

**SZOMATOSZTATIN 4 RECEPTOR ÉS KAPSZAICIN-
ÉRZÉKENY NEURONOK SZEREPÉNEK
VIZSGÁLATA STRESSZ ÉS FÁJDALOM
EGÉRMODELLJEIBEN**

Doktori (PhD) értekezés

dr. Scheich Bálint

Doktori Iskola vezetője, programvezető: Prof. Dr. Pintér Erika

Témavezetők: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna

Dr. Gaszner Balázs

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet



Pécs, 2016.

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
1. A stressz	8
1.1. A stressz fogalma, főbb mechanizmusai, története.....	8
1.2. A stressz jelentősége, a stresszhez kapcsolható betegségek.....	10
1.2.1. <i>A depresszió</i>	11
1.2.2. <i>Szorongásos betegségek</i>	12
1.2.3. <i>A stressz és a krónikus fájdalom összefüggései</i>	13
1.3. A stresszhez kapcsolható betegségek állatmodelljei.....	14
1.3.1. <i>A szorongás és depresszió-szerű viselkedés vizsgálata</i>	15
1.3.2. <i>A depresszió modellezése</i>	15
1.3.3. <i>A krónikus stressz és a nocicepció interakciói állatmodellekben</i>	16
1.4. A stressz neuronális mechanizmusai és hatásai.....	17
1.4.1. <i>A stresszhez kapcsolódó emocionális, kognitív és magatartási folyamatok agyi szerveződése</i>	17
1.4.2. <i>A HPA-tengely agyi szabályozása</i>	18
1.4.3. <i>A stressz- és fájdalomérző rendszerek összefüggései</i>	19
2. A szomatosztatin és receptorai	20
2.1. A szomatosztatin.....	20
2.2. A szomatosztatin receptorai.....	22
2.2.1. <i>Az sst₄ receptor</i>	23
3. A kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok	24
CÉLKITŰZÉSEK	27
KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	28
1. Kísérleti állatok	28
2. Kísérleti elrendezések, csoportok	28
2.1. Az sst ₄ receptor szerepének vizsgálata szorongásban és depresszió-szerű viselkedésben.....	28
2.1.1. <i>Perfúzió és szövetfeldolgozás</i>	29
2.2. KVS.....	30
2.2.1. <i>Plazma mintavétel, perfúzió, szövetfeldolgozás és szervsúly mérés</i>	30
2.3. KRS.....	31

2.3.1. Perfúzió, szövetfeldolgozás és szervsúly mérés.....	31
3. Farmakológiai módszerek.....	32
3.1. J-2156 kezelés.....	32
3.2. RTX előkezelés.....	33
4. Vizsgálati módszerek.....	33
4.1. Viselkedéstesztetek.....	33
4.1.1. Emelt keresztpalló teszt (EKP).....	33
4.1.2. Sötét-világos doboz teszt (SVD).....	33
4.1.3. Open field teszt (OFT).....	34
4.1.4. Forced swim teszt (FST).....	34
4.1.5. Tail suspension teszt (TST).....	35
4.1.6. Szacharóz preferencia teszt (SPT).....	35
4.2. Nocicepció tesztek.....	36
4.2.1. Dinamikus plantáris eszteziometria (DPA).....	36
4.2.2. Hidegtolerancia teszt.....	36
4.2.3. Emelkedő hőmérsékletű forrólap teszt.....	37
4.3. Immunhisztokémiai módszerek.....	37
4.3.1. Fos és FosB immunhisztokémia.....	37
4.3.2. Sst4 ^{LacZ} immunhisztokémia.....	40
4.4. Kortikoszteron radioimmunoassay (RIA).....	40
4.5. Hátsó láb szövetek homogenizálása és citokin koncentrációmérések.....	41
5. Statisztikai módszerek.....	41
6. Etikai vonatkozások.....	42
EREDMÉNYEK, MEGBESZÉLÉS.....	43
1. Az sst4 receptor szerepe a szorongás és depresszió-szerű viselkedés szabályozásában, egérmodellekben.....	43
1.1. Eredmények.....	43
1.1.1. Az Sstr4 gén hiánya és az sst4 aktiváció befolyásolja az akut stressz-situációkban mutatott viselkedést.....	43
1.1.2. Stresszhez kapcsolható agyterületek stressz-indukált aktivációs mintázatának változása sst4 aktiváció hatására és az Sstr4 gén hiányában.....	45
1.1.3. Sst4 expresszió a stresszhez kapcsolható agyterületeken.....	51
1.2. Összefoglalás, megbeszélés, következtetések.....	52

2. Az <i>Sstr4</i> génhiányos egerek fokozott érzékenysége krónikus stressz-indukált viselkedéses és neuroendokrin változásokra.....	59
2.1. Eredmények.....	59
2.1.1. <i>Módosult viselkedéses válaszok KVS-re <i>Sstr4</i>^{-/-} egerekben.....</i>	<i>59</i>
2.1.2. <i>Neuroendokrin és szomatikus paraméterek változása az <i>Sstr4</i> gén-deléció és a KVS hatására.....</i>	<i>65</i>
2.1.3. <i>Az <i>Sstr4</i> gén-deléció és a KVS hatása a stresszhez kapcsolható agyterületek aktivációs mintázatára.....</i>	<i>65</i>
2.2. Összefoglalás, megbeszélés, következtetések.....	66
3. Kapszaicin-érzékeny neuronok szerepének vizsgálata krónikus stressz hatására létrejövő nociceptív válaszokban.....	72
3.1. Eredmények.....	72
3.1.1. <i>A mechano- és termonocicepció változásai KRS és RTX deszenzibilizáció hatására.....</i>	<i>72</i>
3.1.2. <i>Viselkedésváltozások KRS és RTX deszenzibilizáció után.....</i>	<i>72</i>
3.1.3. <i>Szomatikus paraméterek változása KRS és RTX deszenzibilizáció után.....</i>	<i>76</i>
3.1.4. <i>A KRS és RTX deszenzibilizáció hatása a stresszhez kapcsolható agyterületek aktivációs mintázatára.....</i>	<i>76</i>
3.1.5. <i>A KRS és RTX deszenzibilizáció hatása a perifériás citokin koncentrációkra.....</i>	<i>78</i>
3.2. Összefoglalás, megbeszélés, következtetések.....	79
ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS EGYSÉGES ÉRTELMEZÉSE.....	84
IRODALOMJEGYZÉK.....	86
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK.....	107
IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK.....	108
EGYÉB EREDETI PBLIKÁCIÓ.....	109
KONGRESSZUSI SZÓBELI ELŐADÁSOK JEGYZÉKE.....	110
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	111
MELLÉKLET.....	112

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Egyes esetekben, például bizonyos viselkedéstervezetek említésekor, angol kifejezéseket és azok rövidítését alkalmaztam, mert magyar megfelelőjük nem terjedt el a tudományos nyelvben (pl. *tail suspension* teszt – TST). A központi idegrendszeri struktúrák latin elnevezéseit alkalmaztam, egyes anatómiai neveknél azonban az angol megfelelőikből származó rövidítéseket használtam, mert ezek igen elterjedtek a magyar tudományos nyelvben is (pl. *lateral septum* – LS). Egyes hormonok nevinél hasonló megfontolásból használtam az angol eredetű rövidítést (pl. *adrenocorticotrophic hormone* – ACTH).

ACC: anterior cingularis cortex

ACTH: *adrenocorticotrophic hormone* = adrenokortikotrop hormon

ANOVA: *analysis of variance* = varianciaanalízis

AVP: arginin vazopresszin

BLA: nucleus basolateralis amygdalae

CeA: nucleus centralis amygdalae

CRH: *corticotropin releasing hormone* = kortikotropin felszabadulást serkentő hormon

DMH: nucleus dorsomedialis hypothalami

DPA: *dynamic plantar aesthesiometry* = dinamikus plantáris eszteziometria

dPAG: *dorsal periaqueductal grey matter* = periaqueductalis szürkeállomány dorsalis része (substantia grisea centralis, pars dorsalis)

dRN: *dorsal raphe nucleus* = nucleus raphe dorsalis

EKP: emelt keresztpalló teszt

EWcp: centrálisan projiciáló nucleus Edinger-Westphal

FHSz: gerincvelő, felületes hátsó szarv

FM: fibromialgia

FST:	<i>forced swim</i> teszt
G-CSF:	<i>granulocyte colony stimulating factor</i> = granulocita kolónia stimuláló faktor
HPA-tengely:	<i>hypothalamo-pituitary-adrenal</i> = hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengely
HRP:	<i>horseradish peroxidase</i> = torma peroxidázt
IFNγ:	interferon γ
IL:	interleukin
InsC:	insularis cortex
i.p.:	intraperitoneális
KC:	kemokin CXCL1
KRS:	krónikus <i>restraint</i> stressz
KVS:	krónikus variábilis stressz
IPAG:	<i>lateral periaqueductal grey matter</i> = periaqueductalis szürkeállomány lateralis része (substantia grisea centralis, pars lateralis)
LS:	<i>lateral septum</i> = septum laterale
MCP-1:	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i> = monocyta kemoattraktáns protein-1
mPFC:	medialis prefrontalis cortex
mPVN:	nucleus paraventricularis hypothalami, pars magnocellularis
NGS:	<i>normal goat serum</i> = normál kecske szérum
NIST:	nucleus interstitialis striae terminalis
OFT:	<i>open field</i> teszt
PAG:	<i>periaqueductal grey matter</i> = periaqueductalis szürkeállomány (substantia grisea centralis)
PBS:	<i>phosphate buffered saline</i> = foszfát pufferelt sóoldat

