $p < 0,01$ ).



**5.34. ábra.** A morfológiai eredmények összefoglalása a nucleus raphe dorsalis-ban (DR). (A) A szerotonin (5HT) immunreaktív (ir) sejtek száma a DR-ban. (C) Az 5HT specifikus jeldentitása (SSD) a DR-ban, önkényes egységekből (ö.e.) kifejezve. Mikrofontók az 5HT (zöld) jelölésről háromórás anyai megvonáson átesett (MD180), krónikus variábilis enyhe stressznek kitett (CVMS), (B) fiziológias sóoldattal injektált (Vehic) és (D) fluoxetinnel kezelt (Fluo) állatokból. (E) Az acetil-lizin 9 H3 hiszton (H3K9ac) ir sejtek a DR-ban. (F, G) Mikrofelvételek az acetil-lizin 9 H3 hiszton pozitív sejtekről a DR-ban egy (F) MD180, CVMS, Vehic és egy (G) MD180, CVMS, Fluo állatból. A betűjelek az oszlopok felett a csoportpárok közötti legjelentősebb statisztikai különbségeket jelölik, a post hoc tesztek alapján ( $p < 0,05$ ). Ktrl: kontroll (azaz CVMS-nek nem kitett); AFR: normál állatházi protokoll szerint nevelt állat. Lépték: 100 $\mu$ m.

#### 5.II.2.3.8. Összefüggések a viselkedési tesztek és morfológiai eredmények között

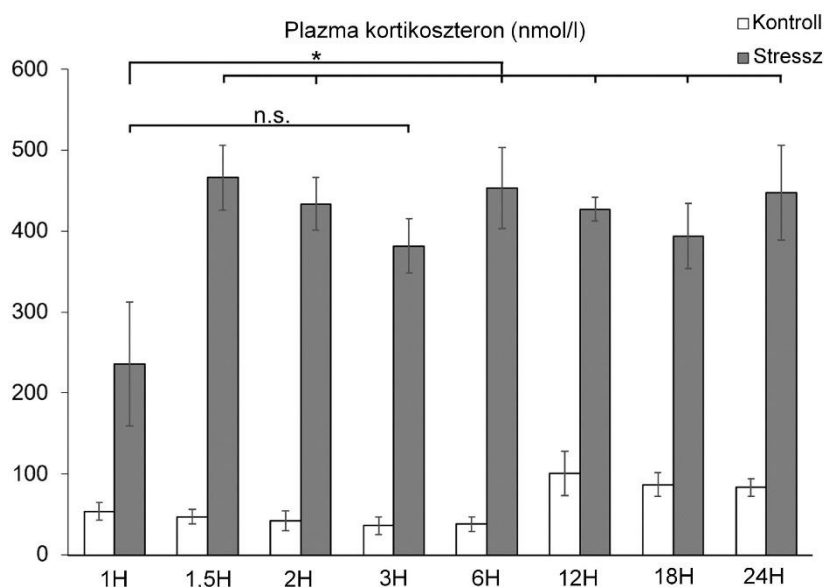
Az LDT során a világos kompartmentben töltött idő negatív korrelációt mutatott a CeA-ban megfigyelt hisztonacetiláció mértékével ( $\rho=-0,40$ ;  $p<0,02$ ). Az MBT által mutatott szorongási szint korrelált a EWcp/UCN1 ( $\rho=0,36$ ;  $p<0,03$ ), DR/5HT ( $\rho=0,41$ ;  $p<0,02$ ) sejtek számával és az DR/5HT SSD-vel is ( $\rho=0,59$ ;  $p<0,001$ ). Továbbá, negatív korrelációt találtunk a szorongás szintje és az BNSTov/CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB sejszám ( $\rho=-0,54$ ;  $p<0,001$ ), valamint a CeA/CRH SSD ( $\rho=-0,58$ ;  $p<0,001$ ) között. A TST-ben mért immobilitási idő negatívan korrelált a BNSTov/CRH sejszámával ( $\rho=-0,46$ ;  $p<0,01$ ) és pozitívan az EWcp/UCN1 sejszámmal ( $\rho=0,46$ ;  $p<0,01$ ). Az FST-ben kapott immobilitási idő erős negatív korrelációt mutatott a VTA hisztonacetilációjával ( $\rho=-0,57$ ;  $p<0,001$ ) és hasonlóan erős, de pozitív kapcsolatot a testtömegváltozással ( $\rho=0,54$ ;  $p<0,001$ ).

### 5.III. A stresszadaptáció életkorfüggő változásainak vizsgálata

Mint az a bevezetésben említésre került, jól ismert tény, hogy a stresszválasz változik az életkorral. Ennek ellenére, viszonylag keveset tudunk ennek háttéréről. Fontos hiányosság volt az irodalomban, hogy az idegsejtszintű aktivitás vizsgálatára gyakran használt funkcionális-morfológiai módszerek közül az azonnali gének működésének életkorfüggő változására alig volt közölt adat, és nem találtunk szisztematikus vizsgálatokat, melyek a patkány teljes élettartamát felölelték volna. Első lépésben ezért akut stressz modellben a FOS immunreaktivitás életkorfüggő változást térképeztük föl. Második munkánkban a FOSB/ $\Delta$ FOSB életkor előrehaladtával bekövetkező változását tanulmányoztuk akut és krónikus stressz modellben. Mivel a CRH rendszer a stresszadaptációban alapvető szerepet játszik, harmadik lépésben a CRH tartalmú területeken vizsgáltuk az akut és krónikus stressz által kiváltott FOS és FOSB/ $\Delta$ FOSB neuronális aktiváció mintázatot, patkányban.

#### 5.III.1 A FOS immunreaktivitás változása az életkor függvényében akut stressz modellben

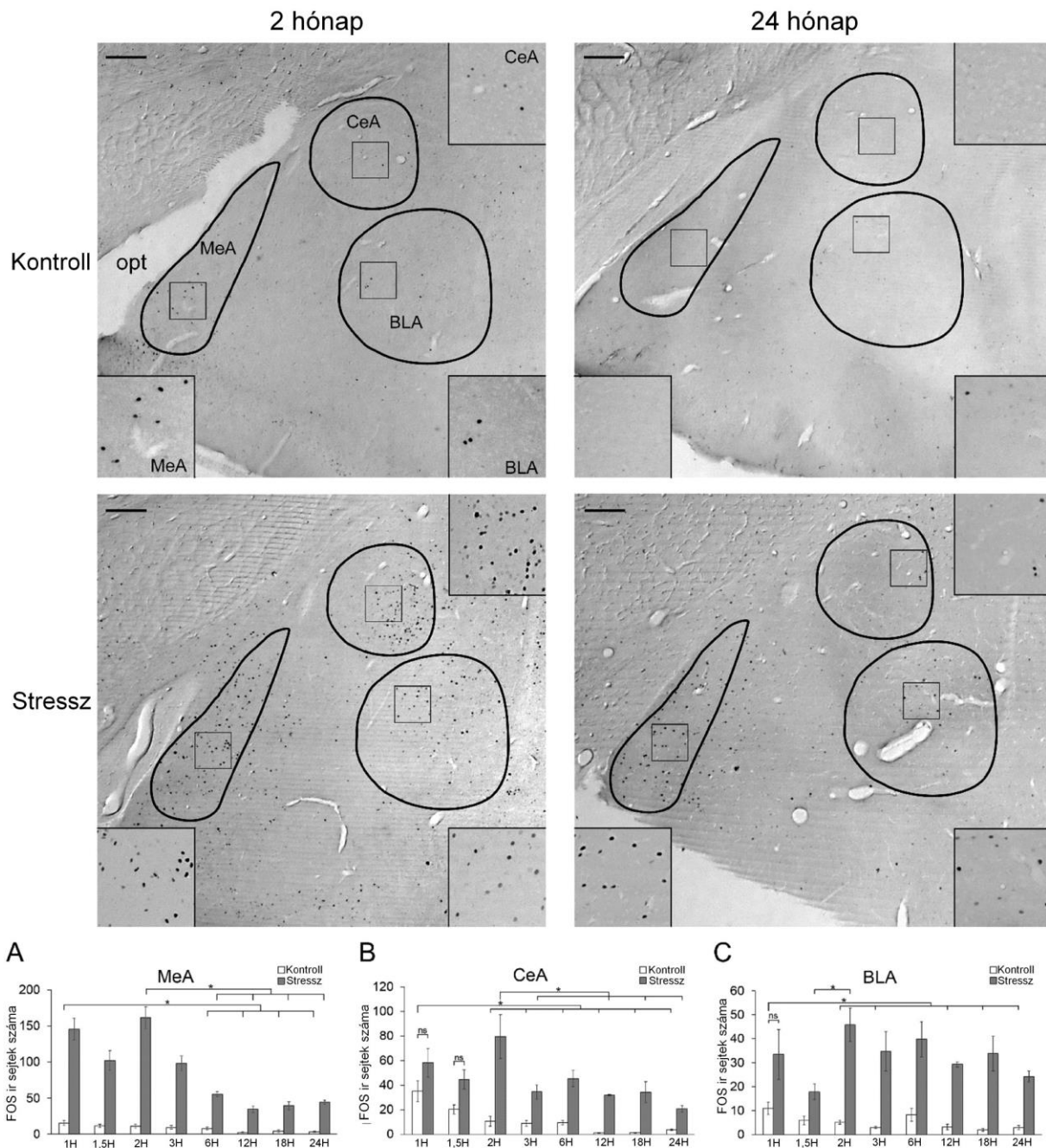
E kísérlet célja az volt, hogy nyolc korcsoportban vizsgáljuk 13 agyterület akut restraint stressz (ARS) hatására fellépő aktivációját szemi-kvantitatív FOS immunhisztokémia segítségével. Annak érdekében, hogy meggyőződjünk az ARS expozíció hatékonyságáról, a 8 vizsgált korcsoportban meghatároztuk az állatok plazma kortikoszteron szintjét, mely a HPA tengely aktivitásának egyik fő indikátora. Az ARS expozíció minden korcsoportban CORT szintemelkedést idézett elő, melynek mértéke a 1 hónapos állatokban még kisebb volt, de később egy viszonylag állandó szinten maradt (5.35. ábra).



**5.35. ábra.** A plazma kortikoszteron (nmol/l) szint az életkor függvényében kontroll és akut restraint stressznek (Stressz) kitett patkányokban. A stressz minden korcsoportban szignifikáns CORT szintemelkedést okozott, ezért ezt nem emeltük ki. A stressznek kitett 1 hónapos (H) állatok alacsonyabb CORT szinttel rendelkeztek, mint a többi stresszelt korcsoport (a 3 hónapos kivételével).  $n=4-5$ /csoport.  $*p<0,05$ , a post hoc teszt szerint; n.s.: nem szignifikáns.

A MeA (5.36.A ábra, F15. táblázat) területén a stressz minden korcsoportban megemelte a FOS sejtszámot ( $p<0,001$ ), míg a fiatal állatokban ez a CeA (5.36.B ábra) és a BLA (5.36.C ábra) területén a magasabb bazális szint miatt nem volt szignifikáns. A bazális FOS jel az amygdalában csökkent az életkor előrehaladtával (MeA:  $\rho=-0,747$ ;  $p<10^{-6}$ ; CeA:  $\rho=-0,838$ ;  $p<10^{-6}$ ; BLA:  $\rho=-0,537$ ;  $p=0,001$ ). A legmagasabb FOS ir neuronszámot a kéthónapos ARS csoportban detektáltuk, mely a korrallal csökkent a MeA ( $\rho=-0,828$ ;  $p<10^{-6}$ ) és CeA területén ( $\rho=-0,575$ ;  $p<10^{-6}$ ).

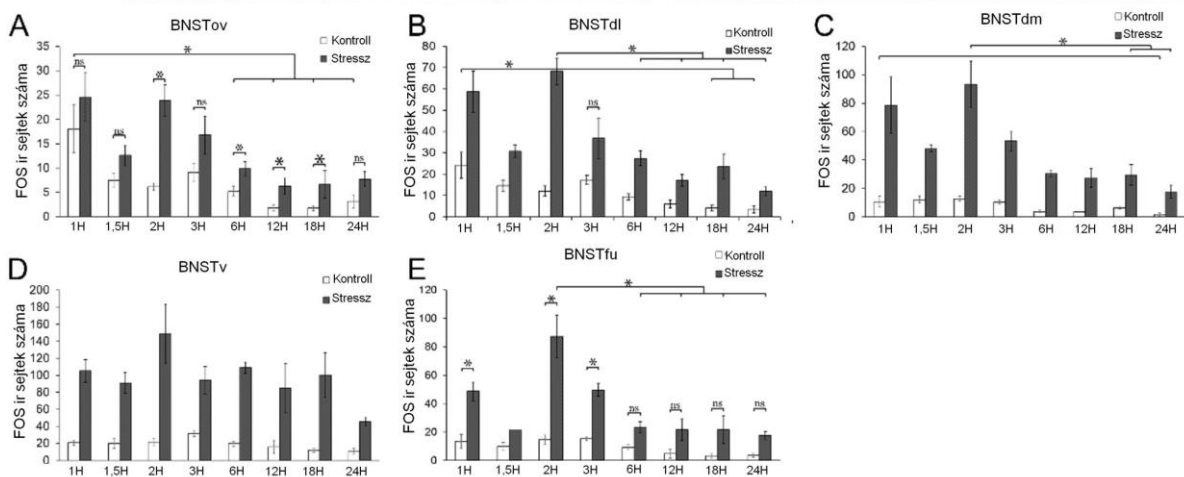
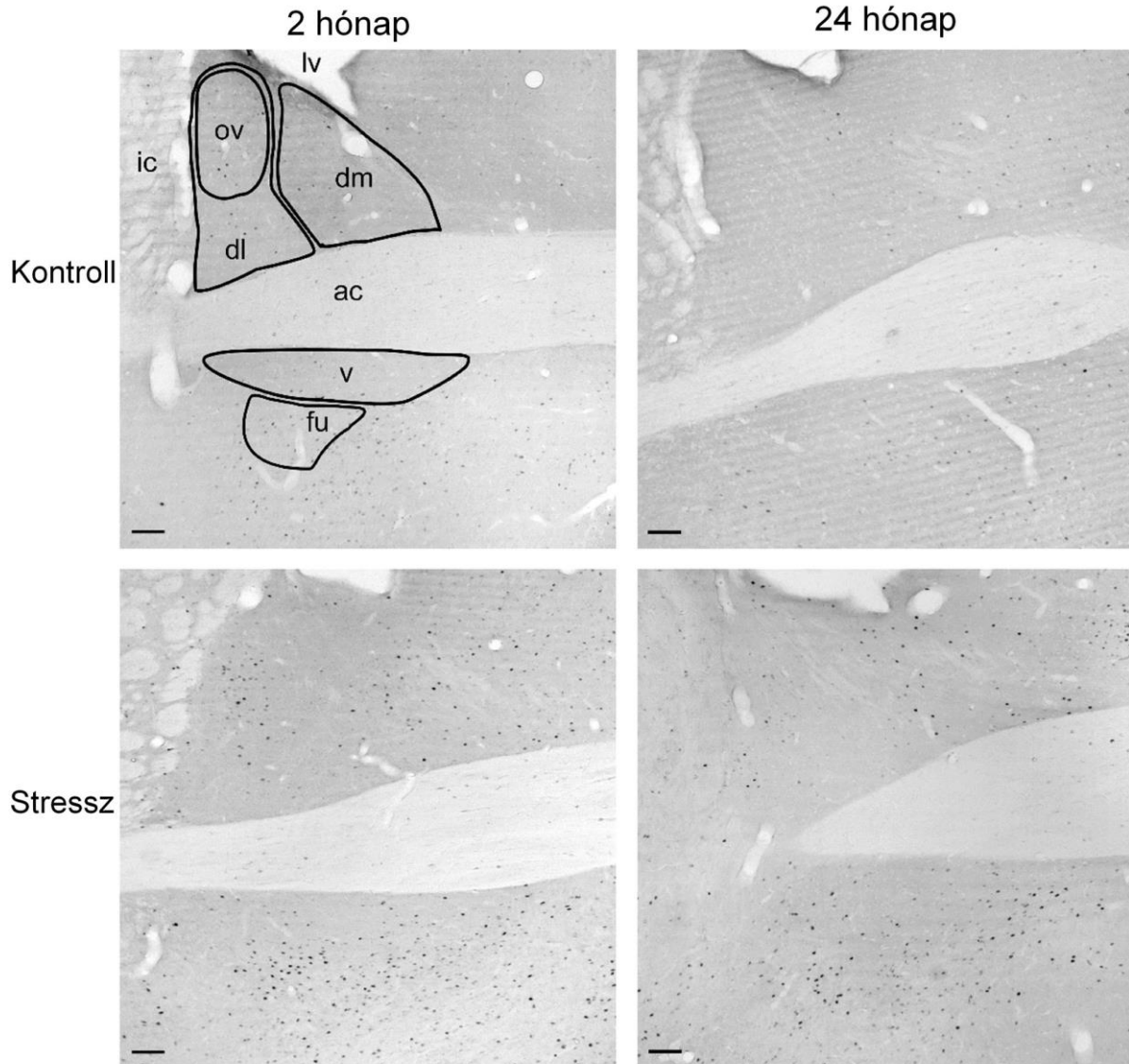




**5.36. ábra.** A FOS immunreaktivitás függ az életkortól a mediális (MeA) centrális (CeA) és basolaterális (BLA) amygdala magokban. Kettő és 24 hónapos (H) kontroll és akut restraint stressznek (ARS) kitett (Stressz) állatok reprezentatív fotói. A kijelölt területeket nagy nagyítású képzetékek is mutatják. A FOS immunreaktivitás korfüggő változását hisztogramok szemléltetik a MeA (A), CeA (B) és BLA (C) területén. Az ARS hatása néhány esettől eltekintve (n.s.) minden korcsoportban szignifikáns volt, ezért azt itt nem jelöltük szisztematikusan. A csoportok közti összehasonlításban a korfüggő eltéréseket emeltük, ki a post hoc teszt szerint ( $*p < 0.05$ ;  $n = 4-5$ /csoport). Fehér oszlopok kontroll, szürke oszlopok: ARS. opt: tractus opticus. Lépték:  $100\mu\text{m}$ .

A BNST (5.37. ábra, F15-16. táblázat) területén a bazális FOS jel az életkorral csökkent (BNSTov:  $\rho = -0,752$ ;  $p < 10^{-6}$ ; BNSTdl:  $\rho = -0,788$ ;  $p < 10^{-6}$ ; BNSTv:  $\rho = -0,401$ ;  $p = 0,019$ ; BNSTfu:  $\rho = -0,609$ ;  $p < 10^{-6}$ ). Az ARS-re adott válasz a BNSTv kivételével szintén csökkent a kor

előrehaladtával (BNSTov:  $\rho=-0,696$ ;  $p<10^{-6}$ ; BNSTdl:  $\rho=-0,707$ ;  $p<10^{-6}$ ; BNSTfu:  $\rho=-0,695$ ;  $p<10^{-6}$ ). A BNSTov (5.37.A ábra) területén a fiatal állatokra jellemző magasabb bazális FOS immunreaktivitás volt jelen, mely mellett az ARS nem idézett elő szignifikáns mértékű aktivitásfokozódást.



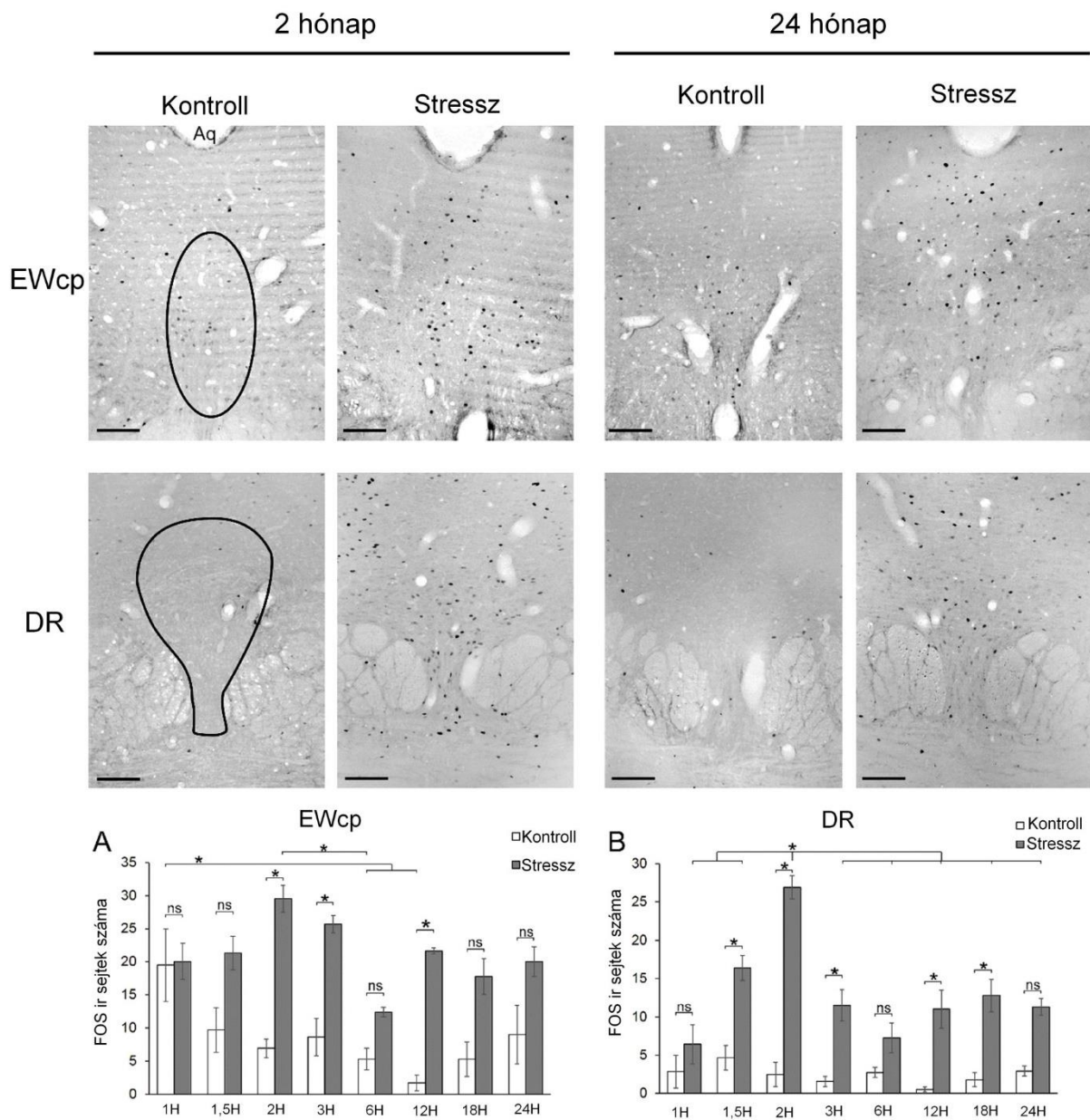
**5.37. ábra.** (130. oldal) *A FOS immunreaktivitás és az életkor összefüggése a nucleus interstitialis striae terminalis (BNST) divízióinak (ov: ovális; dl: dorsolaterális; dm: dorsomediális, v: ventrális, fu: fusiformis) területén. Kettő és 24 hónapos (H) kontroll és akut restraint stressznek (ARS) kitett (Stressz) állatok reprezentatív fotói. A FOS immunreaktív (ir) sejtszám változását hisztogramok szemléltetik a BNSTov (A), BNSTdl (B) és BNSTdm (C) BNSTv (D) és BNSTfu (E) területén. Az ARS hatása néhány esettől eltekintve (n.s.) minden korcsoportban szignifikáns volt, ezért a korcsoporton belüli szignifikanciát nem jelöltük szisztematikusan. A csoportok közti összehasonításban a korfüggő eltéréseket emeltük ki, a post hoc teszt szerint (\* $p < 0.05$ ;  $n = 4-5$ /csoport). Fehér oszlopok: kontroll, szürke oszlopok: ARS. ac: commissura anterior, ic: capsula interna; lv: ventriculus lateralis. Lépték:  $100\mu\text{m}$ .*

A PVNp (5.38.A ábra, F15. táblázat) területén a bazális FOS aktivitás mértékében nem láttunk életkorfüggő különbséget. Az ARS minden korcsoportban emelte a FOS jelet, de a kor előrehaladtával a FOS immunreaktivitás csökkent ( $\rho = -0,508$ ;  $p < 10^{-6}$ , F17. táblázat). A PVNm-ban (5.38.B ábra) a kontroll egyedeknél a FOS tartalmú sejtek száma csökkent a korrallal ( $\rho = -0,480$ ;  $p = 0,003$ ). Az ARS a 1,5 ( $p = 0,28$ ) és a 6 ( $p = 0,27$ ) hónapos korcsoportok kivételével szignifikáns hatással bírt, melynek mértéke a korrallal nem csökkent szignifikáns mértékben.



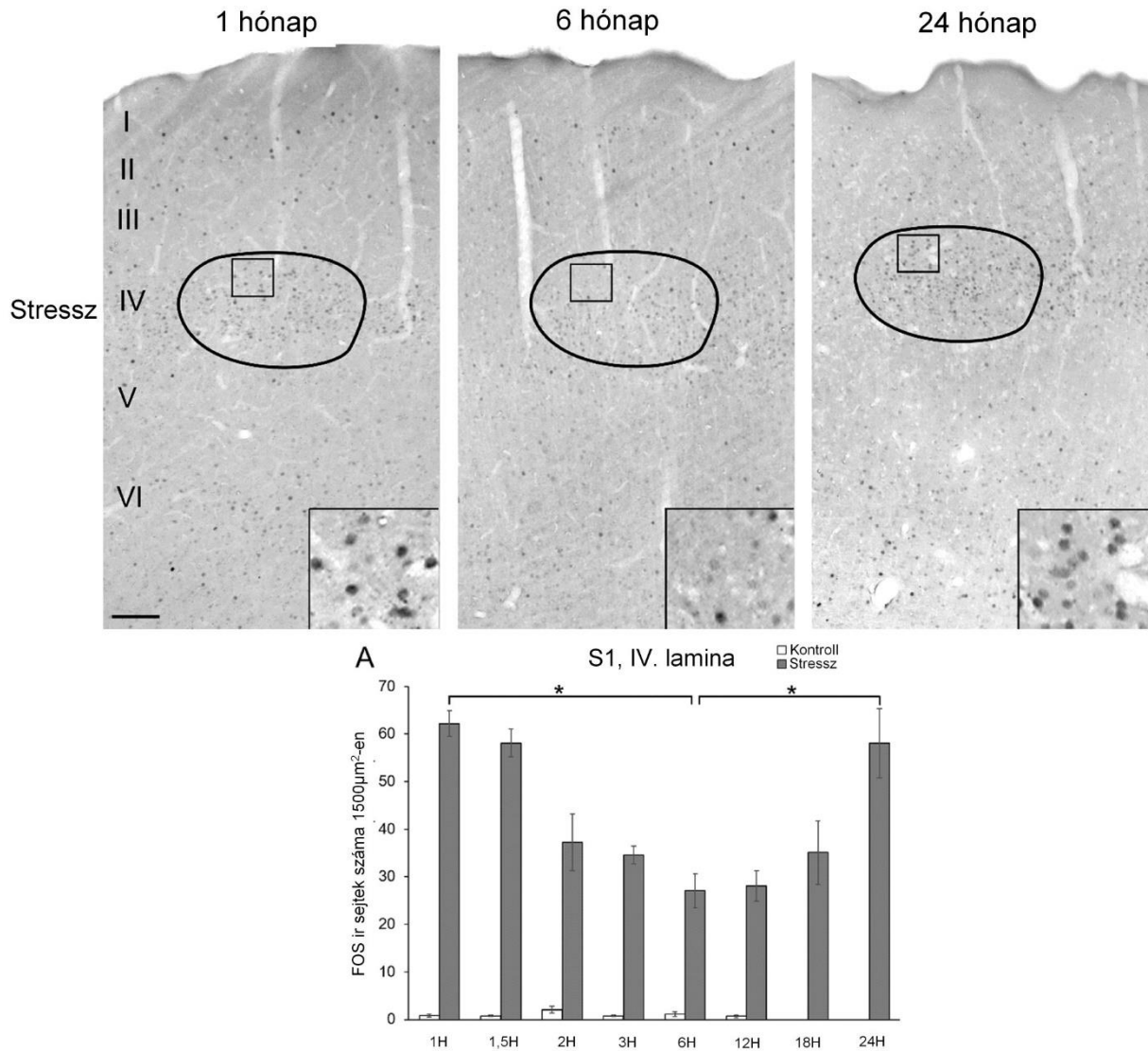
Az EWcp-ben magas bazális FOS jelet láttunk az egy hónapos csoportnál (5.39.A ábra), mely gyakorlatilag megegyezett az egykorú stressz csoport átlagértékével ( $p=0,88$ ). A legalacsonyabb kontroll értéket a 12 hónapos állatokban ( $p<0,02$ ) találtuk. A stresszexpoziáció a 2, 3, és 12 hónapos állatokban emelte a FOS tartalmú sejtek számát az EWcp-ben. Az életkor hatása kevésbé volt kifejezett az EWcp területén ( $\rho=-0,430$ ;  $p<0,05$ ).

A DR területén (5.39.B ábra) a kontroll csoportokat alacsony bazális FOS sejttség jellemezte. Az 1, a 6 és a 24 hónapos csoportok kivételével, az ARS emelte a FOS tartalmú sejtek számát ( $p<0,05$ ). A legmagasabb FOS aktivitást a két hónapos állatoknál találtuk, mely minden más csoport értékétől különbözött.



**5.39. ábra.** (133. oldal) A FOS immunreaktivitás és az életkor összefüggése a centralis projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp) és a nucleus raphe dorsalis (DR) területén. Kettő és 24 hónapos (H) kontroll és akut restraint stressznek kitett (Stressz) állatok reprezentatív fotói. A FOS immunreaktív (ir) sejtszám változását hisztogramok szemléltetik a EWcp (A), és DR (B) területén. Az ARS hatása néhány esettől eltekintve (n.s.) minden korcsoportban szignifikáns volt, ezért a korcsoporton belüli szignifikanciát nem jelöltük szisztematikusan. A csoportok közti összehasonlításban a korfüggő eltéréseket emeltük ki, a post hoc teszt szerint ( $*p < 0.05$ ;  $n = 4-5$ /csoport). Fehér oszlopok: kontroll, szürke oszlopok: stressz. Aq: aqueductus cerebri. Lépték:  $100\mu\text{m}$ .

Azzal a céllal, hogy megvizsgáljuk, vajon a FOS immunjel korral csökkenő aktivitása olyan agyterületen is tetten érhető-e, mely nem játszik fontos szerepet a stresszadaptáció szabályozásában, kiválasztottuk az elsődleges szomatoszenzoros (S1, barrel cortex) kéreg IV. lamináját. Azért választottuk ezt a régiót, mert az állatok bajuszszálait a restrainer cső kúpos vége meghajlította, ingerelve azokat, mely a terület FOS aktivációját indukálhatja. A kontroll állatokban gyakorlatilag detektálhatatlan volt a FOS. Az ARS ugyanakkor erőteljes választ eredményezett, és a kor is hatással volt a IV. lamina sejtjeiben a FOS megjelenésére (5.40. ábra, F15-16. táblázat). A legfiatalabb és legidősebb állatok kb. kétszer nagyobb választ mutattak, mint a 6 és 12 hónapos egyedek ( $p < 0,001$ ), vagyis a fent tárgyalt régiókkal ellentétben, itt egy U alakú görbével leírható dinamikát láttunk (5.40.A ábra), és lineáris korreláció nem volt jellemző ( $\rho = 0,281$ ,  $p = 0,102$ , F17. táblázat).



**5.40. ábra.** A FOS immunreaktivitás és az életkor összefüggése az elsődleges szomatoszenzoros (S1, barrel cortex) kéreg területén. Egy, 6 és 24 hónapos (H) akut restraint stressznek kitett (Stressz) állatok mintáinak reprezentatív fotói. A FOS immunreaktív (ir) sejtszám változását az (A) hisztogram szemlélteti egy 1500μm<sup>2</sup>-es területen, a IV. laminában. A kijelölt közel ovális terület a IV. lamina egy barrel régióját szemlélteti. Nagy nagyítású képetét is mutatja a négyszöggel jelölt régiókban a FOS ir magok sűrűségét. Az ARS hatása minden korcsoportban szignifikáns volt, ezért a korcsoporton belüli szignifikanciát nem jelöltük szisztematikusan. A csoportok közti összehasonlításban a korfüggő eltéréseket emeltük ki, a post hoc teszt szerint (\* $p < 0.05$ ;  $n = 4-5$ /csoport). Fehér oszlopok: kontroll, szürke oszlopok: stressz. I-VI: neocorticalis laminák. Lépték: 100μm.

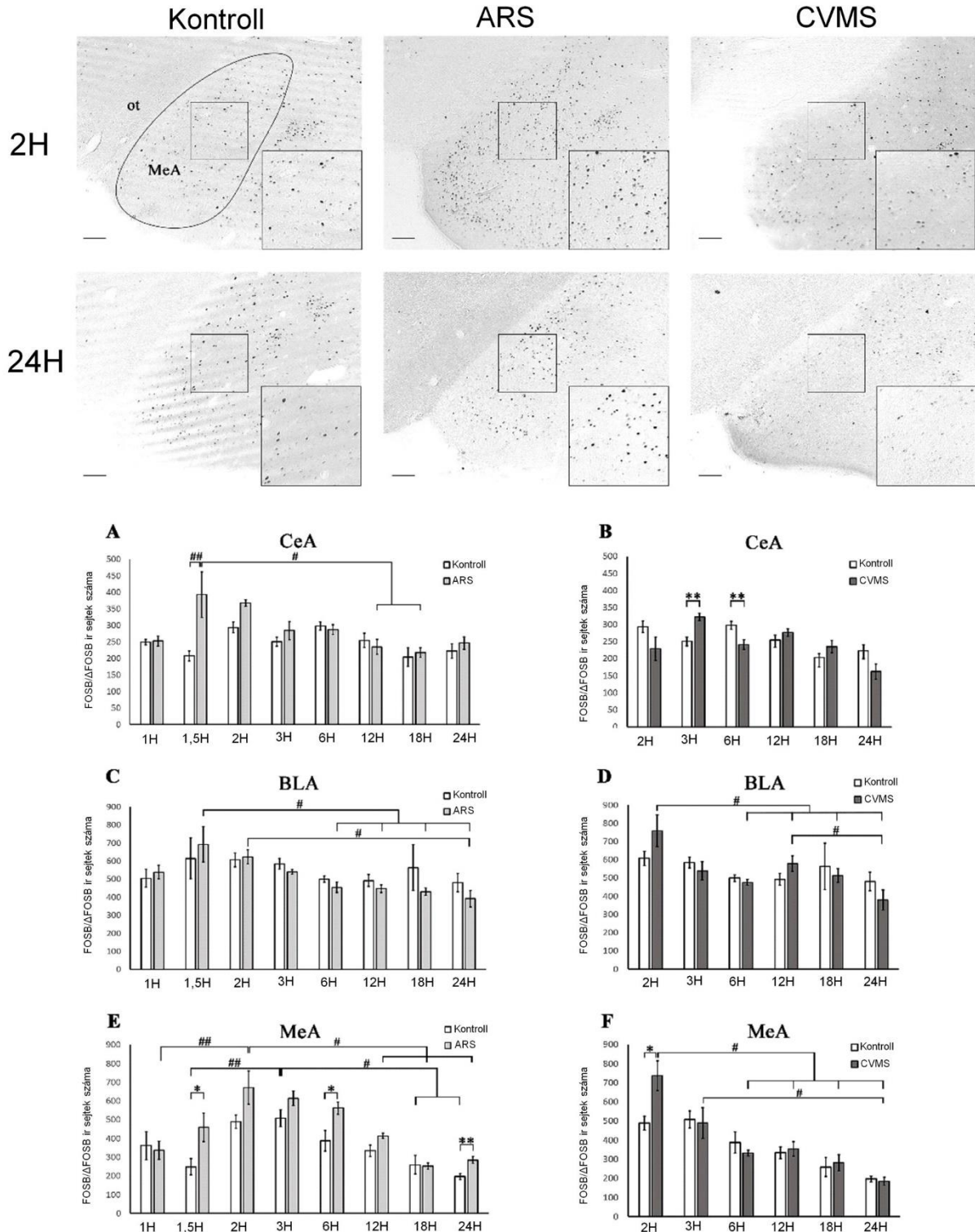
### 5.III.2. A FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás változása az életkor függvényében akut és krónikus variábilis enyhe stressz modellben

A FOSB/ $\Delta$ FOSB a FOS mellett szintén gyakran használt funkcionális-morfológiai markere a sejtekben az új gének átírását is szükségessé tevő adaptáció beindulásának. Ebben a munkában a FOSB/ $\Delta$ FOSB életkor függő dinamikáját értékeltük. Akut stresszben a FOS-hoz hasonlóan a teljes hosszúságú FOSB izoforma is megjelenik, míg krónikus stresszhatás során inkább a  $\Delta$ FOSB változat válik uralkodóvá, és halmozódik fel a sejtekben. Ezért, ebben a munkában az ARS és a CVMS modellt is használtunk, és életkorfüggő változásokat kerestünk.

#### 5.III.2.1. Bazális és az ARS által kiváltott FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás az életkor függvényében

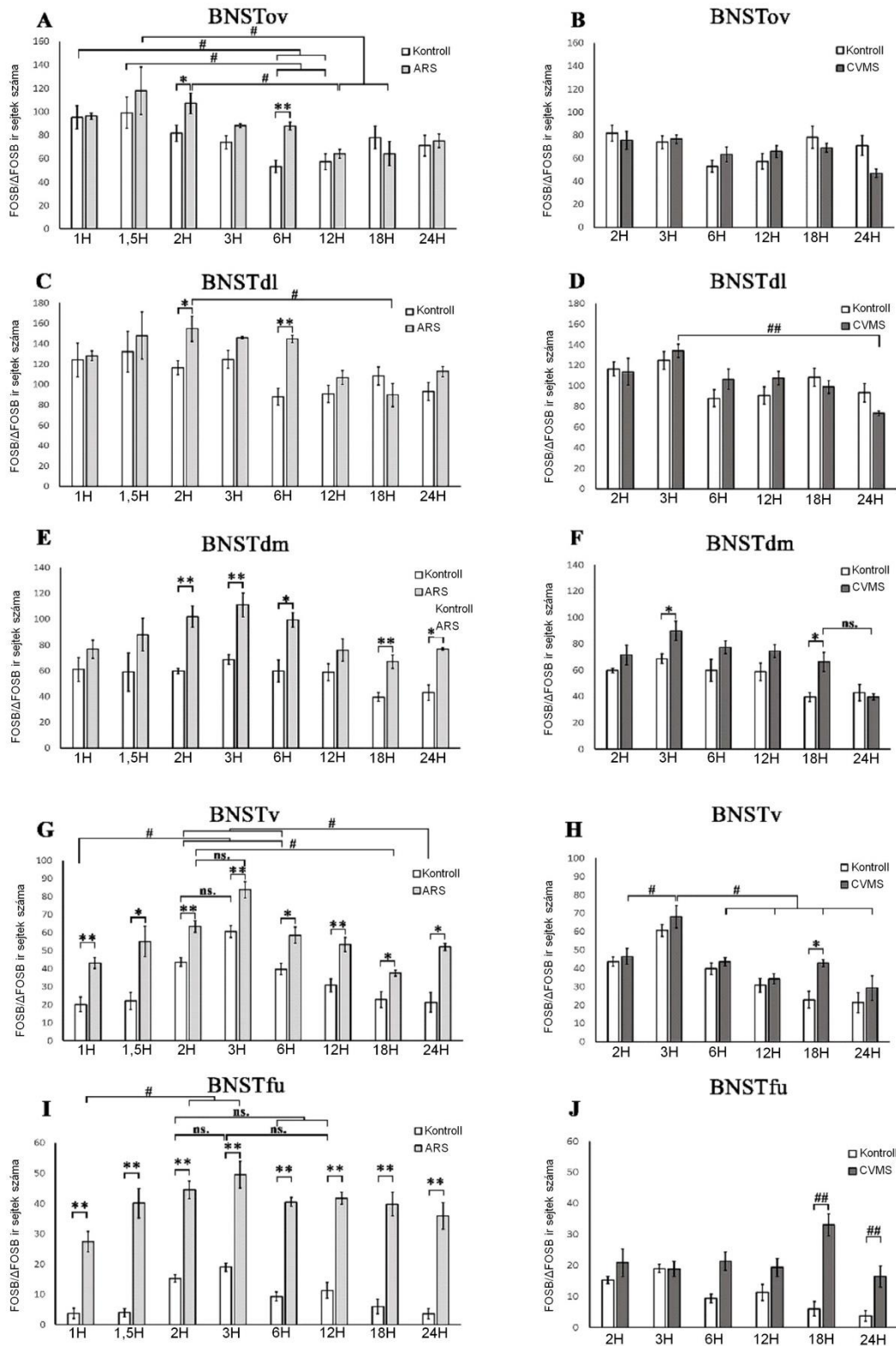
Az amygdala mindhárom divíziójában a fiatal, 1,5 és 2 hónapos ARS-nek kitett patkányok emelkedett FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszámot mutattak a (5.41. ábra, F18-20. táblázat), mely az életkor előrehaladtával csökkent (CeA:  $\rho=-0,41$ ;  $p<0,05$ ; BLA:  $\rho=-0,62$ ;  $p<10^{-4}$ ; MeA:  $\rho=-0,36$ ;  $p<0,05$ , F19. táblázat). A t tesztek a MeA-ban megerősítették az ARS hatását a FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszámra (5.41.E ábra, F21. táblázat).





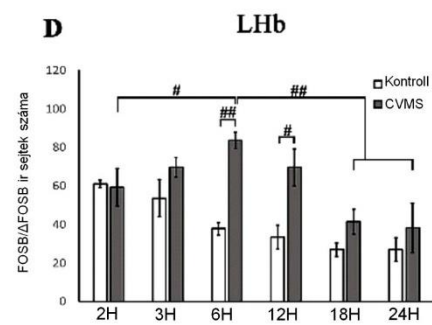
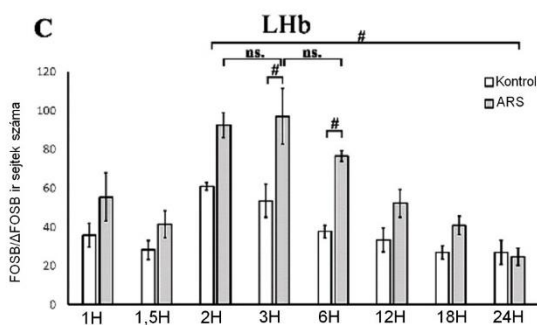
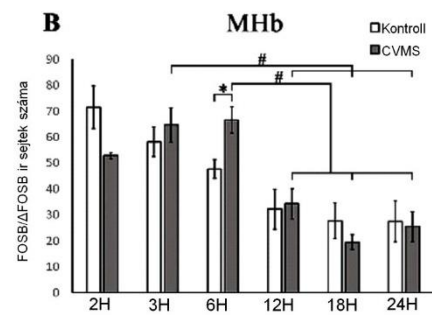
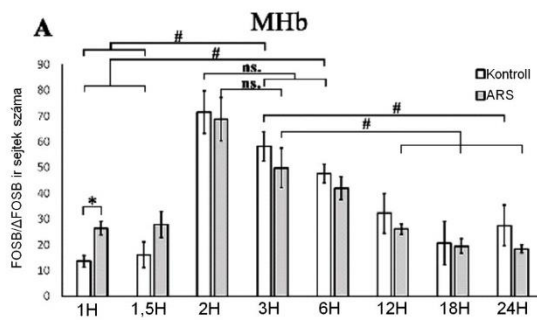
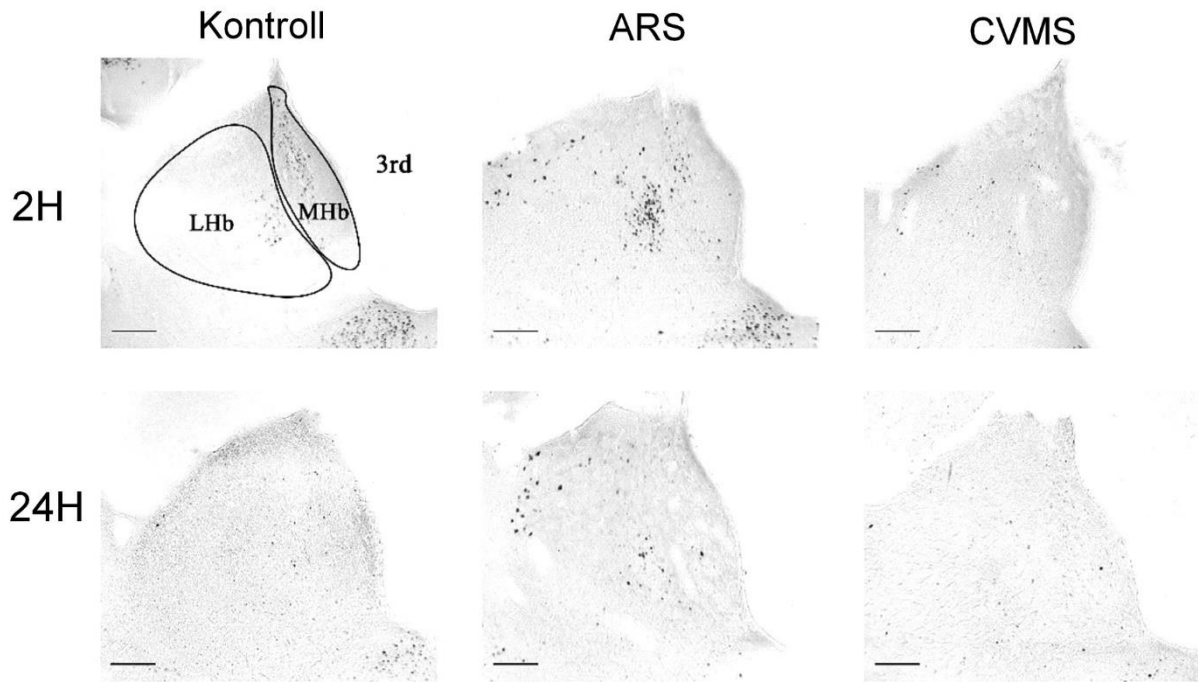
**5.41. ábra.** A FOSB/ΔFOSB immunreaktivitás és az életkor közötti kapcsolat az amygdalában. Reprezentatív képek 2 és 24 hónapos (H) kontroll, akut restraint stressz (ARS) és krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) exponált patkányokból a mediális amygdala (MeA) területén. A FOSB/ΔFOSB immunreaktív (ir) magok számát nyolc korcsoportban vizsgáltuk a MeA (A, B), a centrális (CeA) (C, D) és a basolaterális (BLA) (E, F) amygdala területén. Fehér oszlop: kontroll; világosszürke oszlop: ARS, sötétszürke oszlop: CVMS exponált állatok (n=4-7/csoport). ot: tractus opticus. #p<0,05, ##p<0,01 a post hoc teszt szerint. \*p<0,05, \*\*p<0,01 a t tesztek szerint. Lépték: 100 μm.

A BNST ovális magjában (5.42.A ábra) mind a bazális ( $\rho=-0,41$ ;  $p<0,01$ ), mind az ARS indukált FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszám csökkent ( $\rho=-0,68$ ;  $p<10^{-4}$ ; F19. táblázat) a kor előrehaladtával. A BNSTdl területén (5.42.B ábra) ez az ARS csoportra volt jellemző ( $\rho=-0,42$ ;  $p<0,05$ ), míg a BNSTdm (5.42.C ábra) esetében a korrelációanalízis is csak a kontroll állatoknál mutatott gyenge összefüggést az életkor és a sejtszám között ( $\rho=-0,38$ ;  $p<0,05$ ), annak ellenére, hogy ARS kifejezettebb sejtszámnövelő hatással bírt (F21. táblázat). A BNSTv és BNSTfu területén nem találtunk Spearman-féle korrelációt az életkor és a FOSB/ $\Delta$ FOSB ir sejtek száma között, bár a stressz hatásosan emelte a sejtszámot minden korcsoportban (5.42.G, I ábra).



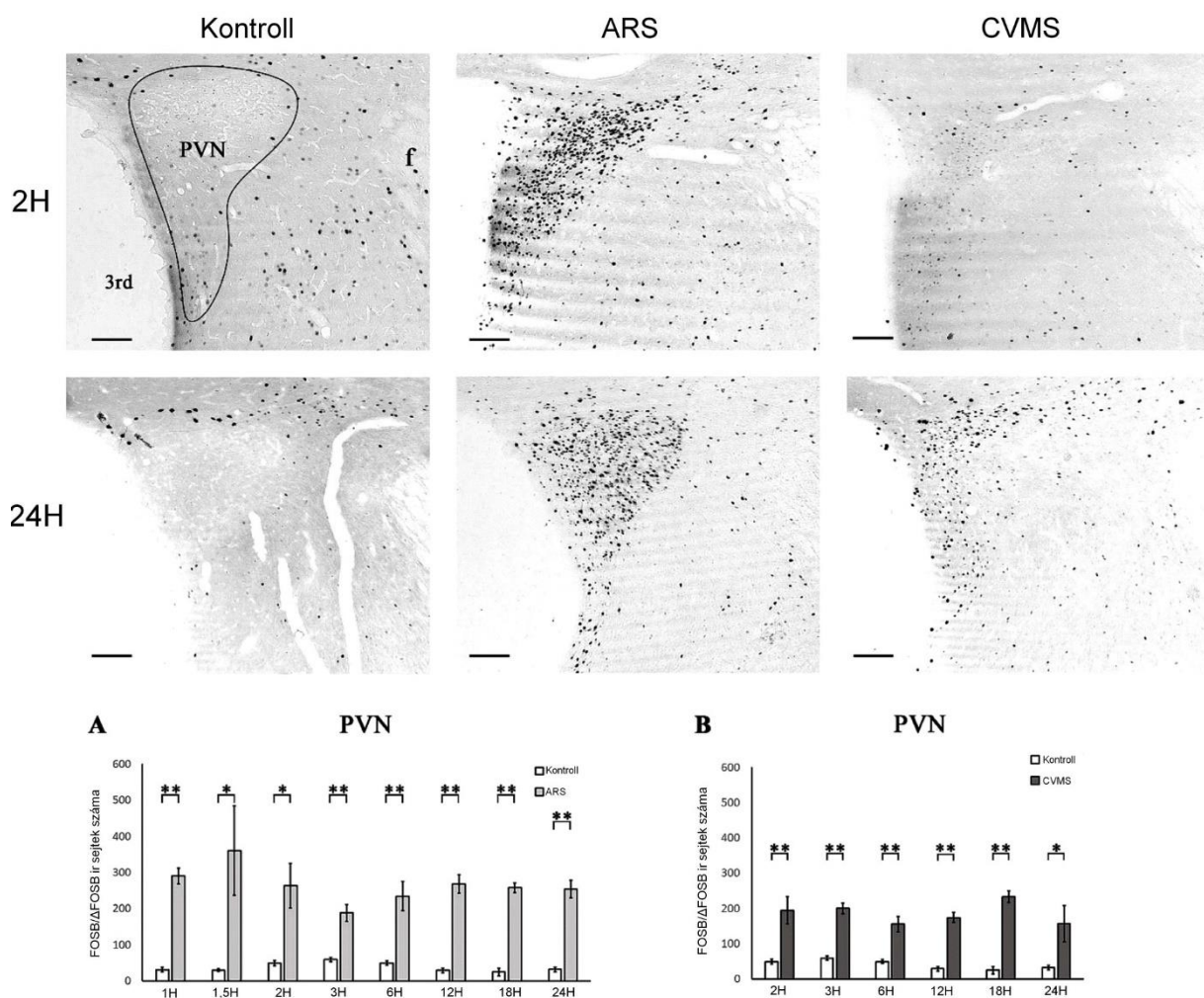
**5.42. ábra.** A FOSB/ΔFOSB immunreaktivitás és az életkor közötti kapcsolat a nucleus interstitialis striae terminalis (BNST) területén. A FOSB/ΔFOSB immunreaktív (ir) magok számát nyolc korcsoportban értékeltük, az ovális (BNSTov) (A, B), a dorsolaterális (BNSTdl) (C, D), dorsomedialis (BNSTdm) (E, F), ventrális (BNSTv) (G, H) és fusiformis (BNSTfu) (I, J) divízió területén, akut restraint stress (ARS) illetve krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) modellben. Fehér oszlop: kontroll; világosszürke oszlop: akut restraint stressz (ARS); sötétszürke oszlop: krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) exponált állatok ( $n = 4-7$ /csoport). # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ns. nem szignifikáns a post hoc teszt szerint. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  a t tesztek szerint.

A mediális (MHb) és laterális habenula (LHb) magok területén (5.43. ábra) viszonylag magas bazális FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás volt jellemző, melynek maximumát 2 hónapos kontrollpatkányokban láttuk, és ez az előbbi mag esetében a korrallal csökkent ( $\rho=-0,41$ ;  $p<0,05$ ). Ennek megfelelően, az ARS hatása csak az 1 hónapos állatoknál (MHb), míg a LHb esetében a 3 és 6 hónapos korban volt szignifikáns ( $p<0,05$ , F22. táblázat). A fiatal állatok alacsony értékei miatt a Spearman analízis nem talált lineáris összefüggést a kor és a sejtszám között, ARS után.



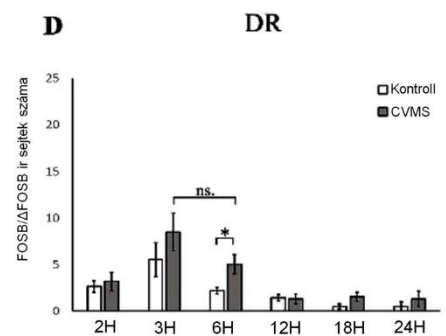
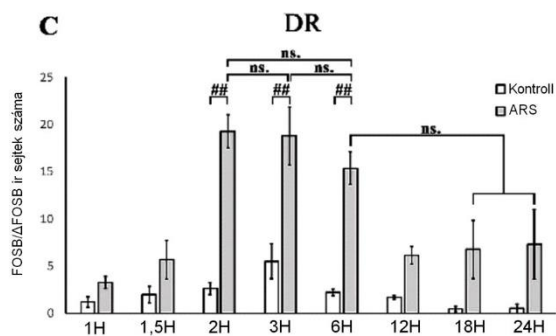
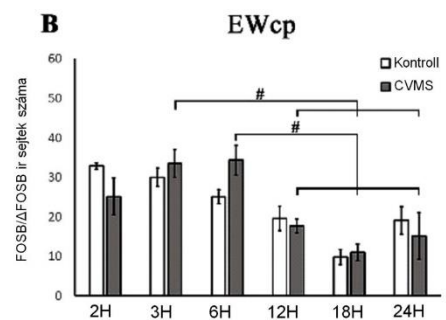
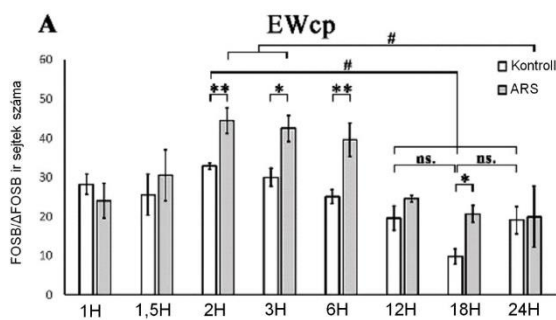
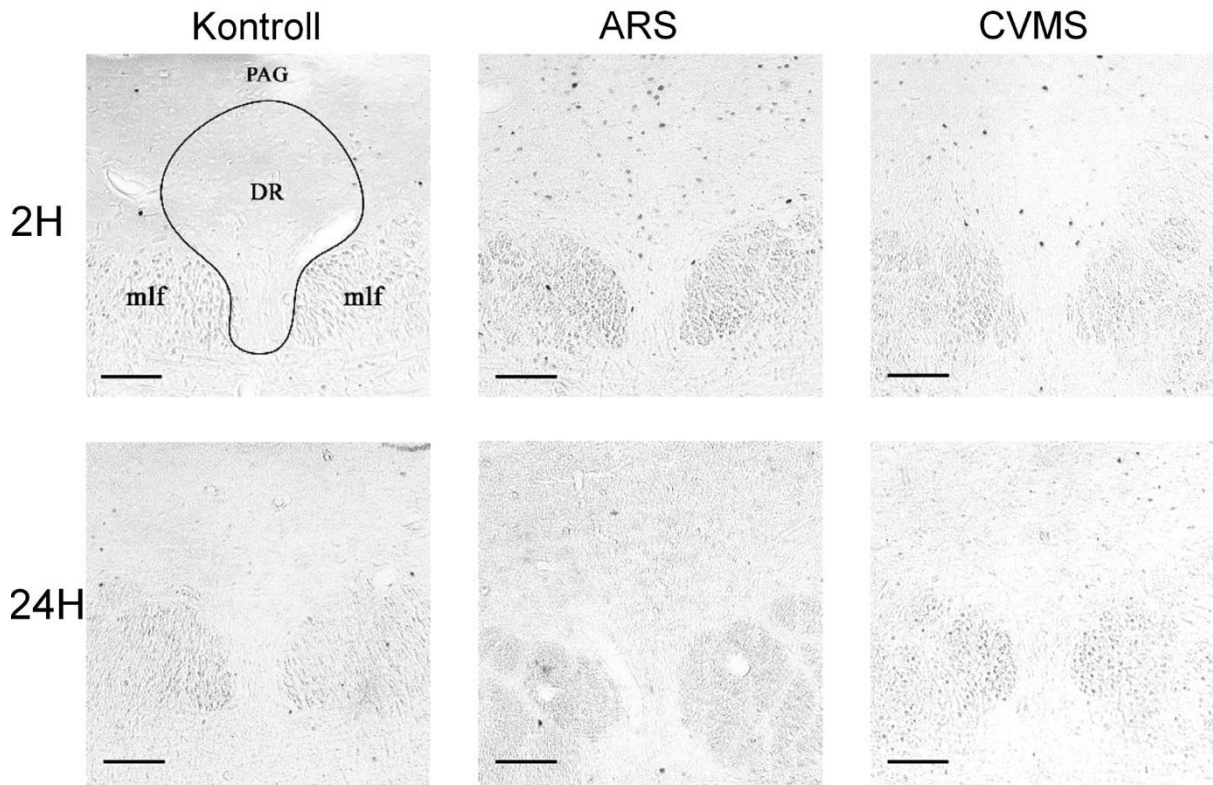
**5.43. ábra.** (140. oldal) A FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás és az életkor közötti kapcsolat a mediális (MHb) és laterális (LHb) habenulában. Reprezentatív képek 2 és 24 hónapos (H) kontroll, akut restraint stressz (ARS) és krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) exponált patkányokból. A FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktív (ir) magok számát nyolc korcsoportban értékeltük a MHb (A, B) és a LHb (C, D) területén. Fehér oszlop: kontroll; világosszürke oszlop: ARS; sötétszürke oszlop: CVMS exponált állatok ( $n = 4-7$ /csoport). # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ns. nem szignifikáns a post hoc teszt szerint. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  a t tesztek szerint. 3rd: ventriculus tertius. Lépték: 100  $\mu$ m.

A PVN területén sem az ANOVA (F23. táblázat), sem a Spearman teszt nem talált szignifikáns összefüggést az életkor és a FOSB/ $\Delta$ FOSB ir sejtek száma között, az ARS expozíció minden korcsoportra jellemző szignifikáns hatása mellett (5.44.A ábra).



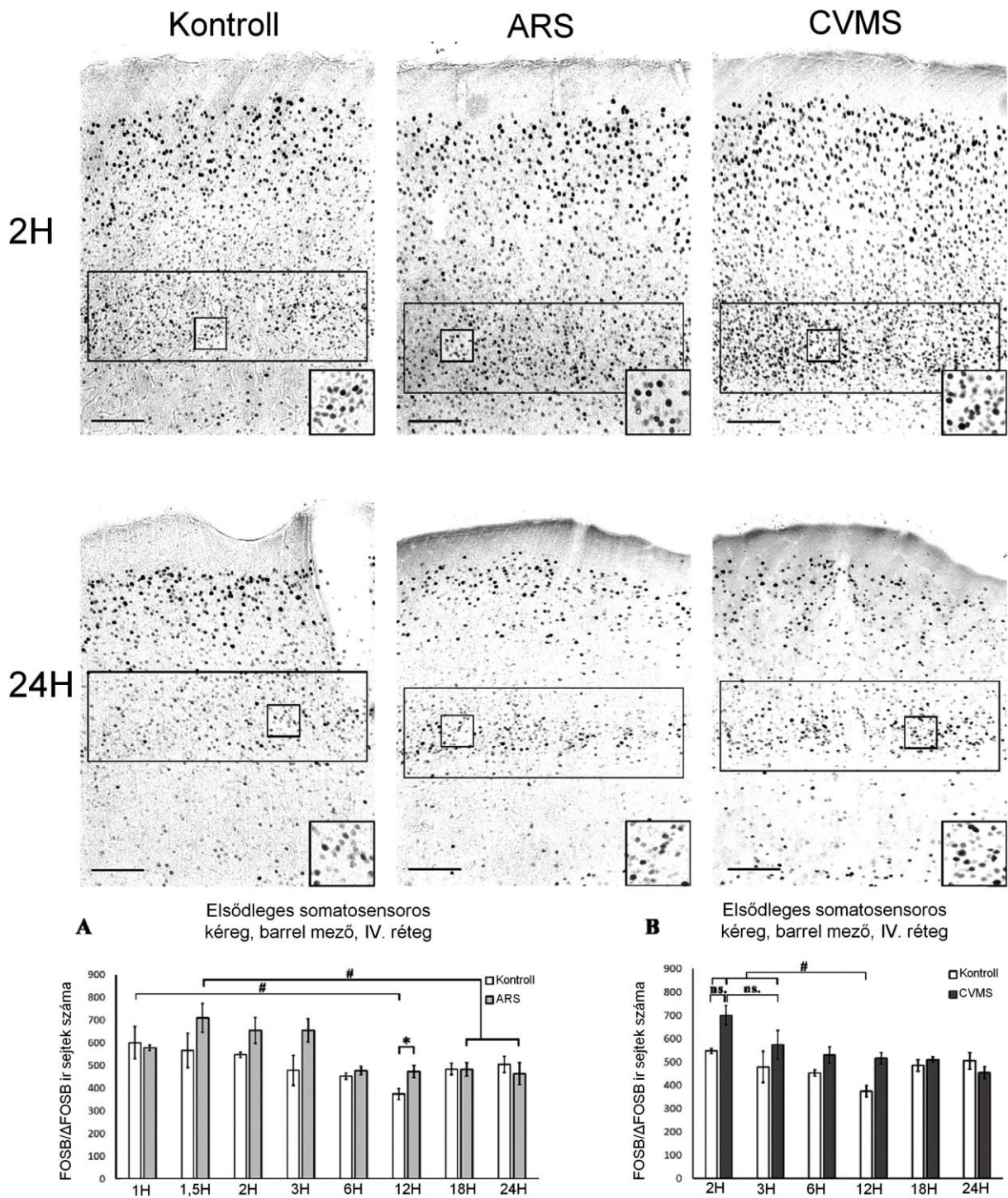
**5.44. ábra.** A FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás és az életkor közötti kapcsolat a nucleus paraventricularis hypothalami-ban (PVN). Reprezentatív képek 2 és 24 hónapos (H) kontroll, akut restraint stressz (ARS) és krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) exponált patkányokból. A FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktív (ir) magok számát nyolc korcsoportban értékeltük a PVN (A, B) területén. Fehér oszlop: kontroll; világosszürke oszlop: ARS; sötétszürke oszlop: CVMS exponált állatok ( $n = 4-7$ /csoport). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  a t tesztek szerint. 3rd: ventriculus tertius. Lépték: 100  $\mu$ m.

Az EWcp (5.45.A ábra) és DR (5.45.C ábra) területén csökkent az életkorral a bazális FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszám (EWcp:  $\rho=-0.55$ ;  $p<10^{-3}$ ; DR:  $\rho=-0,32$ ;  $p<0,05$ ). Az ARS-t követően a 2 és 3 hónapos állatok sejtszáma mindkét magban magasabb volt a kontrollokénál ( $p<0,005$ , F22. táblázat), de a FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszám idős állatokban nagymértékben lecsökkent.



**5.45. ábra.** (142. oldal) A FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás és az életkor közötti kapcsolat a nucleus raphe dorsalis (DR) és a centrális projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp) területén. Reprezentatív képek 2 és 24 hónapos (H) kontroll, akut restraint stressz (ARS) és krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) exponált patkányokból a DR területéről. A FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktív (ir) magok számát nyolc korcsoportban értékeltük az EWcp (A, B) ill. a DR (C, D) területén. Fehér oszlop: kontroll; világosszürke oszlop: ARS; sötétszürke oszlop: CVMS exponált állatok (n = 4-7/csoport). #p<0,05, ##p<0,01, ns. nem szignifikáns a post hoc teszt szerint. \*p<0,05, \*\*p<0,01 a t tesztek szerint. mlf: fasciculus longitudinalis medialis; PAG: substantia grisea centralis. Lépték: 100  $\mu$ m.

A barrel cortex-ben, a Spearman analízis a kontroll állatokban ( $\rho$ =-0,34; p<0,05) gyengébb, az ARS állatokban ( $\rho$ =-0,63; p<10<sup>-4</sup>) erősebb korrelációt mutatott az életkor és a FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszám között. Az ARS hatása csak a 12 hónapos patkányok esetében volt szignifikáns (5.46.A ábra, F22. táblázat).



**5.46. ábra.** A FOSB/ΔFOSB immunreaktivitás és az életkor közötti kapcsolat az elsődleges szomatoszenzoros kéreg (SI), barrel mező IV. rétegében. Reprezentatív képek 2 és 24 hónapos (H) kontroll, akut restraint stressz (ARS) és krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) exponált patkányokból az SI területéről. A FOSB/ΔFOSB immunreaktív (ir) magok számát ARS (A) illetve CVMS (B) modellben vizsgáltuk. Fehér oszlop: kontroll; világosszürke oszlop: ARS; sötétszürke oszlop: CVMS exponált állatok (n=4-7/csoport). #p<0,05, ##p<0,01, ns. nem szignifikáns a post hoc teszt szerint. \*p<0,05, \*\*p<0,01 a t teszt szerint.



### 5.III.2.2. A CVMS által kiváltott FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás korfüggő dinamikája

Az amygdala mindhárom divíziójában negatív korrelációt találtunk az életkor és FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás között CVMS-nek kitett állatokban (CeA:  $\rho=-0,54$ ;  $p<0,001$  BLA:  $\rho=-0,42$ ;  $p<0,05$ ; MeA:  $\rho=-0,70$ ;  $p<10^{-5}$ ). A CVMS-nek a FOSB/ $\Delta$ FOSB növekedésére a CeA esetében a 3 és 6 hónapos, a MeA esetében a 2 hónapos csoportban volt szignifikáns hatása, míg a BLA esetében ilyen csoport nem volt (5.41. ábra).

A BNST divízióiban (5.42. ábra) is csak néhány korcsoportban emelte a CVMS szignifikáns mértékben a FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszámot. A BNSTov ( $\rho=-0,48$ ;  $p<0,005$ ), BNSTdl ( $\rho=-0,55$ ;  $p<0,005$ ), BNSTdm ( $\rho=-0,52$ ;  $p<0,005$ ) és BNSTv ( $\rho=-0,64$ ;  $p<0,005$ ) esetében a Spearman teszt kimutatta, hogy az életkor negatívan korrelált a FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszámmal a CVMS állatokban. Nem igazolódott életkor függés a BNSTfu esetében (5.42.J ábra).

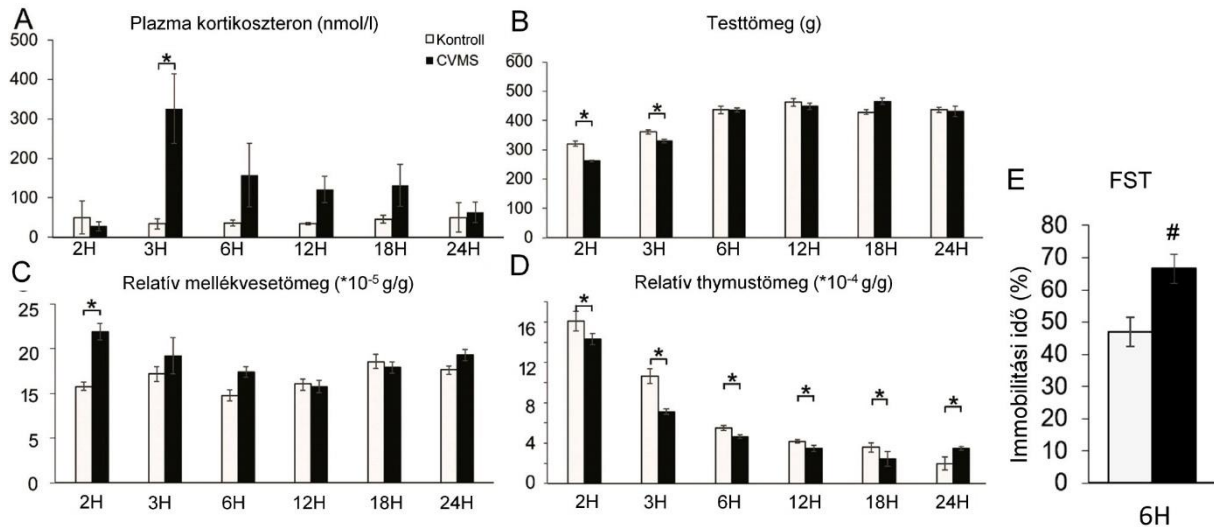
Az MHb területén (5.43. ábra) a Spearman teszt mérsékelt negatív korrelációt mutatott ki az MHb FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszám és az életkor között a CVMS állatokban ( $\rho=-0,58$ ;  $p<0,001$ ). A CVMS csak a 6 hónapos csoportban növelte a sejtszámot ( $p<0,05$ ) (5.43.B ábra). A LHb-ban a 6 ( $p<0,005$ ) és a 12 hónapos ( $p<0,05$ ) állatok megnövekedett FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszámot mutattak a kontrollokhoz képest. Az életkor és a FOSB/ $\Delta$ FOSB ir között nem találtunk korrelációt a LHb-ban.

Sem az ANOVA (F23. táblázat), sem a Spearman teszt nem talált összefüggést az életkor és a PVN FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszám között. A CVMS minden korcsoportban növelte a sejtszámot (5.44.B ábra).

Az EWcp és DR területén (5.45. ábra) a FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtek száma mérsékelten csökkent az életkorral ( $\rho=-0,54$ ;  $p<0,001$  ill.  $\rho=-0,54$ ;  $p<0,001$ ). A t tesztek a 6 hónapos patkányokban mutatott szignifikáns sejtszám növekedést a DR-ban (F22. táblázat).

A barrel cortex területén a CVMS által kiváltott sejtszámemelkedés egyik életkorban sem mutatkozott szignifikánsnak (5.46. ábra). Mérsékelt negatív korrelációt találtunk az életkor és a FOSB/ $\Delta$ FOSB ir sejtszám között ( $\rho=-0,54$ ;  $p<0,005$ ).

A CVMS expozíció hatékonyságát a plazma kortikoszteron szint (5.47.A ábra, F24. táblázat), a testtömeg (5.47.B ábra), a relatív mellékvese- (5.47.C ábra) és thymustömeg (5.47.D ábra) adatok alapján mutattuk ki. Ebben a kísérletben technikai okokból viselkedési tesztek kivitelezésére csak a 6 hónapos korcsoportban volt lehetőségünk, FST segítségével (5.47.E ábra).



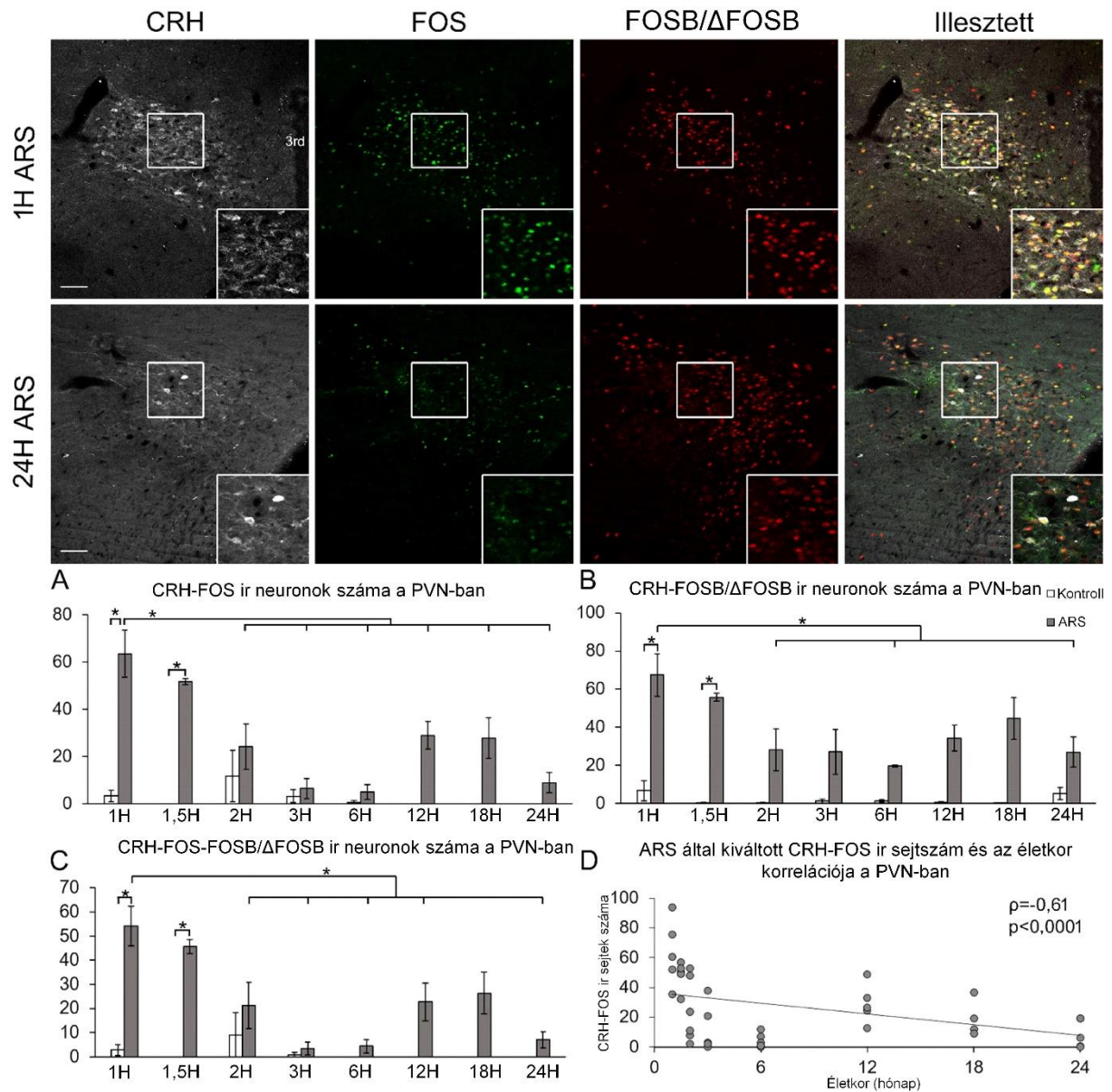
**5.47. ábra.** A krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) modell hatékonyságának ellenőrzése. Kortikoszteron (A) szint, a grammal (g) kifejezett testtömeg (B), a mellékvese relatív tömege (C), a thymus relatív tömege (D), valamint a forced swim tesztben (FST) mért immobilitási idő (E) alátámasztja a CVMS hatását, bár a legtöbb indikátor inkább a fiatalabb állatcsoportok esetén mutatta ki a CVMS hatását, kivéve a relatív thymustömeg adatokat, ahol a CVMS hatása minden korcsoportban megmutatkozott. (\* $p < 0,05$ , post hoc teszt,  $n = 4-8$ .) A 6 hónapos (H) patkányok (E) FST eredményét Student-féle  $t$  próbával értékeltük (# $p < 0,01$ ,  $n = 12$ ). A fehér oszlopok a kontrollcsoportokat, a feketék a CVMS-nek kitett patkányokat jelölik.

### 5.III.3. A CRH tartalmú idegsejtek korfüggő neuronális aktivásmintázata ARS és CVMS modellekben

Mivel a fent összefoglalt eredmények jól mutatták, hogy a stresszadaptációban fontos szerepet játszó területek közül azok, amelyek CRH tartalmú idegsejteket is tartalmaznak, korfüggő FOS és FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitást mutattak (CeA, BNSTov, PVN), azt a célt tűztük ki, hogy leírjuk a CRH neuronok korfüggő stresszreaktivitását is, az ARS és CVMS modellekben.

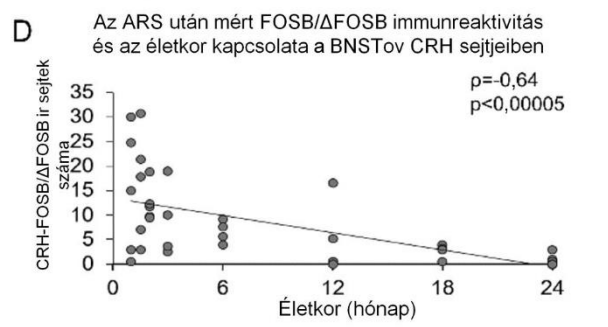
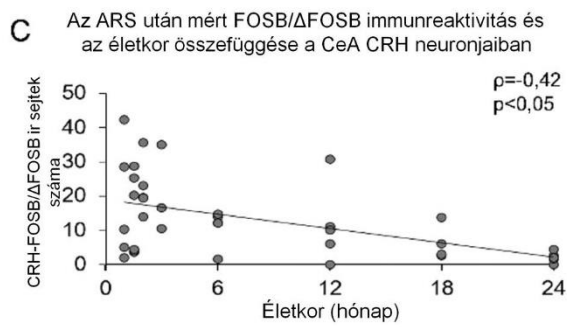
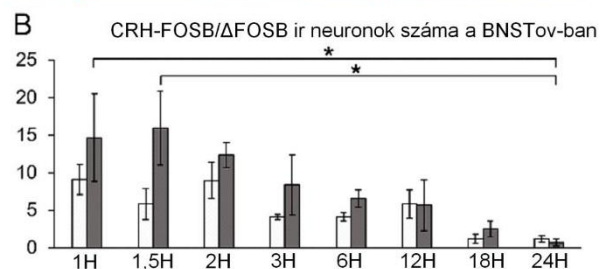
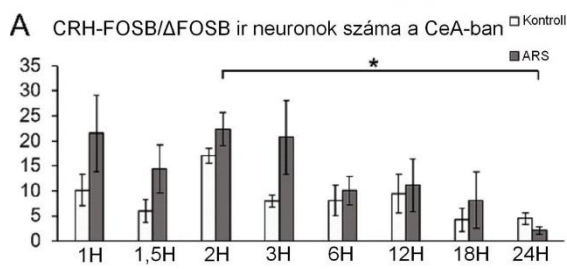
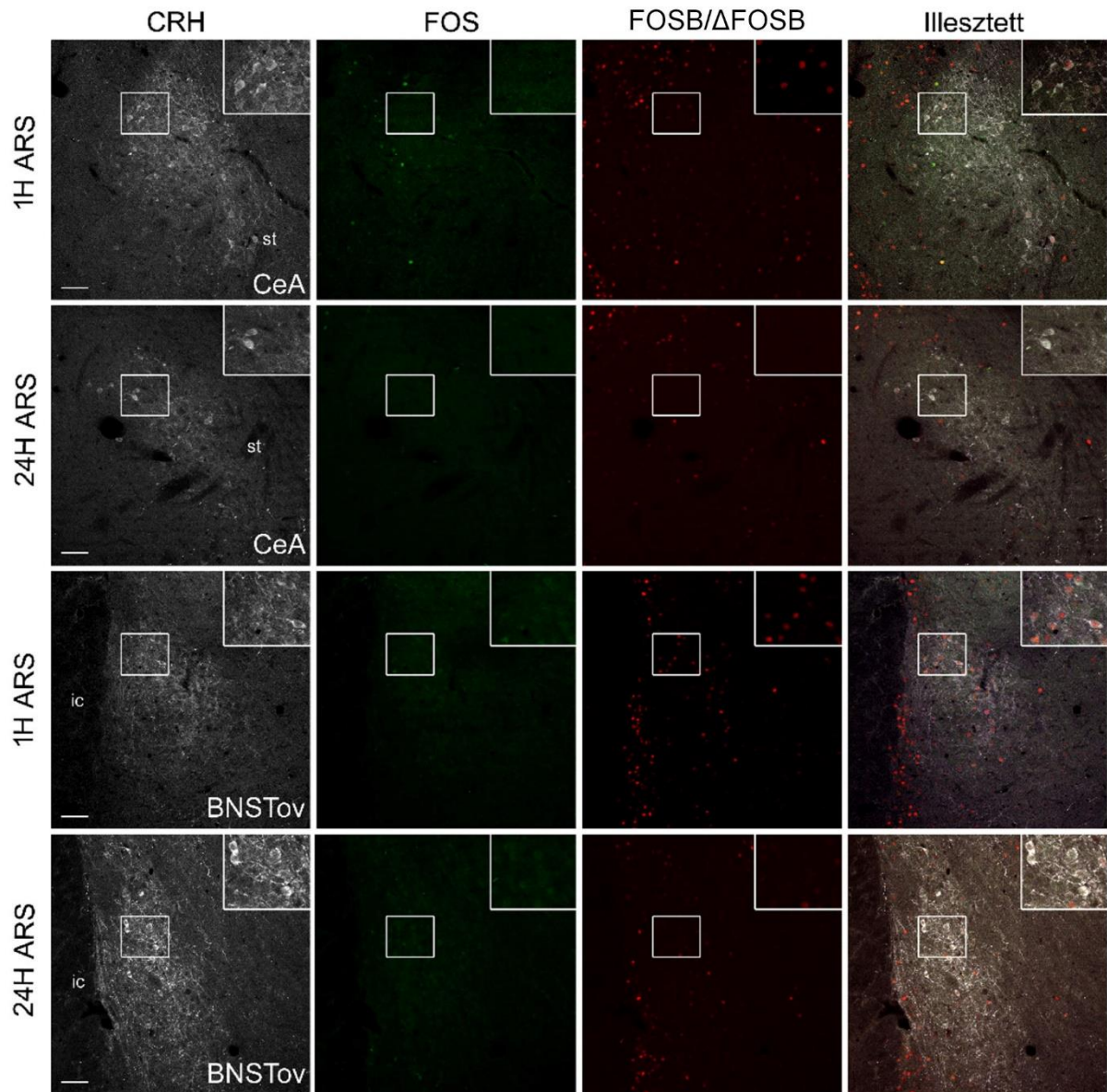
5.III.3.1. A CRH tartalmú idegsejtek korfüggő neuronális aktivitás mintázata ARS modellben  
A PVN-ben az ARS az 1, 1,5 és 12 hónapos állatokban a CRH-FOS kettősen jelölt sejtek számának emelkedését (5.48.A ábra, F25. táblázat) idézte elő a kontroll csoportjaikhoz képest ( $p < 10^{-3}$ ). A CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB kettősen jelölt sejtek esetében is hasonló dinamikát figyeltünk meg (5.48.B ábra). A Spearman korreláció analízis bizonyította a kettősen jelölt sejtek számának csökkenését az életkorral (CRH-FOS:  $\rho = -0,61$ ,  $p < 10^{-4}$ , 5.48.D ábra; CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB:  $\rho = -0,48$ ;  $p < 10^{-3}$ ), és a két adatsor egymással is korrelált ( $\rho = 0,76$ ;  $p < 10^{-6}$ , F26. táblázat). Ennek megfelelően, a CRH-FOS-FOSB/ $\Delta$ FOSB tripla pozitív sejtek száma tekintetében is (5.48.C ábra) hasonló volt a változások dinamikája a stresszre adott válasz életkor függésében ( $\rho = -0,38$ ;  $p < 0,001$ ), és a hármasan jelölt sejtek száma erősen pozitív korrelációban állt a kettősen festődő CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB ( $\rho = 0,86$ ;  $p < 10^{-6}$ ) és CRH-FOS

( $\rho=0,92$ ;  $p<10^{-6}$ ) sejtek számával. A CRH SSD mérések szerint a tripla pozitív sejtek száma ( $\rho=0,43$ ;  $p<0,03$ ) és CRH immunreaktivitása is korrelál az életkorral ( $\rho=0,73$ ;  $p<10^{-4}$ ).



**5.48. ábra.** A nucleus paraventricularis hypothalami (PVN) corticotropin-releasing hormon (CRH) immunreaktív (ir) sejteinek (fehér) életkorfüggő FOS (zöld) és FOSB/ΔFOSB (vörös) immunreaktivitása az akut restraint stressz (ARS) modellben. Reprezentatív fotók az 1 és 24 hónapos (H) ARS-nek kitett csoportokból. A kijelölt területeket nagyobb nagyítású ábrabetétek is demonstrálják csatornánként és az illesztett képeken is. Az (A) hisztogram a CRH- és FOS tartalmú sejtek számát mutatja a kontroll (fehér oszlopok) és az ARS-nek kitett (szürke oszlopok) patkányoknál, nyolc korcsoportban. A (B) panel a CRH- és FOSB/ΔFOSB ir sejtek számát mutatja. A (C) diagramm a FOS-t és FOSB/ΔFOSB-t is tartalmazó CRH sejtek számának öregedéssel összefüggő változását mutatja. (\* $p<0,05$ , post hoc teszt,  $n=4-8$ .) (D) A Spearman-féle korreláció teszt szórásdiagramja szemlélteti a CRH-FOS ir sejtek számának csökkenését az életkorral, ARS-ben. 3rd: ventriculus tertius. Lépték: 100 $\mu$ m.