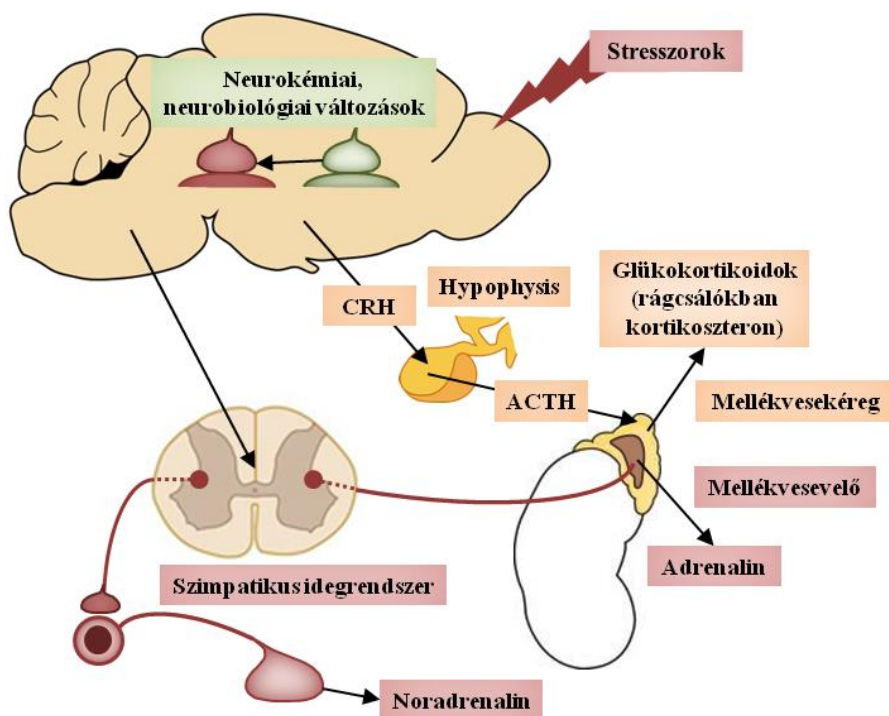
PFA:	paraformaldehid
PFC:	prefrontalis cortex
PVN:	nucleus paraventricularis hypothalami
pPVN:	nucleus paraventricularis hypothalami, pars parvocellularis
RANTES:	<i>regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i> , más néven kemokin CCL5
RIA:	<i>radioimmunoassay</i>
RTX:	reziniferatoxin
RVM:	rostralis ventromedialis medulla
SEM:	<i>standard error of the mean</i> = az átlag standard hibája
SNRI:	szerootonin-noradrenalin <i>reuptake</i> inhibitor
SPT:	szacharóz preferencia teszt
SRIF:	<i>somatotropin release inhibiting factor</i> = szomatotropin felszabadulást gátló faktor
SsC:	szomatoszenzoros cortex
SSRI:	szelektív szerootonin <i>reuptake</i> inhibitor
SVD:	sötét-világos doboz teszt
TNFα:	tumor nekrózis faktor α
TRPV1:	transziens receptor potenciál vanilloid 1
TST:	<i>tail suspension</i> teszt

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. A stressz

1.1. A stressz fogalma, főbb mechanizmusai, története

A stressz definíciója Selye János, a kifejezés és a stressz-koncepció megalkotója szerint „*a szervezet bármely igénybevételre adott nem specifikus válasza*” (Selye, 1936; Szabó, 1998). A stressz a homeosztázist veszélyeztető hatásokra adott adaptív válaszként lehet élettani jelenség, azonban erősségétől, ill. időtartamától függően patológiás következményekkel is járhat. A szervezet a különböző jellegű (pszichológiai, fizikai, biológiai, stb.) igénybevételekre (stresszorokra) hasonló vegetatív idegrendszeri és neuroendokrin válaszokkal reagál (1. ábra).



1. ábra. A stressz főbb vegetatív idegrendszeri és neuroendokrin komponensei (Herman és Cullinan, 1997 alapján).

Akut veszélyhelyzetekben a Cannon-féle vészreakció során a szimpatikus idegvégződésekből noradrenalin, a mellékvesevelőből pedig adrenalin szabadul fel. Selye írta le az ún. „stressz triászt” (mellékvese megnagyobbodás, gastrointestinalis fekélyek, thymolymphaticus

atrophia), amelynek nyomán felismerte a hypothalamus-hypophysis-mellékvese (*hypotahalamo-pituitary-adrenal* - HPA) tengelynek, mint a stressz központi endokrin tengelyének a jelentőségét. A stresszorokra adott válaszként a nucleus paraventricularis hypothalami-ból (PVN) kortikotropin felszabadulást serkentő hormon (*corticotropin releasing hormone* - CRH) és arginin vazopresszin (AVP) szabadul fel, amelyek az adenohypophysisbe jutva serkentik az adrenokortikotrop hormon (*adrenocorticotropic hormone* - ACTH) termelését és ürülését (Herman és Cullinan, 1997). Az ACTH fokozza a mellékvesekéregben a glükokortikoidok termelését (emberben funkcionálisan legfontosabb a kortizol, rágcsálókban ennek megfelelője a kortikoszteron), amelyek (a szimpatikus idegrendszer aktivációjával együtt) az összes szervrendszerre kifejtett rendkívül komplex hatásaik révén felelősek a stresszorokra adott szervezetszintű válaszáért. Megemlítenéd, hogy ezen alapvető felfedezések óta több más endokrin rendszer szerepére is fény derült a stressz-válaszban.

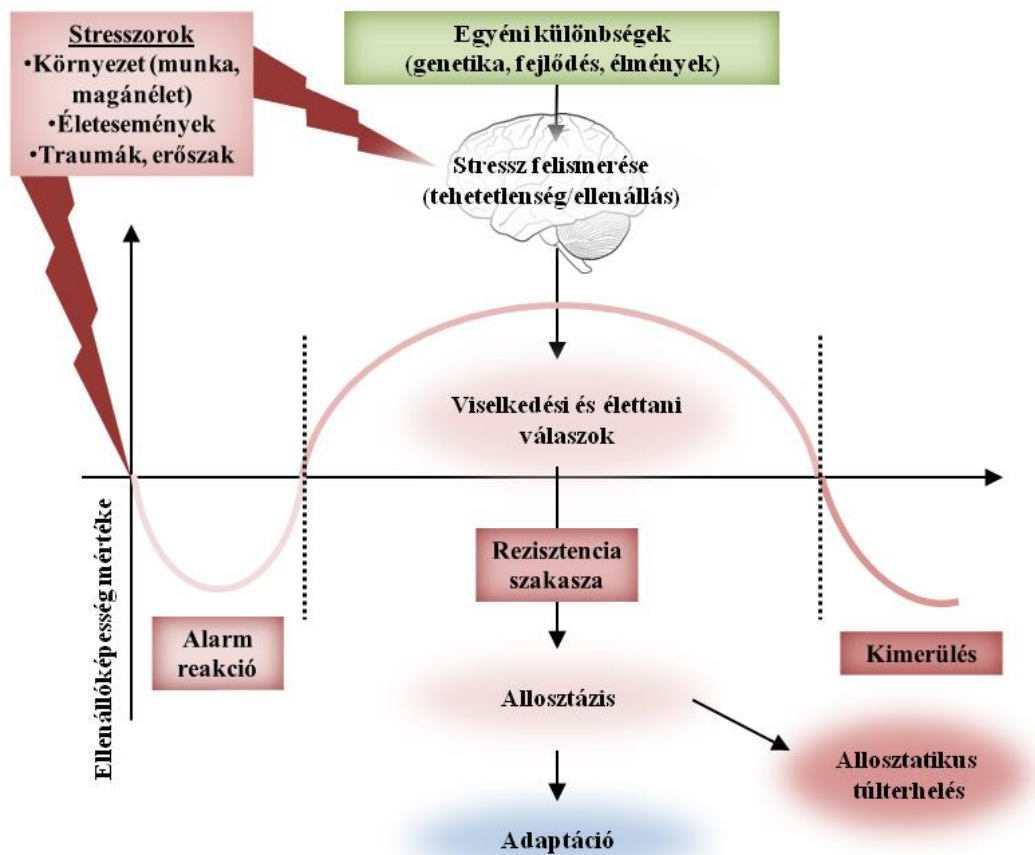
A stresszorok különböző szempontok szerinti csoportosítása lényeges mind az stresszhez kapcsolódó emberi kóros folyamatok, mind ezek állatkísérletes modelljei szempontjából.

- A stresszorok szubjektív értékelése és a velük való megküzdés egyrészt a stresszorok erősségétől, másrészt az egyéni érzékenységtől függ, amit a genetikai háttér, a fejlődés és az élet során szerzett élmények határoznak meg. Eszerint elkülöníthetünk „jó” stresszorokat, amelyekkel a szervezet képes megküzdni az ún. „eustressz” révén, amely adaptív folyamatokat jelent és az ellenálló-képességet növeli. Ezzel szemben a tehetetlenség érzésével járó, kezelhetetlen vagy „rossz” stresszorok kimerülést, patológiás válaszokat és a sérülékenység növekedését, azaz „diszstresszt” eredményeznek.
- Jellegük szerint elkülöníthetők pszichológiai (pl. magánéleti nehézségek, munkahelyi megterhelés, lelki traumák, erőszak), biológiai (pl. fertőzések), fizikai (pl. hőhatás, sugárártalom), kémiai (pl. levegőszennyezés), stb. stresszorok.
- Igen lényeges az expozíció időtartama szerinti elkülönítés akut és ismétlődő vagy hosszantartó krónikus stresszorokra.

A stresszorokra adott válasz dinamikájának eredeti leírása az általános adaptációs szindróma szakaszainak keretében szintén Selye Jánostól származik (Selye, 1950), majd később pontosításra került (**2. ábra**).

1. Elsőként a stresszor felismerése és egyéni különbségektől függő értékelése után ún. alarm reakció következik be, amely az ellenállóképesség átmeneti csökkenésével jellemezhető és beindítja a stressz neuroendokrin folyamatait.

2. Ha a stresszor hosszabb ideig van jelen, a rezisztencia szakaszában a szervezet igyekszik fenntartani a homeosztázist, ellenálló-képessége nő. Az allosztázis a homeosztázist fenntartó folyamatok összessége (McEwen, 2012), ami a szervezet számára kezelhető stresszorok esetén adaptációhoz vezethet.
3. Hosszantartó, ill. kezelhetetlen stresszorok a szervezet kimerülését okozzák, amely kóros folyamatokat indukál és változatos betegségek formájában nyilvánulhat meg. A kimerülés során az allosztatikus folyamatok túlműködése, a szervezet allosztatikus túlterhelése jelentkezik.



2. ábra. A stressz dinamikája, a stressz-válasz szakaszai (Selye, 1950, ill. McEwen, 2012 alapján).

1.2. A stressz jelentősége, a stresszhez kapcsolható betegségek

A stressz-kutatások jelentőségét a stresszhez kapcsolható számos, klinikailag igen jelentős kórkép adja, amelyek mind egyéni mind társadalmi szinten súlyos problémát jelentenek. A stressz, mint etiológiai tényező vagy a lefolyást, ill. terápia választ befolyásoló faktor számos

betegségben jelentős. Itt csak a dolgozat alapját képező kísérletek szempontjából lényeges pszichiátriai betegségek, a depresszió és szorongásos kórképek epidemiológiája, patomechanizmusa és gyógyszeres terápiája, ill. a stressz és krónikus fájdalom összefüggései kerülnek rövid bemutatásra.