A CeA és BNSTov területén CRH-FOS kettős pozitivitást mutató sejteket csak elvétve láttunk, ezért ezeket a sejtszámokat itt nem mutatjuk be. Az igen alacsony FOS aktivitás mellett, a CRH sejtek jelentős FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitást mutattak ARS után. A CeA esetében (5.49.A ábra) a legmagasabb CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszám a 2 hónapos ARS csoportban detektáltuk, mely 10-szer volt nagyobb, mint a 24 hónapos ARS állatoknál ( $p < 0,05$ ). A Spearman analízis is megerősítette az aktivitás korfüggő csökkenését a CeA-ban (5.49.C ábra,  $\rho = -0,42$ ;  $p < 0,05$ , F26. táblázat). Hasonló életkorfüggő változást (5.49.C. ábra) mutatott az ARS-nek kitett állatok BNSTov/CRH neuronjainak FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitása is (5.49.D ábra,  $\rho = -0,64$ ;  $p < 10^{-4}$ ), ezért a két terület CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszáma erős pozitív korrelációt mutatott egymással ( $\rho = 0,86$ ;  $p < 10^{-6}$ ; F26. táblázat).

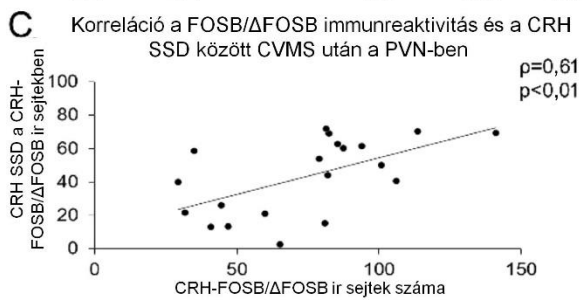
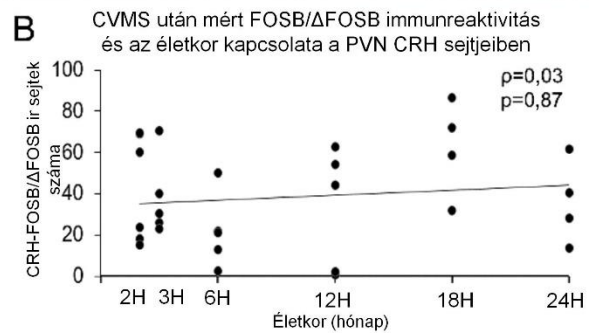
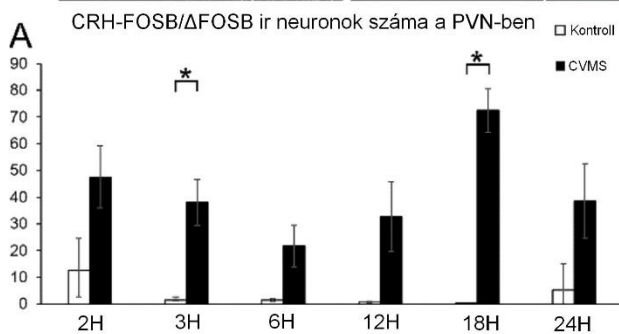
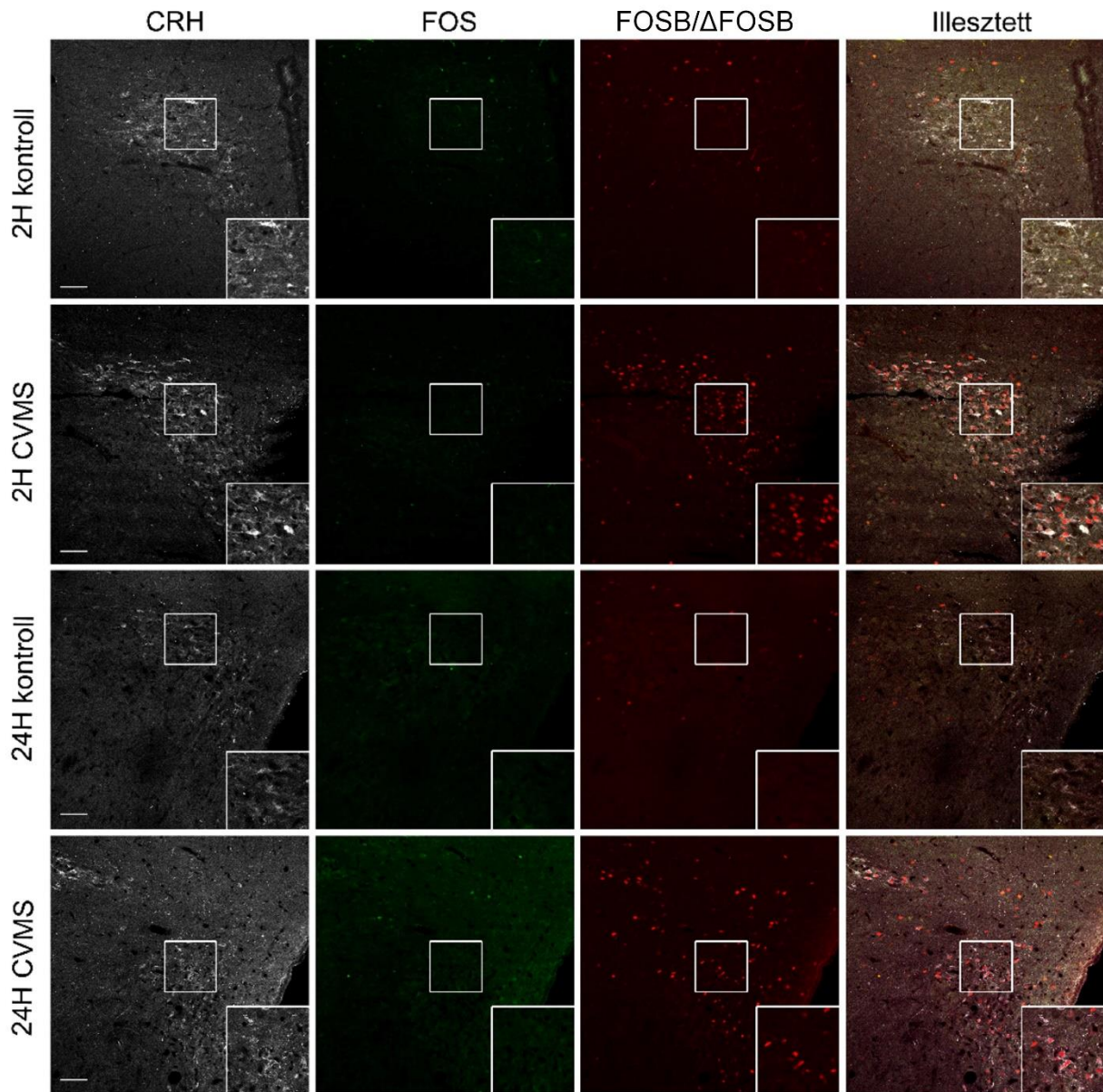


**5.49. ábra.** (149. oldal) A *nucleus centralis amygdalae* (CeA) és a *nucleus interstitialis striae terminalis ovalis* divízió (BNSTov) corticotropin-releasing hormon (CRH) sejtjeinek (fehér) életkorfüggő FOS (zöld) és FOSB/ $\Delta$ FOSB (vörös) immunreaktivitása az akut restraint stressz (ARS) modellben. A reprezentatív fotók a *nucleus centralis amygdalae* (CeA) és a *nucleus interstitialis striae terminalis ovalis* magját (BNSTov) mutatják 1 és 24 hónapos (H) ARS-nek kitett csoportokból. A kijelölt területeket nagyobb nagyítású ábrabetétek is demonstrálják csatornánként és az illesztett képeken is. CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB kettősen jelölt sejtek száma a CeA (A) és a BNSTov területén (B) az életkor függvényében, nyolc korcsoportban. A kontroll csoportokat fehér, az ARS-nek kitetteket szürke oszlopok jelölik. (\* $p < 0,05$ , post hoc teszt;  $n = 4-8$ .) Spearman-féle korreláció teszt szórásdiagramjai szemléltetik a CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB ir sejtek számának csökkenését az életkorral, a CeA (C) és a BNSTov (D) területén, ARS-ben. ic: capsula interna, st: stria terminalis. Lépték: 100 $\mu$ m.

5.III.3.2. A CRH tartalmú idegsejtek korfüggő neuronális aktivitásmintázata CVMS modellben  
Az ARS expozíció mellett vizsgáltuk a PVN, CeA és BNSTov területén a CRH neuronok korfüggő FOS és FOSB/ $\Delta$ FOSB aktivitását CVMS stressz során 6 korcsoportban. Az ARS modellel szemben, ebben a kísérletben nem vizsgáltunk 1 és 1,5 hónapos állatokat, mivel a fiatal állatok leválasztása előtt a CVMS protokollt nem tudtuk alkalmazni.

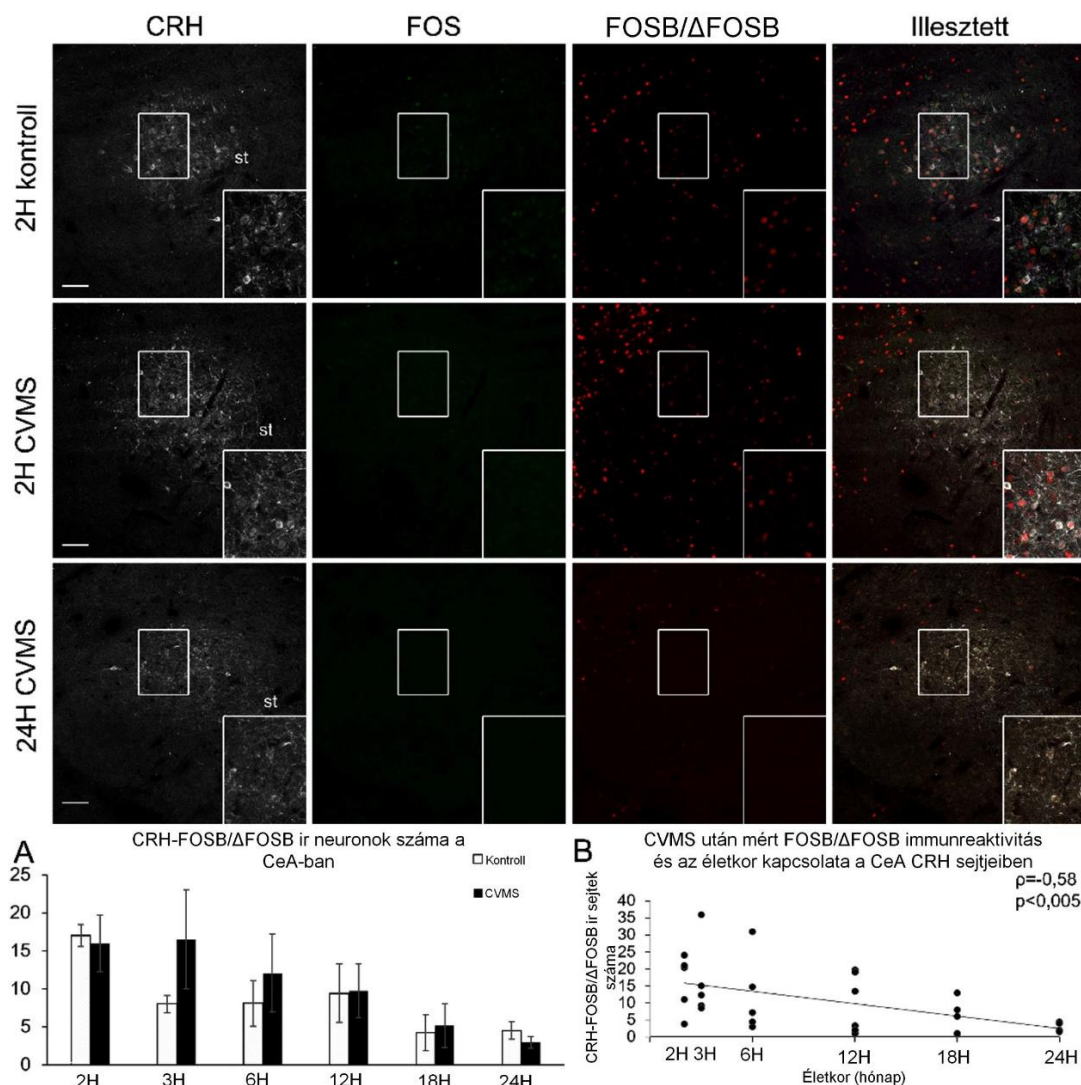
A CVMS expozíció nem okozott számottevő mértékű FOS immunreaktivitás növekedést a CRH neuronokban, sem a tágabb értelemben vett amygdala, sem pedig a PVN területén, ezért az eredmények számszerű leírásától eltekintünk. Ezzel ellentétben, a CVMS jelentős hatással bírt a CRH sejtekben a FOSB/ $\Delta$ FOSB kifejeződésére. Mivel állatainkat 24 órával az utolsó stresszexpozíciót követően perfundáltuk, a FOSB/ $\Delta$ FOSB festés során detektált jel, ellentétben a fent tárgyalt akut modellben megfigyelttel, itt a FOSB fehérje  $\Delta$ FOSB variánsát mutatta, mely a sejtekben zajló hosszútávú transzkripció szintű adaptációs folyamatokat tükrözi (Kovács és mtsai., 1998, Nestler, 2008).

A PVN/CRH sejtek FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitását a CVMS befolyásolta (5.50.A-B ábra), de az életkor nem volt hatással rá (F25. táblázat). A CRH denzitometria szerint a FOSB/ $\Delta$ FOSB tartalmú CRH sejtek száma pozitívan korrelált azok CRH immunjel denzitásával (5.50.C ábra,  $\rho = 0,61$ ;  $p < 0,01$ ). Ezzel szemben, a FOSB/ $\Delta$ FOSB negatív CRH sejtek CRH jeldenzitása nem mutatott összefüggést a FOSB pozitív CRH sejtek számának változásával.



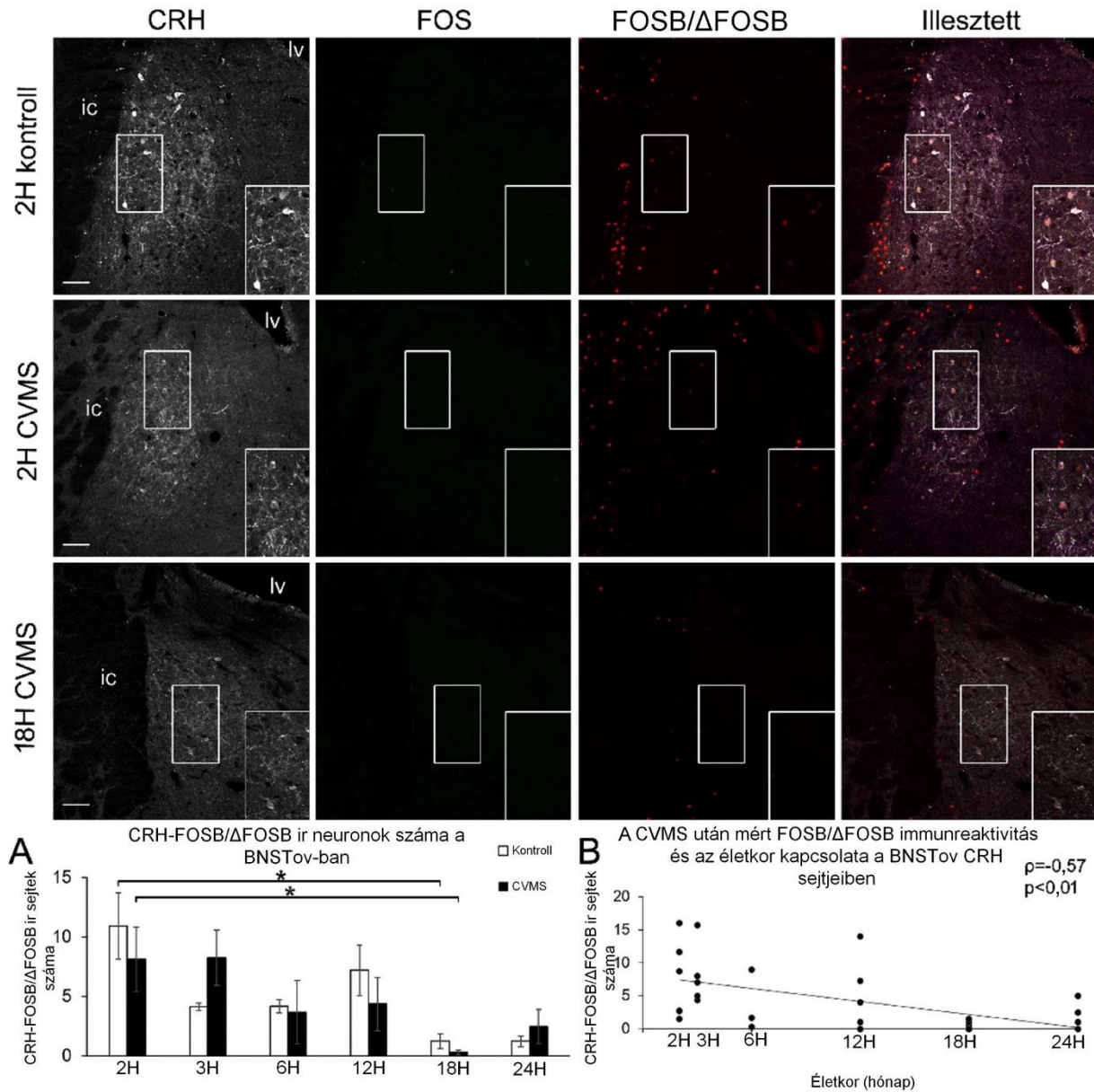
**5.50. ábra** (151. oldal) A nucleus paraventricularis hypothalami (PVN) CRH sejtjeinek (fehér) életkorfüggő FOS (zöld) és FOSB/ $\Delta$ FOSB (vörös) immunreaktivitása a krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) modellben. Reprezentatív fotók 2 és 24 hónapos (H) kontroll és CVMS-nek kitett csoportokból. A kijelölt területeket nagyobb nagyítású ábrabetétek is demonstrálják csatornánként és az illesztett képeken is. Az (A) hisztogram a CRH- és FOSB/ $\Delta$ FOSB tartalmú sejtek számát mutatja a kontroll (fehér oszlopok) és a CVMS-nek kitett (fekete oszlopok) patkányoknál, hat korcsoportban. (\* $p < 0,05$ , post hoc teszt;  $n = 4-8$ .) A Spearman-féle korreláció analízis szórásdiagramja (B) szemlélteti, hogy nincs lineáris összefüggés az életkor és a PVN CRH neuronok FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitása között, míg a FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktív (ir) CRH neuronok száma korrelált (C) a CRH specifikus jelendezítésével. Lépték:  $100\mu\text{m}$ .

A CeA (5.51A. ábra) és a BNSTov (5.52A. ábra) CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszámát csak az életkor befolyásolta (F25. táblázat). A CRH tartalmú sejtek FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitásának korfüggő csökkenését a Spearman-féle korreláció teszt is alátámasztotta (CeA: 5.51.B ábra,  $\rho = -0,55$   $p < 0,005$ ; BNSTov: 5.52.B ábra  $\rho = -0,57$   $p < 0,005$ , F27. táblázat). A CeA és a BNSTov ebben a tekintetben hasonló dinamikát mutatott, és a két mag CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszáma korrelált ( $\rho = 0,81$   $p < 10^{-4}$ ).





**5.51. ábra.** (152. oldal) A nucleus centralis amygdalae (CeA) CRH sejtjeinek (fehér) életkorfüggő FOS (zöld) és FOSB/ $\Delta$ FOSB (vörös) immunreaktivitása a krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) modellben. Reprezentatív fotók, 2 és 24 hónapos (H) kontroll és CVMS-nek kitett csoportokból. Az (A) hisztogram a CRH- és FOSB/ $\Delta$ FOSB tartalmú sejtek számát mutatja a kontroll (fehér oszlopok) és a CVMS-nek kitett (fekete oszlopok) patkányoknál, hat korcsoportban. A Spearman-féle korreláció analízis szórásdiagramja (B) szemlélteti az összefüggést az életkor és a CeA CRH neuronok FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitása között. st: stria terminalis. Lépték: 100 $\mu$ m.



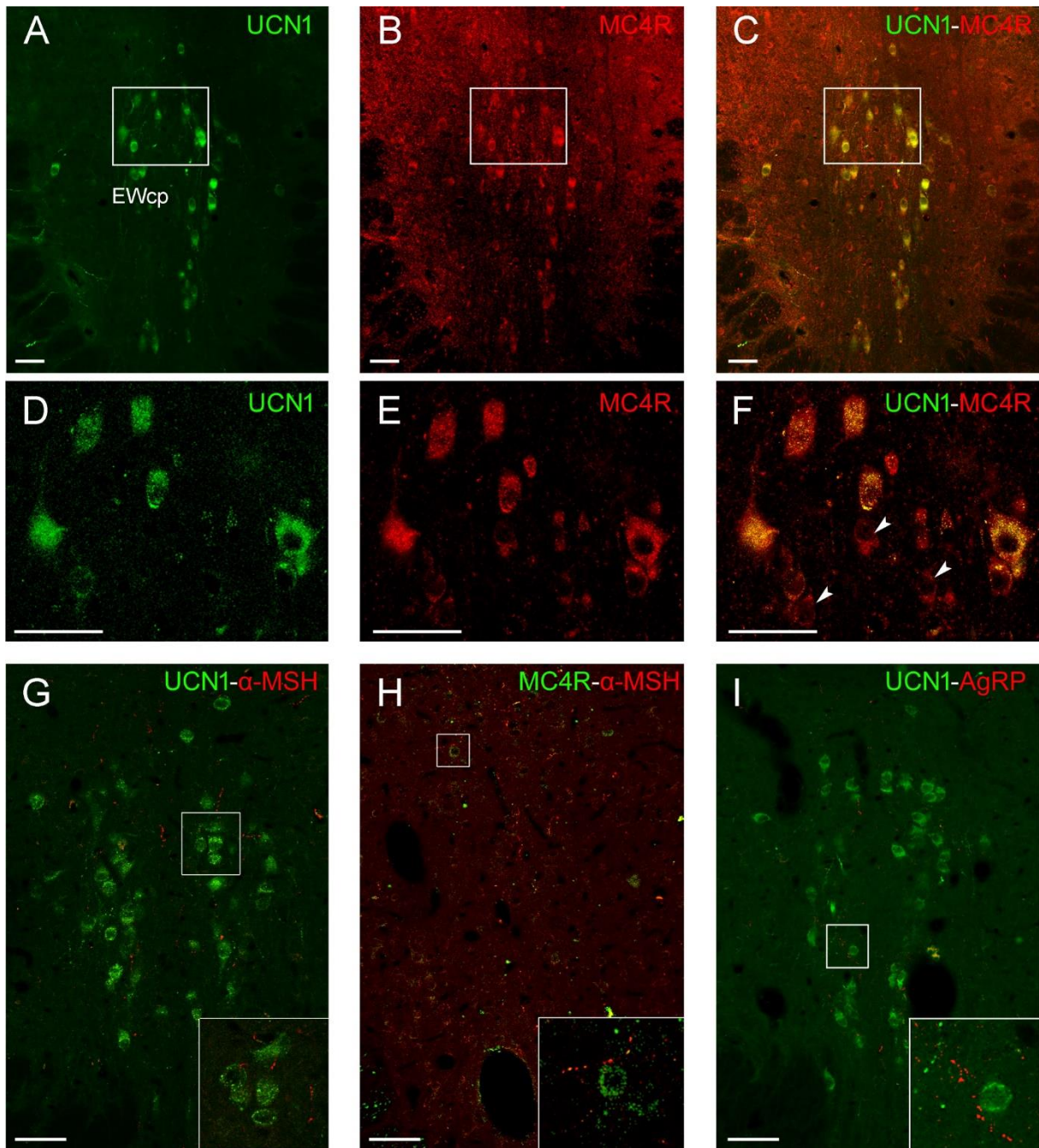
**5.52. ábra.** A nucleus interstitialis striae terminalis ovális divízió (BNSTov) CRH sejtjeinek (fehér) életkorfüggő FOS (zöld) és FOSB/ $\Delta$ FOSB (vörös) immunreaktivitása a krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) modellben. Reprezentatív fotók 2 és 18 hónapos (H) kontroll és CVMS-nek kitett csoportokból. Az (A) hisztogram a CRH- és FOSB/ $\Delta$ FOSB tartalmú sejtek számát mutatja a kontroll (fehér oszlopok) és a CVMS-nek kitett (fekete oszlopok) patkányoknál, hat korcsoportban. (\* $p < 0,05$ , post hoc teszt,  $n = 4-8$ ) A Spearman-féle korreláció analízis szórásdiagramja (B) szemlélteti az összefüggést az életkor és a BNSTov CRH neuronok FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitása között. lv: ventriculus lateralis; ic: capsula interna. Lépték: 100 $\mu$ m.

## **5.IV. Az Edinger-Westphal mag, mint a stresszadaptáció energetikájában szerepet játszó központ vizsgálata**

5.IV.1. A melanocortin 4 receptor jelentőségének vizsgálata az Edinger-Westphal magban

5.IV.1.1. Az EWcp/UCN1 neuronok MC4R-t hordoznak, és alpha-MSH valamint AgRP ir rostok idegzik be őket

Ebben a projektben az volt az alapfeltételezésünk, hogy kapcsolat van a melanocortin rendszer és az EWcp között. Első lépésként neuroanatómiai bizonyítékot kerestünk a melanocortin rendszer és az EWcp/UCN1 neuronok között. Ezért, négyféle kettősjelölést végeztünk. Először, az MC4R-UCN1 festésben megfigyeltük, hogy az EWcp/UCN1 neuronok  $90,09\% \pm 2,81\%$ -a MC4R-t hordoz (5.53.A-F ábra), de az EWcp-ben látott MC4R ir neuronok  $42,20\% \pm 8,1\%$ -a nem tartalmazott kimutatható mennyiségű UCN1-et (5.53.F ábra). Másodsor, az UCN1-alpha-MSH immunfestésben azt láttuk, hogy az alpha-MSH immunpozitív idegrostok az UCN1 neuronok  $23,12\% \pm 2,53\%$ -ának szomszédságában megtalálhatók (5.53.G ábra). Mivel az UCN1 és az MC4R kolokalizációja nem volt teljes, a harmadik lépésben úgy döntöttünk, hogy az EWcp-ben az MC4R pozitív neuronok melletti alpha-MSH ir idegrostokat is kvantitáljuk. Itt azt találtuk, hogy az MC4R ir neuronok  $23,98\% \pm 8,09\%$ -a érintkezett alpha-MSH-tartalmú idegrosttal (5.53.H ábra). Végül, megjelöltük az AgRP-tartalmú idegrostokat is az EWcp-ben, és azt találtuk, hogy az UCN1 neuronok  $10,21\% \pm 1,92\%$ -át AgRP ir rostok érik el (5.53.I. ábra). Így tehát bizonyítottuk az UCN1 neuronok és a melanocortinok közötti neuroanatómiai összeköttetést, és megállapítottuk, hogy a MC4R jelenléte az UCN1 sejtekben funkcionális jelentőségű kapcsolatra ad lehetőséget a rendszerek között.



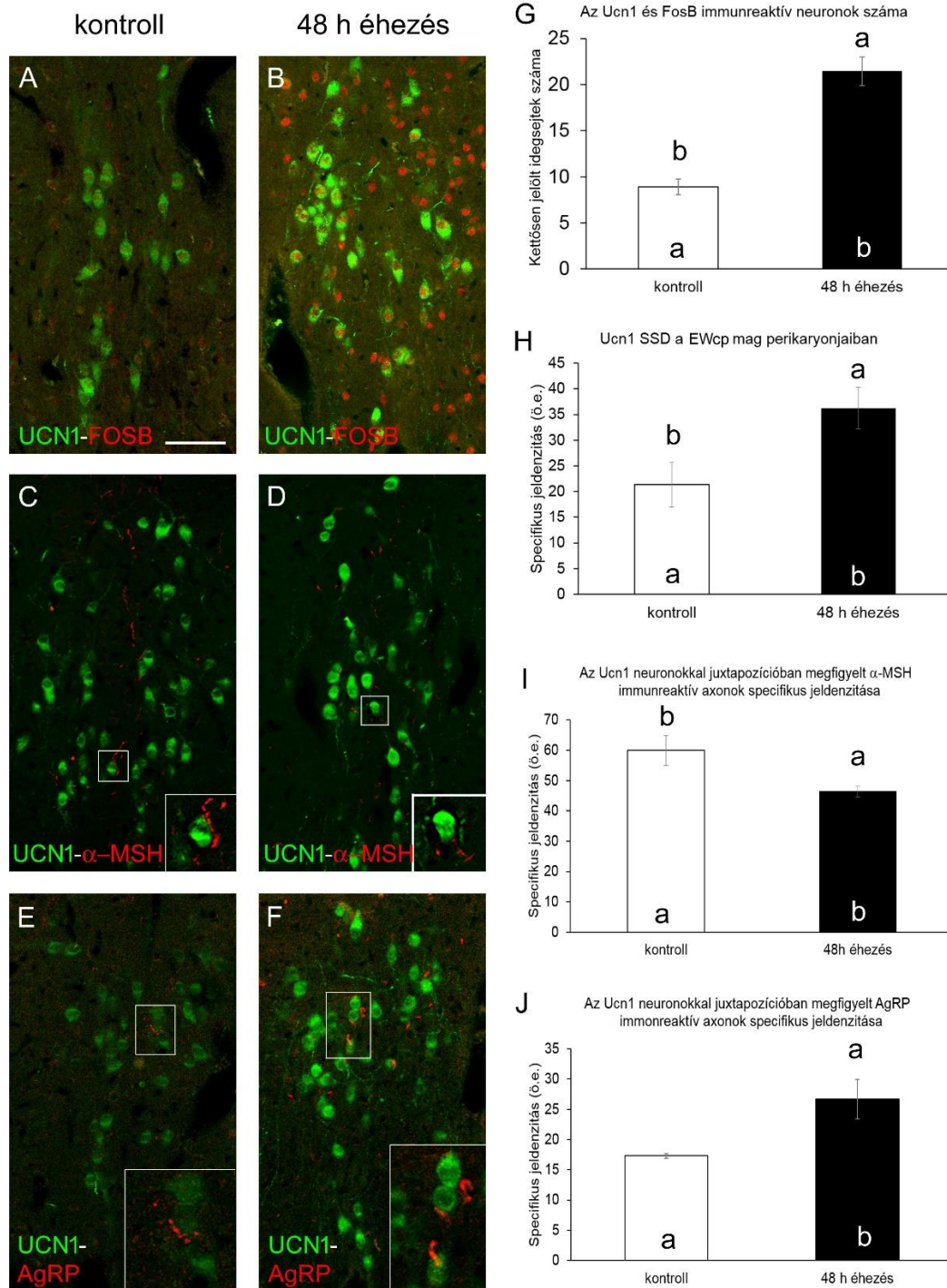
**5.53. ábra.** Reprezentatív konfokális immunfluoreszcens felvételek a centrális projekciójú Edinger-Wesphal mag (EWcp) területéről. Az urocortin 1 (UCN1) (A, D; zöld) és melanocortin 4 receptor (MC4R) immunreaktivitás (B, E; piros) kolokalizációja a (C, F) paneleken egyesített képen is megfigyelhető. Az (F) panelen a nyílhegyek olyan MC4R ir sejteket jelölnek, melyek nem tartalmaztak UCN1-t. G: Alpha melanocytá stimuláló hormon ( $\alpha$ -MSH) immunreaktív (piros) rostok figyelhetők meg az UCN1 ir sejtek (zöld) közvetlen szomszédságában. H:  $\alpha$ -MSH (piros) rostok a MC4R-t hordozó sejtekkel (zöld) juxtapozícióban. I: Agouti-related peptid (AgRP) tartalmú (piros) idegrostok láthatók az UCN1 sejtek (zöld) közelében. A fehér négyszöggel jelölt területek nagyobb nagyítással a megfelelő panel jobb alsó sarkában is megtekinthetők. Lépték: 100 $\mu$ m.

#### 5.IV.1.2. Funkcionális-morfológiai változások 48 órás éhezés hatására a EWcp-ban

Hogy a fenti morfológiai eredmények funkcionális jelentőségét is felmérjük, e projekt második kísérletében koplaltatott patkányok EWcp-jának morfológiai változásait tanulmányoztuk (5.54. ábra). A neuronális aktivitást UCN1-FOSB kettős jelöléssel vizsgáltuk. Negyvennyolc órás táplálékmegevonás  $140,46\% \pm 10,11\%$ -os növekedést okozott az UCN1-FOSB kolokalizáló sejtek számában az EWcp-ben ( $p < 0,05$ ), a normál tápláltsági állapotú patkányokhoz képest (5.54.A, B és G ábra). Az Ucn1 SSD  $69,99\% \pm 7,74\%$ -os emelkedése kísérte a megnövekedett neuronális aktivitást ( $p < 0,01$ ), ami az idegsejtek magasabb UCN1-tartalmára utal, koplalás hatására (5.54.A-F, H ábra). A csoportok között nem találtunk statisztikai különbséget az UCN1 neuronok számában ( $p = 0,24$ ).

A melanocortinok EWcp-ben betöltött jelentőségének tanulmányozására az UCN1 neuronokkal közeli szomszédságban megfigyelt alpha-MSH és AgRP ir idegrostok funkcionális-morfológiai értékelését is elvégeztük a koplaltatott patkányokon. Az UCN1 neuronok melletti alpha-MSH ir idegrostok számát a koplalás  $42,46\% \pm 7,86\%$ -kal ( $p < 0,02$ ) csökkentette (5.54.C-D ábra), és a rostok alpha-MSH SSD értéke  $22,59\% \pm 3,09\%$ -kal volt alacsonyabb az éhező patkányokban ( $p < 0,04$ ) (5.54.I. ábra). Ezzel szemben, az AgRP immunreaktivitás az idegrostokban  $54,24\% \pm 18,88\%$ -kal nőtt éhezéskor ( $p < 0,03$ ) az ad libitum táplált patkányokhoz képest (5.54.E-F, J ábra). Az AgRP idegrostok számában nem találtunk statisztikai különbséget ( $p = 0,44$ ).

E kísérlet további bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy az EWcp Ucn1 neuronjait az energiahomeosztázis változásai befolyásolják, mely tetten érhető mind a sejtek neuronális aktivitásának, mind a peptidtartalmának növekedésében. Ezek az adatok erős közvetett bizonyítékot szolgáltatnak arra is, hogy az EWcp/UCN1 neuronok anorexigén (pl. alpha-MSH) és orexigén bemenete (pl. AgRP) közötti megváltozott egyensúly magyarázhatja az EWcp/UCN1 sejtekben megfigyelt változásokat.



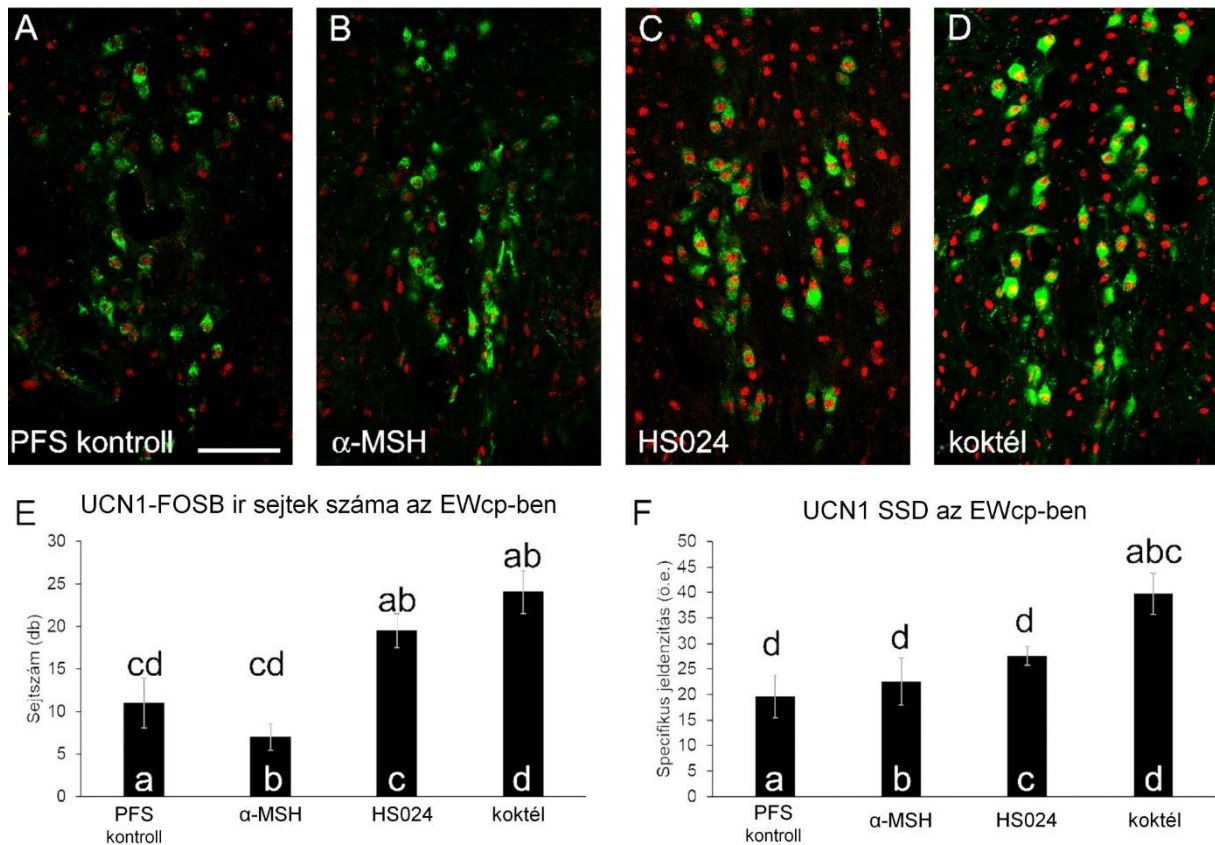
**5.54. ábra.** Az urocortin 1 (UCN1) a FOSB, az alpha melanocyta stimuláló hormon ( $\alpha$ -MSH) és az agouti-related peptid (AgRP) immunreaktivitás változása éhezés alatt a centrális projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp) területén. Reprezentatív konfokális immunfluoreszcens felvételek (A-F). Bal oldalon a kontroll (A, C, E), jobb oldalon 48 óra éhezésen átesett patkányok (B, D, F) mintáinak fotói láthatók. A kontroll csoporthoz (A) képest az UCN1 (zöld) és FOSB (piros) kettősen jelölt sejtek számában bekövetkezett emelkedést láthatjuk éhezésben (B), melyet a G panel is szemléltet. Az éhezés (B) az UCN1 specifikus jelenzítés (SSD) növekedését is előidézte (H). Normál tápláltsági állapotú (C) patkányhoz viszonyítva éhezés hatására (D) az  $\alpha$ -MSH-t tartalmazó axonok (piros) jelenzítése csökkent (I), míg az AgRP tartalmú (piros) axonok (F) neuropeptid tartalma éhezett állatokban magasabb volt (J) a kontroll csoporthoz (E) viszonyítva. A fehér négyszöggel jelölt területek nagyobb nagyítással a megfelelő panel jobb alsó sarkában is megtekinthetők. A grafikon oszlopai felett található betűk a szignifikáns különbséget jelölik a csoportok között, t próba alapján ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ). Lépték:  $100\mu\text{m}$ .

### 5.IV.1.3. Lokális MC4R agonista és antagonistá kezelés funkcionális-morfológiai hatása az EWcp-ben

Annak érdekében, hogy a farmakológiai módszerrel is bizonyítsuk a melanocortin rendszer kapcsolatát az EWcp/UCN1 neuronjaival, a mag fölötti területen végződő helyzetben implantált kanülön keresztül alkalmaztunk lokális injekciós kezeléseket. A cél az volt, hogy a MC4R funkcionális jelentőségét teszteljük az EWcp-ben MC4R agonista (alpha-MSH) és antagonistá (HS024) segítségével, 48 órán át koplaltatott patkányokban. Az UCN1 sejtek peptid jelendezítésát és FOSB neuronális aktivitását határoztuk meg, szemikvantitatív módon.

Az UCN1-FOSB kettősen jelölt sejtek mennyiségét (5.55.A-D ábra) a kezelés főhatása befolyásolta (ANOVA:  $F_{3,24}=11,93$ ;  $p<0,05$ ). A kettősen jelölt sejtek száma (alpha-MSH+HS024) koktélkezelés hatására 118%-kal ( $p<0,02$ ) emelkedett az oldószer (pirogénmentes fiziológiás sóoldat, PFS) injekcióval kezelt, illetve 243%-kal ( $p<10^{-4}$ ) az alpha-MSH-val kezelt patkányokhoz képest. Ezzel összhangban, az UCN1-FOSB sejtek száma megnőtt a lokális HS024 kezelés hatására a PFS (+77%,  $p<0,02$ ) és az alpha-MSH (+178%;  $p<0,001$ ) injekcióhoz képest (5.55.E ábra). A PFS-alpha-MSH és a HS024-koktél csoportpárok összehasonlítása nem mutatott szignifikáns statisztikai különbséget a kettősen jelölt sejtek számában.

Az EWcp neuronok UCN1 peptidtartalmát tükröző SSD-t is befolyásolta a kezelésünk (ANOVA:  $F_{3,24}=5,31$ ;  $p<0,01$ ). A koktél beadása 102%-kal növelte az UCN1 SSD-t a PFS-injektált kontrollokhoz képest ( $p<0,01$ ). Az alpha-MSH kezeléssel összehasonlítva, az UCN1 SSD emelkedésének mértéke a koktélkezelés hatására 76% volt ( $p<0,01$ ). A koktélkezelés 44%-os ( $p<0,03$ ) növekedést okozott az UCN1 SSD-ben a HS024 injekcióval szemben. A PFS, az alpha-MSH és a HS024 kezelt csoportok között nem volt más statisztikai különbség, de a kisebb változások mintázata hasonló volt az UCN1 sejtek számában tapasztaltakhoz (5.55.F ábra).



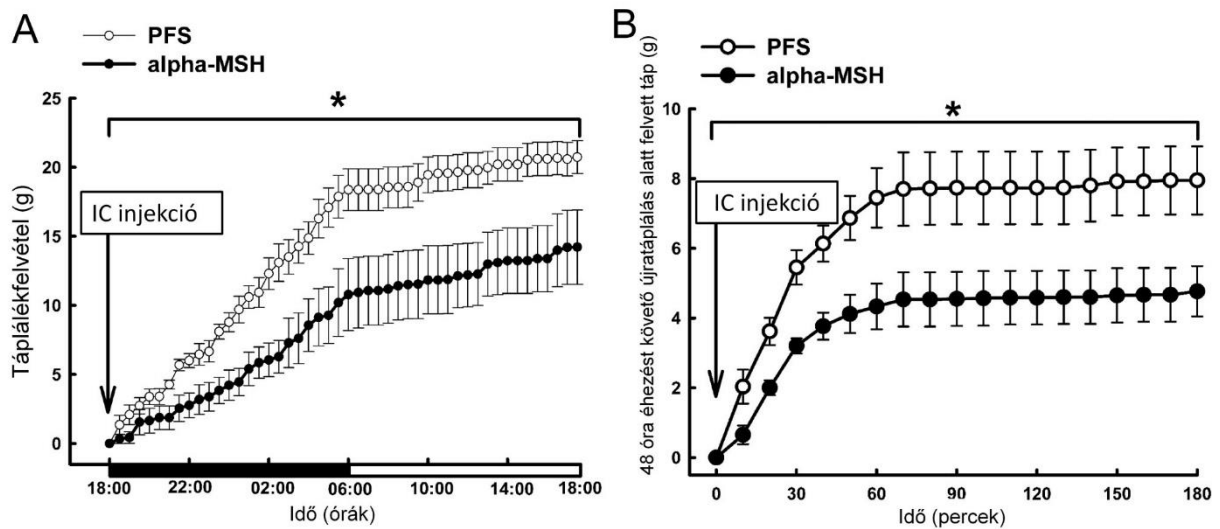
**5.55. ábra.** Az urocortin 1 (UCN1) és a FOSB immunreaktivitás változása a centrális projekciójú Edinger-Wespthal (EWcp) magba adott melanocortin 4 receptor agonista (alpha melanocyta stimuláló hormon,  $\alpha$ -MSH) és antagonistá (HS024) illetve ezek koktéljának hatására, éhezésben. Reprezentatív konfokális immunfluoreszcens felvételek (A-D). Pirogénmentes fiziológiás sóoldattal (PFS) kezelt kontroll csoporthoz (A) és az  $\alpha$ -MSH kezelt csoporthoz (B) képest az UCN1-FOSB kettősen pozitív sejtek számának emelkedése látható a (C) HS024 és a (D) koktél kezelt csoportban, ahogy azt az (E) grafikon is ábrázolja. Az UCN1 specifikus jeldenzítése (F) is szignifikánsan növekedett a koktél kezelt csoportban. A grafikonok oszlopai felett található betűk a szignifikáns különbséget jelölik a csoportpárok között, a post hoc teszt alapján ( $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ). Lépték:  $100\mu\text{m}$ .

5.IV.1.4. Az EWcp-be adott lokális alpha-MSH kezelés hatása a táplálékfelvételre és anyagcserére

A morfológiai megközelítés mellett, vizsgáltuk az EWcp-be injektált alpha-MSH hatását a táplálékfelvétel szabályozására (5.56.A ábra). A patkányok cirkadián ciklusának aktív (éjszakai) időszakának kezdetén beadott alpha-MSH injekció kb. 30%-kal csökkentette a spontán 12 órás éjszakai kumulatív táplálékfogyasztást a PFS injektált kontrollokhöz képest. Ezt nem kompenzálta a nappali táplálékfelvétel növekedése (RM ANOVA:  $F_{1,10} = 8,27$ ;  $p < 0,02$ ).

A következő kísérletben a 48 órás koplalás által kiváltott 3 órás kumulatív táplálékfelvételt vizsgáltuk a 9 órákor alkalmazott alpha-MSH EWcp injekció után (5.56.B ábra). Az alpha-

MSH injekció 40%-os csökkenést eredményezett a táplálékfelvételben, újratáplálás alatt a PFS injekciót kapott, éheztetett kontroll patkányokhoz képest (RM ANOVA:  $F_{1,10}=8,18$ ;  $p<0,02$ ).



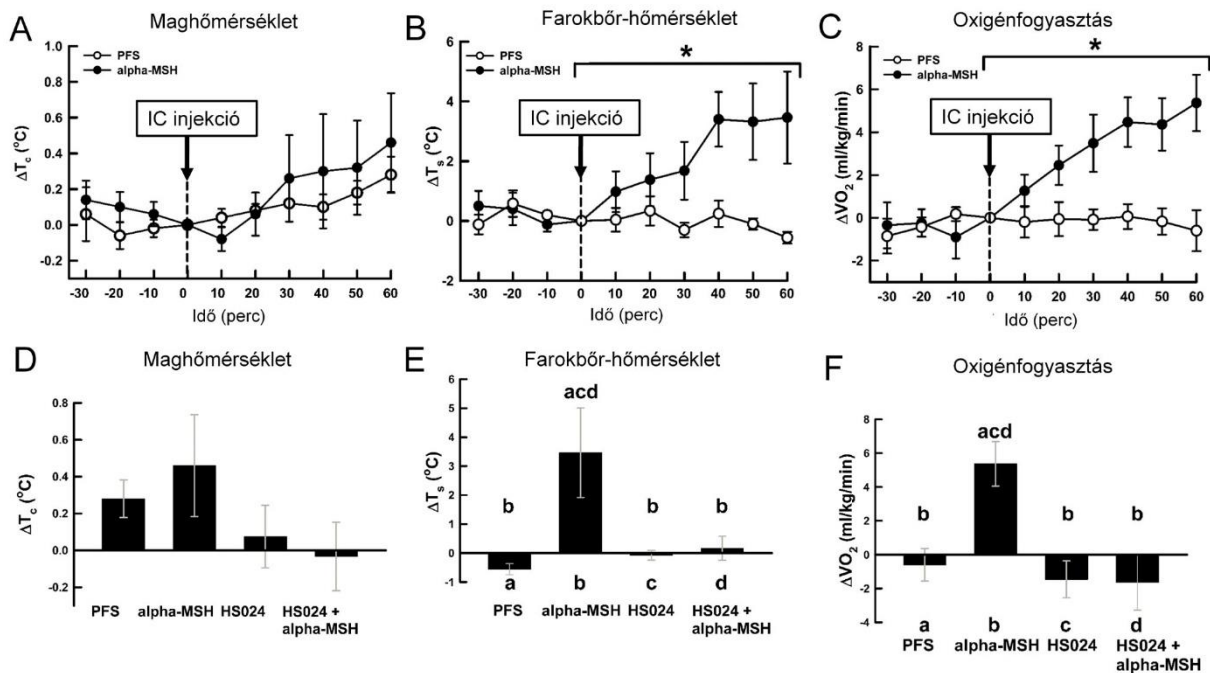
**5.56. ábra.** A centrális projekciójú Edinger-Westphal magba (EWcp) adott intracerebrális (IC) alpha-MSH injekció (sötét körök) hatása a (A) kumulatív spontán táplálékfelvételre (g) az injekciót követő 24 órás időszakban a pirogénmentes sóoldattal (PFS) kezelt kontrollokhoz képest (világos körök). Az abszcissa sötét és világos szakaszai az éjszakai, illetve nappali időszakot jelölik. (B) Intra-EWcp alpha-MSH injekció (sötét körök) hatása az állatok táplálékfelvételére 48 óras éhezést követő újratáplálás során, PFS oldattal kezel (világos körök) kontrollokkal összehasonlítva. (\* $p<0,02$ ; RM ANOVA)

Az EWcp-be adott alpha-MSH alapanyagcserére és a testhőmérsékletre gyakorolt hatását is vizsgáltuk. Az injekció időpontjában a csoportok maghőmérséklete, farokbőr-hőmérséklete és oxigénfogyasztása ( $VO_2$ ) nem különbözött. A PFS-hez képest, az alpha-MSH injekció jelentős (kb. 6 ml/testtömeg kg/perc)  $VO_2$  emelkedést idézett elő (RM ANOVA:  $F_{1,8} = 12,43$ ;  $p<0,01$ ) (5.57.C ábra). Ezt a hipermetabolikus választ nem követte jelentős hipertermia (5.57.A ábra), mivel a hőleadás azonnal növekedni kezdett, amit a farokbőr-hőmérséklet jelentős emelkedése (értágulat) jellemzett (RM ANOVA:  $F_{1,8}=18,81$ ;  $p<0,01$ ; 5.57.B ábra). Ez egy nem koordinált hőszabályozási válaszra utal, mely nem hasonlít a lázszerű válaszhoz, amelyben a hipermetabolizmus hőkonzerválással (vazokonstrikció) párosul, és hipertermiát eredményez.

Az EWcp-be injektált MC4R ligandok hőszabályozó hatásait a beadást követő 60. percben vizsgáltuk. Az ANOVA szignifikáns különbségeket jelzett a négy csoport farokbőr-hőmérsékletében (Ts:  $F_{3,16} = 4,26$ ,  $p<0,05$ , 5.57.E ábra) és az oxigénfogyasztásában ( $VO_2$ :  $F_{3,16}=7,70$ ,  $p<0,01$ , 5.57.F ábra). Az alpha-MSH nem koordinált hipermetabolikus hőszabályozó hatásával ellentétben, sem a HS024, sem a ligandok koktélya nem befolyásolja az oxigénfogyasztást, a maghőmérsékletet (5.57.D ábra) vagy a farokbőr hőmérsékletét. Az



MC4R antagonistá HS024 kivédte az alpha-MSH értágító (5.57.E ábra,  $p < 0,05$ ) és hipermetabolikus (5.57.F ábra,  $p < 0,01$ ) hatását az EWcp-ben.



**5.57. ábra.** A centrális projekciójú Edinger-Westphal mag melanocortin 4 receptorain végzett lokális farmakológiai manipulációk metabolikus hatásai. A EWcp-ba adott intracerebrális (IC) alpha-MSH injekció (sötét körök) hatása a (A) maghőmérséklet ( $T_c$ ), (B) a farokbőr-hőmérséklet ( $T_s$ ) és (C) az oxigénfogyasztás ( $VO_2$ ) változására a pirogénmentes fizioológias sóoldattal (PFS) injektált kontrollokhöz képest (világos körök) ( $*p < 0,01$ ; RM ANOVA). A EWcp-ba adott PFS, alpha-MSH, HS024 vagy az utóbbi kettő kokteljának hatása 60 perc elteltével a (D) maghőmérsékletre, (E) farokbőr-hőmérsékletre és (F) oxigénfogyasztásra. A (D-F) panelek oszlopai feletti betűk a csoportpárok közti szignifikáns ( $p < 0,004$ ) különbségeket jelölik, a post hoc teszt szerint.

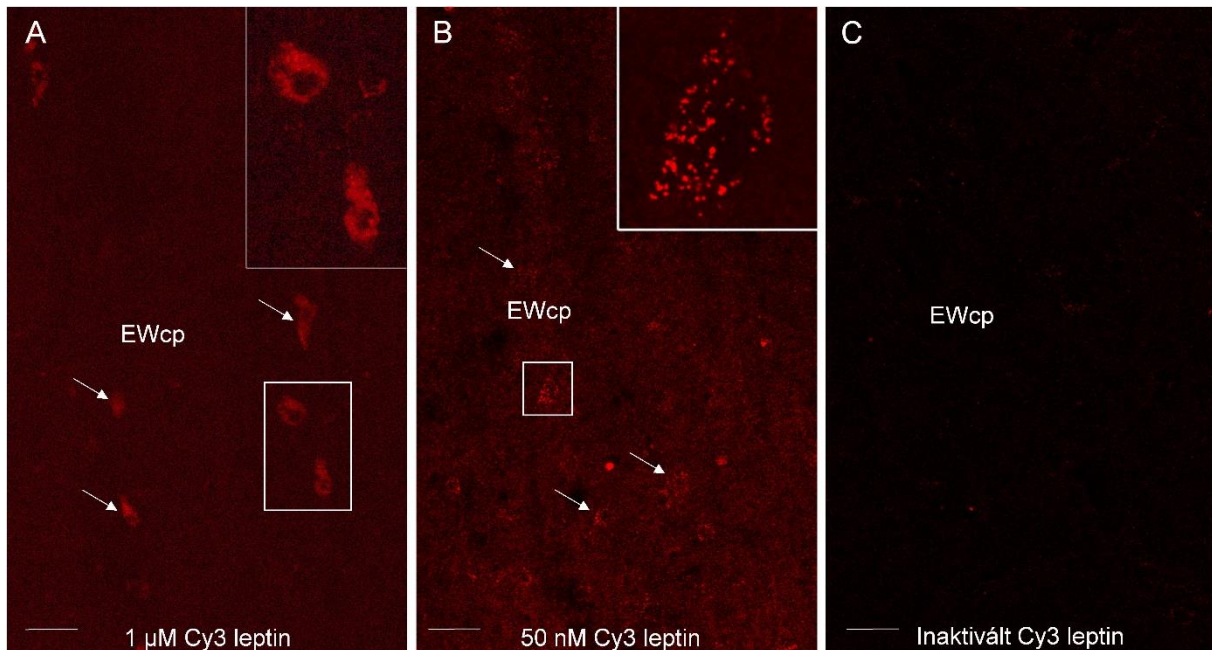
#### 5.IV.2. Leptin hatása EWcp-ben, és ennek metabolikus jelentősége

Ebben a projektben azt teszteltük, hogy az EWcp kaphat-e információt a leptin útján az energiaraktárakról és hogy van-e efferens kapcsolat a mag és a fehér zsírszövet között.

##### 5.IV.2.1. Az EWcp, mint szenzor: a leptin kötődik az UCN1 neuronokhoz

Korábban kimutattuk, hogy az EWcp/UCN1 neuronok kb. fele expresszálja a leptinreceptor rövid formáját, és reagál az ip leptin injekcióra (Xu és mtsai., 2011). Annak vizsgálatára, hogy a leptin fizikailag is képes-e kötődni az EWcp/UCN1 neuronok leptinreceptorához, és hogy az UCN1 sejtekre közvetlenül fejtheti-e ki a hatását, az EWcp-t tartalmazó akut közepagy szeleteket Cy3 jelölt leptinnel inkubáltuk. Azt figyeltük meg, hogy a Cy3 konjugált leptin kötődött az EWcp-hez. Az 1  $\mu$ M koncentrációnál az EWcp neuronok diffúz, erős jelölését idézte elő (5.58.A ábra), míg az 50nM jelölt leptin pontozott megjelenésű sejt felszíni jelet adott az

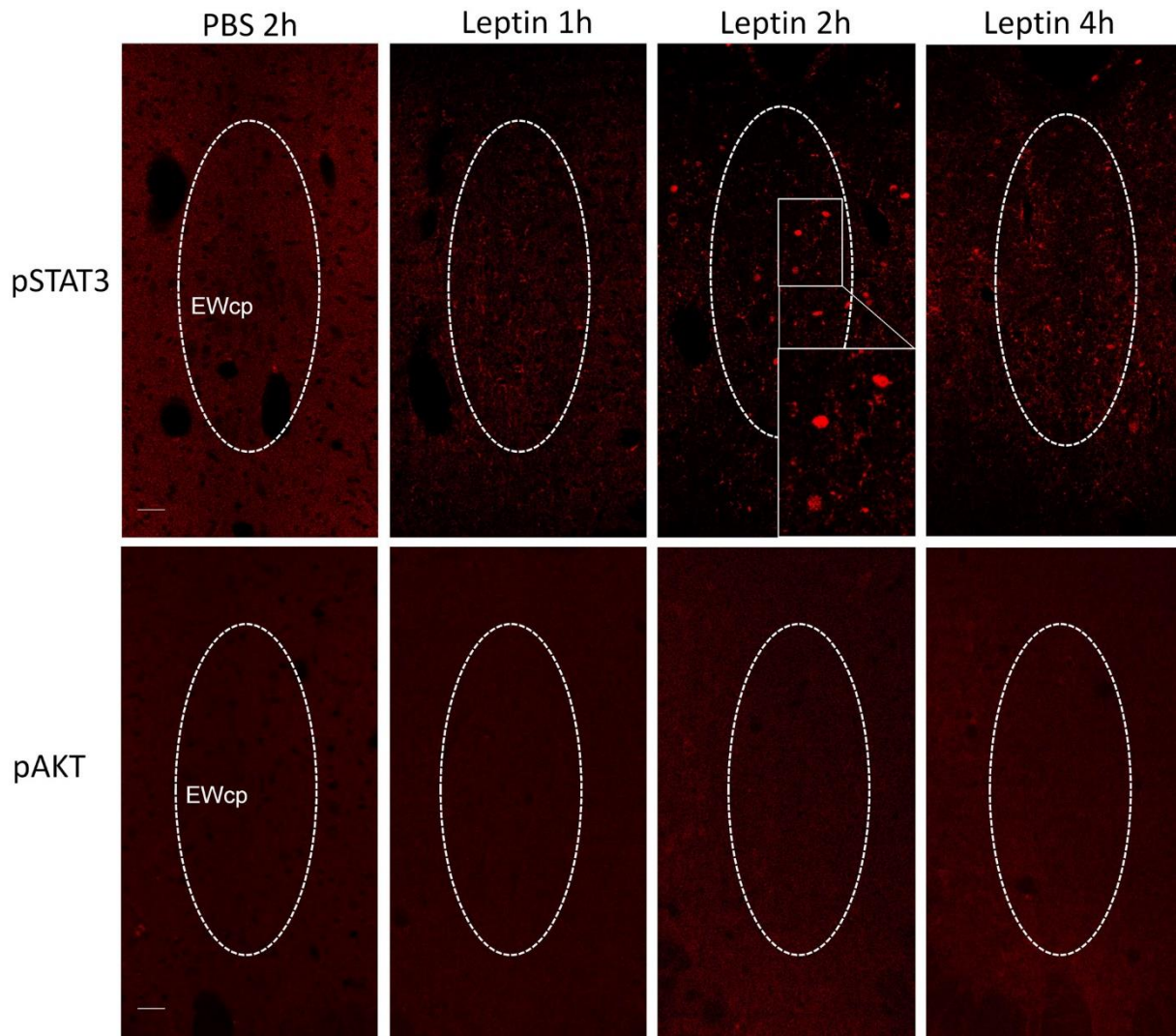
EWcp-ben (5.58.B. ábra), mely bizonyítja, hogy a leptin közvetlenül kötődik az EWcp/UCN1 neuronok leptinreceptoraihoz.



**5.58. ábra.** A leptin a centrális projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp) neuronjaihoz kötődik. Reprezentatív konfokális képek 1 $\mu$ M (A) és 50nM (B) Cy3 konjugált leptinnel kezelt akut patkányagyszeletről. A vörös fluoreszcencia neuronális perikaryon-okat (nyilak) jelöl az EWcp területén, ami a leptin receptorkötődésére utal. Kontrollként, főzéssel inaktivált Cy3 konjugált leptinkezelést végeztünk, amely nem adott értékelhető vörös jelet (C). Lépték: 30 $\mu$ m.

5.IV.2.2. Az EWcp, mint integrátor: a leptin jelátviteli hatása az EWcp/UCN1 neuronokban  
 Korábban megfigyeltük, hogy az ip leptin injekció 2-4 órán belül aktiválja a signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) szignált az EWcp-UCN1 neuronokban (Xu és mtsai., 2011), de ismert, hogy a leptin más intracelluláris jelátviteli útvonalakat is aktivál (Liu és mtsai., 2018a). A leptin által bekapcsolt intracelluláris jelátviteli útvonal(ak) átfogóbb vizsgálatára felmértük a foszforilált STAT3 (pSTAT3), foszforilált AKT (pAKT) és a foszforilált extracelluláris szignál által regulált kináz (pERK) jelenlétét és időbeli változását. Mivel a leptin eltérő dinamikával halad át a vér-agy gáton (Banks és mtsai., 2000; Faouzi és mtsai., 2007), a mintákat 0, 1, 2 és 4 órával a leptin beadása után vettük. Először az ip leptin kezelés hatékonyságát ellenőriztük a mediobasalis hypothalamus-ban (MBH) a pSTAT3 aktiválódás vizsgálatával (ld. Xu és mtsai., 2022 közleményünk kiegészítő [ábráját](#)), ahol a korábbi irodalommal összhangban (Xu és mtsai., 2011), a legerősebb pSTAT3 immunreaktivitást 2 órával az injekció beadása után figyeltük meg. Hasonlóképpen, a pSTAT3 legerőteljesebb aktiválódását az EWcp-ben 2 óránál figyeltük meg, míg 1, illetve 4 órával a beadást követően

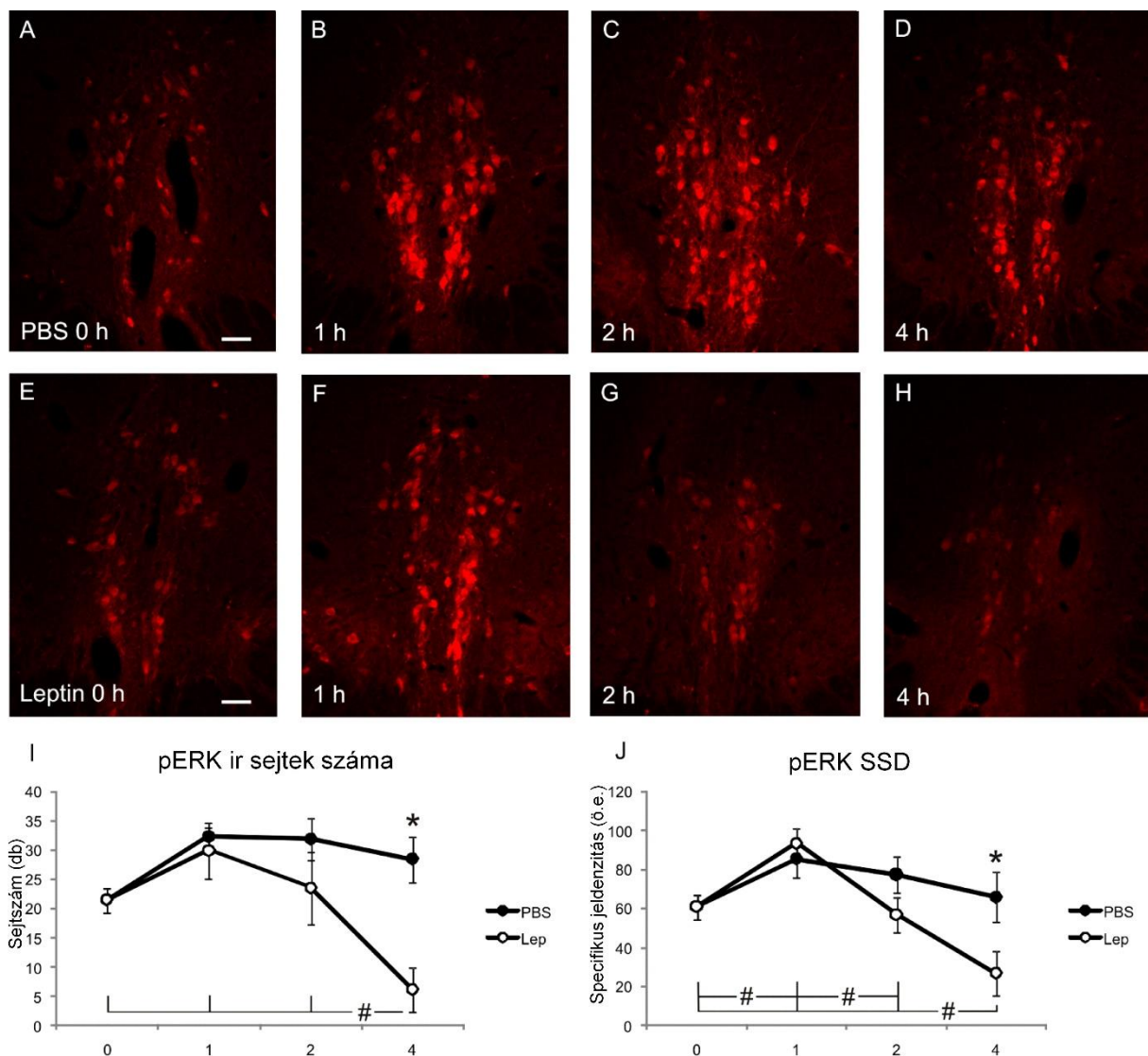
nem észleltünk immunpozitív sejtmagokat (5.59. ábra). A sóoldattal injektált kontroll patkányoknál egyik időpontban sem mutatkozott pSTAT3 immunjel egyik régióban sem. Az irodalmi adatokkal összhangban, az MBH-ban a maximális leptin indukálta pAKT választ és hatást 4 óránál láttuk (ld. Xu és mtsai., 2022 kiegészítő [ábráját](#)), ezzel szemben, az EWcp-ben a leptin egyik időpontban sem indukált pAKT immunreaktivitást (5.59. ábra).



**5.59. ábra.** Leptin injekció hatása a pSTAT3 és pAKT immunreaktivásra a centrális projekciójú Edinger-Westphal magban (EWcp). Két órával a leptin beadása után pSTAT3 immunreaktivitás jelent meg az EWcp-ben (piros sejtmagok). A foszfátpufferelt sóoldattal (PBS) kezelt (kontroll) patkányokban és a leptininjekcióval kezelt állatokban más időpontban nem észleltünk figyelemre méltó pSTAT3 immunjelet. A leptin injekció nem indukálta a pAKT fehérje megjelenését az EWcp-ben, egyik csoportban és egyik időpontban sem. Lépték: 30 $\mu$ m.

A pERK ir neuronok számát a leptinkezelés (ANOVA:  $F_{1,23}=9,45$ ;  $p<0,01$ ), az idő (ANOVA:  $F_{3,23}=5,14$ ;  $p<0,01$ ) és ezek interakciója (ANOVA:  $F_{3,23}=3,25$ ;  $p<0,05$ ; 5.60.I ábra) is befolyásolta. Az oldószert kapott csoportban (5.60.A-D ábra) egyik időpontban sem tapasztaltunk hatást. A leptin csoportban (5.60. E-H ábra) 4 óra után a pERK ir neuronok száma

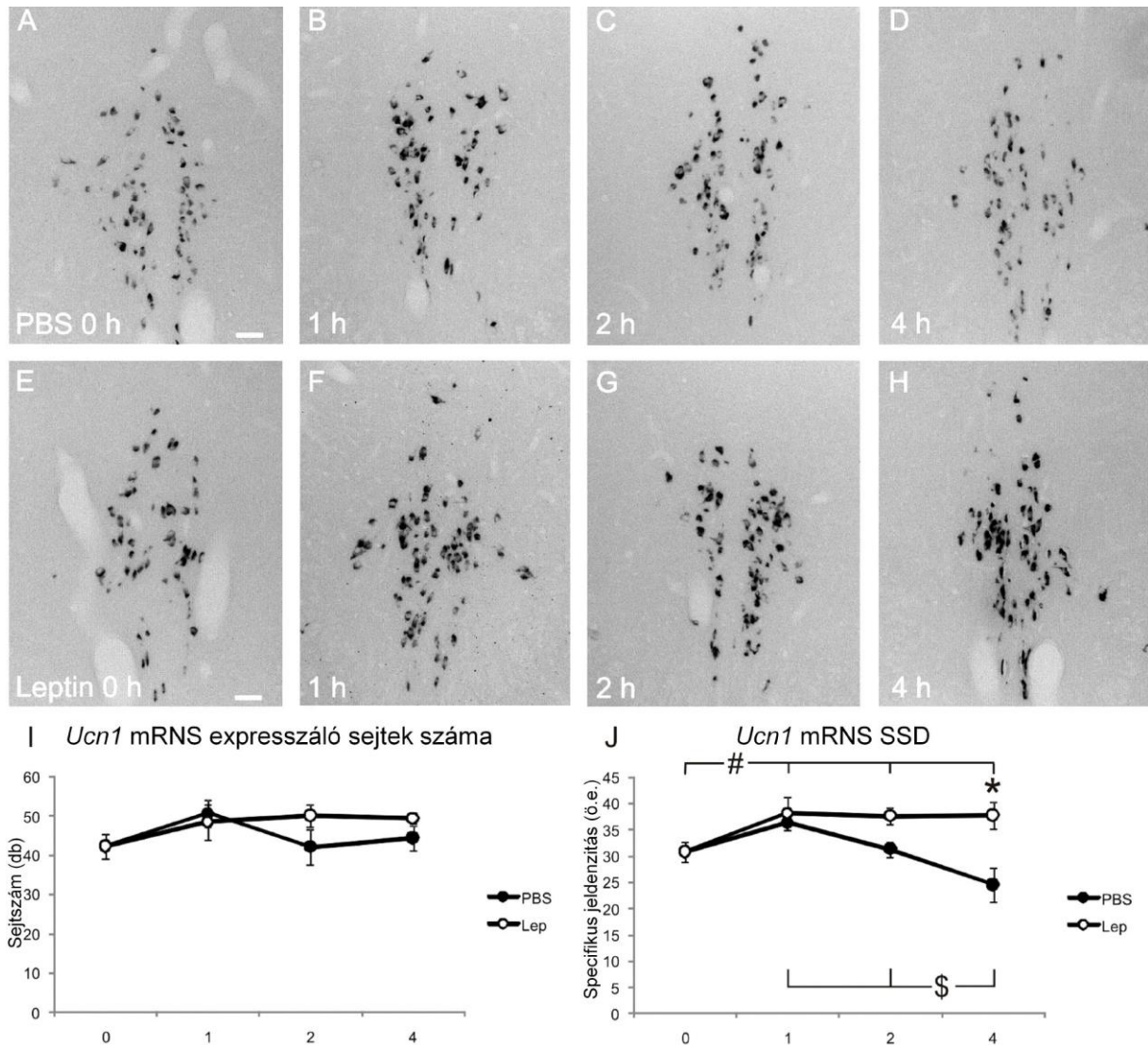
jelentősen alacsonyabb volt, mint a többi időpontban ( $p < 0,05$ ) és jelentősen kisebb volt ( $p < 0,01$ ) a sóoldatot kapott csoportnál is (5.60.I ábra). A pERK jelintenzitást az idő befolyásolta (ANOVA:  $F_{3,23}=7,26$ ;  $p < 0,005$ ; 5.60.J ábra), mivel 1 órával a leptin injekció beadása után a pERK immunreaktivitás tendenciózusan ( $p = 0,06$ ) magasabb volt a sóoldattal injektált, és szignifikánsan megnövekedett volt leptin kezelt ( $p < 0,05$ ) csoportban, a 0. időponthoz képest. Ez a hatás csak átmeneti volt, mivel a későbbi időpontokban a pERK immunjel nem különbözött szignifikánsan a kontrollokétól. Míg 4 óránál a pERK jel a sóoldattal injektált állatokban hasonló volt, mint a 0. időpontban, addig a leptinnel kezelt patkányokban a pERK immunjel jelentősen alacsonyabb volt ( $p < 0,01$ ). Ezek az eredmények további bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a leptin közvetlenül befolyásolja az EWcp/UCN1 neuronokat, elsősorban a pSTAT3 és a pERK jelátviteli utakon keresztül.



**5.60. ábra.** (164. oldal) A pERK immunreaktivitás dinamikája a centrális projekciójú Edinger-Westphal magban (EWcp) sóoldattal (PBS) illetve leptinnel (Lep) kezelt patkányokban. A PBS injekció (A-D) nem befolyásolta a pERK immunreaktív (ir) sejtek számát (sötét körök az I panelben) és a pERK specifikus jelendezítést (SSD), mely az 1 óránál látható átmeneti erős növekedési tendencia után változatlan maradt (sötét körök J-ben). Ezzel szemben, 4 órával a leptin beadása után (F) a pERK ir sejtszám minden időponthoz képest csökkent (világos körök az I ábrán; # $p < 0,05$ , Fisher teszt). A pERK SSD 1 órával a leptin injekció után (F) átmenetileg megnövekedett, melyet 4 óránál erőteljes csökkenés követett (világos körök a J ábrán; # $p < 0,05$ , Fisher teszt, az összes többi időponthoz képest). A leptinnel kezelt patkányok szignifikánsan alacsonyabb pERK sejtszámot és SSD-t mutattak 4 óránál, mint a PBS injekcióval kezelt állatok (\* $p < 0,01$ , Fisher teszt). Lépték:  $50\mu\text{m}$ .

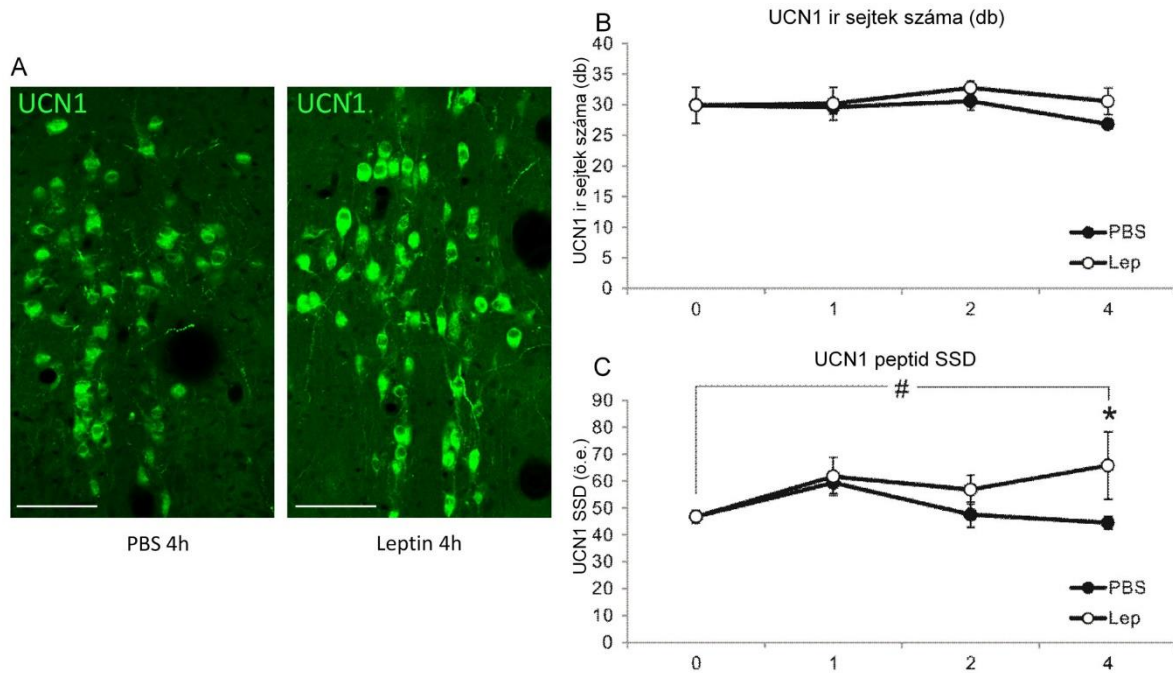
5.IV.2.3. Az EWcp, mint integrátor: a leptin hatása az *Ucn1* mRNS és UCN1 peptid mennyiségére

*In situ* hibridizáció után az *Ucn1* mRNS-t tartalmazó sejtek számában nem láttunk változást (5.61.A-I ábra), de az *Ucn1* mRNS SSD-t a leptin (ANOVA:  $F_{1,24}=11,46$ ;  $p < 0,005$ ) az idő (ANOVA:  $F_{3,24}=3,71$ ;  $p < 0,05$ ), és ezek interakciója is (ANOVA:  $F_{3,24}=3,5$ ;  $p < 0,05$ ) befolyásolta. A sóoldattal injektált patkányoknál az SSD az injekciót követő 1 óránál először növekedési tendenciát mutatott ( $p=0,09$ ; 5.61.J ábra), majd 4 óránál szignifikánsan alacsonyabb volt, mint 1 ( $p < 0,005$ ) és 2 óránál ( $p < 0,05$ ). A leptincsoportban 1 óránál az SSD magasabb volt, mint a 0. időpontban ( $p < 0,05$ ), majd stagnált 2 és 4 óránál is. Négy óránál az *Ucn1* SSD a leptin csoportban jelentősen magasabb volt, mint a kontrollban ( $p < 0,001$ ).



**5.61. ábra.** Az *Ucn1* mRNS expresszió a centrális projekciójú Edinger-Westphal magban (EWcp) sóoldat (PBS) és leptin (Lep) beadása után különböző időpontokban (A-H). Az *Ucn1* mRNS-t expresszáló sejtek számát (I) nem befolyásolta a kezelés. Egy órával a PBS injekció beadása után (B) az *Ucn1* mRNS expresszió növekedésének tendenciája volt megfigyelhető, amely a később csökkent (C, D és sötét körök a J ábrán;  $S_p < 0,05$ , Fisher teszt). A leptin injekció (E-H) 1 óránál (F) növelte az EWcp *Ucn1* mRNS tartalmát, amely a későbbi időpontokban változatlan maradt (G, H és világos körök a J ábrán;  $\#p < 0,05$ , Fisher teszt). A leptinnel kezelt patkányok szignifikánsan magasabb *Ucn1* mRNS specifikus jelintenzitást (SSD) mutattak 4 óránál, mint a PBS injekcióval kezelt állatok ( $*p < 0,001$ , Fisher teszt). ö.e.: önkényes egység. Lépték:  $50\mu\text{m}$ .

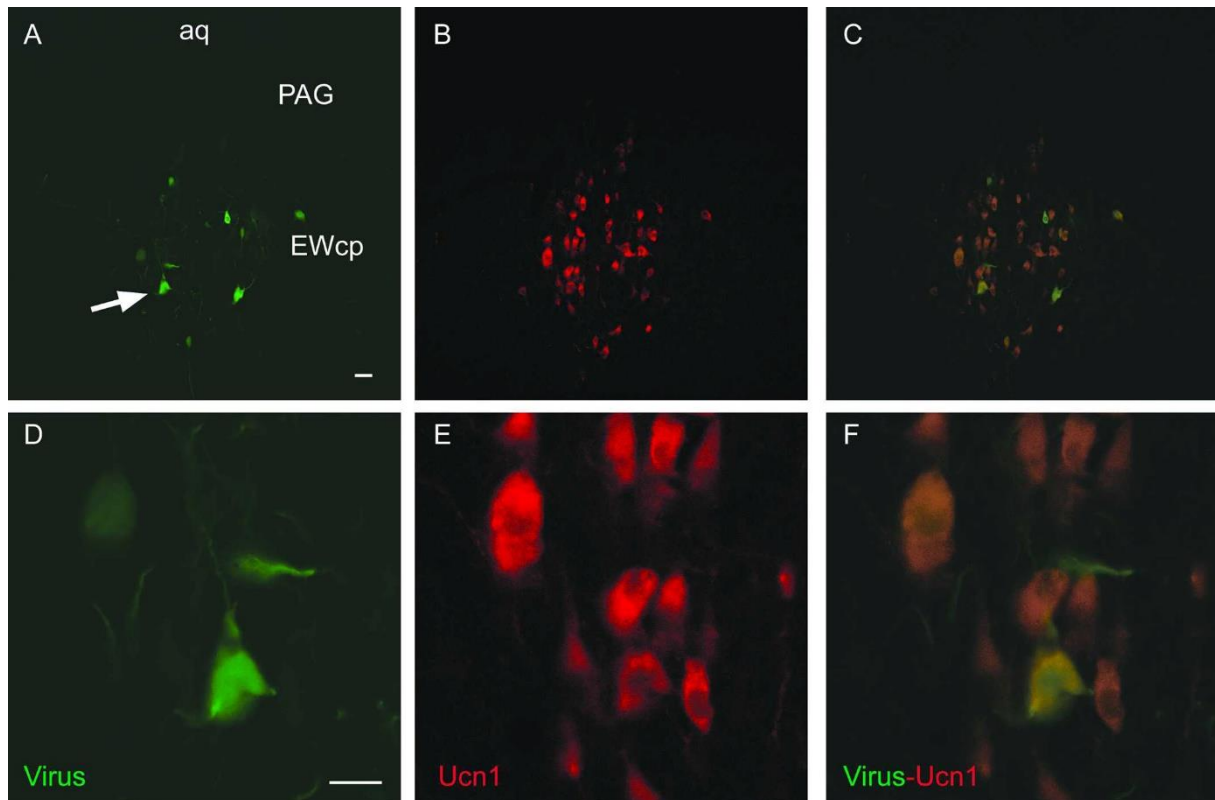
Az EWcp UCN1 ir sejtszámában nem láttunk változást (5.62.A-C ábra). Az UCN1 SSD-re a leptinnek egy közel szignifikáns főhatását figyeltük meg (ANOVA:  $F_{1,24}=3,74$ ;  $p=0,06$ ). A post hoc teszt szerint, 4 óra elteltével ( $p < 0,05$ ) az UCN1 SSD magasabb volt a leptin kezelt patkányokban, mint a kontrollokban (5.62.C ábra). Ezek az eredmények megerősítik korábbi megfigyeléseinket, és azt mutatják, hogy a leptin először az *Ucn1* mRNS expresszióját növelte, amit az UCN1 peptid mennyiségének növekedése kísért.



**5.62. ábra.** Az UCN1 peptid immunfluoreszcens jelölése a centrális projekciójú Edinger-Westphal magban sóoldat (PBS) és leptin (Lep) kezelés után. Reprezentatív képek az UCN1 (zöld) immunreaktív (ir) neuronokról (A) 4 órával a PBS, illetve leptin injekció után. Az UCN1 ir sejtek számát a kezelés egyik időpontban sem befolyásolta (B). A sejtek UCN1 peptidtartalma (C) magasabb volt 4 óránál (\* $p < 0,05$ , Fisher teszt), mint a PBS injektált patkányok esetében. SSD: specifikus jeldenzítés; ö.e.: önkényes egység. Lépték: 100 $\mu$ m.

#### 5.IV.2.4. Az EWcp, mint effektor: retrográd jelölés a fehér zsírszövet felől

Annak a kérdésnek a tisztázására, hogy az EWcp/UCN1 neuronok a fehér zsírszövet preszimpatikus innervációjában is részt vesznek-e, rekombináns BDG pseudorabies vírust injektáltunk az epididymalis zsírba. Öt nap elteltével erős GFP immunreaktivitást találtunk az EWcp-ben, ami produktív fertőzésre és a BDG jelenlétére utalt. Az EWcp középső szintjének reprezentatív metszetei mintegy 10 GFP immunpozitív neuront tartalmaztak (5.63.A, D ábra). A kettős immunjelölés azt mutatta, hogy a jelölt neuronok mintegy 80%-a UCN1 pozitív volt (5.63.C, F ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az EWcp/UCN1 neuronok a fehér zsírszövet preszimpatikus innervációjában is részt vesznek.



**5.63. ábra.** A centrális projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp) UCN1 neuronjai részt vesznek a fehér zsírszövet idegi szabályozásában. Zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) expresszáló pseudorabies vírus (Virus) fehér zsírszövetbe injektálása után a GFP (A, D) megjelent meg az EWcp neuronjaiban. Az UCN1 peptid immunjelölése (B, E; piros) kimutatta, hogy a vírussal fertőzött sejtek többsége egyben UCN1 immunpozitív is volt (C, F). PAG: substantia grisea centralis mesencephali; aq: aqueductus cerebri. Lépték: 30 $\mu$ m.