1.2.1. A depresszió

A depresszió a hangulat általában epizodikusan visszatérő, hosszan tartó negatív irányba tolódását jelenti, amely jellegzetes kognitív és vegetatív, ill. testi tünetekkel jár (pl. testsúlyzavarok, alvászavar, szexuális diszfunkció, stb.). A depressziós epizódokat az érdeklődés, motiváció hiánya és az örömeire való képtelenség (anhedónia) jellemzik és az életminőség jelentős romlásához, a szociális kapcsolatok lazulásához, munkaképtelenséghez, ill. súlyosabb esetben öngyilkossághoz vezethetnek. A depresszió előfordulhat önmagában (unipoláris depresszió) vagy mániás (a hangulat másik végletbe csapása) epizódokkal keveredve, bipoláris zavar részeként. A jelenség rendkívül gyakori, a nyugati típusú társadalmakban élettartam-pervalenciája 15-25% (Kormos és Gaszner, 2013) és világszerte a rokkantság vezető oka (WHO, 2012). 2010-ben az Európai Unióban az idegrendszeri betegségek költségeinek (798 milliárd €) több mint felét a mentális betegségek költségei (461 milliárd €) tették ki. Utóbbiak közül a depresszió költségei szempontjából az első (összesen az európai GDP 1%-a), a szorongásos betegségek a 4. helyen állnak (Gustavsson és mtsai., 2011).

A depresszió patomechanizmusára vonatkozó első elmélet az első, véletlenül felfedezett antidepresszánsok hatásmechanizmusán alapuló ún. monoamin teória volt, amely a betegség kialakulásáért az agyi monoamin típusú neurotranszmitterek (noradrenalin, szerotonin és dopamin) szintjének és felszabadulásának csökkenését tette felelőssé, ami azonban önmagában nem magyarázza a tüneteket (Nabeshima és Kim, 2013). A depresszió kialakulásának okait és mechanizmusát korszerű módon írja le az ún. három találat elmélet (Daskalakis és mtsai., 2013). Eszerint a depresszió és általában a stresszhez kapcsolódó mentális zavarok kialakulásához három faktor együttes jelenléte és interakciója szükséges:

1. **Genetikai hajlam**, amely az agyat érzékenyíti a környezeti stresszorokra (pl.: a szerotonin-transzportert kódoló gén (*SLC6A4*) promotor régiójában található egyik variáció (rövid *5-HTTLPR*) Canli és Lesch, 2007).
2. **Korai (intrauterin és posztnatális) hatások** (pl. anyai stressz, gyermekkori traumák), amelyek érzékenyítik az egyént a későbbi stresszorokkal szemben. E korai hatások

jelen ismereteink szerint elsősorban epigenetikai változások (pl. DNS-metilációs változások; Klengel és mtsai., 2008) révén fejtik ki hatásukat az agyban.

3. **Felnőttkori stressz**, amely az első két „találat” talaján kialakult fokozottan érzékeny fenotípussal rendelkező egyéneknél végül a klinikai tünetek kialakulásához vezet.

A depresszió terápiájában jelenleg alkalmazott szerek még mindig elsősorban a monoaminerg neurotranszmissziót befolyásolják főleg a monoaminok preszinaptikus idegvégződésekre való visszavételének (pl. szelektív szerotonin *reuptake* inhibitorok (SSRI), triciklusos antidepresszánsok) vagy lebomlásuk (monoamin oxidáz A) gátlásával. E szerekre jellemző, hogy hatásukat hosszú idő alatt, hónapokkal a kezelés megkezdése után fejtik ki, a terápia betegek kb. 30-50%-ban hatástalan (Krishnan és Nestler, 2008; Hodes és mtsai., 2015) és számos mellékhatással is számolni kell, ezért az új gyógyszercélpontok azonosítására intenzív kutatások irányulnak.

1.2.2. Szorongásos betegségek

A patológiás szorongással járó állapotok közé a DSM-5 (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5. kiadás, 2013) szerint meghatározott szorongásos zavarok (pánikzavar, fóbiák, stb.), a kényszeres és kapcsolódó zavarok, ill. a traumával- és stresszrel összefüggő zavarok (pl. poszt-traumás stressz szindróma) tartoznak. Bár e kórképek a kiváltó esemény és a klinikai megjelenés tekintetében különböznek, közös jellemzőjük a kóros mértékű szorongás jelenléte, amely az életminőség és a mindennapi funkciók ellátásának súlyos zavarához vezet. A szorongás túlfokozott éberséggel, aggodalommal, negatív elvárásokkal járó érzelmi állapot, amelyet jellegzetes testi tünetek kísérnek és (szemben a félelemmel) nem párosul valós veszélyhelyzettel. Az Egyesült Államokban végzett felmérések szerint a szorongással járó betegségek prevalenciája 18,1% (Kessler és mtsai., 2005a), élettartam prevalenciája pedig 28,8% (Kessler és mtsai., 2005b). Fontos megjegyezni, hogy a szorongásos és depressziós tünettan gyakran együtt fordul elő.

A szorongásos kórképek kialakulásában a depresszióhoz hasonlóan a „három találat” mechanizmus játszik szerepet, vagyis a genetikai sérülékenység (Kilpatrick és mtsai., 2007) és a korai környezeti hatások együtt sérülékeny fenotípust alakítanak ki, majd a későbbi stresszorok létrehozzák a pszichopatológiai eltéréseket (Norrholm és mtsai., 2009).

A szorongásos kórképek nagy klinikai jelentősége ellenére kezelésükre meglepően kevés gyógyszeres terápiás eszköz áll rendelkezésre. A GABA_A receptorok pozitív allosterikus modulátoraiként ható benzodiazepinek kiterjedten használt szerek a szorongásos tünetek kezelésére, használatukat azonban erősen korlátozza magas addiktív és abúzuspotenciáljuk.

A hosszú távú kezelésben az SSRI és szerotonin-noradrenalin *reuptake* inhibitor (SNRI) készítmények és egyes esetekben néhány más vegyület (pl. a szerotonin-5-HT_{1A} receptor parciális agonistája, a buspiron) használhatók (Hoffman és Mathew, 2008). Összességében azonban a szorongásos kórképek farmakoterápiája nem tekinthető megoldottnak.

1.2.3. A stressz és a krónikus fájdalom összefüggései

Kiterjedt kísérletes és klinikai adatok bizonyítják, hogy az emocionális faktorok, ill. a stressz és a nociceptív rendszerek kétirányú interakciói fontos szerepet játszanak mind a fiziológiás fájdalompercepcióban, mind krónikus fájdalomállapotokban (Baliki és Apkarian, 2015). Utóbbiak rendkívül súlyos egészségügyi problémát jelentenek, gyakran vezetnek rokkantsághoz, azonban patomechanizmusuk nem világos és gyógyszeres terápiájuk sem megoldott. A krónikus stressz számos fájdalommal járó betegség lefolyását befolyásolja, mint a rheumatoid arthritis vagy a neuropátiás fájdalom (Zautra és mtsai, 2007), míg más kórképek esetében inkább fontos kórélettani komponensnek tekinthető. A gyakori izom- és vázrendszeri fájdalomállapotok, mint pl. a fibromialgia (FM), környezeti stresszorok és genetikai faktorok összjátékának következtében alakulnak ki (Diatchenko és mtsai., 2013). Mivel ez utóbbi köthető legerősebben a stresszhez, a stressz és a krónikus fájdalom összefüggéseinek jelentősége az FM példáján kerül rövid bemutatásra.

Az FM krónikus, test szerte jelentkező fájdalommal járó szindróma, amit klinikailag diffúz nyomásérzékenység jellemez, amely bizonyos testpontok enyhe nyomásakor különösen erős. Jellemző a krónikus fáradtság és alvászavarok előfordulása is, azonban általában minden feltűnő gyulladásos vagy neurológiai eltérés nélkül jelentkezik.

Az FM igen gyakori, prevalenciája a teljes populációban 2-4%-ra tehető (Jones és mtsai, 2015), ennek ellenére etiológiája és patomechanizmusa mind a mai napig nagyrészt ismeretlen. A depresszió, ill. a neuropátiás fájdalom és az FM igen gyakori együttes előfordulása (kb. 40%; Sluka, 2009) és a sok szempontból hasonló genetikai (Buskila és Sarzi-Puttini, 2006), ill. strukturális és funkcionális központi idegrendszeri elváltozások részben összefedő patofiziológiai mechanizmusok jelenlétére utalnak (Maletic és Raison, 2009). Mindez aláhúzza a stressz és a fájdalomérző és szabályozó rendszerek közötti interakciók jelentőségét (McEwen és Kalia, 2010).

Egyértelmű, hogy hasonlóan a többi krónikus fájdalomállapothoz, az FM kialakulásában is alapvető szerepet játszik a centrális szenzitizáció (Yunus, 2008), amely olyan agyi és gerincvelői szintű plaszticitási folyamatok összessége, amelyek következményeként a fájdalomérzés kórossá válik. Csökken a fájdalomküszöb, ill. normálisan nem fájdalmas

(allodínia) vagy enyhén fájdalmas ingerek (hiperalgézia) is erős fájdalomérzetet váltanak ki. A perifériás idegrendszer szerepe jóval kevésbé ismert, azonban e kérdés újabb klinikai adatok szerint igen jelentős lehet. A neuropátiás állapotok mellett FM-ben is kimutatható a fájdalom közvetítéséért felelős perifériás A δ - és C- (vékonyan mielinizált és nem mielinizált) rostok számának és funkciójának paradox csökkenése (Üçeyler és mtsai., 2013; Serra és mtsai., 2014). Az utóbbi időben keletkezett kísérletes adatok hangsúlyozzák az egyes specifikus perifériás nociceptor populációk egyedi jelentőségét különböző fájdalom-modalitásokban és krónikus fájdalomállapotokban (Minett és mtsai., 2014).

Az immunológiai elváltozások és neuro-immun zavarok szerepe szintén egyre világosabb a krónikus fájdalom kialakulásában, ami tovább fokozza a kórélettani folyamatok bonyolultságát (Scholz és Woolf, 2007). A pro- és anti-inflammatorikus citokinek egyensúlyának zavarát FM-ben is feltételezik, azonban az eddigi klinikai adatok igen ellentmondásosak (Üçeyler és mtsai., 2011; Üçeyler és mtsai., 2014).

Az FM gyógyszeres kezelésében, hasonlóan a neuropátiás fájdalmakhoz, a hagyományos fájdalomcsillapító szerek (nem szteroid gyulladáscsökkentők, opioidok) hatástalanok. Bár néhány szer (pl. a Ca²⁺-csatorna gátló pregabalin és gabapentin és egyes antidepresszánsok) használható (Smith és mtsai., 2011), összességében az FM és egyéb, stresszhez köthető krónikus fájdalomállapotok gyógyszeres terápiája megoldatlan. Ezért a patomechanizmus megismerése, amely a stressz és fájdalomrendszerek (beleértve a perifériás nociceptorokat is) interakcióinak megértését is magában foglalja, alapvető fontosságú az új gyógyszer-célpontok azonosításához.

1.3. A stresszhez kapcsolható betegségek állatmodelljei

A stresszhez kapcsolódó betegségek modellezése állatokban e kórképek számos sajátosan emberi vonása és patofiziológiájuk korlátozott ismerete miatt igen nehéz. Ennek ellenére a fent említett betegségeknek számos állatmodellje (elsősorban rágcsálókban) létezik és a stressz neurobiológiájának több aspektusa e modellekből vált ismertté. Az állatmodelleknek a következő általánosan elfogadott kritériumokat kell teljesíteniük (Belzung és Griebel, 2001):

1. **Látszat („face”) validitás:** az állat megfigyelhető fenotípusának mérhető viselkedéses és élettani paramétereket figyelembe véve hasonlítania kell a megfelelő emberi kórállapot tüneteire.