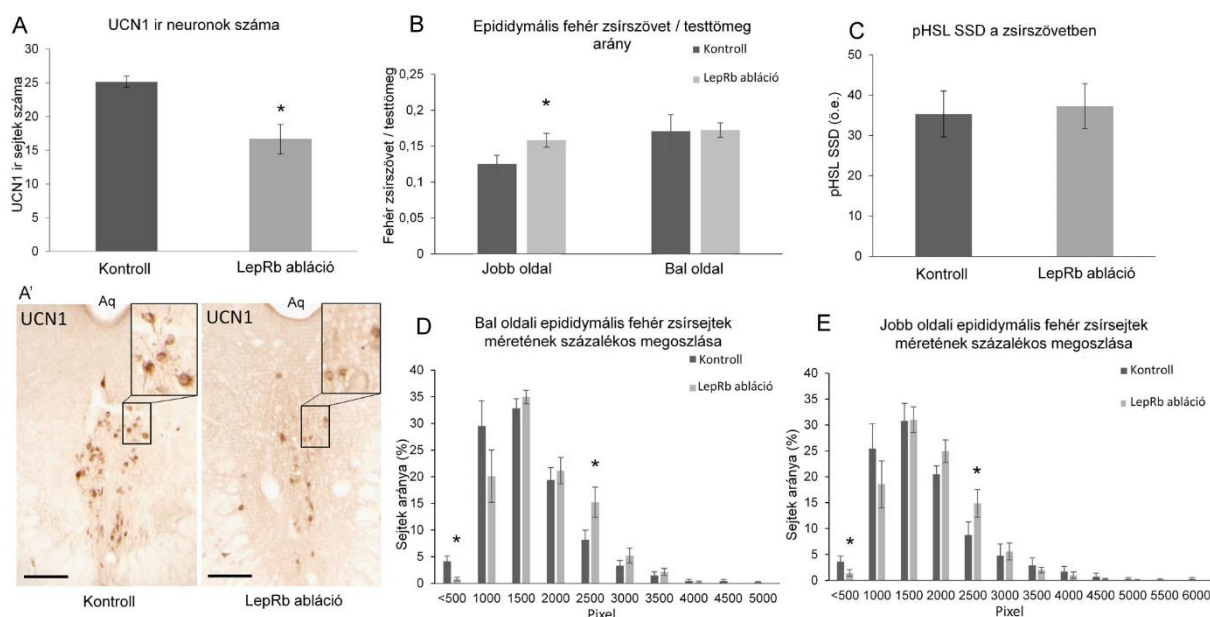
5.IV.2.5. Az EWcp, mint effektor: az EWcp/LepRb/UCN1 neuronok hatása a fehér zsírszövetre  
Az EWcp/LepRb/UCN1 neuronok zsírszövetre gyakorolt funkcionális hatásának felméréséhez leptin konjugált szaporin toxint injektáltunk az EWcp-be. A LepRb pozitív EWcp neuronok sikeres ablációját UCN1 immunhisztokémiával ellenőriztük. Mivel az EWcp középvonali injekcióját patkányban meglehetősen nehéz elvégezni a sinus sagittalis superior sértése és vérzés előidézése nélkül, a fent tárgyalt ferde megközelítést alkalmaztuk. Ezzel a módszerrel kb. 60%-ban sikerült az injekciót közvetlenül az EWcp fölé adni. A leptin-szaporin injektált patkányokban mintegy 34%-kal kevesebb EWcp/LepRb/UCN1 ir neuront találtunk, mint a (szaporin injektált) kontrollokban ( $t(11)=3,397$ ,  $p<0,005$ ; 5.64.A ábra). Mivel az UCN1 neuronok körülbelül 45%-a LepRb pozitív (Xu és mtsai., 2011), a leptin konjugált szaporin a LepRb pozitív EWcp/UCN1 neuronok többségét előlte (34/45=75.5%) (5.64.A' ábra).

Az EWcp/UCN1 neuronok ablációja a jobboldali fehér zsírszövet tömegének növekedését eredményezte ( $t(11)=-2,162$ ;  $p<0,05$ ) a kontrollhoz képest (5.64.B ábra). A bal oldali zsírszövet



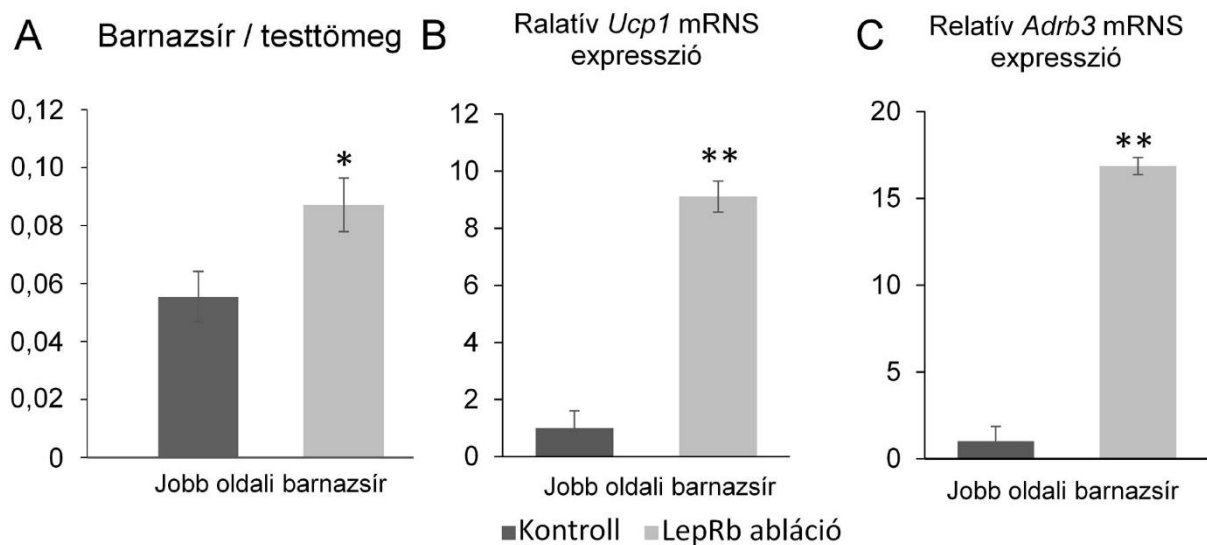
esetében nem találtunk szignifikáns hatást. Ezután, megvizsgáltuk, hogy a LepRb/UCN1 neuron abláció befolyásolja-e a zsírsejtek méretét. Hematoxylin-eosin festett metszetekben az adipocyták viszonylag nagy méretbeli eltérést mutattak, mind a kontroll, mind a leptin-szaporinnal kezelt patkányokban. Az EWcp/LepRb/UCN1 neuron abláción átesett patkányokban mind a bal, mind a jobb zsírszöveti mintában több nagy adipocytát és kevesebb kis zsírsejtet figyeltünk meg, mint a kontrollban ( $p < 0,05$ ). A zsírsejtek méretének gyakoriságeloszlás-változását az átlagos adipocytá keresztmetszeti felület is tükrözte, mely 25%-os növekedést mutatott a bal oldalon, és 20%-kal nőtt a jobb oldali zsírszöveti mintában, a kontrollokhoz képest ( $p < 0,05$ ; 5.64.D, E ábra). Végül, a jobb oldali fehér zsírszövet mintákban értékeltük a lipolízist is a foszforilált hormonszenzitív lipáz (pHSL) segítségével. A leptin-szaporinnak nem volt hatása a pHSL specifikus jelendezítésára ( $p = 0,42$ ; 5.64.C ábra), ami arra utal, hogy az EWcp/UCN1 neuronok ablációja nem befolyásolja közvetlenül a lipolízist.

Ezek az eredményeink azt mutatják, hogy az EWcp/UCN1 neuron abláció növeli a jobb oldali fehér zsírszövet tömegét, a nagy zsírsejtek számát és az átlagos adipocytá keresztmetszeti felületet mindkét oldalon, de a lipolízist közvetlenül nem befolyásolja.



**5.64. ábra** Az LepRb/UCN1 neuron abláció hatása a fehér zsírszövetre. A leptin konjugált szaporin kezelés (A) az UCN1 sejtek számának szignifikáns ( $*p < 0,005$ ;  $t$  próba) csökkenését okozta a centrális projekciójú Edinger-Westphal magban (EWcp), amint azt az A' panelen látható reprezentatív, diaminobenzidín kromogénnel végzett UCN1 immunjelölés fotói is mutatják. A B panel a mellékhere melletti fehér zsírszövet testtömegre vonatkoztatott relatív tömegét mutatja. A jobb oldali epididymális fehér zsírszövet tömege nőtt ( $*p < 0,05$ ) az EWcp leptin szaporin kezelése után, a ballal ellentétben. C panel: foszforilált hormonszenzitív lipáz (pHSL) immunreaktivitás a fehér zsírszövetben. A fehér zsírsejtek digitális fotókon mért pixelben kifejezett méretének összehasonlítása a bal (D) és a jobb epididymális zsírban (E). A grafikonok világoszürke oszlopai a kontroll, a sötétszürkék a leptin receptort (LepRb) hordozó sejtek ablációján átesett csoport mintáira utalnak. Aq: aqueductus cerebri. Lépték: 100 $\mu$ m.

5.IV.2.6. Az EWcp, mint effektor: az EWcp/LepRb/Ucn1 neuronok hatása a barna zsírszövetre  
Mivel korábban kimutatták a barna zsírszövet és az EWcp kapcsolatát Zhang és mtsai. (2011), megvizsgáltuk, hogy a neuronok ablációja miként hat a barna zsírszövetre. Azt találtuk, hogy az abláció után a jobboldali barna zsírszövet tömege nagyobb volt ( $t(11)=-2,47$ ;  $p<0,05$ ), mint a kontrolloknál (5.65.A ábra). Ezután RT-qPCR segítségével megmértük az uncoupling protein 1 mRNS-ének (*Ucp1*) expresszióját, mint a barna zsírszövet aktivációjának molekuláris markerét. Ezen kívül, a 3-as típusú béta adrenerg receptor mRNS (*Adrb3*) expressziót is vizsgáltuk, mely a szimpatikus idegrendszer által regulált barna zsírszöveti termogenezisre utal (Bartness és Song, 2007). A jobb oldali barnazsírban az EWcp/LepRb/UCN1 neuron abláción átesett patkányoknál az *Ucp1* mRNS kilencszeres ( $t(10)=2,819$ ;  $p<0,01$ ; 5.65.B ábra), és az *Adrb3* mRNS tizenhatszoros emelkedését ( $t(8)=3,954$ ;  $p<0,005$ ; 5.65.C ábra) láttuk, a kontrollokhoz képest. A bal oldali barnazsír esetében nem észleltünk szignifikáns hatást. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az EWcp/LepRb/UCN1 neuron abláció befolyásolja a barna zsírszövet tömegét, növeli az *Ucp1*, és az *Adrb3* mRNS expresszióját.

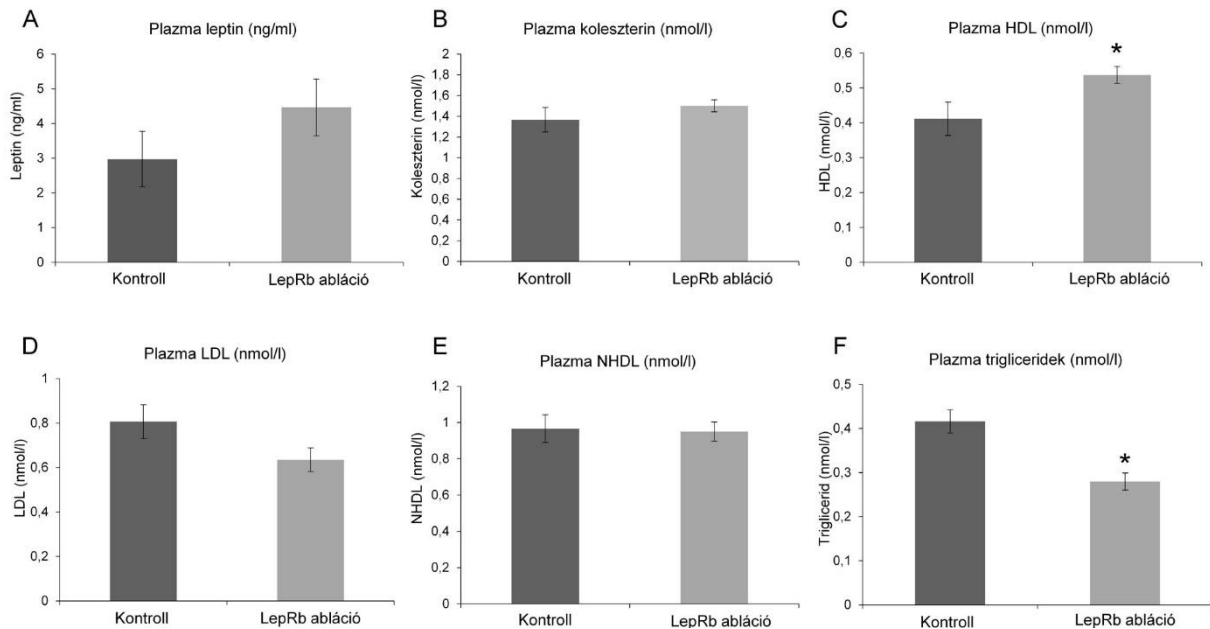


**5.65. ábra.** Az EWcp/LepRb/UCN1 neuronok ablációjának hatása a barna zsírszövetre. A jobb oldali barnazsír testtömegre vonatkoztatott tömege (A) szignifikánsan megnőtt ( $*p<0,05$ ). Az uncoupling protein 1 (*Ucp1*) mRNS-ének ( $**p<0,01$ ) (B) és a  $\beta 3$  adrenerg receptor (*Adrb3*) mRNS-ének ( $**p<0,01$ ) (C) relatív expressziója a jobb oldali barna zsírban az UCN1 neuronok ablációja után (RT-qPCR).

#### 5.IV.2.7. Az EWcp/LepRb/Ucn1 neuronok hatása a plazma leptinre és a lipidprofilra

Az EWcp/LepRb/UCN1 abláción átesett patkányoknál a leptin plazmaszintje tendenciózusan magasabb volt, mint a kontrolloké ( $t(8)=-1,17$ ;  $p=0,1$ ; 5.66.A ábra). A vérben a trigliceridszintek alacsonyabb ( $t(10)= 3,85$   $p<0,01$ ; 5.66.F ábra), a magas denzitású lipoprotein (HDL) szint pedig magasabb volt, mint a kontrollban ( $t(10)=-2,44$ ;  $p<0,05$ ; 5.66.C ábra). Az

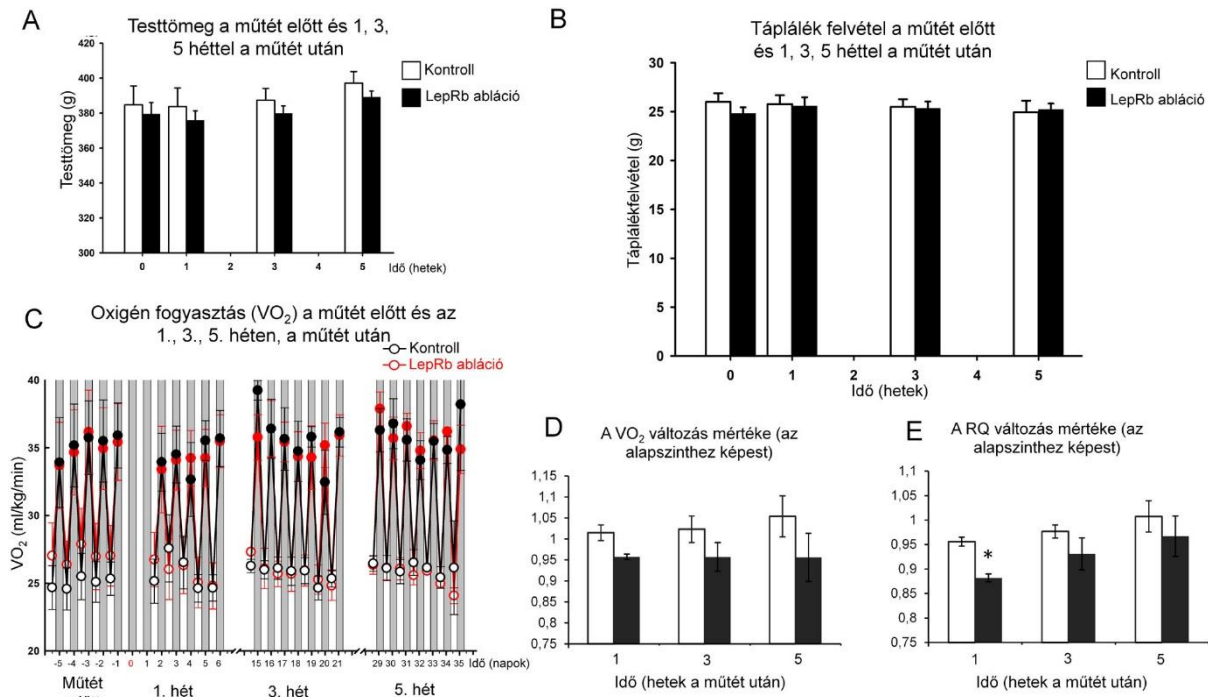
abláción átesett állatok esetében erős tendenciát találtunk az alacsony denzitású lipoprotein (LDL) csökkent szintjére ( $t(9)=2,12$ ;  $p=0,06$ ; 5.66.D ábra). A koleszterin- és az össz nem-HDL koleszterin értéket az abláció nem befolyásolta (5.66.B, E ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az EWcp/LepRb/Ucn1 abláció után megváltozik a plazma lipidprofilja.



**5.66. ábra.** Az EWcp/LepRb/UCN1 neuronabláció hatása a vér lipidprofiljára. Plazma leptin (A), koleszterin (B), magas (HDL) (C) és alacsony denzitású lipoprotein (LDL) (D), nem magas denzitású lipoprotein (NHDL) (E) és triglicerid (F) szintek. A plazma HDL szintje emelkedett, míg a triglicerid (\* $p<0,05$ ) csökkent az EWcp/LepRb/UCN1 sejtek ablációja után.

#### 5.IV.2.8. Az EWcp/LepRb/UCN1 neuronok, mint effektor: a táplálékfelvételi és energetikai hatás

A testtömeg és a táplálékfelvételi paramétereket (5.67.A,B ábra) a leptin-szaporin injekciót követően 5 hétig vizsgáltuk. Az EWcp/LepRb/UCN1 neuronok ablációja e paraméterek egyikét sem befolyásolta szignifikáns mértékben. A kalorimetria egyértelműen mutatta a diurnális ritmust az abláción átesett és kontroll patkányoknál a légzési hányados (RQ:  $VCO_2/VO_2$ ) és az oxigénfogyasztás ( $VO_2$ ) tekintetében. Mindkét paraméter a sötét időszakban volt magasabb (RQ;  $p<0,05$ ,  $VO_2$ ;  $p<0,001$ ; 5.67.C ábra). Továbbá, a világos periódus alatt a LepRb/UCN1 neuron abláció tendenciózusan befolyásolta a  $VO_2$ -t ( $t(5)=1,8$ ;  $p=0,06$ ) és kismértékben csökkentette a RQ-t ( $t(5)=5,37$ ;  $p<0,005$ ). Ezek a hatások csak az injekció beadása utáni első héten voltak jelen (5.67.D, E ábra). A későbbi időpontokban nem figyeltük meg az abláció hatásait. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az EWcp/UCN1 neuronok elvesztése átmenetileg csökkenti a légzési hányadost és az oxigénfogyasztást a sötét napszakban.



**5.67. ábra.** Az EWcp/LepRb/UCN1 neuronok ablációjának hatása a táplálkozásra és az energiahomeosztázisra. A grafikonok a testtömeget, (A), a táplálékfelvételt (B), az oxigénfogyasztás ( $VO_2$ ) napszakos mintázatát (C), valamint a  $VO_2$  (D) és a légzési hányados (RQ) (E) változását mutatják szaporin injektált (kontroll) és leptin-szaporin abláción átesett patkányokban. Egy héttel az UCN1 neuron abláció után az RQ szignifikánsan (\* $p < 0,005$ ) csökkent.

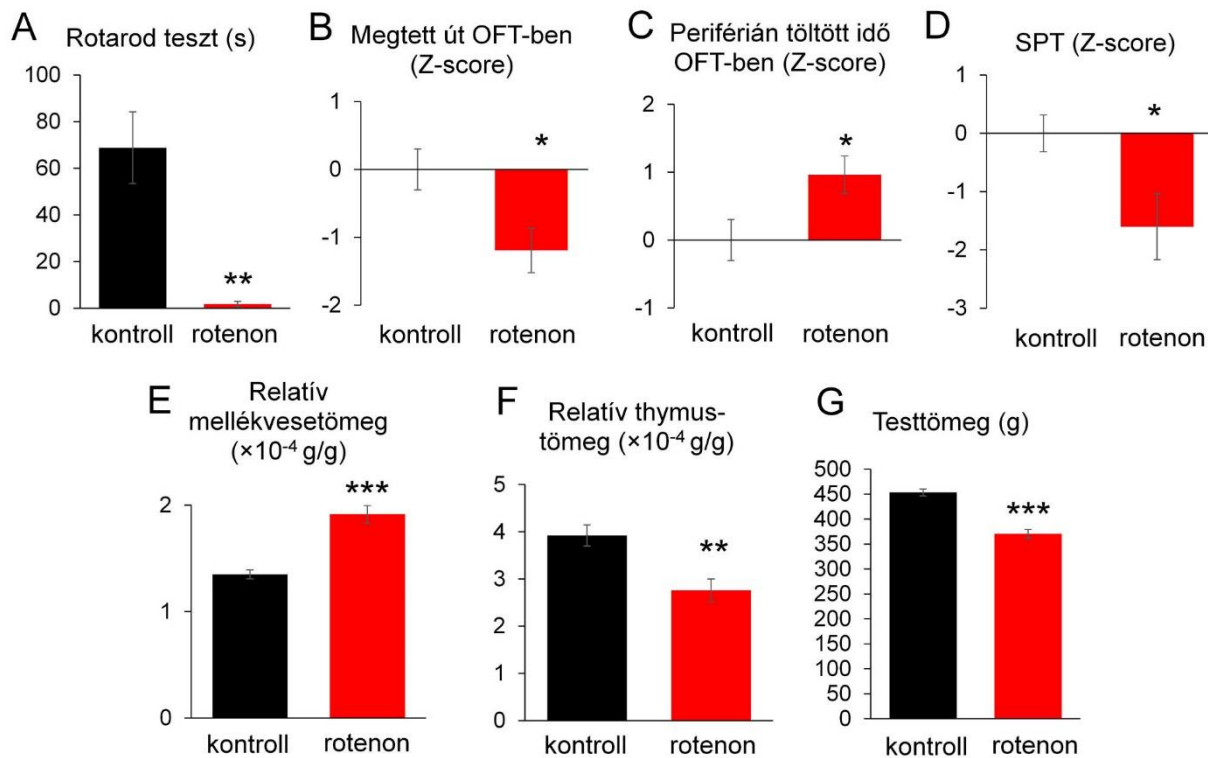
## 5.V. Az EWcp szerepe a Parkinson-kórhoz társuló hangulatzavarban

Ebben a projektben az volt az alapfeltételezésünk, hogy az EWcp területén Parkinson-kórban idegsejt károsodás zajlik, mely hozzájárulhat a betegség nem motoros tüneteként ismert depresszió és szorongás kialakulásához. Ennek vizsgálatára első lépésben egy szisztémás toxinkezelést, a rotenon modellt alkalmaztuk, patkányban. Második lépésben, a rotenon modellben találtakat lokális EWcp/UCN1 neuron ablációval erősítettük meg.

5.V.1. A szisztémás rotenon kezelés a Parkinson-kórhoz hasonló állapotot okoz patkányban, mely motoros és nem motoros tünetekben is megnyilvánul

A rotenon kezelés alatt, két nappal a terminálás előtt a rotarod teszt azt mutatta, hogy az állatok súlyos mozgászavarral küzdöttek, mivel gyakorlatilag képtelenek voltak az eszköz forgó tengelyén maradni ( $1,75 \pm 1,25s$ ), míg a kontroll állatok átlagosan  $68,83 \pm 15,37$  másodpercig tudták követni a gyorsuló forgást ( $p = 0,002$ ) (5.68.A ábra). OFT-ben a rotenon kezelt csoport lényegesen kevesebbet ( $p = 0,01$ ) mozgott az arénában, ami a hipokinéziára (5.68.B ábra), az OFT eszköz falai mellett eltöltött hosszabb idő a megnövekedett szorongási szintre enged következtetni (5.68.C ábra,  $p = 0,027$ ). A SPT-ben a rotenonnal kezelt állatok kisebb édes íz

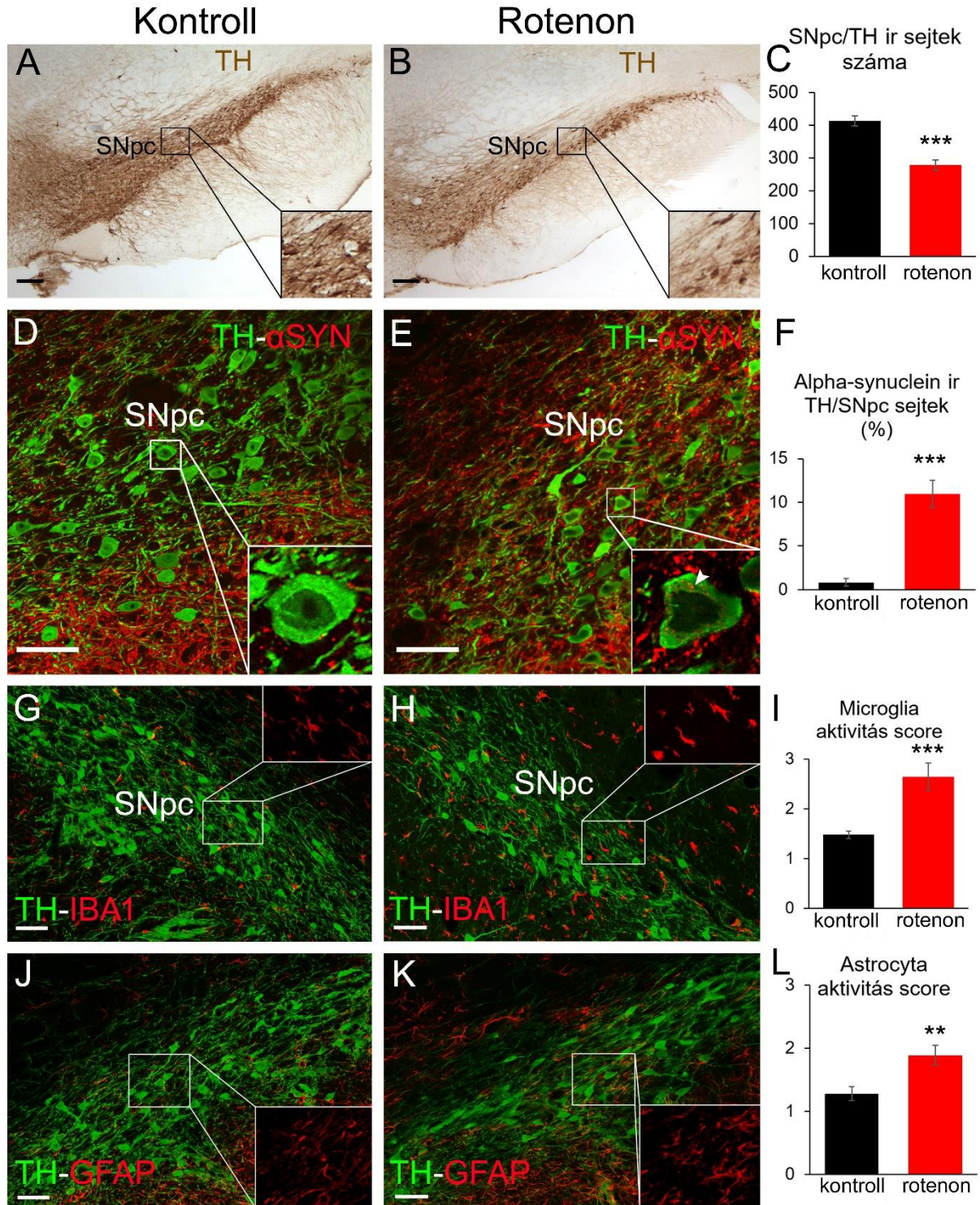
preferenciája megnövekedett anhedónia szintre utalt (5.68.D ábra,  $p=0,029$ ). A rotenon csoport egyedeinek testtömege elmaradt a kontrollcsoportétól (5.68.G ábra,  $p<10^{-5}$ ), a mellékveséjük relatív tömege 31%-kal nagyobb (5.68.E ábra,  $p<10^{-3}$ ), a relatív thymustömegük 26%-kal kisebb volt (5.68.F ábra,  $p=0,008$ ), mely a HPA tengely krónikus aktiválódására utal.



**5.68. ábra.** Viselkedési tesztek eredményei és a HPA tengely működésére utaló fizikai paraméterek a rotenon modellben. A rotarod tesztben (A), a rotenon kezelt állatok (piros oszlop) képtelenek voltak fennmaradni a forgó eszközön. Az open field teszt (OFT)-ben csökkent a mozgási aktivitás (B), és (C) az állatok több időt töltöttek a fal mellett. A cukorpreferencia teszt (SPT) során a rotenon kezelt csoport kevesebb cukros vizet fogyasztott (D). A rotenon kezelt állatok relatív mellékvesetömege megnőtt (E), thymustömege csökkent (F), a testtömeghez hasonlóan (G). (t próba, \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ )

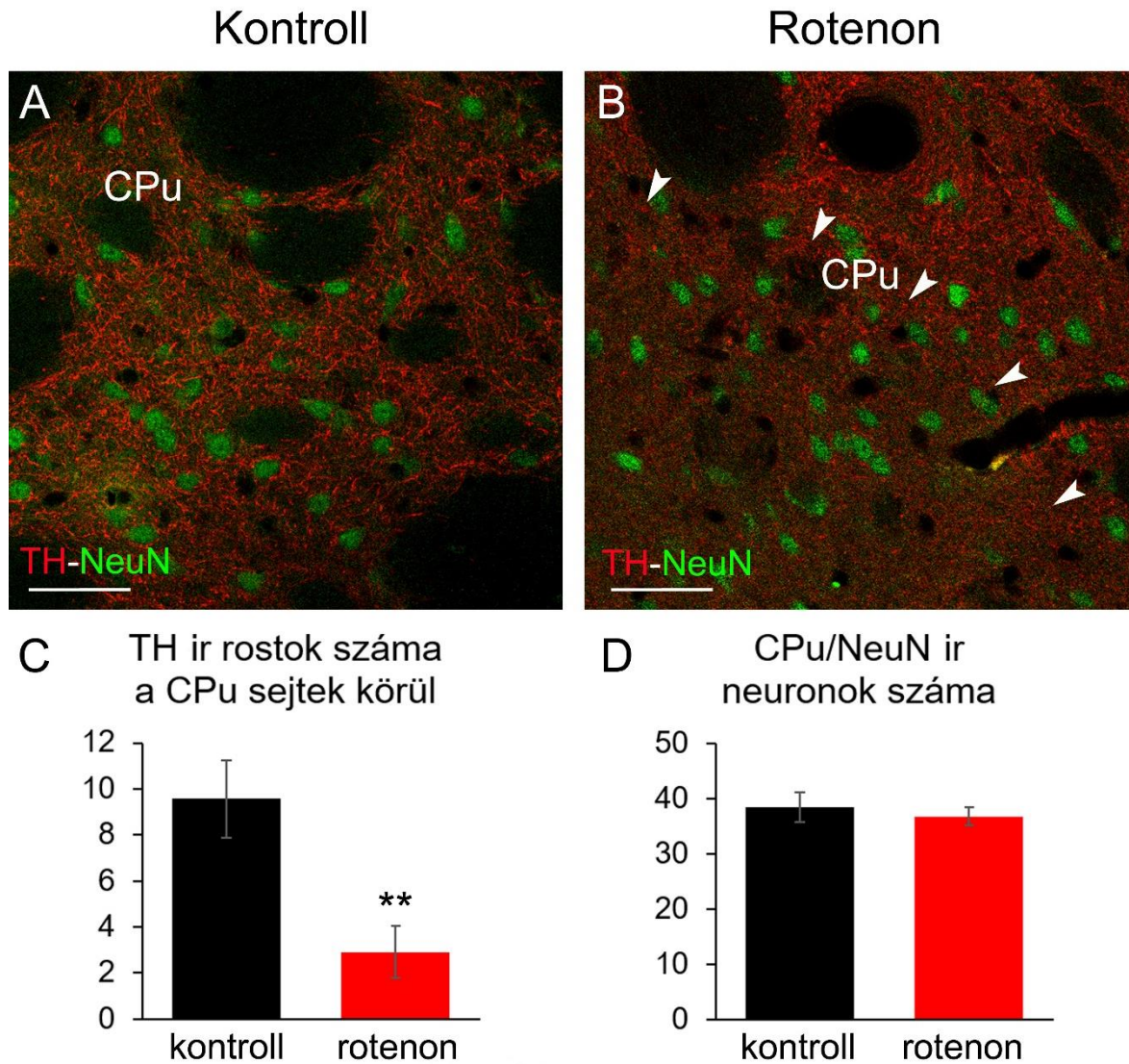
5.V.1.1. A szisztémás rotenon kezelés a SNpc dopaminerg sejtjei mellett az EWcp peptiderg neuronjait is károsítja

A rotenon kezelt egyedekben a SNpc metszetein megfigyelt 32,4%-os TH ir sejttségcsökkenés (5.69.A-C ábra,  $p<10^{-3}$ ) alátámasztja a modellben a neurodegenerációt. A rotenon kezelt állatok mintáiban a SNpc/TH sejtek 10,96% $\pm$ 1,58%-ában láttunk alpha-synuclein ir zárványt, míg a kontroll csoportban ilyen sejtet gyakorlatilag nem találtunk (5.69.D-F ábra;  $p<10^{-4}$ ). A neurodegenerációval együtt járó gliózist (Harrison és mtsai., 2019), mind a microglia (ionized calcium-binding adapter molecule 1, IBA1 jelölés; 5.69.G-I ábra;  $p<10^{-3}$ ) mind az astrocyta sejtek (glial fibrillary acidic protein, GFAP festés) esetében sikerült kimutatni (5.69.J-L ábra,  $p=0,008$ ) az SNpc-ban.



**5.69. ábra.** Szöveti elváltozások a substantia nigra pars compacta (SNpc) területén a rotenon modellben. Tirozin-hidroxiláz (TH) immunfestés diaminobenzidín (barna) kromogénnel a SNpc területén kontroll (A) és rotenon kezelt (B) állatból. Rotenon hatására (piros oszlopok) csökkent a TH immunreaktív (ir) sejtek száma (C). A TH (zöld) – alpha-synuclein ( $\alpha$ SYN) (vörös) kettős jelölés (D, E) mutatja, hogy a rotenon kezelés hatására  $\alpha$ SYN ir zárványok (nyílhegy, E) jelennek meg az SNpc TH ir sejteiben (F). A TH (zöld) – ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) (vörös) kettős jelölés (G, H), nagyított részletein a microglia aktiváció jelei láthatók (I). TH (zöld) – glial fibrillary acidic protein (GFAP) (vörös) kettős jelölés (J, K) az astrocyta aktivációt demonstrálja (L). \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; *t* ill. *U* próba. Lépték: A, B: 200 $\mu$ m, D-K: 50 $\mu$ m.

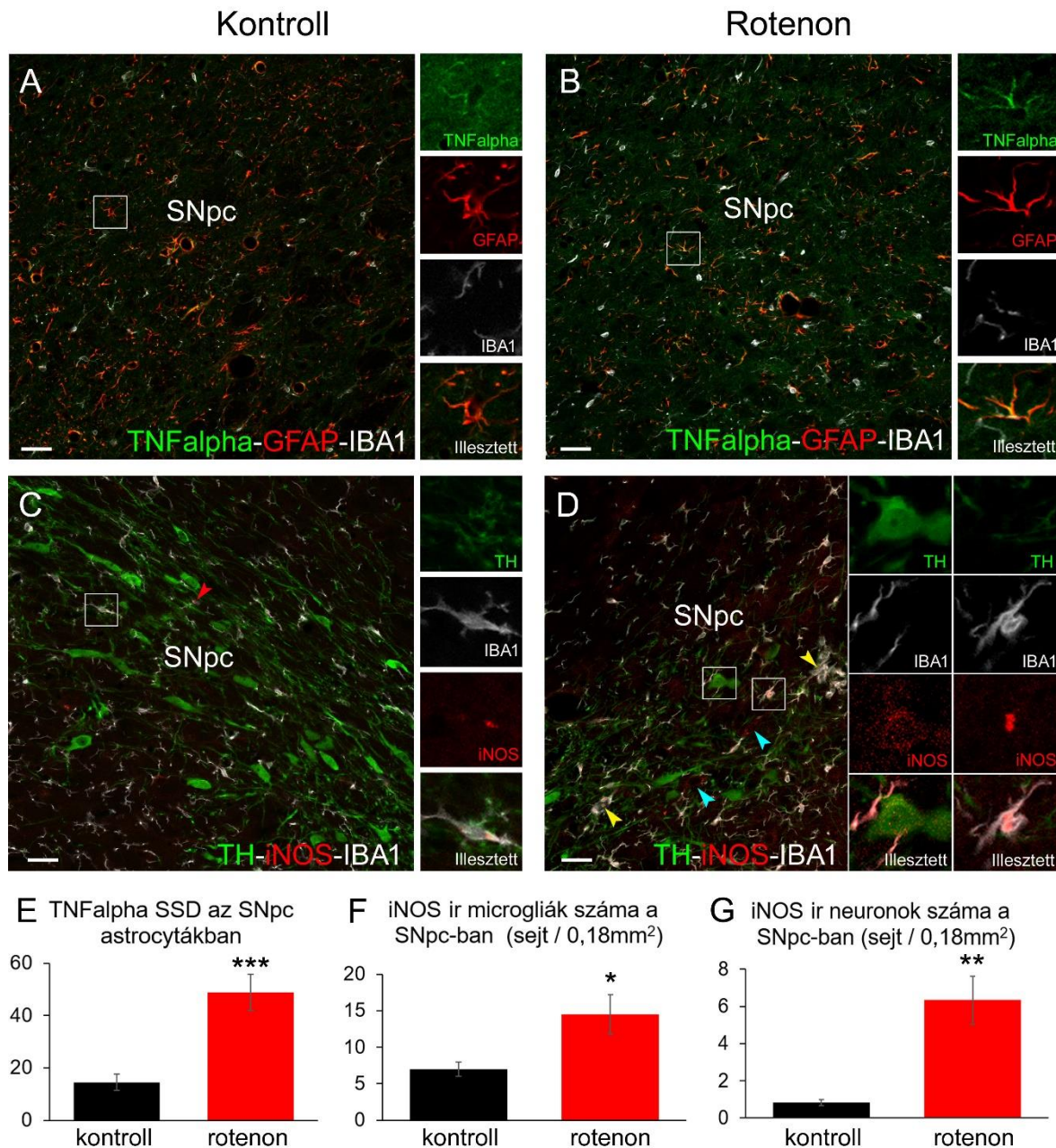
A striatum-ban, a SNpc projekciós területén a TH ir axonok száma diffúzan, 69%-kal csökkent a CPu sejtei körül (5.70.A-D ábra,  $p=0,003$ ), és a striatum TH ir rostjai esetenként fokálisan teljesen eltűntek rotenon kezelés hatására. A CPu területén nem történt neuronpusztulás (5.70. A, B, D ábra,  $p=0,57$ ).



**5.70. ábra.** Tirozin-hidroxiláz (TH) tartalmú rostok károsodása a striatum (CPu) területén. A kontrollhoz képest (A), rotenon kezelés hatására (B) a TH tartalmú rostok (piros) sűrűsége diffúzan csökken (C) a striatum területén. Esetenként, fokálisan, a TH rostok gyakorlatilag eltűntek (a fehér nyílhegyek egy ilyen terület határát jelölik). A NeuN immunreaktív (zöld) idegsejtek száma nem változott a CPu területén (D). \*\* $p<0,01$ , t teszt. Lépték: 50 $\mu$ m.

A modell megbízhatóságát alátámasztotta, hogy a SNpc astrocytáiban megnőtt az egyik fő proinflammatorikus citokin, a tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) szintje (5.71.A, B, E ábra,  $p<10^{-4}$ ). A microgliákban (5.71.C, D, F ábra,  $p=0,025$ ) és a neuronokban (5.71.C, D, G

ábra,  $p=0,0016$ ) megnövekedett az indukálható nitrogén monoxid szintáz (iNOS) immunjel, mely a fokozott szabadgyökképződésre utal.

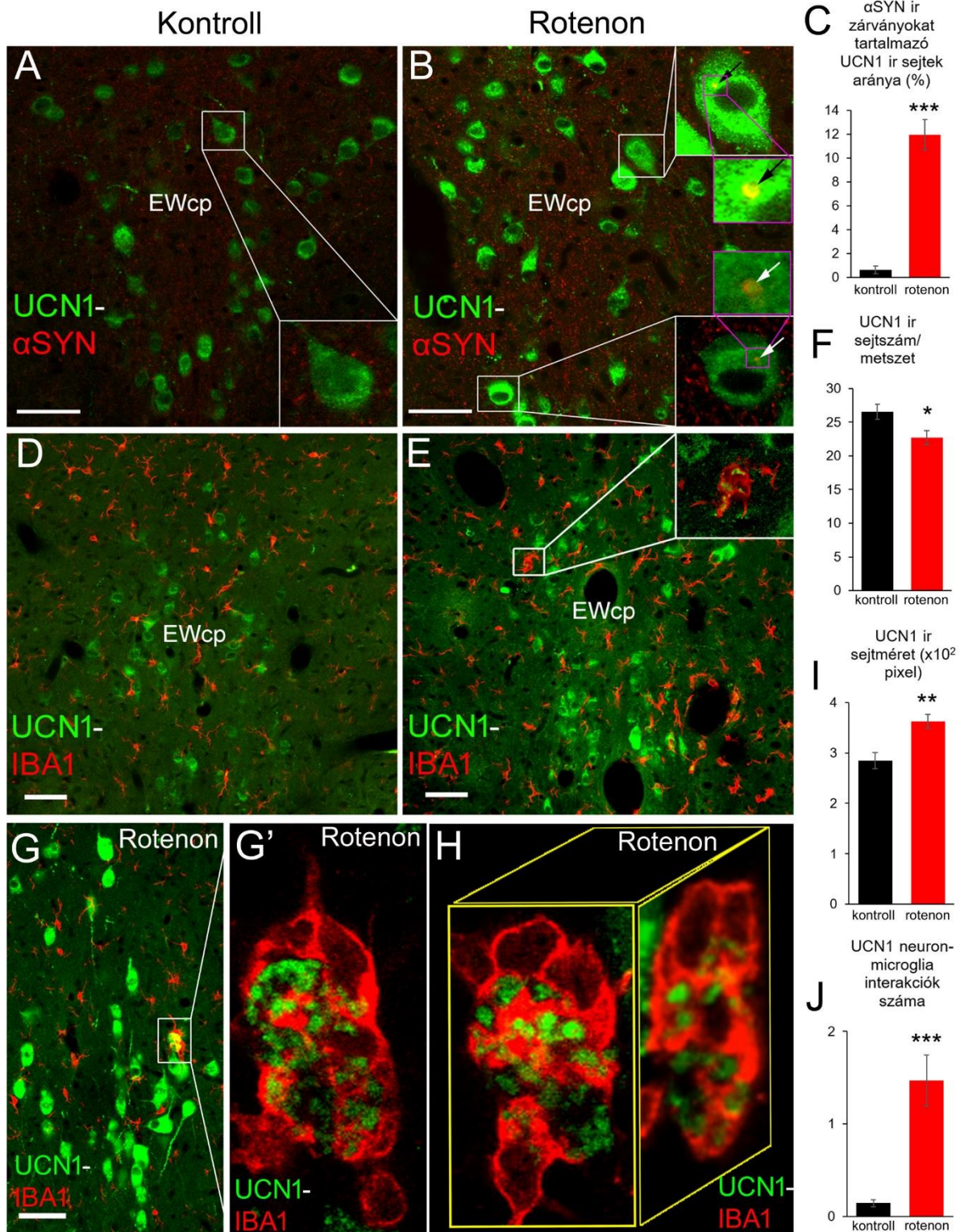


**5.71. ábra.** A gyulladási folyamat és oxidatív stressz a rotenon modellben. A kontroll csoporttal (A) összehasonlítva, rotenon hatására (B) a GFAP (vörös) immunreaktív (ir) astrocytákban a TNFalpha (zöld) nagyobb specifikus jelenítést (SSD) mutatott (E). Az ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) ir microgliákban (fehér) a TNFalpha nem volt kimutatható. Ezzel ellentétben, az oxidatív stressz markereként ismert indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) immunjel (vörös, C és D) erősebb volt a rotenon kezelt állatokban microgliákban (F), különösen a rotenon kezelt állatokban megfigyelt, sárga nyílhegygel jelölt microglia csoportosulások (D) esetében. A kontroll csoportban a microgliák csak elvéve mutattak iNOS pozitívást (piros nyíl és képzetét a C panelben). Rotenon kezelt állatokban gyenge iNOS immunjel volt megfigyelhető a substantia nigra pars compacta (SNpc) idegsejtjeiben is (kék nyilak és G), melyek esetenként TH pozitívak (zöld) voltak (ld. nagy nagyítású képzetét a fehér négyzetben látható sejtről a D panelben). \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ; t próba. Lépték: 50 $\mu$ m.



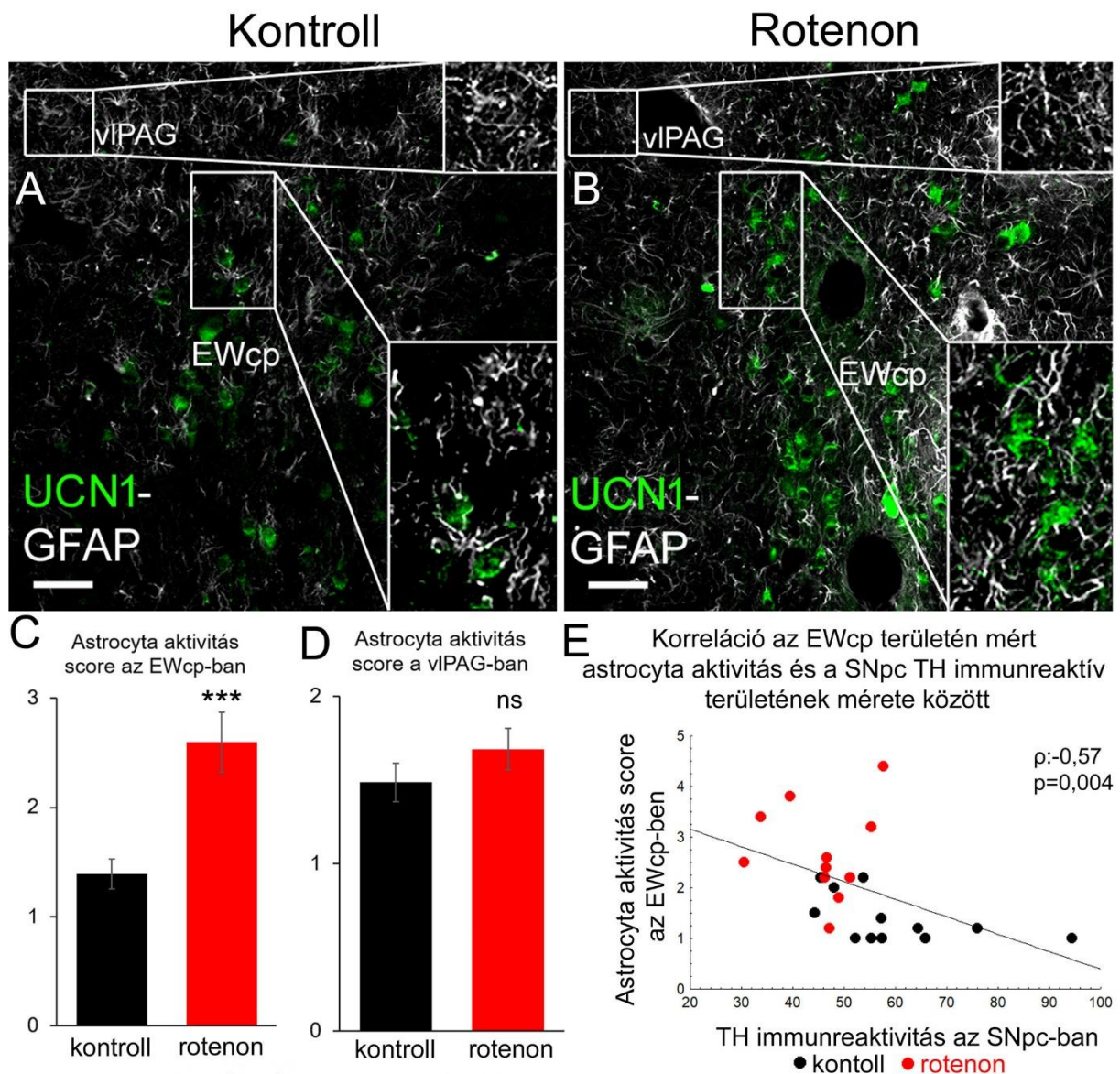
### 5.V.1.2. A EWcp a rotenon modellben

Az alaphipotézisünket, miszerint az EWcp/UCN1 neuronok károsodnak a Parkinson-kór modelljében, alátámasztotta, hogy a toxinnal kezelt állatokban az EWcp/UCN1 sejtszám hasonló arányban csökkent, mint azt az SNpc/TH neuronok esetében megfigyeltük (vö. 5.72.A, B, F ábrákat;  $p=0,019$ , az 5.69.A-C ábrával). A rotenon kezelt patkányok metszeteiben az UCN1 ir idegsejtek puffadtak voltak, (5.72.A, B, I ábra;  $p=0,0019$ ), egy részük citoplazmája szabálytalanná vált és a szétesés jeleit mutatták. A SNpc-hoz hasonlóan, rotenon kezelés után a EWcp/UCN1 neuronok  $11,94\pm 1,28\%$ -ában alpha-synuclein tartalmú zárványokat fedeztünk fel, melyet a kontroll csoportban csak elvétve ( $0,62\pm 0,33\%$ ,  $p<10^{-6}$ ) láttunk (5.72.A, B, C ábra). IBA1 jelöléssel megállapítottuk, hogy a pusztuló UCN1 ir neuronokat és a sejtörmelégeket reaktív microgliák takarították el. A kontroll csoporthoz képest közel 10-szer több, neuronokat megközelítő microglia nyúlványt számoltunk a toxinnal kezelt patkányoknál (5.72.D, E, G, G', H és J ábra;  $p<10^{-3}$ ). Míg a kontrollesoport metszeteinél fagocitáló microgliát gyakorlatilag nem láttunk, addig a rotenon kezelt csoportból készült metszeteken gyakran figyeltünk meg ilyen jelenséget (5.72.G, G', H ábra). Az 5.72.G', H ábrán látható sejtről nagy nagyítású Z stack felvételeket is készítettünk, és ezeket 3D videóanimációk formájában rekonstruáltuk. A videókat közleményünk (Ujvári és mtsai., 2022) kiegészítéseként publikáltuk, azok [online](#) megtekinthetők.



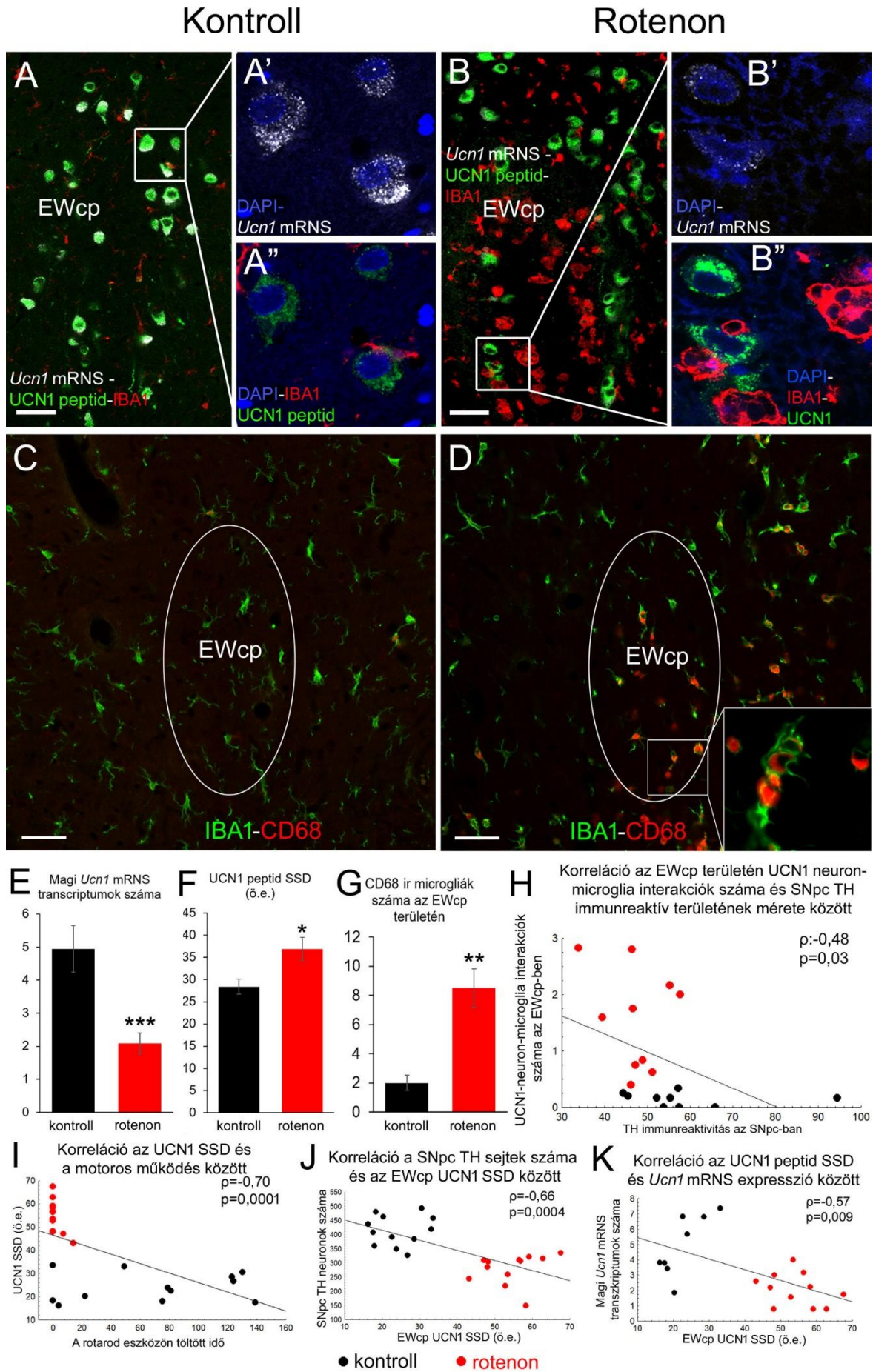
**5.72. ábra.** A centrális projekciójú Edinger-Westphal (EWcp) mag urocortin 1 (UCN1) tartalmú idegsejtjei károsodnak a Parkinson-kór rotenon modelljében. Az urocortin 1 (UCN1) (zöld) – alpha-synuclein ( $\alpha$ SYN) (piros) jelölés (A, B). Rotenon kezelés hatására a neuronokban  $\alpha$ SYN immunreaktív zárványok (nyilak, B) jelennek meg (C), az UCN1 ir sejtek száma csökkent (F), a sejtek morfológiája puffadt (B, I) és a pusztuló UCN1 neuronokat (E, G, G'), IBA1 ir microgliák (vörös) kebelezik be. A H ábra a G és G' paneleken bemutatott pusztuló UCN1 neuront jeleníti meg nagy nagyítású Z-stack fotókból rekonstruált kétirányú virtuális metszeten. Hasonló interakciókat gyakorlatilag csak a rotenon kezelt állatok mintáiban láttunk (J). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; t próba. Lépték: 50 $\mu$ m

Az EWcp területén a neurodegenerációt astrocyta aktivitásnövekedés is kísérte (5.73.A-C ábra;  $U(22)=-14,5$ ,  $p<10^{-3}$ ). A jelenség lokálisnak tűnt, mivel a szomszédos ventrolaterális periaqueductalis szürkeállományban nem találtunk fokozott astrocytaaktivitást (5.73.A, B, D ábra;  $U(22)=52,00$ ;  $p=0,24$ ). Szignifikáns inverz korrelációt találtunk a SNpc/TH ir terület mérete és az EWcp astrocyta (5.73.E ábra,  $\rho=-0,57$ ;  $p=0,004$ ) illetve microglia (5.74 H ábra,  $\rho=-0,48$ ;  $p=0,03$ ) aktivitása között.



**5.73. ábra.** A centrális projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp) területén az astrocyták is aktiválódnak rotenon kezelés hatására. Az urocortin I (UCN1, zöld) tartalmú idegsejtek környezetében a glial fibrillary acidic protein (GFAP, fehér) immunreaktív astrocyták rotenon kezelés után aktívabb morfológiát mutatnak (B, C). Az UCN1 neuronoktól távolabb, a ventrolaterális periaqueductalis szürkeállomány (vlPAG) területén nem látunk jelentős astroglia aktivitásnövekedést (B, D) a kontrollal (A) összehasonlítva. Az astrocyták aktivitása és a substantia nigra (SNpc) tirozin-hidroxiláz (TH) immunreaktív sejtjeinek pusztulása közötti korrelációt az E ábra mutatja. (Vörös szimbólumok a rotenon, a fekete a kontroll csoport egyedeire utalnak.) ns: nem szignifikáns, \*\*\* $p<0,001$ , U teszt. Lépték: 50 $\mu$ m.

Az UCN1 peptid SSD 23%-os emelkedést mutatott rotenon kezelés hatására (5.74.A, A'', B, B'', F ábra;  $t(22)=-11,11$ ;  $p=0,013$ ). Az immunjelölést RNAscope technikával kombinálva, az EWcp neuronok perikaryon-jában összefolyóan megjelenő citoplazmatikus *Ucn1* mRNS jelet láttunk, mely inhomogén módon, csoportokba rendeződve helyezkedett el, főképp a rotenon kezelt állatokban. Ez a klaszterszerű, egyenlőtlen mRNS eloszlás megnehezítette a citoplazmatikus mRNS partikulumok számolását. Ezzel szemben, a karyoplazmában különálló pontokként jelölődtek az *Ucn1* mRNS-ek (5.74.A' és B' ábra). Az intranuclearis *Ucn1* mRNS transzkriptumok számában 57,8%-os csökkenést találtunk rotenon kezelés hatására (5.74. A', A'', B', B'', E ábra), mely erős negatív korrelációban állt a celluláris UCN1 peptid SSD-ával (5.74.K ábra;  $\rho=-0,57$ ;  $p=0,009$ ). Ugyanezek a metszeteken IBA1 jelölést is végeztünk, és a nagyon alacsony *Ucn1* mRNS tartalmú EWcp neuronok közvetlen közelében fagocitáló morfológiát mutató reaktív microgliákat találtunk (5.74.B'' ábra). A CD68 jelölés megerősítette, hogy a microgliák aktív fagocitózist végeztek (5.74.C, D, G ábra;  $t(10)=-4,53$ ;  $p=0,001$ ). A korrelációvizsgálatok is alátámasztották az EWcp PD-ban betöltött szerepét, mivel a EWcp/UCN1 tartalom korrelált mind a rotarod teszt eredményével ( $\rho=-0,70$ ;  $p<10^{-3}$ ), mind a SNpc/TH sejtszámmal (5.74.H, I, J ábra;  $\rho=-0,66$ ;  $p=0,004$ ).

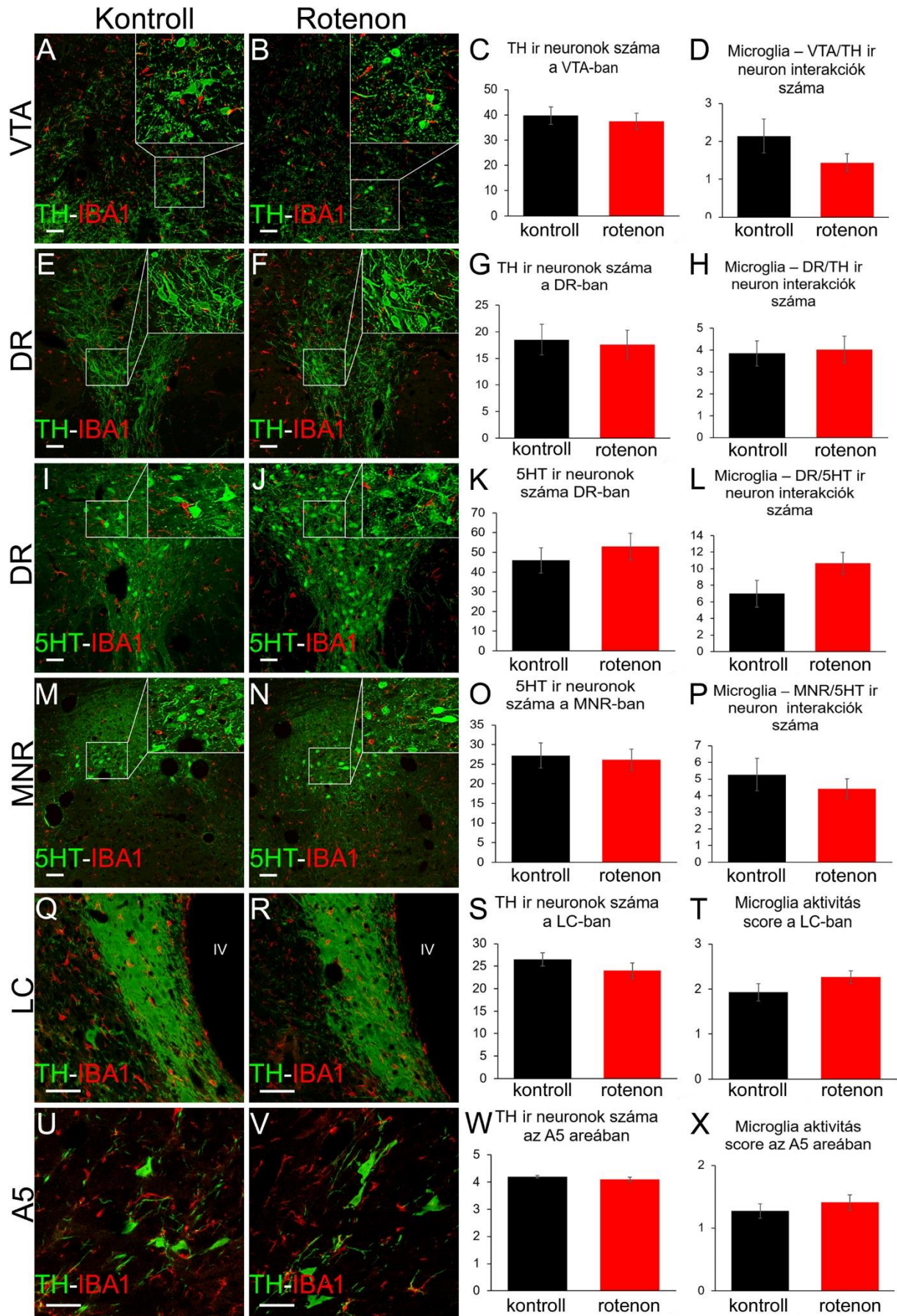


**5.74. ábra.** (181. oldal) A centrális projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp) területén az urocortin 1 (UCN1) tartalmú idegsejtek funkcionális károsodást mutatnak rotenon kezelést követően. RNAscope in situ hibridizáció (az *Ucn1* mRNS fehér az **A** és **B** ábrán), valamint kettős immunfluoreszcens jelölés: (UCN1 peptid, zöld) és ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) (piros az **A** és **B** panelben). Rotenon kezelés hatására az *Ucn1* mRNS mennyisége csökkent a sejtekben (vö. **A'** és **B'**-t illetve **E**), míg a bennük tárolt UCN1 peptid mennyisége nőtt (vö. **A''** és **B''** és **F**). Az alacsony *Ucn1* mRNS tartalmú neuronokat reaktív morfológiájú microglia sejtek (**B''**) közelítik meg. Az IBA1 ir microgliák (zöld **C** és **D** ábrán) CD68 (vörös a **C** és **D** ábrán) markert is tartalmaznak, mely a sejtek reaktív voltát bizonyítja (**D** és **H**). A microglia-UCN1 neuron interakciók száma és a SNpc és tirozin-hidroxiláz tartalma közötti korrelációt a **H** panel mutatja. A Parkinson-kór szerű állapot és az UCN1 neuronok károsodása közötti kapcsolatot mutatja az **I** és **J** panel is. Az UCN1 neuronok peptid és *Ucn1* mRNS tartalma között negatív korreláció állt fenn (**K**). (Vörös szimbólumok a rotenon, a fekete a kontroll csoport egyedeire utalnak.) DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol magfestés (kék). ö.e.: önkényes egység. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ , *t* tesztben. Lépték: 50 $\mu$ m.

### 5.V.1.3. A hangulatszabályozásban résztvevő egyéb agyterületek a rotenon modellben

A rotenon kezelés sejtkárosító hatása, tekintettel annak szisztémás megoszlására, nem korlátozódott feltétlenül a nigrostriatalis rendszerre és az EWcp-re. Ezért, a hangulatszabályozásban résztvevő néhány egyéb régiót is tanulmányoztunk, hogy felderítsük, azok érintettsége is hozzájárulhat-e a megváltozott hangulati állapothoz.

Szövetani vizsgálataink során azt találtuk, hogy sem a VTA (5.75.A-C ábra;  $t(22)=0,48$ ;  $p=0,63$ ), sem pedig a DR dopaminerg sejtjei (5.75.E-G ábra;  $t(16)=0,22$ ;  $p=0,82$ ) nem károsodtak szignifikáns mértékben. Ezt támasztja alá a TH ir sejtek és a microgliák közötti interakciók változatlan száma is a VTA (5.75.A, B, D ábra) és a DR (5.75.E, F, H ábra) területén. Ehhez hasonlóan, sem a DR (5.75. ábra I-K;  $t(15)=-0,73$ ;  $p=0,47$ ), sem a MNR (5.75. M-O ábra;  $t(15)=0,26$ ;  $p=0,79$ ) 5HT ir sejtjei nem pusztultak, és nem kerültek gyakrabban interakcióba microgliákkal rotenon kezelés után (DR: 5.75.I, J, L ábra;  $t(15)=-1,76$ ;  $p=0,099$ . MNR: 5.75.M, N, P; ábra  $t(15)=0,78$ ;  $p=0,44$ ). A noradrenerg agytörzsi magok vizsgálata során sem a LC (5.75. ábra Q-S;  $t(18)=0,26$ ;  $p=0,79$ ), sem az A5 area (5.75. ábra U-W,  $t(18)=0,26$ ;  $p=0,79$ ) nem mutatott sejtszámváltozást a rotenon modellben, ahogy a microglia aktiváció sem volt szignifikáns mértékű e területeken (LC: 5.75.Q, R, T ábra,  $U(19)=35,00$ ,  $p=0,45$ . A5 sejtcsoport: 5.75.U, V, X. ábra;  $U(18)=24,50$ ;  $p=0,16$ ).



**5.75. ábra.** (183. oldal) A dopaminerg, szerotoninerg, és noradrenerg sejtek nem károsodnak a ventrális tegmentális área (VTA), a nucleus raphe dorsalis (DR) és medianus (MNR), a locus ceruleus (LC) és az A5 área területén a Parkinson-kór rotenon modelljében. A tirozin-hidroxiláz (TH) (zöld) ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) (piros) immunjelölés szerint a VTA (A, B), és a DR (E, F,) területén nem történt dopaminerg sejtpusztulás (C és G), és a microglia-TH neuron interakciók száma sem változott (D és H). Szerotonin (5HT) (zöld) és IBA1 (piros) immunjelölés mutatja, hogy sem a DR (I, J), sem a MNR (M, N) területén nem lép fel szerotoninerg sejtpusztulás a rotenon kezelt csoportban (K és O). Ennek megfelelően, a microglia-5HT neuron interakciók száma sem változott a DR (L) és MNR (P) területén. A TH (zöld) és IBA1 (piros) jelölés szerint a LC (Q, R), és A5 area (U, V) noradrenerg sejtjei megkíméltek voltak a rotenon kezelt csoportban (S ill. W). Ennek megfelelően, a microglia-TH neuron interakciók száma sem változott a LC (T) és az A5 área (X) területén. IV: ventriculus quartus. Lépték: 50 $\mu$ m.

### 5.V.2. Az EWcp/UCN1 neuron abláció mozgászavar nélkül váltja ki a hangulatzavart

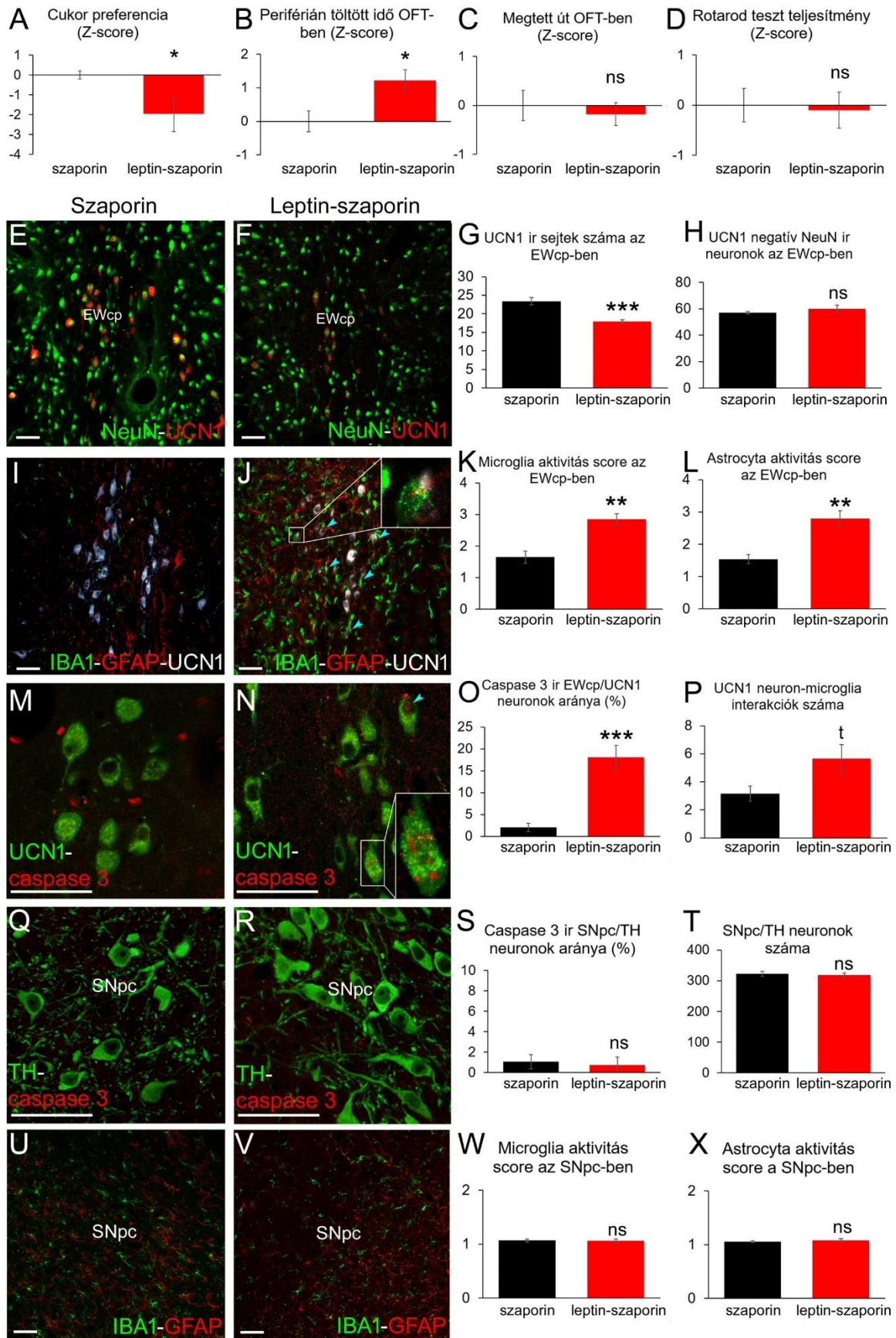
A rotenon modellben megfigyelt hangulatzavarhoz hasonló állapotot idézett elő a leptinnel konjugált szaporinnal végzett szelektív EWcp/UCN1 neuronirtás. Az abláción átesett patkányok a SPT-ben megnövekedett anhedónia szintet mutattak (5.76.A ábra;  $t(16)=2,13$ ;  $p=0,048$ ), és OFT-ben több időt töltöttek a periférián, ami szorongó állapotra enged következtetni (5.76.B ábra;  $t(16)=-2,70$ ;  $p=0,015$ ). Kiemelendő, hogy a csoportok között a megtett távolságban nem találtunk különbséget (5.76.C ábra;  $t(16)=0,45$ ;  $p=0,65$ ), és RPT-ben sem láttunk motoros zavart (5.76.D. ábra;  $t(16)=-0,20$ ;  $p=0,84$ ).

A EWcp-ban a leptin-szaporin kezelése hatására az UCN1 sejtek száma 24,5%-kal csökkent (5.76.E-G ábra;  $t(16)=5,56$ ;  $p<10^{-3}$ ). A nem UCN1 pozitív neuronok száma nem változott, utalva a neuronirtás szelektivitására (5.76.E, F, H ábra;  $t(16)=-1,15$ ;  $p=0,26$ ). A leptin-szaporin kezelés után, az IBA1 jelölt microgliák (5.76.I-K ábra;  $U(12)=1,00$ ;  $p=0,006$ ), és a GFAP ir astrocyták (5.76.I, J, L ábra;  $U(12)=0,00$ ;  $p=0,004$ ) aktivitása is magasabb volt, mint a kontroll, szaporinnal kezelt állatok esetében. Ezzel összhangban, a microglia-UCN1 neuron interakciók száma is emelkedettnek tűnt a szelektív neuronirtást követően, azonban e változás éppen alatta maradt a szignifikanciaszintnek (5.76.I, J, P ábra;  $t(10)=-2,21$ ;  $p=0,051$ ). A leptin-konjugált szaporin kezelt csoportban az UCN1 sejtek caspase 3 aktivitása magasabb volt (5.76.M, N, O ábra;  $t(12)=-5,52$ ;  $p<10^{-3}$ ), mely aktív apoptotikus folyamatokra utal.

Mivel az állatok mozgáskészsége nem károsodott és a SNpc sejtek csak elvéve hordoznak leptin receptort, itt nem vártunk károsodást: a dopaminerg sejtszám (5.76. Q, R, T ábra;  $t(10)=0,41$ ;  $p=0,68$ ), caspase 3 aktivitás (5.76.Q-S ábra;  $t(10)=0,79$ ;  $p=0,43$ ) változatlan volt,



és nem láttunk sem micro- (5.76.U-W ábra;  $U(12)=13.00$ ;  $p=0.42$ ) sem astrogliosis-t (5.76.U, V, X ábra;  $U(12)=14.50$ ;  $p=0.57$ ) a SNpc-ban.



**5.76. ábra.** (185. oldal) A szelektív UCN1 neuron abláció hatásai. A leptin-szaporin által kiváltott neuron abláció hatására a cukorpreferenciára (A) és az open field tesztben (OFT)-ben mérhető szorongási szintre (B). A hangulati eltéréseket nem kísérte csökkent lokomotoros aktivitás OFT-ben (C) és az állatok mozgáskoordinációja is megtartott volt a rotarod tesztben (D). A viselkedési eredményeket Z score formájában adtuk meg. Az UCN1 neuronok (vörös) száma csökkent leptin-szaporin kezelés hatására (E, F, G), míg az UCN1 immunreaktivitást (ir) nem mutató, de NeuN (zöld, E, F) immunpozitív idegsejtek száma változatlan maradt, mely arra utal, hogy az abláció szelektív volt. (H) Három immunfluoreszcens jelölés (I, J) is mutatja, hogy az UCN1 neuronok (fehér) száma csökken leptin-szaporin kezelés hatására és a sejtek környezetében reaktív ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) ir microgliákat (zöld, I és J), valamint glial fibrillary acidic protein (GFAP) ir, aktív astrocytákat figyelhetünk meg (vörös I és J panelben). Ezt az aktivitási score értékek is alátámasztották (K, L). Az UCN1 neuronok és a microglia sejtek közötti interakciók (kék nyílhegyek J-ben) száma is tendenciózusan ( $t, p=0,051$ ) emelkedett (P). A EWcp UCN1 immunreaktivitást mutató sejteiben (zöld, M, és N) leptin-szaporin kezelés után gyakrabban (O) láttunk caspase 3 immunreaktivitást (vörös, M és N). A substantia nigra pars compacta (SNpc) területén a tirozín-hidroxiláz (TH) ir (zöld, Q, R) dopaminerg sejtekben nem találtunk caspase 3 immunreaktivitást (vörös, Q, R és S), és a SNpc/TH sejtek száma a EWcp leptin-szaporin injekciója után változatlan maradt (T). A SNpc/TH sejtek környezetében sem reaktív morfológiájú IBA1 ir (zöld, U, V, és W) microgliákat, sem aktív astrocytákat (GFAP, vörös, U, V és X) nem találtunk, amit a gliaktivitás-értékek is illusztrálnak (W, X). ns: nem szignifikáns \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ ,  $t$  ill.  $U$  teszt. Lépték:  $50\mu\text{m}$ .

## 6. Diskusszió

Az áttekinthetőség érdekében, a Célkitűzések és hipotézisek szakaszban meghatározott öt fő témakör szerinti felosztást megtartva, és Eredményeink leírásához hasonlóan, a megbeszélés során is követem a már megismert ötös felosztást. Az első fő témakör a génmódosított egértörzsek stresszadaptációjának vizsgálatára irányult. A második fő projekt célja a depresszió három találat elméletének egérmódeljének megalkotása és validálására volt. A harmadik kutatási terület a stresszadaptáció életkorfüggő változásainak leírását célozta. A negyedik nagy projekt az EWcp energiaháztartás szabályozásban betöltött szerepéről szólt. Az ötödik fő témakör a Parkinson-kór nem motoros tünetei és az EWcp közötti kapcsolat feltárására irányult.

### 6.I. Génmódosított egértörzsek stresszadaptációjának vizsgálata

Ebben a projektben a PACAP és TRPA1 KO egértörzseket teszteltük akut és krónikus stressz modellekben. Első lépésben a PACAP KO egér viselkedését és akut stresszadaptációját vizsgáltuk.

6.I.1. A PACAP KO egerek depressziószerű tüneteket, alacsonyabb szorongási szintet és csökkent FOS aktivációt mutatnak akut stresszben

A PACAP KO egerekben megfigyelt depressziószerű viselkedés FST-ben összhangban van korábbi munkák eredményeivel, ahol antidepresszánskezeléssel, illetve PACAP kezeléssel sikerült a depressziószerű állapotot megszüntetni (Hashimoto és mtsai., 2009). A PACAP KO egereket MBT és LDT paradigmákban mi vizsgáltuk először (Gaszner és mtsai., 2012), és a korábbi, egyéb szorongási tesztekben látottakkal (Hashimoto és mtsai., 2001) egybehangzóan e két tesztben a KO egerek egyértelműen csökkent szorongási szintjét láttuk. Az OFT-ben látott, PACAP KO állatokra jellemző nagyobb lokomotoros aktivitás és az ugráló viselkedés szintén egybevág a korábbi megfigyelésekkel (Hashimoto és mtsai., 2009). A korábbi adatokkal (Hashimoto és mtsai., 2009) ellentétében, az OFT-ben mi fokozott szorongást láttunk. Ennek magyarázata a mérési módszerek közti eltérésben és a KO állatok fal melletti fokozott explorációjában és magasabb lokomotoros aktivitásában keresendő.

A FST-ben tapasztalt depressziószerű viselkedés, és a csökkent szorongás együttes előfordulása ellentmondásosnak tűnhet. Habár a depresszió és a szorongás együtt jelenhetnek meg (McEvoy és mtsai., 2011), neurobiológiai hátterük eltérő lehet. A BNSTdl/CRH mesterséges overexpressziója például depressziószerű fenotípust idéz elő, anélkül hogy a szorongást befolyásolná, míg a CeA/CRH túltermeltetése csökkenti a stresszindukált szorongást, de a

depressziószerű viselkedésre nincs hatással (Regev és mtsai., 2011). Mivel e magok CRH neuronjai PACAP tartalmú beidegzést is kapnak (Hannibal, 2002, Kozicz és mtsai., 1997), feltételezhető, hogy a PACAP a CRH neuronokon keresztül agyterületspecifikus módon modulálja a viselkedést.

A vad típusú egerekben a FST minden vizsgált agyterületen jelentős FOS immunreaktivitás-emelkedést okozott az irodalmi adatokkal összhangban (Stone és mtsai., 2007, Kovács és mtsai., 1998, Kovács, 1998, 2008). Legfontosabb megfigyelésünk ebben a projektben az volt, hogy a FST kiváltotta FOS aktiváció a PACAP KO egerekben 8 területen (BNSTov, BNSTdl, BNSTv, vLS, EWcp, DR, dPAG, IPAG) elmaradt a vad csoportétól, de négy esetében (CeA, MeA, BNSTdm, dLS) nem.

Az F4. táblázatban összehasonlítottuk a stressz-genotípus interakció hatásának nagyságát a FOS megjelenésére. A legerősebb hatást a DR, a EWcp és a IPAG területén tapasztaltuk a vizsgált agyterületek közül. Ez különösen annak fényében érdekes megfigyelés, hogy mindhárom terület PACAP ir rostok beidegzése alatt áll (Hannibal, 2002) és a PAC1R is kifejeződik bennük (Vaudry és mtsai., 2009). Az általunk látott viselkedésbeli eltérésekhez a DR/5HT neuronok (Bouwknicht és mtsai., 2007, Savitz és mtsai., 2009, Lowry és mtsai., 2008), és az EWcp/UCN1 idegsejtek is hozzájárulhatnak (Kozicz és mtsai., 2008a,b, Kozicz 2010, Neufeld-Cohen és mtsai., 2010a,b). A leszálló antinociceptív rendszerekhez tartozik a IPAG (Heinricher és mtsai., 2009). Fájdalom modellekben korábban kimutattuk, hogy a PAG FOS válasza a PACAP gén mutációja esetén megváltozik. A IPAG területén a kontroll állatoknál megfigyelt FOS aktivitáskülönbség magyarázhatja a PACAP KO egérre jellemző károsodott nocifenzív viselkedést (Sándor és mtsai., 2010).

Más magokban (BNSTov, BNSTdl, BNSTv, BLA, PVNm, PVNp.) a stressz-genotípus interakció hatása kevésbé volt markáns, mégis szignifikánsnak bizonyult (F4. táblázat). A FST által kiváltott FOS reakció ezekben a magokban is kisebb mértékű volt KO egerekben, ami a PACAP fontos szerepére utal e magok stresszaktivációjában, és a hangulatzavarok kialakulásában.

A BNSTov és a BNSTdl egyaránt erős PACAPerg beidegzést kap (Köves és mtsai., 1994, Kozicz és mtsai., 1997). Lokális PACAP kezelés a BNST-ben szorongást vált ki, míg a PAC1R hiánya ellentétes hatású (Otto és mtsai., 2001). A szűkebb értelemben vett amygdala szerepe jól ismert a stresszadaptációban (McEwen és Gianaros, 2010). Annak ellenére, hogy az amygdala erős PACAP tartalmú beidegzés alatt áll (Hannibal, 2002), a CeA és MeA területén

a PACAP hiány FOS-ra kifejtett hatását nem találtuk szignifikánsnak. Csak a BLA területén volt a FOS jel kismértékben alacsonyabb KO állatokban. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a CeA és a MeA nem játszhat döntő szerepet a megfigyelt viselkedésbeli és funkcionálismorfológiai változásokban a PACAP mutáns egerekben.

A PVN/CRH neuronjai PACAP injekció hatására FOS aktivációt mutatnak (Agarwal és mtsai., 2005), mely antagonistával kivédhető (Grinevich és mtsai., 1997). A FST hatására fellépő FOS aktivációt a PVN területén az irodalmi adatok is alátámasztják patkányban (Badowska-Szalewska és mtsai., 2009) és egérben is (Stone és mtsai., 2011). Stroth és Eiden (2010) valamint Tsukiyama és mtsai. (2011) szerint a PACAP deficiens egereknél FST-et követően kisebb a PVN/FOS aktiváció és a CORT válasz, mely összhangban van saját eredményeinkkel.

Az EWcp PACAP tartalmú rostok beidegzése alatt áll (Hannibal, 2002) és ismert, hogy az UCN1 neuronok PACAP mRNS-t is kifejeznek (Topilko és mtsai., 2022, Fehér és mtsai., 2023). PACAP hiányában e sejtekben csökken a FOS tartalom, ezért a mag stresszválaszkészségének csökkenése hozzájárulhat az adaptációzavarhoz patkányban (Gaszner és mtsai., 2009b) és egértörzsekben (Ryabinin és mtsai., 1999).

Adataink értékelésekor figyelembe kell vennünk annak lehetőségét, hogy az egyedfejlődés során esetlegesen fellépnek a PACAP géntermék hiányát kompenzáló mechanizmusok. Bár Girard és mtsai. (2006) nem találtak a PACAP KO egerekben legkézenfekvőbben feltételezhető receptorális, vagy ligand szintű kompenzációs mechanizmusokat, nem zárható ki, hogy eddig nem vizsgált génműködésváltozások ellensúlyozhatják a PACAP hiányát. Így, ki kell mondanunk, hogy a megfigyelt eltérések részben, vagy esetleg teljes egészében e kompenzációs mechanizmusok következményei is lehetnek és lehetséges, hogy nem közvetlenül a PACAP hiány eredményezi őket.

Eredményeink alátámasztják, hogy a PACAP-nak moduláló szerepe lehet a stresszadaptáció szabályozásában, mely csökkent szorongási szinthez vezet a peptid hiányában. A jelenség háttérében eredményeink szerint a PACAP több agyterületet érintő komplex hatása áll. Mivel a hangulatzavarok szempontjából a krónikus stresszhatás jelentősége nagyobb, a következő lépésben a PACAP KO egértörzset a CVMS modellben is megvizsgáltuk.

## 6.1.2. A PACAP hiánya agyterületfüggő módon befolyásolja a FOSB/ $\Delta$ FOSB megjelenését a CVMS modellben

Legjobb tudomásunk szerint a PACAP KO egereket mi vizsgáltuk először a CVMS modellben (Willner, 2005) úgy, hogy antidepresszáns kezelt csoportokat is bevontunk. A CVMS hatásosságát a csökkent testtömeggyarapodás és a mellékvesetömeg növekedése támasztotta alá WT állatokban, mely változások elmaradtak a KO egereknél, utalva a HPA tengely csökkent aktivitására PACAP hiányában. Ez egybevág saját megfigyeléseinkkel és mások hasonló modellekben elért eredményeivel is (Storth és Eiden, 2010, Tsukiyama és mtsai., 2011, Mustafa és mtsai., 2015). A CVMS hatékonyságát mutatta a FST-ben megemelkedett immobilitási idő WT egerekben. C57BL6/N alapon létrehozott (Lehmann és mtsai., 2013) illetve C57BL/6J x 129SvEv hibrid alapon tenyésztett PACAP KO egerekben (Hattori és mtsai., 2012) azt látták, hogy a PACAP génjének deléciója csökkenti a depresszió szintet. A mi CD1 alapon tenyésztett PACAP KO egereinkben azt figyeltük meg, hogy az enyhe stressz paradox módon csökkenti a depressziószerű viselkedést. Az immobilitási idő az imipramin kezelt kontroll KO egerek szintjére csökkent, ami megfelel a Lehmann és mtsai. (2013) által leírtaknak. Megállapíthatjuk tehát, hogy ezek az eredményeink nem támasztják alá a CD1 törzsbe tartozó PACAP KO állatok depressziószerű fenotípusát, de az állatok csökkent válaszkészséget mutatnak a CVMS expozícióra. Mindezt, az egértörzs további vizsgálatát terveztük a három találat elmélet alapján, komplex depresszió modellben.

A FOSB/ $\Delta$ FOSB térképezés széles körben használt eszköz az idesejtek aktivitásának értékelésére (Nestler és mtsai., 1999, Perrotti és mtsai., 2004, Sterrenburg és mtsai., 2011, Vialou és mtsai., 2015), és ebben a kísérletben is elvégeztük a neuronok FOSB/ $\Delta$ FOSB aktivitás mintázatának tanulmányozását. Az általunk használt FOSB antitest a teljes hosszúságú FOSB és a  $\Delta$ FOSB fehérje variánsokat is felismeri (Perrotti és mtsai., 2004, Vialou és mtsai., 2015). Az utóbbi izoforma játszik szerepet a krónikus adaptációban (Nestler és mtsai., 1999, Perrotti és mtsai., 2004, Sterrenburg és mtsai., 2011). Mivel egereinket 16 órával a perfúzió előtt tettük ki az utolsó enyhe (nedves alom) stresszornak, eredményeink elsősorban a  $\Delta$ FOSB megjelenését mutatják. A teljes hosszúságú FOSB ugyanis, amelyet esetleg indukálhatott az utolsó stresszor akut hatása, rövid felezési ideje miatt a mintavételezés időpontjában már minden bizonnyal lebomlott (Kovács, 1998, Carle és mtsai., 2006).

A CVMS szignifikáns változást okozott a FOSB/ $\Delta$ FOSB megjelenésében a 18 vizsgált agyterület közül 11-ben (CeA, MeA, BNSTdm, BNSTov, DG, vLS, PVNp, PVNm, IPAG, EWcp, DR). Két további stresszérzékeny területet, a hippocampus CA1 áréáját és a BNSTv-t,

a stresszhatás  $\times$  genotípus interakció befolyásolta. (F5. táblázat). Ez további bizonyíték a CVMS hatékonyságára. Az imipramin kezelés a CVMS FOSB/ $\Delta$ FOSB-re kifejtett hatását csak a BNSTdm (5.11.C ábra e és g oszlop), a hippocampus három régiójában (5.11.E-G ábrák e és g oszlop) és a DR területén (5.12.E ábra e és g oszlop) fordította vissza. Az imipramin kezelés FOSB/ $\Delta$ FOSB-re gyakorolt viszonylagos hatástalansága azzal is magyarázható, hogy a PACAP KO egerekben a FOSB/ $\Delta$ FOSB válasz majdnem teljesen mértékben elmaradt, ezért a kezelésnek egyfajta „padlóhatás” miatt nem volt tere csökkenteni a közel bazális szintnek megfelelő FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszámokat.

A vizsgált területek közül nyolc (PVNp, CeA, BNSTdm, BNSTov, BNSTv, CA1, vLS és DR) régióban csökkent a FOSB válasz mértéke PACAP hiányában (F5-6. táblázat), mely arra utal, hogy a PACAP stresszor- és agyterület specifikus módon befolyásolja az idegsejtekben megfigyelhető választ CVMS-ben. Mivel ezek a limbikus területek afferens összeköttetésben vannak PVN-nel, illetve a periPVN régióval (Risold és Swanson, 1997, Larsen és mtsai., 1996, Hammack és mtsai., 2010, Ulrich-Lai és Herman., 2009), nem meglepő, hogy a legnagyobb hatást a PVNp területén figyelhettük meg. Jól ismert, hogy a PACAP nagymértékben befolyásolja a PVN reaktivitását (Grinevich és mtsai., 1997, Agarwal és mtsai., 2005, Norrholm és mtsai., 2005, Das és mtsai., 2007, Kageyama és Suda, 2009) és hiánya funkcionális változásokat okoz a HPA tengely működésében, és a viselkedésben (Storth és Eiden, 2010, Tsukiyama és mtsai., 2011, Lehmann és mtsai., 2013).

A PACAP hiányának hatása nem korlátozódott a PVN CRH neuronjainak aktivitásváltozására. A CVMS megnövelte ugyanis a FOSB/ $\Delta$ FOSB aktivitást a WT egerek BNSTov/CRH neuronjaiban is, mely azonban PACAP KO állatokban elmaradt. A FOSB/ $\Delta$ FOSB ir és a CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB ir sejtek számának összehasonlítása arra utal, hogy a FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás a BNSTov/CRH neuronokra jellemző. A BNSTov/CRH neuronjairól ismert, hogy PACAP tartalmú rostok beidegzése alatt állnak (Köves és mtsai., 1994, Kozicz és mtsai., 1997), a CVMS növeli a PACAP és a PAC1R mRNS transzkripciót a BNST-ben, és a BNST PACAP injekciója növeli a szorongási szintet (Hammack és mtsai., 2009), míg a PAC1R hiánya ezzel ellentétes hatással bír. A CRH expresszió mesterséges növelése a BNST területén depressziószerű viselkedést (Regev és mtsai., 2011) vált ki. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a PACAP a BNSTov/CRH rendszerrel interakcióban részt vesz a hangulatszabályozásban (Hammack és mtsai., 2010). A PACAP KO egerekben megfigyelt kisebb BNSTov/CRH aktivitás hozzájárulhat a viselkedési fenotípusban megnyilvánuló változásokhoz.

Az EWcp/UCN1 neuronok működésében is változásokat találtunk PACAP hiányában. Mivel a KO egerek UCN1 neuronjai a FST-ben megfigyelthez hasonló módon CVMS hatására nem mutattak neuronális aktivitásemelkedést, arra következtetünk, hogy a PACAP befolyásolhatja az EWcp/UCN1 neuronjainak stresszadaptációban vitt szerepét. Legutóbbi megfigyeléseink ezt a lehetőséget alátámasztják, mivel az EWcp peptiderg neuronjaiban mind a PACAP, mind a PAC1R mRNS-ét megtaláltuk, így egy autokrin szabályozási mechanizmus lehetősége is felmerül, mely más agyterületeken ismert jelenség (Fehér és mtsai., 2023).

A projekt egy fő eredménye az, hogy a PACAP KO egerekben mind a DR/5HT sejtek száma, mind azok szerotonin tartalma emelkedett, továbbá egy erős, harmadrendű interakciót találtunk a CVMS, a genotípus és a kezelés között, mely arra utal, hogy a DR 5HT neuronjait ez a modell befolyásolja. (F8. táblázat). Hashimoto és mtsai. (2001) ezzel egybehangzóan azt figyelték meg, hogy a PACAP KO egerekben kisebb az agy 5-hidroxi-indolecetsav tartalma. Ennek alapján arra következtethetünk, hogy a szerotoninerg rendszert a PACAP hiány befolyásolja. Mivel Hannibal (2002) csak kevés PACAP ir rostot látott a DR-ban, felmerül, hogy az EWcp/UCN1 (Kozicz 2010, Gaszner és mtsai., 2012, Fehér és mtsai., 2023) és/vagy a BNST/CRH idegelemek közvetíthetik a PACAP hiányának hatásait a DR/5HT sejtjeire (Peyron és mtsai., 1998).

A PACAP hiány egérben a HPA tengely és a PVNp markáns aktivitáscsökkenésével jár együtt, melyhez a HPA tengely szabályozásában érintett limbikus területek, a vLS (Risold és Swanson, 1997), a DR (Larsen és mtsai., 1996) a CeA, a MeA, az BNSTov, és a BNSTdm (Ulrich-Lai és Herman 2009, Hammack és mtsai., 2010) PACAP hiányában fellépő megváltozott stresszérzékenysége is hozzájárulhat. Megállapítottuk, hogy BNSTov/CRH, EWcp/UCN1 és a DR/5HT neuronok működése is megváltozik PACAP KO egerekben, mely a HPA tengely csökkent aktivitásához, és depressziószerű viselkedési mintázathoz vezethet.

Ebben a projektben eredményeink limitációja volt, hogy itt a CD1 alapon tenyésztett PACAP KO egerek fenotípusa nem volt egyértelműen depresszióra utaló, illetve az imipramin hatása nem volt markáns. Ezért, a három találat elméleten alapuló modellünkben további stresszorokkal egészítjük ki a CVMS-t, és a hatékonyságot már fluoxetin kezeléssel teszteltük.

6.I.3. A TRPA1 jelen van a EWcp/UCN1 neuronokban és mennyisége csökken a CVMS egérmodellben valamint öngyilkosság következtében elhunytak EWcp mintáiban

Adatbázisadatok alapján felmerült, hogy a TRPA1 központi idegrendszeri kifejeződése elsősorban az EWcp-re jellemző. Miután ezt sikerült morfológiailag alátámasztani, a Trpa1 KO



egértörzset is alávetettük CVMS-nek, hogy a receptor hiányának viselkedési és funkcionális-morfológiai következményeit megismerjük. Ebben a projektben amellet, hogy a *Trpa1* mRNS-t megtaláltuk az egér EWcp/UCN1 neuronokban, lehetőségünk volt emberi szövetmintákat is tanulmányozni.

Az a megfigyelésünk, hogy majdnem minden EWcp/UCN1 sejt *Trpa1* transzkriptumot tartalmaz, de az UCN1 sejteken kívül nem láttunk jelentős *Trpa1* mRNS expressziót, arra utal, hogy a TRPA1-nek e sejtcsoportra specifikus szabályozó funkciója lehet. Mivel globális és nem kondicionális TRPA1 KO egértörzset használtunk, a funkcionális TRPA1 az állatok minden szövetéből hiányzott. Ezért, az EWcp-n kívüli, TRPA1 tartalmú területek a receptor hiányában megváltozott funkciója bizonyos mértékben hozzájárulhatott a megfigyelt viselkedésbeli változáshoz. Mindazonáltal, mivel azt láttuk, hogy a *Trpa1* expresszióját a CVMS nem befolyásolta az egér ganglion trigeminale-ban, úgy tűnik, hogy a *Trpa1* szabályozása az EWcp-ben eltér a periférián megfigyelttől. Tekintettel az EWcp/UCN1 neuronok stresszszabályozásban (Gaszner és mtsai., 2004, 2009a, Kormos és mtsai., 2016) és a stresszel kapcsolatos pszichopatológiákban (Kozicz és mtsai., 2008a) betöltött fontos szerepére, felmerült az EWcp/TRPA1 receptorok esetleges jelentősége a kórképekben. E kérdés vizsgálatok a depresszió CVMS egérmodelljében és depresszióban szenvedett öngyilkosság következtében elhunyt egyének mintáiban is alacsonyabb *Trpa1* expressziót találtunk az EWcp-ben.

A TRPA1 hiánya a kontroll KO egerekben magasabb *Ucn1* expresszióval, alacsonyabb testsúlygyarapodással, magasabb nyugalmi ACTH szinttel, és depressziószerű viselkedési fenotípussal járt együtt FST-ben. A megnövekedett *Ucn1* mRNS a változatlan EWcp/UCN1 peptidtartalommal társulva fokozott UCN1 felszabadulásra utalhat. Az UCN1 anorexigén tulajdonsága (Spina és mtsai., 1996) magyarázhatja a kontroll *Trpa1* KO egerek csökkent testsúlygyarapodását, míg fokozott depressziószintjük a DR magban fokozott UCN1/CRH1R jelátvitellel függhet össze (van der Doelen és mtsai., 2017, Dos Santos Júnior és mtsai., 2015, Waselus és mtsai., 2009). Az a tény, hogy a TST-ben nem láttunk genotípus különbséget, azzal magyarázható, hogy a tesztek nem minden esetben adnak konzisztens eredményt (Renard és mtsai., 2003), mert a genotípus hatás tesztspecifikus lehet. Ezt támasztja alá az is, hogy a *Trpa1* KO állatok mindkét szorongási paradigmában (OFT, MBT) kisebb (és nem nagyobb) mértékben szorongtak. Bár a szorongás társulhat depresszióval, egyes génmutációk eltérően hathatnak rájuk, mint ahogy azt a PACAP KO egereknél is láttuk (Gaszner és mtsai., 2012). Felmerülhet a csökkent szorongási szint jelenségének adaptív szerepe is, ahogy azt anyáknál a

szülés utáni időszakban leírták (Klampfl és mtsai., 2018). Ebben az értelemben, a *Trpa1* KO egerek csökkent szorongása a máladaptív repertoárjuk része lehet. A *Trpa1* KO egerek megnövekedett UCN1 aktivitása valószínűleg az aktívabb UCN1/CRH2R jelátvitel révén csökkenheti szorongási szintjüket (Vetter és mtsai., 2002, Kormos és Gaszner, 2013). Az OFT eredményeket úgy is értelmezhetjük, hogy a *Trpa1* KO egerek érzékenyebbek a stresszre ebben a tesztben. Mivel az EWcp/UCN1 neuronok axonjai a tágabb értelemben vett amygdalába is eljutnak (Cano és mtsai., 2021), és az amygdalába adott UCN1 a CRH receptorokon keresztül növeli a szorongást (Gaskins és mtsai., 2021), lehetséges, hogy a stresszexpozió fokozott UCN1 felszabadulás útján hozzájárul a *Trpa1* KO egerek emelkedett szorongási szintjéhez, stresszben.

A HPA tengely működését értékelő fizikai, endokrinológiai és viselkedési paraméterek azt mutatták, hogy a CVMS modell ebben a kísérletben is megbízhatóan működött. A stressznek kitett *Trpa1* KO egerek a WT egerekéhez képest nagyobb relatív mellékvesetömege a HPA tengely aktivitásának jelentős, hosszú távú növekedését tükrözheti. A glukokortikoidok immunszuppresszív hatása miatt ez a thymus csökkent tömegével kellene, hogy együtt járjon. Nem találtunk azonban olyan változást a thymus tömegében, ami a TRPA1-től függött volna. Erre az adhat magyarázatot, hogy a lymphocyták differenciálódása függ a TRPA1-től (Zhu és mtsai., 2020, Szabó és mtsai., 2022) de felmerül a *Trpa1* KO egerekben fennálló HPA tengely szabályozási zavar is. E kérdés tisztázására további tesztekre van szükség.

TRPA1 hiányában, CVMS hatására nem alakult ki depressziószerű állapot FST-ben, de súlyosbodott a szorongás (OFT), nagyobb mértékű volt a mellékvesetömeg és az EWcp/UCN1 peptidtartalom emelkedés. A viselkedésbeli változások a kontroll *Trpa1* KO egerekben megfigyelt fokozott depressziószintnek és csökkent nyugalmi szorongásszintnek tulajdoníthatók, mivel a depressziószerű fenotípus megakadályozta a depressziós paraméterek további növekedését, míg az eredetileg kevésbé szorongó fenotípus nagyobb teret hagyott a szorongási szint növekedésének. Az WT állatokban megfigyelt a CVMS által kiváltott *Ucn1* expressziónövekedést nem láttuk a KO állatokban, mely magyarázhatja a megfigyelt viselkedési fenotípust. Feltételezzük, hogy a funkcionális TRPA1 hiánya azt eredményezi, hogy az UCN1 neuronok sejtmembránjában kevesebb kationcsatorna található, ami a sejtek csökkent depolarizációkészségéhez vezethet. Így, a CVMS által kiváltott EWcp/UCN1 aktiváció (Kormos és mtsai., 2016, Farkas és mtsai., 2017) korlátozott mértékű lehet. Ezzel összhangban, stressznek kitett, *Trpa1* KO egerek változatlan *Ucn1* mRNS expressziójához társuló emelkedett EWcp/UCN1 peptidtartalom szintén csökkent peptidtermelésre és felszabadulásra és/vagy

fokozott tárolásra utalhat. Ez végül csökkent UCN1/CRH2R jelátvitelhez és fokozott HPA tengely aktivitáshoz vezethet (Vetter és mtsai., 2002, Kormos és Gaszner, 2013), melyet a stressznek kitett *Trpa1* KO egerek nagyobb mellékvesetömege is alátámaszt.

Az *EWcp/UCN1* mRNS megnövekedett expresszióját öngyilkosság következtében elhalálozottak mintáiban korábban kimutatták (Kozicz és mtsai., 2008b). Állatkísérleti eredményeink transzlációs értékét mutatja, hogy az *UCN1* és a *TRPA1* mRNS expresszióját megtaláltuk emberi *EWcp* mintákban, és a CVMS-nek kitett egerekhez hasonlóan, a *TRPA1* mRNS expressziója öngyilkos egyénekben kisebb volt. Ez arra utal, hogy a TRPA1 az *EWcp*-n keresztül emberben is befolyásolhatja a hangulati állapotot. Mivel az ioncsatorna fontos szerepet játszik a sejtaktivációjában, azt feltételezzük, hogy az alacsonyabb *TRPA1* mRNS expresszió kevesebb kationcsatornát eredményez a membránban, csökkentve az UCN1 neuronok serkenthetőségét, ami hozzájárulhat a depresszióban fellépő máladaptív folyamathoz. Legutóbb elektrofiziológiai megközelítéssel sikerült kimutatnunk, hogy a TRPA1 receptor valóban hozzájárul az *EWcp/UCN1* neuronok elektromos aktivitásának szabályozásához (Al-Omari és mtsai., 2023). További, farmakológiai és elektrofiziológiai kísérletek szükségesek annak meghatározására, hogy a TRPA1/*EWcp* hogyan járul hozzá a máladaptációhoz.

Az *EWcp/TRPA1* jelentőségét a CVMS modellben vizsgáltuk, globális KO egerek felhasználásával, ezért meg kell jegyeznünk, hogy bizonyos kompenzációs folyamatok felléphettek az egyedfejlődés során, melyek a viselkedési eredményeket is befolyásolhatták. Ezen kívül, mivel a receptort mind a periférián, mind pedig korlátozott mennyiségben a központi idegrendszer egyéb részein is megtaláltuk (Oláh és mtsai., 2021, Konkoly és mtsai., 2021), nem zárhatjuk ki, hogy más, itt nem vizsgált perifériás vagy centrális mechanizmusok is hozzájárultak a KO egerek viselkedési fenotípusához.

A fenti limitációkat is tekintetbe véve, ebben a tanulmányban az *EWcp/UCN1* neuronokat, mint a *Trpa1* mRNS expresszió fő kifejeződési helyét azonosítottuk az egéragyban. Bizonyítottuk a TRPA1 szerepét az *EWcp/UCN1* neuronok stresszadaptációjában a CVMS modellben, egérben. A *TRPA1* mRNS öngyilkosok férfiak *EWcp* mintáiban downregulált volt, mely alátámasztja az eredmények transzlációs értékét.

## 6.II. A három találat elmélet egérmódeljének kifejlesztése és validálása

Az egyszerű genetikai, epigenetikai vagy környezeti megközelítéseken alapuló depressziómodellek korlátait kiküszöbölendő, vagy más szemszögből vizsgálva, előnyeiket egyesítendő, Mill és Petronis (2007) három találat elmélete alapján egyazon kísérleti

elrendezésben kombináltuk a genetikai, epigenetikai és környezeti hatásokat. Hipotézisünk az volt, hogy e paradigmák kombinációja segíthet egerekben depresszióhoz hasonló állapotot előidézni. A genetikai hajlamot a PACAP génmutációval modelleztük (Gaszner és mtsai., 2012; Hashimoto és mtsai., 2009, 2001). A korai averzív életeseményt anyai depriváció segítségével valósítottuk meg, mely az epigenom átprogramozása útján hosszútávú változásokat eredményez a stresszadaptációban (Gröger és mtsai., 2016; Authement és mtsai., 2015; Jawahar és mtsai., 2015). Végül, a harmadik találat a CVMS, melyet a genetikai hajlamra és a maternális deprivációval kombináltunk.

6.II.1 A stresszadaptáció fizikai, endokrinológiai és viselkedési indikátorai, valamint funkcionális-morfológiai eredmények a három találat elmélet konstrukciós és fenomenológiai validitására utalnak PACAP HZ egerekben

A fizikai paraméterek közül a várt testtömegcsökkenés CVMS hatására a legtöbb csoportunkban alátámasztotta a stressz hatékonyságát. Kiemelendő, hogy a CVMS hatása a testtömegre az összes rizikófaktort hordozó MD180 HZ CVMS egereknél volt a legjelentősebb. A HPA tengely aktivitációjára utalt a megnövekedett mellékvesetömeg és a stresszhatás közötti szignifikáns kapcsolat, valamint a magasabb CORT szintek a WT és PACAP HZ AFR egerekben. A korábbi vizsgálatokkal összhangban, az AFR KO egerek nem reagáltak CVMS-re (Stroth és Eiden, 2010; Tsukiyama és mtsai., 2011; Lehman, és mtsai., 2013; Mustafa és mtsai., 2015; Kormos és mtsai., 2016). A CVMS által kiváltott CORT válasz a MD180 PACAP HZ egerekben zavart volt, mely endokrinológiai tekintetben a HPA tengely máladaptációjára utal.

Viselkedési szempontból, a CVMS hatékonysága a stressznek kitett AFR WT egerek hosszabb FST immobilitási idejében volt tetten érhető, korábbi munkáinkkal összhangban (Kormos és mtsai., 2016). A depressziószerű állapot elmélyítéséhez MD180 HZ egerekben CVMS expozícióra is szükség volt, utalva e csoport modellértékére. A CD1 alapon tenyésztett PACAP KO egerek depressziószerű fenotípusát korábbi munkáinkban mi is láttuk, (Gaszner és mtsai., 2012) és mások is (Hashimoto és mtsai., 2009) kimutatták. Ezzel ellentétben, az anomáliát nem látták C57BL/6N PACAP KO (Lehmann és mtsai., 2013) és C57BL/6J × 129SvEv hibrid PACAP KO egerekben (Hattori és mtsai., 2012). Érdekes, hogy CVMS hatására ez a törzsfüggő különbség eltűnik: CD1 PACAP KO egerünk FST-ben (Kormos és mtsai., 2016) és TST-ben csökkent depressziószintet mutatott. A CVMS maternális depriváció szorongásra gyakorolt hatásosságát a MBT alátámasztotta. Fontos, hogy az MD180 PACAP HZ egereknél a CVMS

expozícióra volt szükség a szorongásszint emeléséhez, ezért ebből a szempontból is ez utóbbi csoport tűnik alkalmasnak a hangulatzavarok modellezésére.

Morfológiai eredményeink ismételten megerősítették a BNSTov/CRH neuronok szerepét a hangulatszabályozásban (Kormos és mtsai., 2016), mivel a CVMS FOSB/ $\Delta$ FOSB választ okozott a WT és HZ állatok BNSTov/CRH neuronjaiban, mely a KO egerekben elmaradt. Az anyai gondoskodás minősége befolyásolta a BNSTov/CRH tartalmát, és a súlyos anyai depriváció a FOSB/ $\Delta$ FOSB expresszióját megemelte a kontroll egerekben, mely megváltozott génextpressziót jelez és utalhat a stresszadaptáció készség változására e neuronokban. A HPA tengely MD180 PACAP HZ egerekben megfigyelt csökkent reaktivitása részben magyarázható lehet a BNSTov csökkent CVMS reaktivitásával, mivel korábban kimutatták, hogy a ventrális BNST lézió csökkenti a PVN és a HPA tengely aktivitását (Choi és mtsai., 2007). Mivel a szorongási szint emelkedése a HZ egerekben volt kifejezettebb, a bennük 70%-kal kisebb PACAP expresszió (Hashimoto és mtsai., 2001), a korábbi maternális depriváció és a CVMS expozíció együttesen alakítja ki a megfigyelt fenotípust, utalva modellünk konstrukciós validitására.

Az EWcp/UCN1 neuronok korábbi eredményeinknek megfelelően reagáltak a CVMS-re (Korosi és mtsai., 2005, Kormos és mtsai., 2016), és a MD180-ra (Gaszner és mtsai., 2009a). Új eredményként mutattuk ki, hogy az MD180 fokozott bazális FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitást idéz elő EWcp/UCN1 neuronokban, különösen a PACAP HZ és KO állatokban, ami a megváltozott génextpressziót és PACAP expressziótól függő CVMS reaktivitást okoz. Az EWcp/UCN1 sejtek az MD180 KO egerekben CVMS-t követően tartalmazták a legtöbb FOSB/ $\Delta$ FOSB-t. A viszonylag alacsony depressziószint a KO egerekben az EWcp/UCN1 neuronok túlzott aktivitásával lehet magyarázható. Ezt támasztja alá, hogy az Ucn1 KO egereknek korlátozott az adaptációs képességük krónikus stresszben (Zalutskaya és mtsai., 2007). A LDT-ben mért alacsony szorongási értékek is az EWcp/UCN1 sejtek magasabb aktivitásával magyarázható, mivel Ucn1 mutáns egerben fokozott szorongást mutattak ki (Vetter és mtsai., 2002). A CVMS-nek kitett MD180 KO egerünkben a fokozott UCN1/CRH2R jelátvitel anxiolitikus hatást közvetíthetett (Kormos és Gaszner, 2013).

Korábbi eredmények is rámutattak arra, hogy a PACAP KO állatok DR/5HT rendszerében a 5HT mennyisége, metabolizmusa és neuronális aktivitás mértéke is eltér a WT-ban láthatótól (Hashimoto és mtsai., 2001, Gaszner és mtsai., 2012; Kormos és mtsai., 2016), mely hozzájárulhat az egerek megváltozott hangulati állapotához. Az AFR csoportban minden genotípus az 5HT ir neuronok aktivitásának növekedésével reagált a CVMS-re, mely eltér

korábbi vizsgálatunk eredményétől (Kormos és mtsai., 2016), amit az ebben a kísérletben a CVMS paradigma utolsó négy napján beiktatott viselkedési teszt sorozat stresszhatása magyarázhat. A súlyos anyai depriváció erőteljesen növelte a DR/5HT-FOSB/ $\Delta$ FOSB aktivitást a kontroll állatokban, és a CVMS expozíció után a neuronális aktivitás csökkent, mely a rendszer adaptációs zavarára utal, hiszen az AFR és MS15 csoportban nem láttunk ilyen változást.

Összefoglalva, ezek alapján arra következtettünk, hogy a PACAP HZ egerek MD180 és CVMS expozíció után megbízható modellként használhatók a depresszió tanulmányozására, mivel a fizikai, endokrinológiai és viselkedési paraméterek a hangulatzavarokat kiváltó ismert genetikai epigenetikai és környezeti faktorok hatására olyan változásokat mutattak, melyek hasonlítanak az emberben is megfigyelt kór állapot tüneteire. Ezen túl, néhány a hangulatszabályozásban szerepet játszó PACAP tartalmú területen jellegzetes funkcionális-morfológiai eltéréseket figyeltünk meg, mely jó egyezést mutat az egyéb hangulatzavar modellekben látottakkal. Ezek alapján kimondhattuk, hogy a PACAP-nak moduláló szerepe van hangulatszabályozásban, és az általunk fejlesztett három találat elméleten alapuló modell a Willner-féle (1984) konstrukciós és fenomenológiai validitási kritériumoknak is megfelel. További vizsgálatok voltak azonban szükségesek a harmadik willneri szempont, a prediktív validitási kritérium tesztelésére.

#### 6.II.2. A három találat elmélet egérmódeljének prediktív validitásának tesztelése

A Willner (1984) által meghatározott harmadik, prediktív validitási kritérium vizsgálatára fluoxetinnel kezelt PACAP HZ egércsoportokkal egészítettük ki a modellt, hogy felmérjük, miként reagálnak a mindhárom találatot hordozó állatok az SSRI-kezelésre. Ezzel a stratégiával sikeresen reprodukáltuk a konstrukciós és fenomenológiai validitási kritériumokat alátámasztó eredményeket (6.1. ábra).

		AFR		MD180	
		stressz	kezelés	stressz	kezelés
HPA tengely válasz		CORT	●	●	↓
Viselkedési tesztek	szorongás	MBT	●	↓	↓
		LDT	●	●	●
	depresszió szint	FST	↑	●	↓
		TST	●	↓	●
	PFC	FOSB	↑	●	●
H3K9ac		●	↓	●	
hippocampus	CA1	FOSB	●	●	●
		H3K9ac	↓	●	↑
	CA3	FOSB	↑	↑	●
		H3K9ac	●	↓	↑
	DG	FOSB	●	↑	↓
		H3K9ac	↓	●	↑
BNSTov	CRH	●	↑	↓	
	CRH-FOSB	●	●	↑	
	CRH SSD	●	↑	●	
	H3K9ac	●	●	●	
CeA	CRH	↑	↑	●	
	CRH-FOSB	↑	↑	●	
	CRH SSD	●	●	●	
	H3K9ac	●	↑	●	
VTA	TH SSD	↑	●	●	
	H3K9ac	●	●	↑	
EWcp	UCN1	●	↓	↓	
	UCN1-FOSB	●	↓	↓	
	UCN1 SSD	●	●	●	
	H3K9ac	↑	●	↓	
DR	5HT	↓	●	↓	
	5HT SSD	↓	●	●	
	H3K9ac	●	●	●	

**6.1. ábra.** Az anyai megvonás stresszre és kezelésre gyakorolt hatásainak összefoglalása. ↑ növekedés, ↓ csökkenés, ● nincs hatás. Az „AFR” fő kategórián belül a „stressz” oszlopban az AFR, kontroll, vivőanyag csoportot az AFR, stressz, vivőanyag csoporttal hasonlítottuk össze. A „kezelés” oszlopban az AFR, kontroll, vivőanyag csoportot az AFR, kontroll, fluoxetin kezelt állatokkal hasonlítottuk össze. Az „MD180” fő kategóriában a „stressz” oszlopban az MD180, kontroll, vivőanyag csoportot az MD180, stressz, vivőanyag csoporttal hasonlítottuk össze. A „kezelés” oszlopban az MD180, kontroll, vivőanyag csoportot az MD180, kontroll, fluoxetin állatokkal hasonlítottuk össze. Sárga mezők: az anyai megvonás a stressz VAGY a kezelés hatását befolyásolta. Piros cellák: az anyai megvonás a stressz ÉS a kezelés hatásait is befolyásolta. A sötét háttér paradox, máladaptív változásokra utal. AFR: normál állatházi körülmények között tartott, MD180: anyai megvonást kapott, HPA tengely: hypothalamus hypophysis mellékvese tengely. BNSTov: a nucleus interstitialis striae terminalis ovális almagja, CeA: az amygdala centrális magja, VTA: ventralis tegmentalis area, EWcp: centrális projekciójú Edinger-Westphal mag, DR: nucleus raphe dorsalis, CORT: kortikoszteron titer, MBT: marble burying teszt, LDT: light-dark box teszt, FST: forced swim teszt, TST: tail suspension teszt, FOSB: FOSB/ΔFOSB pozitív sejtek száma, H3K9ac: acetil-lizin 9 H3 hiszton immunreaktivitás, CRH: corticotropin-releasing hormon pozitív sejtek száma, SSD: specifikus jelzenítés, CRH-FOSB: az adott antigén és FOSB/ΔFOSB szövettani kolokalizációja, TH: tirozin-hidroxiláz, UCN1: az urocortin1 immunreaktív sejtek száma, 5HT: a szerotonin immunreaktív sejtek száma. (Módosítva, Gaszner és mtsai., 2022a alapján)

Az MBT eredmények alátámasztják modellünk érzékenységet prediktív validitás tekintetében, mivel az anyai gondoskodás minőségétől függetlenül a fluoxetin kezelés hatékonyan csökkentette a stresszelt állatok szorongásszintjét a CVMS-t elszenvedett egerek csoportjaiban, ahogy azt más laboratóriumok eredményei is alátámasztják (Todorović és Filipović, 2017). Az AFR CVMS-nek kitett egerek FST-ben paradox módon magasabb depressziószintet mutattak a fluoxetin kezelés után. Ez az eredmény megkérdőjelezi a FST megbízhatóságát, és egybeesik azzal, hogy az utóbbi időben egyre több éles kritika éri a FST-et, és megkérdőjelezi validitását a depressziószint értékelésében (Molendijk és mtsai., 2015; de Kloet és mtsai., 2016; Commons és mtsai., 2017; Kara és mtsai., 2018). Más laboratóriumok eredményei szerint a TST érzékenyebb teszt, mint a FST (Bai és mtsai., 2001). Ennek megfelelően, TST-ben, az SSRI-kezelés erőteljesen csökkentette a depresszió szintjét az AFR állatokban. A viselkedési tesztben azt láttuk, hogy ha az egerek valamennyi kockázati tényezőnek ki voltak téve, akkor már nem tudtak sikerrel alkalmazkodni (Daskalakis és mtsai., 2013; Farkas és mtsai., 2017). Kiemelendő, hogy anyai depriváció mellett csökkent a fluoxetin kezelés hatékonysága. Ez a megfigyelésünk felhívja a figyelmet a személyre szabott terápia jelentőségére a hangulatzavarok terápiájában (Kappelmann és mtsai., 2020), amely figyelembe veszi a páciens által hordozott kockázati tényezőket és azok típusát.

Az a jelenség, hogy a CVMS növeli a FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitást a PFC-ben, jól ismert (Perrotti és mtsai., 2004; Lehmann és Herkenham, 2011; Sterrenburg és mtsai., 2011; Laine és mtsai., 2017), és megfelel a vivőanyaggal kezelt CVMS-nek kitett egereinknél megfigyelteknek. Fontos, hogy ha a CVMS-t az MD180 talaján alkalmaztuk, sem a CVMS, sem a fluoxetin kezelés nem emelte meg a FOSB/ $\Delta$ FOSB aktivitást a PFC-ben. Ennek a jelenségnek nagy transzlációs jelentősége lehet, mivel a FOSB/ $\Delta$ FOSB-vel kapcsolatos transzkripciós változásokat gyakran a terápiás hatékonyság tesztelésére használják depresszió modellekben (Vialou és mtsai., 2015). A hisztonacetiláció vizsgálatánál azt találtuk, hogy az AFR egerekben a fluoxetin kezelés csökkent acetilációval társult, de ha az egerek MD180-n estek át, akkor egy eleve alacsonyabb acetilációs szintet láttunk, amelyet a fluoxetin kezelés már nem befolyásolt. Ez arra utal, hogy a fluoxetinterápia és a fiatalkorban átélt stressz kölcsönhatásba lép a PFC-ben, ami összhangban van egy korábbi vizsgálat eredményeivel (Levine és mtsai., 2012). A hangulatszabályozásban kiemelt jelentőségű PFC területén látott összetett, a fluoxetin terápia által modulált funkcionális-morfológiai változások bizonyítják a régió érintettségét és támogatják a modell megbízhatóságát.



A hippocampus területén az anyai megvonás nagyon alacsony, szinte kimutathatatlan FOSB/ $\Delta$ FOSB jellel társult, ezért az SSRI kezelésnek nem sok tere volt a FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás csökkentésére. Az MD180 csökkentette a hisztonacetilációt az összes hippocampus régióban, ami összhangban van Sun és mtsai. (2021) eredményeivel. A CVMS csökkentette a H3K9ac immunjelet a vivőanyaggal kezelt AFR egerekben az összes vizsgált régióban, ami egybevág egy korábbi kísérlet eredményeivel (Hunter és mtsai., 2009), a CA1 régiót kivéve, ahol Ferland és Schrader (2011) nem találtak változást. A fluoxetin kezelés növelte az acetilációt a korábban CVMS-t átélt egerekben. Ez megfelel Hunter és mtsai. (2009) eredményeinek, ahol e hiszton metilációját mérték. Jelen vizsgálatunk azt mutatja, hogy a CVMS-nek kitett, MD180-t is elszenvedett egerekben a fluoxetin acetilációnövelő hatása megszűnt a CA1-ben, és átfordult egy csökkentő hatásba a CA3-ban és a DG-ban. Ez arra utal, hogy az antidepresszánsok hatékonysága függhet a kockázati tényezők számától és az epigenetikai státusztól, amelyet a modellállat hordoz. Ezt a megállapítást emberi hangulatzavarok terápiája vonatkoztatva úgy értelmezhetjük, hogy rámutat az egyénre szabott terápiás megközelítés fontosságára a depresszió kezelésében, a farmakoterápia hatékonyságának növelése érdekében.

A BNSTov-ban, korábbi eredményeinkkel ellentétben, a CVMS nem indukált jelentős FOSB/ $\Delta$ FOSB aktivációt az AFR állatokban (Farkas és mtsai., 2017). Ezt a vivőanyag injekciók által okozott további enyhe stressz magyarázhatja, mely a kontroll állatokat is érintette. Anyai megvonást követően a stresszre adott válasz nagysága mind a CRH, mind a FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtek számának tekintetében csökkent. Ez alátámasztja a viselkedési tesztjeink azon értelmezését, hogy az MD180 állatoknál máladaptációt láttunk. Korrelációanalíziseink igazolták, hogy a szorongási- (MBT) és a depressziószint (TST) fordítottan arányos a BNSTov/CRH sejtek FOSB/ $\Delta$ FOSB pozitivitásával, mely egybevág Choi és mtsai. (2007) eredményeivel. Ennek megfelelően, a fluoxetin kezelés CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszámemelkedést indukált a legtöbb csoportban, ami erős anxiolitikus és antidepresszáns hatással járt együtt, melyet más laboratóriumok eredményei is megerősítenek (Torres és mtsai., 1998; Hammack és mtsai., 2010; Surget és mtsai., 2011; Partridge és mtsai., 2016). Ehhez a viselkedési hatáshoz hozzájárulhat a deprivált csoportokban megfigyelt kisebb CRH tartalom a BNSTov sejtekben, melyet Hu és mtsai. (2020) is kimutattak.

A CeA stressz hatására bekövetkező aktivációja jól ismert jelenség (Kozicz és mtsai., 2008a; Regev és mtsai., 2011; Laine és mtsai., 2017; Kovács és mtsai., 2019). Modellünkben mi is emelkedett CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszámot, CeA/CRH jelendezítést találtunk. Az anyai

megvonás alapjaiban rendezte át a neuronális aktivitási mintázatot a kontroll és a stresszben részesült PACAP HZ egerekben, mivel a fluoxetin kezelés csökkentette a CeA FOSB/ $\Delta$ FOSB aktivitását és CRH tartalmát, és fluoxetin terápia mellett a CVMS nem növelte FOSB/ $\Delta$ FOSB aktivitást és a CRH ir sejtszámot. A CeA/CRH SSD és az MBT-ben elrejtett üveggolyók száma közötti negatív korreláció egyrészt a fluoxetin erős anxiolitikus hatását bizonyítja stressz után (Partridge és mtsai., 2016), másrészt azt, hogy a magasabb CeA/CRH szint alacsonyabb szorongással jár együtt. Ez némileg meglepő megfigyelés, mivel a magasabb CRH szint általában fokozott szorongással párosul (Pomrenze és mtsai., 2019), mégis, ha a posztnatális időszakban averzív életesemény lépett fel korábban, ennek az ellenkezőjét találták (Bolton és mtsai., 2018). Az irodalomból ismert, hogy az élet posztnatális időszakában átélt averzív élethelyzet a CeA stresszadaptációját és ezzel összefüggésben az állatok hangulati állapotát is megváltoztatja (Bian és mtsai., 2021). Az, hogy az általunk alkalmazott modellben is ezt láttuk, alátámasztja a modell megbízhatóságát, és mindkét általunk vizsgált előagyi CRH rendszer érintettségét mutatja.

A VTA a mezolimbikus dopaminerg pálya központjaként a hangulatzavarok tünetei közül az anhedónia és a csökkent motiváció kialakításában játszat szerepet (Nestler és Carlezon, 2006). Az anyai deprivációt elszenvedett utódoknál megfigyelt TH jelzenítés-csökkenés utal a modell hatékonyságára, és egybevágnak korábbi eredményekkel (Peña és mtsai., 2017). A prediktív validitásra utal az, hogy a fluoxetin kezelés hatékonyan növelte a VTA-ban a hisztonacetilációt, ahogy az az irodalmi adatok alapján (Levine és mtsai., 2012; Schmauss, 2015) várható volt. Modellünkben a VTA TH immunreaktivitása illetve H3K9ac ir sejtszámok többszörös interakcióban álltak az anyai gondoskodás minőségével, a stresszel és a kezeléssel, mely bizonyítja, hogy a VTA funkcionális változásokat mutat a modellben.

Az EWcp/UCN1 neuronok minden fluoxetin kezelt csoportban kevesebb peptidet tartalmaztak. Ez az MBT eredményeivel korrelálva megalapozza a modellünk prediktív validitását, és alátámasztja a EWcp jelentőségét a szorongással kapcsolatos betegségekben, összhangban a korábbi adatokkal (Vetter és mtsai., 2002; Gaszner és mtsai., 2004, 2009b, 2012; Kozicz és mtsai., 2008a; Kormos és mtsai., 2016). A maternális depriváció csökkentette az EWcp FOSB/ $\Delta$ FOSB aktivitását, UCN1 tartalmát és a hisztonfehérjék acetilációjának mértékét, mely korrelált az UCN1 jelzenitással. Az a megfigyelés, hogy a stresszexpozió az anyai megvonásban részesített állatokban alacsonyabb acetilációs szintet okozott, mélyreható máladaptív változásokra utal az EWcp neuronjaiban és egybevágnak korábbi patkányban tett megfigyeléseinkkel is (Gaszner és mtsai., 2009b). Az, hogy a fluoxetin kezelés visszafordította

ezt a máladaptív változást az EWcp-ben a PFC-hez hasonlóan (Levine és mtsai., 2012), további bizonyíték a prediktív validitásra.

A DR/5HT neuronok a HPA tengely- és a hangulatszabályozás résztvevői (Steinbusch és mtsai., 1981; Ma és mtsai., 1991; Peyron és mtsai., 1998, összefoglaló közlemény a témában: Venkatraman és mtsai., 2017) és a PACAP KO egerek viselkedési anomáliái a szerotoninerg rendszer változásaira is visszavezethetők (Shintani és mtsai., 2006). Az AFR egerekben a stressz csökkentette a DR/5HT sejtek számát, összhangban mások (Issler és mtsai., 2014) és saját eredményeinkkel (Kormos és mtsai., 2016). Az is ismert volt korábban (Tao és mtsai., 2000; Quentin és mtsai., 2018), hogy normál anyai gondoskodásban részesült állatokban a fluoxetin kezelés önmagában nem változtatja meg a 5HT sejtek számát, ellentétben az anyai deprivációval, ami emeli azt (Gardner és mtsai., 2009). A modellünkben tett érdekes új megfigyelésünk volt, hogy anyai megvonást elszenvedett egerekben a stressz önmagában nem befolyásolta a DR/5HT-t, de a fluoxetin hatására csökkent a DR/5HT sejtszám, és a legnagyobb mértékben ez a csökkenés a mindhárom találatot elszenvedett állatokban következett be, újabb bizonyítékot szolgáltatva a modell prediktív validitására. Egyben ez tovább erősíti a korai életszakaszban elszenvedett averzív életesemények jól ismert hosszútávú jelentőségét a stresszadaptációs válaszban és a hangulatszabályozásban (Čater és Majdič, 2021). Az MBT-ben mért szorongási szint és DR/5HT sejtek számának, valamint 5HT jeldenzitásának korrelációja rámutat, hogy a viselkedési változáshoz hozzájárul a DR megváltozott működése is. Az DR/5HT és a H3K9ac ir sejtek számának erős negatív korrelációja is rávilágít az epigenetika jelentőségére a hangulatszabályozásban. A DR/5HT, és BNST<sub>ov</sub>/CRH, illetve a EWcp/UCN1 sejtek száma közötti erős korreláció pedig funkcionális kapcsolatra utal, ami összhangban van Waselus és mtsai. (2009), van der Doelen és mtsai. (2015) és Priest és mtsai., (2023) neuroanatómiai vizsgálataival. A BNST<sub>ov</sub> és a CeA CRH aktivitása negatívan, míg a EWcp/UCN1 és a DR/5HT pozitívan korrelált az MBT-ben megfigyelt szorongási és a TST-ben regisztrált depresszió szintekkel. Ez a korábban áttekintett (Kormos és Gaszner, 2013) eredményekkel összhangban arra utal, hogy ezek a területek inverz módon befolyásolják a hangulati állapotot.

A kép teljességéhez hozzá tartozik, hogy tekintetbe kell vennünk a modell limitációit is. A projektben vizsgált agyterületek ösztrogénérzékenysége jól ismert (Derks és mtsai., 2009; Clark és mtsai., 2012; Kelly és mtsai., 2013; Vandegrift és mtsai., 2017; Le Moëne és mtsai., 2019), ezért a nemi különbségek szempontjából érdekes lett volna a nőstény állatok vizsgálata is. Mivel az ösztrociklus váltakozásának hatása növelte volna eredményeink szórását, szükség

lett volna az állatok ciklusának vizsgálatára hüvelykenetézéssel, mely egy további stresszfaktort is jelentett volna, továbbá, a ciklust a CVMS expozíció megzavarhatja. Figyelemmel az állatkísérlet összetettségére, a nőstény állatok vizsgálatát illető fenti nehezítő tényezőkre, valamint az állattartó létesítményünk kapacitására, a modellt nőstény egereken nem állt módunkban tesztelni.

Szintén fontos megjegyeznünk, mint limitáció, hogy egyes neurontípusokra nem jellemző a neuronális aktivitási markerként használt azonnali gének expressziója (Hoffman és mtsai., 1994; Dragunow és Faull, 1998). A FOSB/ $\Delta$ FOSB jelölés hátránya ezért, hogy nem detektálja a potenciálisan nagyon fontos, gátló jellegű funkcionális változásokat (Bowers és mtsai., 1998; Choi és mtsai., 2007). Vagyis, a módszerünk nem mutatja, ha a vizsgált területeken csökkent aktivitás és/vagy génexpresszió következett be.

Összefoglalva, a humán depresszió három találat elmélete (Mill és Petronis, 2007, de Kloet és mtsai., 2007; Daskalakis és mtsai., 2013) alapján felállított modellünk (Farkas és mtsai., 2016), melyben a PACAP gén mutáns alléllját hordozó egereket anyai megvonásnak és később krónikus variábilis enyhe stressznek tettünk ki, a Willner-féle (1984) konstrukciós és fenomenológiai validitási kritériumoknak megfelelt (Farkas és mtsai., 2017). A fluoxetin kezelés helyreállította az MBT-ben mért szorongási és a TST által mutatott depresszió szinteket, tehát a modell megfelel a harmadik, prediktív (Willner, 1984) validitási feltételnek is (Gaszner és mtsai., 2022a). Morfológiai adataink arra utalnak, hogy a hangulatzavarra genetikailag érzékenyebb PACAP HZ egereken alkalmazott anyai megvonás mélyreható agyterületspecifikus változásokat okoz a BNSTov és CeA CRH-tartalmú, a VTA dopaminerg, az EWcp urocortinerg és a DR szerotoninerg sejtjeiben (Gaszner és mtsai., 2022a). Ezeknek a területeknek, valamint a PFC és a hippocampus hisztonacetilációjában és a stresszadaptációt tükröző neuronaktivációs mintázatának változása is alátámasztja a modell hatékonyságát, és kiemeli az anyai gondoskodás minőségének jelentőségét (Gaszner és mtsai., 2022b). Mivel a hangulatzavarokban az agy számos területén láttak funkcionális és strukturális anomáliákat (Villas Boas és mtsai., 2019), az általunk megfigyelt funkcionális-neuromorfológiai változások komplexitása (6.1. ábra) szintén modellünk validitását erősíti (Villas Boas és mtsai., 2019).

A modellben eddig nem vizsgált régiók tanulmányozása további olyan agyterületek vagy idegsejthálózatok azonosításához vezethet, amelyek hozzájárulnak a hangulatzavarok összetett neurobiológiájához. Tekintettel a depresszió farmakoterápiájának korlátaira, nagy igény lenne új típusú és hatásmechanizmusú gyógyszerek fejlesztésére. Az ígéretes hatóanyagjelölt

vegyületek preklinikai tesztelése modellünkben a jövőben hozzájárulhat új farmakoterápiai stratégiák kidolgozásához.

### **6.III. A stresszválasz korfüggésének vizsgálata**

Ebben a projektben arra kerestük a választ, hogy miként változik az életkorral a stresszadaptációban részt vevő legfontosabb agyterületek válasza akut és krónikus stresszexpozíció során. A neuronok akut és krónikus aktivitását FOS illetve FOSB/ $\Delta$ FOSB jelöléssel értékeltük. Vizsgálatunkat kiterjesztettük a CRH termelő neuronokra a CeA, BNSTov és a PVN területén.

Eredményeink megbízhatóságának alapfeltétele, hogy megbizonyosodjunk az alkalmazott stresszorok hatékonyságáról. A FOS kifejeződés vizsgálata jól bevált módszer az idegsejtaktiváció tesztelésére (Kovács, 1998, 2008). Az általunk alkalmazott ARS megbízhatónak bizonyult, mivel az az összes 13 vizsgált agyterületen FOS aktivitásnövekedést okozott. További bizonyítékot egy általánosan használt akut stressz indikátor (Bali és Jaggi, 2015), a CORT szint emelkedése szolgáltatott a HPA tengely aktivációjára. Bár az 1 és 1,5 hónapos állatokban ez nem volt szignifikáns ez életkori sajátossággal vagy a vizsgált állattörzsre jellemző tulajdonsággal magyarázható (Koenig és mtsai., 2018, Montaron és mtsai., 2006).

A CVMS hatékonyságának megítélésére állataink testtömegváltozását és relatív mellékvese- és thymustömegét, valamint plazma CORT szintjét használtuk. A testtömegadatok a 2 és 3 hónapos állatoknál mutatták a stressz hatékonyságát, mert a CORT katabolikus hatása a gyors növekedés idején nagyobb mértékben befolyásolhatta a testtömeg változást. A relatív mellékvese-, és thymustömegek megbízhatóbban mutatták a CVMS effektivitását a legidősebb csoport kivételével. Szintén a HPA tengely CVMS hatására bekövetkező fokozott aktivitására utalt a PVN területén emelkedő CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszám (Imaki és mtsai., 1991, Sterrenburg és mtsai., 2011, Kormos és mtsai., 2016). A FST szintén megerősítette, hogy a CVMS-nek kitett állatok depressziószerű viselkedést mutatnak, bár meg kell jegyeznünk, hogy ebben a projektben csak a 6 hónapos állatokban volt lehetőségünk ezt meg vizsgálni.

#### **6.III.1. Az akut stressz hatása a FOS kifejeződésre az életkor függvényében**

A legnagyobb FOS sejtszám emelkedést a 2 hónapos állatokban láttuk, melyet a késői adolescens és a posztpubertás korban megnövekedett agyi stresszérzékenység okozhat (Kellogg és mtsai., 1998, Romeo és mtsai., 2006, McCormick és mtsai., 2010). Az ARS által kiváltott

FOS válasz az állatok életkorának előrehaladtával fokozatosan csökkent kilenc magban (MeA, CeA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, BNSTfu, PVN, EWcp és DR). A FOS reaktivitáscsökkenés dinamikája magonként különbözik: a DR és CeA esetében a 3. a MeA, BNSTov, BNSTdm, BNSTfu, PVN esetében a 6., a BNSTdl-nél pedig a 12. hónaptól volt statisztikailag szignifikáns mértékű. A Spearman analízis 7 magban (MeA, CeA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, BNSTfu, PVNp) támasztotta alá a FOS jel csökkenését a korrallal.

Nem találtunk korrelációt a CORT szint és egyik mag FOS reaktivitása között sem. A CORT válasz szinte minden életkorban magas volt, míg a magok FOS reaktivitása csökkent. Ez arra utal, hogy bár a FOS és a CORT önmagukban megbízható indikátorai a stresszreakciónak, a FOS aktivitás önmagában nem informatív a HPA tengely aktivitásának tekintetében.

A FOS aktiváció ANOVA elemzése hét területen (BLA, CeA, BNSTfu, PVNp, PVNm, EWcp, DR) igazolta a stressz és életkor interakciójának hatását. Ezek közül három magban (CeA, BNSTfu, és PVNp) a korrelációanalízis is bizonyította a korfüggő sejtszámcsökkenést, mely azt sugallja, hogy a PVNp korfüggő FOS immunreaktivitás változását a CeA és BNSTfu FOS reaktivitásának hanyatlása is magyarázhatja. Ezt támasztja alá a BNST és CeA szerepe a glukokortikoid válasz kialakításában (Choi és mtsai., 2007) és kapcsolatuk PVN-nel (Dong és mtsai., 2001). Hat régióban (S1, MeA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, BNSTv) nem volt kimutatható a kor és stressz interakció együttes hatása és a korrelációanalízis sem mutatott a stressz csoportoknál az S1 és a BNSTv esetében életkorfüggő FOS immunreaktivitáscsökkenést. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a MeA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, BNSTv kisebb mértékben járulnak hozzá a korrallal bekövetkező változásokhoz, így szerepük fontosabb lehet a HPA tengely válaszában fenntartásában, idősebb korban.

Az öregedés velejárója, hogy a szenzoros rendszerek működése a korrallal romlik. Hogy kizárjuk annak a lehetőségét, hogy a megfigyelt FOS reakciócsökkenés pusztán ennek tudható be, az elsődleges szomatoszenzoros barrel cortex (S1) régiót választottuk ki, mert ennek nincs jelentős szerepe lenne a stresszadaptációban, de mivel az ARS során az állatok bajuszszálai mechanikusan ingerlődnek, *Fos* mRNS és fehérje jelenik meg S1 régióban (Girotti és mtsai., 2006, Bisler és mtsai., 2002). Eredményeink szerint az S1 régió FOS válaszkészségére is hat az életkor, ugyanakkor nem lineárisan csökkenő, hanem egy U alakú görbét ír le az életkor függvényében, ezért a stresszérzékeny területek életkorfüggő FOS válasza agyterület-specifikus jelenség, és nem a szenzoros deficit okozza.

Munkánk egy váratlan eredménye volt, hogy habár a 13 általunk vizsgált terület közül 10 (BNSTdl, BNSTdm, BNSTv, BNSTfu, MeA, BLA, PVNp, PVNm, DR, S1) igen alacsony bazális FOS immunreaktivitást mutatott a stresszelt csoportokhoz viszonyítva a különböző korcsoportokban, 3 mag (CeA, BNSTov, EWcp) jelentősebb bazális FOS immunreaktivitást mutatott az 1 hónapos korcsoportban. 1,5 hónapos kortól aztán ez már csökkent, és hasonló mintázatot mutatott, mint a többi mag esetében. A viszonylag magas bazális FOS aktivitás jelentőségét nem ismerjük, de mivel a BNSTov és a CeA CRH-t, az EWcp UCN1-t tartalmaz, felvetődik, hogy az állatok negyedik héten esedékes leválasztását követően magasabb FOS aktivitás szükséges a megfelelő stresszadaptációhoz az érzékeny juvenilis korban (Horovitz és mtsai., 2012).

### 6.III.2. A FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás életkorfüggő dinamikája

#### 6.III.2.1. Az ARS által kiváltott FOSB/ $\Delta$ FOSB válasz agyterületspecifikus módon függ az életkortól

Tizenegy magban (CeA, MeA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, BNSTv, BNSTfu, LHb, PVN, DR, EWcp) a FOSB/ $\Delta$ FOSB immunjel növekedett ARS-t követően, de erősen életkorfüggő módon. A BNSTfu, BNSTv és a PVN a vizsgált élettartam alatt végig reagált, a HPA tengely változatlan CORT válaszában megfelelően (Sterrenburg és mtsai., 2011, 2012 Herman és mtsai., 2001; Kovács és mtsai., 2018). Nyolc mag (CeA, MeA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, LHb, EWcp és DR) csak meghatározott életkorban adott FOSB/ $\Delta$ FOSB választ. A 2 hónapos korban hét (CeA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, BNSTdm, DR, EWcp), 3 hónapos korban 4 (BNSTdm, LHb, EWcp, DR), 6 hónapos korban hat (MeA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, LHb és DR) mag reagált az ARS-re megnövekedett FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitással. Az egészen fiatal, 1 és 1,5 hónapos és az idősebb korcsoportok (12 hó felett) alacsonyabb reaktivitást mutattak az ARS-re.

Úgy tűnik tehát, hogy a 2-3 hónapos (késői adolescens, fiatal felnőtt korú) patkányok magasabb FOSB/ $\Delta$ FOSB érzékenységet mutatnak, ami egybeesik a hangulatzavarokra való fokozott fogékonyság időszakával (McCormick és mtsai., 2010, Spear, 2000; McCutcheon és Marinelli, 2009; Sengupta, 2013, Kovács és mtsai., 2018, 2019).

Az életkorfüggő FOSB/ $\Delta$ FOSB dinamika összehasonlítása alapján öt mag (MeA, BNSTv, MHb, LHb, DR) viszonylag alacsony FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitást mutatott 1 és 1,5 hónapos korban, amely 2 és 3 hónapos korban emelkedett, majd felnőttkorban (12 hó), a korai (18 hó) és a késői szenescenciában (24 hó) ismét csökkent. Ettől eltérően, hat másik régióban

(CeA, BLA, BNSTov, BNSTdl, EWcp és S1) a legfiatalabb (1,5-2 hó) patkányok mutatták a legmagasabb FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitást, amely idősebb korban (18-24 hó) csökkent, serdülőkori csúcs nélkül.

A PVN ARS esetén a teljes élettartam alatt folyamatosan magas FOSB/ $\Delta$ FOSB ir-t mutat. Ez élesen eltér a PVN/FOS válasz dinamikájától, amely az öregedéssel csökkent (Kovács és mtsai., 2018). Ez arra utal, hogy a FOSB/ $\Delta$ FOSB, és nem a FOS válasz tarthatja fenn az AP1 által vezérelt ARS hatására bekövetkező adaptív változásokat a PVN-ben, idős korban. Mivel a PVN/CRH neuronok FOSB/ $\Delta$ FOSB válasza az életkor előrehaladtával csökken (Kovács és mtsai., 2019), további vizsgálatok szükségesek azoknak a PVN sejteknek az azonosítására, amelyek fenntartják, esetleg növelik reaktivitásukat idős korban.

6.III.2.2 A CVMS által kiváltott FOSB/ $\Delta$ FOSB ir agyterületspecifikus módon függ az életkortól

A CVMS három területen (BNSTfu, LHb, PVN) növelte a FOSB/ $\Delta$ FOSB jelet minden vizsgált korcsoportban, ami összhangban van a korábbi, azonos (Kovács és mtsai., 2019) vagy nagyon hasonló (Sterrenburg és mtsai., 2011, Zhang és mtsai., 2019) krónikus stresszmodelleket alkalmazó vizsgálatok eredményeivel. A PVN/CRH neuronok az egész élettartam során konstans FOSB/ $\Delta$ FOSB reakciót mutatnak a CVMS-re (Kovács és mtsai., 2019), és ezzel összhangban Herman és mtsai., (2001) azt találták, hogy a patkányok egy intermittáló krónikus stresszmodellben a 3 és 33 hónapos kor között állandó CORT-választ mutatnak. Ezek arra utal, hogy a FOSB/ $\Delta$ FOSB részt vehet a Crh gén hosszabbtávú szabályozásában (Kageyama és mtsai., 2014), mivel annak promótere AP1 kötőhelyeket tartalmaz (Malkoski és Dorin, 1999). A jelenlegi eredmények alapján az életkorfüggetlen FOSB/ $\Delta$ FOSB reakció nem tűnik specifikusnak a PVN CRH sejteire, és felmerül a thyrotropin-releasing hormon tartalmú sejtek szerepe is.

A legtöbb vizsgált mag (MeA, CeA, BNSTdm, BNSTv, BNSTfu, MHb, LHb, DR) csak egy vagy két vizsgált életkorban mutatott szignifikáns FOSB/ $\Delta$ FOSB választ a CVMS-re, melynek két csúcsát 6 (CeA, MHb, LHb, DR) és 18 hónapos korban (BNSTdm, BNSTv, BNSTfu) láttuk. A CVMS által kiváltott FOSB/ $\Delta$ FOSB válasz tehát a felnőttkorra és a korai szenescenciára jellemző (6 hó, 18 hó), és ellentétben áll az ARS által kiváltott FOSB/ $\Delta$ FOSB válasz életkorfüggő dinamikájával.

Tíz régió (MeA, BLA, BNSTdl, BNSTdm, BNSTv, MHb, LHb, DR, EWcp, S1) mutatott életkorfüggő FOSB/ $\Delta$ FOSB dinamikát CVMS-ben. A legmagasabb FOSB/ $\Delta$ FOSB jelet 3



hónapos korban észleltük a BNSTdl, BNSTdm, BNSTv, EWcp, DR területén. A MeA és az S1 esetében a maximumot 2 hónapnál, míg a habenula magjai (MHb, LHb) 6 hónapnál mutatták a maximumot. Ezután csökkenést láttunk, és a legalacsonyabb értékeket 24 hónapos állatokban figyeltük meg. Ez a dinamika hasonló a FOS ARS (Kovács és mtsai., 2018), és a FOSB/ $\Delta$ FOSB (Kovács és mtsai., 2019) CVMS modellben látott változásaihoz.

Négy magban (CeA, BNSTov, BNSTfu, PVN) nem észleltünk életkorfüggő változást a FOSB/ $\Delta$ FOSB jel nagyságában a CVMS állatokban. Ezek közül, a hangulatszabályozásban is szerepet játszó extrahypothalamicus CRH sejtpopulációk (Choi és mtsai., 2007; Herman és mtsai., 2016) a korrallal csökkenő FOSB/ $\Delta$ FOSB aktivációt mutatnak (Kovács és mtsai., 2019). További vizsgálatokra van tehát szükség azoknak az idegsejteknek az azonosítására, amelyek fenntartják a változatlan FOSB/ $\Delta$ FOSB tartalmat ezekben a magokban.

A primer szomatoszenzoros (S1) kéreg is bekerült ebbe a vizsgálatba, hogy teszteljük, vajon a szenzoros rendszerek a természetes öregedéssel összefüggő érzékenységcsökkenése hozzájárulhatott-e a FOSB/ $\Delta$ FOSB-válasz csökkenéséhez. Korábbi munkánkban azt láttuk, hogy az ARS-re adott FOS válasz U alakú dinamikát mutat, ami arra utal, hogy az öregedéssel összefüggő reaktivitáscsökkenés nem magyarázza a FOS válasz csökkenését (Kovács és mtsai., 2018). Bár ebben a vizsgálatban a FOSB/ $\Delta$ FOSB jel CVMS válaszában kisebb csökkenése bekövetkezett az életkor előrehaladtával, a csökkenés limitált mértéke és a magas bazális expresszió arra utal, hogy a szenzoros rendszerek nem károsodtak jelentősen patkányainkban. A megfigyelt csökkenés részben az öregedéssel összefüggő agykérgi atrófiának is tulajdonítható (Yang és mtsai., 2021).

Az alap kutatásokban gyakran használnak 2 hónapos patkányokat és ezeket már "felnőttnek" tekintik, holott patkányoknál ez a késői serdülő, korai felnőttkor (McCutcheon és Marinelli, 2009; Sengupta, 2013). Ekkor, neuronális markerek expresszióváltozása (Caballero és mtsai., 2014), felgyorsult axon- és szinaptikus fejlődés (Crews és mtsai., 2007), reorganizáció és myelinizáció jellemző (Brenhouse és Andersen, 2011; Green és McCormick, 2013). Az ARS által kiváltott PVN FOS reaktivitás 2 hónapos korban tetőzik (Kovács és mtsai., 2018), majd csökken. Ezzel szemben, a FOSB/ $\Delta$ FOSB markernél életkortól független ARS választ láttunk. Ezért, eredményeink egyik módszertani szempontból lényeges konklúziója az, hogy ha fiatal állatokat használunk, akkor az életkortól független dinamikájú aktivitási markerek használata szükséges a központi idegrendszer serdülő- és fiatal felnőttkori nagy plaszticitása miatt (Crews és mtsai., 2007; McCutcheon és Marinelli, 2009; Eiland és Romeo, 2013).

Összefoglalva, ebben a projektben a FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás szisztematikus értékelését végeztük el kontroll, ARS és CVMS exponált hím patkányoknál a teljes élettartamot felölelően. A legmagasabb ARS által kiváltott FOSB/ $\Delta$ FOSB tartalom a vizsgált magokban a késő serdülőkorra, kora felnőttkorra (1,5-3 hó) volt jellemző. A CVMS-re adott FOSB/ $\Delta$ FOSB válasz maximuma kevésbé esett egy életszakaszra, 2 és 12 hónap között változott a vizsgált agyterületeken. A PVN és a BNSTfu nem mutatott korfüggő FOSB/ $\Delta$ FOSB csökkenést. A FOSB/ $\Delta$ FOSB emelkedés mértéke életkorhoz és stresszorhoz kötött. A FOSB/ $\Delta$ FOSB emelkedésének életkorhoz kapcsolódó dinamikája eltér a FOS-étól, ami a funkciójuk különbségére utalhat.

6.III.3. A CRH tartalmú idegsejtek azonnali gén aktivációjának korfüggő dinamikája akut és krónikus stressz modellekben

Az idegsejtaktiváció térképezése után a CRH tartalmú idegsejtek FOS és FOSB/ $\Delta$ FOSB tartalmát vizsgáltuk a PVN, CeA és BNSTov területén ARS-nek és CVMS-nek kitett patkányokban. Feltételezésünk az volt, hogy a CRH neuronok számát és azonnali gén expresszióját a stresszor típusa és az életkor is befolyásolja.

6.III.3.1. CRH neuron aktiváció ARS hatására az életkor függvényében

A PVN/CRH sejtek száma, amelyek FOS-t is tartalmaznak, akut stresszben emelkedik (Crane és mtsai., 2005, Rotllant és mtsai., 2007), melynek mértéke nagyobb a prepubertás korú állatokban, mint a fiatal felnőtt patkányokban (Romeo és mtsai., 2006). Saját eredményeink is megerősítik, hogy az ARS által kiváltott PVN/CRH FOS válasz nagysága a korrallal csökken, és ez a dinamika az állatok 24 hónapos koráig fennáll. A glutamáterg PVN/CRH neuronok (Hrabovszky és mtsai., 2005) a HPA tengelyt szabályozzák. Az életkorrallal csökkenő PVN/CRH FOS reakció alapján a HPA tengely aktivitásának csökkenését is feltételeznénk, de ezt nem támasztották alá a CORT méréseink eredményei, mások munkáival összhangban (Lupien és mtsai., 2005, Koenig és mtsai., 2011). Ezt az magyarázhatja, hogy a hypophyseotrop CRH neuronok nem feltétlenül tartalmaznak kimutatható mennyiségű FOS-t, annak ellenére, hogy emelik a HPA tengely aktivitását (Aguilera and Liu, 2012). A CRH-FOS-FOSB/ $\Delta$ FOSB jelölés eredményei azt mutatják, hogy 2 órával az akut restraint stressz megindítását követően mind a CRH-FOS, mind a CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB sejtszámok megemelkednek. Habár irodalmi adatok szerint a FOS jel maximuma korábban jelenik meg, mint a FOSB/ $\Delta$ FOSB-nél (Kovács 1998, 2008, Nestler 2008), nem találtunk jelentős különbséget a két azonnali gént kifejező sejtek számában a korfüggő ARS által előidézett expressziós mintázatok összehasonlításakor.

A CeA és BNSTov CRH neuronjai stresszben aktivált FOS expressziója ismert (Criado és Morales 2000, Butler és mtsai., 2016), bár akut immobilizáció (Rotllant és mtsai., 2007) és audiogén stressz (Helfferrich és Palkovits 2003) expozíció nem okozott FOS immunjel növekedést bennük. Az utóbbi irodalmi adatokkal vágnak egybe saját eredményeink is. Metszetenként csupán 2-3 sejtet, az összes BNSTov/CRH illetve CeA/CRH sejt mindössze 2-4%-át tette ki a FOS pozitivitást is mutató neuronok aránya, melynek biológiai jelentősége elhanyagolható lehet. Ezzel ellentétben, számottevő FOSB/ $\Delta$ FOSB aktivitást láttunk jelentős bazális jel mellett, melyre az ARS hatása minimális volt, de mind a bazális mind az ARS után mért FOSB/ $\Delta$ FOSB jel csökkent a korrallal. A CeA és BNSTov CRH sejteinek aktivitásváltozása hasonló dinamikát mutat, melyet magyarázhat, hogy direkt összeköttetésben állnak egymással (Dong és mtsai., 2001), és mindkét CRH sejtcsoport GABAerg (Sparta és mtsai., 2013, Partridge és mtsai., 2016). A CeA/CRH sejtek a LC-hoz (Kravets és mtsai., 2015, Paretkar és Dimitrov, 2018) és a DR-hoz (Weissbourd és mtsai., 2014) küldenek rostokat, hasonlóan a BNSTov/CRH neuronokhoz (Van Bockstaele és mtsai., 1999, Weissbourd és mtsai., 2014, Sunstrum és Inoue 2018), bár kiemelendő, hogy utóbbi a PVN működésére is hat (Aguilera és Liu, 2012). Ez alapján felmerül, hogy a CeA és BNSTov CRH sejteinek időskori aktivitáscsökkenése hatással bír a szerotoninerger (DR) és noradrenerger (LC) (Borsody és Weiss 1996) területeken, valamint a PVN neuronjain. Mivel a GABAerg rostok főleg a PVN-t körbe ölelő (periPVN) GABA-erg gyűrűn végződnek, továbbá a PVN több, számos egyéb területről kap direkt afferentációt (pl.: BNSTfu, LS, DMH, LC, NTS, DR) melyek akár ellentétes irányban is befolyásolhatják az aktivitását (Herman és mtsai., 2016), nem szükségszerű, hogy az általunk a BNSTov-ben látott korfüggő változás megegyezzen a PVN-ben látott dinamikával, de a PVN/CRH sejtek glutamaterger jellege is magyarázat lehet az eltérésre.

#### 6.III.3.2. CRH neuron aktiváció CVMS hatására az életkor függvényében

Ebben a projektben azt figyeltük meg, hogy a PVN/CRH neuronok nem mutatnak korfüggő FOSB/ $\Delta$ FOSB aktivitásváltozást CVMS-ben. Jelen eredményeinkkel összhangban, korábbi egér (Kormos és mtsai., 2016) és patkánykísérleteink (Sterrenburg és mtsai., 2011) is rámutattak, hogy a CVMS fokozza a FOSB/ $\Delta$ FOSB megjelenését a PVN területén, ahogy azt más laboratóriumokban is látták (de Andrade és mtsai., 2014) a CRH sejtekben (Radley és Sawchenko, 2015 Kiss és Majercikova, 2017). Szemben a FOS kifejeződésével, a CRH sejtek CVMS hatására bekövetkező FOSB/ $\Delta$ FOSB válasza független az életkortól, hiszen a kettősen jelölt sejtek száma nem csökkent az idős állatainkban sem. A CVMS által kiváltott PVN/CRH FOSB/ $\Delta$ FOSB válasz nem változott az életkorral szignifikáns mértékben; de ha a 3, 12, 18 és

24 hónapos CVMS-nek kitett állatok CRF-FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitását vizsgáljuk, a változások iránya feltűnő hasonlóságot mutat a Tenk és mtsai. (2017) által megfigyelt *Crh* mRNS korfüggő ingadozásával.

A CeA és BNSTov CRH sejteinek vizsgálatakor azt láttuk, hogy aktivitásuk nem függ a CVMS-től, de mértéke csökken a korrall. Ez összhangban van korábbi (Sterrenburg és mtsai., 2011, Majercikova és Kiss, 2015) fiatal felnőtt patkányokon végzett kísérletek eredményeivel. Néhány BNSTov- és CeA/CRH neuron mind a kontroll állatokban, mind CVMS után is aktív volt. Ugyanakkor, a PVN-ben látottakkal ellentétben, a FOSB/ $\Delta$ FOSB aktivitás jelentősen csökkent az korrall. E különbség hátterében a sejtek eltérő neurokémiai karaktere állhat (Deussing és Chen, 2018), de az eltérő korfüggő dinamika biológiai jelentőségének feltérzése további kísérletek tárgyát kell, hogy képezze.

Az azonnali géntermékek, mint a FOS és a FOSB/ $\Delta$ FOSB, kimutatása kedvelt eszköze a sejtek környezeti stimulusra adott transzkripciós szintű válaszána kimutatására. Ismert azonban a módszer néhány olyan limitációja, amelyeket tekintetbe kell venni eredményeink értelmezése során. Az általunk vizsgált AP1 alegységek, a FOS és FOSB/ $\Delta$ FOSB (Kovács, 1998) fehérjék csak egy bizonyos küszöbérték feletti stimulus esetén jelennek meg (Worley és mtsai., 1993), amikor új gének kifejeződését igénylő adaptációs folyamatokra indulnak meg (Kovács, 2008). Az azonnali géntermékek megjelenése ezért a sejtben nem mutat közvetlen összefüggést a neuron elektromos aktivitásával, hiszen, ha így lenne, a kontroll állatokból származó minták esetében is milliónyi FOS ir sejtet látnánk (Kovács, 2008). Másrészt, ismertek olyan tónusos gátló neuronok, mint pl. a hallópálya glicinerg sejtjei (Reisch és mtsai., 2007), melyek nem fejeznek ki FOS-t. Eredményeink interpretálása szempontjából tehát fontos limitáció, hogy a sejtek gátlását a módszer nem mutatja ki (Kovács, 1998). Eredményeink értelmezését az is korlátozza, hogy az AP1 a sejt által adott választ nagyon sokrétűen befolyásolhatja, ugyanis számos gén promótere tartalmaz az AP1 transzkripciós faktor kötődésére alkalmas szekvenciát. Ezért, egy szövettani festés során a FOS vagy FOSB/ $\Delta$ FOSB immunjel megjelenése a sejtmagban önmagában csak arról ad információt, hogy új gének aktiválódnak, de az, hogy pontosan melyek ezek, és mi ennek a funkcionális következménye, rejtve marad.

Egy további, de áthidalható technikai limitációt jelentett, hogy az általunk alkalmazott kereskedelmi forgalomban elérhető antiszérum, mind a rövidebb féléletidejű (full length) FOSB-t, mind a később, kisebb mennyiségben megjelenő, de hosszú felezési idejű  $\Delta$ FOSB fehérje variánst is felismeri. Ezért, annak érdekében, hogy a CVMS modell egyedeiben elkerüljük az akut stressz által kiváltott full length FOSB detektálását, a krónikus stressznek

kitett állatainkat az utolsó stresszor alkalmazását követően egy nappal perfundáltuk. Így az antiszérum már nem kötődhetett az akut stresszben megjelenő teljes hosszúságú FOSB-hez, mert az a mintavételezés idején már lebomlott, és ezért már csak a hosszú felezési idejű  $\Delta$ FOSB variánst detektálhatta.

Összefoglalva, a CRH tartalmú agyterületeken végzett vizsgálat megerősítette, hogy a PVN esetében a FOS főleg a CRH tartalmú sejtekben jelenik meg ARS-ben, melynek mértéke az életkor előrehaladtával csökken. Ezzel szemben, a CVMS indukálta CRH-FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás nem változik a korrallal. A CeA és BNSTov CRH neuronok FOS és FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitása nem mutat jelentős változást akut és krónikus stressz hatására, de a kontroll állatokban a CeA és BNSTov CRH neuronjaiban jelentős FOSB/ $\Delta$ FOSB immunjel látszott, mely az életkorrallal csökkent. Tanulmányunk majdnem a teljes élettartamot felölelő képet ad a patkány PVN, CeA és BNSTov CRH neuronjainak FOS és FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitásáról ARS és CVMS hatására. Mivel az immunreaktivitást erősen befolyásolja az állatok életkora, az állatkísérletek tervezése során különös gonddal kell eljárni a megfelelő korú állatok és az alkalmas vizsgálandó azonnali gének kiválasztásánál.

#### **6.IV. Az EWcp, mint az energiaegyensúly szabályozásában szerepet játszó stresszadaptációs központ vizsgálata**

Jelen dolgozat alapját két olyan közlemény is képezi, amelyek egy több kutatócsoport által végzett nemzetközi kollaborációban készültek azzal a céllal, hogy felderítsük az EWcp jelentőségét az energiaegyensúly szabályozásában.

6.IV.1. A MC4R ligandumok modulálják az energiaháztartást az EWcp/UCN1 neuronokon keresztül

Ebben a munkánkban azt feltételeztük és sikerrel bizonyítottuk, hogy a melanocortin rendszer befolyásolhatja az EWcp/UCN1 sejteket. Morfológiai evidenciát szolgáltatunk arra, hogy az EWcp/UCN1 sejteket alpha-MSH és AgRP ir idegrostok idegzik be. Egy korábbi, a melanocortinok agyi eloszlását térképező munka alátámasztja ennek lehetőségét, bár Bagnol és mtsai. (1999) nem vizsgálták, hogy van-e a melanocortin tartalmú rostok és az UCN1 neuronok között szoros kapcsolat. A melanocortin rendszer és az EWcp közötti kölcsönhatás további neuroanatómiai alapját bizonyítottuk azzal, hogy az UCN1 neuronok több mint 90%-ában MC4R-t találtunk. Bár az MC4R jelenlétéről a PAG-ban már korábban beszámoltak (Alvaro és mtsai., 1996), mi írtuk le elsőként a MC4R jelenlétét az UCN1 neuronokban. A MC4R promóter által szabályozottan GFP expresszáló MC4R riporter egerekben is végeztünk morfológiai

vizsgálatokat (Liu és mtsai., 2003; Cui és mtsai., 2012). Bár a szerzők a tanulmányaikban nem sorolják fel és nem tárgyalják az EWcp-t, mint expressziós helyet, a publikációik ábráin (lásd a 2.J ábrát a Liu és mtsai. (2003) és a 4.A ábrát Cui et és mtsai., (2012) cikkeiben) az EWcp területén a GFP expresszió egyértelműen bizonyítja a MC4R expresszióját, egerben. Ez összhangban van a patkányra vonatkozó jelen eredményeinkkel. Mindez beleillik abba a képbe, hogy az EWcp az energiahomeosztázis szabályozásának fontos központja, tekintettel arra, hogy az UCN1 neuronok leptin- (Xu és mtsai., 2009), ghrelin- (Zigman és mtsai., 2006), NPY Y1- és Y5- (Gaszner és mtsai., 2007) valamint orexin receptort (Emmerzaal és mtsai., 2013) hordoznak és így az energia homeosztázisra vonatkozó sokrétű információt kapnak.

Azt is teszteltük ebben a projektben, hogy az akut negatív energiaegyensúly (koplalás) okoz-e funkcionális-morfológiai változást az UCN1 neuronokban. Megnövekedett UCN1 SSD-t láttunk a koplaltatott patkányokban, összhangban korábbi munkánkkal, ahol az *Ucn1* mRNS upregulációját figyeltük meg éheztetett patkányokban (Xu és mtsai., 2009). Az UCN1 neuronokban emelkedett FOSB immunreaktivitást találtunk a koplaltatott állatokban, mely a sejtek hosszabb távú, a génkifejeződés szintjén bekövetkező adaptációját mutatja (Vialou és mtsai., 2015). Korábban, a FOS markert használva nem láttuk a CART/UCN1 neuronok aktiválódását éhezés alatt (Xu és mtsai., 2009). Ez a látszólagos ellentmondás azzal oldható fel, hogy a FOS gyorsan eltűnik a stimulus után a sejtekből (Kovács 1998, 2008), míg a FOSB elnyújtottabb dinamikával növekszik (Nestler és mtsai., 1999; Pertotti és mtsai., 2004; Kovács 1998, 2008; Sterrenburg és mtsai., 2011) és a 48 órás koplalás után is detektálható még. Ebben a kísérletben azt is láttuk, hogy a koplalás csökkentette az alpha-MSH és növelte az AgRP SSD-t az UCN1 neuronokkal szomszédos terminálisokban, mely teljes összhangban vannak a korábbi vizsgálatok eredményeivel (Cone és mtsai., 2006). Bár a fenti morfológiai megfigyelések nem bizonyítják az ok-okozati kapcsolatot az anorexigén és orexigén peptidfelszabadulás mennyisége és az UCN1 expresszió nagysága között, mégis azt sugallják, hogy ez lehet a helyzet.

E kérdés egyértelmű eldöntésére farmakológiai megközelítést alkalmaztunk. Itt azt láttuk, hogy koplaltatott patkányokban az MC4R HS024-gyel történő blokkolása tovább növelte az EWcp UCN1 tartalmát és a már amúgy is megemelkedett FOSB immunjelet is. Mivel az exogén alpha-MSH injekció nem okozott jelentős további változást, feltételezzük, hogy az MC4R endogén inverz agonistája, az AgRP elfoglalhatta a MC4R kötőhelyeket az éhező patkányokban. A HS024 erős MC4R gátló hatása magyarázhatja a FOSB további emelkedését.

*In vivo* funkcionális eredményeink további bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a melanocortinok az EWcp UCN1 neuronjain keresztül befolyásolják az energia homeosztázist. Az alpha-MSH EWcp-be injektálása által kiváltott hipermetabolikus hatás hasonlít az oldalkamrába adott alpha-MSH hatásához (Balaskó és mtsai., 2010). Amikor nem éheztetett patkányoknak adtunk alpha-MSH-t, a spontán táplálékfelvételük csökkent. Koplaltatott patkányaink alpha-MSH injekció után az újratáplálás alatt is kevesebb tápot fogyasztottak, ami összhangban van az alpha-MSH jól ismert anorexigén hatásával (Gantz és mtsai., 1993). Az UCN1 intracerebroventrikuláris (Spina és mtsai., 1996) és intracerebrális injekciója anorexigén hatású és immunneutralizációja a ventromedialis hypothalamus-ban növeli a táplálékfelvételt (Ohata és mtsai., 2000). Az egér EWcp elektrolitikus léziója megváltoztatja a táplálkozási viselkedést (Weitemier és Ryabinin, 2005) a testtömeg befolyásolása nélkül és az etanol által kiváltott hipotermiát is kivédi (Turek és Ryabinin, 2005). A patkány EWcp neuroanatómiai kapcsolatait figyelembe véve (Bittencourt és mtsai., 1999; da Silva és mtsai., 2013; Dos Santos Júnior és mtsai., 2015) több szereplő is részt vehet az UCN1 neuronok energia homeosztázisra gyakorolt hatásában, de két hipotetikus downstream irányt lehet kiemelni.

Az első a DR lehet, mivel az patkányban kétirányú kapcsolatokkal rendelkezik az EWcp/UCN1 neuronokkal (Kozicz 2010; Dos Santos Júnior és mtsai., 2015; van der Doelen, 2017). Mivel a DR neuronok stresszfüggően fejezik ki a CRH receptorokat (Waselus és mtsai., 2009), és a CRH2R aktiválása fokozott FOS reakciót okoz patkány DR-ban (Amat és mtsai., 2004), nem kétséges, hogy az UCN1 és a DR/5HT között kölcsönhatás van. Turek és Ryabinin (2005) például kimutatta, hogy a DR-ba adott UCN1 injekció a CRH2R-n keresztül hipertermiát vált ki, ami CRH-val nem volt kiváltható. Majmokban kimutatták, hogy a magas zsírtartalmú étrend lecsökkenti az UCN1 és a CRH2R expresszióját a DR-ben (Bethea és mtsai., 2015). Ezek alapján a melanocortinok az UCN1 neuronokon keresztül befolyásolhatják a DR/5HT sejtjeit, mely a táplálékfelvétel és az energiaegyensúly szabályozásában összetett szereppel bír (Lam és mtsai., 2010; Luo és mtsai., 2016).

A második lehetőség, a szimpatikus idegrendszerrel fennálló kapcsolat, mivel UCN1 ir idegrostokat figyeltek meg a patkány (Bittencourt és mtsai., 1999) és az egér gerincvelő oldalsó szarvában, ahol ezek CRH2R-t expresszáló sejtekkel érintkeztek (Korosi és mtsai., 2007). Bár kísérletes megerősítésre vár, feltételezhető, hogy az EWcp-be adott alpha-MSH injekció által okozott perifériás értágulat ennek a kapcsolatnak tulajdonítható a vazomotor hatású preganglionáris szimpatikus neuronok felé. Ez utóbbi hipotézist alátámasztja korábbi (Shah és

mtsai., 2013) és legutóbbi (Xu és mtsai., 2022) munkánk, amelyben bizonyítottuk az EWcp/UCN1 neuronok és a szimpatikus idegrendszer közötti neuroanatómiai kapcsolatot.