2. **Konstrukt validitás:** a megfelelő emberi betegség és az állatmodellben jelentkező módosulások háttérében ugyanazoknak a mechanizmusoknak kell állniuk, hasonló neurobiológiai eltéréseken kell alapulniuk.
3. **Prediktív (farmakológiai) validitás:** az adott betegségtől szenvedő pácienseken már sikerrel alkalmazott szerek megfelelő irányú hatásokat váltanak ki. Az állatmodell legyen alkalmas új gyógyszercélpontok azonosítására és a gyógyszerfejlesztés szempontjából potenciálisan érdekes vegyületek tesztelésére.

Az irodalomból rendkívül nagyszámú állatmodell ismert, itt csupán a dolgozat szempontjából legfontosabb alapelvek kerülnek bemutatásra.

1.3.1. A szorongás és depresszió-szerű viselkedés vizsgálata

A szorongás és depresszió-szerű viselkedés jellemzésére leggyakrabban használt tesztek alapja, hogy az állatokat valamilyen akut stresszornak teszik ki, majd ebben a szituációban vizsgálják viselkedésük valamely releváns paraméterét.

A szorongást vizsgáló tesztek általában a rágcsálók világos, nyitott terekkel szembeni averziója, szorongása és az új, ismeretlen helyek explorációjára irányuló motivációja közti konfliktuson alapulnak. E modellekben az állatok általában valamilyen biztonságot nyújtó (pl. zárt, sötét) és egy nyílt, megvilágított tér közül választhatnak különböző elrendezésekben (Calhoon és Tye, 2015). Ezekben a tesztekben a benzodiazepinek bizonyítottan csökkentik a szorongás paramétereit (pl. világos/nyílt terekben töltött idő) (Borsini és mtsai., 2002).

A depresszió-szerű viselkedés jellemzéséhez az állatok valamilyen kontrollálhatatlan stresszhelyzettel (pl. vízbe dobás, fellógatás a faroknál fogva) való megküzdését vizsgáljuk. Depresszió-szerű viselkedésen a passzivitást, a viselkedésben megnyilvánuló „reménytelenséget”, „kétségbeesést” értjük, amely könnyen mérhető (pl. immobilitással töltött idő formájában) (Krishnan és Nestler, 2010). E viselkedési paraméterek érzékenysége a klinikailag már bevált antidepresszánsokra jól ismert (Cryan és mtsai., 2005).

A hangulatzavarok egyéb tüneteire hasonló viselkedésformák tanulmányozása is lehetséges (pl. alvászavarok, szociális és kognitív zavarok, stb.). Jó példa erre a rágcsálók édes íz (cukoroldat) iránti preferenciájának csökkenése, amelyet az anhedónia (örömeire való képtelenség) vizsgálatára alkalmaznak (Willner és mtsai., 1987).

1.3.2. A depresszió modellezése

Az előző részben leírt elveket alkalmazó tesztek az állatok fenotípusának valamely aspektusát jellemzik. A depresszió valódi modelljeinek azonban azok a kísérleti paradigmák tekinthetők,

amelyekben az állatokat a depresszió egy vagy több fő etiológiai tényezőjének kitéve ahhoz hasonló jellemzőket mutató állapotot lehet létrehozni. Ezek a modellek általában valamilyen genetikai manipulációt vagy perinatális, ill. felnőttkori krónikus stresszt jelentenek. Az utóbbi évtizedekben igen nagyszámú ilyen modellt fejlesztettek ki (bővebben lsd. Nestler és mtsai., 2002).

Gyakran használt, valid és nagy transzlációs relevanciával bíró rágcsáló modell a krónikus variábilis stressz (KVS) (Katz és Hersch, 1981; Katz és mtsai., 1981). Ennek során az állatokat hosszú ideig (ált. 3-6 hét) állandóan változó stresszoroknak teszik ki az adaptáció elkerülése érdekében. E modellben számos kutatócsoport kimutatta a szorongás, a depresszió-szerű viselkedés és az anhedónia paramétereinek növekedését, ill. a HPA-tengely aktivitásának fokozódását (Willner, 1997). Számos depressziós egyénben tapasztalt neurobiológiai változás kimutatható KVS-nek kitétt állatokban is (Hill és mtsai., 2012).

1.3.3. A krónikus stressz és a nocicepció interakciói állatmodellekben

A krónikus stressz hatásait a nocicepcióra széles körben vizsgálják e jelenség nagy klinikai jelentősége miatt. A kísérletes pszichológiai stressz mind egészséges egyénben, mind krónikus fájdalomtól szenvedő betegekben jelentősen fokozza a fájdalomérzést (Crettaz és mtsai., 2013). Ennek analógiájára szubakut és krónikus stressz-modellekben (pl. hideg, zaj, erőltetett úsztatás vagy *restraint*) a fájdalomküszöb csökkenését, hiperalgétia és allodínia kialakulását írták le rágcsálókban is (Imbe és mtsai., 2006; Jennings és mtsai., 2014). A krónikus stressz hatására létrejövő nociceptív változásokat gyakran az FM állatkísérletes modelljeiként interpretálják (DeSantana és mtsai., 2013). Bár e modellek a patomechanizmust teljes komplexitásában valószínűleg nem reprodukálják, a belőlük nyert adatok releváns információkkal szolgálhatnak az FM és általában a krónikus fájdalom megértéséhez. Az ilyen jellegű vizsgálatok transzlációs jelentőségét és farmakológiai validitását igazolja, hogy a stressz-indukált hiperalgétia FM-ben használt gyógyszerekkel csökkenthető (Nishiyori és Ueda, 2008).

A stressz élettani mechanizmusainak és immunrendszerre kifejtett hatásának vizsgálatára régóta alkalmazott krónikus *restraint* stressz (KRS) mozgáskorlátozás révén egy összetett (fizikai és mentális) stresszor ismételt alkalmazását jelenti, amelyre gyengébb az adaptáció, mint más stresszorok (pl. ismételt hideg stressz) esetén (Jaggi és mtsai., 2011.). A KRS-nek kitétt állatokban különböző típusú ingerekkel szembeni hiperalgétia alakul ki (Bardin és mtsai., 2009). Megjegyzendő, hogy az akut stresszorok jellemzően inkább fájdalomcsillapító hatásúak. A stressz-indukált analgétia mechanizmusának kutatása nagyban hozzájárult az

endogén fájdalomcsillapító rendszerek élettani működésének megértéséhez (Butler és Finn, 2009), a krónikus fájdalom szempontjából azonban kevésbé jelentős.

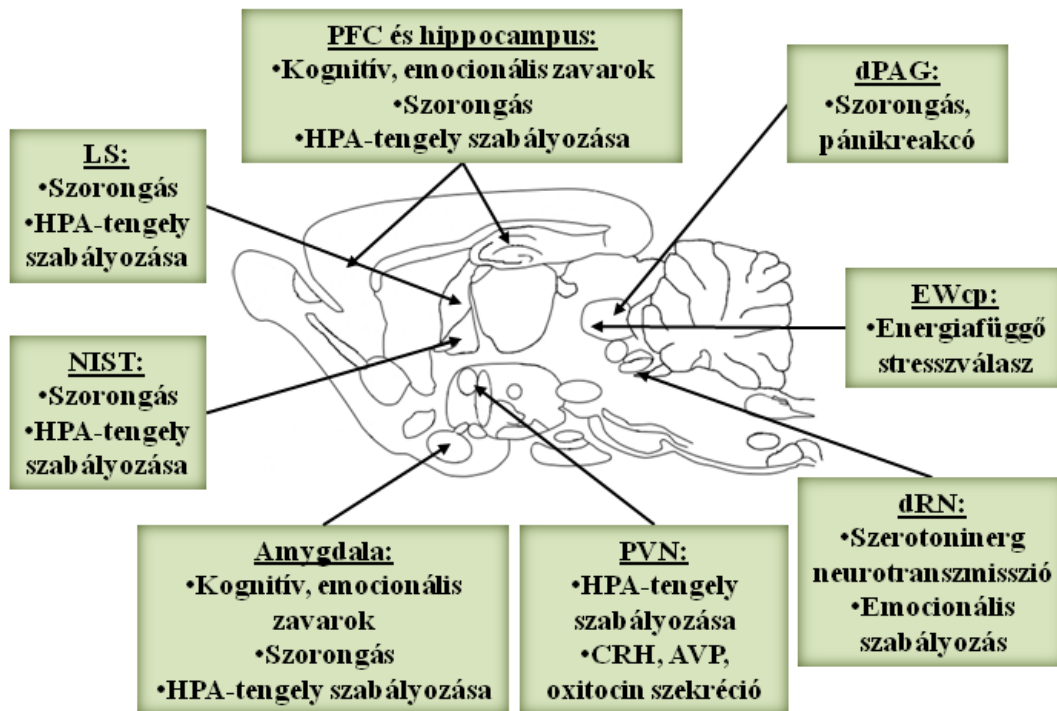
1.4. A stressz neuronális mechanizmusai és hatásai

1.4.1. A stresszhez kapcsolódó emocionális, kognitív és magatartási folyamatok agyi szerveződése

Akut és krónikus stressznek kitett állatokból és stresszhez köthető pszichiátriai betegségekben szenvedő paciensekből nyert adatoknak köszönhetően már a stressz agyi struktúrára és funkcióra kifejtett hatásának számos részlete ismertté vált. Számos sejtszintű, neuroplasztikus jelenség szerepe vált ismertté (Lucassen és mtsai., 2014) és az ezek kialakulásában fontos több mediátort (pl. kortikoszteroidok, glutamát, BDNF-*brain derived neurotrophic factor*) és jelátviteli folyamatot azonosítottak (McEwen és mtsai., 2015).