Összefoglalva, az alpha-MSH- és AgRP tartalmú idegrostok és az MC4R ir UCN1 neuronok közötti szoros kapcsolat erős bizonyítékot szolgáltatott a melanocortinok és EWcp/UCN1 sejtek kölcsönhatására. A koplalás csökkentette az alpha-MSH, növelte az AgRP immunreaktivitást az EWcp/UCN1 perikaryon-ok körül, mely UCN1 és FOSB immunjel növekedéssel járt együtt. Az EWcp-ben a MC4R farmakológiai manipulációja bizonyította, hogy az alpha-MSH táplálékfelvételre és energiaegyensúlyra gyakorolt hatását legalább részben az EWcp/UCN1 neuronok közvetítik.

#### 6.IV.2. Kapcsolat az EWcp és a fehér zsírszövet között

Ebben a projektben az volt a cél, hogy kapcsolatot találjunk az EWcp/LepRb/UCN1 neuronok és a fehér zsírszövet között. Alapfeltételezésünket alátámasztja, hogy a leptin képes kötődni az EWcp neuronjaihoz, perifériás injekciója után 2 órával aktiválja a sejtekben pSTAT3 utat, 4 órával a beadás után csökkenti a pERK jelátvitelt és modulálja az *Ucn1* expresszióját. Azt is láttuk, hogy az EWcp/UCN1 neuronok preszimpatikus beidegést adnak a fehér zsírszövet felé és befolyásolják a zsírszövet szerkezetét és funkcióját.

##### 6.IV.2.1. A leptin több jelátviteli utat is aktivál az EWcp neuronjaiban

Kimutattuk, hogy a leptin valóban kötődik a receptorához az EWcp/*Ucn1* neuronokon, ami arra utal, hogy a leptin közvetlenül szabályozhatja az UCN1 neuronok aktivitását az EWcp-ben. Ezt az is alátámasztja, hogy a leptinkezelés 2 óra alatt indukálta a pSTAT3-at, mely 4 óránál visszaesett, hasonlóan a pSTAT3 ventromediális hypothalamikus aktivációs dinamikájához (Faouzi és mtsai., 2007). A leptin viszonylag átmeneti hatása az EWcp-ben összhangban van a leptin azonnali, rövid tartamú hatásával, mely a sejtek elektromos aktivitásának változásában is tetten érhető volt (Xu és mtsai., 2011).

A leptin a LepRb útján más jelátviteli utakat is aktiválhat, mint a PI3K-AKT (Niswender és mtsai., 2001; 2004) és a MAPK-ERK útvonalak (Rahmouni és mtsai., 2009). Jelen vizsgálatunkban az EWcp-ben nem láttunk az AKT foszforilációt, ami arra utal, hogy ez nem vesz részt a leptin hatás jelátvitelében ezen a területen. Ez abból a szempontból nem meglepő, hogy a hypothalamus-ban sem láttunk változást a pAKT mennyiségében leptininfúzió hatására (Burgos-Ramos és mtsai., 2010). A pERK aktiváció tekintetében azonban azt találtuk, hogy 4 órával a leptin beadása után mennyisége jelentősen csökkent a sóoldattal kezelt patkányokhoz képest. Ez a dinamika különbözik attól, amit az agy más részein megfigyeltek. A leptin például



30 perc alatt aktiválja a pERK-t a hypothalamus-ban, de a nucleus tractus solitarii-ben nem láttak ilyen leptinhatást (Benomar és mtsai., 2005; Rahmouni és mtsai., 2009).

A leptin által előidézett STAT3 aktiváció tehát arra utal, hogy a leptin részt vehet a hosszabb távú transzkripciós változások, például az *ucn1* génexpresszió szabályozásában. Mivel az *ucn1* gén működése időfüggő módon változott, ahogy azt a 2 és 4 órával a leptin beadása után emelkedő *Ucn1* mRNS expresszió és a 4 óránál megnövekedett UCN1 immunreaktivitás mutatta, arra a következtetésre jutottunk, hogy a leptin közvetlenül kötődik a LepRb-hoz az EWcp/UCN1 neuronokon, STAT3 aktivációt indukál, ami növeli az UCN1 bioszintézisét, melyet az *Ucn1* mRNS expresszió kezdeti, majd a peptidtartalom időben eltoltnövekedése bizonyít.

6.IV.2.2. Az EWcp/LepRb/UCN1 neuronok a vegetatív idegrendszeren keresztül szabályozzák a fehér zsírszövet mennyiségét

Korábbi vizsgálatokból jól ismert, hogy a zsírszövet PRV jelölése a PVN és az area preoptica medialis, valamint az agytörzs és a gerincvelő számos magja erősen jelölődött (Bamshad és mtsai., 1998). A szimpatikus idegrostok a thoracalis gerincvelői IML-ből indulva a ganglion stellatum-ban átkapcsolva részt vesznek a fehér zsírszövetet idegi szabályozásában (Geerling és mtsai., 2014). Ebben a kísérletben azt láttuk, hogy az EWcp/UCN1 neuronok retrográd módon jelölődtek a zsírszövetbe adott PRV injekciót követően. A BDG specifikus retrográd, transzneurális terjedést mutat, és a humán CMV promóter szabályozása alatt azonnal kifejezi a GFP-t, ami lehetővé teszi a fertőzött neuronok korai azonosítását. Az EWcp-ben megfigyelt vírusjelölés tehát azt bizonyítja, hogy idegi kapcsolat van a mag és a zsírszövet között. Megjegyzendő azonban, hogy ezzel a technikával nem tudjuk meghatározni, hogy az EWcp és az IML közötti kapcsolat közvetlen vagy közvetett-e. Ezért, nem tudjuk kizárni, hogy a kapcsolat vagy annak egy része nyúltvelői vagy egyéb területek vegetatív magjain keresztül is fennállhat. Az a korábbi megfigyelés azonban, hogy UCN1 ir rostok idegzik be az IML-t (Korosi és mtsai., 2007), arra utal, hogy az EWcp közvetlenül (is) szabályozhatja a szimpatikus idegrendszert (Cano és mtsai., 2021).

Általánosságban elmondható, hogy a fehér zsírszövetre ható megnövekedett szimpatikus aktivitás növeli a zsírszöveti lipolízis útján a plazma TG szintjét. Ez utóbbi a szabad zsírsav (FFA) felszabadulást és a májban fokozottan nagy alacsony denzitású lipoprotein (VLDL) szintézisét okoz. A LepRb/UCN1 neuronok ablációja jelentős zsírtömeg emelkedést eredményezett az adipocyták méretének növekedése miatt. Továbbá, az EWcp/LepRb/UCN1 neuron abláció után alacsonyabb plazma TG, LDL és HDL szintet láttunk, ami a csökkent

lipolitikus aktivitás magyarázhat. Ez a keringő FFA csökkenéséhez és a máj VLDL termelésének szubsztráthiányához vezet, ami a plazma LDL- és TG szintjét csökkenti. Összességében a zsírtömeg és a plazma lipidek elemzése arra utal, hogy a LepRb/UCN1 neuronok ablációja a lipolízis csökkenéséhez vezet melynek hátterében a fehér zsírszövet csökkent szimpatikus stimulációja állhat.

A barna zsírszövet erős szimpatikus beidegzés alatt áll (Boulant, 2000; Watanabe és mtsai., 1994) és a terminálisokból származó noradrenalin az ADRB3 útján serkenti a termogenezist (Bartness és Song, 2007) valamint az UCP1 szintézisét. Az EWcp/LepRb/UCN1 neuronabláció a barna zsírszövet tömegnövekedését eredményezte, mely együtt járt az *Adrb3* és *Ucp1* mRNS fokozott expressziójával. Ezek az eredmények alátámasztják, hogy az EWcp/LepRb/UCN1 sejtek hozzájárulnak a szimpatikus idegrendszer útján a barna zsírszövet hőtermelésének magasabb rendű szabályozásához. Ez összhangban van azzal, hogy a MC4R agonisták EWcp injekciója aktiválja az UCN1 neuronokat, ami fokozott perifériás vazodilatáció révén a hőleadás emelkedéséhez vezet (Füredi és mtsai., 2017).

#### 6.IV.2.3. Az EWcp/LepRb/UCN1 neuronok szerepe az energiaegyensúlyban

Az EWcp/LepRb/UCN1 neuronok ablációja nem okozott jelentős változást a táplálékfelvételben és a testtömegben. Ez azt sugallja, hogy az EWcp/LepRb/UCN1 abláció hatása nem függ össze a leptin és UCN1 jól ismert anorexigén hatásától. Korábbi vizsgálatok szerint a centrálisan alkalmazott UCN1 kezelés a táplálékfelvételt erőteljesen csökkentette (Spina és mtsai., 1996) és növelte az oxigénfogyasztást (De Fanti és Martinez, 2002). Jelen kísérletünkben azt láttuk, hogy a EWcp/LepRb/UCN1 ablációt követő első héten átmenetileg csökkent a légzési hányados a világos napszakban, ami a fokozott zsírfelhasználást jelez, és arra utal, hogy az UCN1 neuronok modulálják a zsír lipidmobilizációt és a zsíroxidációt a fehér zsírszövetben.

Összefoglalva, ebben a tanulmányban nyert adataink azt mutatják, hogy a fehér zsírszövetből származó leptin az EWcp-ben kötődik receptorához, növeli az UCN1 termelést és fokozza a zsírszövet szimpatikus aktivációját. Ez a plazma TG szintjének növekedéséhez, valamint lipolíziséhez vezet anélkül, hogy a táplálékfelvétel megváltozna. Az EWcp által közvetített szimpatikus aktiváció tehát hozzájárulhat az energiaegyensúly fenntartásához olyan körülmények között, mint pl. egy stresszhelyzet, amikor a szervezetnek több energiát kell hozzáférhetővé tennie a sikeres adaptáció érdekében, de táplálékfelvételre nincsen mód.

## 6.V. Az EWcp hozzájárul a Parkinson-kór nem motoros tüneteinek patkányban

A Parkinson-kór szisztémás toxikus modelljében a rotenont választottuk annak felmérésére, hogy a Parkinson-kórhoz hasonló állapot társulhat-e morfológiai változásokkal a peptiderg EWcp-ben, és hogy ez depressziószerű fenotípussal és szorongással jár-e együtt. Ezután, lokális neuronablációt végeztünk, hogy megvizsgáljuk, a szelektív EWcp károsodás hasonló romlást okoz-e a hangulati állapotban.

6.V.1. A szorongás és depresszió, mint a Parkinson-kór nem motoros tüneteinek, megjelennek a rotenon modellben

A PD rotenon modellje az emberi kórállapot számos jellemzőjét reprodukálja patkányban, mint pl. a mitochondriális károsodást, a dopaminerg nigrostriális neurodegenerációt, microglia aktivációt, a citoplazma területén megjelenő alpha-synuclein ir zárványok, a LB-ek kialakulását (Betarbet és mtsai., 2000, 2006). Modellünkben a rotarod teszt (Campos és mtsai., 2013, Labib és mtsai., 2021) egyértelműen kimutatta a súlyos motoros deficitet a rotenonnal kezelt patkányokban, mely összhangban volt az OFT-ben látott csökkent lokomotoros aktivitással, korábbi vizsgálatokkal (Zaitone és mtsai., 2012, Sun és mtsai., 2019) egybehangzóan. Az OFT-ben a rotenonnal kezelt patkányok hosszabb időt töltöttek az eszköz falánál, mely megnövekedett szorongásukra utal. Ugyanezek a patkányok a SPT-ben a kevesebb édesített vizet fogyasztottak, mely a jutalomkereső viselkedés csökkenésére, anhedóniára utal (Scheggi és mtsai., 2018), tehát az *in vivo* teszteredmények megerősítették a Parkinson-kór modell hatékonyságát.

A módszer megbízhatóságának szövettani megerősítése érdekében egyrészt a SNpc/TH ir sejtek számolását végeztük el, ahol 32,4%-os csökkenést láttunk a rotenon kezelt patkányokban. Bár ez lényegesen kevesebb, mint az emberekben PD-ban tapasztalható 70%-os neuronveszteség (Poewe és mtsai., 2017), patkányban az SNpc/TH neuronok 20%-ának elvesztése már jelentős motoros deficittel jár (Zhu és mtsai., 2004). Másrészt, irodalmi adatokkal összhangban, citoplazmatikus alpha-synuclein ir zárványokat találtunk az SNpc/TH-ban (Prasad és mtsai., 2020), amelyek megfelelnek az LB-szerű struktúráknak. Ezek a szövettani bizonyítékok tovább erősítik azt a megállapítást, hogy a modell megbízhatóan működött. Ezen túl, az SNpc astrocytáinak megnövekedett TNFalpha immunreaktivitása, a microglia sejtek és neuronok fokozott iNOS immunjele arra utal, hogy a rotenon kezeléssel összefüggő oxidatív stressz és a következményes neuroinflammáció hozzájárult a

neuronvesztéshez (Clausen és mtsai., 2020, Zhang és mtsai., 2021). A rotenon modellben diffúz striatális dopaminerg axonvesztést és esetenként drasztikus fokális TH ir rostvesztést is megfigyeltek (Höglinger és mtsai., 2003). Ezzel összhangban, csökkent CPu/TH ir rosttartalmat mértünk a rotenon kezelt patkányokban, és találtunk néhány körülírt striatális neuropil területet, ahol a TH szinte kimutathatatlaná vált (5.70.B ábra).

6.V.2. Az EWcp/UCN1 neuronok neurodegenerációt szenvednek, és a túlélő sejtek funkcionális károsodást mutatnak a rotenon modellben

A neuronvesztés mértéke, a LB-szerű struktúráknak megfelelő citoplazmatikus alpha-synuclein ir zárványok jelenléte és a fokozott microgliaaktivitás az SNpc-ben összhangban és statisztikai korrelációban volt az EWcp micro- és astroglia aktivitással, valamint az UCN1 neuronok elvesztésével. Ez az SNpc és az EWcp hasonló érzékenységre utal a toxikus szerrel szemben. Ez nem meglepő, mivel az EWcp neuronok fejlődési szempontból is szoros kapcsolatban állnak az SNpc/TH neuronokkal (Joksimovic és mtsai., 2009).

Az UCN1 ir sejtörmelék (5.72.G', H ábra) és a CD68 ir reaktív microglia (Doorn és mtsai., 2014) közötti nyilvánvaló kölcsönhatáson (5.74D. ábra) túl, amely egyértelműen bizonyítja az EWcp/UCN1 sejtek elvesztését, bizonyítékot szolgáltatunk arra is, hogy a túlélő UCN1 sejtek funkcionális károsodást szenvedtek. Ezt az magyarázhatja, hogy a mitochondriális komplex I gátlása az UCN1 sejtekben energiadeficitet okozott (Heinz és mtsai., 2017), ezért az UCN1 peptid felhalmozódott az energiaigényes axontranszport károsodása miatt. Az UCN1 megnövekedett SSD-je peptidfelhalmozódásra utal a sejtek perikaryon-jában. Ehhez hasonló állapotot láttunk egerekben is stresszexpozió során (Korosi és mtsai., 2005, Farkas és mtsai., 2017). Az *Ucn1* mRNS mennyiségének itt megfigyelt csökkenése összhangban van a krónikusan stressznek kitett patkányok (Aschrafi és mtsai., 2016) és depresszióban szenvedett öngyilkos egyének (Kozicz és mtsai., 2008b) EWcp mintáiban talált eredményekkel. A mellékvese-, thymus- és testtömeg adatok a HPA tengely fokozott aktivitására utalnak, amelyet a depresszió állatmodelljeiben (Kormos és Gaszner, 2013, Farkas és mtsai., 2017) és az emberi betegségben (Deussing és Chen, 2018) is gyakran megfigyelnek.

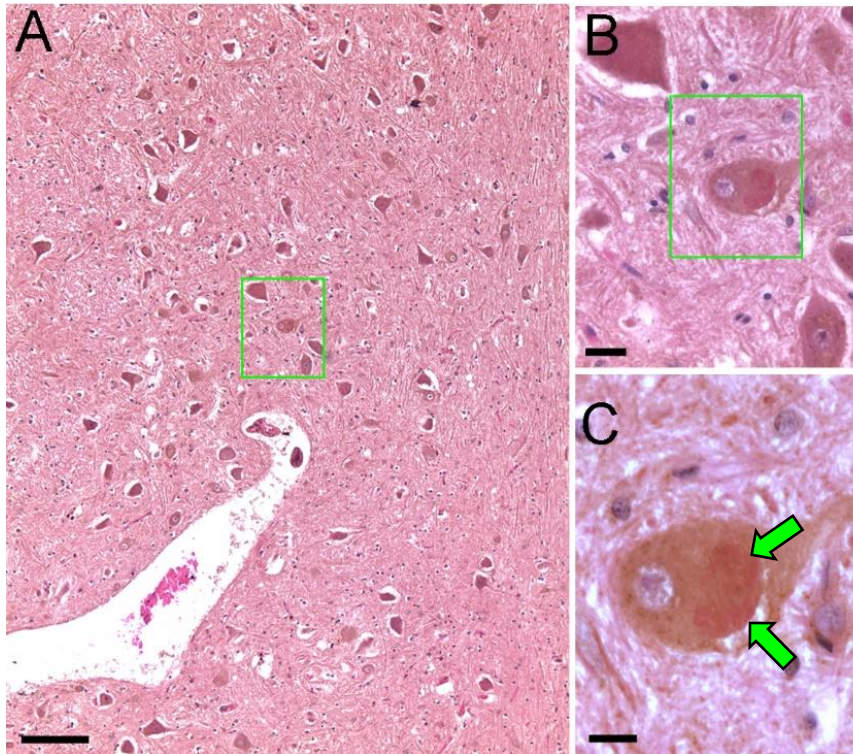
Bár korábbi közlemények leírják, hogy PD-ban neurodegeneráció érinti a DR (Borgonovo és mtsai., 2017), VTA és LC (Goedert és mtsai., 2001) területét, patkányainkban nem tapasztaltuk a szerotoninerg, dopaminerg és noradrenerg sejtpopulációk jelentős károsodását. Nem zárhatjuk ki azonban, hogy egy nagyobb rotenon dózis (Zhang és mtsai., 2017) vagy egy hosszabb kezelési időtartam ezeket vagy más központokat is érintett volna (Zhang és mtsai.,

2021), amelyeket ebben a projektben nem vizsgáltunk, de hatással lehetnek a hangulati állapotra. Figyelemmel e lehetőségekre is, eredményeink szerint az EWcp/UCN1 neuronok jelentős szereppel bír a PD-hoz társuló hangulatzavarban.

6.V.3. A lokális célzott toxikus UCN1 neuron abláció megváltozott hangulati állapotot eredményez

Annak további alátámasztására, hogy az EWcp/UCN1 neuronok elvesztése hozzájárul a hangulati állapot romlásához, célzott, lokális UCN1 sejt ablációt végeztünk. A leptin konjugált szaporin a EWcp/LepRb/UCN1 sejtekhez kötődik, (Xu és mtsai., 2009, 2011) és szelektív részleges UCN1 neuronpusztulást okoz. Több leptin-szaporin dózis előtesztelése után sikerült olyan dózist találni, amely a rotenon modellben megfigyelthez hasonló mértékű sejtpusztulást okozott. Korábbi munkák (Xu és mtsai., 2022) és az előkísérletek azt mutatták, hogy a leptin-szaporin modellben a sejthalálhoz két hétre van szükség. Mindazonáltal, az UCN1 neuronokban időnként észlelt caspase 3 immunreaktivitás arra utalt, hogy egyes sejtekben a leptin-szaporin által kiváltott apoptotikus folyamat (Sikriwal és mtsai., 2018) a szövetmintavétel időpontjában még folyamatban volt. Néhány aktivált micro- és astrogliasejt a szaporininjekcióval kezelt kontroll állatokban is megfigyelhető volt, valószínűleg a műtét során bevezetett tú közvetlen fizikai hatásának köszönhetően. A leptin-szaporinnal kezelt patkányokban mindkét gliasejttípus reaktívabb volt, és a microglia tendenciózusan gyakrabban lépett interakcióba UCN1 neuronokkal. A neuronabláció szelektivitását megerősítette az UCN1 immunnegatív, de a NeuN pozitív EWcp sejtek változatlan száma leptin-szaporin kezelés után. A leptin-szaporinnal injektált állatokban az OFT-ben látott fokozott szorongás és a SPT-ben látott anhedónia arra utalt, hogy az EWcp/UCN1 sejtek elvesztése hangulatváltozást idézett elő, de a normális mozgáskoordináció és mozgásszervi aktivitás kizárta a parkinsonizmust. Ezzel összhangban, az SNpc-ben dopaminerg neuronvesztést, apoptotikus aktivitást vagy reaktív gliózist nem észleltünk.

Összefoglalva, ebben a projektben sikeresen alkalmaztuk a PD rotenon modelljét, és kimutattuk a betegség nem motoros tüneteinek tekintett szorongásos és depressziószerű fenotípust patkányban. A szelektív helyi UCN1 neuronabláció hasonló hangulati állapotot idézett elő motoros tünetek nélkül. Eredményeink összességében arra utalnak, hogy az EWcp-ben lévő UCN1 neuronok károsodása hozzájárul a PD nem motoros tüneteinek kialakulásához. Humán vizsgálatok vannak folyamatban annak bizonyítására, hogy a patkány modellben megfigyelthez hasonló változások zajlanak az emberi PD-ban, az EWcp-ben. Ennek a projektnek e disszertáció benyújtásakor még publikáció előtt álló fő előzetes eredményét a 6.2. ábrán mutatom be.



**6.2. ábra.** Parkinson-kórban elhunyt személy centrális projekciójú Edinger-Westphal magjából származó metszetben egy UCN1 tartalmú (barna) neuronban eosinophil intracitoplazmatikus zárvány, Lewy test (zöld nyilak) figyelhető meg. A felvétel bizonyítja, hogy a rotenon modellben, patkányban tett szövettani megfigyeléseinkhez hasonló változások lépnek fel Parkinson-kórban szenvedő egyéneknél is. UCN1 immunjelölés DAB kromogénnel és hematoxylin-eosin festés. Lépték: A: 100 $\mu$ m, B: 20  $\mu$ m, C: 10  $\mu$ m. (Közlés előtt álló megfigyelések, Pytel és mtsai).

## 7. Új tudományos eredmények összegzése

### I. Génmódosított egértörzsek stresszadaptációjának vizsgálata

1. Akut stressz modellben kimutattuk, hogy az endogén PACAP, a PVN és MeA mellett, több egyéb agyterület aktivációját érintő moduláló szereppel bír.
2. Elsőként írtuk le CVMS modellben, hogy PACAP hiányában BNSTov/CRH és EWcp/UCN1 neuronok nem reagálnak CVMS-re, és a DR 5HT tartalma csökkent.
3. Elsőként azonosítottuk az EWcp/UCN1 neuronokat, mint a *Trpa1* mRNS fő kifejeződési helyét egéragyban. Bizonyítottuk a TRPA1 szerepét az EWcp/UCN1 neuronok stresszadaptációjában, CVMS modellben, egérben. A *TRPA1* mRNS öngyilkosok férfiak EWcp mintáiban downregulált volt, mely alátámasztja az eredmények transzlációs értékét.

### II. A három találat elmélet modellezése egérben

1. A három találat elmélet alapján felállított depresszió egérmodellünkben a PACAP HZ egerek MD180 és CVMS expozíció után megbízható modellnek bizonyultak a depresszió tanulmányozására a Willner-féle (1984) konstrukciós és fenomenológiai validitási kritériumok szerint.
2. A három találat elmélet modellben a fluoxetin kezelés helyreállította a szorongási és depresszió szinteket, ezért a modell a harmadik, prediktív (Willner, 1984) validitási szempontnak is megfelel. A hangulatzavarra genetikailag érzékenyebb PACAP HZ egereken alkalmazott anyai megvonás agyterületspecifikus funkcionális-morfológiai változásokat okozott a hangulatszabályozásban szerepet játszó előagyi és agytörzsi központokban.

### III. A stresszválasz életkorfüggő változásának vizsgálata

1. Tizenhárom vizsgált agyterület közül hétben (MeA, CeA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, BNSTfu, PVNp) találtunk a korrallal csökkenő FOS kifejeződést ARS-ben. Kimutattuk, hogy fiatal kontroll állatokban jelentékeny FOS immunreaktivitás van jelen a CeA, BNSTov és EWcp területén.
2. A FOSB/ $\Delta$ FOSB életkorfüggő dinamikája eltér a FOS esetében megfigyelttől. ARS modellben 11 vizsgált régióban (CeA, MeA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, BNSTv, BNSTfu, LHb, PVN, DR, EWcp) nőtt a FOSB/ $\Delta$ FOSB ir sejtek száma, de ennek mértéke erősen függött az életkortól.

3. A CVMS expozíció után megfigyelt FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitás tíz régió (MeA, BLA, BNSTdl, BNSTdm, BNSTv, MHb, LHb, DR, EWcp, S1) esetében függött az életkortól, négy terület esetében azonban nem (CeA, BNSTov, BNSTfu, PVN).
4. Kimutattuk, hogy a PVN/CRH neuronok ARS által kiváltott válasza mind a FOS, mind a FOSB/ $\Delta$ FOSB tekintetében csökken az életkorral. Ezzel ellentétben, CVMS által kiváltott FOSB/ $\Delta$ FOSB válasz a PVN CRH sejtjeiben nem változik a korrallal. Kimutattuk, hogy a CeA és BNSTov CRH sejtjei FOSB/ $\Delta$ FOSB-t tartalmaznak naív fiatal állatokban, melynek mennyisége CVMS hatására nem változik, de erősen csökken az életkorral.

#### **IV. Az EWcp, mint a stresszválasz energetikájában részt vevő központ vizsgálata**

1. Elsőként írtuk le, hogy alpha-MSH- és AgRP tartalmú idegrostok közelítik meg a EWcp/UCN1 neuronokat, melyek MC4R-t hordoznak. Koplalás hatására csökkent az alpha-MSH, és nőtt az AgRP immunreaktivitás az EWcp/UCN1 perikaryon-ok körül, mely UCN1 és FOSB immunjel növekedéssel járt együtt. Az EWcp-ben a MC4R farmakológiai manipulációja bizonyította, hogy az alpha-MSH táplálékfelvételre és energiaegyensúlyra gyakorolt hatását legalább részben az EWcp/UCN1 neuronok közvetítik.
2. Elsőként írtuk le, hogy a leptin az EWcp-ben kötődhet receptorához, növeli az UCN1 termelést és fokozza a zsírszövet szimpatikus aktivációját. Ez a plazma TG szintjének növekedéséhez, valamint lipolíziséhez vezet anélkül, hogy a táplálékfelvétel megváltozna. Az EWcp által közvetített szimpatikus aktiváció hozzájárulhat az energiaegyensúly fenntartásához stresszhelyzetben.

#### **V. Az EWcp jelentősége a Parkinson-kórhoz társuló hangulatzavarokban**

1. A PD rotenon modelljében kimutattuk a betegség nem motoros hangulati állapotot érintő, szorongásban és depressziószerű fenotípusban megnyilvánuló tüneteit patkányban. Elsőként írtuk le az EWcp/UCN1 sejtekben alpha-synuclein zárványok megjelenését, a funkcionális-morfológiai károsodását, és neuroinflammatorikus változásokkal kísért degenerációját a rotenon modellben.
2. A szelektív helyi UCN1 neuronabláció hasonló hangulati állapotot idézett elő a PD motoros tünetek megjelenése nélkül, mely arra utal, hogy az EWcp/UCN1 neuronok károsodása hozzájárul a PD nem motoros tüneteinek.



## 8. Az értekezés alapját képező lektorált publikációk listája

Eredeti közlemények:

1. **Gaszner B\***, Kormos V\*, Kozicz T, Hashimoto H, Reglodi D, Helyes Z. The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger-Westphal nucleus, ventral lateral septum, and dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*. 2012 Jan 27;202:283-99.  
*Q1. IF: 3,122. Független idézettség: 50. \*Megosztott első szerzőség.*
2. Kormos V, Gáspár L, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, Balogh A, Hashimoto H, Reglodi D, Helyes Z, **Gaszner B**. Reduced response to chronic mild stress in PACAP mutant mice is associated with blunted FosB expression in limbic forebrain and brainstem centers. *Neuroscience*. 2016 Aug 25;330:335-58. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.06.004. Epub 2016 Jun 6. PMID: 27282087.  
*Q1. IF: 3,277. Független idézettség: 19.*
3. Farkas J, Kovács LÁ, Gáspár L, Nafz A, Gaszner T, Ujvári B, Kormos V, Csernus V, Hashimoto H, Reglodi D, **Gaszner B**. Construct and face validity of a new model for the three-hit theory of depression using PACAP mutant mice on CD1 background. *Neuroscience*. 2017 Jun 23;354:11-29. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.04.019. Epub 2017 Apr 25. PMID: 28450265.  
*Q1. IF: 3,382. Független idézettség: 17.*
4. Füredi N, Nagy A, Mikó A, Berta G, Kozicz T, Pétervári E, Balaskó M, **Gaszner B**. Melanocortin 4 receptor ligands modulate energy homeostasis through urocortin 1 neurons of the centrally projecting Edinger-Westphal nucleus. *Neuropharmacology*. 2017 May 15;118:26-37. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.03.002. Epub 2017 Mar 3. PMID: 28267582.  
*D1. IF: 4,229. Független idézettség: 3.*
5. Kovács LÁ, Schiessl JA, Nafz AE, Csernus V, **Gaszner B**. Both Basal and Acute Restraint Stress-Induced c-Fos Expression Is Influenced by Age in the Extended Amygdala and Brainstem Stress Centers in Male Rats. *Front Aging Neurosci*. 2018 Aug 22;10:248. doi: 10.3389/fnagi.2018.00248. PMID: 30186150; PMCID: PMC6113579.  
*Q2. IF: 3,633. Független idézettség: 18.*
6. Kovács LÁ, Berta G, Csernus V, Ujvári B, Füredi N, **Gaszner B**. Corticotropin-Releasing Factor-Producing Cells in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus and Extended Amygdala Show Age-Dependent FOS and FOSB/DeltaFOSB Immunoreactivity in Acute and Chronic Stress Models in the Rat. *Front Aging Neurosci*. 2019 Oct 9;11:274. doi: 10.3389/fnagi.2019.00274. PMID: 31649527; PMCID: PMC6794369.  
*Q1. IF: 4,8. Független idézettség: 8.*
7. Kormos V, Kecskés A, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, Al-Omari A, Hegedüs D, Renner É, Palkovits M, Zelena D, Helyes Z, Pintér E, **Gaszner B**. Peptidergic neurons of the Edinger-Westphal nucleus express TRPA1 ion channel that is downregulated both upon chronic variable mild stress in male mice and in humans who died by suicide. *J Psychiatry Neurosci*. 2022 May 4;47(3):E162-E175. doi: 10.1503/jpn.210187. PMID: 35508327; PMCID: PMC9074809.  
*Q1. IF: 4,3. Független idézettség: 1.*
8. Ujvári B, Pytel B, Márton Z, Bognár M, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Berta G, Kecskés A, Kormos V, Farkas B, Füredi N, **Gaszner B**. Neurodegeneration in the centrally-projecting Edinger-Westphal nucleus contributes to the non-motor symptoms of

Parkinson's disease in the rat. *J Neuroinflammation*. 2022 Feb 2;19(1):31. doi: 10.1186/s12974-022-02399-w. PMID: 35109869; PMCID: PMC8809039.

*D1. IF: 9,3. Független idézettség: 6.*

9. Gaszner T, Farkas J, Kun D, Ujvári B, Berta G, Csernus V, Füredi N, Kovács LÁ, Hashimoto H, Reglődi D, Kormos V, **Gaszner B**. Fluoxetine treatment supports predictive validity of the three hit model of depression in male PACAP heterozygous mice and underpins the impact of early life adversity on therapeutic efficacy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Sep 23;13:995900. doi: 10.3389/fendo.2022.995900. PMID: 36213293; PMCID: PMC9537566.

*Q1. IF: 5,2. Független idézettség: 3.*

10. Gaszner T, Farkas J, Kun D, Ujvári B, Füredi N, Kovács LÁ, Hashimoto H, Reglődi D, Kormos V, **Gaszner B**. Epigenetic and Neuronal Activity Markers Suggest the Recruitment of the Prefrontal Cortex and Hippocampus in the Three-Hit Model of Depression in Male PACAP Heterozygous Mice. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 3;23(19):11739. doi: 10.3390/ijms231911739. PMID: 36233039; PMCID: PMC9570135.

*D1. IF: 5,6. Független idézettség: 0.*

11. Xu L, Füredi N, Lutter C, Geenen B, Pétervári E, Balaskó M, Dénes Á, Kovács KJ, **Gaszner B**<sup>#</sup>, Kozicz T<sup>#</sup>. Leptin coordinates efferent sympathetic outflow to the white adipose tissue through the midbrain centrally-projecting Edinger-Westphal nucleus in male rats. *Neuropharmacology*. 2022 Mar 1;205:108898. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108898. Epub 2021 Dec 1. PMID: 34861283.

*Q1. IF: 4,7. Független idézettség: 3<sup>#</sup>Megosztott utolsó- és levelező szerzőség.*

12. Kovács LÁ, Füredi N, Ujvári B, Golgol A, **Gaszner B**. Age-Dependent FOSB/ΔFOSB Response to Acute and Chronic Stress in the Extended Amygdala, Hypothalamic Paraventricular, Habenular, Centrally-Projecting Edinger-Westphal, and Dorsal Raphe Nuclei in Male Rats. *Front Aging Neurosci*. 2022 May 3;14:862098. doi: 10.3389/fnagi.2022.862098. PMID: 35592695; PMCID: PMC9110804.

*Q2. IF: 4,8. Független idézettség: 3.*

## 2. Összefoglaló közlemény:

1. Kormos V, **Gaszner B**. Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. *Neuropeptides*. 2013 Dec;47(6):401-19. doi: 10.1016/j.npep.2013.10.014. Epub 2013 Oct 24. PMID: 24210138.

*Q1. IF: 2,546. Független idézettség: 241*

## 3. Könyvfejezet:

1. Farkas J, Kovacs LÁ, Gaszner T, **Gaszner B**. Using PACAP heterozygous mice as models of the three hit theory of depression. In *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide—PACAP*. 2016. (pp. 731-741). Springer, Cham. ISBN: 978-3-319-35135-3.

## 9. A pályázó értekezéséhez fel nem használt lektorált tudományos dolgozatai

1. Al-Omari A, Kecskés M, **Gaszner B**, Biró-Sütő T, Fazekas B, Berta G, Kuzma M, Pintér E, Kormos V. Functionally active TRPA1 ion channel is downregulated in peptidergic neurons of the Edinger-Westphal nucleus upon acute alcohol exposure. *Front Cell Dev Biol.* 2023 Jan 10;10:1046559. doi: 10.3389/fcell.2022.1046559. PMID: 36704197; PMCID: PMC9872022.
2. Fehér M, Márton Z, Szabó Á, Kocsa J, Kormos V, Hunyady Á, Kovács LÁ, Ujvári B, Berta G, Farkas J, Füredi N, Gaszner T, Pytel B, Reglődi D, **Gaszner B**. Downregulation of PACAP and the PAC1 Receptor in the Basal Ganglia, Substantia Nigra and Centrally Projecting Edinger-Westphal Nucleus in the Rotenone model of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci.* 2023 Jul 24;24(14):11843. doi: 10.3390/ijms241411843. PMID: 37511603; PMCID: PMC10380602.
3. Kovács DK, Eitmann S, Berta G, Kormos V, **Gaszner B**, Pétervári E, Balaskó M. Aging Changes the Efficacy of Central Urocortin 2 to Induce Weight Loss in Rats. *Int J Mol Sci.* 2023 May 19;24(10):8992. doi: 10.3390/ijms24108992. PMID: 37240340; PMCID: PMC10219457.
4. Medrano M, Allaoui W, Van Bulck M, Thys S, Makrini-Maleville L, Seuntjens E, De Vos WH, Valjent E, **Gaszner B**, Van Eeckhaut A, Smolders I, De Bundel D. Neuroanatomical characterization of the Nmu-Cre knock-in mice reveals an interconnected network of unique neuropeptidergic cells. *Open Biol.* 2023 Jun;13(6):220353. doi: 10.1098/rsob.220353. Epub 2023 Jun 14. PMID: 37311538; PMCID: PMC10264104.
5. Dinh TT, Xiang M, Rajaraman A, Wang Y, Salazar N, Zhu Y, Roper W, Rhee S, Brulois K, O'Hara E, Kiefel H, Dinh TM, Bi Y, Gonzalez D, Bao EP, Red-Horse K, Balogh P, Gábris F, **Gaszner B**, Berta G, Pan J, Butcher EC. An NKX-COUP-TFII morphogenetic code directs mucosal endothelial addressin expression. *Nat Commun.* 2022 Dec 2;13(1):7448. doi: 10.1038/s41467-022-34991-2. PMID: 36460642; PMCID: PMC9718832.
6. Keringer P, Furedi N, **Gaszner B**, Miko A, Pakai E, Fekete K, Olah E, Kelava L, Romanovsky AA, Rumbus Z, Garami A. The hyperthermic effect of central cholecystokinin is mediated by the cyclooxygenase-2 pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2022 Jan 1;322(1):E10-E23. doi: 10.1152/ajpendo.00223.2021. Epub 2021 Nov 15. PMID: 34779255.
7. Kiss F, Kormos V, Szőke É, Kecskés A, Tóth N, Steib A, Szállási Á, Scheich B, **Gaszner B**, Kun J, Fülöp G, Pohóczky K, Helyes Z. Functional Transient Receptor Potential Ankyrin 1 and Vanilloid 1 Ion Channels Are Overexpressed in Human Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 8;23(3):1921. doi: 10.3390/ijms23031921. PMID: 35163843; PMCID: PMC8836603.
8. Konkoly J, Kormos V, **Gaszner B**, Correia P, Berta G, Biró-Sütő T, Zelena D, Pintér E. Transient receptor potential ankyrin 1 ion channel expressed by the Edinger-Westphal nucleus contributes to stress adaptation in murine model of posttraumatic stress disorder. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Dec 6;10:1059073. doi: 10.3389/fcell.2022.1059073. PMID: 36561364; PMCID: PMC9763580.
9. Szabó T, Kormos V, **Gaszner B**, Rékási Z. Perifériás ideg epineuralis metilénkékfestése kadáverkézen [Epineural methylene blue nerve staining on cadaver hand]. *Orv Hetil.* 2022 Nov 13;163(46):1834-1839. Hungarian. doi: 10.1556/650.2022.32617. PMID: 36373580.

10. Szabó T, Kormos V, Rékási Z, **Gaszner B**. Epineural Methylene Blue Injection May Aid Localization of Digital Nerves in Dupuytren's Surgery. *Eur Surg Res*. 2022;63(3):105-113. doi: 10.1159/000519666. Epub 2021 Oct 22. PMID: 34689139; PMCID: PMC9501739.
11. Kiss P, Banki E, **Gaszner B**, Nagy D, Helyes Z, Pal E, Reman G, Toth G, Tamas A, Reglodi D. Protective Effects of PACAP in a Rat Model of Diabetic Neuropathy. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 2;22(19):10691. doi: 10.3390/ijms221910691. PMID: 34639032; PMCID: PMC8509403.
12. Konkoly J, Kormos V, **Gaszner B**, Sándor Z, Kecskés A, Alomari A, Szilágyi A, Szilágyi B, Zelena D, Pintér E. The Role of TRPA1 Channels in the Central Processing of Odours Contributing to the Behavioural Responses of Mice. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Dec 20;14(12):1336. doi: 10.3390/ph14121336. PMID: 34959735; PMCID: PMC8703823.
13. Nemes B, Bölcskei K, Kecskés A, Kormos V, **Gaszner B**, Aczél T, Hegedüs D, Pintér E, Helyes Z, Sándor Z. Human Somatostatin SST<sub>4</sub> Receptor Transgenic Mice: Construction and Brain Expression Pattern Characterization. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 4;22(7):3758. doi: 10.3390/ijms22073758. PMID: 33916620; PMCID: PMC8038480.
14. Olah E, Rumbus Z, Kormos V, Tekus V, Pakai E, Wilson HV, Fekete K, Solymar M, Kelava L, Keringer P, **Gaszner B**, Whiteman M, Keeble J, Pinter E, Garami A. The Hypothermic Effect of Hydrogen Sulfide Is Mediated by the Transient Receptor Potential Ankyrin-1 Channel in Mice. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Sep 29;14(10):992. doi: 10.3390/ph14100992. PMID: 34681216; PMCID: PMC8538668.
15. Reglodi D, Ujvári B, Fábíán E, Farkas J, **Gaszner B**, Lubics A, Opper B, Horváth G., Rékási Z, Hollósy T Amit nem hittünk volna... Az anatómia digitális oktatása, mint sikertörténet *ORVOSKÉPZÉS* 96 : 2 pp. 280-285. , 6 p. (2021) MOB
16. Aczél T, Kecskés A, Kun J, Szenthe K, Bánáti F, Szathmary S, Herczeg R, Urbán P, Gyenesei A, **Gaszner B**, Helyes Z, Bölcskei K. Hemokinin-1 Gene Expression Is Upregulated in Trigeminal Ganglia in an Inflammatory Orofacial Pain Model: Potential Role in Peripheral Sensitization. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 22;21(8):2938. doi: 10.3390/ijms21082938. PMID: 32331300; PMCID: PMC7215309.
17. Kecskés A, Pohóczky K, Kecskés M, Varga ZV, Kormos V, Szőke É, Henn-Mike N, Fehér M, Kun J, Gyenesei A, Renner É, Palkovits M, Ferdinandy P, Ábrahám IM, **Gaszner B**, Helyes Z. Characterization of Neurons Expressing the Novel Analgesic Drug Target Somatostatin Receptor 4 in Mouse and Human Brains. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 21;21(20):7788. doi: 10.3390/ijms21207788. PMID: 33096776; PMCID: PMC7589422.
18. Fulop DB, Humli V, Szepeszy J, Ott V, Reglodi D, **Gaszner B**, Nemeth A, Szirmai A, Tamas L, Hashimoto H, Zelles T, Tamas A. Hearing impairment and associated morphological changes in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. *Sci Rep*. 2019 Oct 10;9(1):14598. doi: 10.1038/s41598-019-50775-z. PMID: 31601840; PMCID: PMC6787024.
19. Fulop BD, Sandor B, Szentleleky E, Karanyicz E, Reglodi D, **Gaszner B**, Zakany R, Hashimoto H, Juhasz T, Tamas A. Altered Notch Signaling in Developing Molar Teeth of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)-Deficient Mice. *J Mol Neurosci*. 2019 Jul;68(3):377-388. doi: 10.1007/s12031-018-1146-7. Epub 2018 Aug 10. PMID: 30094580.
20. Hunyady Á, Hajna Z, Gubányi T, Scheich B, Kemény Á, **Gaszner B**, Borbély É, Helyes Z. Hemokinin-1 is an important mediator of pain in mouse models of neuropathic and inflammatory mechanisms. *Brain Res Bull*. 2019 Apr;147:165-173. doi: 10.1016/j.brainresbull.2019.01.015. Epub 2019 Jan 18. PMID: 30664920.
21. Feher M, **Gaszner B**, Tamas A, Gil-Martinez AL, Fernandez-Villalba E, Herrero MT, Reglodi D. Alteration of the PAC1 Receptor Expression in the Basal Ganglia of MPTP-

- Induced Parkinsonian Macaque Monkeys. *Neurotox Res.* 2018 May;33(4):702-715. doi: 10.1007/s12640-017-9841-7. Epub 2017 Dec 11. PMID: 29230633.
22. Füredi N, Mikó A, **Gaszner B**, Feller D, Rostás I, Tenk J, Solymár M, Balaskó M, Pétervári E. Activity of the Hypothalamic Melanocortin System Decreases in Middle-Aged and Increases in Old Rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2018 Mar 14;73(4):438-445. doi: 10.1093/gerona/glx213. PMID: 29099963.
  23. Borbély É, Hajna Z, Nabi L, Scheich B, Tékus V, László K, Ollmann T, Kormos V, **Gaszner B**, Karádi Z, Lénárd L, Paige CJ, Quinn JP, Szolcsányi J, Pintér E, Keeble J, Berger A, Helyes Z. Hemokinin-1 mediates anxiolytic and anti-depressant-like actions in mice. *Brain Behav Immun.* 2017 Jan;59:219-232. doi: 10.1016/j.bbi.2016.09.004. Epub 2016 Sep 9. PMID: 27621226.
  24. Jungling A, Reglodi D, Karadi ZN, Horvath G, Farkas J, **Gaszner B**, Tamas A. Effects of Postnatal Enriched Environment in a Model of Parkinson's Disease in Adult Rats. *Int J Mol Sci.* 2017 Feb 14;18(2):406. doi: 10.3390/ijms18020406. PMID: 28216584; PMCID: PMC5343940.
  25. Scheich B, Vincze P, Szőke É, Borbély É, Hunyady Á, Szolcsányi J, Dénes Á, Környei Z, **Gaszner B**, Helyes Z. Chronic stress-induced mechanical hyperalgesia is controlled by capsaicin-sensitive neurones in the mouse. *Eur J Pain.* 2017 Sep;21(8):1417-1431. doi: 10.1002/ejp.1043. Epub 2017 Apr 25. PMID: 28444833.
  26. Scheich B, Csekő K, Borbély É, Ábrahám I, Csernus V, **Gaszner B**, Helyes Z. Higher susceptibility of somatostatin 4 receptor gene-deleted mice to chronic stress-induced behavioral and neuroendocrine alterations. *Neuroscience.* 2017 Mar 27;346:320-336. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.01.039. Epub 2017 Feb 1. PMID: 28161436.
  27. Tenk J, Rostás I, Füredi N, Mikó A, Solymár M, Soós S, **Gaszner B**, Feller D, Székely M, Pétervári E, Balaskó M. Age-related changes in central effects of corticotropin-releasing factor (CRF) suggest a role for this mediator in aging anorexia and cachexia. *Geroscience.* 2017 Feb;39(1):61-72. doi: 10.1007/s11357-017-9962-1. Epub 2017 Jan 18. PMID: 28299639; PMCID: PMC5352590.
  28. Aschrafi A, Verheijen JM, Gordebeke PM, Olde Loohuis NF, Menting K, Jager A, Palkovits M, Geenen B, Kos A, Martens GJ, Glennon JC, Kaplan BB, **Gaszner B**, Kozicz T. MicroRNA-326 acts as a molecular switch in the regulation of midbrain urocortin 1 expression. *J Psychiatry Neurosci.* 2016 Aug;41(5):342-53. doi: 10.1503/jpn.150154. PMID: 27045550; PMCID: PMC5008923.
  29. Farkas S, Bölcskei K, Markovics A, Varga A, Kis-Varga Á, Kormos V, **Gaszner B**, Horváth C, Tuka B, Tajti J, Helyes Z. Utility of different outcome measures for the nitroglycerin model of migraine in mice. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2016 Jan-Feb;77:33-44. doi: 10.1016/j.vascn.2015.09.006. Epub 2015 Oct 9. PMID: 26456070.
  30. Füredi N, Miko A, Aubrecht B, **Gaszner B**, Feller D, Rostas I, Tenk J, Soos S, Balasko M, Balogh A, Pap M, Petervari E. Regulatory Alterations of Energy Homeostasis in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR). *J Mol Neurosci.* 2016 Aug;59(4):521-30. doi: 10.1007/s12031-016-0771-2. Epub 2016 Jun 24. PMID: 27339773.
  31. Rostás I, Tenk J, Mikó A, Füredi N, Soós S, Solymár M, Lengyel A, Székely M, **Gaszner B**, Feller D, Pétervári E, Balaskó M. Age-related changes in acute central leptin effects on energy balance are promoted by obesity. *Exp Gerontol.* 2016 Dec 1;85:118-127. doi: 10.1016/j.exger.2016.10.006. Epub 2016 Oct 22. PMID: 27780783.
  32. Scheich B, **Gaszner B**, Kormos V, László K, Ádori C, Borbély É, Hajna Z, Tékus V, Bölcskei K, Ábrahám I, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z. Somatostatin receptor subtype 4 activation is involved in anxiety and depression-like behavior in mouse models. *Neuropharmacology.* 2016 Feb;101:204-15. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.09.021. Epub 2015 Sep 18. PMID: 26387439.

33. Tenk J, Rostás I, Füredi N, Mikó A, Soós S, Solymár M, **Gaszner B**, Székely M, Pétervári E, Balaskó M. Acute central effects of corticotropin-releasing factor (CRF) on energy balance: Effects of age and gender. *Peptides*. 2016 Nov;85:63-72. doi: 10.1016/j.peptides.2016.09.005. Epub 2016 Sep 13. PMID: 27637621.
34. Helyes Z, Kun J, Dobrosi N, Sándor K, Németh J, Perkecz A, Pintér E, Szabadfi K, **Gaszner B**, Tékus V, Szolcsányi J, Steinhoff M, Hashimoto H, Reglődi D, Bíró T. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Is Upregulated in Murine Skin Inflammation and Mediates Transient Receptor Potential Vanilloid-1-Induced Neurogenic Edema. *J Invest Dermatol*. 2015 Sep;135(9):2209-2218. doi: 10.1038/jid.2015.156. Epub 2015 Apr 23. PMID: 25905588.
35. Horvath G, Reglődi D, Farkas J, Vadasz G, Mammel B, Kvarik T, Bodzai G, Kiss-Illes B, Farkas D, Matkovits A, Manavalan S, **Gaszner B**, Tamas A, Kiss P. Perinatal positive and negative influences on the early neurobehavioral reflex and motor development. *Adv Neurobiol*. 2015;10:149-67. doi: 10.1007/978-1-4939-1372-5\_8. PMID: 25287540.
36. Banki E, Pakai E, **Gaszner B**, Zsiboras C, Czett A, Bhuddi PR, Hashimoto H, Toth G, Tamas A, Reglodi D, Garami A. Characterization of the thermoregulatory response to pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in rodents. *J Mol Neurosci*. 2014 Nov;54(3):543-54. doi: 10.1007/s12031-014-0361-0. Epub 2014 Jul 4. PMID: 24994541.
37. Maasz G, Pirger Z, Reglodi D, Petrovics D, Schmidt J, Kiss P, Rivnyak A, Hashimoto H, Avar P, Jambor E, Tamas A, **Gaszner B**, Mark L. Comparative protein composition of the brains of PACAP-deficient mice using mass spectrometry-based proteomic analysis. *J Mol Neurosci*. 2014 Nov;54(3):310-9. doi: 10.1007/s12031-014-0264-0. Epub 2014 Mar 19. PMID: 24643519.
38. Xu L, Janssen D, van der Knaap N, Roubos EW, Leshan RL, Myers MG Jr, **Gaszner B**, Kozicz T. Integration of stress and leptin signaling by CART producing neurons in the rodent midbrain centrally projecting Edinger-Westphal nucleus. *Front Neuroanat*. 2014 Mar 3;8:8. doi: 10.3389/fnana.2014.00008. PMID: 24624061; PMCID: PMC3939672.
39. Shah NS, Pugh PC, Nam H, Rosenthal DT, van Wijk D, **Gaszner B**, Kozicz T, Kerman IA. A subset of presympathetic-premotor neurons within the centrally projecting Edinger-Westphal nucleus expresses urocortin-1. *J Chem Neuroanat*. 2013 Sep;52:25-35. doi: 10.1016/j.jchemneu.2013.04.004. Epub 2013 May 22. PMID: 23707488; PMCID: PMC3775998.
40. Markovics A, Kormos V, **Gaszner B**, Lashgarara A, Szoke E, Sandor K, Szabadfi K, Tuka B, Tajti J, Szolcsanyi J, Pinter E, Hashimoto H, Kun J, Reglodi D, Helyes Z. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays a key role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *Neurobiol Dis*. 2012 Jan;45(1):633-44. doi: 10.1016/j.nbd.2011.10.010. Epub 2011 Oct 18. PMID: 22033344.
41. Sterrenburg L, **Gaszner B**, Boerrigter J, Santbergen L, Bramini M, Roubos EW, Peeters BW, Kozicz T. Sex-dependent and differential responses to acute restraint stress of corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat paraventricular nucleus, central amygdala, and bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci Res*. 2012 Jan;90(1):179-92. doi: 10.1002/jnr.22737. Epub 2011 Sep 15. PMID: 21922520.
42. Rouwette T, Klemann K, **Gaszner B**, Scheffer GJ, Roubos EW, Scheenen WJ, Vissers K, Kozicz T. Differential responses of corticotropin-releasing factor and urocortin 1 to acute pain stress in the rat brain. *Neuroscience*. 2011 Jun 2;183:15-24. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.03.054. Epub 2011 Apr 2. PMID: 21463663.
43. Sterrenburg L, **Gaszner B**, Boerrigter J, Santbergen L, Bramini M, Elliott E, Chen A, Peeters BW, Roubos EW, Kozicz T. Chronic stress induces sex-specific alterations in methylation and expression of corticotropin-releasing factor gene in the rat. *PLoS One*.

- 2011;6(11):e28128. doi: 10.1371/journal.pone.0028128. Epub 2011 Nov 23. PMID: 22132228; PMCID: PMC3223222.
44. Derks NM, **Gaszner B**, Roubos EW, Kozicz LT. Sex differences in urocortin 1 dynamics in the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus of the rat. *Neurosci Res.* 2010 Jan;66(1):117-23. doi: 10.1016/j.neures.2009.10.003. Epub 2009 Oct 13. PMID: 19833156.
  45. Rouwette TP, Kozicz T, Olde Loohuis NF, **Gaszner B**, Vreugdenhil E, Scheffer GJ, Roubos EW, Vissers KC, Scheenen WJ. Acute pain increases phosphorylation of DCLK-long in the Edinger-Westphal nucleus but not in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *J Pain.* 2010 Oct;11(10):930-40. doi: 10.1016/j.jpain.2009.12.017. Epub 2010 Apr 24. PMID: 20418180.
  46. Sándor K, Kormos V, Botz B, Imreh A, Böleskei K, **Gaszner B**, Markovics A, Szolcsányi J, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Reglodi D, Helyes Z. Impaired nocifensive behaviours and mechanical hyperalgesia, but enhanced thermal allodynia in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficient mice. *Neuropeptides.* 2010 Oct;44(5):363-71. doi: 10.1016/j.npep.2010.06.004. PMID: 20621353.
  47. Xu L, Bloem B, **Gaszner B**, Roubos EW, Kozicz T. Stress-related changes in the activity of cocaine- and amphetamine-regulated transcript and nesfatin neurons in the midbrain non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus in the rat. *Neuroscience.* 2010 Oct 13;170(2):478-88. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.07.001. Epub 2010 Jul 16. PMID: 20638450.
  48. Derks NM, **Gaszner B**, Bernhardt K, Roubos EW, Kozicz T. Sex-specific expression of BDNF and CART in the midbrain non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus in the rat. *Peptides.* 2009 Dec;30(12):2268-74. doi: 10.1016/j.peptides.2009.09.009. Epub 2009 Sep 13. PMID: 19755135.
  49. Farkas J, Reglodi D, **Gaszner B**, Szogyi D, Horvath G, Lubics A, Tamas A, Frank F, Besirevic D, Kiss P. Effects of maternal separation on the neurobehavioral development of newborn Wistar rats. *Brain Res Bull.* 2009 May 29;79(3-4):208-14. doi: 10.1016/j.brainresbull.2008.12.011. Epub 2009 Jan 15. PMID: 19150489.
  50. **Gaszner B**, Jensen KO, Farkas J, Reglodi D, Csernus V, Roubos EW, Kozicz T. Effects of maternal separation on dynamics of urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor in the rat non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus. *Int J Dev Neurosci.* 2009 Aug;27(5):439-51. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2009.05.006. Epub 2009 May 19. PMID: 19460425.
  51. **Gaszner B**, Van Wijk DC, Korosi A, Józsa R, Roubos EW, Kozicz T. Diurnal expression of period 2 and urocortin 1 in neurones of the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus in the rat. *Stress.* 2009 Mar;12(2):115-24. doi: 10.1080/10253890802057221. PMID: 18850494.
  52. Van Wijk DC, Xu L, Spiegelberg L, Struik RF, Meijer KH, **Gaszner B**, Kozicz T, Roubos EW. Ultrastructural and immunocytochemical characterization of the rat non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus. *Gen Comp Endocrinol.* 2009 Oct;164(1):32-9. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.04.002. Epub 2009 Apr 10. PMID: 19362554.
  53. Xu L, Bloem B, **Gaszner B**, Roubos EW, Kozicz T. Sex-specific effects of fasting on urocortin 1, cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and nesfatin-1 expression in the rat Edinger-Westphal nucleus. *Neuroscience.* 2009 Sep 15;162(4):1141-9. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.05.003. Epub 2009 May 6. PMID: 19426783.
  54. Derks NM, Müller M, **Gaszner B**, Tilburg-Ouwens DT, Roubos EW, Kozicz LT. Housekeeping genes revisited: different expressions depending on gender, brain area and stressor. *Neuroscience.* 2008 Oct 2;156(2):305-9. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.07.047. Epub 2008 Aug 3. PMID: 18722514.

55. Racz B, Horvath G, Faluhelyi N, Nagy AD, Tamas A, Kiss P, Gallyas F Jr, Toth G, **Gaszner B**, Csernus V, Reglodi D. Effects of PACAP on the circadian changes of signaling pathways in chicken pinealocytes. *J Mol Neurosci*. 2008 Nov;36(1-3):220-6. doi: 10.1007/s12031-008-9112-4. Epub 2008 Jul 1. PMID: 18592414.
56. Roubos EW, Lázár G, Calle M, Barendregt HP, **Gaszner B**, Kozicz T. Brain distribution and evidence for both central and neurohormonal actions of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide in *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol*. 2008 Apr 1;507(4):1622-38. doi: 10.1002/cne.21641. PMID: 18220255.
57. Cserepes, B ; Jancso, G ; Gasz, B ; Racz, B ; Balatonyi, B ; **Gaszner, B** ; Lantos, J ; Roth, E Stressz-regulátor neuropeptid sejtprotektív hatása iszkémiás-reperfúziós károsodással szemben izolált szívizomsejteken *CARDIOLOGIA HUNGARICA* 37 pp. 153-165. , 13 p. (2007) MOB
58. **Gaszner B**, Korosi A, Palkovits M, Roubos EW, Kozicz T. Neuropeptide Y activates urocortin 1 neurons in the nonpreganglionic Edinger-Westphal nucleus. *J Comp Neurol*. 2007 Feb 1;500(4):708-19. doi: 10.1002/cne.21177. PMID: 17154253.
59. Reglődi D, Lubics A, Kiss P, Lengvári I, **Gaszner B**, Tóth G, Hegyi O, Tamás A. Effect of PACAP in 6-OHDA-induced injury of the substantia nigra in intact young and ovariectomized female rats. *Neuropeptides*. 2006 Aug;40(4):265-74. doi: 10.1016/j.npep.2006.06.001. Epub 2006 Aug 10. PMID: 16904179.
60. **Gaszner B**, Csernus V, Kozicz T. Urocortinergic neurons respond in a differentiated manner to various acute stressors in the Edinger-Westphal nucleus in the rat. *J Comp Neurol*. 2004 Dec 6;480(2):170-9. doi: 10.1002/cne.20343. PMID: 15514930.
61. **Gaszner B**, Kozicz T. Interaction between catecholaminergic terminals and urocortinergic neurons in the Edinger-Westphal nucleus in the rat. *Brain Res*. 2003 Oct 31;989(1):117-21. doi: 10.1016/s0006-8993(03)03367-5. PMID: 14519518.

A pályázó közleményeinek kumulatív impakt faktora: 294,378.



## 10. Tudománymetriai összefoglaló táblázatok

Gaszner Balázs (Neuroanatómia) tudományos és oktatói munkásságának összefoglalása  
MTA V. Orvostudományi Osztálya (2023.10.13)

Tudományos közlemények	Szám		Hivatkozások <sup>1</sup>	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
<b>I. Tudományos folyóiratcikk<sup>2</sup></b>	73			
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű		67	1097	1620
szakcikk hazai idegen nyelvű		0	0	0
szakcikk magyar nyelvű		2	0	0
szakcikk sokszerzős, érdemi szerzőként <sup>3</sup>		0	0	0
összefoglaló közlemény		3	232	254
rövid közlemény		1	8	12
<b>II. Könyvek</b>	0			
<b>a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként</b>	0			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv		0	0	0
<b>b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként</b>	0			
idegen nyelvű		0		
magyar nyelvű		0		
bb) Felsőoktatási tankönyv		0		
<b>III. Könyvrészlet</b>	11			
idegen nyelvű		2	14	17
magyar nyelvű		0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet		9	0	0
<b>IV. Konferenciaközlemény<sup>4</sup></b>	0		0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)		9	0	0
<b>Tudományos közlemények összesen (I-IV)</b>		75	1351	1903
<b>Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)</b>	84		1351	1903
<b>V. További tudományos művek</b>	2			
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkek és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkek is		2	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok		0	0	0
Oltalmak (szabadalmak)		0	0	0
<b>VI. Hivatkozott absztraktok<sup>5</sup></b>	0		0	0
<b>Összes hivatkozás<sup>1</sup></b>			1351	1903
<b>Hirsch index<sup>6</sup></b>	23			
<b>g index<sup>6</sup></b>	42			

Speciális tudománymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma <sup>2</sup>	7	305
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma <sup>2</sup>	15	395
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2008) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	65	1601
Az utolsó 10 év (2013-) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	50	844
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	245	12,87%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben		51 + 0
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő <sup>7</sup>	0	0

**Megjegyzések:**

1 a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli, a WoS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok

2 lektorált, tudományos folyóiratban

3 a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja

4 konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben

5 nem-hivatkozott absztrakt itt nem kerül az összesítésbe

6 a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli összes hivatkozással számolva. A Hirsch és a g index definíciója

7 közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények hivatkozottsága külön értékelendő, és nem számítható be az összesített hivatkozások közé

n.a. = nincs adat

## 11. Köszönetnyilvánítás

Habár e köszönetnyilvánítás egy sokéves munka összefoglalása végén áll, a köszönettel kellett volna kezdenem. Hiszen, ha nem kaptam volna segítséget pályafutásom alatt, nem is lett volna miről írni ebben a munkában.

Először korábbi tanáraitam illeti köszönet. Azokat, akik elindítottak ezen az úton, kezdve középiskolai tanárainnal, akik felkeltették érdeklődésemet a természettudományok iránt. Köszönöm Takácsné Kovács Anikó, Gombás Attiláné, Szászi József és Dr. Hári Ferenc példamutató oktató munkáját a biológia és kémia terén. Egyetemi éveim alatt és PhD képzésem során Dr. Kozicz Tamástól tanulhattam meg az anatómiát, a szövettant, fejlődéstant, neuroanatómiát, valamint azt a tudományos szemléletet és sok-sok módszert, amivel alkalmassá válhattam önálló kutatómunka végzésére. Mindezért, szeretném köszönetemet újra kifejezni. A közös munkánk Pécssett kezdődött, majd Hollandiában folytatódott, ahol a Radboud Egyetemen, Dr. Eric Roubos intézetében dolgoztunk együtt. Sajnos, Eric korai és hirtelen távozása miatt, köszönetemet már nem fejezhetem ki neki szemtől-szemben. Most, 15 év távlatából látom, hogy a tudományos közlemények írása terén elvárt és egy fiatal PhD hallgató szempontjából talán akkor még túlzónak is érzett alaposága, és megalkuvást nem tűrő pontosságot elváró attitűdje az, ami hozzájárult ahhoz, hogy önálló kutatóként magam is témavezetőként tevékenykedhessek.

Az önálló kutatói munka egyik feltétele az, hogy az infrastruktúra rendelkezésre álljon. A Pécsi Tudományegyetem Anatómiai Intézetének korábbi és jelenlegi vezetője, Dr. Csernus Valér és Dr. Reglödi Dóra nemcsak támogató háttérrel és lehetőséget adtak munkám elvégzéséhez, hanem szakértelmükkel, jó tanácsaikkal, módszertani ismereteikkel, pályázati források megszerzésével, kollaborációk kiépítésével, a laborállatok biztosításával és számos egyéb úton is hozzájárultak munkám sikeréhez, amit ezúton szeretnék megköszönni.

Az Anatómiai Intézetben végzett oktatási feladatok majdnem egész embert kívánnak. Ezért, a laboratóriumi munkát csak asszisztensek segítségével tudtuk elvégezni. Nagy köszönettel tartozom elsősorban Orbán Izabellának a precíz, igényes, pontos és fáradhatatlan munkáért. Az Anatómiai Intézet asszisztensei közül többen is hozzájárultak a munkákhoz. Név szerint Díttrich Erzsébet, Brumán Beatrix és Mercz Tünde hozzájárulását szeretném kiemelni és megköszönni. Az állatkísérletes munka lehetetlen lett volna Hornyák Jánosné és Hornyák Attila állatgondozói segítsége nélkül. Szeretném megköszönni ezen kívül az Anatómiai Intézet minden dolgozójának a hozzájárulását, aki valamilyen úton-módon segítséget nyújtott munkánk elvégzéséhez.

A disszertáció alapját képező munka öt korábbi PhD hallgató szorgalmából is táplálkozik. Elsősorban feleségemet, Dr. Kormos Viktóriát illeti köszönet. PhD témavezetésében hivatalosan, a köztünk fennálló családi kötelék miatt, nem vehettem részt, de a közösen végzett kutatómunkát a PhD védése óta eltelt és a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben eltöltött időszakban is közös cikkek hosszú sora, köztük számos olyan munka is bizonyítja, ami nem képezte e disszertáció alapját. Szerencsés vagyok abból a szempontból is, hogy Feleségem gyakorló kutatóként mindig megértéssel volt a munkánk természetéből adódó kihívások tekintetében, ami sokszor a családtól elvett időt jelentette, legyen az munkaidőn túl nyúló kísérletek, adatelemzések vagy konferenciárészvételek miatti távollét. E feladataim nyilván lemondással jártak Bálint és Máté fiainak is, ezért nekik is köszönettel tartozom türelmükért, főleg azért, mert ezt kisgyermekként különösen nehéz lehetett számukra megérteni, elfogadni. Dr. Farkas József részben, Dr. Gaszner Tamás teljes egészében a három találat elmélet modell kialakítása során elért eredményeink alapján szerzett PhD fokozatot, és több évig dolgoztak velem. PhD védésük után is sok segítséget nyújtottak, nyújtanak a munkákban, amiért szintén köszönet illeti őket. Szeretném megköszönni azt a sok-sok nagyon időigényes morfológiai munkát Dr. Kovács Lászlónak, akivel a stresszválasz életkorfüggő változásait vizsgáltuk. Dr. Füredi Nóra az energiaegyensúly szabályozással kapcsolatos kísérleteken dolgozott és PhD képzése során a Transzlációs Medicina Intézet munkatársával, Dr. Pétervári Erikával közösen irányítottuk. Bár a PhD dolgozatában szereplő közlemények nem képezik e disszertáció alapját, posztdoktori munkatársként több projektben nyújtott sok segítségét itt is szeretném megköszönni. Nagy köszönet illeti Dr. Ujvári Balázst is, aki a Parkinson-kór és az Edinger-Westphal mag kapcsolatát vizsgálta és szerzett PhD fokozatot, és különösen sok segítséget nyújtott TDK hallgatók toborzásában, irányításában is.

Dr. Szabó Tamásnak, és Dr. Scheich Bálintnak, Dr. Rékási Zoltánnal illetve Dr. Helyes Zsuzsannával közösen vezetett korábbi PhD hallgatóimnak is köszönöm a közös munkát, még akkor is, ha közleményeik didaktikai okból nem kerültek be ebbe a disszertációba. Szintén szeretném köszönetemet kifejezni munkájukért jelenlegi PhD hallgatóimnak, Hegedüs Dánielnek, Dr. Márton Zsombornak, Dr. Pytel Bencének és Dr. Fehér Máténak, valamint annak a 35 TDK hallgatóknak, akik az évek során kisebb-nagyobb mértékben hozzájárultak a kutatási eredményekhez.

Közleményeink szerzői listájából kitűnik, hogy számos kollaboráció járult hozzá a projektek eredményességéhez. Itt a Pécsi Tudományegyetemen a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetét szeretném kiemelni, ahol Feleségem mellett Dr. Kecskés Angélával is sokat dolgoztunk együtt, de köszönet illeti Dr. Pintér Erikát és Dr. Helyes Zsuzsannát is a

génmódosított egerek biztosításáért. A Transzlációs Medicina Intézetben Dr. Balaskó Márta és Dr. Garami András munkacsoportjával is számos együttműködés zajlik, és ezúton köszönöm segítségüket. Szeretném megköszönni Dr. Berta Gergelynek a konfokális mikroszkópnál nyújtott segítséget, és az Orvosi Biológiai Intézet és Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumnak, Dr. Ábrahám Hajnalkának és ifj. Dr. Sétáló Györgynek a hozzáférést a műszerhez.

Köszönet illeti Dr. Palkovits Miklóst és Dr. Renner Évát a Semmelweis Egyetem Anatómiai Szövet- és Fejlődéstani Intézetében az emberi agyszövetminták biztosításáért, Dr. Zelena Dórát, Dr. Kovács Krisztinát és Dr. Dénes Ádámot a közös munkáért a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézettel. Szintén szeretném megköszönni a nemzetközi kollaborációt Dr. Xu Lu-nak (Radboud University, Nijmegen, Hollandia, majd Tulane University, New Orleans, USA) és Bram Geenen-nek (Radboud University, Nijmegen, Hollandia).

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném megköszönni Édesanyámnak, és Édesapámnak, aki már nem lehet velünk, a feltétel nélküli szeretet, támogatást, segítséget, féltő gondoskodást, és sok-sok önzetlen lemondást, ami lehetővé tette számomra, hogy eljussak idáig.

## 12. Támogatók

A disszertációban összefoglalt tudományos eredmények az alábbi kutatási támogatások jóvoltából valósulhattak meg:

Bolyai János posztdoktori kutatási ösztöndíj, Pécsi Tudományegyetem Kutatási Alap (PTE KA-34039/10-8, KA-2017-01, KA-2019-12), OTKA PD100706, NKFI-FK124188, MTA – Lendület Program, KTIA\_13\_NAP-A-III/5, MTA TKI 14016, GINOP-2.3.2-15-2016-00050 – PEPSYS, NAP 2017-1.2.1-NKP-2017-00002, 20765-3/2018/FEKUTSTRAT FIKP II, III, IV, 2020-4.1.1-TKP2020 (TKP2020-IKA-08), EFOP-3.6.2-16-2017-00008. A TKP2021-EGA-16 projekt az Innovációs és Technológiai Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a TKP2021-EGA pályázati program finanszírozásában valósult meg.

### 13. Rövidítések jegyzéke

A5: noradrenerg sejtcsoport a híd tegmentumában  
 ACTH: adrenocorticotrop hormon  
 Adrb3: 3-as típusú béta adrenerg receptor  
 AFR: animal facility rearing, standard állatházi protokoll szerint tartott állat  
 AgRP: agouti-related peptid  
 alpha-MSH: alpha melanocyta stimuláló hormon  
 ANOVA: varianciaanalízis  
 AP1: aktivátor protein 1  
 aq: aqueductus cerebri  
 ARS: akut restraint stressz  
 ATP: adenzin-trifoszfát  
 BDG: Ba-DupGreen vírus  
 BDNF: brain-derived neurotrophic factor  
 BLA: nucleus basolateralis amygdalae  
 BNST: nucleus interstitialis striae terminalis (angol terminológia szerint: bed nucleus of the stria terminalis)  
 BNSTdl: a BNST dorsolaterális divíziója  
 BNSTdm: a BNST dorsomediális divíziója  
 BNSTfu: a BNST fusiformis divíziója  
 BNSTov: a BNST ovális divíziója  
 BNSTv: a BNST ventrális divíziója  
 CA1: cornu Ammonis 1  
 CA3: cornu Ammonis 3  
 CART: cocaine- and amphetamine-regulated transcript  
 CD68: cluster of differentiation 68, aktivált microglia marker  
 CeA: nucleus centralis amygdalae  
 CI: capsula interna  
 CMV: cytomegalovírus  
 CORT: kortikoszteron  
 CPu: nucleus caudatus-putamen, caudate putamen  
 CRH: corticotropin-releasing hormon  
 CRH1R: corticotropin-releasing hormon 1-es típusú receptora  
 CRH2R: corticotropin-releasing hormon 2-es típusú receptora  
 CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz (chronic variable mild stress)  
 Cy: cyanine  
 DAPI: 4',6-diamidino 2-fenilindol  
 DG: gyrus dentatus  
 DIG: digoxigenin  
 dLS: nucleus septi lateralis dorsalis divíziója  
 DMH: dorsomedialis hypothalamus  
 dPAG: substantia grisea centralis (periaqueductal gray matter), dorsalis divízió  
 DR: nucleus raphe dorsalis  
 EW: Edinger-Westphal mag  
 EWcp: centrális projekciójú Edinger-Westphal mag  
 FFA: szabad zsírsav  
 Fluo: fluoxetin  
 FOS: Finkel-Biskis-Jinkins egér szarkóma vírus eredetű celluláris onkogén családba tartozó gén (c-fos) fehérje terméke

FOSB/ $\Delta$ FOSB: Finkel-Biskis-Jenkins egér szarkóma vírus eredetű celluláris onkogén családba tartozó gén (fosb) fehérje termékei.  
 FST: forced swim teszt  
 GABA: gamma-amino-vaajsav  
 GFAP: glial fibrillary acidic protein  
 GFP: zöld fluoreszcens fehérje  
 GR: glukokortikoid receptor  
 H: hónapos korú  
 H3K9ac: acetyl-lizin 9 H3 hiszton  
 HDL: a magas denzitású lipoprotein  
 HPA: hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg tengely  
 HS024: MC4R antagonistá hatóanyag  
 HZ: heterozigóta  
 IBA1: ionized calcium-binding adapter molecule 1  
 IC: intracerebrális  
 III: ventriculus tertius  
 iLPFC: infralimbikus prefrontális kéreg  
 IML: nucleus intermediolateralis  
 iNOS: indukálható nitrogén monoxid szintáz  
 ip: intraperitonealis  
 ir: immunreaktív  
 IV: ventriculus quartus  
 KO: génkiütött, knockout mutáns  
 KTRL: kontroll  
 LB: Lewy test  
 LC: locus ceruleus  
 LDL: alacsony denzitású lipoprotein  
 LDT: light-dark box teszt  
 Lep: leptin  
 LepRb: leptin receptor  
 LHb: nucleus lateralis habenulae  
 IPAG: substantia grisea centralis (periaqueductal gray matter), dorsalis divízió  
 LPS: lipopoliszacharid  
 lv: ventriculus lateralis  
 MANOVA: multifaktoriális varianciaanalízis  
 MAPK: mitogén aktivált protein kináz  
 MBH: mediobasalis hypothalamus  
 MBT: marble burying teszt  
 MC4R: 4-es típusú melanocortin receptor  
 MD180: napi 180 perces, súlyos maternális depriváció  
 MeA: nucleus medialis amygdalae  
 MHb: nucleus medialis habenulae  
 ml: lemniscus medialis  
 MNR: nucleus raphe medianus  
 MQ: MilliQ víz  
 MR: mineralokortikoid receptor  
 MS15: napi 15 perces anyai szeparáció  
 NBF: neutrális pufferelt formalin  
 NBT/BCIPT: nitro-blue tetrazolium és 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate  
 NDS: normál számár szérum



NeuN: neuronális nukleáris marker  
 NGS: normál kecske szérum  
 NHLD: nem magas denzitású lipoprotein  
 NPY: neuropeptid Y  
 ns: nem szignifikáns  
 NTS: nucleus tractus solitarii  
 OFT: open field teszt  
 ö.e.: önkényes egység  
 PAC1R: PAC1 receptor  
 PACAP: hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polypeptid  
 PAG: substantia grisea centralis  
 pAKT: foszforilált AKT  
 PBS: foszfát pufferelt fiziológias sóoldat  
 PCR: polimeráz láncreakció  
 PD: Parkinson-kór  
 periPVN área: a nucleus paraventricularis hypothalami körül elhelyezkedő terület  
 pERK: foszforilált extracelluláris szignál által regulált kináz  
 PFC: prefrontális kéreg  
 PFS: pirogén mentes fiziológias sóoldat  
 pHSL: foszforilált hormonszenzitív lipáz  
 PI3K: foszfatidil-inozitol 3 kináz  
 pIPFC: prelimbikus prefrontális kéreg  
 PND: postnatal day, születés utáni nap  
 PRV: pseudorabies vírus  
 pSTAT3: foszforilált signal transducer and activator of transcription 3  
 PVN: nucleus paraventricularis hypothalami  
 PVN: nucleus paraventricularis hypothalami, pars magnocellularis  
 PVNp: nucleus paraventricularis hypothalami, pars parvocellularis  
 RM-ANOVA: repeated measures ANOVA  
 RPT: rotarod performance teszt  
 RQ: légzési hányados  
 RT-PCR: reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció  
 RT-qPCR: reverz transzkriptáz kvantitatív polimeráz láncreakció  
 S1: primer szomatoszenzoros (barrel) kéreg  
 SHRP: stressz hiporeszponzív periódus  
 SNpc: substantia nigra, pars compacta  
 SPT: cukorpreferencia teszt  
 SSC: standard sóoldat-citrát puffer  
 SSD: specifikus jeldenzitás (specific signal density)  
 SSRI: szelektív szerotonin visszavétel gátló  
 STAT3: signal transducer and activator of transcription 3  
 Tc: maghőmérséklet  
 TG: triglicerid  
 TH: tirozin-hidroxiláz  
 TNFalpha: tumor necrosis factor alpha  
 TRPA1: tranziens receptor potenciál ankirin 1  
 Ts: farokbőr-hőmérséklet  
 TST: tail suspension teszt  
 UCN1: urocortin 1  
 UCN2: urocortin 2

UCN3: urocortin 3  
Ucp1: uncoupling protein 1  
UTP: uridin-trifoszfát  
Vehic: vehiculum, oldószerrel kezelt  
VIP: vasoactive intestinal polypeptide  
VLDL nagyon alacsony denzitású lipoprotein  
vIPAG: substantia grisea centralis ventrolaterális része  
vLS: nucleus septi laterális ventrális divíziója  
VO<sub>2</sub>: oxigénfogyasztás  
VTA: area tegmenti ventralis, ventral tegmental area  
WT: vad típusú  
 $\alpha$ MSH: alfa melanocytá stimuláló hormon  
 $\alpha$ SYN: alfa synuclein  
3rd: ventriculus tertius  
5HT: 5-hidroxi-triptamin, szerotonin

## 14. Függelék

<b>Antitest neve (gazda, típus)</b>	<b>Gyártó</b>	<b>Katalógus- szám</b>	<b>Referencia</b>	<b>RRID</b>	<b>Antigén</b>	<b>Hígítás</b>
<b>AgRP (nyúl, poliklonális)</b>	Phoenix Pharma- ceuticals	H-003-57	Fekete és mtsai., 2000	AB_2313909	egér agouti-related peptid (82-131)	1:6000
<b>alpha-MSH (nyúl, poliklonális)</b>	Peninsula Laboratories	H-04301	Funkelstein és mtsai., 2008	AB_10013604	egér, patkány, ember alpha-MSH	1:5000
<b>alpha-synuclein (egér, monoklonális)</b>	Abcam	Ab1903	Wu és mtsai., 2015	AB_302665	Rekombináns az emberi alpha-synucleinnel teljesen megegyező szekvenciával	1:2000
<b>caspase 3 (nyúl, poliklonális)</b>	Abcam	ab49822	Fan és mtsai., 2021	AB_868673	167-175. aminosav szakasz a p17 alegységben (cleaved caspase)	1:4000
<b>CD68 (nyúl, poliklonális)</b>	Abcam	ab125212	Deng és mtsai., 2021	AB_10975465	szintetikus peptid: AFCITRRRQSTYQPL	1:100
<b>CRH (kecske, poliklonális)</b>	Santa Cruz	sc-1759	Kormos és mtsai., 2016	AB_631300	Humán CRH C terminális szakasz peptid fragmentuma	1:150
<b>CRH (nyúl, poliklonális)</b>	Salk Institute Prof. WW. Vale	PBL# rC70	Sterrenburg és mtsai., 2011	AB_2314232	humán/patkány teljes CRH	1:16000
<b>FOS (c-Fos) (nyúl, poliklonális)</b>	Santa Cruz	sc-52	Gaszner és mtsai., 2007	AB_2106783	a humán FOS protein 3- 16. aminosavát tartalmazó rekombináns peptid	1:500

<b>FOS (c-Fos)</b> <b>(nyúl,</b> <b>poliklonális)</b>	Synaptic Systems	226003	Hume és mtsai., 2017	AB_2231974	patkány FOS (c-Fos) fehérje N terminális peptid fragmentum	1:1000
<b>FOS (c-Fos)</b> <b>(tengerimalac,</b> <b>poliklonális)</b>	Synaptic Systems	226004	Bolós és mtsai., 2019	AB_2619946	patkány FOS (c-Fos) fehérje N terminális peptid fragmentum	1:1000
<b>FOSB/ΔFOSB (FOSB) (egér,</b> <b>monoklonális)</b>	Abcam	AB11959	Tuplin és mtsai., 2018	AB_298732	szintetikus humán FOSB peptid	1:1500
<b>FOSB/ΔFOSB (FOSB) (nyúl,</b> <b>monoklonális)</b>	Abcam	ab240288	Bollinger és mtsai., 2019	AB_2721123	Rekombináns protein részlet (a szekvencia a cég üzleti titokként kezelt tulajdona)	1:16000
<b>FOSB/ΔFOSB (FOSB) (nyúl,</b> <b>poliklonális)</b>	Santa Cruz	sc-48	Sterrenburg és mtsai., 2011	AB_631515	egér FOSB protein középső szakasza	1:500
<b>GFAP</b> <b>(egér,</b> <b>monoklonális)</b>	Novocastra	NCLLGFA P-GA5	Kálmán és mtsai., 2019	AB_563739	Sertés gerincvelő	1:1000
<b>GFAP</b> <b>(nyúl,</b> <b>monoklonális)</b>	Abcam	Ab33922	MacLeod és mtsai., 2019	AB_732571	C terminus szintetikus fehérje (a szekvencia a gyártó által meghatározva)	1:1500
<b>GFP</b> <b>(csirke,</b> <b>poliklonális)</b>	Abcam	ab13970	Huesing és mtsai., 2021	AB_300798	rekombináns teljes hosszúságú zöld fluoreszcens fehérje	1:2000
<b>H3K9ac (acetyl-lysine 9 H3 histone) (nyúl,</b> <b>poliklonális)</b>	Sigma	SAB4500347	Merschbacher és mtsai., 2016	AB_10742909	szintetikus peptid a mely a 3-52 aminosav szakaszt tartalmazza a Lys 9 acetilációs hellyel	1:4000
<b>iNOS</b> <b>(nyúl,</b> <b>monoklonális)</b>	Abcam	ab178945	Kapralov és mtsai., 2020	AB_2861417	Rekombináns protein részlet (a szekvencia a cég üzleti titokként kezelt tulajdona)	1:250

<b>IBA1</b> (kecske, poliklonális)	Wako Ltd.	011-27991	Ryan és mtsai., 2020	AB_2935833	C terminus szintetikus IBA1 fehérjefragmentum	1:500
<b>IBA1</b> (nyúl, poliklonális)	Wako Ltd.	019-19741	Homma és mtsai., 2006	AB_839504	C terminus szintetikus IBA1 fehérjefragmentum	1:1000
<b>MC4R</b> (kecske, poliklonális)	Santa Cruz	sc-6880	Füredi és mtsai., 2017	AB_2143109	egér, patkány melanocortin 4 receptor	1:100
<b>NeuN</b> (egér, monoklonális)	Millipore	MAB377	Kim és mtsai., 2006	AB_2298772	Tisztított sejtmag egér agyból	1:1000
<b>pAKT</b> (nyúl, monoklonális)	Cell Signaling Technology	4058	Xu és mtsai., 2011	AB_331168	Ser473 foszforilált Akt	1:100
<b>pERK</b> (nyúl, poliklonális)	Santa Cruz	sc-7976-R	Xu és mtsai., 2011	AB_2297323	Tyr 204 foszforilált egér patkány, ember p-ERK	1:300
<b>pHSL</b> (nyúl, poliklonális)	Cell Signaling Technology	4139	Xu és mtsai., 2011	AB_2135495	patkány, Ser563 foszforilált hormon szenzitív lipáz	1:100
<b>pSTAT3</b> (nyúl, poliklonális)	Cell Signaling Technology	9131	Xu és mtsai., 2011	AB_331586	Tyr 705 foszforilált Stat3	1:500
<b>TH</b> (egér, monoklonális)	Sigma	T2928	Parsons és mtsai., 2007	AB_477569	patkány tirozin- hidroxiláz	1:2000
<b>TH</b> (nyúl, poliklonális)	Abcam	ab112	Cui és mtsai., 2019	AB_297840	Teljes hosszúságú fehérje patkány pheochromocytomából	1:2000

<b>TNFalpha</b> (egér, monoklonális)	Abcam	ab220210	Deng és mtsai., 2021	AB_2892586	Rekombináns TNFalpha- val egyező fehérje	1:200
<b>UCN1</b> (kecske, poliklonális)	Santa Cruz	SC1825	Gaszner és mtsai., 2007	AB_2304014	C terminus fehérje fragmentum patkány UCN1	1:200
<b>UCN1</b> (nyúl, poliklonális)	Salk Institute Prof. WW. Vale	PBL#5779	Korosi és mtsai., 2007	AB_231552	patkány UCN1 (1–40 aminosav)	1:20000
<b>5HT</b> (egér, monoklonális)	Universite' Claude Bernard, Lyon, Franciaország Dr. Luciene Leger	saját készítésű	Kormos és mtsai., 2016	nincs	BSA-konjugált 5HT	1:20000

**FI. táblázat.** A projekteken használt elsődleges antitestek összefoglaló táblázata. Az antiszérumok neve, eredete, fajtája, katalógusszáma, irodalmi referenciák, RRID adatai, valamint az immunizálásra használt antigénekre és a festések során alkalmazott hígításokra vonatkozó adatok.