Az egyes agyterületek specializált szerepe, ill. funkcionális változásaik jelentősége a stressz kóros következményeinek létrejöttében szintén egyre jobban tisztázott (**3. ábra**). A krónikus stresszhez köthető kognitív, döntéshozatali és emocionális zavarokban a prefrontális cortex (PFC) és a hippocampus aktivitásának gyengülése, ill. ezzel szemben az amygdala funkcionális erősödése igen fontosak. E területeken jelentős morfológiai változások (pl. a PFC-ben és a hippocampusban a dendritok rövidülése és a dendrittűskék számának csökkenése, míg az amygdalában ezek fordítottja) mutathatók ki (Chattarji és mtsai., 2015). A szorongás létrejöttében szerepet játszó neuronhálózatok is egyre jobban ismertté válnak. A környezetből érkező szenzoros információk a nucleus basolateralis amygdalae-ban (BLA) gyűlnek össze, majd főként a nucleus centralis amygdalae-ban (CeA) és a nucleus interstitialis striae terminalis-ban (NIST) (Fox és mtsai., 2015), ill. egyéb kérgi (PFC, hippocampus) és subcorticalis struktúrákban (pl. septum laterale - LS) történik az értékelésük. E struktúrák egymással is összetett kapcsolatban vannak és a bennük található egyes almagok és neuroncsoportok komplex, sokszor egymással ellentétes funkciókat látnak el. Végül ez az összetett hálózat az inger értékelésétől függően további agyterületek aktiválásával létrehozhatja a szorongásra jellemző viselkedéses (pl. periaqueductalis szürkeállomány dorsalis része - dPAG), endokrin (PVN) és vegetatív (agytrónzi vegetatív központok) válaszokat (Calhoun és Tye, 2015). A dPAG-ban található neuronok felelősek az akut szorongásos reakciók viselkedéses komponenseinek kiváltásáért, ill. kóros körülmények között a pánikreakcióért (Paul és mtsai., 2014). A centrálisan projiciáló nucleus Edinger-Westphal-ban (EWcp) található peptiderg neuronok az energiaháztartástól függő stressz-válasz kialakításában játszanak jelentős szerepet (Xu és mtsai., 2012). A depresszió

patofiziológiájában igen nagy jelentőségű előagyi szerotonerg rendszer a hídban található nucleus raphe dorsalis-ból (dRN) indul ki, amely klinikai és állatkísérletes adatok szerint is alapvető szerepet játszik az emocionális szabályozásban, ill. annak kóros elváltozásaiban (Michelsen és mtsai., 2008).



3. ábra. A stressz viselkedési és neuroendokrin komponenseinek szabályozásában, ill. ezek kóros eltéréseiben jelentős agyterületek kísérletes és klinikai adatok alapján (készült az 1.4.1.-ben idézett művek alapján).

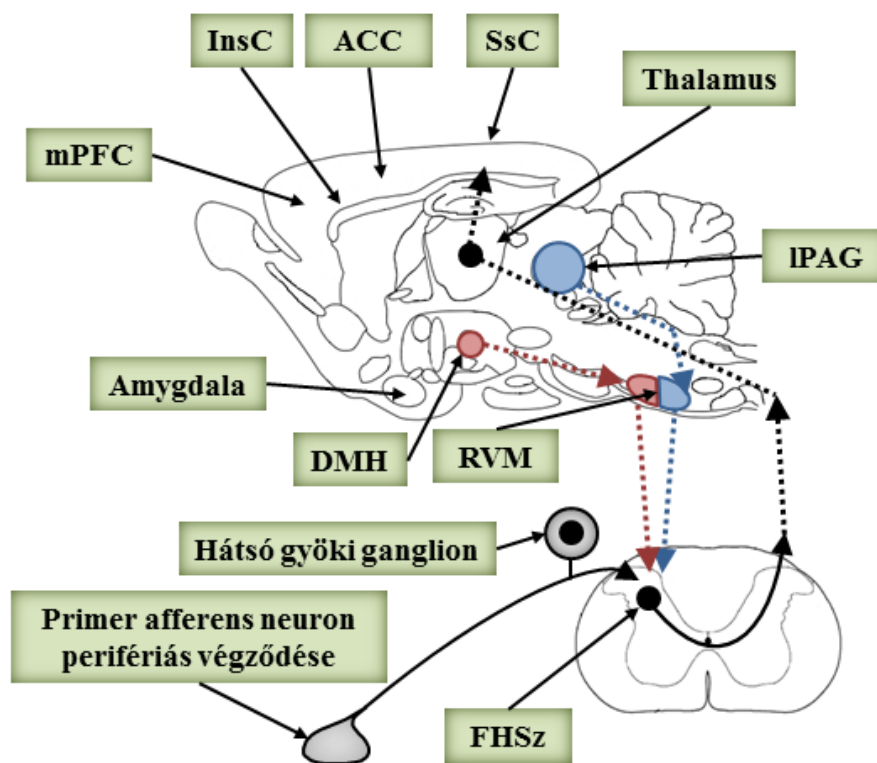
1.4.2. A HPA-tengely agyi szabályozása

A PVN parvocellularis régiójában (pPVN) található CRH-szekretáló neuronok a HPA-tengely első állomásának tekinthetők, azonban számos magasabb szintű központ szabályozza működésüket. A medialis PFC (mPFC) egyes részei (anterior cingularis és prelimbicus kéreg) és a hippocampus gátló, míg az amygdala serkentő hatást fejt ki a pPVN-re, így szabályozva a HPA-tengely válaszát pszichológiai stresszorokra (Herman és mtsai., 2005). E limbikus struktúrák közvetve, subcorticalis kapcsolóállomásokon, például a NIST-en keresztül projiciálnak a pPVN-be (Forray és Gysling, 2004). Egyéb stresszhez kapcsolható agyterületek, pl. az LS szerepére szintén fény derült a pPVN működésének szabályozásában (Anthony és mtsai., 2014). A CRH és az AVP mellett egyéb hypothalamicus peptid típusú

hormonok, így pl. a PVN magnocellularis régiójából (mPVN) felszabaduló oxitocin és AVP szintén részt vesznek a HPA-tengely szabályozásában (Herman és mtsai., 2008).

1.4.3. A stressz- és fájdalomérző rendszerek összefüggései

A fájdalomérzésért elsődlegesen a primer nociceptorok fő célpontjától, a gerincvelő felületes hátsó szarvától (FHSz) a szomatoszenzoros kéregig (SsC) terjedő spinothalamicus pálya felelős. E rendszer aktivitását azonban számos más központi idegrendszeri struktúra szabályozza (serkenti vagy gátolja), amelyek a stressz fájdalomfokozó hatásait is közvetítik (4. ábra). Az előagyi szabályozó területek közé tartozik az mPFC, az anterior cingularis (ACC) és insularis cortex (InsC), ill. az amygdala. E központok jelentőségét állatkísérletes modellekben és krónikus fájdalomtól szenvedő, így FM-es betegekkel végzett klinikai vizsgálatokban is bizonyították (Jennings és mtsai., 2014; Cagnie és mtsai., 2014), elsősorban a fájdalom emocionális és kognitív állapottól függő modulációjáért felelősek (Bushnell és mtsai., 2013).



4. ábra. A nocicepcióban és annak szabályozásában jelentős perifériás és központi idegrendszeri struktúrák. A spinothalamicus pálya részei fekete, a nocicepciót fokozó leszálló rendszerek piros, a gátlók kék szaggatott vonallal jelölve (készült az 1.4.2.-ben idézett művek alapján).

FM-ben a leszálló fájdalomcsillapító rendszerek csökkent működése mutatható ki (Jensen és mtsai., 2009; Lannersten és Kosek, 2010). A legtöbb tanulmány a mesencephalicus lateralis PAG-ból (IPAG) a nyúltvelői rostralis ventromedialis medullán (RVM) keresztül az FHSz-be projiciáló leszálló pálya működésének vizsgálatára irányul, amelynek hatását opioid peptidok és monoaminok közvetítik (Ossipov és mtsai., 2010). Mind az IPAG (Devall és mtsai., 2011), mind az RVM (Imbe és mtsai., 2004) stressz-indukált hiperalgéziában játszott szerepére utaló adatok megtalálhatók az irodalomban, a pontos mechanizmusok tisztázása azonban további vizsgálatokat igényel. A fájdalomérzést serkentő rendszerek közül a nucleus dorsomedialis hypothalami-ból (DMH) az RVM-be projiciáló neuronok jelentőségére derült fény a stresszel összefüggésben (Wagner és mtsai., 2013). A gerincvelő szintjén a stressz fájdalomfokozó hatása a gátló és serkentő neurotranszmisszió egyensúlyának felbomlásához köthető az utóbbi irányába (Quintero és mtsai., 2011).

E centrális mechanizmusok mellett állatkísérletes vizsgálatok felvetették a perifériás idegrendszeri folyamatok szerepét is a stressz-indukált hiperalgéziában. A hátsó gyöki ganglionok szintjén a tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1, lsd. később) és egyes nátrium-csatornák expressziójának növekedését, ill. a gátló endokannabinoid CB1 receptor szintjének csökkenését mutatták ki stressz hatására (Hong és mtsai., 2011; Zheng és mtsai., 2015). A hiperalgézia felerősödése stressz hatására a primer afferensek katecholaminok és glükokortikoidok által közvetített szenzitizációjának eredménye (Khasar és mtsai. 2005; 2008). Mindazonáltal, a perifériás nociceptorok pontos szerepét tisztázó szisztematikus kísérletes vizsgálatot eddig nem végeztek.

2. A szomatosztatin és receptorai

A neuropeptidok szabályozó szerepét egyre több klinikai és kísérletes adat bizonyítja fiziológiás és kóros központi idegrendszeri folyamatokban, így a stresszben, szorongásban és depresszióban is (Kormos és Gaszner, 2013), receptoraik ígéretes gyógyszer-célpontoknak tekinthetők. E dolgozat alapját képező kísérleteinket a gátló jellegű ciklikus neuropeptid, a szomatosztatin jelentőségére vonatkozó eddigi ismeretek alapozták meg.

2.1. A szomatosztatin

A szomatosztatint elsőként Brazeau és mtsai. izolálták birka hypothalamusból 1972-ben (Brazeau és mtsai., 1973). Elsőként a peptid növekedési hormon felszabadulást gátló hatására derült fény, amelyre egyik korai, ma már kevésbé használt elnevezése is utal: szomatotropin felszabadulást gátló faktor (*somatotropin release inhibiting factor* - SRIF). A szomatosztatint

kódoló génről prepro-szomatostatin propeptid expresszálódik, amelyből aztán a 14 (SRIF₁₄, az emlős agyban domináns), ill. 28 (SRIF₂₈) aminosav hosszúságú szomatostatin izoformák képződnek. 1996-ban klónozták a szomatostatinhoz hasonló neuropeptidet a kortisztatint, amely ugyanazokon a receptorokon keresztül fejt ki hatását (de Lecea és mtsai., 1996).

A szomatostatin számos egyéb hypophysealis (pl. tireotrop hormon; Vale és mtsai., 1974) és perifériás hormon (pl. inzulin és glukagon; Leblanc és mtsai., 1975) szekrécióját is gátolja. Expresszióját a hypothalamuson kívül számos egyéb agyterületen, így például az amygdalában, a NIST-ben, a septumban, a hippocampusban és több kérgi területen is kimutatták (Epelbaum, 1986). Az agyban a szomatostatin gátló neuromodulátor, expressziója GABAerg neuronokban mutatható ki, amelyek részben lokális interneuronok (pl. a cortex, a hippocampus és az amygdala lokális interneuronjai), részben távoli agyterületekre projiciáló sejtek (pl. az amygdalából a NIST-be és az agytörzsbe) (Viollet és mtsai., 2008). A peptidnek mind preszinaptikus (glutamát vagy GABA felszabadulás gátlása), mind posztzinaptikus hatásai kimutathatóak, mindkét folyamat dinamikája lassabb és hatása hosszabban tartó, mint a klasszikus neurotranszmitterek esetén (Baraban és Tallent, 2004).

A szomatostatin számos élettani funkció szabályozásában részt vesz, mint pl. az alvás, motoros aktivitás, szenzoros funkciók, fájdalom, tanulás és memória. Az agy kóros állapotaiban, így a neurodegeneratív Alzheimer- és Parkinson-kórban, ill. skizofréniában és epilepsziában klinikai és állatkísérletes vizsgálatok bizonyították a szomatostatin csökkent szintjét és protektív hatását (Martel és mtsai., 2012; Tuboly és Vécsei, 2013). Ismert, hogy a gátló neurotranszmisszió csökkenése, beleértve a szomatostatint is, igen fontos szerepet játszik a hangulatzavarok és a szorongás patogenezisében (Lin és Sibille, 2013). Klinikai vizsgálatokban a szomatostatin expresszió csökkenését írták le major depressziós betegek dorsolateralis prefrontalis (Sibille és mtsai., 2011) és cingularis cortexében (Tripp és mtsai., 2011), ill. amygdalájában (Guilloux és mtsai., 2012) és krónikusan stresszelt állatok agyában is kimutatható szintjének csökkenése (Czéh és mtsai., 2015). Akut stressz hatására a szomatostatin felszabadulás megnövekedik az amygdalában (Brodin és mtsai., 1994), a hypothalamusban (Arancibia és mtsai., 2000) és a hippocampusban (Arancibia és mtsai., 2001). A szomatostatin génhiányos egerek megnövekedett emocionális viselkedést és bazális kortikoszteron szintet, ill. a depressziós betegekéhez hasonló génexpressziós és neuronális transzkriptom profilváltozásokat mutatnak (Lin és Sibille, 2015). Az intracerebroventricularisan adott szomatostatin szorongáscsökkentő és antidepresszáns-szerű hatásokat fejt ki patkányokban (Engin és mtsai., 2008). A szorongáscsökkentő hatás szempontjából a septum és az amygdala jelentősége valószínűsíthető, hiszen a peptid

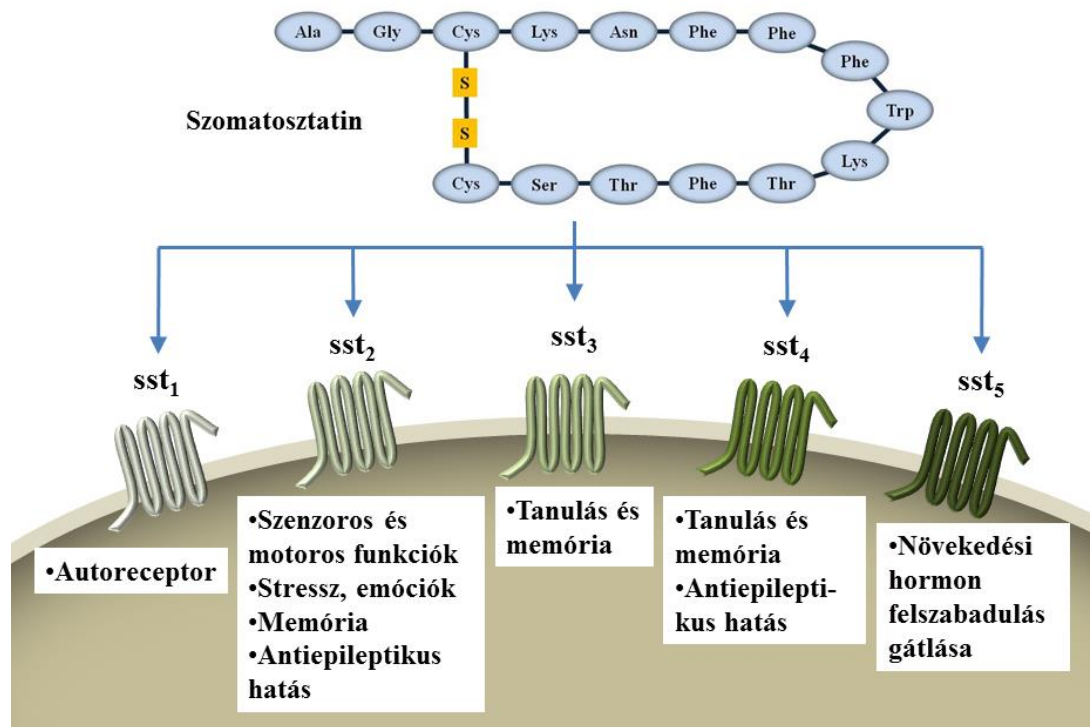
szelektív injekciója e struktúrákba hasonló hatást fejt ki, mint az intracerebroventricularis adás (Yeung és mtsai., 2011). Más adatok a szomatosztatinnak a triciklusos antidepresszáns imipramin hatásában játszott jelentős szerepére utalnak (Nilsson és mtsai., 2012).

2.2. A szomatosztatin receptorai

A szomatosztatinnak öt heptahelikális, $G_{i/0}$ -proteinhez kötött receptora ismert: sst_1 , sst_2 (két *splicing* variánsa, az sst_{2A} és sst_{2B} létezik), sst_3 , sst_4 és sst_5 (Hoyer és mtsai., 1995). E receptorok két csoportba oszthatók a szomatosztatin szintetikus oktapeptid analógjaihoz (pl. az oktreotid) való affinitásuk alapján (Patel, 1999). Az SRIF-1 csoportba az sst_2 , sst_3 és sst_5 receptorok tartoznak, amelyek nagy oktapeptid kötő képességgel rendelkeznek, ezek felelősek elsősorban a szomatosztatin endokrin hatásainak közvetítéséért. A másik csoportba (SRIF-2) az oktapeptid analógokhoz alacsony affinitást mutató sst_1 és sst_4 receptorok tartoznak. Utóbbi csoport, különösen az sst_4 receptor gyógyszerfejlesztési szempontból igen érdekes perifériás fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatásai és az endokrin hatások hiánya miatt (Pintér és mtsai., 2002; Szolcsányi és mtsai., 2004; Helyes és mtsai., 2009).

A rendelkezésre álló adatok szerint a szomatosztatin receptorok elsősorban gátló neuronális szintű hatásokat fejtenek ki, amelyek változatos és receptortól függő jelátviteli mechanizmusok révén jönnek létre (pl. adenilát cikláz-cAMP-protein kináz A útvonal gátlása, K^+ -csatornák serkentése, egyes Ca^{2+} -csatornák gátlása; Csaba és Dournaud, 2001). Mindegyik receptor expresszálódik az agyban (legnagyobb mennyiségben az sst_2 és sst_4) és az egyes receptorok specializált szerepe a peptid hatásainak közvetítésében mind élettani, mind kóros folyamatokban egyre jobban ismert (Martel és mtsai., 2012) (5. ábra).

A szomatosztatin stresszben játszott fontos szerepe és receptorainak a stressz szabályozásában résztvevő agyterületeken (pl. amygdala, hippocampus, PFC) való expressziója ellenére a receptorok szerepére vonatkozóan nagyon kevés adat áll rendelkezésre. Az sst_2 és sst_3 receptorok jelentősége valószínűsíthető a szomatosztatin szorongáscsökkentő és antidepresszáns-szerű hatásaiban, mivel az sst_2 és sst_3 agonisták adása a natív peptidhez hasonló hatásokat fejt ki (Engin és Treit, 2009). Szintén ezt támasztja alá, hogy szelektív sst_2 antagonistá amygdalába és septumba való mikroinjekciója megszünteti a szomatosztatin szorongáscsökkentő hatását (Yeung és Treit, 2012). Az *Sstr2* génhányos egerekben a szorongás és a hypophysealis ACTH felszabadulás emelkedik (Viollet és mtsai., 2000). Az akut pszichológiai stressz az sst_2 mRNS expresszió szelektív növekedését okozza az amygdalában (Nanda és mtsai., 2008). A többi szomatosztatin receptor stresszben játszott szerepére vonatkozólag azonban nem áll rendelkezésre adat.

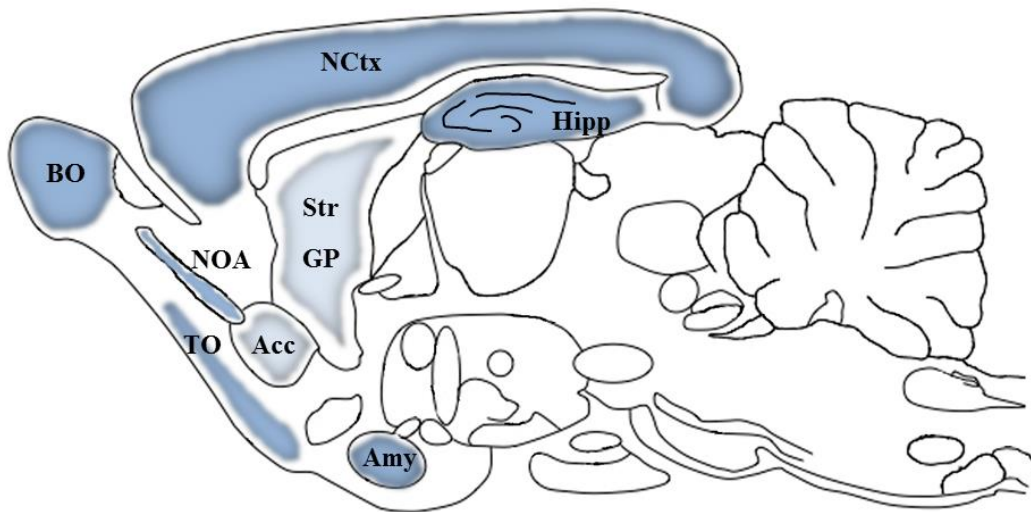


5. ábra. A szomatosztatin receptorok és szerepük fiziológias és kóros központi idegrendszeri folyamatokban (Martel és mtsai., 2012 alapján).