Termék neve	Gyártó	Katalógus-szám	RRID	Hígítás
Normál szamár szérum (NDS)	Jackson Immunoresearch	017-000-121	AB_2337258	2-5%
Normál kecske szérum (NGS)		005-000-001	AB_2336983	2-5%
AF488 szamár anti-egér IgG		706-545-148	AB_2340472	1:200
AF488 szamár anti-tengerimalac IgG		706-545-148	AB_2340472	1:500
AF488 szamár anti-kecske IgG		706-545-148	AB_2340472	1:600
Cy2 szamár anti-kecske IgG		705-225-147	AB_2307341	1:200
Cy2 szamár anti-egér IgG		715-225-151	AB_2340827	1:200
Cy2 szamár anti-csirke IgG		703-225-155	AB_2340370	1:100
Cy2 szamár anti-nyúl IgG		711-225-152	AB_2340612	1:250
Cy3 szamár anti-kecske IgG		705-165-147	AB_2307351	1:800
Cy3 szamár anti-nyúl IgG		711-165-152	AB_2307443	1:800
Cy3 szamár anti-egér IgG		715-165-151	AB_2315777	1:500
AF647 szamár anti-nyúl IgG		711-605-152	AB_2492288	1:500
AF647 szamár anti-nyúl IgG		Thermo Fisher	A31573	AB_2536183
AF647 szamár anti-kecske IgG	Jackson Immunoresearch	705-605-003	AB_2340436	1:500
Biotin szamár anti-nyúl IgG		711-065-152	AB_2340593	1:1000
Biotin szamár anti-kecske IgG		705-065-147	AB_2340397	1:1000
AF488 konjugált sztreptavidin		016-540-084	AB_2337249	1:2000
Cy3 konjugált sztreptavidin		016-160-084	AB_2337244	1:2000
Cy5 konjugált sztreptavidin		016-170-084	AB_2337245	1:1000

**F2. táblázat.** A festésekhez használt normál szérumok, fluorofór illetve biotin konjugált szekunder immunglobulinok (IgG), valamint a fluoreszcens festékekkel jelölt sztreptavidin reagensek összefoglaló táblázata. AF: Alexa Fluor. Cy: Cyanine.

Gén	Primer nukleotid szekvencia	Primer-típus	Termék mérete (bp)	NCBI referen-cia szekvencia
Hs <i>TRPA1</i>	TCCTCTCCATCTGGCAGCAAAG	F	115	NM_007332.3
	GGACGCATGATGCAAAGCTGTC	R		
Hs <i>POLR2A</i>	GAGAGCGTTGAGTTCCAGAACC	F	152	NM_000937.5
	TGGATGTGTGCGTTGCTCAGCA	R		
Hs <i>UCN1</i>	CTTCTCTGTCCATTGACCTCACC	F	123	NM_003353.4
	ATCACTTGCCCACCGAGTCGAA	R		
Mm <i>Trpa1</i>	ATCCAAATAGACCCAGGCACG	F	101	NM_177781.5
	CAAGCATGTGTCAATGTTTGGTACT	R		
Mm <i>Actb</i>	CTGTATGCCTCTGGTCGTAC	F	214	NM_007393.5
	TGATGTCACGCACGATTTCC	R		
Mm <i>Gapdh</i>	TTCACCACCATGGAGAAGGC	F	237	NM_008084.3
	GGCATGGACTGTGGTCATGA	R		
Rn <i>Adrb3</i>	CAGAACTCACCGCTCAACAG	F	141	NM_013108.2
	ATCCATGGACGTTGCTTGTC	R		
Rn <i>Ucp1</i>	CCACAGAAAGCTTGTC AACACT	F	150	NM_012682.2
	AATGGCAGGGGACGTCAT	R		
Rn <i>18S rRNS</i>	ACGGACCAGAGCGAAAGCAT	F	310	M11188
	TGTCAATCCTGTCCGTGTCC	R		

**F3. táblázat.** RT-PCR primerek. Hs: *Homo sapiens*. Mm: *Mus musculus*. Rn: *Rattus norvegicus*. bp: bázispár, F: forward, R: reverse.



Agyte- rület	ANOVA (F és p értékek)			PACAP im- mun-reaktív rostok relatív denzitása (Hannibal, 2002)	PACAP WT és KO ege- rek stresszre adott FOS válaszának különbsége	A PACAP KO és WT egerek FOS stresszválaszának összehasonlítása (Fisher féle post hoc tesztek p ér- tékei)
	stressz	genotípus	interakció			
CEA	<b>F=50,97</b> <b>p&lt;10<sup>-5</sup></b>	F=0,79 p=0,38	F=1,62 p=0,22	+++	-21%	p=0,14
MeA	<b>F=47,02</b> <b>p&lt;10<sup>-4</sup></b>	F=0,41 p=0,52	F=1,24 p=0,28	+++	-19%	p=0,23
BLA	<b>F=80,27</b> <b>p&lt;10<sup>-4</sup></b>	F=0,94 p=0,34	<b>F=5,51</b> <b>p&lt;0,04</b>	+	<b>-27,5%</b>	<b>p=0,032</b>
BNSTo v	<b>F=32,52</b> <b>p&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>F=9,26</b> <b>p&lt;0,01</b>	<b>F=10,97</b> <b>p&lt;0,01</b>	+++	<b>-63,84%</b>	<b>p=0,0003</b>
BNSTdl	<b>F=51,05</b> <b>p&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>F=4,93</b> <b>p&lt;0,05</b>	<b>F=9,09</b> <b>p&lt;0,01</b>	+++	<b>-40,1%</b>	<b>p=0,0019</b>
BNSTd m	<b>F=40,10</b> <b>p&lt;10<sup>-4</sup></b>	F=0,64 p=0,43	F=3,62 p=0,07	-	-27%	p=0,073
BNSTv	<b>F=50,94</b> <b>p&lt;10<sup>-5</sup></b>	F=0,02 p=0,88	<b>F=8,40</b> <b>p&lt;0,02</b>	-	<b>-25%</b>	<b>p=0,046</b>
dLS	<b>F=37,43</b> <b>p&lt;10<sup>-4</sup></b>	F=0,35 p=0,55	F=1,88 p=0,19	+++	-24,58%	p=0,18
vLS	<b>F=31,16</b> <b>p&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>F=5,85</b> <b>p&lt;0,03</b>	F=2,17 p=0,16	+++	<b>-45,9%</b>	<b>p=0,011</b>
EWcp	<b>F=164,56</b> <b>p&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>F=5,34</b> <b>p&lt;0,01</b>	<b>F=23,87</b> <b>p&lt;0,001</b>	+	<b>-43,4%</b>	<b>p&lt;10<sup>-5</sup></b>
DR	<b>F=96,13</b> <b>p&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>F=40,75</b> <b>p&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>F=49,10</b> <b>p&lt;10<sup>-6</sup></b>	+	<b>-78,61%</b>	<b>p&lt;10<sup>-6</sup></b>
dPAG	<b>F=49,38</b> <b>p&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>F=9,23</b> <b>p&lt;0,01</b>	<b>F=5,93</b> <b>p&lt;0,03</b>	+++	-4,83%	p=0,67
IPAG	<b>F=225,14</b> <b>p&lt;10<sup>-6</sup></b>	F=1,5971 p=0,22	<b>F=41,45</b> <b>p&lt;10<sup>-5</sup></b>	+++	<b>-21,72%</b>	<b>p=0,0021</b>
PVNm	<b>F=64,09</b> <b>p&lt;10<sup>-5</sup></b>	F=0,65 p=0,41	<b>F=15,97</b> <b>p&lt;0,01</b>	+++++	<b>-36,04%</b>	<b>p=0,0035</b>
PVNp	<b>F=89,16</b> <b>p&lt;10<sup>-7</sup></b>	F=1,49 p=0,23	<b>F=14,43</b> <b>p&lt;0,01</b>	+++++	<b>-36,46%</b>	<b>p=0,0026</b>

**F4. táblázat.** A FOS immunreaktív sejtszámokon végzett statisztikai teszteredmények összefoglalása, akut stressz modellben párhuzamba állítva az egyes, stresszben szerepet játszó területek PACAP immunreaktív rostjainak denzitásával Hannibal (2002.) alapján, valamint a FOS reaktivitás gyengülésének mértékével PACAP hiányban. PACAP WT: vad típusú, PACAP KO: a PACAP génkiütött (knockout) egér. (A szignifikáns értékeket félkövér betűtípussal emeltük ki.)

		Két utas ANOVA			A FOSB/ $\Delta$ FOSB immunjel különbség nagysága a stressznek kitett WT és KO egerek között (Fisher-féle post hoc teszt)
		Főhatások		Interakció	
Agyterület		CVMS	genotípus	CVMS $\times$ genotípus	
CeA	F <sub>3,22</sub>	<b>5,25</b>	<b>8,57</b>	<b>9,01</b>	<b>-54,74%</b> <b>p&lt;0,001</b>
	p	<b>&lt;0,04</b>	<b>&lt;0,02</b>	<b>&lt;0,01</b>	
MeA	F <sub>3,22</sub>	<b>8,55</b>	2,05	1,04	
	p	<b>&lt;0,01</b>	0,16	0,32	
BLA	F <sub>3,22</sub>	0,14	0,40	0,70	
	p	0,70	0,53	0,41	
BNSTdm	F <sub>3,22</sub>	<b>5,65</b>	<b>4,60</b>	<b>6,61</b>	<b>-56,96%</b> <b>p&lt;0,01</b>
	p	<b>&lt;0,04</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,03</b>	
BNSTdl	F <sub>3,22</sub>	0,05	3,80	2,08	
	p	0,81	0,07	0,17	
BNSTov	F <sub>3,22</sub>	<b>10,12</b>	<b>9,32</b>	<b>7,44</b>	<b>-47,59%</b> <b>p&lt;0,001</b>
	p	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,02</b>	
BNSTv	F <sub>3,22</sub>	0,03	0,04	<b>12,27</b>	<b>-51,33%</b> <b>p&lt;0,03</b>
	p	0,84	0,83	<b>&lt;0,01</b>	
CA1	F <sub>3,22</sub>	2,76	<b>7,00</b>	<b>5,62</b>	<b>-67,77%</b> <b>p&lt;0,01</b>
	p	0,11	<b>&lt;0,02</b>	<b>&lt;0,04</b>	
CA3	F <sub>3,22</sub>	0,01	0,14	2,20	
	p	0,99	0,71	0,15	
DG	F <sub>3,22</sub>	<b>8,15</b>	0,16	0,48	
	p	<b>&lt;0,02</b>	0,69	0,49	
vLS	F <sub>3,22</sub>	<b>14,66</b>	3,65	<b>6,20</b>	<b>-61,07%</b> <b>p=0,01</b>
	p	<b>&lt;0,01</b>	0,08	<b>&lt;0,04</b>	
dLS	F <sub>3,22</sub>	2,27	0,34	0,15	
	p	0,15	0,56	0,70	
PVNp	F <sub>3,22</sub>	<b>50,79</b>	2,58	<b>51,28</b>	<b>-81,79%</b> <b>p&lt;0,00001</b>
	p	<b>p&lt;10<sup>-5</sup></b>	0,12	<b>p&lt;10<sup>-5</sup></b>	
PVNm	F <sub>3,22</sub>	<b>6,20</b>	2,88	2,09	
	p	<b>&lt;0,03</b>	0,11	0,16	
dPAG	F <sub>3,22</sub>	0,31	0,005	2,54	
	p	0,58	0,94	0,12	
IPAG	F <sub>3,22</sub>	<b>5,14</b>	0,16	<b>4,63</b>	<b>-19,47%</b> <b>p=0,08</b>
	p	<b>&lt;0,04</b>	0,69	<b>&lt;0,05</b>	
EWcp	F <sub>3,22</sub>	<b>6,56</b>	0,14	0,32	
	p	<b>&lt;0,03</b>	0,70	0,57	
DR	F <sub>3,22</sub>	<b>18,21</b>	1,72	<b>8,44</b>	<b>-58,53%</b> <b>p&lt;0,01</b>
	p	<b>&lt;0,001</b>	0,20	<b>&lt;0,01</b>	

**F5. táblázat:** A kétutas varianciaanalízis (ANOVA) az injekciós kezelésben nem részesült egerek mintáin végzett FOSB/ $\Delta$ FOSB immunfestés eredményein (1. adathalmaz). A jobb oldali oszlop összegzi, hogy a genotípus milyen mértékben befolyásolja a FOSB/ $\Delta$ FOSB expressziót a Fisher-féle post hoc teszt eredményei szerint. Rövidítések: nucleus centralis (CeA), medialis (MeA) et basolateralis (BLA) amygdalae; nucleus dorsomedialis (BNSTdm), dorsolateralis (BNSTdl), ovalis (BNSTov), ventralis (BNSTv) nuclei interstitialis striae terminalis. A hippocampus CA1, CA3 régiói és a gyrus dentatus (DG). Ventrális (vLS) és dorsális (dLS) almagok a nucleus lateralis septi területén; pars parvocellularis (PVNp) et magnocellularis (PVNm) nuclei paraventricularis hypothalami, dorsalis (dPAG) és lateralis (IPAG) periaqueductalis szürkeállomány, EWcp: centrális projekciójú Edinger-Westphal mag; DR: nucleus raphe dorsalis, CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz; WT: vad típusú, KO: a PACAP génkiütött (knockout) egér. A szignifikáns értékeket **félkövér** betűtípussal emeltük ki.

		MANOVA						
		Főhatások			Interakciók			
Agyterület		CVMS	kezelés	genotípus	CVMS × kezelés	CVMS × genotípus	kezelés × genotípus	CVMS × kezelés × genotípus
CeA	F <sub>7,41</sub>	<b>9,26</b>	<b>8,43</b>	2,14	2,39	0,17	<b>4,22</b>	1,40
	p	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,15	0,13	0,67	<b>&lt;0,05</b>	0,24
MeA	F <sub>7,40</sub>	<b>28,46</b>	<b>7,28</b>	0,03	0,59	0,01	3,37	0,62
	p	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>&lt;0,02</b>	0,84	0,44	0,91	0,07	0,43
BLA	F <sub>7,41</sub>	1,77	0,30	1,21	1,87	0,11	1,56	0,03
	p	0,19	0,58	0,27	0,18	0,73	0,22	0,84
BNSTdm	F <sub>7,40</sub>	<b>18,33</b>	0,01	<b>4,56</b>	0,01	2,94	<b>6,85</b>	<b>5,08</b>
	p	<b>&lt;0,001</b>	0,90	<b>&lt;0,05</b>	0,94	0,09	<b>&lt;0,02</b>	<b>&lt;0,04</b>
BNSTdl	F <sub>7,41</sub>	0,83	0,12	2,23	0,03	0,45	0,04	0,06
	p	0,36	0,72	0,14	0,85	0,50	0,83	0,80
BNSTov	F <sub>7,39</sub>	0,53	2,53	<b>15,67</b>	0,14	1,02	2,29	0,31
	p	0,47	0,12	<b>&lt;0,001</b>	0,70	0,32	0,14	0,58
BNSTv	F <sub>7,41</sub>	0,70	1,80	1,11	0,36	0,03	<b>7,81</b>	0,05
	p	0,40	0,18	0,29	0,54	0,85	<b>&lt;0,01</b>	0,81
CA1	F <sub>7,41</sub>	0,15	0,06	2,92	2,53	1,31	<b>4,79</b>	1,37
	p	0,69	0,80	0,09	0,12	0,26	<b>&lt;0,04</b>	0,24
CA3	F <sub>7,41</sub>	0,10	0,30	1,32	1,30	0,53	<b>4,44</b>	1,05
	p	0,74	0,58	0,25	0,26	0,47	<b>&lt;0,05</b>	0,31
DG	F <sub>7,40</sub>	2,39	0,89	0,28	3,17	0,08	<b>4,41</b>	2,72
	p	0,13	0,35	0,60	0,08	0,77	<b>&lt;0,05</b>	0,11
vLS	F <sub>7,41</sub>	<b>20,02</b>	<b>4,92</b>	<b>5,32</b>	1,76	<b>6,90</b>	0,61	0,61
	p	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,04</b>	<b>&lt;0,03</b>	0,19	<b>&lt;0,02</b>	0,44	0,43
dLS	F <sub>7,41</sub>	1,18	0,30	1,20	0,65	0,43	0,03	0,12
	p	0,28	0,58	0,28	0,42	0,51	0,85	0,72
PVNp	F <sub>7,41</sub>	<b>5,67</b>	<b>15,14</b>	<b>33,91</b>	<b>9,61</b>	0,006	0,29	0,82
	p	<b>&lt;0,03</b>	<b>&lt;10<sup>-3</sup></b>	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>&lt;0,01</b>	0,93	0,59	0,37
PVNm	F <sub>7,41</sub>	<b>8,46</b>	1,08	0,03	0,06	0,09	0,56	1,53
	p	<b>&lt;0,01</b>	0,30	0,85	0,79	0,76	0,45	0,22
dPAG	F <sub>7,41</sub>	2,61	0,0005	1,98	0,03	0,0001	0,48	0,009
	p	0,11	0,98	0,16	0,84	0,99	0,49	0,97
IPAG	F <sub>7,41</sub>	<b>15,53</b>	0,17	0,09	0,0001	0,49	0,22	0,10
	p	<b>&lt;0,001</b>	0,67	0,76	0,99	0,48	0,63	0,74
EWcp	F <sub>7,40</sub>	0,91	0,01	<b>11,12</b>	0,5	<b>14,43</b>	1,32	0,10
	p	0,34	0,97	<b>&lt;0,01</b>	0,48	<b>&lt;0,001</b>	0,25	0,74
DR	F <sub>7,41</sub>	<b>23,87</b>	1,60	<b>7,00</b>	<b>4,66</b>	<b>4,88</b>	3,03	0,74
	p	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	0,21	<b>&lt;0,02</b>	<b>&lt;0,04</b>	<b>&lt;0,04</b>	0,09	0,39

**F6. táblázat:** A multifaktoriális varianciaanalízis (MANOVA) FOSB/ $\Delta$ FOSB immunhisztokémia eredményein, melyek az injekciós kezeléseken átesett állatok mintáiból származnak (2. adathalmaz). Rövidítések: nucleus centralis (CeA), medialis (MeA) et basolateralis (BLA) amygdalae; nucleus dorsomedialis (BNSTdm), dorsolateralis (BNSTdl), ovalis (BNSTov), ventralis (BNSTv) nucleii interstitialis striae terminalis. A hippocampus CA1, CA3 régiói és a gyrus dentatus (DG). Ventrális (vLS) és dorsális (dLS) almagok a nucleus lateralis septi területén; pars parvocellularis (PVNp) et magnocellularis (PVNm) nucleii paraventricularis hypothalami, dorsalis (dPAG) és lateralis (lPAG) periaqueductalis szürkeállomány. EWcp: centrális projekciójú Edinger-Westphal mag; DR: nucleus raphe dorsalis, CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz. (A szignifikáns értékeket félkövér betűtípussal emeltük ki.)

Agyterület	Vizsgált paraméter	Kétutas ANOVA			
			CVMS	genotípus	CVMS × genotípus interakció
CeA	CRH-FOSB/ΔFOSB kolokalizáció	F <sub>3,22</sub>	<b>7,19</b>	<b>10,38</b>	<b>8,34</b>
		p	<b>&lt;0,02</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,02</b>
	CRH sejtszám	F <sub>3,22</sub>	0,63	0,21	0,07
		p	0,43	0,65	0,79
	CRH SSD	F <sub>3,22</sub>	0,004	0,53	3,25
		p	0,95	0,47	0,09
EWcp	UCN1-FOSB/ΔFOSB kolokalizáció	F <sub>3,22</sub>	<b>7,68</b>	<b>12,44</b>	4,06
		p	<b>&lt;0,02</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,06
	UCN1 sejtszám	F <sub>3,22</sub>	0,81	<b>5,37</b>	0,62
		p	0,38	<b>&lt;0,04</b>	0,44
	UCN1 SSD	F <sub>3,22</sub>	0,14	0,80	0,65
		p	0,71	0,38	0,43
DR	5HT sejtszám	F <sub>3,22</sub>	3,37	<b>4,84</b>	4,56
		p	0,08	<b>&lt;0,05</b>	0,052
	5HT SSD	F <sub>3,22</sub>	<b>46,61</b>	<b>7,19</b>	<b>18,42</b>
		p	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>&lt;0,02</b>	<b>&lt;0,001</b>

**F7. táblázat:** A kétutas varianciaanalízissel (ANOVA) az injekciós kezelésben nem részesült egerek mintáin végzett kettős jelölések eredményein (1. adathalmaz). CeA: nucleus centralis amygdalae, EWcp: centrális projekciójú Edinger-Westphal mag; DR: nucleus raphe dorsalis, CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz; SSD: specifikus jeldenzítés. A szignifikáns értékeket **félkövér** betűtípussal emeltük ki.

Agyterület	Vizsgált paraméter	MANOVA							
			Főhatás			Interakció			
			CVMS	kezelés	genotípus	CVMS × kezelés	CVMS × genotípus	kezelés × genotípus	CVMS × kezelés × genotípus
CeA	CRH-FOSB/ΔFOSB kolokalizáció	F <sub>7,41</sub>	1,37	0,13	<b>10,47</b>	2,08	<b>6,41</b>	2,28	0,21
		p	0,25	0,72	<b>&lt;0,01</b>	0,15	<b>&lt;0,02</b>	0,14	0,65
	CRH sejtszám	F <sub>7,41</sub>	1,86	0,37	<b>7,48</b>	0,25	0,23	0,85	1,82
		p	0,18	0,57	<b>&lt;0,02</b>	0,61	0,62	0,36	0,18
	CRH SSD	F <sub>7,41</sub>	1,89	0,49	0,003	0,15	1,17	0,08	2,73
		p	0,17	0,48	0,95	0,70	0,28	0,76	0,10
EWcp	UCN1-FOSB/ΔFOSB kolokalizáció	F <sub>7,41</sub>	2,06	0,05	4,12	0,06	2,06	0,95	0,22
		p	0,16	0,81	0,051	0,79	0,16	0,33	0,63
	UCN1 sejtszám	F <sub>7,41</sub>	0,64	0,81	0,24	1,37	0,003	0,03	2,11
		p	0,42	0,37	0,62	0,24	0,95	0,84	0,15
	UCN1 SSD	F <sub>7,41</sub>	<b>7,89</b>	1,63	3,53	0,54	0,55	0,23	0,11
		p	<b>&lt;0,01</b>	0,21	0,06	0,46	0,46	0,63	0,73
DR	5HT sejtszám	F <sub>7,41</sub>	0,17	0,04	2,67	1,13	0,75	4,18	0,28
		p	0,68	0,83	0,11	0,71	0,39	0,053	0,59
	5HT SSD	F <sub>7,41</sub>	1,90	0,07	3,68	0,157	0,34	<b>5,19</b>	<b>7,90</b>
		p	0,17	0,78	0,06	0,69	0,56	<b>&lt;0,04</b>	<b>&lt;0,01</b>

**F8. táblázat.** A multifaktoriális varianciaanalízis (MANOVA) eredményeinek az injekciós kezelésen átesett egerek mintáin (2. adathalmaz). CeA: nucleus centralis amygdalae, EWcp: centrális projekciójú Edinger-Westphal mag, DR: nucleus raphe dorsalis, CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz; SSD: specifikus jeldenzítés. A szignifikáns értékeket **félkövér** betűtípussal emeltük ki.

Vizsgált paraméter	ANOVA					
	CVMS		Genotípus		Interakció	
	F <sub>1,56</sub>	p	F <sub>1,56</sub>	p	F <sub>1,56</sub>	p
eltemetett üveggolyók MBT-ben	<b>178,9</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>4,81</b>	<b>0,03</b>	0,04	0,82
periférián megtett út OFT-ben	<b>14,81</b>	<b>0,0003</b>	1,20	0,27	<b>23,29</b>	<b>0,00001</b>
periférián töltött idő OFT-ben	<b>10,52</b>	<b>0,002</b>	<b>42,31</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>33,18</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>
cukorpreferencia SPT-ben	<b>15,70</b>	<b>0,0002</b>	0,01	0,97	0,03	0,87
immobilitási idő TST-ben	<b>15,74</b>	<b>0,0002</b>	3,01	0,08	0,16	0,68
immobilitási idő FST-ben	<b>15,23</b>	<b>0,0006</b>	0,66	0,42	<b>7,4</b>	<b>0,01</b>
plazma ACTH	2,75	0,11	0,23	0,63	<b>11,63</b>	<b>0,004</b>
plazma CORT	<b>5,00</b>	<b>0,03</b>	0,09	0,92	0,01	0,90
relatív mellékvesetömeg	<b>113,84</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>9,13</b>	<b>0,03</b>	<b>4,46</b>	<b>0,039</b>
relatív thymustömeg	<b>7,31</b>	<b>0,009</b>	<b>24,59</b>	<b>0,000007</b>	<b>15,79</b>	<b>0,002</b>
testtömegváltozás	<b>100,85</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>4,71</b>	<b>0,03</b>	3,72	0,058
testtömeg	<b>11,68</b>	<b>0,001</b>	<b>4,53</b>	<b>0,037</b>	1,003	0,321
<i>Ucn1</i> mRNS	<b>5,30</b>	<b>0,02</b>	<b>4,5</b>	<b>0,04</b>	0,43	0,51
UCN1 peptid	0,94	0,34	0,45	0,50	<b>5,22</b>	<b>0,03</b>

**F9. táblázat.** A *Trpa1* WT és KO állatok vizsgálata során gyűjtött eredmények varianciaanalízisének (ANOVA) összefoglalója. A krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS), a genotípus és ezek interakciójának hatásait jellemző F és p értékek. A szignifikáns eredményeket **félkövér** betűtípussal emeltük ki. Rövidítések: MBT: marble burying teszt, OFT: open field teszt, SPT: cukorpreferencia teszt, TST: tail suspension teszt, FST: forced swim teszt, ACTH: adrenocorticotrop hormon, CORT: kortikoszteron, urocortin 1 (*Ucn1* mRNS illetve UCN1 peptid).

Multifaktoriális varianciaanalízis														
Vizsgált paraméter	Főhatások						Interakciók							
	Genotípus (G)		Stressz (S)		Anyai gondoskodás (AG)		G × S		G × AG		S × AG		G × S × AG	
	F <sub>17,98</sub>	P	F <sub>17,98</sub>	P	F <sub>17,98</sub>	P	F <sub>17,98</sub>	P	F <sub>17,98</sub>	P	F <sub>17,98</sub>	P	F <sub>17,98</sub>	P
Testtömeg	2,23	0,11	<b>43,28</b>	<10 <sup>-3</sup>	0,70	0,49	<b>3,46</b>	<0,05	0,59	0,66	<b>6,66</b>	<0,01	1,24	0,29
Mellékvese-tömeg	0,75	0,47	<b>4,43</b>	<0,05	0,466	0,63	0,37	0,69	0,23	0,91	2,52	0,086	0,47	0,75
CORT	1,99	0,14	<b>32,89</b>	<10 <sup>-5</sup>	0,72	0,48	1,63	0,2	<b>2,51</b>	<0,05	0,74	0,47	<b>3,13</b>	<0,05
FST	<b>16,7</b>	<10 <sup>-4</sup>	0,12	0,72	1,83	0,16	4,63	<0,05	<b>5,21</b>	<10 <sup>-3</sup>	3,24	<0,05	<b>3,84</b>	<0,01
TST	<b>89,23</b>	<0,001	10,98	0,29	12,92	0,28	<b>55,54</b>	<0,01	<b>26,53</b>	<0,05	0,68	0,5	0,17	0,95
LDT	1,25	0,29	0,07	0,79	0,27	0,76	<b>5,11</b>	<0,01	0,72	0,58	<b>5,17</b>	<0,01	<b>3,56</b>	<0,05
LDT átlépések	10,79	0,34	0,05	0,82	15,92	0,21	<b>41,14</b>	<0,05	<b>31,63</b>	<0,05	0,43	0,65	0,7	0,59
LDT megsz. átlépések	126,28	0,28	0,04	0,84	148,73	0,23	118,66	0,31	0,41	0,80	0,85	0,43	0,44	0,77
MBT	<b>62,31</b>	<b>0,003</b>	<b>448,04</b>	<10 <sup>-4</sup>	23,22	0,11	29,18	0,06	19,5	0,11	<b>115,15</b>	<10 <sup>-4</sup>	15,62	0,19

**F10. táblázat.** A depresszió három találat elmélet alapján felállított állapotmodellünk vizsgálatának eredményei a multifaktoriális varianciaanalízis során. A táblázat a genotípus (G) a stressz (S) az anyai gondoskodás minősége (AG) főhatásait, valamint a faktorok interakcióit foglalja össze. A szignifikáns eredményeket **félkövér** betűtípussal emeltük ki. Rövidítések: CORT: plazma kortikoszteron szint, FST: forced swim teszt, TST: tail suspension teszt, LDT: világos kompartmentben töltött idő a light dark boksztészben. LDT átlépések: a kompartmentek közti átlépések száma light dark boksztészben. LDT megsz. átlépések: megszakított átlépések száma light dark boksztészben. MBT: marble burying teszt.

Vizsgált paraméter		Multifaktoriális varianciaanalízis													
		Főhatások						Interakciók							
		Genotípus (G)		Stressz (S)		Anyai gondoskodás (AG)		G × S		G × AG		S × AG		G × S × AG	
		F <sub>17,98</sub>	p	F <sub>17,98</sub>	p	F <sub>17,98</sub>	p	F <sub>17,98</sub>	p	F <sub>17,98</sub>	p	F <sub>17,98</sub>	p	F <sub>17,98</sub>	p
BNSTov CRH-FOSB	<b>6,39</b>	<b>0,002</b>	<b>10,21</b>	<b>0,002</b>	<b>4,38</b>	<b>0,01</b>	1,86	0,16	0,76	0,55	0,76	0,47	0,33	0,86	
BNSTov CRH sejttség	1,17	0,31	<b>4,63</b>	<b>0,03</b>	<b>17,85</b>	<10 <sup>-5</sup>	0,35	0,7	0,82	0,52	2,7	0,07	1,05	0,34	
BNSTov CRH SSD	0,87	0,42	<b>97,02</b>	<b>0,002</b>	<b>43,88</b>	<b>0,01</b>	0,09	0,91	15,23	0,2	23,34	0,1	16,74	0,16	
UCN1-FOSB	<b>8,46</b>	<10 <sup>-3</sup>	<b>8,5</b>	<b>0,004</b>	<b>10,05</b>	<10 <sup>-3</sup>	1,08	0,34	1,61	0,18	<b>5,53</b>	<b>0,005</b>	1,92	0,11	
UCN1 SSD	<b>11,09</b>	<10 <sup>-3</sup>	4,7	<b>0,03</b>	<b>4,82</b>	<b>0,01</b>	0,56	0,57	0,68	0,6	<b>5,59</b>	<b>0,005</b>	1,73	0,15	
UCN1 sejttség	<b>5,04</b>	<b>0,008</b>	<b>14,49</b>	<10 <sup>-3</sup>	1,1	0,33	0,29	0,74	2,00	0,1	1,75	0,18	1,5	0,21	
5HT SSD	<b>3,62</b>	<b>0,03</b>	0,41	0,52	<b>5,13</b>	<b>0,008</b>	0,52	0,59	<b>2,59</b>	<b>0,04</b>	<b>3,55</b>	<b>0,003</b>	0,17	0,95	
5HT-FOSB	0,42	0,66	<b>55,42</b>	<b>0,02</b>	0,81	0,45	<b>37,45</b>	<b>0,03</b>	<b>26,35</b>	<b>0,04</b>	<b>245,88</b>	<10 <sup>-5</sup>	0,76	0,55	
5HT sejttség	0,46	0,63	<b>4,5</b>	<b>0,04</b>	0,49	0,61	0,37	0,7	0,18	0,95	0,52	0,6	0,94	0,44	

**Fig. táblázat.** A depresszió három találat elmélet alapján felállított állapotmodellünk vizsgálatának eredményei a multifaktoriális varianciaanalízis során. A táblázat a genotípus (G) a stressz (S) az anyai gondoskodás minősége (AG) főhatásait, valamint a faktorok interakcióit foglalja össze. A szignifikáns eredményeket félkövér betűtípussal emeltük ki. Rövidítések: BNSTov CRH-FOSB: CRH és FOSB/AFOSB kettősen jelölt sejtek száma a BNSTov területén. BNSTov CRH SSD: CRH specifikus jeldeztetés a BNSTov területén. UCN1-FOSB: UCN1 és FOSB/AFOSB kettősen jelölt sejtek száma az EWcp területén. UCN1 SSD: UCN1 specifikus jeldeztetés. 5HT SSD: szerotonin jeldeztetés a DR területén. 5HT-FOSB: 5HT és FOSB/AFOSB kettősen jelölt sejtek száma DR területén. 5HT sejttség: 5HT jelölt immunreaktív sejtek száma DR területén.

Vizsgált paraméter		MANOVA																	
		Főhatások						Interakciók											
		Stressz (S)		Anyai gondoskodás (AG)		Kezelés (K)		S × AG		S × K		K × AG		S × AG × K					
F <sub>1,32</sub>	p	F <sub>1,32</sub>	p	F <sub>17,98</sub>	p	F <sub>1,32</sub>	p	F <sub>1,32</sub>	p	F <sub>1,32</sub>	p	F <sub>1,32</sub>	p	F <sub>1,32</sub>	p				
Testtömeg	0,03	0,87	<b>7,61</b>	< <b>0,01</b>	0,04	0,84	0,13	<b>6,8</b>	< <b>0,02</b>	<b>4,27</b>	< <b>0,05</b>	<b>4,36</b>	< <b>0,05</b>						
Mellékvesetömeg	0,09	0,77	<b>9,38</b>	< <b>0,01</b>	2,12	0,16	0,26	2,07	0,16	0,15	0,71	<b>4,57</b>	< <b>0,05</b>						
Thymustömeg	<b>4,74</b>	< <b>0,05</b>	0,12	0,73	0,17	0,68	0,46	0,01	0,94	0,06	0,81	<b>11,25</b>	< <b>0,01</b>						
Plazma kortikoszteron	0,23	0,64	0,51	0,48	0,63	0,43	0,94	0,04	0,84	1,83	0,18	<b>4,97</b>	< <b>0,05</b>						
Light-dark box teszt	0,28	0,60	<b>7,36</b>	< <b>0,05</b>	0,34	0,56	0,40	<b>9,00</b>	< <b>0,01</b>	0,83	0,37	1,23	0,27						
Marble burying teszt	<b>52,04</b>	< <b>10<sup>-7</sup></b>	0,03	0,87	<b>36,37</b>	< <b>10<sup>-6</sup></b>	0,18	<b>16,38</b>	< <b>0,001</b>	0,29	0,59	1,30	0,26						
Tail suspension teszt	0,69	0,41	2,79	0,11	<b>14,63</b>	< <b>0,001</b>	<b>6,09</b>	0,01	0,96	<b>5,62</b>	< <b>0,05</b>	2,12	0,15						
Forced swim teszt	3,48	0,07	<b>17,75</b>	< <b>0,001</b>	<b>13,17</b>	< <b>0,001</b>	< <b>10<sup>-9</sup></b>	3,09	0,09	2,04	0,16	3,37	0,08						
PFC FOSB/ΔFOSB sejtszám	<b>4,93</b>	< <b>0,05</b>	0,040	0,85	1,21	0,28	0,94	<b>7,27</b>	< <b>0,05</b>	0,02	0,89	0,92	0,35						
PFC H3K9ac sejtszám	0,69	0,41	2,81	0,11	<b>4,72</b>	< <b>0,05</b>	0,50	0,49	0,95	<b>5,43</b>	< <b>0,05</b>	0,08	0,78						
CA1 FOSB/ΔFOSB sejtszám	1,92	0,18	<b>7,38</b>	< <b>0,05</b>	0,21	0,65	0,21	4,03	0,5	0,99	0,33	<b>7,24</b>	< <b>0,05</b>						
CA1 H3K9ac sejtszám	0,26	0,61	2,84	0,10	<b>11,17</b>	< <b>0,01</b>	< <b>0,01</b>	0,07	0,79	1,36	0,25	30,85	< <b>10<sup>-6</sup></b>						
CA3 FOSB/ΔFOSB sejtszám	0,25	0,62	<b>5,12</b>	< <b>0,05</b>	0,25	0,62	0,01	<b>11,71</b>	< <b>0,01</b>	0,11	0,75	<b>7,62</b>	< <b>0,01</b>						
CA3 H3K9ac sejtszám	0,04	0,84	<b>5,45</b>	< <b>0,05</b>	1,98	0,17	0,06	0,64	0,43	0,19	0,67	<b>29,29</b>	< <b>10<sup>-6</sup></b>						
DG FOSB/ΔFOSB sejtszám	2,65	0,12	0,21	0,65	<b>7,09</b>	< <b>0,05</b>	2,44	2,59	0,12	0,01	0,91	<b>9,27</b>	< <b>0,01</b>						
DG H3K9ac sejtszám	<b>15,25</b>	< <b>0,001</b>	<b>30,65</b>	< <b>10<sup>-6</sup></b>	0,16	0,70	< <b>10<sup>-6</sup></b>	<b>15,83</b>	< <b>0,001</b>	0,07	0,80	<b>74,61</b>	< <b>10<sup>-9</sup></b>						

**FI2. táblázat.** A depresszió három találat elmélet állapotmodelljében, a prediktív validitás vizsgálat során gyűjtött eredményeink elemzése multifaktorális varianciaanalízissel (MANOVA). A szignifikáns eredmények félkövér betűtípussal emeltük ki. AG: anyai gondoskodás. CA1: a hippocampus CA1 régiója. CA3: a hippocampus CA3 régiója. DG: gyrus dentatus. K: kezelés. PFC: prefrontális kéreg. H3K9ac: acetyl-liczin 9 H3 hiszton. S: krónikus variábilis enyhe stressz.



Vizsgált paraméter		MANOVA															
		Főhatások								Interakciók							
		Stressz (S)		Anyai gondoskodás (AG)		Kezelés (K)		S × AG		S × K		K × AG		S × AG × K			
F <sub>1,32</sub>	p	F <sub>1,32</sub>	p	F <sub>1,7,98</sub>	p	F <sub>1,32</sub>	p	F <sub>1,32</sub>	p	F <sub>1,32</sub>	p	F <sub>1,32</sub>	p	F <sub>1,32</sub>	p		
BNSTov CRH sejtszám	1,58	0,22	3,25	0,08	<b>84,31</b>	<10 <sup>-10</sup>	2,39	0,13	<b>10,31</b>	<0,01	<b>5,03</b>	<0,05	7,79	<0,01			
BSNTov CRH-FOSB/ΔFOSB sejtszám	<b>16,93</b>	<10 <sup>-3</sup>	<b>5,02</b>	<0,05	<b>75,47</b>	<10 <sup>-9</sup>	0,39	0,54	<b>16,30</b>	<10 <sup>-3</sup>	0,30	0,59	1,00	0,33			
BNSTov CRH SSD	1,01	0,95	<b>195,0</b>	<10 <sup>-14</sup>	<b>39,60</b>	<10 <sup>-6</sup>	0,20	0,65	<b>14,08</b>	<10 <sup>-3</sup>	<b>33,61</b>	<10 <sup>-5</sup>	2,42	0,13			
BSNTov H3K9ac sejtszám	0,89	0,35	1,16	0,29	0,30	0,59	0,85	0,37	1,42	0,25	0,22	0,64	1,49	0,24			
CeA CRH sejtszám	3,68	0,07	<b>7,05</b>	<0,05	2,28	0,14	<b>5,87</b>	<0,05	4,04	0,06	0,33	0,59	<b>16,94</b>	<10 <sup>-3</sup>			
CeA CRH-FOSB/ΔFOSB sejtszám	2,27	0,14	<b>7,93</b>	<0,01	2,72	0,11	<b>8,13</b>	<0,01	<b>7,63</b>	<0,05	0,25	0,62	<b>22,22</b>	<10 <sup>-4</sup>			
CeA CRH SSD	1,43	0,24	0,04	0,84	<b>17,47</b>	<10 <sup>-3</sup>	0,39	0,54	<b>10,10</b>	<0,01	0,29	0,60	0,56	0,46			
CeA H3K9ac sejtszám	1,95	0,17	1,20	0,28	<b>9,48</b>	<0,01	<b>7,35</b>	<0,05	0,30	0,59	<b>4,54</b>	<0,05	0,05	0,82			
VTA TH SSD	<b>11,40</b>	<0,01	<b>195,2</b>	<10 <sup>-14</sup>	3,14	0,09	<b>5,46</b>	<0,05	<b>7,34</b>	<0,05	<b>15,07</b>	<10 <sup>-3</sup>	<b>18,10</b>	<10 <sup>-3</sup>			
VTA H3K9ac sejtszám	<b>4,76</b>	<0,05	0,02	0,88	<b>11,47</b>	<0,01	<b>18,41</b>	<10 <sup>-3</sup>	1,72	0,20	<b>6,00</b>	<0,05	1,79	0,19			

**Fig. 13. táblázat.** A depresszió három találat elmélet állapotmodelljében, a prediktív validitás vizsgálat során gyűjtött eredményeink elemzése multifaktoriális varianciaanalízissel (MANOVA). A szignifikáns eredmények félkövér betűtípussal emeltük ki. AG: anyai gondoskodás. BNSTov: nucleus interstitialis striae terminalis ovális divíziója. CeA: nucleus centralis amygdalae. CRH: corticotropin-releasing hormon. K: kezelés. H3K9ac: acetil-lizin 9 H3 hiszton. S: krónikus variábilis enyhe stressz. SSD: specifikus jeldezítés. TH: tirozin-hidroxiláz. VTA: area tegmenti ventralis

Vizsgált paraméter		MANOVA													
		Főhatások						Interakciók							
		Stressz (S)		Anyai gondoskodás (AG)		Kezelés (K)		S × AG		S × K		K × AG		S × AG × K	
F <sub>1,32</sub>	P	F <sub>1,32</sub>	P	F <sub>17,98</sub>	P	F <sub>1,32</sub>	P	F <sub>1,32</sub>	P	F <sub>1,32</sub>	P	F <sub>1,32</sub>	P	F <sub>1,32</sub>	P
EWcp UCN1 sejtszám	<b>7,28</b>	<0,05	<b>5,52</b>	<0,05	<b>111,7</b>	<10 <sup>-11</sup>	<b>4,70</b>	<0,05	1,44	0,24	0,92	0,35	<b>6,31</b>	<0,05	
EWcp UCN1-FOSB/ΔFOSB sejtszám	<b>4,63</b>	<0,05	<b>189,1</b>	<10 <sup>-15</sup>	<b>52,05</b>	<10 <sup>-8</sup>	0,61	0,44	0,05	0,83	<b>4,26</b>	<0,05	1,41	0,24	
EWcp UCN1 SSD	<b>6,76</b>	<0,05	<b>51,62</b>	<10 <sup>-8</sup>	<b>20,46</b>	<10 <sup>-4</sup>	0,21	0,65	2,33	0,14	3,49	0,07	<b>6,40</b>	<0,05	
EWcp H3K9ac sejtszám	<b>4,51</b>	<0,05	<b>80,80</b>	<10 <sup>-9</sup>	0,01	0,91	<b>4,69</b>	<0,05	0,27	0,61	<b>5,35</b>	<0,05	<b>31,11</b>	<10 <sup>-6</sup>	
DR 5HT sejtszám	<b>26,19</b>	<10 <sup>-4</sup>	0,23	0,64	<b>29,07</b>	<10 <sup>-4</sup>	0,59	0,45	0,44	0,51	<b>66,37</b>	<10 <sup>-8</sup>	<b>11,49</b>	<0,01	
DR-FOSB/ΔFOSB sejtszám	0,95	0,34	0,01	0,99	0,05	0,82	0,14	0,71	0,41	0,53	1,47	0,24	<b>5,35</b>	<0,05	
DR 5HT SSD	<b>11,85</b>	<0,01	1,69	0,21	0,47	0,50	1,03	0,32	0,60	0,45	0,14	0,71	0,21	0,65	
DR H3K9ac sejtszám	3,43	0,07	0,59	0,45	2,71	0,11	0,17	0,69	0,10	0,76	<b>6,62</b>	<0,05	<b>6,34</b>	<0,05	

**F14. táblázat.** A depresszió három találat elmélet állapotmodelljében, a prediktív validitás vizsgálat során gyűjtött eredményeink elemzése multifaktorális varianciaanalízissel (MANOVA). A szignifikáns eredmények **felkövér** betűtípussal emeltük ki. AG: anyai gondoskodás. DR: nucleus raphe dorsalis. EWcp: centrális projekciójú Edinger-Westphal mag. K: kezelés. H3K9ac: acetil-lizin 9 H3 hiszton. S: krónikus variábilis enyhe stressz. SSD: specifikus jeldezítés. TH: tirozin-hidroxiáz. UCN1: Urocortin I. VTA: area tegmenti ventralis. 5HT: szerotonin.

Agyterület	Két utas ANOVA					
	Főhatások				ARS x kor interakció	
	ARS		Kor			
	F <sub>1,57</sub>	p	F <sub>7,57</sub>	p	F <sub>7,57</sub>	p
MeA	<b>517,11</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>16,05</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	0,73	0,65
CeA	<b>234,27</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>17,75</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>8,94</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>
BLA	<b>252,76</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>3,45</b>	<b>&lt;0,005</b>	<b>3,02</b>	<b>&lt;0,01</b>
BNSTov	<b>51,24</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>13,61</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	1,24	0,29
BNSTdl	<b>47,43</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>15,110</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	2,00	0,07
BNSTdm	<b>254,45</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>16,703</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	1,41	0,22
BNSTv	<b>177,10</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>3,38</b>	<b>&lt;0,005</b>	0,79	0,59
BNSTfu	<b>128,96</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>11,68</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>2,44</b>	<b>&lt;0,05</b>
PVNp	<b>298,44</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>6,18</b>	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>2,67</b>	<b>&lt;0,02</b>
PVNm	<b>173,59</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>5,61</b>	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>2,48</b>	<b>0,03</b>
EWcp	<b>85,11</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>3,89</b>	<b>&lt;0,005</b>	<b>3,36</b>	<b>&lt;0,01</b>
DR	<b>157,87</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>8,93</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>8,03</b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>
S1	<b>956,36</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>2,43</b>	<b>&lt;0,04</b>	1,95	0,07

**F15. táblázat.** A FOS immunreaktivitás értékelése az ARS modellben az életkor függvényében. Kétutas varianciaanalízissel (ANOVA) eredményeinek összefoglaló táblázata. A szignifikáns eltéréseket **félkövér** betűtípussal emeltük ki. Medialis (MeA), centrális (CeA), basolateralis amygdala (BLA). A nucleus interstitialis striae terminalis ovális (BNSTov), dorsolateralis (BNSTdl), dorsomedialis (BNSTdm), ventralis (BNSTv), fusiformis (BNSTfu) divíziói. Hypothalamus: nucleus paraventricularis pars parvocellularis (PVNp), nucleus paraventricularis pars magnocellularis (PVNm). Centrális projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp), nucleus raphe dorsalis (DR), szomatoszenzoros barrel cortex (S1). A magokban, ahol nem detektáltunk szignifikáns interakciót külön vizsgáltuk a kontroll és stressz csoportok korfüggő FOS aktivitását egyutas ANOVA segítségével (lásd F16. táblázat).

Agyterület	Kondíció	Egyutas ANOVA	
		Az életkor főhatása	
		F	p
MeA	Kontroll	<b>F<sub>7,29</sub>=6,54</b>	<b>p&lt;0,001</b>
	ARS	<b>F<sub>7,28</sub>=28,70</b>	<b>p&lt;10<sup>-6</sup></b>
BNSTov	Kontroll	<b>F<sub>7,29</sub>=9,62</b>	<b>p&lt;10<sup>-5</sup></b>
	ARS	<b>F<sub>7,28</sub>=7,46</b>	<b>p&lt;10<sup>-4</sup></b>
BNSTdl	Kontroll	<b>F<sub>7,29</sub>=7,69</b>	<b>p&lt;10<sup>-4</sup></b>
	ARS	<b>F<sub>7,28</sub>=11,10</b>	<b>p&lt;10<sup>-4</sup></b>
BNSTdm	Kontroll	<b>F<sub>7,29</sub>=7,93</b>	<b>p&lt;0,001</b>
	ARS	<b>F<sub>7,28</sub>=11,17</b>	<b>p&lt;10<sup>-4</sup></b>
BNSTv	Kontroll	F <sub>7,29</sub> =1,91	p=0,10
	ARS	<b>F<sub>7,28</sub>=3,06</b>	<b>p&lt;0,02</b>
S1	Kontroll	F <sub>7,29</sub> =1,58	p=0,18
	ARS	<b>F<sub>7,28</sub>=9,56</b>	<b>p&lt;10<sup>-5</sup></b>

**F16. táblázat.** FOS immunreaktivitás életkor függésének értékelése az ARS modellben egyutas varianciaanalízissel (ANOVA). A szignifikáns különbségeket **félkövéren** emeltük ki. Alkalmazott rövidítések: nucleus medialis amygdalae (MeA), nucleus interstitialis striae terminalis ovális (BNSTov), dorsolateralis (BNSTdl), dorsomedialis (BNSTdm) és ventralis (BNSTv) divíziói, szomatoszenzoros barrel cortex (S1).

Agyterület	Kondíció	Spearman korreláció	
		$\rho$	p
MeA	Kontrol	<b>-0,747</b>	<b>&lt;0,001</b>
	ARS	<b>-0,828</b>	<b>&lt;0,001</b>
CeA	Kontrol	<b>-0,838</b>	<b>&lt;0,001</b>
	ARS	<b>-0,575</b>	<b>&lt;0,001</b>
BLA	Kontrol	<b>-0,573</b>	<b>&lt;0,002</b>
	ARS	0,075	0,662
BNSTov	Kontrol	<b>-0,752</b>	<b>&lt;0,001</b>
	ARS	<b>-0,696</b>	<b>&lt;0,001</b>
BNSTdl	Kontrol	<b>-0,788</b>	<b>&lt;0,001</b>
	ARS	<b>-0,707</b>	<b>&lt;0,001</b>
BNSTdm	Kontrol	<b>-0,675</b>	<b>&lt;0,001</b>
	ARS	<b>-0,777</b>	<b>&lt;0,001</b>
BNSTv	Kontrol	<b>-0,410</b>	<b>&lt;0,05</b>
	ARS	-0,314	0,066
BNSTfu	Kontrol	<b>-0,609</b>	<b>&lt;0,001</b>
	ARS	<b>-0,695</b>	<b>&lt;0,001</b>
PVNp	Kontrol	<b>-0,562</b>	<b>&lt;0,001</b>
	ARS	<b>-0,508</b>	<b>&lt;0,003</b>
PVNm	Kontrol	<b>-0,480</b>	<b>&lt;0,004</b>
	ARS	-0,208	0,224
EWcp	Kontrol	<b>-0,430</b>	<b>&lt;0,02</b>
	ARS	-0,199	0,244
DR	Kontrol	-0,067	0,702
	ARS	-0,177	0,303
S1	Kontrol	0,104	0,552
	ARS	-0,281	0,102

**F17. táblázat.** Az életkor és a FOS immunreaktivitás összefüggésének vizsgálata Spearman-féle korreláció analízissel, kontroll állatokban és akut restraint stressz (ARS) modellben. A szignifikáns eredményeket **félkövéren** emeltük ki. Nucleus medialis (MeA), centralis (CeA) et basolateralis amygdalae (BLA). A nucleus interstitialis striae terminalis (BNST) ovális (BNSTov), dorsolateralis (BNSTdl), dorsomedialis (BNSTdm), ventralis (BNSTv), fusiformis (BNSTfu) divíziói. Nucleus paraventricularis pars parvocellularis (PVNp) et pars magnocellularis (PVNm), centrális projekciójú Edinger-Westphal nucleus (EWcp), nucleus raphe dorsalis (DR), szomatoszenzoros barrel cortex (S1).

Agyterület	Kétutas ANOVA					
	Kor		ARS		Kor x ARS interakció	
	F	p	F	p	F	p
CeA	<b>2,46</b>	<b>&lt;0,05</b>	2,63	0,11	<b>3,04</b>	<b>&lt;0,01</b>
BLA	<b>3,57</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,97	0,33	0,67	0,69
MeA	<b>13,53</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>15,40</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,43	0,21
BNSTov	<b>6,24</b>	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>6,00</b>	<b>&lt;0,05</b>	1,26	0,28
BNSTdl	<b>4,57</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>11,05</b>	<b>&lt;0,01</b>	1,71	0,12
BNSTdm	<b>3,91</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>56,85</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	0,92	0,50
BNSTv	<b>17,65</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>105,8</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	0,83	0,56
BNSTfu	<b>8,25</b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>444,8</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	0,78	0,60
MHb	<b>19,64</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	0,12	0,73	1,04	0,41
LHb	<b>14,28</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>36,14</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>2,23</b>	<b>&lt;0,05</b>
PVN	0,72	0,66	<b>166,9</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	1,48	0,19
EWcp	<b>8,23</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>12,71</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,40	0,22
DR	<b>9,61</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>87,44</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>4,96</b>	<b>&lt;0,001</b>
S1	<b>6,051</b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>7,38</b>	<b>&lt;0,01</b>	1,68	0,13

**F18. táblázat.** Az akut restraint stressz (ARS) és az életkor hatása a FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivásra. Kétutas varianciaanalízis (ANOVA) tesztek F és p eredményeinek összefoglalása. A **félkövér** karakterek a szignifikáns eredményeket emelik ki. Rövidítések: centrális (CeA), basolaterális (BLA), mediális (MeA) amygdala. Nucleus interstitialis striae terminalis ovális (BNSTov), dorsolaterális (BNSTdl), dorsomediális (BNSTdm), ventrális (BNSTv), fusiform (BNSTfu) részei. Mediális (MHb) és laterális (LHb) habenula. PVN: nucleus paraventricularis hypothalami; EWcp: centrális projekciójú Edinger-Westphal mag; DR: nucleus raphe dorsalis; S1: elsődleges szomatoszenzoros kéreg, barrel mező.

Agyterület	Kontroll csoportok		ARS csoportok		CVMS csoportok	
	$\rho$	p	$\rho$	p	$\rho$	p
CeA	-0,12	0,47	<b>-0,41</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>-0,54</b>	<b>&lt;0,001</b>
BLA	-0,24	0,12	<b>-0,62</b>	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>-0,42</b>	<b>&lt;0,05</b>
MeA	<b>-0,36</b>	<b>&lt;0,05</b>	-0,29	0,07	<b>-0,70</b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>
BNSTov	<b>-0,41</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>-0,68</b>	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>-0,48</b>	<b>&lt;0,01</b>
BNSTdl	<b>-0,41</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>-0,42</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>-0,55</b>	<b>&lt;0,01</b>
BNSTdm	<b>-0,38</b>	<b>&lt;0,05</b>	-0,18	0,27	<b>-0,52</b>	<b>&lt;0,01</b>
BNSTv	-0,10	0,52	-0,04	0,80	<b>-0,64</b>	<b>&lt;0,001</b>
BNSTfu	-0,15	0,35	0,19	0,27	0,10	0,61
MHb	0,12	0,43	<b>-0,41</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>-0,58</b>	<b>&lt;0,001</b>
LHb	-0,26	0,09	-0,31	0,06	-0,32	0,08
PVN	-0,09	0,54	-0,08	0,62	-0,04	0,83
EWcp	<b>-0,55</b>	<b>&lt;0,001</b>	-0,28	0,09	<b>-0,54</b>	<b>&lt;0,001</b>
DR	<b>-0,32</b>	<b>&lt;0,05</b>	-0,05	0,75	<b>-0,54</b>	<b>&lt;0,001</b>
S1	<b>-0,34</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>-0,63</b>	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>-0,54</b>	<b>&lt;0,01</b>

**F19. táblázat.** Az életkor hatása a FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivásra. A Spearman-féle analízisekben talált korrelációs koefficiens (p) és az ezekhez tartozó p értékek összefoglalása. A **félkövér** karakterek a szignifikáns eredményeket emelik ki. Rövidítések: centrális (CeA), basolaterális (BLA), mediális (MeA) amygdala. Nucleus interstitialis striae terminalis ovális (BNSTov), dorsolaterális (BNSTdl), dorsomediális (BNSTdm), ventrális (BNSTv), fusiform (BNSTfu), részei. Mediális (MHb) és laterális (LHb) habenula. PVN: nucleus paraventricularis hypothalami; EWcp: centrális projekciójú Edinger-Westphal mag; DR: nucleus raphe dorsalis; S1: elsődleges szomatoszenzoros kéreg, barrel mező.

Agyterület	Egyutas ANOVA					
	Kontroll csoportok		ARS csoportok		CVMS csoportok	
	F	p	F	p	F	p
CeA	1,13	0,37	<b>4,50</b>	<b>&lt;0,01</b>	2,46	0,06
BLA	0,73	0,64	<b>5,13</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>5,19</b>	<b>&lt;0,01</b>
MeA	<b>7,13</b>	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>7,25</b>	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>7,29</b>	<b>&lt;0,001</b>
BNSTov	<b>3,56</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>3,85</b>	<b>&lt;0,01</b>	2,23	0,08
BNSTdl	<b>2,51</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>3,49</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>4,36</b>	<b>&lt;0,01</b>
BNSTdm	1,89	0,1	<b>2,74</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>7,25</b>	<b>&lt;0,001</b>
BNSTv	<b>11,55</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>7,27</b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>10,63</b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>
BNSTfu	<b>8,91</b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>3,10</b>	<b>&lt;0,05</b>	1,71	0,17
MHb	<b>10,84</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>11,03</b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>8,30</b>	<b>&lt;0,001</b>
LHb	<b>5,43</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>8,77</b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>5,94</b>	<b>&lt;0,01</b>
PVN	1,03	0,43	1,01	0,45	1,15	0,37
EWcp	<b>5,70</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>4,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>6,52</b>	<b>&lt;0,001</b>
DR	<b>3,22</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>7,13</b>	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>6,92</b>	<b>&lt;0,001<sup>4</sup></b>
S1	<b>2,49</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>3,59</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>4,12</b>	<b>&lt;0,01</b>

**F20. táblázat.** Az életkor főhatása a FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivásra. Egyutas varianciaanalízis (ANOVA) F és p értékei kontroll patkányokban és az akut restraint stressz (ARS), illetve krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) modellben vizsgált állapotokban. A **félkövér** karakterek a szignifikáns eredményeket emelik ki. Rövidítések: centrális (CeA), basolaterális (BLA), mediális (MeA) amygdala. Nucleus interstitialis striae terminalis ovális (BNSTov), dorsolaterális (BNSTdl), dorsomediális (BNSTdm), ventrális (BNSTv), fusiform (BNSTfu) részei. Mediális (MHb) és laterális (LHb) habenula. PVN: nucleus paraventricularis hypothalami; EWcp: centrális projekciójú Edinger-Westphal mag; DR: nucleus raphe dorsalis; S1: elsődleges szomatoszenzoros kéreg, barrel mező.

Agyterület	Korcsoportok							
	1H	1.5H	2H	3H	6H	12H	18H	24H
CeA	0,27	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,003</b>	0,64	0,57	0,54	0,68	0,49
BLA	0,58	0,61	0,78	0,2	0,21	0,30	0,38	0,18
MeA	0,78	<b>&lt;0,05</b>	0,08	0,11	<b>&lt;0,05</b>	0,06	0,91	<b>&lt;0,01</b>
BNSTov	0,92	0,51	<b>&lt;0,05</b>	0,06	<b>&lt;0,01</b>	0,42	0,36	0,75
BNSTdl	0,79	0,64	<b>&lt;0,05</b>	0,06	<b>&lt;0,001</b>	0,17	0,24	0,14
BNSTdm	0,18	0,20	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,14	<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;0,01</b>
BNSTv	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,01</b>
BNSTfu	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
MHb	<b>&lt;0,01</b>	0,13	0,82	0,41	0,35	0,50	0,88	0,33
LHb	0,17	0,16	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;5*10<sup>-5</sup></b>	0,08	0,07	0,78
PVN	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>
EWcp	0,44	0,57	<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,19	<b>&lt;0,05</b>	0,91
DR	<b>&lt;0,05</b>	0,11	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,05</b>	0,09
S1	0,77	0,20	0,07	0,06	0,32	<b>&lt;0,05</b>	0,96	0,5

**F21. táblázat.** Akut restraint stressz (ARS) hatása a FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivásra az egyes korcsoportokban, a kontrollhoz képest. A t próbák p értékeinek összefoglalása. Az állatok életkorát hónapban (H) adtuk meg. A **félkövér** karakterek a szignifikáns eredményeket emelik ki. Rövidítések: centrális (CeA), basolaterális (BLA), mediális (MeA) amygdala. Nucleus interstitialis striae terminalis ovális (BNSTov), dorsolaterális (BNSTdl), dorsomediális (BNSTdm), ventrális (BNSTv), fusiform (BNSTfu), részei. Mediális (MHb) és laterális (LHb) habenula. PVN: nucleus paraventricularis hypothalami; EWcp: centrális projekciójú Edinger-Westphal mag; DR: nucleus raphe dorsalis; S1: elsődleges szomatoszenzoros kéreg, barrel mező.

Agyterület	Korcsoportok					
	2H	3H	6H	12H	18H	24H
CeA	0,11	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,05</b>	0,37	0,08	0,08
BLA	0,1	0,45	0,34	0,14	0,41	0,18
MeA	<b>&lt;0,05</b>	0,83	0,33	0,70	0,73	0,66
MHb	0,16	0,48	<b>&lt;0,05</b>	0,83	0,45	0,87
LHb	0,18	0,13	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>&lt;0,05</b>	0,16	0,39
BNSTov	0,57	0,71	0,29	0,33	0,48	0,07
BNSTdl	0,19	0,41	0,21	0,14	0,48	0,17
BNSTdm	0,13	<b>&lt;0,05</b>	0,12	0,08	<b>&lt;0,05</b>	0,75
BNSTv	0,57	0,35	0,38	0,46	<b>&lt;0,05</b>	0,45
BNSTfu	0,21	0,97	<b>&lt;0,05</b>	0,06	<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;0,05</b>
PVN	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>&lt;0,05</b>
EWcp	0,11	0,45	0,05	0,6	0,67	0,58
DR	0,63	0,31	<b>&lt;0,05</b>	0,87	0,09	0,4
S1	<b>&lt;0,01</b>	0,33	0,07	<b>&lt;0,01</b>	0,38	0,29

**F22. táblázat.** A krónikus variábilis enyhe stressz hatása a FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitásra az egyes korcsoportokban, a kontrollhoz képest. A t próbák p értékei. Az állatok életkorát hónapban (H) adtuk meg. A **félkövér** karakterek a szignifikáns eredményeket emelik ki. Rövidítések: centrális (CeA), basolaterális (BLA), mediális (MeA) amygdala. Nucleus interstitialis striae terminalis ovális (BNSTov), dorsolaterális (BNSTdl), dorsomedialis (BNSTdm), ventrális (BNSTv), fusiform (BNSTfu), részei. Mediális (MHb) és laterális (LHb) habenula. PVN: nucleus paraventricularis hypothalami; EWcp: centrális projekciójú Edinger-Westphal mag; DR: nucleus raphe dorsalis; S1: elsődleges szomatoszenzoros kéreg, barrel mező.

Agyterület	Kétutas ANOVA					
	Kor		CVMS		Kor x CVMS interakció	
	F	p	F	p	F	p
CeA	<b>2,51</b>	<b>&lt;0,05</b>	0,06	0,80	1,13	0,35
BLA	<b>4,37</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,008	0,93	1,46	0,22
MeA	<b>15,33</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	0,27	0,60	1,03	0,41
BNSTov	<b>3,23</b>	<b>&lt;0,05</b>	0,23	0,63	1,38	0,25
BNSTdl	<b>6,52</b>	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	0,37	0,54	1,34	0,26
BNSTdm	<b>10,11</b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>20,02</b>	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	1,33	0,27
BNSTv	<b>21,30</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>9,25</b>	<b>&lt;0,01</b>	0,98	0,44
BNSTfu	<b>2,56</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>49,70</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>4,83</b>	<b>&lt;0,01</b>
MHb	<b>10,97</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	0,07	0,79	2,38	0,051
LHb	<b>7,21</b>	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>25,18</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>4,89</b>	<b>&lt;0,01</b>
PVN	0,70	0,62	<b>118,5</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	1,58	0,18
EWcp	<b>12,78</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	0,002	0,97	1,68	0,15
DR	<b>11,55</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>5,70</b>	<b>&lt;0,05</b>	0,83	0,53
S1	<b>7,01</b>	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>14,09</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>2,71</b>	<b>&lt;0,05</b>

**F23. táblázat.** A krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) és az életkor hatása a FOSB/ $\Delta$ FOSB immunreaktivitásra. A kétutas varianciaanalízis (ANOVA) F és p eredményeinek összefoglalása. A **félkövér** karakterek a szignifikáns eredményeket emelik ki. Rövidítések: centrális (CeA), basolaterális (BLA), mediális (MeA) amygdala. Nucleus interstitialis striae terminalis ovális (BNSTov), dorsolaterális (BNSTdl), dorsomedialis (BNSTdm), ventrális (BNSTv), fusiform (BNSTfu) részei. Mediális (MHb) és laterális (LHb) habenula. PVN: nucleus paraventricularis hypothalami; EWcp: centrális projekciójú Edinger-Westphal mag; DR: nucleus raphe dorsalis; S1: elsődleges szomatoszenzoros kéreg, barrel mező.

Paraméter	Csoportok	Kétutas ANOVA					
		Főhatás				Interakció	
		Kor		Stressz		Kor × Stressz	
		F	p	F	p	F	p
Testtömeg	Kontroll vs. ARS	<b>165,86</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	1,14	0,29	<b>3,07</b>	<b>&lt;0,01</b>
	Kontroll vs. CVMS	<b>60,54</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>5,86</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>10,96</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>
Relatív mellékvese tömeg	Kontroll vs. ARS	<b>57,77</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	0,77	0,38	<b>4,73</b>	<b>&lt;0,001</b>
	Kontroll vs. CVMS	<b>5,85</b>	<b>&lt;10<sup>-3</sup></b>	<b>19,66</b>	<b>&lt;10<sup>-3</sup></b>	1,41	0,23
Relatív thymus tömeg	Kontroll vs. ARS	<b>154,56</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	0,23	0,63	2,04	0,06
	Kontroll vs. CVMS	<b>175,73</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	0,28	0,60	<b>4,00</b>	<b>&lt;0,005</b>

**F24. táblázat.** A test és szervtömeg index adatok kétutas varianciaanalízissel (ANOVA) történt elemzésből származó eredmények összefoglaló táblázata. A szignifikáns hatásokat **félkövéren** emeltük ki. ARS: akut restraint stressz; CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz.

Csoportok	Jelölés	Mag	Kétutas ANOVA						
			Főhatás				Interakció		
			Kor		Stressz		Kor x Stressz		
			F	p	F	p	F	p	
Kontroll vs. ARS	CRH- FOS	PVN	<b>7,71</b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>74,39</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>7,68</b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	
		BNSTov	1,64	0,14	0,21	0,66	1,42	0,21	
		CeA	1,26	0,28	0,22	0,64	1,60	0,15	
	CRH- FOSB/ΔFOSB	PVN	<b>2,61</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>89,17</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>3,03</b>	<b>&lt;0,01</b>	
		BNSTov	<b>5,32</b>	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>4,13</b>	<b>&lt;0,05</b>	1,18	0,32	
		CeA	<b>3,45</b>	<b>&lt;0,005</b>	<b>6,04</b>	<b>&lt;0,05</b>	0,74	0,64	
	CRH- FOSB/ΔFOSB-FOS	PVN	<b>7,35</b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	<b>66,81</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>6,78</b>	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	
	Kontroll vs. CVMS	CRH- FOSB/ΔFOSB	PVN	2,19	0,07	<b>64,19</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	1,93	0,11
			BNSTov	<b>5,37</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,06	0,81	0,97	0,44
CeA			<b>3,93</b>	<b>&lt;0,005</b>	0,91	0,34	0,65	0,66	

**F25. táblázat.** A CRH termelő területek FOS és FOSB/ΔFOSB aktivációjának vizsgálata. A kétutas varianciaanalízis (ANOVA) eredményei. A szignifikáns hatásokat **félkövéren** emeltük ki. ARS: akut restraint stressz; CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz.



Mag	Jelölés	Kor	Test-tömeg	Mellék- vese tömeg	Relatív mellék- vese tömeg	Relatív thymus tömeg	PVN CRH- FOS	PVN CRH- FOSB/ $\Delta$ FOSB	CeA CRH- FOSB/ $\Delta$ FOSB	BNSTov CRH- FOSB/ $\Delta$ FOSB	PVN CRH- FOSB/ $\Delta$ FOSB - FOS	
PVN	CRH- FOS	$\rho$	<b>-0,61</b>	<b>-0,51</b>	<b>-0,57</b>	<b>0,37</b>	<b>0,61</b>		<b>0,76</b>	<b>0,41</b>	0,32	<b>0,92</b>
		p	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;10<sup>-3</sup></b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>		<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt;0,05</b>	0,06	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>
	CRH- FOSB/ $\Delta$ FOSB	$\rho$	<b>-0,48</b>	<b>-0,43</b>	<b>-0,37</b>	<b>0,45</b>	<b>0,56</b>	<b>0,76</b>		0,21	0,16	<b>0,86</b>
		p	<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;10<sup>-3</sup></b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>		0,24	0,36	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>
	CRH- FOSB/ $\Delta$ FOSB -FOS	$\rho$	<b>-0,38</b>	<b>-0,28</b>	<b>-0,26</b>	<b>0,26</b>	<b>0,36</b>	<b>0,92</b>	<b>0,86</b>	<b>0,28</b>	<b>0,23</b>	
		p	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>0,06</b>	
BNSTov	CRH- FOSB/ $\Delta$ FOSB	$\rho$	<b>-0,64</b>	<b>-0,45</b>	<b>-0,6</b>	0,11	<b>0,54</b>	0,32	0,16	<b>0,86</b>		0,23
		p	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;10<sup>-3</sup></b>	0,5	<b>&lt;0,001</b>	0,06	0,36	<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>		0,06
CeA	CRH- FOSB/ $\Delta$ FOSB	$\rho$	<b>-0,42</b>	-0,25	<b>-0,4</b>	0,13	<b>0,38</b>	<b>0,42</b>	0,21		<b>0,86</b>	<b>0,28</b>
		p	<b>&lt;0,05</b>	0,16	<b>&lt;0,05</b>	0,45	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	0,24		<b>&lt;10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt;0,05</b>

**F26. táblázat.** A CRH neuronok akut restraint stressz után mért aktiváció mintázata és az egyéb vizsgált paraméterek közti összefüggés vizsgálata Spearman korreláció analízissel. A szignifikáns összefüggéseket **félkövéren** emeltük ki. PVN: nucleus paraventricularis, BNSTov: nucleus interstitialis striae terminalis ovalis magja, CeA: nucleus centralis amygdalae.

Mag	Jelölés	Kor	Test-tömeg	Mellék- vese tömeg	Relatív mellék- vese tömeg	Relatív thymus- tömeg	PVN CRH- FOSB/ $\Delta$ FOSB	CeA CRH- FOSB/ $\Delta$ FOSB	BNSTov CRH- FOSB/ $\Delta$ FOSB	
PVN	CRH- FOSB/ $\Delta$ FOSB	$\rho$	0,03	-0,02	-0,16	-0,02	-0,04		0,04	0,06
		p	0,87	0,92	0,43	0,92	0,83		0,82	0,76
BNSTov	CRH- FOSB/ $\Delta$ FOSB	$\rho$	<b>-0,57</b>	<b>-0,62</b>	-0,35	0,32	<b>0,6</b>	0,06	<b>0,82</b>	
		p	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,09	0,11	<b>&lt;0,01</b>	0,76	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	
CeA	CRH- FOSB/ $\Delta$ FOSB	$\rho$	<b>-0,58</b>	<b>-0,4</b>	-0,17	0,27	<b>0,56</b>	0,04		<b>0,82</b>
		p	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,05</b>	0,4	0,18	<b>&lt;0,01</b>	0,82		<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>

**I. táblázat.** A CRH neuronok krónikus variábilis enyhe stressz után mért aktiváció mintázata és az egyéb vizsgált paraméterek közti összefüggés vizsgálata Spearman korreláció analízissel. A szignifikáns összefüggéseket **félkövéren** emeltük ki. PVN: nucleus paraventricularis, BNSTov: nucleus interstitialis striae terminalis ovalis magja, CeA: nucleus centralis amygdalae.

## 15. Idézett irodalom

1. Agarwal A, Halvorson LM, Legradi G. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mimics neuroendocrine and behavioral manifestations of stress: Evidence for PKA-mediated expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005 Jul 29;138(1):45-57. doi: 10.1016/j.molbrainres.2005.03.016. PMID: 15882914; PMCID: PMC1950324.
2. Aguilera G, Liu Y. The molecular physiology of CRH neurons. *Front Neuroendocrinol*. 2012 Jan;33(1):67-84. doi: 10.1016/j.yfrne.2011.08.002. Epub 2011 Aug 18. PMID: 21871477; PMCID: PMC4341841.
3. Albert PR, Vahid-Ansari F, Luckhart C. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. *Front Behav Neurosci*. 2014. 8:199. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00199.
4. Albrecht U. Molecular Mechanisms in Mood Regulation Involving the Circadian Clock. *Front Neurol*. 2017 Feb 7;8:30. doi: 10.3389/fneur.2017.00030. PMID: 28223962; PMCID: PMC5293817.
5. Alheid GF, Heimer L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience*. 1988 Oct;27(1):1-39. doi: 10.1016/0306-4522(88)90217-5. PMID: 3059226.
6. Almlí LM, Mercer KB, Kerley K, Feng H, Bradley B, Conneely KN, Ressler KJ. ADCYAP1R1 genotype associates with post-traumatic stress symptoms in highly traumatized African-American females. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2013 Apr;162B(3):262-72. doi: 10.1002/ajmg.b.32145. Epub 2013 Mar 15. PMID: 23505260; PMCID: PMC3738001.
7. Al-Omari A, Kecskés M, Gaszner B, Biró-Sütő T, Fazekas B, Berta G, Kuzma M, Pintér E, Kormos V. Functionally active TRPA1 ion channel is downregulated in peptidergic neurons of the Edinger-Westphal nucleus upon acute alcohol exposure. *Front Cell Dev Biol*. 2023 Jan 10;10:1046559. doi: 10.3389/fcell.2022.1046559. PMID: 36704197; PMCID: PMC9872022.
8. Alvaro JD, Tatro JB, Quillan JM, Fogliano M, Eisenhard M, Lerner MR, Nestler EJ, Duman RS. Morphine down-regulates melanocortin-4 receptor expression in brain regions that mediate opiate addiction. *Mol Pharmacol*. 1996 Sep;50(3):583-91. PMID: 8794897.
9. Amat J, Tamblin JP, Paul ED, Bland ST, Amat P, Foster AC, Watkins LR, Maier SF. Microinjection of urocortin 2 into the dorsal raphe nucleus activates serotonergic neurons and increases extracellular serotonin in the basolateral amygdala. *Neuroscience*. 2004;129(3):509-19. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.07.052. PMID: 15541873.
10. Andersen SL, Teicher MH. Delayed effects of early stress on hippocampal development. *Neuropsychopharmacology*. 2004 Nov;29(11):1988-93. doi: 10.1038/sj.npp.1300528. PMID: 15316569.
11. Aschrafi A, Verheijen JM, Gordebeke PM, Olde Loohuis NF, Menting K, Jager A, Palkovits M, Geenen B, Kos A, Martens GJ, Glennon JC, Kaplan BB, Gaszner B, Kozicz T. MicroRNA-326 acts as a molecular switch in the regulation of midbrain urocortin 1 expression. *J Psychiatry Neurosci*. 2016 Aug;41(5):342-53. doi: 10.1503/jpn.150154. PMID: 27045550; PMCID: PMC5008923.
12. Authement ME, Kodangattil JN, Gouty S, Rusnak M, Symes AJ, Cox BM, Nugent FS. Histone Deacetylase Inhibition Rescues Maternal Deprivation-Induced GABAergic Metaplasticity through Restoration of AKAP Signaling. *Neuron*. 2015 Jun 3;86(5):1240-52. doi: 10.1016/j.neuron.2015.05.024. PMID: 26050042.
13. Bachtell RK, Weitemier AZ, Ryabinin AE. Lesions of the Edinger-Westphal nucleus in C57BL/6J mice disrupt ethanol-induced hypothermia and ethanol consumption. *Eur J Neurosci*. 2004 Sep;20(6):1613-23. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03594.x. PMID: 15355328.
14. Badowska-Szalewska E, Klejbor I, Cecot T, Spodnik JH, Moryś J. Changes in NGF/c-Fos double staining in the structures of the limbic system in juvenile and aged rats exposed to forced swim test. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2009;69(4):448-58. PMID: 20048762.
15. Bagnol D, Lu XY, Kaelin CB, Day HE, Ollmann M, Gantz I, Akil H, Barsh GS, Watson SJ. Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J Neurosci*. 1999 Sep 15;19(18):RC26. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-18-j0004.1999. PMID: 10479719; PMCID: PMC6782481.

16. Bai F, Li X, Clay M, Lindstrom T, Skolnick P. Intra- and interstrain differences in models of "behavioral despair". *Pharmacol Biochem Behav.* 2001 Oct-Nov;70(2-3):187-92. doi: 10.1016/s0091-3057(01)00599-8. PMID: 11701187.
17. Baker M, Dorzab J, Winokur G, Cadoret R. Depressive disease. Evidence favoring polygenic inheritance based on an analysis of ancestral cases. *Arch Gen Psychiatry.* 1972 Sep;27(3):320-7. doi: 10.1001/archpsyc.1972.01750270030004. PMID: 5051620.
18. Balaskó, M., Garami, A., Soós, S., Koncsecskó-Gáspár, M., Székely, M., Pétervári, E., 2010. Central alpha-MSH, energy balance, thermal balance, and antipyresis. *Journal of Thermal Biology* 35, 211-217.
19. Bale TL, Vale WW. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:525-57. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121410. PMID: 14744257.
20. Balestrino R, Martinez-Martin P. Reprint of "Neuropsychiatric symptoms, behavioural disorders, and quality of life in Parkinson's disease". *J Neurol Sci.* 2017 Mar 15;374:3-8. doi: 10.1016/j.jns.2017.01.026. Epub 2017 Jan 12. PMID: 28109579.
21. Balestrino R, Schapira AHV. Parkinson disease. *Eur J Neurol.* 2020 Jan;27(1):27-42. doi: 10.1111/ene.14108. Epub 2019 Nov 27. PMID: 31631455.
22. Bali A, Jaggi AS. Preclinical experimental stress studies: protocols, assessment and comparison. *Eur J Pharmacol.* 2015 Jan 5;746:282-92. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.10.017. Epub 2014 Nov 7. PMID: 25446911.
23. Bamshad M, Aoki VT, Adkison MG, Warren WS, Bartness TJ. Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *Am J Physiol.* 1998 Jul;275(1):R291-9. doi: 10.1152/ajpregu.1998.275.1.R291. PMID: 9688991.
24. Banks WA, Clever CM, Farrell CL. Partial saturation and regional variation in the blood-to-brain transport of leptin in normal weight mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000 Jun;278(6):E1158-65. doi: 10.1152/ajpendo.2000.278.6.E1158. PMID: 10827020.
25. Barberio B, Zamani M, Black CJ, Savarino EV, Ford AC. Prevalence of symptoms of anxiety and depression in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2021 May;6(5):359-370. doi: 10.1016/S2468-1253(21)00014-5. Epub 2021 Mar 12. PMID: 33721557.
26. Bariselli S, Glangetas C, Tzanoulinou S, Bellone C. Ventral tegmental area subcircuits process rewarding and aversive experiences. *J Neurochem.* 2016 Dec PMID: 27546491.
27. Bartness TJ, Song CK. Brain-adipose tissue neural crosstalk. *Physiol Behav.* 2007 Jul 24;91(4):343-51. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.04.002. Epub 2007 Apr 12. PMID: 17521684; PMCID: PMC1986714.
28. Baudin A, Blot K, Verney C, Estevez L, Santamaria J, Gressens P, Giros B, Otani S, Daugé V, Naudon L. Maternal deprivation induces deficits in temporal memory and cognitive flexibility and exaggerates synaptic plasticity in the rat medial prefrontal cortex. *Neurobiol Learn Mem.* 2012 Oct;98(3):207-14. doi: 10.1016/j.nlm.2012.08.004. Epub 2012 Aug 24. PMID: 22922490.
29. Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell.* 2006 Mar 24;124(6):1269-82. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.023. PMID: 16564016.
30. Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White Iii CL, Akiyama H, Caviness JN, Shill HA, Sabbagh MN, Walker DG; Arizona Parkinson's Disease Consortium. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol.* 2010 Jun;119(6):689-702. doi: 10.1007/s00401-010-0664-3. Epub 2010 Mar 21. PMID: 20306269; PMCID: PMC2866090.
31. Beaulieu S, Di Paolo T, Barden N. Control of ACTH secretion by the central nucleus of the amygdala: implication of the serotonergic system and its relevance to the glucocorticoid delayed negative feedback mechanism. *Neuroendocrinology.* 1986;44(2):247-54. doi: 10.1159/000124652. PMID: 3025760.
32. Belleau EL, Treadway MT, Pizzagalli DA. The Impact of Stress and Major Depressive Disorder on Hippocampal and Medial Prefrontal Cortex Morphology. *Biol Psychiatry.* 2019 Mar 15;85(6):443-453. doi: 10.1016/j.biopsych.2018.09.031. Epub 2018 Oct 10. PMID: 30470559; PMCID: PMC6380948.
33. Benarroch EE. Locus coeruleus. *Cell Tissue Res.* 2018 Jul;373(1):221-232. doi: 10.1007/s00441-017-2649-1. Epub 2017 Jul 7. PMID: 28687925.
34. Benomar Y, Wetzler S, Larue-Achagiotis C, Djiane J, Tomé D, Taouis M. In vivo leptin infusion impairs insulin and leptin signalling in liver and hypothalamus. *Mol Cell Endocrinol.* 2005 Oct 20;242(1-2):59-66. doi: 10.1016/j.mce.2005.07.003. PMID: 16150536.

35. Bereshchenko O, Bruscoli S, Riccardi C. Glucocorticoids, Sex Hormones, and Immunity. *Front Immunol.* 2018 Jun 12;9:1332. doi: 10.3389/fimmu.2018.01332. PMID: 29946321; PMCID: PMC6006719.
36. Bernard C. (1865) Introduction a` la médecine expérimentale. *Endocrinology* 150: 5626–5632.
37. Betarbet R, Canet-Aviles RM, Sherer TB, Mastroberardino PG, McLendon C, Kim JH, Lund S, Na HM, Taylor G, Bence NF, Kopito R, Seo BB, Yagi T, Yagi A, Klinefelter G, Cookson MR, Greenamyre JT. Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone on DJ-1, alpha-synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. *Neurobiol Dis.* 2006 May;22(2):404-20. doi: 10.1016/j.nbd.2005.12.003. Epub 2006 Jan 24. PMID: 16439141.
38. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2000 Dec;3(12):1301-6. doi: 10.1038/81834. PMID: 11100151.
39. Bethea CL, Reddy AP, Flowers M, Shapiro RA, Colman RJ, Abbott DH, Levine JE. High fat diet decreases beneficial effects of estrogen on serotonin-related gene expression in marmosets. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2015 Apr 3;58:71-80. doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.11.008. Epub 2014 Dec 24. PMID: 25542371; PMCID: PMC4339406.
40. Bian Y, Ma Y, Ma Q, Yang L, Zhu Q, Li W, Meng L. Prolonged Maternal Separation Induces the Depression-Like Behavior Susceptibility to Chronic Unpredictable Mild Stress Exposure in Mice. *Biomed Res Int.* 2021 Jul 29;2021:6681397. doi: 10.1155/2021/6681397. PMID: 34368355; PMCID: PMC8342142.
41. Biebermann H, Kühnen P, Kleinau G, Krude H. The neuroendocrine circuitry controlled by POMC, MSH, and AGRP. *Handb Exp Pharmacol.* 2012;(209):47-75. doi: 10.1007/978-3-642-24716-3\_3. PMID: 22249810.
42. Binder EB, Nemeroff CB. The CRF system, stress, depression and anxiety-insights from human genetic studies. *Mol Psychiatry.* 2010 Jun;15(6):574-88. doi: 10.1038/mp.2009.141. Epub 2009 Dec 15. PMID: 20010888; PMCID: PMC3666571.
43. Binneman B, Feltner D, Kolluri S, Shi Y, Qiu R, Stiger T. A 6-week randomized, placebo-controlled trial of CP-316,311 (a selective CRH1 antagonist) in the treatment of major depression. *Am J Psychiatry.* 2008 May;165(5):617-20. doi: 10.1176/appi.ajp.2008.07071199. Epub 2008 Apr 15. PMID: 18413705.
44. Bisler S, Schleicher A, Gass P, Stehle JH, Zilles K, Staiger JF. Expression of c-Fos, ICER, Krox-24 and JunB in the whisker-to-barrel pathway of rats: time course of induction upon whisker stimulation by tactile exploration of an enriched environment. *J Chem Neuroanat.* 2002 Mar;23(3):187-98. doi: 10.1016/s0891-0618(01)00155-7. PMID: 11861125.
45. Bissette G, Klimek V, Pan J, Stockmeier C, Ordway G. Elevated concentrations of CRF in the locus coeruleus of depressed subjects. *Neuropsychopharmacology.* 2003 Jul;28(7):1328-35. doi: 10.1038/sj.npp.1300191. Epub 2003 May 21. PMID: 12784115.
46. Bittencourt JC, Vaughan J, Arias C, Rissman RA, Vale WW, Sawchenko PE. Urocortin expression in rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. *J Comp Neurol.* 1999 Dec 20;415(3):285-312. PMID: 10553117.
47. Blackburn-Munro G, Blackburn-Munro RE. Chronic pain, chronic stress and depression: coincidence or consequence? *J Neuroendocrinol.* 2001 Dec;13(12):1009-23. doi: 10.1046/j.0007-1331.2001.00727.x. PMID: 11722697.
48. Blackwood DH, Fordyce A, Walker MT, St Clair DM, Porteous DJ, Muir WJ. Schizophrenia and affective disorders--cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *Am J Hum Genet.* 2001 Aug;69(2):428-33. doi: 10.1086/321969. Epub 2001 Jul 6. PMID: 11443544; PMCID: PMC1235314.
49. Bland RC, Newman SC, Orn H. Recurrent and nonrecurrent depression. A family study. *Arch Gen Psychiatry.* 1986 Nov;43(11):1085-9. doi: 10.1001/archpsyc.1986.01800110071009. PMID: 3767598.
50. Blesa J, Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat.* 2014 Dec 15;8:155. doi: 10.3389/fnana.2014.00155. PMID: 25565980; PMCID: PMC4266040.
51. Bloem B, Xu L, Morava E, Faludi G, Palkovits M, Roubos EW, Kozicz T. Sex-specific differences in the dynamics of cocaine- and amphetamine-regulated transcript and nesfatin-1 expressions in the midbrain of depressed suicide victims vs. controls. *Neuropharmacology.* 2012 Jan;62(1):297-303. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.023. Epub 2011 Jul 22. PMID: 21803054.