2.2.1. Az *sst₄* receptor

Az *sst₄* receptort Bruno és mtsai. írták le 1992-ben (Bruno és mtsai., 1992). A receptorral kapcsolatos eddigi kutatások elsősorban aktivációjának fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatásaira koncentráltak, amelyek perifériás idegrendszeri folyamatokhoz és neuro-immun interakciókhoz köthetők. Az *sst₄* az agyban a második legnagyobb mennyiségben előforduló receptor, immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei szerint számos agyi struktúrában expresszálódik, mint a cortex, a striatum, a hippocampus és az amygdala (Schreff és mtsai., 2000; Selmer és mtsai., 2000a; 2000b) (6. ábra). Ennek ellenére a receptor központi idegrendszeri folyamatokban játszott szerepéről igen kevés adat áll rendelkezésre. Az élettani funkciók közül a lokomotoros aktivitás (Santis és mtsai., 2009), ill. a tanulás és memória szabályozásában bizonyult jelentősnek (Gastambide és mtsai., 2010). Kóros folyamatokban játszott szerepére vonatkozó eddigi vizsgálatok egyrészt egy *sst₄* agonista (NNC 26-9100) protektív hatását bizonyították az Alzheimer-kór egyik egérmodelljében (*senescence-accelerated mouse prone-8* - SAMP8 modell; Sandoval és mtsai., 2011) a szolúbilis A β (42) oligomerek szintjének metalloproteináz-függő

csökkentésével (Sandoval és mtsai., 2013), másrészt a szomatosztatin antikonvulzív hatásának közvetítésében játszott szerepét mutatták ki egérben (Moneta és mtsai., 2002). A stressz szabályozásában fontos agyterületeken való expressziója ellenére, az sst₄ receptor szerepéről a stresszben, ill. a szorongásos betegségek és hangulatzavarok patogenezisében nem áll rendelkezésünkre adat.



6. ábra. Az sst₄ receptor expressziója patkányagyban (Acc: *nucleus accumbens*, Amy: *amygdala*, BO: *bulbus olfactorius*, GP: *globus pallidus*, Hipp: *hippocampus*, NCtx: *neocortex*, NOA: *nucleus olfactorius anterior*, Str: *striatum*, TO: *tuberculum olfactorium*; Schreff és mtsai., 2000, ill. Martel és mtsai., 2012 alapján).

3. Kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok

A kapszaicin-érzékeny érző idegsejtek a primer érző neuronok 50-70%-át teszik ki, perifériás axonjaik vékonyan mielinizált, ill. nem mielinizált (A δ - és C-) rostok formájában érik el a perifériás szöveteket. Közös tulajdonságuk a funkciójuk szempontjából alapvető kapszaicin receptor, a TRPV1 expressziója, amely nem szelektív kation csatornaként működik. Ez a különleges nociceptor populáció a fájdalmas ingerek érzékelése mellett a nocicepció szabályozásában is komplex módon vesz részt, ezért a krónikus fájdalom patofiziológiájában játszott szerepének kutatása igen jelentős.

Az 1950-es években Jancsó Miklós és Szolcsányi János figyelték meg, hogy az egyes paprikafélék csípősségét okozó kapszaicin fájdalomkeltő hatását csökkent fájdalomérzés követi, amely alapján feltételezték, hogy a vegyület a rá érzékeny idegrostokat először

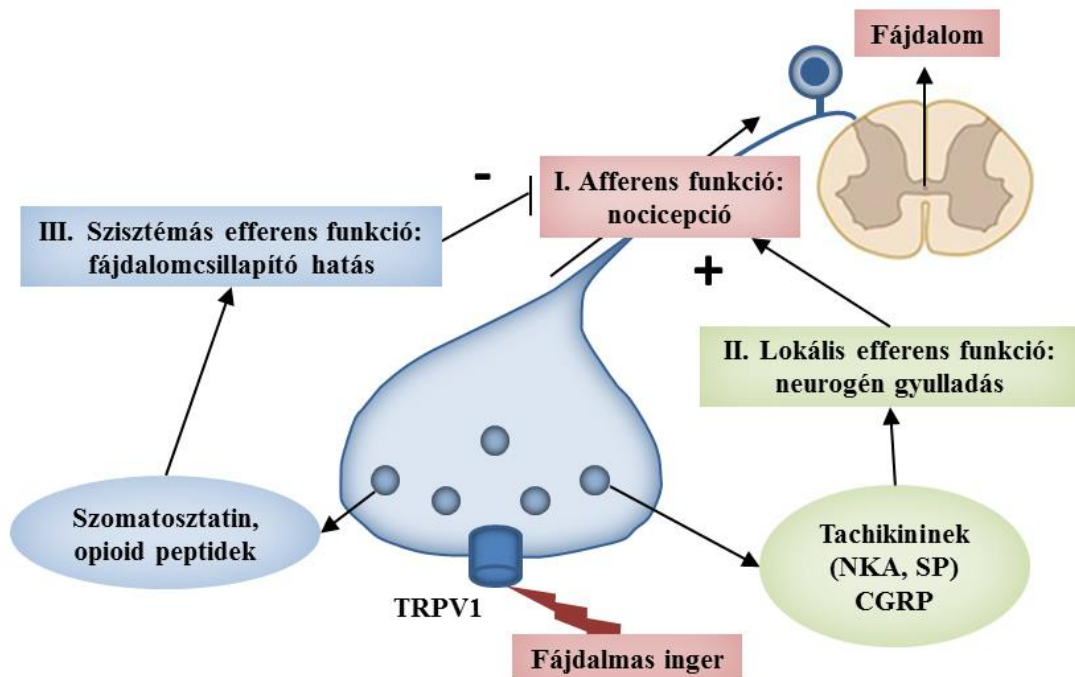
aktiválja, majd deszenzibilizációjukat okozza (Jancsó és mtsai., 1967). A TRPV1-et végül 1997-ben klónozták (Caterina és mtsai., 1997). Azóta számos vizsgálat irányult a csatorna aktivációs mechanizmusainak vizsgálatára, amelyek bizonyították, hogy a kapszaicinen kívül az 43°C-nál magasabb hőmérséklet, az alacsony pH és bizonyos endogén vegyületek, mint az N-arachidonoil-etanolamin (AEA), a 12-hidroperoxi-eikozatetraénsav (12-HPETE), ill. az N-arachidonoil-dopamin (NADA) is aktiválni képesek a TRPV1-et (Tominaga és mtsai., 1998; Yoo és mtsai., 2014).

Ezek alapján a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok ún. polimodális nociceptorok. A kapszaicin mellett az idegvégződések erőteljes aktiválására, majd deszenzibilizációjára alkalmas másik exogén anyag az *Euphorbia resinifera* nevű kutyatejféleiben található ultrapotens kapszaicin analóg, a reziniferatoxin (RTX) (Szolcsányi és mtsai., 1990). A kapszaicinnal vagy RTX-el végzett deszenzibilizáció nagyban hozzájárult az idegvégződések funkciójának megismeréséhez, ill. terápiásan is felhasználható. Az ioncsatorna megnyílásakor a beáramló Na⁺-ionok depolarizációt okoznak, amely akciós potenciálokat generál, míg a szintén beáramló Ca²⁺-ionok neuropeptid felszabadulást okoznak az idegvégződésekben. Ha a TRPV1-en keresztül folyamatosan vagy túl nagy gyakorisággal történik kation beáramlás, akkor az a citoplazma és a mitokondriumok duzzadását, az intracelluláris energiaforgalom felborulását és az idegvégződés tartós funkcióvesztését, sőt degenerációját okozza. Ez a deszenzibilizáció biológiai alapja (Anand és Bley, 2011).

A kapszaicin-szenzitív szenzoros neuronok ún. hármas funkcióval rendelkeznek (**7. ábra**):

- **Klasszikus afferens funkció:** a végződés depolarizációja következtében létrejövő akciós potenciálok révén a fájdalmas ingerek közvetítése a központi idegrendszerbe.
- **Lokális efferens funkció:** a végződések aktivációjakor gyulladás- és fájdalomkeltő neuropeptidok szabadulnak fel (pl. kalcitonin gén rokon peptid (CGRP), P-anyag (SP), neurokinin A (NKA) és más tachikininek), amelyek vazodilatációt, plazma extravazációt és gyulladásos sejtek aktivációját idézik elő. E folyamatokat összefoglalóan neurogén gyulladásnak nevezzük (Holzer, 1988).
- **Szisztémás efferens funkció:** az idegvégződések aktivációjakor egyúttal fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatású neuropeptidok (szomatosztatin és opioid peptidok) is felszabadulnak és nem csak lokálisan hatnak, hanem a szisztémás keringésbe is bejutnak („szenzokrin” funkció) (Szolcsányi, 1996; Pintér és mtsai., 2006).

A kapszaicin-érzékeny neuronok összetett funkciójuk révén fontos szerepet játszanak mind az élettani, mind a patológiás fájdalomban (Immke és Gavva, 2006; Jara-Oseguera és mtsai., 2008). A stressz-indukált nociceptív változásokat tekintve e nociceptorok szerepének tisztázása nagy jelentőségű lenne, figyelembe véve a perifériás idegrendszer szerepére utaló klinikai és kísérletes adatokat (pl. az FM-ben leírt vékonyrost diszfunkciót), azonban e kérdéssel kapcsolatban alig áll rendelkezésünkre információ.



7. ábra. A kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok hármass funkciója (készült az 3.-ban idézett művek alapján).

CÉLKITŰZÉSEK

A stresszhez kapcsolható betegségek, mint a depresszió és szorongásos kórképek, ill. a stressz és krónikus fájdalom összefüggései nagy klinikai jelentőséggel bírnak, azonban a pontos patofiziológiai mechanizmusok ismeretlenek. A gyógyszeres kezelés lehetőségei sem kielégítőek, ami kiemeli az új gyógyszercélpontok azonosítását célzó kutatások fontosságát.

Munkacsoportunk több évtizedes kutatásai jelentősen hozzájárultak a kapszaicin-érzékeny neuronok és az sst4 receptor jelentőségének megértéséhez a fájdalom-szabályozásban a perifériás idegrendszerben. Jelen kísérleteinkben a központi idegrendszerben is expresszáldó sst4 akut és krónikus stressz-folyamatokban betöltött szerepét, valamint a kapszaicin-érzékeny neuronok és a krónikus stressz interakcióit vizsgáltuk *in vivo* egérmodellekben. Eredményeink hozzájárulhatnak a stresszhez köthető kórfolyamatok megismeréséhez és új gyógyszercélpontok azonosításához. Munkám főbb célkitűzései tehát a következők voltak:

- I. **Az sst4 receptor jelentőségének vizsgálata szorongásban és depresszió-szerű viselkedésben akut stressz-szituációkban** *Sstr4* génhiányos egerek (*Sstr4^{-/-}*) és kis molekulájú szelektív agonista (J-2156) segítségével. E kísérletekben az akut stressz-tesztekben mutatott viselkedés vizsgálata mellett a háttérben álló mechanizmusok felderítésére az sst4 aktiváció stressz-indukált agyi neuronális aktivációra kifejtett hatását is vizsgáltuk Fos immunhisztokémiával. Az sst4 expresszió kimutatására sst4^{LacZ} immunhisztokémiát használtunk.
- II. **Az sst4 receptor szerepének vizsgálata KVS-re való érzékenységben** vad típusú és *Sstr4^{-/-}* egerekben. A viselkedéses változásokat a szorongás, a depresszió-szerű viselkedés és az anhedónia vizsgálatával, a neuroendokrin választ a HPA-tengely aktivitását jellemző paraméterek mérésével (szomatikus paraméterek, kortikoszteron plazmakoncentráció), míg a krónikus neuronális aktivitást a stresszhez és depresszióhoz köthető agyterületeken FosB immunhisztokémiával jellemeztük.
- III. **A kapszaicin-érzékeny neuronok szerepének komplex vizsgálata RTX deszenzibilizációval KRS hatására létrejövő nociceptív (mechanikai, hideg és meleg), ill. a kapcsolódó viselkedési, neuronális és immunológiai változásokban.** A funkcionális eltérések háttérében álló központi idegrendszeri mechanizmusok vizsgálatára a stressz és fájdalom interakcióiban fontos agyterületek aktivitását FosB immunhisztokémiával jellemeztük. A perifériás folyamatok jelentőségének felméréséhez a gerincvelői FHSz aktivitását és a hátsó láb szöveteinek citokin profilját határoztuk meg.