52. Bollinger JL, Salinas I, Fender E, Sengelaub DR, Wellman CL. Gonadal hormones differentially regulate sex-specific stress effects on glia in the medial prefrontal cortex. *J Neuroendocrinol.* 2019 Aug;31(8):e12762. doi: 10.1111/jne.12762. Epub 2019 Jul 15. PMID: 31228875; PMCID: PMC6715499.
53. Bolós M, Terreros-Roncal J, Perea JR, Pallas-Bazarra N, Ávila J, Llorens-Martín M. Maturation Dynamics of the Axon Initial Segment (AIS) of Newborn Dentate Granule Cells in Young Adult C57BL/6J Mice. *J Neurosci.* 2019 Feb 27;39(9):1605-1620. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2253-18.2019. Epub 2019 Jan 16. PMID: 30651327; PMCID: PMC6391570.
54. Bolton JL, Molet J, Regev L, Chen Y, Rismanchi N, Haddad E, Yang DZ, Obenaus A, Baram TZ. Anhedonia Following Early-Life Adversity Involves Aberrant Interaction of Reward and Anxiety Circuits and Is Reversed by Partial Silencing of Amygdala Corticotropin-Releasing Hormone Gene. *Biol Psychiatry.* 2018 Jan 15;83(2):137-147. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.08.023. Epub 2017 Sep 7. PMID: 29033027; PMCID: PMC5723546.
55. Borbély É, Hajna Z, Nabi L, Scheich B, Tékus V, László K, Ollmann T, Kormos V, Gaszner B, Karádi Z, Lénárd L, Paige CJ, Quinn JP, Szolcsányi J, Pintér E, Keeble J, Berger A, Helyes Z. Hemokinin-1 mediates anxiolytic and anti-depressant-like actions in mice. *Brain Behav Immun.* 2017 Jan;59:219-232. doi: 10.1016/j.bbi.2016.09.004. Epub 2016 Sep 9. PMID: 27621226.
56. Borgonovo J, Allende-Castro C, Laliena A, Guerrero N, Silva H, Concha ML. Changes in neural circuitry associated with depression at pre-clinical, pre-motor and early motor phases of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2017 Feb;35:17-24. doi: 10.1016/j.parkreldis.2016.11.009. Epub 2016 Nov 21. PMID: 27889469.
57. Borsody MK, Weiss JM. Influence of corticotropin-releasing hormone on electrophysiological activity of locus coeruleus neurons. *Brain Res.* 1996 Jun 17;724(2):149-68. doi: 10.1016/0006-8993(96)00199-0. PMID: 8828564
58. Boucher MN, May V, Braas KM, Hammack SE. PACAP orchestration of stress-related responses in neural circuits. *Peptides.* 2021 Aug;142:170554. doi: 10.1016/j.peptides.2021.170554. Epub 2021 Apr 15. PMID: 33865930; PMCID: PMC8592028.
59. Boulant JA. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin Infect Dis.* 2000 Oct;31 Suppl 5:S157-61. doi: 10.1086/317521. PMID: 11113018.
60. Bouwknecht JA, Spiga F, Staub DR, Hale MW, Shekhar A, Lowry CA. Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Res Bull.* 2007 Apr 2;72(1):32-43. doi: 10.1016/j.brainresbull.2006.12.009. Epub 2007 Jan 16. PMID: 17303505; PMCID: PMC1800906.
61. Bowers G, Cullinan WE, Herman JP. Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuits. *J Neurosci.* 1998 Aug 1;18(15):5938-47. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-15-05938.1998. PMID: 9671680; PMCID: PMC6793042.
62. Brake WG, Zhang TY, Diorio J, Meaney MJ, Gratton A. Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *Eur J Neurosci.* 2004 Apr;19(7):1863-74. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03286.x. PMID: 15078560.
63. Bremne JD, Vermetten E. Stress and development: behavioral and biological consequences. *Dev Psychopathol.* 2001 Summer;13(3):473-89. doi: 10.1017/s0954579401003042. PMID: 11523844.
64. Brenhouse HC, Andersen SL. Developmental trajectories during adolescence in males and females: a cross-species understanding of underlying brain changes. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011 Aug;35(8):1687-703. doi: 10.1016/j.neubiorev.2011.04.013. Epub 2011 May 12. PMID: 21600919; PMCID: PMC3134153.
65. Brichta L, Greengard P. Molecular determinants of selective dopaminergic vulnerability in Parkinson's disease: an update. *Front Neuroanat.* 2014 Dec PMID: 25565977
66. Burford NG, Webster NA, Cruz-Topete D. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Modulation of Glucocorticoids in the Cardiovascular System. *Int J Mol Sci.* 2017 Oct 16;18(10):2150. doi: 10.3390/ijms18102150. PMID: 29035323; PMCID: PMC5666832.
67. Burgos-Ramos E, Chowen JA, Argente J, Barrios V. Regional and temporal differences in leptin signaling in rat brain. *Gen Comp Endocrinol.* 2010 May 15;167(1):143-52. doi: 10.1016/j.ygcen.2010.01.021. Epub 2010 Feb 4. PMID: 20138175.

68. Burton CL, Chatterjee D, Chatterjee-Chakraborty M, Lovic V, Grella SL, Steiner M, Fleming AS. Prenatal restraint stress and motherless rearing disrupts expression of plasticity markers and stress-induced corticosterone release in adult female Sprague-Dawley rats. *Brain Res.* 2007 Jul 16;1158:28-38. doi: 10.1016/j.brainres.2007.05.003. Epub 2007 May 8. PMID: 17543293.
69. Butler RK, Oliver EM, Sharko AC, Parilla-Carrero J, Kaigler KF, Fadel JR, Wilson MA. Activation of corticotropin releasing factor-containing neurons in the rat central amygdala and bed nucleus of the stria terminalis following exposure to two different anxiogenic stressors. *Behav Brain Res.* 2016 May 1;304:92-101. doi: 10.1016/j.bbr.2016.01.051. Epub 2016 Jan 25. PMID: 26821289; PMCID: PMC4789084.
70. Caballero A, Flores-Barrera E, Cass DK, Tseng KY. Differential regulation of parvalbumin and calretinin interneurons in the prefrontal cortex during adolescence. *Brain Struct Funct.* 2014 Jan;219(1):395-406. doi: 10.1007/s00429-013-0508-8. Epub 2013 Feb 12. PMID: 23400698; PMCID: PMC3665762.
71. Callahan LB, Tschetter KE, Ronan PJ. Inhibition of corticotropin releasing factor expression in the central nucleus of the amygdala attenuates stress-induced behavioral and endocrine responses. *Front Neurosci.* 2013 Oct 29;7:195. doi: 10.3389/fnins.2013.00195. PMID: 24194694; PMCID: PMC3810776.
72. Campbell S, Macqueen G. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *J Psychiatry Neurosci.* 2004 Nov;29(6):417-26. PMID: 15644983; PMCID: PMC524959.
73. Campos FL, Carvalho MM, Cristovão AC, Je G, Baltazar G, Salgado AJ, Kim YS, Sousa N. Rodent models of Parkinson's disease: beyond the motor symptomatology. *Front Behav Neurosci.* 2013 Nov 26;7:175. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00175. PMID: 24324416; PMCID: PMC3840800.
74. Cannon WB. (1929) Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev* 9: 399–431.
75. Cano G, Hernan SL, Sved AF. Centrally Projecting Edinger-Westphal Nucleus in the Control of Sympathetic Outflow and Energy Homeostasis. *Brain Sci.* 2021 Jul 29;11(8):1005. doi: 10.3390/brainsci11081005. PMID: 34439626; PMCID: PMC8392615.
76. Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol.* 1995 Sep 18;360(2):213-45. doi: 10.1002/cne.903600203. Erratum in: *J Comp Neurol* 1996 May 27;369(2):328-30. PMID: 8522644.
77. Canteras NS, Swanson LW. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol.* 1992 Oct 8;324(2):180-94. doi: 10.1002/cne.903240204. PMID: 1430328.
78. Carle TL, Ohnishi YN, Ohnishi YH, Alibhai IN, Wilkinson MB, Kumar A, Nestler EJ. Proteasome-dependent and -independent mechanisms for FosB destabilization: identification of FosB degron domains and implications for DeltaFosB stability. *Eur J Neurosci.* 2007 May;25(10):3009-19. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05575.x. PMID: 17561814.
79. Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol.* 2003 Feb 28;463(1-3):235-72. doi: 10.1016/s0014-2999(03)01285-8. PMID: 12600714.
80. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science.* 2003 Jul 18;301(5631):386-9. doi: 10.1126/science.1083968. PMID: 12869766.
81. Castello JP, Pasi M, Kubiszewski P, Abramson JR, Charidimou A, Kourkoulis C, DiPucchio Z, Schwab K, Anderson CD, Gurol ME, Greenberg SM, Rosand J, Viswanathan A, Biffi A. Cerebral Small Vessel Disease and Depression Among Intracerebral Hemorrhage Survivors. *Stroke.* 2022 Feb;53(2):523-531. doi: 10.1161/STROKEAHA.121.035488. Epub 2021 Sep 30. PMID: 34587793; PMCID: PMC8792169.
82. Catena-Dell'Osso M, Fagiolini A, Marazziti D, Baroni S, Bellantuono C. Non-monoaminergic targets for the development of antidepressants: focus on neuropeptides. *Mini Rev Med Chem.* 2013 Jan;13(1):2-10. PMID: 22876945.
83. Čater M, Majdič G. How early maternal deprivation changes the brain and behavior? *Eur J Neurosci.* 2022 May;55(9-10):2058-2075. doi: 10.1111/ejn.15238. Epub 2021 Apr 28. PMID: 33870558.
84. Chalmers DT, Lovenberg TW, De Souza EB. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci.* 1995 Oct;15(10):6340-50. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-10-06340.1995. PMID: 7472399; PMCID: PMC6577987.

85. Chang HS, Won E, Lee HY, Ham BJ, Lee MS. Association analysis for corticotropin releasing hormone polymorphisms with the risk of major depressive disorder and the response to antidepressants. *Behav Brain Res.* 2015 Oct 1;292:116-24. doi: 10.1016/j.bbr.2015.06.005. Epub 2015 Jun 6. PMID: 26055202.
86. Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH; National Institute for Clinical Excellence. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 2006 Mar;5(3):235-45. doi: 10.1016/S1474-4422(06)70373-8. PMID: 16488379.
87. Choi DC, Furay AR, Evanson NK, Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Herman JP. Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. *J Neurosci.* 2007 Feb 21;27(8):2025-34. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4301-06.2007. PMID: 17314298; PMCID: PMC6673539.
88. Choi KW, Kim YK, Jeon HJ. Comorbid Anxiety and Depression: Clinical and Conceptual Consideration and Transdiagnostic Treatment. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1191:219-235. doi: 10.1007/978-981-32-9705-0\_14. PMID: 32002932.
89. Chowdhury GM, Fujioka T, Nakamura S. Induction and adaptation of Fos expression in the rat brain by two types of acute restraint stress. *Brain Res Bull.* 2000 Jun;52(3):171-82. doi: 10.1016/s0361-9230(00)00231-8. PMID: 10822158.
90. Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol.* 2009 Jul;5(7):374-81. doi: 10.1038/nrendo.2009.106. Epub 2009 Jun 2. PMID: 19488073.
91. Cizza G, Calogero AE, Brady LS, Bagdy G, Bergamini E, Blackman MR, Chrousos GP, Gold PW. Male Fischer 344/N rats show a progressive central impairment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis with advancing age. *Endocrinology.* 1994 Apr;134(4):1611-20. doi: 10.1210/endo.134.4.8137722. PMID: 8137722.
92. Clark JA, Alves S, Gundlach C, Rocha B, Birzin ET, Cai SJ, Flick R, Hayes E, Ho K, Warriar S, Pai L, Yudkovitz J, Fleischer R, Colwell L, Li S, Wilkinson H, Schaeffer J, Wilkening R, Mattingly E, Hammond M, Rohrer SP. Selective estrogen receptor-beta (SERM-beta) compounds modulate raphe nuclei tryptophan hydroxylase-1 (TPH-1) mRNA expression and cause antidepressant-like effects in the forced swim test. *Neuropharmacology.* 2012 Nov;63(6):1051-63. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.07.004. Epub 2012 Jul 13. PMID: 22796107.
93. Clausen BH, Wirenfeldt M, Høgedal SS, Frich LH, Nielsen HH, Schrøder HD, Østergaard K, Finsen B, Kristensen BW, Lambertsen KL. Characterization of the TNF and IL-1 systems in human brain and blood after ischemic stroke. *Acta Neuropathol Commun.* 2020 Jun 5;8(1):81. doi: 10.1186/s40478-020-00957-y. PMID: 32503645; PMCID: PMC7273684.
94. Commons KG, Cholanians AB, Babb JA, Ehlinger DG. The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. *ACS Chem Neurosci.* 2017 May 17;8(5):955-960. doi: 10.1021/acchemneuro.7b00042. Epub 2017 Mar 22. PMID: 28287253; PMCID: PMC5518600.
95. Cone RD. Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr Rev.* 2006 Dec;27(7):736-49. doi: 10.1210/er.2006-0034. Epub 2006 Oct 31. PMID: 17077189.
96. Covington HE 3rd, Maze I, Vialou V, Nestler EJ. Antidepressant action of HDAC inhibition in the prefrontal cortex. *Neuroscience.* 2015 Jul 9;298:329-35. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.04.030. Epub 2015 Apr 20. PMID: 25907440; PMCID: PMC4441835.
97. Crane JW, French KR, Buller KM. Patterns of neuronal activation in the rat brain and spinal cord in response to increasing durations of restraint stress. *Stress.* 2005 Sep;8(3):199-211. doi: 10.1080/10253890500333817. PMID: 16236624.
98. Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* 1980 Aug;13(2):167-70. doi: 10.1016/0091-3057(80)90067-2. PMID: 6106204.
99. Crews F, He J, Hodge C. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007 Feb;86(2):189-99. doi: 10.1016/j.pbb.2006.12.001. Epub 2007 Jan 12. PMID: 17222895.
100. Criado JR, Morales M. Acute ethanol induction of c-Fos immunoreactivity in pre-pro-enkephalin expressing neurons of the central nucleus of the amygdala. *Brain Res.* 2000 Apr 7;861(1):173-7. doi: 10.1016/s0006-8993(99)02468-3. PMID: 10751579.
101. Cui H, Sohn JW, Gautron L, Funahashi H, Williams KW, Elmquist JK, Lutter M. Neuroanatomy of melanocortin-4 receptor pathway in the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol.* 2012 Dec 15;520(18):4168-83. doi: 10.1002/cne.23145. PMID: 22605619; PMCID: PMC3652326.

102. Cui J, Fu Y, Lu R, Bi Y, Zhang L, Zhang C, Aschner M, Li X, Chen R. Metabolomics analysis explores the rescue to neurobehavioral disorder induced by maternal PM2.5 exposure in mice. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019 Mar;169:687-695. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.11.037. Epub 2018 Nov 27. PMID: 30500738.
103. Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience.* 1995 Jan;64(2):477-505. doi: 10.1016/0306-4522(94)00355-9. PMID: 7700534.
104. Cullinan WE, Herman JP, Watson SJ. Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol.* 1993 Jun 1;332(1):1-20. doi: 10.1002/cne.903320102. PMID: 7685778.
105. Cunningham ET Jr, Sawchenko PE. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J Comp Neurol.* 1988 Aug 1;274(1):60-76. doi: 10.1002/cne.902740107. PMID: 2458397.
106. Czéh B, Fuchs E, Wiborg O, Simon M. Animal models of major depression and their clinical implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2016 Jan 4;64:293-310. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.04.004. Epub 2015 Apr 17. PMID: 25891248.
107. Czéh B, Lucassen PJ. What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2007 Aug;257(5):250-60. doi: 10.1007/s00406-007-0728-0. PMID: 17401728.
108. Czéh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A, Fuchs E. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Oct 23;98(22):12796-801. doi: 10.1073/pnas.211427898. Epub 2001 Oct 2. PMID: 11675510; PMCID: PMC60133.
109. Czéh B, Simon M. Benefits of animal models to understand the pathophysiology of depressive disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2021 Mar 2;106:110049. doi: 10.1016/j.pnpbp.2020.110049. Epub 2020 Jul 29. PMID: 32735913.
110. Cservenka A, Spangler E, Cote DM, Ryabinin AE. Postnatal developmental profile of urocortin 1 and cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the perioloculomotor region of C57BL/6J mice. *Brain Res.* 2010 Mar 10;1319:33-43. doi: 10.1016/j.brainres.2010.01.003. Epub 2010 Jan 11. PMID: 20064491; PMCID: PMC2826606.
111. da Silva AV, Torres KR, Haemmerle CA, Céspedes IC, Bittencourt JC. The Edinger-Westphal nucleus II: Hypothalamic afferents in the rat. *J Chem Neuroanat.* 2013 Dec;54:5-19. doi: 10.1016/j.jchemneu.2013.04.001. Epub 2013 Apr 22. PMID: 23619059.
112. Das M, Vihlen CS, Legradi G. Hypothalamic and brainstem sources of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide nerve fibers innervating the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 2007 Feb 1;500(4):761-76. doi: 10.1002/cne.21212. PMID: 17154257; PMCID: PMC1934940.
113. Daskalakis NP, Bagot RC, Parker KJ, Vinkers CH, de Kloet ER. The three-hit concept of vulnerability and resilience: toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology.* 2013 Sep;38(9):1858-73. doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.06.008. Epub 2013 Jul 7. PMID: 23838101; PMCID: PMC3773020.
114. Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day TA. Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci.* 2001 Oct;14(7):1143-52. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01733.x. PMID: 11683906.
115. de Andrade JS, Viana MB, Abrão RO, Bittencourt JC, Céspedes IC. CRF family peptides are differently altered by acute restraint stress and chronic unpredictable stress. *Behav Brain Res.* 2014 Sep 1;271:302-8. doi: 10.1016/j.bbr.2014.06.014. Epub 2014 Jun 13. PMID: 24933190.
116. De Fanti BA, Martínez JA. Central urocortin activation of sympathetic-regulated energy metabolism in Wistar rats. *Brain Res.* 2002 Mar 15;930(1-2):37-41. doi: 10.1016/s0006-8993(01)03401-1. PMID: 11879793.
117. de Kloet AD, Herman JP. Fat-brain connections: Adipocyte glucocorticoid control of stress and metabolism. *Front Neuroendocrinol.* 2018 Jan;48:50-57. doi: 10.1016/j.yfrne.2017.10.005. Epub 2017 Oct 16. PMID: 29042142.
118. de Kloet ER, de Kloet SF, de Kloet CS, de Kloet AD. Top-down and bottom-up control of stress-coping. *J Neuroendocrinol.* 2019 Mar;31(3):e12675. doi: 10.1111/jne.12675. Epub 2019 Feb 1. PMID: 30578574; PMCID: PMC6519262.



119. de Kloet ER, Derijk RH, Meijer OC. Therapy Insight: is there an imbalanced response of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in depression? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007 Feb;3(2):168-79. doi: 10.1038/ncpendmet0403. PMID: 17237843.
120. de Kloet ER, Otte C, Kumsta R, Kok L, Hillegers MH, Hasselmann H, Kliegel D, Joëls M. Stress and Depression: a Crucial Role of the Mineralocorticoid Receptor. *J Neuroendocrinol.* 2016 Aug;28(8). doi: 10.1111/jne.12379. PMID: 26970338.
121. de Kloet ER, Sibug RM, Helmerhorst FM, Schmidt MV. Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005 Apr;29(2):271-81. doi: 10.1016/j.neubio-rev.2004.10.008. Epub 2004 Dec 9. Erratum in: *Neurosci Biobehav Rev.* 2006;30(4):576. Schmidt, Mathias [corrected to Schmidt, Mathias V]. PMID: 15811498.
122. Deng C, Zhang Q, He P, Zhou B, He K, Sun X, Lei G, Gong T, Zhang Z. Targeted apoptosis of macrophages and osteoclasts in arthritic joints is effective against advanced inflammatory arthritis. *Nat Commun.* 2021 Apr 12;12(1):2174. doi: 10.1038/s41467-021-22454-z. PMID: 33846342; PMCID: PMC8042091.
123. Dent GW, Okimoto DK, Smith MA, Levine S. Stress-induced alterations in corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the paraventricular nucleus during ontogeny. *Neuroendocrinology.* 2000 Jun;71(6):333-42. doi: 10.1159/000054554. PMID: 10878495.
124. Derks NM, Gaszner B, Bernhardt K, Roubos EW, Kozicz T. Sex-specific expression of BDNF and CART in the midbrain non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus in the rat. *Peptides.* 2009 Dec;30(12):2268-74. doi: 10.1016/j.peptides.2009.09.009. Epub 2009 Sep 13. PMID: 19755135.
125. Derks NM, Gaszner B, Roubos EW, Kozicz LT. Sex differences in urocortin 1 dynamics in the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus of the rat. *Neurosci Res.* 2010 Jan;66(1):117-23. doi: 10.1016/j.neures.2009.10.003. Epub 2009 Oct 13. PMID: 19833156.
126. Deussing JM, Chen A. The Corticotropin-Releasing Factor Family: Physiology of the Stress Response. *Physiol Rev.* 2018 Oct 1;98(4):2225-2286. doi: 10.1152/physrev.00042.2017. PMID: 30109816.
127. Dias BG, Ressler KJ. PACAP and the PAC1 receptor in post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2013 Jan;38(1):245-6. doi: 10.1038/npp.2012.147. PMID: 23147486; PMCID: PMC3521970.
128. Diorio D, Viau V, Meaney MJ. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci.* 1993 Sep;13(9):3839-47. doi: 10.1523/JNEUROSCI.13-09-03839.1993. PMID: 8396170; PMCID: PMC6576467.
129. Dirks A, Groenink L, Bouwknecht JA, Hijzen TH, Van Der Gugten J, Ronken E, Verbeek JS, Veening JG, Dederen PJ, Korosi A, Schoolderman LF, Roubos EW, Olivier B. Overexpression of corticotropin-releasing hormone in transgenic mice and chronic stress-like autonomic and physiological alterations. *Eur J Neurosci.* 2002 Nov;16(9):1751-60. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02245.x. PMID: 12431228.
130. Dong HW, Petrovich GD, Swanson LW. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res Brain Res Rev.* 2001 Dec;38(1-2):192-246. doi: 10.1016/s0165-0173(01)00079-0. PMID: 11750933.
131. Doorn KJ, Moors T, Drukarch B, van de Berg WDJ, Lucassen PJ, van Dam AM. Microglial phenotypes and toll-like receptor 2 in the substantia nigra and hippocampus of incidental Lewy body disease cases and Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol Commun.* 2014 Aug 7;2:90. doi: 10.1186/s40478-014-0090-1. PMID: 25099483; PMCID: PMC4224021.
132. Dore R, Iemolo A, Smith KL, Wang X, Cottone P, Sabino V. CRF mediates the anxiogenic and anti-rewarding, but not the anorectic effects of PACAP. *Neuropsychopharmacology.* 2013 Oct;38(11):2160-9. doi: 10.1038/npp.2013.113. Epub 2013 May 9. PMID: 23657440; PMCID: PMC3773665.
133. Dorzab J, Baker M, Cadoret RJ, Winokur G. Depressive disease: familial psychiatric illness. *Am J Psychiatry.* 1971 Mar;127(9):1128-33. doi: 10.1176/ajp.127.9.1128. PMID: 5100603.
134. Dos Santos Júnior ED, Da Silva AV, Da Silva KR, Haemmerle CA, Batagello DS, Da Silva JM, Lima LB, Da Silva RJ, Diniz GB, Sita LV, Elias CF, Bittencourt JC. The centrally projecting Edinger-Westphal nucleus--I: Efferents in the rat brain. *J Chem Neuroanat.* 2015 Oct;68:22-38. doi: 10.1016/j.jchemneu.2015.07.002. Epub 2015 Jul 21. PMID: 26206178.
135. Douglass J, McKinzie AA, Couceyro P. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci.* 1995 Mar;15(3 Pt 2):2471-81. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-03-02471.1995. PMID: 7891182; PMCID: PMC6578117.

136. Dragunow M, Faull R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods*. 1989 Sep;29(3):261-5. doi: 10.1016/0165-0270(89)90150-7. PMID: 2507830.
137. DSM-5: Diagnostic and statistical manual of mental disorders, Fifth edition, 2013. American Psychiatric Association, ISBN 978-0-89042-555-8, American Psychiatric Publishing
138. Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*. 2006 Jun 15;59(12):1116-27. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.02.013. Epub 2006 Apr 21. PMID: 16631126.
139. Edinger L. Über den Verlauf der centralen Hirnnervenbahnen mit Demonstrationen von Präparaten. *Arch Psychiatr Nervenkrankheiten*. 1885; 16:858–859
140. Eiland L, Romeo RD. Stress and the developing adolescent brain. *Neuroscience*. 2013 Sep 26;249:162-71. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.048. Epub 2012 Nov 2. PMID: 23123920; PMCID: PMC3601560.
141. Ellenbogen JM, Hurford MO, Liebeskind DS, Neimark GB, Weiss D. Ventromedial frontal lobe trauma. *Neurology*. 2005 Feb 22;64(4):757. doi: 10.1212/wnl.64.4.757. PMID: 15728314.
142. Ellenbroek BA, van den Kroonenberg PT, Cools AR. The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr Res*. 1998 Apr 10;30(3):251-60. doi: 10.1016/s0920-9964(97)00149-7. PMID: 9589519.
143. Elliott E, Ezra-Nevo G, Regev L, Neufeld-Cohen A, Chen A. Resilience to social stress coincides with functional DNA methylation of the Crf gene in adult mice. *Nat Neurosci*. 2010 Nov;13(11):1351-3. doi: 10.1038/nn.2642. Epub 2010 Oct 3. PMID: 20890295.
144. Ellul P, Mariotti-Ferrandiz E, Leboyer M, Klatzmann D. Regulatory T Cells As Supporters of Psychoimmune Resilience: Toward Immunotherapy of Major Depressive Disorder. *Front Neurol*. 2018 Mar 20;9:167. doi: 10.3389/fneur.2018.00167. PMID: 29615964; PMCID: PMC5869201.
145. Emmerzaal TL, vd Doelen RH, Roubos EW, Kozicz T. Orexinergic innervation of urocortin1 and cocaine and amphetamine regulated transcript neurons in the midbrain centrally projecting Edinger-Westphal nucleus. *J Chem Neuroanat*. 2013 Dec;54:34-41. doi: 10.1016/j.jchemneu.2013.07.004. Epub 2013 Aug 16. PMID: 23958928.
146. Fan L, Zhou L. AG490 protects cerebral ischemia/reperfusion injury via inhibiting the JAK2/3 signaling pathway. *Brain Behav*. 2021 Jan;11(1):e01911. doi: 10.1002/brb3.1911. Epub 2020 Oct 23. PMID: 33098244; PMCID: PMC7821583.
147. Faouzi M, Leshan R, Björnholm M, Hennessey T, Jones J, Münzberg H. Differential accessibility of circulating leptin to individual hypothalamic sites. *Endocrinology*. 2007 Nov;148(11):5414-23. doi: 10.1210/en.2007-0655. Epub 2007 Aug 9. PMID: 17690165.
148. Farkas J, Kovács LÁ, Gáspár L, Nafz A, Gaszner T, Ujvári B, Kormos V, Csernus V, Hashimoto H, Reglődi D, Gaszner B. Construct and face validity of a new model for the three-hit theory of depression using PACAP mutant mice on CD1 background. *Neuroscience*. 2017 Jun 23;354:11-29. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.04.019. Epub 2017 Apr 25. PMID: 28450265.
149. Farkas J, Kovacs LÁ, Gaszner T, Gaszner B. Using PACAP heterozygous mice as models of the three hit theory of depression. In *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide—PACAP*. 2016. (pp. 731-741). Springer, Cham. ISBN: 978-3-319-35135-3.
150. Farkas J. Early Life Adversity in the Rodent Neurobehavioral Development and Three Hit Concept Model of Major Depressive Disorder. 2018. Doctoral (PhD) thesis. <https://pea.lib.pte.hu/handle/pea/23318>
151. Fehér M, Márton Z, Szabó Á, Kocsa J, Kormos V, Hunyady Á, Kovács LÁ, Ujvári B, Berta G, Farkas J, Füredi N, Gaszner T, Pytel B, Reglődi D, Gaszner B. Downregulation of PACAP and the PAC1 Receptor in the Basal Ganglia, Substantia Nigra and Centrally Projecting Edinger-Westphal Nucleus in the Rotenone model of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 2023 Jul 24;24(14):11843. doi: 10.3390/ijms241411843. PMID: 37511603; PMCID: PMC10380602.
152. Feingold D, Weinstein A. Cannabis and Depression. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1264:67-80. doi: 10.1007/978-3-030-57369-0\_5. PMID: 33332004.
153. Fekete C, Légrádi G, Mihály E, Huang QH, Tatro JB, Rand WM, Emerson CH, Lechan RM. alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. *J Neurosci*. 2000 Feb 15;20(4):1550-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-04-01550.2000. PMID: 10662844; PMCID: PMC6772359.

154. Feldman S, Conforti N, Itzik A, Weidenfeld J. Differential effect of amygdaloid lesions on CRF-41, ACTH and corticosterone responses following neural stimuli. *Brain Res.* 1994 Sep 26;658(1-2):21-6. doi: 10.1016/s0006-8993(09)90005-1. PMID: 7834344.
155. Feldman S, Conforti N, Saphier D. The preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis are involved in the effects of the amygdala on adrenocortical secretion. *Neuroscience.* 1990;37(3):775-9. doi: 10.1016/0306-4522(90)90107-f. PMID: 2247223.
156. Ferland CL, Schrader LA. Regulation of histone acetylation in the hippocampus of chronically stressed rats: a potential role of sirtuins. *Neuroscience.* 2011 Feb 3;174:104-14. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.10.077. Epub 2010 Nov 5. PMID: 21056634; PMCID: PMC3020273.
157. Figueiredo HF, Bruestle A, Bodie B, Dolgas CM, Herman JP. The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor. *Eur J Neurosci.* 2003 Oct;18(8):2357-64. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02932.x. PMID: 14622198.
158. Finamore TL, Port RL. Developmental stress disrupts habituation but spares prepulse inhibition in young rats. *Physiol Behav.* 2000 Jun 1-15;69(4-5):527-30. doi: 10.1016/s0031-9384(00)00205-5. PMID: 10913792.
159. Flandreau EI, Bourke CH, Ressler KJ, Vale WW, Nemeroff CB, Owens MJ. Escitalopram alters gene expression and HPA axis reactivity in rats following chronic overexpression of corticotropin-releasing factor from the central amygdala. *Psychoneuroendocrinology.* 2013 Aug;38(8):1349-61. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.11.020. Epub 2012 Dec 23. PMID: 23267723; PMCID: PMC3749072.
160. Flandreau EI, Ressler KJ, Owens MJ, Nemeroff CB. Chronic overexpression of corticotropin-releasing factor from the central amygdala produces HPA axis hyperactivity and behavioral anxiety associated with gene-expression changes in the hippocampus and paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Psychoneuroendocrinology.* 2012 Jan;37(1):27-38. doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.04.014. Epub 2011 May 26. PMID: 21616602; PMCID: PMC3164918.
161. Fong TM, Mao C, MacNeil T, Kalyani R, Smith T, Weinberg D, Tota MR, Van der Ploeg LH. ART (protein product of agouti-related transcript) as an antagonist of MC-3 and MC-4 receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Aug 28;237(3):629-31. doi: 10.1006/bbrc.1997.7200. PMID: 9299416.
162. Fox AS, Oler JA, Tromp do PM, Fudge JL, Kalin NH. Extending the amygdala in theories of threat processing. *Trends Neurosci.* 2015 May;38(5):319-29. doi: 10.1016/j.tins.2015.03.002. Epub 2015 Apr 4. PMID: 25851307; PMCID: PMC4417372.
163. Fox JH, Lowry CA. Corticotropin-releasing factor-related peptides, serotonergic systems, and emotional behavior. *Front Neurosci.* 2013 Sep 20;7:169. doi: 10.3389/fnins.2013.00169. PMID: 24065880; PMCID: PMC3778254.
164. Fuchs E, Czéh B, Kole MH, Michaelis T, Lucassen PJ. Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2004 Dec;14 Suppl 5:S481-90. doi: 10.1016/j.euroneuro.2004.09.002. PMID: 15550346.
165. Funkelstein L, Toneff T, Mosier C, Hwang SR, Beuschlein F, Lichtenauer UD, Reinheckel T, Peters C, Hook V. Major role of cathepsin L for producing the peptide hormones ACTH, beta-endorphin, and alpha-MSH, illustrated by protease gene knockout and expression. *J Biol Chem.* 2008 Dec 19;283(51):35652-9. doi: 10.1074/jbc.M709010200. Epub 2008 Oct 10. PMID: 18849346; PMCID: PMC2602888.
166. Füredi N, Nagy Á, Mikó A, Berta G, Kozicz T, Pétervári E, Balaskó M, Gaszner B. Melanocortin 4 receptor ligands modulate energy homeostasis through urocortin 1 neurons of the centrally projecting Edinger-Westphal nucleus. *Neuropharmacology.* 2017 May 15;118:26-37. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.03.002. Epub 2017 Mar 3. PMID: 28267582.
167. Galts CPC, Bettio LEB, Jewett DC, Yang CC, Brocardo PS, Rodrigues ALS, Thacker JS, Gil-Mohapel J. Depression in neurodegenerative diseases: Common mechanisms and current treatment options. *Neurosci Biobehav Rev.* 2019 Jul;102:56-84. doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.04.002. Epub 2019 Apr 15. PMID: 30995512.
168. Gantz I, Konda Y, Tashiro T, Shimoto Y, Miwa H, Munzert G, Watson SJ, DelValle J, Yamada T. Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J Biol Chem.* 1993 Apr 15;268(11):8246-50. PMID: 8463333.
169. Gardner KL, Hale MW, Oldfield S, Lightman SL, Plotsky PM, Lowry CA. Adverse experience during early life and adulthood interact to elevate tph2 mRNA expression in serotonergic neurons within the dorsal raphe nucleus. *Neuroscience.* 2009 Nov 10;163(4):991-1001. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.07.055. Epub 2009 Jul 30. PMID: 19647049; PMCID: PMC2760611.

170. Gaskins DL, Burke AR, Sajdyk TJ, Truitt WA, Dietrich AD, Shekhar A. Role of Basolateral Amygdalar Somatostatin 2 Receptors in a Rat Model of Chronic Anxiety. *Neuroscience*. 2021 Nov 21;477:40-49. doi: 10.1016/j.neuroscience.2021.08.031. Epub 2021 Sep 4. PMID: 34487822; PMCID: PMC9744088.
171. Gaszner B Plastic responses to stress by the rodent urocortineric Edinger-Westphal nucleus. 2008 Series Donders Institute for Brain Cognition and Behaviour ISBN 978-90-9023714-5, Radboud University Nijmegen, The Netherlands [https://repository.ubn.ru.nl/bitstream/handle/2066/65578/65578\\_plasretos.pdf](https://repository.ubn.ru.nl/bitstream/handle/2066/65578/65578_plasretos.pdf)
172. Gaszner B, Csernus V, Kozicz T. Urocortineric neurons respond in a differentiated manner to various acute stressors in the Edinger-Westphal nucleus in the rat. *J Comp Neurol*. 2004 Dec 6;480(2):170-9. doi: 10.1002/cne.20343. PMID: 15514930.
173. Gaszner B, Jensen KO, Farkas J, Reglodi D, Csernus V, Roubos EW, Kozicz T. Effects of maternal separation on dynamics of urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor in the rat non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus. *Int J Dev Neurosci*. 2009b Aug;27(5):439-51. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2009.05.006. Epub 2009 May 19. PMID: 19460425.
174. Gaszner B, Kormos V, Kozicz T, Hashimoto H, Reglodi D, Helyes Z. The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger-Westphal nucleus, ventral lateral septum, and dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*. 2012 Jan 27;202:283-99. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.046. Epub 2011 Dec 9. PMID: 22178610.
175. Gaszner B, Korosi A, Palkovits M, Roubos EW, Kozicz T. Neuropeptide Y activates urocortin 1 neurons in the nonpreganglionic Edinger-Westphal nucleus. *J Comp Neurol*. 2007 Feb 1;500(4):708-19. doi: 10.1002/cne.21177. PMID: 17154253.
176. Gaszner B, Kozicz T. Interaction between catecholaminergic terminals and urocortineric neurons in the Edinger-Westphal nucleus in the rat. *Brain Res*. 2003 Oct 31;989(1):117-21. doi: 10.1016/s0006-8993(03)03367-5. PMID: 14519518.
177. Gaszner B, Van Wijk DC, Korosi A, Józsa R, Roubos EW, Kozicz T. Diurnal expression of period 2 and urocortin 1 in neurones of the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus in the rat. *Stress*. 2009a Mar;12(2):115-24. doi: 10.1080/10253890802057221. PMID: 18850494.
178. Gaszner T A depresszió három találat elméletén alapuló állatmodell prediktív validitásának vizsgálata az epigenom változásainak tükrében. PhD értekezés. 2023. <http://pea.lib.pte.hu/handle/pea/34841>
179. Gaszner T, Farkas J, Kun D, Ujvári B, Berta G, Csernus V, Füredi N, Kovács LÁ, Hashimoto H, Reglódi D, Kormos V, Gaszner B. Fluoxetine treatment supports predictive validity of the three hit model of depression in male PACAP heterozygous mice and underpins the impact of early life adversity on therapeutic efficacy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022a Sep 23;13:995900. doi: 10.3389/fendo.2022.995900. PMID: 36213293; PMCID: PMC9537566.
180. Gaszner T, Farkas J, Kun D, Ujvári B, Füredi N, Kovács LÁ, Hashimoto H, Reglódi D, Kormos V, Gaszner B. Epigenetic and Neuronal Activity Markers Suggest the Recruitment of the Prefrontal Cortex and Hippocampus in the Three-Hit Model of Depression in Male PACAP Heterozygous Mice. *Int J Mol Sci*. 2022b Oct 3;23(19):11739. doi: 10.3390/ijms231911739. PMID: 36233039; PMCID: PMC9570135.
181. Gavrilov YV, Perekrest SV, Novikova NS. Intracellular expression of c-Fos protein in various structures of the hypothalamus in electrical pain stimulation and administration of antigens. *Neurosci Behav Physiol*. 2008 Jan;38(1):87-92. doi: 10.1007/s11055-008-0012-4. PMID: 18097765.
182. Geerling JJ, Boon MR, Kooijman S, Parlevliet ET, Havekes LM, Romijn JA, Meurs IM, Rensen PC. Sympathetic nervous system control of triglyceride metabolism: novel concepts derived from recent studies. *J Lipid Res*. 2014 Feb;55(2):180-9. doi: 10.1194/jlr.R045013. Epub 2013 Nov 27. PMID: 24285857; PMCID: PMC3886657.
183. George MS, Ketter TA, Post RM. Prefrontal cortex dysfunction in clinical depression. *Depression*. 1994. 2(2), 59-72.
184. Gesi M, Soldani P, Giorgi FS, Santinami A, Bonaccorsi I, Fornai F. The role of the locus coeruleus in the development of Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000 Aug;24(6):655-68. doi: 10.1016/s0149-7634(00)00028-2. PMID: 10940440.
185. Ghasemi M, Montaser-Kouhsari L, Shafaroodi H, Nezami BG, Ebrahimi F, Dehpour AR. NMDA receptor/nitric system blockage augments antidepressant-like effects of paroxetine in the mouse forced swimming

- test. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009 Oct;206(2):325-33. doi: 10.1007/s00213-009-1609-1. Epub 2009 Jul 16. PMID: 19609507.
186. Ghosal S, Duman CH, Liu RJ, Wu M, Terwilliger R, Girgenti MJ, Wohleb E, Fogaca MV, Teichman EM, Hare B, Duman RS. Ketamine rapidly reverses stress-induced impairments in GABAergic transmission in the prefrontal cortex in male rodents. *Neurobiol Dis*. 2020 Feb;134:104669. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104669. Epub 2019 Nov 7. PMID: 31707118.
  187. Giardino WJ, Cote DM, Li J, Ryabinin AE. Characterization of Genetic Differences within the Centrally Projecting Edinger-Westphal Nucleus of C57BL/6J and DBA/2J Mice by Expression Profiling. *Front Neuroanat*. 2012 Feb 14;6:5. doi: 10.3389/fnana.2012.00005. PMID: 22347848; PMCID: PMC3278674.
  188. Gili M, Castellví P, Vives M, de la Torre-Luque A, Almenara J, Blasco MJ, Cebrià AI, Gabilondo A, Pérez-Ara MA, A MM, Lagares C, Parés-Badell O, Piqueras JA, Rodríguez-Jiménez T, Rodríguez-Marín J, Soto-Sanz V, Alonso J, Roca M. Mental disorders as risk factors for suicidal behavior in young people: A meta-analysis and systematic review of longitudinal studies. *J Affect Disord*. 2019 Feb 15;245:152-162. doi: 10.1016/j.jad.2018.10.115. Epub 2018 Oct 26. PMID: 30390504.
  189. Gilmer WS, McKinney WT. Early experience and depressive disorders: human and non-human primate studies. *J Affect Disord*. 2003 Jul;75(2):97-113. doi: 10.1016/s0165-0327(03)00046-6. PMID: 12798250.
  190. Girard BA, Lelievre V, Braas KM, Razinia T, Vizzard MA, Ioffe Y, El Meskini R, Ronnett GV, Waschek JA, May V. Noncompensation in peptide/receptor gene expression and distinct behavioral phenotypes in VIP- and PACAP-deficient mice. *J Neurochem*. 2006 Oct;99(2):499-513. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04112.x. PMID: 17029602.
  191. Girotti M, Pace TW, Gaylord RI, Rubin BA, Herman JP, Spencer RL. Habituation to repeated restraint stress is associated with lack of stress-induced c-fos expression in primary sensory processing areas of the rat brain. *Neuroscience*. 2006;138(4):1067-81. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.12.002. Epub 2006 Jan 23. PMID: 16431027.
  192. Glover V, O'Connor TG, O'Donnell K. Prenatal stress and the programming of the HPA axis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010 Sep;35(1):17-22. doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.11.008. Epub 2009 Nov 13. PMID: 19914282.
  193. Goedert M, Jakes R, Anthony Crowther R, Grazia Spillantini M. Parkinson's Disease, Dementia with Lewy Bodies, and Multiple System Atrophy as  $\alpha$ -Synucleinopathies. *Methods Mol Med*. 2001;62:33-59. doi: 10.1385/1-59259-142-6:33. PMID: 21318766.
  194. Goldfarb EV. Enhancing memory with stress: Progress, challenges, and opportunities. *Brain Cogn*. 2019 Jul;133:94-105. doi: 10.1016/j.bandc.2018.11.009. Epub 2018 Dec 12. PMID: 30553573; PMCID: PMC9972486.
  195. Green MR, McCormick CM. Effects of stressors in adolescence on learning and memory in rodent models. *Horm Behav*. 2013 Jul;64(2):364-79. doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.09.012. PMID: 23998678.
  196. Grinevich V, Fournier A, Pelletier G. Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on corticotropin-releasing hormone (CRH) gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res*. 1997 Oct 31;773(1-2):190-6. doi: 10.1016/s0006-8993(97)01011-1. PMID: 9409720.
  197. Groenink L, Dirks A, Verdouw PM, Schipholt MI, Veening JG, van der Gugten J, Olivier B. HPA axis dysregulation in mice overexpressing corticotropin releasing hormone. *Biol Psychiatry*. 2002 Jun 1;51(11):875-81. doi: 10.1016/s0006-3223(02)01334-3. PMID: 12022960.
  198. Gröger N, Matas E, Gos T, Lesse A, Poeggel G, Braun K, Bock J. The transgenerational transmission of childhood adversity: behavioral, cellular, and epigenetic correlates. *J Neural Transm (Vienna)*. 2016 Sep;123(9):1037-52. doi: 10.1007/s00702-016-1570-1. Epub 2016 May 12. PMID: 27169537.
  199. Guidi J, Fava GA. Sequential Combination of Pharmacotherapy and Psychotherapy in Major Depressive Disorder: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Psychiatry*. 2021 Mar 1;78(3):261-269. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2020.3650. PMID: 33237285; PMCID: PMC7689568.
  200. Guilloux JP, Seney M, Edgar N, Sibille E. Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: relevance to emotionality and sex. *J Neurosci Methods*. 2011 Apr PMID: 21277897
  201. Gustavsson A, Svensson M, Jacobi F, Allgulander C, Alonso J, Beghi E, Dodel R, Ekman M, Faravelli C, Fratiglioni L, Gannon B, Jones DH, Jenum P, Jordanova A, Jönsson L, Karampampa K, Knapp M, Kobelt G, Kurth T, Lieb R, Linde M, Ljungcrantz C, Maercker A, Melin B, Moscarelli M, Musayev A, Norwood F, Preisig M, Pugliatti M, Rehm J, Salvador-Carulla L, Schlehofer B, Simon R, Steinhausen HC, Stovner LJ, Vallat JM, Van

- den Bergh P, van Os J, Vos P, Xu W, Wittchen HU, Jönsson B, Olesen J; CDBE2010Study Group. Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2011 Oct;21(10):718-79. doi: 10.1016/j.euroneuro.2011.08.008. Epub 2011 Sep 15. Erratum in: *Eur Neuropsychopharmacol.* 2012 Mar;22(3):237-8. PMID: 21924589.
202. Hakulinen C, Musliner KL, Agerbo E. Bipolar disorder and depression in early adulthood and long-term employment, income, and educational attainment: A nationwide cohort study of 2,390,127 individuals. *Depress Anxiety.* 2019 Nov;36(11):1080-1088. doi: 10.1002/da.22956. Epub 2019 Sep 11. PMID: 31508865.
203. Hammack SE, May V. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in stress-related disorders: data convergence from animal and human studies. *Biol Psychiatry.* 2015 Aug 1;78(3):167-77. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.12.003. Epub 2014 Dec 9. PMID: 25636177; PMCID: PMC4461555.
204. Hammack SE, Cheung J, Rhodes KM, Schutz KC, Falls WA, Braas KM, May V. Chronic stress increases pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST): roles for PACAP in anxiety-like behavior. *Psychoneuroendocrinology.* 2009 Jul;34(6):833-43. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.12.013. Epub 2009 Jan 31. PMID: 19181454; PMCID: PMC2705919.
205. Hammack SE, Cooper MA, Lezak KR. Overlapping neurobiology of learned helplessness and conditioned defeat: implications for PTSD and mood disorders. *Neuropharmacology.* 2012 Feb;62(2):565-75. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.02.024. Epub 2011 Mar 9. PMID: 21396383; PMCID: PMC3433056.
206. Hammack SE, Roman CW, Lezak KR, Kocho-Shellenberg M, Grimmig B, Falls WA, Braas K, May V. Roles for pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) expression and signaling in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) in mediating the behavioral consequences of chronic stress. *J Mol Neurosci.* 2010 Nov;42(3):327-40. doi: 10.1007/s12031-010-9364-7. Epub 2010 Apr 20. PMID: 20405238; PMCID: PMC2955825.
207. Hannibal J. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Comp Neurol.* 2002 Nov 25;453(4):389-417. doi: 10.1002/cne.10418. PMID: 12389210.
208. Hannibal J, Mikkelsen JD, Fahrenkrug J, Larsen PJ. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide gene expression in corticotropin-releasing factor-containing parvocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus is induced by colchicine, but not by adrenalectomy, acute osmotic, ether, or restraint stress. *Endocrinology.* 1995 Sep;136(9):4116-24. doi: 10.1210/endo.136.9.7649120. PMID: 7649120.
209. Harrison L, Pfuhlmann K, Schriever SC, Pfluger PT. Profound weight loss induces reactive astrogliosis in the arcuate nucleus of obese mice. *Mol Metab.* 2019 Jun PMID: 30979678
210. Harro J. Animal models of depression: pros and cons. *Cell Tissue Res.* 2019 Jul;377(1):5-20. doi: 10.1007/s00441-018-2973-0. Epub 2018 Dec 17. PMID: 30560458.
211. Hartline KM, Owens MJ, Nemeroff CB. Postmortem and cerebrospinal fluid studies of corticotropin-releasing factor in humans. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Mar 22;780:96-105. doi: 10.1111/j.1749-6632.1996.tb15114.x. PMID: 8602742.
212. Harvey BH, Brand L, Jeeva Z, Stein DJ. Cortical/hippocampal monoamines, HPA-axis changes and aversive behavior following stress and restrest in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Physiol Behav.* 2006 May 30;87(5):881-90. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.01.033. Epub 2006 Mar 6. PMID: 16546226.
213. Hashimoto H, Shintani N, Baba A. New insights into the central PACAPergic system from the phenotypes in PACAP- and PACAP receptor-knockout mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Jul;1070:75-89. doi: 10.1196/annals.1317.038. PMID: 16888150.
214. Hashimoto H, Shintani N, Tanida M, Hayata A, Hashimoto R, Baba A. PACAP is implicated in the stress axes. *Curr Pharm Des.* 2011;17(10):985-9. doi: 10.2174/138161211795589382. PMID: 21524255; PMCID: PMC3179129.
215. Hashimoto H, Hashimoto R, Shintani N, Tanaka K, Yamamoto A, Hatanaka M, Guo X, Morita Y, Tanida M, Nagai K, Takeda M, Baba A. Depression-like behavior in the forced swimming test in PACAP-deficient mice: amelioration by the atypical antipsychotic risperidone. *J Neurochem.* 2009 Jul;110(2):595-602. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06168.x. Epub 2009 May 15. PMID: 19457081.
216. Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K, Mori W, Hirose M, Matsuda T, Sakaue M, Miyazaki J, Niwa H, Tashiro F, Yamamoto K, Koga K, Tomimoto S, Kunugi A, Suetake S, Baba A. Altered psychomotor behaviors in mice

- lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 6;98(23):13355-60. doi: 10.1073/pnas.231094498. Epub 2001 Oct 30. PMID: 11687615; PMCID: PMC60875.
217. Hashimoto R, Hashimoto H, Shintani N, Ohi K, Hori H, Saitoh O, Kosuga A, Tatsumi M, Iwata N, Ozaki N, Kamijima K, Baba A, Takeda M, Kunugi H. Possible association between the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene and major depressive disorder. *Neurosci Lett*. 2010 Jan 14;468(3):300-2. doi: 10.1016/j.neulet.2009.11.019. Epub 2009 Nov 13. PMID: 19914336.
  218. Hattori S, Takao K, Tanda K, Toyama K, Shintani N, Baba A, Hashimoto H, Miyakawa T. Comprehensive behavioral analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) knockout mice. *Front Behav Neurosci*. 2012 Oct 2;6:58. doi: 10.3389/fnbeh.2012.00058. PMID: 23060763; PMCID: PMC3462416.
  219. Hattori T, Baba K, Matsuzaki S, Honda A, Miyoshi K, Inoue K, Taniguchi M, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Shimizu S, Yukioka F, Kumamoto N, Yamaguchi A, Tohyama M, Katayama T. A novel DISC1-interacting partner DISC1-Binding Zinc-finger protein: implication in the modulation of DISC1-dependent neurite outgrowth. *Mol Psychiatry*. 2007 Apr;12(4):398-407. doi: 10.1038/sj.mp.4001945. Epub 2007 Jan 23. PMID: 17389905.
  220. Hatzinger M. Neuropeptides and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) system: review of recent research strategies in depression. *World J Biol Psychiatry*. 2000 Apr;1(2):105-11. doi: 10.3109/15622970009150573. PMID: 12607206.
  221. Heim C, Binder EB. Current research trends in early life stress and depression: review of human studies on sensitive periods, gene-environment interactions, and epigenetics. *Exp Neurol*. 2012 Jan;233(1):102-11. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.10.032. Epub 2011 Nov 7. PMID: 22101006.
  222. Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev*. 2009 Apr;60(1):214-25. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.12.009. Epub 2008 Dec 25. PMID: 19146877; PMCID: PMC2894733.
  223. Heinz S, Freyberger A, Lawrenz B, Schladt L, Schmuck G, Ellinger-Ziegelbauer H. Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation. *Sci Rep*. 2017 Apr 4;7:45465. doi: 10.1038/srep45465. PMID: 28374803; PMCID: PMC5379642.
  224. Held K, Künzel H, Ising M, Schmid DA, Zobel A, Murck H, Holsboer F, Steiger A. Treatment with the CRH1-receptor-antagonist R121919 improves sleep-EEG in patients with depression. *J Psychiatr Res*. 2004 Mar-Apr;38(2):129-36. doi: 10.1016/s0022-3956(03)00076-1. PMID: 14757326.
  225. Helfferich F, Palkovits M. Acute audiogenic stress-induced activation of CRH neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and catecholaminergic neurons in the medulla oblongata. *Brain Res*. 2003 Jun 13;975(1-2):1-9. doi: 10.1016/s0006-8993(03)02509-5. PMID: 12763588.
  226. Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*. 1997 Feb;20(2):78-84. doi: 10.1016/s0166-2236(96)10069-2. PMID: 9023876.
  227. Herman JP, Cullinan WE, Morano MI, Akil H, Watson SJ. Contribution of the ventral subiculum to inhibitory regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J Neuroendocrinol*. 1995 Jun;7(6):475-82. doi: 10.1111/j.1365-2826.1995.tb00784.x. PMID: 7550295.
  228. Herman JP, Dolgas CM, Carlson SL. Ventral subiculum regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical and behavioural responses to cognitive stressors. *Neuroscience*. 1998 Sep;86(2):449-59. doi: 10.1016/s0306-4522(98)00055-4. PMID: 9881860.
  229. Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*. 2003 Jul;24(3):151-80. doi: 10.1016/j.yfrne.2003.07.001. PMID: 14596810.
  230. Herman JP, Larson BR, Speert DB, Seasholtz AF. Hypothalamo-pituitary-adrenocortical dysregulation in aging F344/Brown-Norway F1 hybrid rats. *Neurobiol Aging*. 2001 Mar-Apr;22(2):323-32. doi: 10.1016/s0197-4580(00)00242-6. PMID: 11182482.
  231. Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, Scheimann J, Myers B. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Compr Physiol*. 2016 Mar 15;6(2):603-21. doi: 10.1002/cphy.c150015. PMID: 27065163; PMCID: PMC4867107.
  232. Hinwood M, Morandini J, Day TA, Walker FR. Evidence that microglia mediate the neurobiological effects of chronic psychological stress on the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. 2012 Jun;22(6):1442-54. doi: 10.1093/cercor/bhr229. Epub 2011 Aug 30. PMID: 21878486.

233. Hoffman GE, Le WW, Abbud R, Lee WS, Smith MS. Use of Fos-related antigens (FRAs) as markers of neuronal activity: FRA changes in dopamine neurons during proestrus, pregnancy and lactation. *Brain Res.* 1994 Aug 22;654(2):207-15. doi: 10.1016/0006-8993(94)90481-2. PMID: 7987670.
234. Holsboer F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology.* 2000 Nov;23(5):477-501. doi: 10.1016/S0893-133X(00)00159-7. PMID: 11027914.
235. Holsboer F, Ising M. Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy. *Annu Rev Psychol.* 2010;61:81-109, C1-11. doi: 10.1146/annurev.psych.093008.100321. PMID: 19575614.
236. Homma A, Li HP, Hayashi K, Kawano Y, Kawano H. Differential response of arcuate proopiomelanocortin- and neuropeptide Y-containing neurons to the lesion produced by gold thioglucose administration. *J Comp Neurol.* 2006 Nov 1;499(1):120-31. doi: 10.1002/cne.21097. PMID: 16958086.
237. Horovitz O, Tsoory MM, Hall J, Jacobson-Pick S, Richter-Levin G. Post-weaning to pre-pubertal ('juvenile') stress: a model of induced predisposition to stress-related disorders. *Neuroendocrinology.* 2012;95(1):56-64. doi: 10.1159/000331393. Epub 2012 Feb 22. PMID: 23475083.
238. Höglinger GU, Féger J, Prigent A, Michel PP, Parain K, Champy P, Ruberg M, Oertel WH, Hirsch EC. Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J Neurochem.* 2003 Feb;84(3):491-502. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01533.x. PMID: 12558969.
239. Hrabovszky E, Wittmann G, Turi GF, Liposits Z, Fekete C. Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone and corticotropin-releasing hormone neurons of the rat contain vesicular glutamate transporter-2. *Endocrinology.* 2005 Jan;146(1):341-7. doi: 10.1210/en.2004-0856. Epub 2004 Oct 14. PMID: 15486233.
240. Hsu DT, Chen FL, Takahashi LK, Kalin NH. Rapid stress-induced elevations in corticotropin-releasing hormone mRNA in rat central amygdala nucleus and hypothalamic paraventricular nucleus: an in situ hybridization analysis. *Brain Res.* 1998 Mar 30;788(1-2):305-10. doi: 10.1016/s0006-8993(98)00032-8. PMID: 9555067.
241. Hsu SY, Hsueh AJ. Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat Med.* 2001 May;7(5):605-11. doi: 10.1038/87936. PMID: 11329063.
242. Hu P, Maita I, Phan ML, Gu E, Kwok C, Dieterich A, Gergues MM, Yohn CN, Wang Y, Zhou JN, Qi XR, Swaab DF, Pang ZP, Lucassen PJ, Roepke TA, Samuels BA. Early-life stress alters affective behaviors in adult mice through persistent activation of CRH-BDNF signaling in the oval bed nucleus of the stria terminalis. *Transl Psychiatry.* 2020 Nov 11;10(1):396. doi: 10.1038/s41398-020-01070-3. PMID: 33177511; PMCID: PMC7658214.
243. Huesing C, Zhang R, Gummadi S, Lee N, Qualls-Creekmore E, Yu S, Morrison CD, Burk D, Berthoud HR, Neuhuber W, Münzberg H. Organization of sympathetic innervation of interscapular brown adipose tissue in the mouse. *J Comp Neurol.* 2022 Jun;530(9):1363-1378. doi: 10.1002/cne.25281. Epub 2021 Dec 16. PMID: 34837221; PMCID: PMC9010363.
244. Hume C, Sabatier N, Menzies J. High-Sugar, but Not High-Fat, Food Activates Supraoptic Nucleus Neurons in the Male Rat. *Endocrinology.* 2017 Jul 1;158(7):2200-2211. doi: 10.1210/en.2016-1640. PMID: 28430937.
245. Hunter S. The rostral mesencephalon in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 1985;68(1):53-8. doi: 10.1007/BF00688956. PMID: 2996284.
246. Hunter RG, McCarthy KJ, Milne TA, Pfaff DW, McEwen BS. Regulation of hippocampal H3 histone methylation by acute and chronic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Dec 8;106(49):20912-7. doi: 10.1073/pnas.0911143106. Epub 2009 Nov 23. PMID: 19934035; PMCID: PMC2791599.
247. Husum H, Termeer E, Mathé AA, Bolwig TG, Ellenbroek BA. Early maternal deprivation alters hippocampal levels of neuropeptide Y and calcitonin-gene related peptide in adult rats. *Neuropharmacology.* 2002 May;42(6):798-806. doi: 10.1016/s0028-3908(02)00038-2. PMID: 12015206.
248. Imaki T, Nahan JL, Rivier C, Sawchenko PE, Vale W. Differential regulation of corticotropin-releasing factor mRNA in rat brain regions by glucocorticoids and stress. *J Neurosci.* 1991 Mar;11(3):585-99. doi: 10.1523/JNEUROSCI.11-03-00585.1991. PMID: 2002354; PMCID: PMC6575358.
249. Innis RB, Aghajanian GK. Cholecystokinin-containing and nociceptive neurons in rat Edinger-Westphal nucleus. *Brain Res.* 1986 Jan 22;363(2):230-8. doi: 10.1016/0006-8993(86)91008-5. PMID: 3942895.
250. Issler O, Carter RN, Paul ED, Kelly PA, Oilverman HJ, Neufeld-Cohen A, Kuperman Y, Lowry CA, Seckl JR, Chen A, Jamieson PM. Increased anxiety in corticotropin-releasing factor type 2 receptor-null mice requires recent acute stress exposure and is associated with dysregulated serotonergic activity in limbic brain areas.



- Biol Mood Anxiety Disord. 2014 Jan 21;4(1):1. doi: 10.1186/2045-5380-4-1. PMID: 24447313; PMCID: PMC4029322.
251. Iurescia S, Seripa D, Rinaldi M. Role of the 5-HTTLPR and SNP Promoter Polymorphisms on Serotonin Transporter Gene Expression: a Closer Look at Genetic Architecture and In Vitro Functional Studies of Common and Uncommon Allelic Variants. *Mol Neurobiol*. 2016 Oct;53(8):5510-26. doi: 10.1007/s12035-015-9409-6. Epub 2015 Oct 13. PMID: 26464328.
  252. Jacobowitz DM, O'Donohue TL. alpha-Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 Dec;75(12):6300-4. doi: 10.1073/pnas.75.12.6300. PMID: 366617; PMCID: PMC393169.
  253. Jacobowich NM. O tonchaishem stroenii cherepnigo i spinnogo mozga. *Voenno-Meditsinskii Zhurnal* 20, part. 1857; 2:35–85.
  254. Jaggar M, Fanibunda SE, Ghosh S, Duman RS, Vaidya VA, Chapter 6 - The Neurotrophic Hypothesis of Depression Revisited: New Insights and Therapeutic Implications Editor(s): João Quevedo, André F. Carvalho, Carlos A. Zarate, *Neurobiology of Depression*, Academic Press, 2019, Pages 43-62, ISBN 9780128133330, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813333-0.00006-8>.
  255. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008 Apr;79(4):368-76. doi: 10.1136/jnnp.2007.131045. PMID: 18344392.
  256. Jans JE, Woodside BC. Nest temperature: effects on maternal behavior, pup development, and interactions with handling. *Dev Psychobiol*. 1990 Sep;23(6):519-34. doi: 10.1002/dev.420230607. PMID: 2272408.
  257. Janssen D, Kozicz T. Is it really a matter of simple dualism? Corticotropin-releasing factor receptors in body and mental health. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013 Mar 12;4:28. doi: 10.3389/fendo.2013.00028. PMID: 23487366; PMCID: PMC3594922.
  258. Jawahar MC, Murgatroyd C, Harrison EL, Baune BT. Epigenetic alterations following early postnatal stress: a review on novel aetiological mechanisms of common psychiatric disorders. *Clin Epigenetics*. 2015 Nov 14;7:122. doi: 10.1186/s13148-015-0156-3. PMID: 26583053; PMCID: PMC4650349.
  259. Joëls M, Verkuyl JM, Van Riel E. Hippocampal and hypothalamic function after chronic stress. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Dec;1007:367-78. doi: 10.1196/annals.1286.036. PMID: 14993070.
  260. Joksimovic M, Anderegg A, Roy A, Campochiaro L, Yun B, Kittappa R et al. Spatiotemporally separable Shh domains in the midbrain define distinct dopaminergic progenitor pools. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 10;106(45):19185-90. doi: 10.1073/pnas.0904285106. Epub 2009 Oct 22. PMID: 19850875; PMCID: PMC2776440.
  261. Jørgensen H, Knigge U, Kjaer A, Vadsholt T, Warberg J. Serotonergic involvement in stress-induced ACTH release. *Brain Res*. 1998 Nov 16;811(1-2):10-20. doi: 10.1016/s0006-8993(98)00901-9. PMID: 9804868.
  262. Joynt KE, Whellan DJ, O'Connor CM. Depression and cardiovascular disease: mechanisms of interaction. *Biol Psychiatry*. 2003 Aug 1;54(3):248-61. doi: 10.1016/s0006-3223(03)00568-7. PMID: 12893101.
  263. Ju G, Swanson LW, Simerly RB. Studies on the cellular architecture of the bed nuclei of the stria terminalis in the rat: II. Chemoarchitecture. *J Comp Neurol*. 1989 Feb 22;280(4):603-21. doi: 10.1002/cne.902800410. PMID: 2468695.
  264. Juruena MF, Bocharova M, Agustini B, Young AH. Atypical depression and non-atypical depression: Is HPA axis function a biomarker? A systematic review. *J Affect Disord*. 2018 Jun;233:45-67. doi: 10.1016/j.jad.2017.09.052. Epub 2017 Oct 6. PMID: 29150144.
  265. Kageyama K, Itoi K, Iwasaki Y, Niioka K, Watanuki Y, Yamagata S, Nakada Y, Das G, Suda T, Daimon M. Stimulation of corticotropin-releasing factor gene expression by FosB in rat hypothalamic 4B cells. *Peptides*. 2014 Jan;51:59-64. doi: 10.1016/j.peptides.2013.11.004. Epub 2013 Nov 15. PMID: 24246425.
  266. Kageyama K, Suda T. Regulatory mechanisms underlying corticotropin-releasing factor gene expression in the hypothalamus. *Endocr J*. 2009;56(3):335-44. doi: 10.1507/endocrj.k09e-075. Epub 2009 Apr 7. PMID: 19352056.
  267. Kalin NH, Shelton SE, Davidson RJ. The role of the central nucleus of the amygdala in mediating fear and anxiety in the primate. *J Neurosci*. 2004 Jun 16;24(24):5506-15. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0292-04.2004. PMID: 15201323; PMCID: PMC6729317.
  268. Kalin NH, Takahashi LK, Chen FL. Restraint stress increases corticotropin-releasing hormone mRNA content in the amygdala and paraventricular nucleus. *Brain Res*. 1994 Sep 5;656(1):182-6. doi: 10.1016/0006-8993(94)91382-x. PMID: 7804835.

269. Kalinichev M, Easterling KW, Holtzman SG. Early neonatal experience of Long-Evans rats results in long-lasting changes in reactivity to a novel environment and morphine-induced sensitization and tolerance. *Neuropsychopharmacology*. 2002 Oct;27(4):518-33. doi: 10.1016/S0893-133X(02)00326-3. PMID: 12377389.
270. Kalinichev M, Easterling KW, Holtzman SG. Long-lasting changes in morphine-induced locomotor sensitization and tolerance in Long-Evans mother rats as a result of periodic postpartum separation from the litter: a novel model of increased vulnerability to drug abuse? *Neuropsychopharmacology*. 2003 Feb;28(2):317-28. doi: 10.1038/sj.npp.1300068. Epub 2002 Sep 20. PMID: 12589385.
271. Kálmán M, Oszwald E, Pócsai K. Three-plane description of astroglial populations of OVLT subdivisions in rat: Tanycyte connections to distant parts of third ventricle. *J Comp Neurol*. 2019 Dec 1;527(17):2793-2812. doi: 10.1002/cne.24707. Epub 2019 May 13. PMID: 31045238.
272. Kappelmann N, Rein M, Fietz J, Mayberg HS, Craighead WE, Dunlop BW, Nemeroff CB, Keller M, Klein DN, Arnow BA, Husain N, Jarrett RB, Vittengl JR, Menchetti M, Parker G, Barber JP, Bastos AG, Dekker J, Peen J, Keck ME, Kopf-Beck J. Psychotherapy or medication for depression? Using individual symptom meta-analyses to derive a Symptom-Oriented Therapy (SOt) metric for a personalised psychiatry. *BMC Med*. 2020 Jun 5;18(1):170. doi: 10.1186/s12916-020-01623-9. PMID: 32498707; PMCID: PMC7273646.
273. Kapralov AA, Yang Q, Dar HH, Tyurina YY, Anthonymuthu TS, Kim R, St Croix CM, Mikulska-Ruminska K, Liu B, Shrivastava IH, Tyurin VA, Ting HC, Wu YL, Gao Y, Shurin GV, Artyukhova MA, Ponomareva LA, Timashev PS, Domingues RM, Stoyanovsky DA, Greenberger JS, Mallampalli RK, Bahar I, Gabrilovich DI, Bayir H, Kagan VE. Redox lipid reprogramming commands susceptibility of macrophages and microglia to ferroptotic death. *Nat Chem Biol*. 2020 Mar;16(3):278-290. doi: 10.1038/s41589-019-0462-8. Epub 2020 Feb 17. PMID: 32080625; PMCID: PMC7233108.
274. Kara NZ, Stukalin Y, Einat H. Revisiting the validity of the mouse forced swim test: Systematic review and meta-analysis of the effects of prototypic antidepressants. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018 Jan;84:1-11. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.11.003. Epub 2017 Nov 9. PMID: 29128579.
275. Karyotaki E, Smit Y, Holdt Henningsen K, Huibers MJ, Robays J, de Beurs D, Cuijpers P. Combining pharmacotherapy and psychotherapy or monotherapy for major depression? A meta-analysis on the long-term effects. *J Affect Disord*. 2016 Apr;194:144-52. doi: 10.1016/j.jad.2016.01.036. Epub 2016 Jan 20. PMID: 26826534.
276. Kash TL, Winder DG. Neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor bi-directionally modulate inhibitory synaptic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuropharmacology*. 2006 Oct;51(5):1013-22. doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.06.011. Epub 2006 Aug 10. PMID: 16904135.
277. Ke QF, Wang LX. Neuroanatomical evidence of the melanocortin-4 receptor expression in the mesencephalic periaqueductal gray innervating renal tissues. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Apr 15;8(4):6119-23. PMID: 26131214; PMCID: PMC4483877.
278. Kecskés A, Pohóczky K, Kecskés M, Varga ZV, Kormos V, Szőke É, Henn-Mike N, Fehér M, Kun J, Gyenesi A, Renner É, Palkovits M, Ferdinandy P, Ábrahám IM, Gaszner B, Helyes Z. Characterization of Neurons Expressing the Novel Analgesic Drug Target Somatostatin Receptor 4 in Mouse and Human Brains. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 21;21(20):7788. doi: 10.3390/ijms21207788. PMID: 33096776; PMCID: PMC7589422.
279. Kehne JH, Cain CK. Therapeutic utility of non-peptidic CRF1 receptor antagonists in anxiety, depression, and stress-related disorders: evidence from animal models. *Pharmacol Ther*. 2010 Dec;128(3):460-87. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.08.011. Epub 2010 Sep 6. PMID: 20826181; PMCID: PMC3373002.
280. Kellogg CK, Awatramani GB, Piekut DT. Adolescent development alters stressor-induced Fos immunoreactivity in rat brain. *Neuroscience*. 1998 Apr;83(3):681-9. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00408-9. PMID: 9483552.
281. Kelly DA, Varnum MM, Krentzel AA, Krug S, Forger NG. Differential control of sex differences in estrogen receptor  $\alpha$  in the bed nucleus of the stria terminalis and anteroventral periventricular nucleus. *Endocrinology*. 2013 Oct;154(10):3836-46. doi: 10.1210/en.2013-1239. Epub 2013 Sep 11. PMID: 24025225; PMCID: PMC3776875.
282. Kendler KS, Gardner CO, Prescott CA. Clinical characteristics of major depression that predict risk of depression in relatives. *Arch Gen Psychiatry*. 1999 Apr;56(4):322-7. doi: 10.1001/archpsyc.56.4.322. Erratum in: *Arch Gen Psychiatry*. 2000 Jan;57(1):94-5. PMID: 10197826.
283. Kendler KS, Gatz M, Gardner CO, Pedersen NL. A Swedish national twin study of lifetime major depression. *Am J Psychiatry*. 2006 Jan;163(1):109-14. doi: 10.1176/appi.ajp.163.1.109. PMID: 16390897.

284. Khan A, Brown WA. Antidepressants versus placebo in major depression: an overview. *World Psychiatry*. 2015 Oct;14(3):294-300. doi: 10.1002/wps.20241. PMID: 26407778; PMCID: PMC4592645.
285. Khlebnikov VV, Kuznetsov SL, Chernov DA, Agrytskov AM, Ahmad A, Nor-Ashikin MN, Ullah M, Kapitonova MY. [Age-related peculiarities of the hypothalamo-hypophyseal-adrenal system in chronic heterotypic stress]. *Morfologiya*. 2015;147(1):15-20. Russian. PMID: 25958723.
286. Kim BG, Dai HN, Lynskey JV, McAtee M, Bregman BS. Degradation of chondroitin sulfate proteoglycans potentiates transplant-mediated axonal remodeling and functional recovery after spinal cord injury in adult rats. *J Comp Neurol*. 2006 Jul 10;497(2):182-98. doi: 10.1002/cne.20980. PMID: 16705682; PMCID: PMC2570641.
287. Kim EJ, Pellman B, Kim JJ. Stress effects on the hippocampus: a critical review. *Learn Mem*. 2015 Aug 18;22(9):411-6. doi: 10.1101/lm.037291.114. PMID: 26286651; PMCID: PMC4561403.
288. Kim Y, Kim K, Chartier KG, Wike TL, McDonald SE. Adverse childhood experience patterns, major depressive disorder, and substance use disorder in older adults. *Aging Ment Health*. 2021 Mar;25(3):484-491. doi: 10.1080/13607863.2019.1693974. Epub 2019 Nov 26. PMID: 31769297.
289. Kim YE, Jeon BS. Clinical implication of REM sleep behavior disorder in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*. 2014;4(2):237-44. doi: 10.3233/JPD-130293. PMID: 24613864.
290. Kino T. Stress, glucocorticoid hormones, and hippocampal neural progenitor cells: implications to mood disorders. *Front Physiol*. 2015 Aug 19;6:230. doi: 10.3389/fphys.2015.00230. PMID: 26347657; PMCID: PMC4541029.
291. Kiss A, Majercikova Z. Repeated asenapine treatment does not participate in the mild stress induced FosB/ $\Delta$ FosB expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus neurons. *Neuropeptides*. 2017 Feb;61:57-65. doi: 10.1016/j.npep.2016.10.003. Epub 2016 Oct 15. PMID: 27756486.
292. Klampfl SM, Schramm MM, Gaßner BM, Hübner K, Seasholtz AF, Brunton PJ, Bayerl DS, Bosch OJ. Maternal stress and the MPOA: Activation of CRF receptor 1 impairs maternal behavior and triggers local oxytocin release in lactating rats. *Neuropharmacology*. 2018 May 1;133:440-450. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.02.019. Epub 2018 Mar 2. PMID: 29477300; PMCID: PMC5869057.
293. Koenig JI, Walker CD, Romeo RD, Lupien SJ. Effects of stress across the lifespan. *Stress*. 2011 Sep;14(5):475-80. doi: 10.3109/10253890.2011.604879. PMID: 21848435.
294. Koenig S, Bredehöft J, Perniss A, Fuchs F, Roth J, Rummel C. Age Dependent Hypothalamic and Pituitary Responses to Novel Environment Stress or Lipopolysaccharide in Rats. *Front Behav Neurosci*. 2018 Mar 19;12:55. doi: 10.3389/fnbeh.2018.00055. PMID: 29615881; PMCID: PMC5868128.
295. Koenigs M, Grafman J. The functional neuroanatomy of depression: distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex. *Behav Brain Res*. 2009 Aug 12;201(2):239-43. doi: 10.1016/j.bbr.2009.03.004. Epub 2009 Mar 17. PMID: 19428640; PMCID: PMC2680780.
296. Komoly S., Palkovits M. *Gyakorlati neurológia és neuroanatómia* p. 189-198. 2018 ISBN: 978963226681 7
297. Konkoly J, Kormos V, Gaszner B, Sándor Z, Kecskés A, Alomari A, Szilágyi A, Szilágyi B, Zelena D, Pintér E. The Role of TRPA1 Channels in the Central Processing of Odours Contributing to the Behavioural Responses of Mice. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Dec 20;14(12):1336. doi: 10.3390/ph14121336. PMID: 34959735; PMCID: PMC8703823.
298. Koo JW, Chaudhury D, Han MH, Nestler EJ. Role of Mesolimbic Brain-Derived Neurotrophic Factor in Depression. *Biol Psychiatry*. 2019 Nov 15;86(10):738-748. doi: 10.1016/j.biopsych.2019.05.020. Epub 2019 Jun 4. PMID: 31327473; PMCID: PMC6814503.
299. Kormos V, Gáspár L, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, Balogh A, Hashimoto H, Reglődi D, Helyes Z, Gaszner B. Reduced response to chronic mild stress in PACAP mutant mice is associated with blunted FosB expression in limbic forebrain and brainstem centers. *Neuroscience*. 2016 Aug 25;330:335-58. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.06.004. Epub 2016 Jun 6. PMID: 27282087.
300. Kormos V, Gaszner B. Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. *Neuropeptides*. 2013 Dec;47(6):401-19. doi: 10.1016/j.npep.2013.10.014. Epub 2013 Oct 24. PMID: 24210138.
301. Kormos V, Kecskés A, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, Alomari A, Hegedüs D, Renner É, Palkovits M, Zelena D, Helyes Z, Pintér E, Gaszner B. Peptidergic neurons of the Edinger-Westphal nucleus express TRPA1 ion channel that is downregulated both upon chronic variable mild stress in male mice and in humans who died

- by suicide. *J Psychiatry Neurosci.* 2022 May 4;47(3):E162-E175. doi: 10.1503/jpn.210187. PMID: 35508327; PMCID: PMC9074809.
302. Kormos V. Hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid génhiányos egerek stresszadaptációs rendszereinek vizsgálata akut és krónikus modellekben 2018. PhD értekezés <https://pea.lib.pte.hu/handle/pea/23344>
303. Korosi A, Kozicz T, Richter J, Veening JG, Olivier B, Roubos EW. Corticotropin-releasing factor, urocortin 1, and their receptors in the mouse spinal cord. *J Comp Neurol.* 2007 Jun 20;502(6):973-89. doi: 10.1002/cne.21347. PMID: 17444496.
304. Korosi A, Schotanus S, Olivier B, Roubos EW, Kozicz T. Chronic ether stress-induced response of urocortin 1 neurons in the Edinger-Westphal nucleus in the mouse. *Brain Res.* 2005 Jun 7;1046(1-2):172-9. doi: 10.1016/j.brainres.2005.04.012. PMID: 15885665.
305. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007 Feb 23;128(4):693-705. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005. PMID: 17320507.
306. Kovács KJ, Arias C, Sawchenko PE. Protein synthesis blockade differentially affects the stress-induced transcriptional activation of neuropeptide genes in parvocellular neurosecretory neurons. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998 Feb;54(1):85-91. doi: 10.1016/s0169-328x(97)00324-0. PMID: 9526053.
307. Kovács KJ. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int.* 1998 Oct;33(4):287-97. doi: 10.1016/s0197-0186(98)00023-0. PMID: 9840219.
308. Kovács KJ. CRH: the link between hormonal-, metabolic- and behavioral responses to stress. *J Chem Neuroanat.* 2013 Dec;54:25-33. doi: 10.1016/j.jchemneu.2013.05.003. Epub 2013 Jun 15. PMID: 23774011.
309. Kovács KJ. Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J Neuroendocrinol.* 2008 Jun;20(6):665-72. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01734.x. PMID: 18601687.
310. Kovács LÁ, Berta G, Csernus V, Ujvári B, Füredi N, Gaszner B. Corticotropin-Releasing Factor-Producing Cells in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus and Extended Amygdala Show Age-Dependent FOS and FOSB/DeltaFOSB Immunoreactivity in Acute and Chronic Stress Models in the Rat. *Front Aging Neurosci.* 2019 Oct 9;11:274. doi: 10.3389/fnagi.2019.00274. PMID: 31649527; PMCID: PMC6794369.
311. Kovács LÁ, Füredi N, Ujvári B, Golgol A, Gaszner B. Age-Dependent FOSB/ $\Delta$ FOSB Response to Acute and Chronic Stress in the Extended Amygdala, Hypothalamic Paraventricular, Habenular, Centrally-Projecting Edinger-Westphal, and Dorsal Raphe Nuclei in Male Rats. *Front Aging Neurosci.* 2022 May 3;14:862098. doi: 10.3389/fnagi.2022.862098. PMID: 35592695; PMCID: PMC9110804.
312. Kovács LÁ, Schiessl JA, Nafz AE, Csernus V, Gaszner B. Both Basal and Acute Restraint Stress-Induced c-Fos Expression Is Influenced by Age in the Extended Amygdala and Brainstem Stress Centers in Male Rats. *Front Aging Neurosci.* 2018 Aug 22;10:248. doi: 10.3389/fnagi.2018.00248. PMID: 30186150; PMCID: PMC6113579.
313. Kovács LÁ: Limbikus és középagy stressz-asszociált magok korfüggő aktivitásának vizsgálata az akut és krónikus stressz patkánymodelljében 2020. PhD értekezés <https://pea.lib.pte.hu/handle/pea/24088>
314. Kozicz T, Bordewin LA, Czéh B, Fuchs E, Roubos EW. Chronic psychosocial stress affects corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus and central extended amygdala as well as urocortin 1 in the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus of the tree shrew. *Psychoneuroendocrinology.* 2008 Jul;33(6):741-54. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.02.012. Epub 2008 Apr 3. PMID: 18394812.
315. Kozicz T, Li M, Arimura A. The activation of urocortin immunoreactive neurons in the Einger-Westphal nucleus following stress in rats. *Stress.* 2001 Jun;4(2):85-90. doi: 10.3109/10253890109115724. PMID: 22432129.
316. Kozicz T, Tilburg-Ouwens D, Faludi G, Palkovits M, Roubos E. Gender-related urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor expression in the adult human midbrain of suicide victims with major depression. *Neuroscience.* 2008 Apr 9;152(4):1015-23. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.12.050. Epub 2008 Jan 18. PMID: 18329817.
317. Kozicz T, Vigh S, Arimura A. Axon terminals containing PACAP- and VIP-immunoreactivity form synapses with CRF-immunoreactive neurons in the dorsolateral division of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *Brain Res.* 1997 Aug 29;767(1):109-19. doi: 10.1016/s0006-8993(97)00737-3. PMID: 9365022.
318. Kozicz T, Yanaihara H, Arimura A. Distribution of urocortin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol.* 1998 Feb 2;391(1):1-10. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19980202)391:1<1::aid-cne1>3.0.co;2-6. PMID: 9527535.

319. Kozicz T. Met-enkephalin immunoreactive neurons recruited by acute stress are innervated by axon terminals immunopositive for tyrosine hydroxylase and dopamine- $\alpha$ -hydroxylase in the anterolateral division of bed nuclei of the stria terminalis in the rat. *Eur J Neurosci*. 2002 Sep;16(5):823-35. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02129.x. PMID: 12372018.
320. Kozicz T. The missing link; the significance of urocortin 1/urocortin 2 in the modulation of the dorsal raphe serotonergic system. *Mol Psychiatry*. 2010 Apr;15(4):340-1. doi: 10.1038/mp.2009.134. Epub 2009 Dec 15. PMID: 20010891.
321. Kozicz T, Bittencourt JC, May PJ, Reiner A, Gamlin PD, Palkovits M, Horn AK, Toledo CA, Ryabinin AE. The Edinger-Westphal nucleus: a historical, structural, and functional perspective on a dichotomous terminology. *J Comp Neurol*. 2011 Jun 1;519(8):1413-34. doi: 10.1002/cne.22580. PMID: 21452224; PMCID: PMC3675228.
322. Kozicz T, Korosi A, Korsman C, Tilburg-Ouwens D, Groenink L, Veening J, van Der Gugten J, Roubos E, Olivier B. Urocortin expression in the Edinger-Westphal nucleus is down-regulated in transgenic mice over-expressing neuronal corticotropin-releasing factor. *Neuroscience*. 2004;123(3):589-94. doi: 10.1016/j.neuroscience.2003.10.042. PMID: 14706771.
323. Kozicz T, Sterrenburg L, Xu L. Does midbrain urocortin 1 matter? A 15-year journey from stress (mal)adaptation to energy metabolism. *Stress*. 2011 Jul;14(4):376-83. doi: 10.3109/10253890.2011.563806. Epub 2011 Mar 27. PMID: 21438786.
324. Köves K, Görcs TJ, Kausz M, Arimura A. Present status of knowledge about the distribution and colocalization of PACAP in the forebrain. *Acta Biol Hung*. 1994;45(2-4):297-321. PMID: 7725824.
325. Kravets JL, Reyes BA, Unterwald EM, Van Bockstaele EJ. Direct targeting of peptidergic amygdalar neurons by noradrenergic afferents: linking stress-integrative circuitry. *Brain Struct Funct*. 2015 Jan;220(1):541-58. doi: 10.1007/s00429-013-0674-8. Epub 2013 Nov 23. PMID: 24271021; PMCID: PMC4032379.
326. Kudryavtseva NN, Bakshtanovskaya IV, Koryakina LA. Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991 Feb;38(2):315-20. doi: 10.1016/0091-3057(91)90284-9. PMID: 2057501.
327. Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays*. 1998 Aug;20(8):615-26. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199808)20:8<615::AID-BIES4>3.0.CO;2-H. PMID: 9780836.
328. Kwon MS, Seo YJ, Shim EJ, Choi SS, Lee JY, Suh HW. The effect of single or repeated restraint stress on several signal molecules in paraventricular nucleus, arcuate nucleus and locus coeruleus. *Neuroscience*. 2006 Nov 3;142(4):1281-92. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.07.027. Epub 2006 Aug 28. PMID: 16938401.
329. Labib AY, Ammar RM, El-Naga RN, El-Bahy AAZ, Tadros MG, Michel HE. Mechanistic insights into the protective effect of paracetamol against rotenone-induced Parkinson's disease in rats: Possible role of endocannabinoid system modulation. *Int Immunopharmacol*. 2021 May;94:107431. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107431. Epub 2021 Feb 9. PMID: 33578261.
330. Lacerda-Pinheiro SF, Pinheiro Junior RF, Pereira de Lima MA, Lima da Silva CG, Vieira dos Santos Mdo S, Teixeira Júnior AG, Lima de Oliveira PN, Ribeiro KD, Rolim-Neto ML, Bianco BA. Are there depression and anxiety genetic markers and mutations? A systematic review. *J Affect Disord*. 2014 Oct;168:387-98. doi: 10.1016/j.jad.2014.07.016. Epub 2014 Jul 22. PMID: 25106036.
331. Laine MA, Sokolowska E, Dudek M, Callan SA, Hyytiä P, Hovatta I. Brain activation induced by chronic psychosocial stress in mice. *Sci Rep*. 2017 Nov 8;7(1):15061. doi: 10.1038/s41598-017-15422-5. PMID: 29118417; PMCID: PMC5678090.
332. Lam DD, Garfield AS, Marston OJ, Shaw J, Heisler LK. Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacol Biochem Behav*. 2010 Nov;97(1):84-91. doi: 10.1016/j.pbb.2010.09.003. Epub 2010 Sep 17. PMID: 20837046.
333. Lammel S, Lim BK, Ran C, Huang KW, Betley MJ, Tye KM, Deisseroth K, Malenka RC. Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature*. 2012 Nov 8;491(7423):212-7. doi: 10.1038/nature11527. Epub 2012 Oct 14. PMID: 23064228; PMCID: PMC3493743.
334. Lange UC, Schneider R. What an epigenome remembers. *Bioessays*. 2010 Aug;32(8):659-68. doi: 10.1002/bies.201000030. PMID: 20658704.
335. Larsen PJ, Hay-Schmidt A, Vrang N, Mikkelsen JD. Origin of projections from the midbrain raphe nuclei to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat: a combined retrograde and anterograde tracing study. *Neuroscience*. 1996 Feb;70(4):963-88. doi: 10.1016/0306-4522(95)00415-7. PMID: 8848177.

336. Le Moëne O, Stavarache M, Ogawa S, Musatov S, Ågmo A. Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the central amygdala and the ventromedial nucleus of the hypothalamus: Sociosexual behaviors, fear and arousal in female rats during emotionally challenging events. *Behav Brain Res.* 2019 Jul 23;367:128-142. doi: 10.1016/j.bbr.2019.03.045. Epub 2019 Mar 27. PMID: 30928462.
337. LeDoux J. The amygdala. *Curr Biol.* 2007 Oct 23;17(20):R868-74. doi: 10.1016/j.cub.2007.08.005. PMID: 17956742.
338. Lee HS, Eum YJ, Jo SM, Waterhouse BD. Projection patterns from the amygdaloid nuclear complex to subdivisions of the dorsal raphe nucleus in the rat. *Brain Res.* 2007 Apr 27;1143:116-25. doi: 10.1016/j.brainres.2007.01.081. Epub 2007 Jan 28. PMID: 17320060.
339. Lehmann ML, Herkenham M. Environmental enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway. *J Neurosci.* 2011 Apr 20;31(16):6159-73. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0577-11.2011. PMID: 21508240; PMCID: PMC3094574.
340. Lehmann ML, Mustafa T, Eiden AM, Herkenham M, Eiden LE. PACAP-deficient mice show attenuated corticosterone secretion and fail to develop depressive behavior during chronic social defeat stress. *Psychoneuroendocrinology.* 2013 May;38(5):702-15. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.09.006. Epub 2012 Oct 11. PMID: 23062748; PMCID: PMC3652373.
341. Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen TM, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, Desaki AL, Desta T, Diep E, Dolbeare TA, Donelan MJ, Dong HW, Dougherty JG, Duncan BJ, Ebbert AJ, Eichele G, Estin LK, Faber C, Facer BA, Fields R, Fischer SR, Fliss TP, Frensley C, Gates SN, Glattfelder KJ, Halverson KR, Hart MR, Hohmann JG, Howell MP, Jeung DP, Johnson RA, Karr PT, Kawal R, Kidney JM, Knapik RH, Kuan CL, Lake JH, Laramée AR, Larsen KD, Lau C, Lemon TA, Liang AJ, Liu Y, Luong LT, Michaels J, Morgan JJ, Morgan RJ, Mortrud MT, Mosqueda NF, Ng LL, Ng R, Orta GJ, Overly CC, Pak TH, Parry SE, Pathak SD, Pearson OC, Puchalski RB, Riley ZL, Rockett HR, Rowland SA, Royall JJ, Ruiz MJ, Sarno NR, Schaffnit K, Shapovalova NV, Sivisay T, Slaughterbeck CR, Smith SC, Smith KA, Smith BI, Sodt AJ, Stewart NN, Stumpf KR, Sunkin SM, Sutram M, Tam A, Teemer CD, Thaller C, Thompson CL, Varnam LR, Visel A, Whitlock RM, Wohnoutka PE, Wolkey CK, Wong VY, Wood M, Yaylaoglu MB, Young RC, Youngstrom BL, Yuan XF, Zhang B, Zwingman TA, Jones AR. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature.* 2007 Jan 11;445(7124):168-76. doi: 10.1038/nature05453. Epub 2006 Dec 6. PMID: 17151600.
342. Levine A, Worrell TR, Zimnisky R, Schmauss C. Early life stress triggers sustained changes in histone deacetylase expression and histone H4 modifications that alter responsiveness to adolescent antidepressant treatment. *Neurobiol Dis.* 2012 Jan;45(1):488-98. doi: 10.1016/j.nbd.2011.09.005. Epub 2011 Sep 21. PMID: 21964251; PMCID: PMC3225638.
343. Levine S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Nov 30;746:275-88; discussion 289-93. doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb39245.x. PMID: 7825883.
344. Levine S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology.* 2005 Nov;30(10):939-46. doi: 10.1016/j.psyneuen.2005.03.013. PMID: 15958281.
345. Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C, Vaughan J, Reyes TM, Gulyas J, Fischer W, Bilezikjian L, Rivier J, Sawchenko PE, Vale WW. Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jun 19;98(13):7570-5. doi: 10.1073/pnas.121165198. PMID: 11416224; PMCID: PMC34709.
346. Li M, D'Arcy C, Meng X. Maltreatment in childhood substantially increases the risk of adult depression and anxiety in prospective cohort studies: systematic review, meta-analysis, and proportional attributable fractions. *Psychol Med.* 2016 Mar;46(4):717-30. doi: 10.1017/S0033291715002743. Epub 2015 Dec 28. PMID: 26708271.
347. Liddle RA. Parkinson's disease from the gut. *Brain Res.* 2018 Aug 15;1693(Pt B):201-206. doi: 10.1016/j.brainres.2018.01.010. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29360467; PMCID: PMC6003841.
348. Lind MJ, Marraccini ME, Sheerin CM, Bountress K, Bacanu SA, Amstadter AB, Nugent NR. Association of Posttraumatic Stress Disorder With rs2267735 in the ADCYAP1R1 Gene: A Meta-Analysis. *J Trauma Stress.* 2017 Aug;30(4):389-398. doi: 10.1002/jts.22211. Epub 2017 Jul 26. PMID: 28746747; PMCID: PMC5706560.

349. Lippmann M, Bress A, Nemeroff CB, Plotsky PM, Monteggia LM. Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *Eur J Neurosci*. 2007 May;25(10):3091-8. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05522.x. PMID: 17561822.
350. Liu H, Kishi T, Roseberry AG, Cai X, Lee CE, Montez JM, Friedman JM, Elmquist JK. Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter. *J Neurosci*. 2003 Aug 6;23(18):7143-54. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-18-07143.2003. PMID: 12904474; PMCID: PMC6740648.
351. Liu J, Yang X, Yu S, Zheng R. The Leptin Signaling. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1090:123-144. doi: 10.1007/978-981-13-1286-1\_7. PMID: 30390288.
352. Liu MY, Yin CY, Zhu LJ, Zhu XH, Xu C, Luo CX, Chen H, Zhu DY, Zhou QG. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nat Protoc*. 2018b Jul PMID: 29988104
353. Liu W, Ge T, Leng Y, Pan Z, Fan J, Yang W, Cui R. The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex. *Neural Plast*. 2017;2017:6871089. doi: 10.1155/2017/6871089. Epub 2017 Jan 26. PMID: 28246558; PMCID: PMC5299163.
354. Loewy AD, Saper CB. Edinger-Westphal nucleus: projections to the brain stem and spinal cord in the cat. *Brain Res*. 1978 Jul 7;150(1):1-27. doi: 10.1016/0006-8993(78)90650-9. PMID: 78743.
355. Lowry CA, Hale MW, Evans AK, Heerkens J, Staub DR, Gasser PJ, Shekhar A. Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Dec;1148:86-94. doi: 10.1196/annals.1410.004. PMID: 19120094.
356. Luo M, Li Y, Zhong W. Do dorsal raphe 5-HT neurons encode "beneficialness"? *Neurobiol Learn Mem*. 2016 Nov;135:40-49. doi: 10.1016/j.nlm.2016.08.008. Epub 2016 Aug 18. PMID: 27544850.
357. Lupien SJ, Fiocco A, Wan N, Maheu F, Lord C, Schramek T, Tu MT. Stress hormones and human memory function across the lifespan. *Psychoneuroendocrinology*. 2005 Apr;30(3):225-42. doi: 10.1016/j.psyneuen.2004.08.003. PMID: 15511597.
358. Lutfy K, Shankar G. Emerging evidence for the role of pituitary adenylate cyclase-activating peptide in neuropsychiatric disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2019;167:143-157. doi: 10.1016/bs.pmbts.2019.06.009. Epub 2019 Jul 11. PMID: 31601402.
359. Ma QP, Yin GF, Ai MK, Han JS. Serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the amygdala in the rat. *Neurosci Lett*. 1991 Dec 16;134(1):21-4. doi: 10.1016/0304-3940(91)90499-j. PMID: 1815148.
360. MacLeod G, Bozek DA, Rajakulendran N, Monteiro V, Ahmadi M, Steinhart Z, Kushida MM, Yu H, Coutinho FJ, Cavalli FMG, Restall I, Hao X, Hart T, Luchman HA, Weiss S, Dirks PB, Angers S. Genome-Wide CRISPR-Cas9 Screens Expose Genetic Vulnerabilities and Mechanisms of Temozolomide Sensitivity in Glioblastoma Stem Cells. *Cell Rep*. 2019 Apr 16;27(3):971-986.e9. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.047. PMID: 30995489.
361. MacQueen GM, Ramakrishnan K, Ratnasingan R, Chen B, Young LT. Desipramine treatment reduces the long-term behavioural and neurochemical sequelae of early-life maternal separation. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2003 Dec;6(4):391-6. doi: 10.1017/S1461145703003729. PMID: 14641986.
362. Makino S, Shibasaki T, Yamauchi N, Nishioka T, Mimoto T, Wakabayashi I, Gold PW, Hashimoto K. Psychological stress increased corticotropin-releasing hormone mRNA and content in the central nucleus of the amygdala but not in the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Brain Res*. 1999 Dec 11;850(1-2):136-43. doi: 10.1016/s0006-8993(99)02114-9. PMID: 10629757.
363. Malkoski SP, Dorin RI. Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene. *Mol Endocrinol*. 1999 Oct;13(10):1629-44. doi: 10.1210/mend.13.10.0351. PMID: 10517666.
364. Masi G, Brovedani P. The hippocampus, neurotrophic factors and depression: possible implications for the pharmacotherapy of depression. *CNS Drugs*. 2011 Nov 1;25(11):913-31. doi: 10.2165/11595900-000000000-00000. PMID: 22054117.
365. Mayberg HS, Liotti M, Brannan SK, McGinnis S, Mahurin RK, Jerabek PA, Silva JA, Tekell JL, Martin CC, Lancaster JL, Fox PT. Reciprocal limbic-cortical function and negative mood: converging PET findings in depression and normal sadness. *Am J Psychiatry*. 1999 May;156(5):675-82. doi: 10.1176/ajp.156.5.675. PMID: 10327898.
366. Mayberg HS, Lozano AM, Voon V, McNeely HE, Seminowicz D, Hamani C, Schwab JM, Kennedy SH. Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Neuron*. 2005 Mar 3;45(5):651-60. doi: 10.1016/j.neuron.2005.02.014. PMID: 15748841.

367. McCall JG, Al-Hasani R, Siuda ER, Hong DY, Norris AJ, Ford CP, Bruchas MR. CRH Engagement of the Locus Coeruleus Noradrenergic System Mediates Stress-Induced Anxiety. *Neuron*. 2015 Aug 5;87(3):605-20. doi: 10.1016/j.neuron.2015.07.002. Epub 2015 Jul 23. PMID: 26212712; PMCID: PMC4529361.
368. McCormick CM, Mathews IZ, Thomas C, Waters P. Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. *Brain Cogn*. 2010 Feb;72(1):73-85. doi: 10.1016/j.bandc.2009.06.003. Epub 2009 Jul 17. PMID: 19616355.
369. McCutcheon JE, Marinelli M. Age matters. *Eur J Neurosci*. 2009 Mar;29(5):997-1014. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06648.x. PMID: 19291226; PMCID: PMC2761206.
370. McDonald AJ, Mascagni F. Projections of the lateral entorhinal cortex to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience*. 1997 Mar;77(2):445-59. doi: 10.1016/s0306-4522(96)00478-2. PMID: 9472403.
371. McEvoy PM, Grove R, Slade T. Epidemiology of anxiety disorders in the Australian general population: findings of the 2007 Australian National Survey of Mental Health and Wellbeing. *Aust N Z J Psychiatry*. 2011 Nov;45(11):957-67. doi: 10.3109/00048674.2011.624083. PMID: 22044173.
372. McEwen BS, Bowles NP, Gray JD, Hill MN, Hunter RG, Karatsoreos IN, Nasca C. Mechanisms of stress in the brain. *Nat Neurosci*. 2015 Oct;18(10):1353-63. doi: 10.1038/nn.4086. Epub 2015 Sep 25. PMID: 26404710; PMCID: PMC4933289.
373. McEwen BS, Gianaros PJ. Central role of the brain in stress and adaptation: links to socioeconomic status, health, and disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Feb;1186:190-222. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05331.x. PMID: 20201874; PMCID: PMC2864527.
374. McEwen BS. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci*. 1998 May 1;840:33-44. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09546.x. PMID: 9629234.
375. McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res*. 2000 Dec 15;886(1-2):172-189. doi: 10.1016/s0006-8993(00)02950-4. PMID: 11119695.
376. McEwen BS. Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol Aging*. 2002 Sep-Oct;23(5):921-39. doi: 10.1016/s0197-4580(02)00027-1. PMID: 12392796.
377. McGuffin P, Rijdsdijk F, Andrew M, Sham P, Katz R, Cardno A. The heritability of bipolar affective disorder and the genetic relationship to unipolar depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2003 May;60(5):497-502. doi: 10.1001/archpsyc.60.5.497. PMID: 12742871.
378. McHugh RK, Weiss RD. Alcohol Use Disorder and Depressive Disorders. *Alcohol Res*. 2019 Jan 1;40(1):arcr.v40.1.01. doi: 10.35946/arcr.v40.1.01. PMID: 31649834; PMCID: PMC6799954.
379. McKlveen JM, Myers B, Herman JP. The medial prefrontal cortex: coordinator of autonomic, neuroendocrine and behavioural responses to stress. *J Neuroendocrinol*. 2015 Jun;27(6):446-56. doi: 10.1111/jne.12272. PMID: 25737097; PMCID: PMC4580281.
380. McQuaid RJ, McInnis OA, Abizaid A, Anisman H. Making room for oxytocin in understanding depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014 Sep;45:305-22. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.07.005. Epub 2014 Jul 12. PMID: 25025656.
381. Merali Z, Du L, Hrdina P, Palkovits M, Faludi G, Poulter MO, Anisman H. Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region. *J Neurosci*. 2004 Feb 11;24(6):1478-85. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4734-03.2004. PMID: 14960621; PMCID: PMC6730322.
382. Merali Z, Kent P, Du L, Hrdina P, Palkovits M, Faludi G, Poulter MO, Bédard T, Anisman H. Corticotropin-releasing hormone, arginine vasopressin, gastrin-releasing peptide, and neuromedin B alterations in stress-relevant brain regions of suicides and control subjects. *Biol Psychiatry*. 2006 Apr 1;59(7):594-602. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.08.008. Epub 2005 Sep 28. PMID: 16197926.
383. Merschbaecher K, Hatko L, Folz J, Mueller U. Inhibition of different histone acetyltransferases (HATs) uncovers transcription-dependent and -independent acetylation-mediated mechanisms in memory formation. *Learn Mem*. 2016 Jan 15;23(2):83-9. doi: 10.1101/lm.039438.115. PMID: 26773101; PMCID: PMC4749833.
384. Meyza KZ, Boguszewski PM, Nikolaev E, Zagrodzka J. The effect of age on the dynamics and the level of c-Fos activation in response to acute restraint in Lewis rats. *Behav Brain Res*. 2007 Jun 18;180(2):183-9. doi: 10.1016/j.bbr.2007.03.007. Epub 2007 Mar 14. PMID: 17452054.



385. Mill J, Petronis A. Molecular studies of major depressive disorder: the epigenetic perspective. *Mol Psychiatry*. 2007 Sep;12(9):799-814. doi: 10.1038/sj.mp.4001992. Epub 2007 Apr 10. PMID: 17420765.
386. Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, Devon RS, St Clair DM, Muir WJ, Blackwood DH, Porteous DJ. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet*. 2000 May 22;9(9):1415-23. doi: 10.1093/hmg/9.9.1415. PMID: 10814723.
387. Mirescu C, Peters JD, Gould E. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat Neurosci*. 2004 Aug;7(8):841-6. doi: 10.1038/nn1290. Epub 2004 Jul 25. PMID: 15273691.
388. Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Oct 16;164(1):567-74. doi: 10.1016/0006-291x(89)91757-9. PMID: 2803320.
389. Miyata A, Jiang L, Dahl RD, Kitada C, Kubo K, Fujino M, Minamino N, Arimura A. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Jul 31;170(2):643-8. doi: 10.1016/0006-291x(90)92140-u. PMID: 2383262.
390. Molendijk ML, de Kloet ER. Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. *Psychoneuroendocrinology*. 2015 Dec;62:389-91. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.08.028. Epub 2015 Sep 2. PMID: 26386543.
391. Montaron MF, Drapeau E, Dupret D, Kitchener P, Arousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory. *Neurobiol Aging*. 2006 Apr;27(4):645-54. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.02.014. Epub 2005 Jun 13. PMID: 15953661.
392. Monteiro S, Roque S, de Sá-Calçada D, Sousa N, Correia-Neves M, Cerqueira JJ. An efficient chronic unpredictable stress protocol to induce stress-related responses in C57BL/6 mice. *Front Psychiatry*. 2015 Feb 2;6:6. doi: 10.3389/fpsy.2015.00006. PMID: 25698978; PMCID: PMC4313595.
393. Mulinari S. Monoamine theories of depression: historical impact on biomedical research. *J Hist Neurosci*. 2012;21(4):366-92. doi: 10.1080/0964704X.2011.623917. PMID: 22947380.
394. Mullins N, Lewis CM. Genetics of Depression: Progress at Last. *Curr Psychiatry Rep*. 2017 Aug;19(8):43. doi: 10.1007/s11920-017-0803-9. PMID: 28608123; PMCID: PMC5486596.
395. Mustafa T, Jiang SZ, Eiden AM, Weihe E, Thistlethwaite I, Eiden LE. Impact of PACAP and PAC1 receptor deficiency on the neurochemical and behavioral effects of acute and chronic restraint stress in male C57BL/6 mice. *Stress*. 2015;18(4):408-18. doi: 10.3109/10253890.2015.1025044. Epub 2015 Sep 4. PMID: 25853791; PMCID: PMC4834918.
396. Myers B, Scheimann JR, Franco-Villanueva A, Herman JP. Ascending mechanisms of stress integration: Implications for brainstem regulation of neuroendocrine and behavioral stress responses. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017 Mar;74(Pt B):366-375. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.05.011. Epub 2016 May 18. PMID: 27208411; PMCID: PMC5115997.
397. NCT04133233 <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04133233>
398. Nemeroff CB, Widerlöv E, Bissette G, Walléus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science*. 1984 Dec 14;226(4680):1342-4. doi: 10.1126/science.6334362. PMID: 6334362.
399. Nemes B, Bölcskei K, Kecskés A, Kormos V, Gaszner B, Aczél T, Hegedüs D, Pintér E, Helyes Z, Sándor Z. Human Somatostatin SST4 Receptor Transgenic Mice: Construction and Brain Expression Pattern Characterization. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 4;22(7):3758. doi: 10.3390/ijms22073758. PMID: 33916620; PMCID: PMC8038480.
400. Nestler EJ, Carlezon WA Jr. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry*. 2006 Jun 15;59(12):1151-9. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.09.018. Epub 2006 Mar 29. PMID: 16566899.
401. Nestler EJ, Kelz MB, Chen J. DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. *Brain Res*. 1999 Jul 17;835(1):10-7. doi: 10.1016/s0006-8993(98)01191-3. PMID: 10448191.
402. Nestler EJ. Review. Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2008 Oct 12;363(1507):3245-55. doi: 10.1098/rstb.2008.0067. PMID: 18640924; PMCID: PMC2607320.
403. Nestler EJ.  $\Delta$ FosB: a transcriptional regulator of stress and antidepressant responses. *Eur J Pharmacol*. 2015 Apr 15;753:66-72. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.10.034. Epub 2014 Nov 7. PMID: 25446562; PMCID: PMC4380559.

404. Nestler EJ. Epigenetics: Stress makes its molecular mark. *Nature*. 2012 Oct 11;490(7419):171-2. doi: 10.1038/490171a. PMID: 23060173; PMCID: PMC4858713.
405. Nettles KW, Pesold C, Goldman MB. Influence of the ventral hippocampal formation on plasma vasopressin, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and behavioral responses to novel acoustic stress. *Brain Res*. 2000 Mar 6;858(1):181-90. doi: 10.1016/s0006-8993(99)02281-7. PMID: 10700613.
406. Neufeld-Cohen A, Evans AK, Getselter D, Spyroglou A, Hill A, Gil S, Tsoory M, Beuschlein F, Lowry CA, Vale W, Chen A. Urocortin-1 and -2 double-deficient mice show robust anxiolytic phenotype and modified serotonergic activity in anxiety circuits. *Mol Psychiatry*. 2010 Apr;15(4):426-41, 339. doi: 10.1038/mp.2009.115. Epub 2009 Nov 3. Erratum in: *Mol Psychiatry*. 2010 Apr;15(4):442. PMID: 19884890.
407. Neufeld-Cohen A, Tsoory MM, Evans AK, Getselter D, Gil S, Lowry CA, Vale WW, Chen A. A triple urocortin knockout mouse model reveals an essential role for urocortins in stress recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Nov 2;107(44):19020-5. doi: 10.1073/pnas.1013761107. Epub 2010 Oct 11. PMID: 20937857; PMCID: PMC2973872.
408. Ng RK, Gurdon JB. Epigenetic inheritance of cell differentiation status. *Cell Cycle*. 2008 May 1;7(9):1173-7. doi: 10.4161/cc.7.9.5791. Epub 2008 Feb 19. PMID: 18418041.
409. Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T. Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. *Front Neurosci*. 2014 Jun 17;8:166. doi: 10.3389/fnins.2014.00166. PMID: 24987328; PMCID: PMC4060417.
410. Niswender KD, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*. 2004 Oct;15(8):362-9. doi: 10.1016/j.tem.2004.07.009. PMID: 15380807.
411. Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG Jr, Schwartz MW. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature*. 2001 Oct 25;413(6858):794-5. doi: 10.1038/35101657. PMID: 11677594.
412. Njung'e K, Handley SL. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991 Jan;38(1):63-7. doi: 10.1016/0091-3057(91)90590-x. PMID: 2017455.
413. Norrholm SD, Das M, Légrádi G. Behavioral effects of local microinfusion of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) into the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). *Regul Pept*. 2005 May 15;128(1):33-41. doi: 10.1016/j.regpep.2004.12.023. PMID: 15721485; PMCID: PMC1950325.
414. Obeso JA, Stamelou M, Goetz CG, Zhu W, Lang AE, Weintraub D, Burn D, Halliday GM, Bezaud E, Przedborski S, Lehericy S, Brooks DJ, Rothwell JC, Hallett M, DeLong MR, Marras C, Tanner CM, Ross GW, Langston JW, Klein C, Bonifati V, Jankovic J, Lozano AM, Deuschl G, Bergman H, Tolosa E, Rodriguez-Violante M, Fahn S, Postuma RB, Berg D, Marek K, Standaert DG, Surmeier DJ, Olanow CW, Kordower JH, Calabresi P, Schapira AHV, Stoessl AJ. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Mov Disord*. 2017 Sep;32(9):1264-1310. doi: 10.1002/mds.27115. PMID: 28887905; PMCID: PMC5685546.
415. Ohata H, Suzuki K, Oki Y, Shibasaki T. Urocortin in the ventromedial hypothalamic nucleus acts as an inhibitor of feeding behavior in rats. *Brain Res*. 2000 Apr 7;861(1):1-7. doi: 10.1016/s0006-8993(99)02378-1. PMID: 10751559.
416. Okamura N, Hashimoto K, Iyo M, Shimizu E, Dempfle A, Friedel S, Reinscheid RK. Gender-specific association of a functional coding polymorphism in the Neuropeptide S receptor gene with panic disorder but not with schizophrenia or attention-deficit/hyperactivity disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007 Oct 1;31(7):1444-8. doi: 10.1016/j.pnpbp.2007.06.026. Epub 2007 Jul 3. PMID: 17669576.
417. Okere, B., Xu, L., Roubos, E.W., Sonetti, D., Kozicz, T., 2010. Restraint stress alters the secretory activity of neurons co-expressing urocortin-1, cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and nesfatin-1 in the mouse Edinger-Westphal nucleus. *Brain Res*. 1317, 92-99.
418. Olah E, Rumbus Z, Kormos V, Tekus V, Pakai E, Wilson HV, Fekete K, Solymar M, Kelava L, Keringer P, Gaszner B, Whiteman M, Keeble J, Pinter E, Garami A. The Hypothermic Effect of Hydrogen Sulfide Is Mediated by the Transient Receptor Potential Ankyrin-1 Channel in Mice. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Sep 29;14(10):992. doi: 10.3390/ph14100992. PMID: 34681216; PMCID: PMC8538668.
419. Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science*. 1997 Oct 3;278(5335):135-8. doi: 10.1126/science.278.5335.135. Erratum in: *Science* 1998 Sep 11;281(5383):1615. PMID: 9311920.

420. Ormel J, Hartman CA, Snieder H. The genetics of depression: successful genome-wide association studies introduce new challenges. *Transl Psychiatry*. 2019 Mar 15;9(1):114. doi: 10.1038/s41398-019-0450-5. PMID: 30877272; PMCID: PMC6420566.
421. Otto C, Martin M, Wolfer DP, Lipp HP, Maldonado R, Schütz G. Altered emotional behavior in PACAP-type-I-receptor-deficient mice. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001 Aug 15;92(1-2):78-84. doi: 10.1016/s0169-328x(01)00153-x. PMID: 11483244.
422. Paez-Pereda M, Hausch F, Holsboer F. Corticotropin releasing factor receptor antagonists for major depressive disorder. *Expert Opin Investig Drugs*. 2011 Apr;20(4):519-35. doi: 10.1517/13543784.2011.565330. PMID: 21395482.
423. Palagini L, Baglioni C, Ciapparelli A, Gemignani A, Riemann D. REM sleep dysregulation in depression: state of the art. *Sleep Med Rev*. 2013 Oct;17(5):377-90. doi: 10.1016/j.smrv.2012.11.001. Epub 2013 Feb 5. PMID: 23391633.
424. Pampallona S, Bollini P, Tibaldi G, Kupelnick B, Munizza C. Combined pharmacotherapy and psychological treatment for depression: a systematic review. *Arch Gen Psychiatry*. 2004 Jul;61(7):714-9. doi: 10.1001/archpsyc.61.7.714. PMID: 15237083.
425. Paredes-Rodriguez E, Vegas-Suarez S, Morera-Herreras T, De Deurwaerdere P, Miguez C. The Noradrenergic System in Parkinson's Disease. *Front Pharmacol*. 2020 Apr PMID: 32322208
426. Paretkar T, Dimitrov E. The Central Amygdala Corticotropin-releasing hormone (CRH) Neurons Modulation of Anxiety-like Behavior and Hippocampus-dependent Memory in Mice. *Neuroscience*. 2018 Oct 15;390:187-197. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.08.019. Epub 2018 Aug 29. PMID: 30170157; PMCID: PMC6168391.
427. Parsons MP, Li S, Kirouac GJ. Functional and anatomical connection between the paraventricular nucleus of the thalamus and dopamine fibers of the nucleus accumbens. *J Comp Neurol*. 2007 Feb 20;500(6):1050-63. doi: 10.1002/cne.21224. PMID: 17183538.
428. Partridge JG, Forcelli PA, Luo R, Cashdan JM, Schulkin J, Valentino RJ, Vicini S. Stress increases GABAergic neurotransmission in CRF neurons of the central amygdala and bed nucleus stria terminalis. *Neuropharmacology*. 2016 Aug;107:239-250. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.03.029. Epub 2016 Mar 22. PMID: 27016019; PMCID: PMC7025394.
429. Paul ED, Lowry CA. Functional topography of serotonergic systems supports the Deakin/Graeff hypothesis of anxiety and affective disorders. *J Psychopharmacol*. 2013 Dec;27(12):1090-106. doi: 10.1177/0269881113490328. Epub 2013 May 23. PMID: 23704363.
430. Paxinos G, Franklin KBJ. *The mouse brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. 2001. ISBN: 9780128161579
431. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates (6th ed.)*. 2007 New York: Elsevier Academic Press ISBN: 978-0-12-373721-2
432. Peña CJ, Kronman HG, Walker DM, Cates HM, Bagot RC, Purushothaman I, Issler O, Loh YE, Leong T, Kiraly DD, Goodman E, Neve RL, Shen L, Nestler EJ. Early life stress confers lifelong stress susceptibility in mice via ventral tegmental area OTX2. *Science*. 2017 Jun 16;356(6343):1185-1188. doi: 10.1126/science.aan4491. PMID: 28619944; PMCID: PMC5539403.
433. Peris J, MacFadyen K, Smith JA, de Kloet AD, Wang L, Krause EG. Oxytocin receptors are expressed on dopamine and glutamate neurons in the mouse ventral tegmental area that project to nucleus accumbens and other mesolimbic targets. *J Comp Neurol*. 2017 Apr PMID: 2761543
434. Perrin AJ, Pariante CM. Endocrine and immune effects of non-convulsive neurostimulation in depression: A systematic review. *Brain Behav Immun*. 2020 Jul;87:910-920. doi: 10.1016/j.bbi.2020.02.016. Epub 2020 Feb 29. PMID: 32126288.
435. Perrin MH, Donaldson CJ, Chen R, Lewis KA, Vale WW. Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. *Endocrinology*. 1993 Dec;133(6):3058-61. doi: 10.1210/endo.133.6.8243338. PMID: 8243338.
436. Perrotti LI, Hadeishi Y, Ulery PG, Barrot M, Monteggia L, Duman RS, Nestler EJ. Induction of deltaFosB in reward-related brain structures after chronic stress. *J Neurosci*. 2004 Nov 24;24(47):10594-602. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2542-04.2004. PMID: 15564575; PMCID: PMC6730117.

437. Perroud N, Rutembesa E, Paoloni-Giacobino A, Mutabaruka J, Mutesa L, Stenz L, Malafosse A, Karege F. The Tutsi genocide and transgenerational transmission of maternal stress: epigenetics and biology of the HPA axis. *World J Biol Psychiatry*. 2014 May;15(4):334-45. doi: 10.3109/15622975.2013.866693. Epub 2014 Apr 1. PMID: 24690014.
438. Pétervári E, Garami A, Soós S, Székely M, Balaskó M. Age-dependence of alpha-MSH-induced anorexia. *Neuropeptides*. 2010 Aug;44(4):315-22. doi: 10.1016/j.npep.2010.03.002. Epub 2010 Apr 10. PMID: 20382426.
439. Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001 Dec;38(1-2):247-89. doi: 10.1016/s0165-0173(01)00080-7. PMID: 11750934.
440. Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvét M, Luppi PH. Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience*. 1998 Jan;82(2):443-68. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00268-6. PMID: 9466453.
441. Pinhasov A, Neshet E, Gross M, Turgeman G, Kreinin A, Yadid G. The role of the PACAP signaling system in depression. *Curr Pharm Des*. 2011;17(10):990-1001. doi: 10.2174/138161211795589328. PMID: 21524254.
442. Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. 2008 Jan;33(1):88-109. doi: 10.1038/sj.npp.1301574. Epub 2007 Sep 12. PMID: 17851537.
443. Pizzagalli DA, Roberts AC. Prefrontal cortex and depression. *Neuropsychopharmacology*. 2022 Jan;47(1):225-246. doi: 10.1038/s41386-021-01101-7. Epub 2021 Aug 2. Erratum in: *Neuropsychopharmacology*. 2021 Aug 19;: PMID: 34341498; PMCID: PMC8617037.
444. Plotsky PM, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Caldji C, Sharma S, Meaney MJ. Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology*. 2005 Dec;30(12):2192-204. doi: 10.1038/sj.npp.1300769. PMID: 15920504.
445. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, Schrag AE, Lang AE. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Mar 23;3:17013. doi: 10.1038/nrdp.2017.13. PMID: 28332488.
446. Pomrenze MB, Tovar-Diaz J, Blasio A, Maiya R, Giovanetti SM, Lei K, Morikawa H, Hopf FW, Messing RO. A Corticotropin Releasing Factor Network in the Extended Amygdala for Anxiety. *J Neurosci*. 2019 Feb 6;39(6):1030-1043. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2143-18.2018. Epub 2018 Dec 10. PMID: 30530860; PMCID: PMC6363927.
447. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1977 Oct;229(2):327-36. PMID: 596982.
448. Potter E, Sutton S, Donaldson C, Chen R, Perrin M, Lewis K, Sawchenko PE, Vale W. Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Sep 13;91(19):8777-81. doi: 10.1073/pnas.91.19.8777. PMID: 8090722; PMCID: PMC44689.
449. Prada SI. Population-level effects of depression diagnosis on Medicare payments and use. *J Am Geriatr Soc*. 2014 Sep;62(9):1805-7. doi: 10.1111/jgs.13014. PMID: 25243691.
450. Prasad EM, Hung SY. Behavioral Tests in Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson's Disease. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Oct 16;9(10):1007. doi: 10.3390/antiox9101007. PMID: 33081318; PMCID: PMC7602991.
451. Priest MF, Freda SN, Rieth IJ, Badong D, Dumrongprechachan V, Kozorovitskiy Y. Peptidergic and functional delineation of the Edinger-Westphal nucleus. *Cell Rep*. 2023 Aug 16;42(8):112992. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112992. Epub ahead of print. PMID: 37594894.
452. Quentin E, Belmer A, Maroteaux L. Somato-Dendritic Regulation of Raphe Serotonin Neurons; A Key to Antidepressant Action. *Front Neurosci*. 2018 Dec 20;12:982. doi: 10.3389/fnins.2018.00982. PMID: 30618598; PMCID: PMC6307465.
453. Raabe FJ, Spengler D. Epigenetic Risk Factors in PTSD and Depression. *Front Psychiatry*. 2013 Aug 7;4:80. doi: 10.3389/fpsy.2013.00080. PMID: 23966957; PMCID: PMC3736070.
454. Radley JJ, Gosselink KL, Sawchenko PE. A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. *J Neurosci*. 2009 Jun 3;29(22):7330-40. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5924-08.2009. PMID: 19494154; PMCID: PMC2743123.
455. Radley JJ, Sawchenko PE. Evidence for involvement of a limbic paraventricular hypothalamic inhibitory network in hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptations to repeated stress. *J Comp Neurol*. 2015 Dec 15;523(18):2769-87. doi: 10.1002/cne.23815. Epub 2015 Jun 18. PMID: 26010947; PMCID: PMC4607561.

456. Rahmouni K, Sigmund CD, Haynes WG, Mark AL. Hypothalamic ERK mediates the anorectic and thermogenic sympathetic effects of leptin. *Diabetes*. 2009 Mar;58(3):536-42. doi: 10.2337/db08-0822. Epub 2008 Dec 9. PMID: 19066310; PMCID: PMC2646051.
457. Ramot A, Jiang Z, Tian JB, Nahum T, Kuperman Y, Justice N, Chen A. Hypothalamic CRFR1 is essential for HPA axis regulation following chronic stress. *Nat Neurosci*. 2017 Mar;20(3):385-388. doi: 10.1038/nn.4491. Epub 2017 Jan 30. PMID: 28135239.
458. Rattray M, Savery D, Wotherspoon G, Priestley JV, Smith GS. Two populations of cells that express preprocholecystinin mRNA in ventral periaqueductal grey. *Neurosci Lett*. 1992 Aug 31;143(1-2):55-9. doi: 10.1016/0304-3940(92)90232-v. PMID: 1436682.
459. Regev L, Neufeld-Cohen A, Tsoory M, Kuperman Y, Getselter D, Gil S, Chen A. Prolonged and site-specific over-expression of corticotropin-releasing factor reveals differential roles for extended amygdala nuclei in emotional regulation. *Mol Psychiatry*. 2011 Jul;16(7):714-28. doi: 10.1038/mp.2010.64. Epub 2010 Jun 15. PMID: 20548294.
460. Reglodi D, Kiss P, Szabadfi K, Atlasz T, Gabriel R, Horvath G, Szakaly P, Sandor B, Lubics A, Laszlo E, Farkas J, Matkovits A, Brubel R, Hashimoto H, Ferencz A, Vincze A, Helyes Z, Welke L, Lakatos A, Tamas A. PACAP is an endogenous protective factor-insights from PACAP-deficient mice. *J Mol Neurosci*. 2012 Nov;48(3):482-92. doi: 10.1007/s12031-012-9762-0. Epub 2012 Apr 14. PMID: 22528455.
461. Reisch A, Illing RB, Laszig R. Immediate early gene expression invoked by electrical intracochlear stimulation in some but not all types of neurons in the rat auditory brainstem. *Exp Neurol*. 2007 Dec;208(2):193-206. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.06.016. Epub 2007 Jul 10. PMID: 17825819.
462. Renard CE, Dailly E, David DJ, Hascoet M, Bourin M. Monoamine metabolism changes following the mouse forced swimming test but not the tail suspension test. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003 Aug;17(4):449-55. doi: 10.1046/j.1472-8206.2003.00160.x. PMID: 12914547.
463. Ressler KJ, Mercer KB, Bradley B, Jovanovic T, Mahan A, Kerley K, Norrholm SD, Kilaru V, Smith AK, Myers AJ, Ramirez M, Engel A, Hammack SE, Toufexis D, Braas KM, Binder EB, May V. Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. *Nature*. 2011 Feb 24;470(7335):492-7. doi: 10.1038/nature09856. Erratum in: *Nature*. 2011 Sep 1;477(7362):120. PMID: 21350482; PMCID: PMC3046811.
464. Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias CA, Hogenesch JB, Gulyas J, Rivier J, Vale WW, Sawchenko PE. Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 27;98(5):2843-8. doi: 10.1073/pnas.051626398. PMID: 11226328; PMCID: PMC30227.
465. Risold PY, Swanson LW. Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res Brain Res Rev*. 1997 Sep 19;24(2-3):115-95. doi: 10.1016/s0165-0173(97)00009-x. PMID: 9385454.
466. Rodríguez-Violante M, Zerón-Martínez R, Cervantes-Arriaga A, Corona T. Who Can Diagnose Parkinson's Disease First? Role of Pre-motor Symptoms. *Arch Med Res*. 2017 Apr;48(3):221-227. doi: 10.1016/j.arcmed.2017.08.005. Epub 2017 Sep 4. PMID: 28882322.
467. Romeo RD, Bellani R, Karatsoreos IN, Chhua N, Vernov M, Conrad CD, McEwen BS. Stress history and pubertal development interact to shape hypothalamic-pituitary-adrenal axis plasticity. *Endocrinology*. 2006 Apr;147(4):1664-74. doi: 10.1210/en.2005-1432. Epub 2006 Jan 12. PMID: 16410296.
468. Romeo RD. Pubertal maturation and programming of hypothalamic-pituitary-adrenal reactivity. *Front Neuroendocrinol*. 2010 Apr;31(2):232-40. doi: 10.1016/j.yfrne.2010.02.004. Epub 2010 Mar 1. PMID: 20193707.
469. Rotllant D, Nadal R, Armario A. Differential effects of stress and amphetamine administration on Fos-like protein expression in corticotropin releasing factor-neurons of the rat brain. *Dev Neurobiol*. 2007 May;67(6):702-14. doi: 10.1002/dneu.20345. PMID: 17443818.
470. Russo SJ, Nestler EJ. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2013 Sep;14(9):609-25. doi: 10.1038/nrn3381. Epub 2013 Aug 14. Erratum in: *Nat Rev Neurosci*. 2013 Oct;14(10):736. PMID: 23942470; PMCID: PMC3867253.
471. Ryabinin AE, Wang YM, Finn DA. Different levels of Fos immunoreactivity after repeated handling and injection stress in two inbred strains of mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 1999 May;63(1):143-51. doi: 10.1016/s0091-3057(98)00239-1. PMID: 10340535.

472. Ryabinin AE, Tsoory MM, Kozicz T, Thiele TE, Neufeld-Cohen A, Chen A, Lowery-Gionta EG, Giardino WJ, Kaur S. Urocortins: CRF's siblings and their potential role in anxiety, depression and alcohol drinking behavior. *Alcohol*. 2012 Jun;46(4):349-57. doi: 10.1016/j.alcohol.2011.10.007. Epub 2012 Mar 22. PMID: 22444954; PMCID: PMC3358480.
473. Ryan KM, Boyle NT, Harkin A, Connor TJ. Dexamethasone attenuates inflammatory-mediated suppression of  $\beta$ 2-adrenoceptor expression in rat primary mixed glia. *J Neuroimmunol*. 2020 Jan 15;338:577082. doi: 10.1016/j.jneuroim.2019.577082. Epub 2019 Nov 2. PMID: 31707103.
474. Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev*. 2003 Jul;83(3):803-34. doi: 10.1152/physrev.00002.2003. PMID: 12843409.
475. Sampath D, Sathyanesan M, Newton SS. Cognitive dysfunction in major depression and Alzheimer's disease is associated with hippocampal-prefrontal cortex dysconnectivity. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2017 Jun 12;13:1509-1519. doi: 10.2147/NDT.S136122. PMID: 28652752; PMCID: PMC5476659.
476. Sánchez E, Rubio VC, Thompson D, Metz J, Flik G, Millhauser GL, Cerdá-Reverter JM. Phosphodiesterase inhibitor-dependent inverse agonism of agouti-related protein on melanocortin 4 receptor in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009 May;296(5):R1293-306. doi: 10.1152/ajpregu.90948.2008. Epub 2009 Feb 18. PMID: 19225141; PMCID: PMC2689838.
477. Sándor K, Kormos V, Botz B, Imreh A, Bölcskei K, Gaszner B, Markovics A, Szolcsányi J, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Reglodi D, Helyes Z. Impaired nocifensive behaviours and mechanical hyperalgesia, but enhanced thermal allodynia in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficient mice. *Neuropeptides*. 2010 Oct;44(5):363-71. doi: 10.1016/j.npep.2010.06.004. PMID: 20621353.
478. Santarelli S, Lesuis SL, Wang XD, Wagner KV, Hartmann J, Labermaier C, Scharf SH, Müller MB, Holsboer F, Schmidt MV. Evidence supporting the match/mismatch hypothesis of psychiatric disorders. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2014 Jun;24(6):907-18. doi: 10.1016/j.euroneuro.2014.02.002. Epub 2014 Feb 15. PMID: 24589292.
479. Sapolsky RM. Do glucocorticoid concentrations rise with age in the rat? *Neurobiol Aging*. 1992 Jan-Feb;13(1):171-4. doi: 10.1016/0197-4580(92)90025-s. PMID: 1542376.
480. Savitz J, Lucki I, Drevets WC. 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol*. 2009 May;88(1):17-31. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.01.009. Epub 2009 Feb 7. PMID: 19428959; PMCID: PMC2736801.
481. Sawchenko PE, Li HY, Ericsson A. Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. *Prog Brain Res*. 2000;122:61-78. doi: 10.1016/s0079-6123(08)62131-7. PMID: 10737051.
482. Scheggi S, De Montis MG, Gambarana C. Making Sense of Rodent Models of Anhedonia. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2018 Nov 1;21(11):1049-1065. doi: 10.1093/ijnp/pyy083. PMID: 30239762; PMCID: PMC6209858.
483. Scheich B, Csekő K, Borbély É, Ábrahám I, Csernus V, Gaszner B, Helyes Z. Higher susceptibility of somatostatin 4 receptor gene-deleted mice to chronic stress-induced behavioral and neuroendocrine alterations. *Neuroscience*. 2017 Mar 27;346:320-336. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.01.039. Epub 2017 Feb 1. PMID: 28161436.
484. Scheich B, Gaszner B, Kormos V, László K, Ádori C, Borbély É, Hajna Z, Tékus V, Bölcskei K, Ábrahám I, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z. Somatostatin receptor subtype 4 activation is involved in anxiety and depression-like behavior in mouse models. *Neuropharmacology*. 2016 Feb;101:204-15. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.09.021. Epub 2015 Sep 18. PMID: 26387439.
485. Schmauss C. An HDAC-dependent epigenetic mechanism that enhances the efficacy of the antidepressant drug fluoxetine. *Sci Rep*. 2015 Feb 2;5:8171. doi: 10.1038/srep08171. PMID: 25639887; PMCID: PMC4313090.
486. Schmidt MV. Animal models for depression and the mismatch hypothesis of disease. *Psychoneuroendocrinology*. 2011 Apr;36(3):330-8. doi: 10.1016/j.psyneuen.2010.07.001. Epub 2010 Jul 31. PMID: 20674180.
487. Schneider SA, Obeso JA. Clinical and pathological features of Parkinson's disease. *Curr Top Behav Neurosci*. 2015;22:205-20. doi: 10.1007/7854\_2014\_317. PMID: 24850081.
488. Schuhmacher A, Lennertz L, Wagner M, Höfels S, Pfeiffer U, Guttenthaler V, Maier W, Zobel A, Mössner R. A variant of the neuronal amino acid transporter SLC6A15 is associated with ACTH and cortisol responses

- and cognitive performance in unipolar depression. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013 Feb;16(1):83-90. doi: 10.1017/S1461145712000223. Epub 2012 Apr 4. PMID: 22475622.
489. Scott MM, Lachey JL, Sternson SM, Lee CE, Elias CF, Friedman JM, Elmquist JK. Leptin targets in the mouse brain. *J Comp Neurol*. 2009 Jun 10;514(5):518-32. doi: 10.1002/cne.22025. PMID: 19350671; PMCID: PMC2710238.
490. Seggie J. Differential responsivity of corticosterone and prolactin to stress following lesions of the septum or amygdala: implications for psychoneuroendocrinology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1987;11(2-3):315-24. doi: 10.1016/0278-5846(87)90076-5. PMID: 3628836.
491. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1998 Spring;10(2):230-1. doi: 10.1176/jnp.10.2.230a. PMID: 9722327.
492. Selye H. Hormones and resistance. *J Pharm Sci*. 1971 Jan;60(1):1-28. doi: 10.1002/jps.2600600102. PMID: 4926765.
493. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*. 2013 Jun;4(6):624-30. PMID: 23930179; PMCID: PMC3733029.
494. Shah NS, Pugh PC, Nam H, Rosenthal DT, van Wijk D, Gaszner B, Kozicz T, Kerman IA. A subset of presympathetic-premotor neurons within the centrally projecting Edinger-Westphal nucleus expresses urocortin-1. *J Chem Neuroanat*. 2013 Sep;52:25-35. doi: 10.1016/j.jchemneu.2013.04.004. Epub 2013 May 22. PMID: 23707488; PMCID: PMC3775998.
495. Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality. *Biometrika*. 1965. 52:591-9. doi: 10.2307/2333709
496. Shintani N, Hashimoto H, Tanaka K, Kawagishi N, Kawaguchi C, Hatanaka M, Ago Y, Matsuda T, Baba A. Serotonergic inhibition of intense jumping behavior in mice lacking PACAP (Adcyap1-/-). *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Jul;1070:545-9. doi: 10.1196/annals.1317.079. PMID: 16888223.
497. Shutter JR, Graham M, Kinsey AC, Scully S, Lüthy R, Stark KL. Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev*. 1997 Mar 1;11(5):593-602. doi: 10.1101/gad.11.5.593. PMID: 9119224.
498. Sikriwal D, Ghosh P, Batra JK. Ribosome inactivating protein saporin induces apoptosis through mitochondrial cascade, independent of translation inhibition. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(12):2880-8. doi: 10.1016/j.biochel.2008.06.004. Epub 2008 Jun 20. PMID: 18611444.
499. Silverman MN, Sternberg EM. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Jul;1261:55-63. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06633.x. PMID: 22823394; PMCID: PMC3572859.
500. Singh AL, D'Onofrio BM, Slutske WS, Turkheimer E, Emery RE, Harden KP, Heath AC, Madden PA, Statham DJ, Martin NG. Parental depression and offspring psychopathology: a children of twins study. *Psychol Med*. 2011 Jul;41(7):1385-95. doi: 10.1017/S0033291710002059. Epub 2010 Nov 8. PMID: 21054918; PMCID: PMC3119509.
501. Skelton KH, Owens MJ, Nemeroff CB. The neurobiology of urocortin. *Regul Pept*. 2000 Sep 25;93(1-3):85-92. doi: 10.1016/s0167-0115(00)00180-4. PMID: 11033056.
502. Smith MA, Kim SY, van Oers HJ, Levine S. Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain. *Endocrinology*. 1997 Nov;138(11):4622-8. doi: 10.1210/endo.138.11.5529. PMID: 9348187.
503. Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical methods*. Iowa State University Press. 1989. ISBN: 978-0813815619
504. Söber S, Laan M, Annilo T. MicroRNAs miR-124 and miR-135a are potential regulators of the mineralocorticoid receptor gene (NR3C2) expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jan 1;391(1):727-32. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.11.128. Epub 2009 Nov 26. PMID: 19944075; PMCID: PMC2806518.
505. Sonnenberg JL, Macgregor-Leon PF, Curran T, Morgan JI. Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizure. *Neuron*. 1989 Sep;3(3):359-65. doi: 10.1016/0896-6273(89)90260-2. PMID: 2518370.
506. Sparta DR, Jennings JH, Ung RL, Stuber GD. Optogenetic strategies to investigate neural circuitry engaged by stress. *Behav Brain Res*. 2013 Oct 15;255:19-25. doi: 10.1016/j.bbr.2013.05.007. Epub 2013 May 16. PMID: 23684554; PMCID: PMC4415682.
507. Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000 Jun;24(4):417-63. doi: 10.1016/s0149-7634(00)00014-2. PMID: 10817843.

508. Spencer SJ, Xu L, Clarke MA, Lemus M, Reichenbach A, Geenen B, Kozicz T, Andrews ZB. Ghrelin regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and restricts anxiety after acute stress. *Biol Psychiatry*. 2012 Sep 15;72(6):457-65. doi: 10.1016/j.biopsych.2012.03.010. Epub 2012 Apr 21. PMID: 22521145.
509. Spina M, Merlo-Pich E, Chan RK, Basso AM, Rivier J, Vale W, Koob GF. Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. *Science*. 1996 Sep 13;273(5281):1561-4. doi: 10.1126/science.273.5281.1561. PMID: 8703220.
510. Stanković I, Petrović I, Pekmezović T, Marković V, Stojković T, Dragašević-Mišković N, Svetel M, Kostić V. Longitudinal assessment of autonomic dysfunction in early Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2019 Sep;66:74-79. doi: 10.1016/j.parkreldis.2019.07.008. Epub 2019 Jul 10. PMID: 31320275.
511. Steinbusch HW, Nieuwenhuys R, Verhofstad AA, Van der Kooy D. The nucleus raphe dorsalis of the rat and its projection upon the caudatoputamen. A combined cytoarchitectonic, immunohistochemical and retrograde transport study. *J Physiol (Paris)*. 1981. 77(2-3):157-74. PMID: 6169825.
512. Stenzel-Poore MP, Heinrichs SC, Rivest S, Koob GF, Vale WW. Overproduction of corticotropin-releasing factor in transgenic mice: a genetic model of anxiogenic behavior. *J Neurosci*. 1994 May;14(5 Pt 1):2579-84. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-05-02579.1994. PMID: 8182429; PMCID: PMC6577466.
513. Sterling P, Eyer J. (1988) Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology S. Fisher, J. Reason (Eds.), *Handbook of Life Stress, Cognition and Health*, John Wiley & Sons, New York, pp. 629-649.
514. Sterrenburg L, Gaszner B, Boerrigter J, Santbergen L, Bramini M, Elliott E, Chen A, Peeters BW, Roubos EW, Kozicz T. Chronic stress induces sex-specific alterations in methylation and expression of corticotropin-releasing factor gene in the rat. *PLoS One*. 2011;6(11):e28128. doi: 10.1371/journal.pone.0028128. Epub 2011 Nov 23. PMID: 22132228; PMCID: PMC3223222.
515. Sterrenburg L, Gaszner B, Boerrigter J, Santbergen L, Bramini M, Roubos EW, Peeters BW, Kozicz T. Sex-dependent and differential responses to acute restraint stress of corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat paraventricular nucleus, central amygdala, and bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci Res*. 2012 Jan;90(1):179-92. doi: 10.1002/jnr.22737. Epub 2011 Sep 15. PMID: 21922520.
516. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 1985;85(3):367-70. doi: 10.1007/BF00428203. PMID: 3923523.
517. Stone EA, Lehmann ML, Lin Y, Quartermain D. Reduced evoked fos expression in activity-related brain regions in animal models of behavioral depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007 Aug 15;31(6):1196-207. doi: 10.1016/j.pnpbp.2007.04.010. Epub 2007 Apr 24. PMID: 17513031.
518. Stone EA, Lin Y, Sarfraz Y, Quartermain D. Antidepressant-like action of intracerebral 6-fluoronorepinephrine, a selective full  $\alpha$ -adrenoceptor agonist. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011 Apr;14(3):319-31. doi: 10.1017/S1461145710000507. Epub 2010 May 12. PMID: 20459885.
519. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000 Jan 6;403(6765):41-5. doi: 10.1038/47412. PMID: 10638745.
520. Strelakova T, Liu Y, Kiselev D, Khairuddin S, Chiu JLY, Lam J, Chan YS, Pavlov D, Proshin A, Lesch KP, Anthony DC, Lim LW. Chronic mild stress paradigm as a rat model of depression: facts, artifacts, and future perspectives. *Psychopharmacology (Berl)*. 2022 Mar;239(3):663-693. doi: 10.1007/s00213-021-05982-w. Epub 2022 Jan 24. PMID: 35072761; PMCID: PMC8785013.
521. Stroth N, Eiden LE. Stress hormone synthesis in mouse hypothalamus and adrenal gland triggered by restraint is dependent on pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide signaling. *Neuroscience*. 2010 Feb 17;165(4):1025-30. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.11.023. Epub 2009 Nov 18. PMID: 19931358; PMCID: PMC2815259.
522. Stroth N, Holighaus Y, Ait-Ali D, Eiden LE. PACAP: a master regulator of neuroendocrine stress circuits and the cellular stress response. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Mar;1220(1):49-59. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.05904.x. PMID: 21388403; PMCID: PMC3078626.
523. Sullivan MD. Depression Effects on Long-term Prescription Opioid Use, Abuse, and Addiction. *Clin J Pain*. 2018 Sep;34(9):878-884. doi: 10.1097/AJP.0000000000000603. PMID: 29505419.
524. Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS. Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry*. 2000 Oct;157(10):1552-62. doi: 10.1176/appi.ajp.157.10.1552. PMID: 11007705.
525. Sun C, Wang Y, Mo M, Song C, Wang X, Chen S, Liu Y. Minocycline Protects against Rotenone-Induced Neurotoxicity Correlating with Upregulation of Nurr1 in a Parkinson's Disease Rat Model. *Biomed Res Int*. 2019 Mar 5;2019:6843265. doi: 10.1155/2019/6843265. PMID: 30949504; PMCID: PMC6425343.



526. Sun H, Zhang X, Kong Y, Gou L, Lian B, Wang Y, Jiang L, Li Q, Sun H, Sun L. Maternal Separation-Induced Histone Acetylation Correlates with BDNF-Programmed Synaptic Changes in an Animal Model of PTSD with Sex Differences. *Mol Neurobiol.* 2021 Apr;58(4):1738-1754. doi: 10.1007/s12035-020-02224-6. Epub 2020 Nov 27. PMID: 33245480.
527. Sun X, Song Z, Si Y, Wang JH. microRNA and mRNA profiles in ventral tegmental area relevant to stress-induced depression and resilience. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2018 Aug 30;86:150-165. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.05.023. Epub 2018 Jun 1. PMID: 29864451.
528. Sunstrum JK, Inoue W. Heterosynaptic modulation in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuropharmacology.* 2019 Aug;154:87-95. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.11.004. Epub 2018 Nov 5. PMID: 30408488.
529. Surget A, Tanti A, Leonardo ED, Laugeray A, Rainer Q, Touma C, Palme R, Griebel G, Ibarguen-Vargas Y, Hen R, Belzung C. Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Mol Psychiatry.* 2011 Dec;16(12):1177-88. doi: 10.1038/mp.2011.48. Epub 2011 May 3. PMID: 21537331; PMCID: PMC3223314.
530. Szabó K, Kemény Á, Balázs N, Khanfar E, Sándor Z, Boldizsár F, Gyulai R, Najbauer J, Pintér E, Berki T. Presence of TRPA1 Modifies CD4+/CD8+ T Lymphocyte Ratio and Activation. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022 Jan 1;15(1):57. doi: 10.3390/ph15010057. PMID: 35056114; PMCID: PMC8781558.
531. Szatmári S Jr, Ajtay A, Bálint M, Takáts A, Oberfrank F, Bereczki D. Linking Individual Patient Data to Estimate Incidence and Prevalence of Parkinson's Disease by Comparing Reports of Neurological Services and Pharmacy Prescription Refills at a Nationwide Level. *Front Neurol.* 2019 Jun 18;10:640. doi: 10.3389/fneur.2019.00640. PMID: 31275231; PMCID: PMC6591465.
532. Szentágothai J. (1942) Die innere Gliederung des Oculomotoriuskernes. *Arch. Psychiat.* 115, 127.
533. Tao R, Ma Z, Auerbach SB. Differential effect of local infusion of serotonin reuptake inhibitors in the raphe versus forebrain and the role of depolarization-induced release in increased extracellular serotonin. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Aug;294(2):571-9. PMID: 10900234.
534. Tenk J, Rostás I, Füredi N, Mikó A, Solymár M, Soós S, Gaszner B, Feller D, Székely M, Pétervári E, Balaskó M. Age-related changes in central effects of corticotropin-releasing factor (CRF) suggest a role for this mediator in aging anorexia and cachexia. *Geroscience.* 2017 Feb;39(1):61-72. doi: 10.1007/s11357-017-9962-1. Epub 2017 Jan 18. PMID: 28299639; PMCID: PMC5352590.
535. Thirivikraman KV, Nemeroff CB, Plotsky PM. Sensitivity to glucocorticoid-mediated fast-feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is dependent upon stressor specific neurocircuitry. *Brain Res.* 2000 Jul 7;870(1-2):87-101. doi: 10.1016/s0006-8993(00)02405-7. PMID: 10869505.
536. Thirivikraman KV, Su Y, Plotsky PM. Patterns of Fos-Immunoreactivity in the CNS Induced by Repeated Hemorrhage in Conscious Rats: Correlations with Pituitary-Adrenal Axis Activity. *Stress.* 1997 Dec;2(2):145-158. doi: 10.3109/10253899709014745. PMID: 9787263.
537. Todorović N, Filipović D. The antidepressant- and anxiolytic-like effects of fluoxetine and clozapine in chronically isolated rats involve inhibition of hippocampal TNF- $\alpha$ . *Pharmacol Biochem Behav.* 2017 Dec;163:57-65. doi: 10.1016/j.pbb.2017.10.006. Epub 2017 Oct 16. PMID: 29042248.
538. Topilko T, Diaz SL, Pacheco CM, Verny F, Rousseau CV, Kirst C, Deleuze C, Gaspar P, Renier N. Edinger-Westphal peptidergic neurons enable maternal preparatory nesting. *Neuron.* 2022 Apr 20;110(8):1385-1399.e8. doi: 10.1016/j.neuron.2022.01.012. Epub 2022 Feb 4. PMID: 35123655; PMCID: PMC9090132.
539. Torres G, Horowitz JM, Laflamme N, Rivest S. Fluoxetine induces the transcription of genes encoding c-fos, corticotropin-releasing factor and its type 1 receptor in rat brain. *Neuroscience.* 1998 Nov;87(2):463-77. doi: 10.1016/s0306-4522(98)00147-x. PMID: 9740405.
540. Treadway MT, Waskom ML, Dillon DG, Holmes AJ, Park MTM, Chakravarty MM, Dutra SJ, Polli FE, Iosifescu DV, Fava M, Gabrieli JDE, Pizzagalli DA. Illness progression, recent stress, and morphometry of hippocampal subfields and medial prefrontal cortex in major depression. *Biol Psychiatry.* 2015 Feb 1;77(3):285-294. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.06.018. Epub 2014 Jul 3. PMID: 25109665; PMCID: PMC4277904.
541. Tsukiyama N, Saida Y, Kakuda M, Shintani N, Hayata A, Morita Y, Tanida M, Tajiri M, Hazama K, Ogata K, Hashimoto H, Baba A. PACAP centrally mediates emotional stress-induced corticosterone responses in mice. *Stress.* 2011 Jul;14(4):368-75. doi: 10.3109/10253890.2010.544345. Epub 2011 Mar 27. PMID: 21438773; PMCID: PMC3128825.

542. Noye Tuplin EW, Lightfoot SHM, Holahan MR. Comparison of the Time-Dependent Changes in Immediate Early Gene Labeling and Spine Density Following Abstinence From Contingent or Non-contingent Chocolate Pellet Delivery. *Front Behav Neurosci*. 2018 Jul 16;12:144. doi: 10.3389/fnbeh.2018.00144. PMID: 30061817; PMCID: PMC6055009.
543. Turek VF, Ryabinin AE. Ethanol versus lipopolysaccharide-induced hypothermia: involvement of urocortin. *Neuroscience*. 2005;133(4):1021-8. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.03.037. PMID: 15964490.
544. Tye KM, Mirzabekov JJ, Warden MR, Ferenczi EA, Tsai HC, Finkelstein J, Kim SY, Adhikari A, Thompson KR, Andalman AS, Gunaydin LA, Witten IB, Deisseroth K. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature*. 2013 Jan 24;493(7433):537-541. doi: 10.1038/nature11740. Epub 2012 Dec 12. PMID: 23235822; PMCID: PMC4160519.
545. Ujvári B, Pytel B, Márton Z, Bognár M, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Berta G, Kecskés A, Kormos V, Farkas B, Füredi N, Gaszner B. Neurodegeneration in the centrally-projecting Edinger-Westphal nucleus contributes to the non-motor symptoms of Parkinson's disease in the rat. *J Neuroinflammation*. 2022 Feb 2;19(1):31. doi: 10.1186/s12974-022-02399-w. PMID: 35109869; PMCID: PMC8809039.
546. Ujvári B. A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag szerepének vizsgálata a Parkinson-kórhoz kapcsolódó hangulatzavarok patkány modelljeiben 2022. PhD értekezés <https://pea.lib.pte.hu/handle/pea/34193>
547. Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Jun;10(6):397-409. doi: 10.1038/nrn2647. PMID: 19469025; PMCID: PMC4240627.
548. Unschuld PG, Ising M, Roeske D, Erhardt A, Specht M, Kloiber S, Uhr M, Müller-Myhsok B, Holsboer F, Binder EB. Gender-specific association of galanin polymorphisms with HPA-axis dysregulation, symptom severity, and antidepressant treatment response. *Neuropsychopharmacology*. 2010 Jun;35(7):1583-92. doi: 10.1038/npp.2010.30. Epub 2010 Mar 17. PMID: 20237460; PMCID: PMC3055457.
549. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*. 1981 Sep 18;213(4514):1394-7. doi: 10.1126/science.6267699. PMID: 6267699.
550. Van Bockstaele EJ, Peoples J, Valentino RJ. A.E. Bennett Research Award. Anatomic basis for differential regulation of the rostralateral peri-locus coeruleus region by limbic afferents. *Biol Psychiatry*. 1999 Nov 15;46(10):1352-63. doi: 10.1016/s0006-3223(99)00213-9. PMID: 10578450.
551. Van de Kar LD, Piechowski RA, Rittenhouse PA, Gray TS. Amygdaloid lesions: differential effect on conditioned stress and immobilization-induced increases in corticosterone and renin secretion. *Neuroendocrinology*. 1991 Aug;54(2):89-95. doi: 10.1159/000125856. PMID: 1766554.
552. van der Doelen RH, Arnoldussen IA, Ghareh H, van Och L, Homberg JR, Kozicz T. Early life adversity and serotonin transporter gene variation interact to affect DNA methylation of the corticotropin-releasing factor gene promoter region in the adult rat brain. *Dev Psychopathol*. 2015 Feb;27(1):123-35. doi: 10.1017/S0954579414001345. PMID: 25640835.
553. van der Doelen RHA, Robroch B, Arnoldussen IA, Schulpen M, Homberg JR, Kozicz T. Serotonin and urocortin 1 in the dorsal raphe and Edinger-Westphal nuclei after early life stress in serotonin transporter knockout rats. *Neuroscience*. 2017 Jan 6;340:345-358. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.10.072. Epub 2016 Nov 5. PMID: 27826101.
554. Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W, Sawchenko PE. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol*. 2000 Dec 11;428(2):191-212. doi: 10.1002/1096-9861(20001211)428:2<191::aid-cne1>3.0.co;2-u. PMID: 11064361.
555. Vandegrift BJ, You C, Satta R, Brodie MS, Lasek AW. Estradiol increases the sensitivity of ventral tegmental area dopamine neurons to dopamine and ethanol. *PLoS One*. 2017 Nov 6;12(11):e0187698. doi: 10.1371/journal.pone.0187698. PMID: 29107956; PMCID: PMC5673180.
556. Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev*. 2009 Sep;61(3):283-357. doi: 10.1124/pr.109.001370. PMID: 19805477.
557. Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C, et al. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature*. 1995 Nov 16;378(6554):287-92. doi: 10.1038/378287a0. PMID: 7477349.
558. Veeraiah P, Noronha JM, Maitra S, Bagga P, Khandelwal N, Chakravarty S, Kumar A, Patel AB. Dysfunctional glutamatergic and  $\gamma$ -aminobutyric acidergic activities in prefrontal cortex of mice in social defeat model of

- depression. *Biol Psychiatry*. 2014 Aug 1;76(3):231-8. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.09.024. Epub 2013 Oct 3. PMID: 24239130.
559. Venkatraman A, Edlow BL, Immordino-Yang MH. The Brainstem in Emotion: A Review. *Front Neuroanat*. 2017 Mar 9;11:15. doi: 10.3389/fnana.2017.00015. PMID: 28337130; PMCID: PMC5343067.
560. Vertes RP. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*. 2004 Jan;51(1):32-58. doi: 10.1002/syn.10279. PMID: 14579424.
561. Vetter DE, Li C, Zhao L, Contarino A, Liberman MC, Smith GW, Marchuk Y, Koob GF, Heinemann SF, Vale W, Lee KF. Urocortin-deficient mice show hearing impairment and increased anxiety-like behavior. *Nat Genet*. 2002 Aug;31(4):363-9. doi: 10.1038/ng914. Epub 2002 Jul 1. PMID: 12091910.
562. Vialou V, Thibault M, Kaska S, Cooper S, Gajewski P, Eagle A, Mazei-Robison M, Nestler EJ, Robison AJ. Differential induction of FosB isoforms throughout the brain by fluoxetine and chronic stress. *Neuropharmacology*. 2015 Dec;99:28-37. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.07.005. Epub 2015 Jul 9. PMID: 26164345; PMCID: PMC4655122.
563. Villas Boas GR, Boerngen de Lacerda R, Paes MM, Gubert P, Almeida WLDC, Rescia VC, de Carvalho PMG, de Carvalho AAV, Oesterreich SA. Molecular aspects of depression: A review from neurobiology to treatment. *Eur J Pharmacol*. 2019 May 15;851:99-121. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.02.024. Epub 2019 Feb 15. PMID: 30776369.
564. Voineskos D, Daskalakis ZJ, Blumberger DM. Management of Treatment-Resistant Depression: Challenges and Strategies. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2020 Jan 21;16:221-234. doi: 10.2147/NDT.S198774. PMID: 32021216; PMCID: PMC6982454.
565. Vyas A, Jadhav S, Chattarji S. Prolonged behavioral stress enhances synaptic connectivity in the basolateral amygdala. *Neuroscience*. 2006 Dec 1;143(2):387-93. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.08.003. Epub 2006 Sep 8. PMID: 16962717.
566. Walker CD, Scribner KA, Cascio CS, Dallman MF. The pituitary-adrenocortical system of neonatal rats is responsive to stress throughout development in a time-dependent and stressor-specific fashion. *Endocrinology*. 1991 Mar;128(3):1385-95. doi: 10.1210/endo-128-3-1385. PMID: 1847856.
567. Walker DL, Miles LA, Davis M. Selective participation of the bed nucleus of the stria terminalis and CRF in sustained anxiety-like versus phasic fear-like responses. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009 Nov 13;33(8):1291-308. doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.06.022. Epub 2009 Jul 10. PMID: 19595731; PMCID: PMC2783512.
568. Wan Q, Gao K, Rong H, Wu M, Wang H, Wang X, Wang G, Liu Z. Histone modifications of the Crhr1 gene in a rat model of depression following chronic stress. *Behav Brain Res*. 2014 Sep 1;271:1-6. doi: 10.1016/j.bbr.2014.05.031. Epub 2014 May 24. PMID: 24867333.
569. Wang F, Flanagan J, Su N, Wang LC, Bui S, Nielson A, Wu X, Vo HT, Ma XJ, Luo Y. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*. 2012 Jan;14(1):22-9. doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.08.002. PMID: 22166544; PMCID: PMC3338343.
570. Wang YJ, Li H, Yang YT, Tie CL, Li F, Xu ZQ, Wang CY. Association of galanin and major depressive disorder in the Chinese Han population. *PLoS One*. 2013 May 31;8(5):e64617. doi: 10.1371/journal.pone.0064617. PMID: 23741354; PMCID: PMC3669409.
571. Wang X, Su H, Copenhagen LD, Vaishnav S, Pieri F, Shope CD, Brownell WE, De Biasi M, Paylor R, Bradley A. Urocortin-deficient mice display normal stress-induced anxiety behavior and autonomic control but an impaired acoustic startle response. *Mol Cell Biol*. 2002 Sep;22(18):6605-10. doi: 10.1128/MCB.22.18.6605-6610.2002. PMID: 12192058; PMCID: PMC135620.
572. Warwick R. Oculomotor organisation. *Ann R Coll Surg Engl*. 1956 Jul;19(1):36-52. PMID: 13340667; PMCID: PMC2378015.
573. Waselus M, Nazzaro C, Valentino RJ, Van Bockstaele EJ. Stress-induced redistribution of corticotropin-releasing factor receptor subtypes in the dorsal raphe nucleus. *Biol Psychiatry*. 2009 Jul 1;66(1):76-83. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.02.014. Epub 2009 Apr 11. PMID: 19362706; PMCID: PMC2728006.
574. Watanabe J, Mishihiro K, Amatsu T, Kanamura S. Absence of paravascular nerve projection and cross-innervation in interscapular brown adipose tissues of mice. *J Auton Nerv Syst*. 1994 Nov;49(3):269-76. doi: 10.1016/0165-1838(94)90173-2. PMID: 7528757.

575. Webster MJ, Knable MB, O'Grady J, Orthmann J, Weickert CS. Regional specificity of brain glucocorticoid receptor mRNA alterations in subjects with schizophrenia and mood disorders. *Mol Psychiatry*. 2002;7(9):985-94, 924. doi: 10.1038/sj.mp.4001139. PMID: 12399952.
576. Weissbourd B, Ren J, DeLoach KE, Guenther CJ, Miyamichi K, Luo L. Presynaptic partners of dorsal raphe serotonergic and GABAergic neurons. *Neuron*. 2014 Aug 6;83(3):645-62. doi: 10.1016/j.neuron.2014.06.024. PMID: 25102560; PMCID: PMC4779447.
577. Weissman MM, Wickramaratne P, Merikangas KR, Leckman JF, Prusoff BA, Caruso KA, Kidd KK, Gammon GD. Onset of major depression in early adulthood. Increased familial loading and specificity. *Arch Gen Psychiatry*. 1984 Dec;41(12):1136-43. doi: 10.1001/archpsyc.1984.01790230022003. PMID: 6508504.
578. Weitemier AZ, Ryabinin AE. Lesions of the Edinger-Westphal nucleus alter food and water consumption. *Behav Neurosci*. 2005 Oct;119(5):1235-43. doi: 10.1037/0735-7044.119.5.1235. PMID: 16300431.
579. Westphal CFO. Über einen Fall von chronischer progressiver Lähmung der Augenmuskeln (Ophthalmoplegia externa) nebst Beschreibung von Ganglienzellengruppen im Bereiche des Oculomotoriuskerns. *Arch Psychiat und Nervenkrankheiten*. 1887 18:846–871.
580. WHO, 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>
581. Wiley RG, Kline IV RH. Neuronal lesioning with axonally transported toxins. *J Neurosci Methods*. 2000 Nov PMID: 11074097
582. Willner P, Gruca P, Lason M, Tota-Glowczyk K, Litwa E, Niemczyk M, Papp M. Validation of chronic mild stress in the Wistar-Kyoto rat as an animal model of treatment-resistant depression. *Behav Pharmacol*. 2019 Apr;30(2 and 3-Spec Issue):239-250. doi: 10.1097/FBP.0000000000000431. PMID: 30204592.
583. Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987;93(3):358-64. doi: 10.1007/BF00187257. PMID: 3124165.
584. Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*. 2005;52(2):90-110. doi: 10.1159/000087097. Epub 2005 Jul 19. PMID: 16037678.
585. Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 1984;83(1):1-16. doi: 10.1007/BF00427414. PMID: 6429692.
586. Winokur G. Depression spectrum disease: description and family study. *Compr Psychiatry*. 1972 Jan;13(1):3-8. doi: 10.1016/0010-440x(72)90028-4. PMID: 5059416.
587. Winokur G, Tanna VL. Possible role of X-linked dominant factor in manic depressive disease. *Dis Nerv Syst*. 1969 Feb;30(2):89-94. PMID: 4975420.
588. Worley PF, Bhat RV, Baraban JM, Erickson CA, McNaughton BL, Barnes CA. Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement. *J Neurosci*. 1993 Nov;13(11):4776-86. doi: 10.1523/JNEUROSCI.13-11-04776.1993. PMID: 8229198; PMCID: PMC6576344.
589. Wu F, Xu HD, Guan JJ, Hou YS, Gu JH, Zhen XC, Qin ZH. Rotenone impairs autophagic flux and lysosomal functions in Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2015 Jan 22;284:900-911. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.11.004. Epub 2014 Nov 13. PMID: 25446361.
590. Wulsin AC, Wick-Carlson D, Packard BA, Morano R, Herman JP. Adolescent chronic stress causes hypothalamo-pituitary-adrenocortical hypo-responsiveness and depression-like behavior in adult female rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2016 Mar;65:109-17. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.12.004. Epub 2015 Dec 23. PMID: 26751968; PMCID: PMC4968078.
591. Xu L, Anwyl R, Rowan MJ. Behavioural stress facilitates the induction of long-term depression in the hippocampus. *Nature*. 1997 May 29;387(6632):497-500. doi: 10.1038/387497a0. PMID: 9168111.
592. Xu L, Füredi N, Lutter C, Geenen B, Pétervári E, Balaskó M, Dénes Á, Kovács KJ, Gaszner B, Kozicz T. Leptin coordinates efferent sympathetic outflow to the white adipose tissue through the midbrain centrally-projecting Edinger-Westphal nucleus in male rats. *Neuropharmacology*. 2022 Mar 1;205:108898. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108898. Epub 2021 Dec 1. PMID: 34861283.
593. Xu L, Scheenen WJ, Leshan RL, Patterson CM, Elias CF, Bouwhuis S, Roubos EW, Myers MG Jr, Kozicz T. Leptin signaling modulates the activity of urocortin 1 neurons in the mouse nonpreganglionic Edinger-Westphal nucleus. *Endocrinology*. 2011 Mar;152(3):979-88. doi: 10.1210/en.2010-1143. Epub 2011 Jan 5. PMID: 21209012; PMCID: PMC3040051.

594. Xu L, Scheenen WJ, Roubos EW, Kozicz T. Peptidergic Edinger-Westphal neurons and the energy-dependent stress response. *Gen Comp Endocrinol.* 2012 Jul 1;177(3):296-304. doi: 10.1016/j.ygcen.2011.11.039. Epub 2011 Dec 7. PMID: 22166814.
595. Xu L. Leptin action in the midbrain: From reward to stress. *J Chem Neuroanat.* 2014 Nov;61-62:256-65. doi: 10.1016/j.jchemneu.2014.06.007. Epub 2014 Jul 5. PMID: 25007718.
596. Xu Y, Day TA, Buller KM. The central amygdala modulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to systemic interleukin-1beta administration. *Neuroscience.* 1999;94(1):175-83. doi: 10.1016/s0306-4522(99)00311-5. PMID: 10613507.
597. Xu L, Bloem B, Gaszner B, Roubos EW, Kozicz T. Sex-specific effects of fasting on urocortin 1, cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and nesfatin-1 expression in the rat Edinger-Westphal nucleus. *Neuroscience.* 2009 Sep 15;162(4):1141-9. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.05.003. Epub 2009 May 6. PMID: 19426783.
598. Xu L, Bloem B, Gaszner B, Roubos EW, Kozicz T. Stress-related changes in the activity of cocaine- and amphetamine-regulated transcript and nesfatin neurons in the midbrain non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus in the rat. *Neuroscience.* 2010 Oct 13;170(2):478-88. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.07.001. Epub 2010 Jul 16. PMID: 20638450.
599. Yang Y, Zhang Q, Ren J, Zhu Q, Wang L, Zhang Y, Geng Z. Evolution of Brain Morphology in Spontaneously Hypertensive and Wistar-Kyoto Rats From Early Adulthood to Aging: A Longitudinal Magnetic Resonance Imaging Study. *Front Aging Neurosci.* 2021 Nov 30;13:757808. doi: 10.3389/fnagi.2021.757808. PMID: 34916922; PMCID: PMC8670306.
600. Yehuda R, Boisoneau D, Mason JW, Giller EL. Glucocorticoid receptor number and cortisol excretion in mood, anxiety, and psychotic disorders. *Biol Psychiatry.* 1993 Jul 1-15;34(1-2):18-25. doi: 10.1016/0006-3223(93)90252-9. PMID: 8373936.
601. Yoshida M, Taniguchi Y. Projection of pro-opiomelanocortin neurons from the rat arcuate nucleus to the midbrain central gray as demonstrated by double staining with retrograde labeling and immunohistochemistry. *Arch Histol Cytol.* 1988 May;51(2):175-83. doi: 10.1679/aohc.51.175. PMID: 2457387.
602. Zaitone SA, Abo-Elmatty DM, Elshazly SM. Piracetam and vinpocetine ameliorate rotenone-induced Parkinsonism in rats. *Indian J Pharmacol.* 2012 Nov-Dec;44(6):774-9. doi: 10.4103/0253-7613.103300. PMID: 23248410; PMCID: PMC3523508.
603. Zalutskaya AA, Arai M, Bounoutas GS, Abou-Samra AB. Impaired adaptation to repeated restraint and decreased response to cold in urocortin 1 knockout mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Jul;293(1):E259-63. doi: 10.1152/ajpendo.00616.2006. Epub 2007 Apr 24. PMID: 17456638.
604. Zelena D, Kiem DT, Barna I, Makara GB. Alpha 2-adrenoreceptor subtypes regulate ACTH and beta-endorphin secretions during stress in the rat. *Psychoneuroendocrinology.* 1999 Apr;24(3):333-43. doi: 10.1016/s0306-4530(98)00081-x. PMID: 10101737.
605. Zhang D, Li S, Hou L, Jing L, Ruan Z, Peng B, Zhang X, Hong JS, Zhao J, Wang Q. Microglial activation contributes to cognitive impairments in rotenone-induced mouse Parkinson's disease model. *J Neuroinflammation.* 2021 Jan 5;18(1):4. doi: 10.1186/s12974-020-02065-z. PMID: 33402167; PMCID: PMC7786472.
606. Zhang J, Fan Y, Li Y, Zhu H, Wang L, Zhu MY. Chronic social defeat up-regulates expression of the serotonin transporter in rat dorsal raphe nucleus and projection regions in a glucocorticoid-dependent manner. *J Neurochem.* 2012 Dec;123(6):1054-68. doi: 10.1111/jnc.12055. Epub 2012 Nov 7. PMID: 23061525; PMCID: PMC3514584.
607. Zhang S, Xu Z, Gao Y, Wu Y, Li Z, Liu H, Zhang C. Bidirectional crosstalk between stress-induced gastric ulcer and depression under chronic stress. *PLoS One.* 2012;7(12):e51148. doi: 10.1371/journal.pone.0051148. Epub 2012 Dec 12. PMID: 23251441; PMCID: PMC3521024.
608. Zhang WH, Liu WZ, He Y, You WJ, Zhang JY, Xu H, Tian XL, Li BM, Mei L, Holmes A, Pan BX. Chronic Stress Causes Projection-Specific Adaptation of Amygdala Neurons via Small-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel Downregulation. *Biol Psychiatry.* 2019 May 15;85(10):812-828. doi: 10.1016/j.biopsych.2018.12.010. Epub 2018 Dec 20. PMID: 30737013; PMCID: PMC6800185.
609. Zhang Y, Kerman IA, Laque A, Nguyen P, Faouzi M, Louis GW, Jones JC, Rhodes C, Münzberg H. Leptin-receptor-expressing neurons in the dorsomedial hypothalamus and median preoptic area regulate

- sympathetic brown adipose tissue circuits. *J Neurosci*. 2011 Feb 2;31(5):1873-84. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3223-10.2011. PMID: 21289197; PMCID: PMC3069639.
610. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994 Dec 1;372(6505):425-32. doi: 10.1038/372425a0. Erratum in: *Nature* 1995 Mar 30;374(6521):479. PMID: 7984236.
611. Zhang ZN, Zhang JS, Xiang J, Yu ZH, Zhang W, Cai M, Li XT, Wu T, Li WW, Cai DF. Subcutaneous rotenone rat model of Parkinson's disease: Dose exploration study. *Brain Res*. 2017 Jan 15;1655:104-113. doi: 10.1016/j.brainres.2016.11.020. Epub 2016 Nov 19. PMID: 27876560.
612. Zhong H, Rong J, Zhu C, Liang M, Li Y, Zhou R. Epigenetic Modifications of GABAergic Interneurons Contribute to Deficits in Adult Hippocampus Neurogenesis and Depression-Like Behavior in Prenatally Stressed Mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2020 Apr 23;23(4):274-285. doi: 10.1093/ijnp/pyaa020. PMID: 32211762; PMCID: PMC7177164.
613. Zhong P, Vickstrom CR, Liu X, Hu Y, Yu L, Yu HG, Liu QS. HCN2 channels in the ventral tegmental area regulate behavioral responses to chronic stress. *Elife*. 2018 Jan 2;7:e32420. doi: 10.7554/eLife.32420. PMID: 29256865; PMCID: PMC5749952
614. Zhu C, Vourc'h P, Fernagut PO, Fleming SM, Lacan S, Dicarlo CD, Seaman RL, Chesselet MF. Variable effects of chronic subcutaneous administration of rotenone on striatal histology. *J Comp Neurol*. 2004 Oct 25;478(4):418-26. doi: 10.1002/cne.20305. PMID: 15384065.
615. Zhu T, Zhou D, Zhang Z, Long L, Liu Y, Fan Q, Chen F, Zhang X, Wu Y, Zeng H, Verkhatsky A, Zhao J, Nie H. Analgesic and antipruritic effects of oxymatrine sustained-release microgel cream in a mouse model of inflammatory itch and pain. *Eur J Pharm Sci*. 2020 Jan 1;141:105110. doi: 10.1016/j.ejps.2019.105110. Epub 2019 Oct 22. PMID: 31654757.
616. Ziegler DR, Cass WA, Herman JP. Excitatory influence of the locus coeruleus in hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to stress. *J Neuroendocrinol*. 1999 May;11(5):361-9. doi: 10.1046/j.1365-2826.1999.00337.x. PMID: 10320563.
617. Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol*. 2006 Jan 20;494(3):528-48. doi: 10.1002/cne.20823. Erratum in: *J Comp Neurol*. 2006 Dec 1;499(4):690. PMID: 16320257; PMCID: PMC4524499.