KÍSÉRLETI MODELLEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok

Az akut stressz-tesztekben és a KVS vizsgálatban C57Bl/6J alapon előállított *Sstr4* génhányos (*Sstr4^{-/-}*) és vad típusú (*Sstr4^{+/+}*) egereket használtunk. Az eredeti *Sstr4* heterozigóta (*Sstr4^{+/-}*) tenyészpárokat Prof. Dr. Pierce C. Empson kutatócsoportja (Laboratory of Molecular Neuroscience, The Babraham Institute, Babraham Research Campus, Babraham, Cambridge CB22 3AT, Egyesült Királyság) hozta létre és bocsátotta rendelkezésünkre. Az *Sstr4* deléciója egy *LacZ* gént tartalmazó konstrukttal való helyettesítéssel történt (részletesebben lsd. Helyes és mtsai., 2009). Az *Sstr4^{+/-}* egerek pároztatása után az utódok genotípusának meghatározása PCR-al történt. Az akut stressz-tesztekben külön szaporított *Sstr4^{-/-}* és *Sstr4^{+/+}* egerek utódait, míg a KVS kísérletekben heterozigóta állatok genotipizált *Sstr4^{-/-}* és *Sstr4^{+/+}* utódait használtuk.

Az sst₄ agonista J-2156 hatását C57Bl/6J és CD1 egerekben vizsgáltuk. Az RTX deszenzibilizáció és KRS interakcióinak vizsgálatához CD1 egereket használtunk. A C57Bl/6J és CD1 állatok eredeti tenyészpárjait a Charles River Laboratories Magyarország Kft.-től vásároltuk.

Kizárólag hím, 2-6 hónapos egerekkel dolgoztunk, amelyeket a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiái Intézetének Állatházában tartottunk és tenyésztettünk standard műanyag ketrecekben (4-6 egér/ketrec) 24-25°C-on, 12-12 órás sötét-világos ciklusban, *ad libitum* ellátva normál rágcsáló táppal és vízzel.

2. Kísérleti elrendezések, csoportok

2.1. Az sst₄ receptor szerepének vizsgálata szorongásban és depresszió-szerű viselkedésben

Akut viselkedéstesztekben vizsgáltuk az *Sstr4* gén-deléció és az sst₄ agonista J-2156 kezelés hatását. Mivel számos egérkísérlet bizonyította a törzskülönbségek szerepét a szorongásban, depresszió-szerű viselkedésben és gyógyszerhatásokban (Cryan és Mombereau, 2004), a J-2156 hatását vizsgáló kísérleteket C57Bl/6J és CD1 egerekben is elvégeztük. Összefoglalva, a következő csoportokat használtuk:

- *Sstr4^{+/+}* vs. *Sstr4^{-/-}* egerek,

- Fiziológias sóoldattal (NaCl) kezelt vs. J-2156-al kezelt C57Bl/6J egerek,
- Fiziológias sóoldattal kezelt vs. J-2156-al kezelt CD1 egerek.

Minden funkcionális tesztben különböző állatcsoportokat használtunk, így minden állat csak egy tesztben vett részt. Minden viselkedéstesztet délelőtt végeztünk el.

2.1.1. Perfúzió és szövetsfeldolgozás

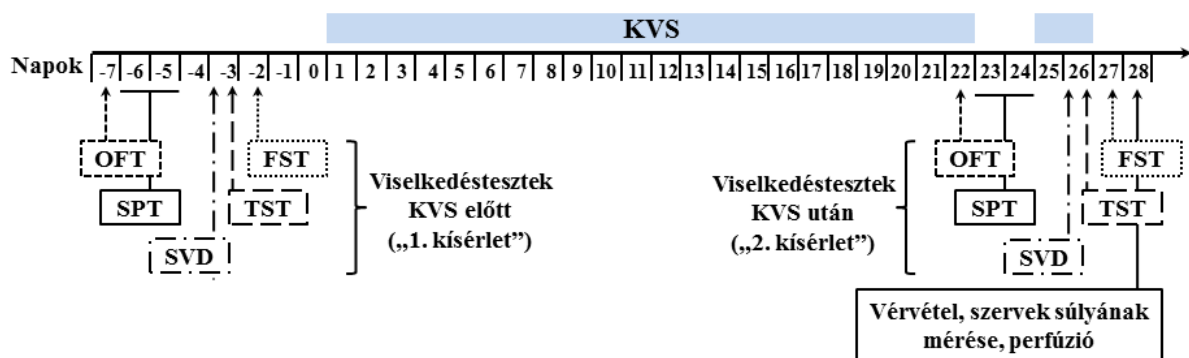
A J-2156 *tail suspension* tesztben (TST) kifejtett antidepresszáns-szerű hatásának (ld. alább) háttérében álló mechanizmusok vizsgálatához Fos (akut neuronális aktivációs marker) immunhisztokémiát végeztünk számos, stresszhez köthető agyterületen. Ehhez 2 órával a TST után 7-8, random módon kiválasztott CD1 egeret altattunk el az NaCl-, ill. J-2156-oldattal kezelt csoportokból (i.p. ketamin-xilazin, dózisok: 100 mg/kg, ill. 5 mg/kg), majd transzkardiálisan perfundáltuk őket 0,1% foszfát pufferelt sóoldattal (*phosphate buffered saline* - PBS), majd 4%-os paraformaldehid (PFA) oldattal (0,2 M Millonig foszfát pufferben). A 4%-os PFA-ban történő posztfixálást követően az agyakat 30 µm-es coronalis szeletekre metsztük Leica VS1000 vibrotómmal (Leica, Wetzlar Németország). A metszeteket 3 sorozatra osztottuk és felhasználásig fagyálló oldatban tároltuk -20°C-on. Kontroll csoportként TST-nek nem exponált NaCl-, ill. J-2156-oldattal kezelt CD1 egereket használtunk (n=6/csoport).

Az *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} egerek között *forced swim* tesztben (FST) talált funkcionális különbség háttérében álló mechanizmusokat szintén Fos immunhisztokémiával vizsgáltuk. Ehhez génhianyos és vad típusú, FST-ben résztvevő, ill. FST-nek nem exponált állatokat használtunk (n=5-6/csoport). Az altatás, perfúzió és szövetsfeldolgozás az előző bekezdésben leírtaknak megfelelően történt.

Az sst₄ receptor jelenlétét az amygdalában sst₄^{LacZ} immunhisztokémiával (ld. alább) mutattuk ki, melynek lényege az *Sstr4* gén deléciójához használt *LacZ* génről expresszálandó β-galaktózidáz fehérje kimutatása. Ehhez *Sstr4*^{-/-} egereket használtunk (n=3), amelyek semmilyen viselkedéstesztben nem vettek részt. Ezeket az állatokat a fent leírt módon való altatás után transzkardiálisan perfundáltuk Tyrode pufferrel, majd Zamboni fixálóval (0,2% pikrinsavat tartalmazó 4%-os PFA 0,16 M foszfát pufferben (pH 6,9) oldva). Az agyakat ugyanebben a fixálóban 4°C-on történő 120 perces posztfixálás után 10% szacharóz oldatba helyeztük, majd CO₂-vel való hirtelen fagyasztás után kriosztáttal 20 µm-es szeletekre metsztük az amygdala és a dRN szintjében.

2.2. A KVS

A KVS kísérletben 4 csoportot használtunk: nem stresszelt, ill. krónikusan stresszelt *Sstr4^{+/+}* és *Sstr4^{-/-}* egereket (összesen n=39, 9-11/csoport). Az egész kísérlet 4 hétig tartott (8. ábra). Az első héten végeztük az összes állattal a kontroll funkcionális tesztek az alap viselkedéses paraméterek meghatározásához („1. kísérlet”). A következő 3 hétben tettük ki a megfelelő csoportokat KVS-nek. Krónikus stressz paradigmánk, amely egy korábban leírt protokoll módosított változata (Sterrenburg és mtsai., 2011) 6 különböző stresszorból állt (az állatok rázása ketrecükben egy rázógépen 2 óráig, éjszakai megvilágítás 12 óráig, ferde (45°) ketrecben tartás 12 óráig, nedves almon tartás 12 óráig, *restraint* stressz 50 ml-es kilyuggatott műanyag csövekben 2 óráig, hideg stressz (4°C) az egerek hűtőbe helyezésével 30 percre). Ezekből naponta két eltérőt alkalmaztunk, mindig variálva a stresszorokat. A viselkedésteszteket a KVS harmadik hetében megismételtük („2. kísérlet”) minden csoportban. Az „1. kísérlet” és „2. kísérlet” paraméterek abszolút értékei mellett a viselkedési paraméterek különbségeit, vagyis változásukat is összehasonlítottuk a statisztikai analízis során. A „változás” paramétereket a következőképpen számoltuk: („1. kísérlet” érték - „2. kísérlet” érték). E módszerrel célunk a finomabb különbségek kimutatása volt, amelyeket a viselkedéssparaméterekben tapasztalható nagy egyedi különbségek elfednének.



8. ábra. A KVS modellben alkalmazott protokoll a viselkedéstesztekt és a terminálás időbeli elrendezésével (FST: *forced swim* teszt; OFT: *open field* teszt; SPT: szacharóz preferencia teszt; SVD: sötét-világos doboz teszt; TST: *tail suspension* teszt).

2.2.1. Plazma mintavétel, perfúzió, szövetfeldolgozás és szervsúly mérés

A HPA-tengely aktivitást a relatív mellékvese és csecsemőmirigy súlyok és a plazma kortikoszteron szintek mérésével határoztuk meg, míg a stresszhez köthető agyterületek

aktivitását FosB (krónikus neuronális aktivációs marker) immunhisztokémiával jellemeztük a KVS után.

Ezek elvégzéséhez az állatokat 24 órával az utolsó stresszor után öltük le. Na-pentobarbitállal (70 mg/kg, i.p.) való altatás után megnyitottuk a mellkast és a bal kamrából 0,5-1 ml vért vettünk egy heparinizált fecskendővel, amelyet aztán jégbe hűtött csövekbe helyeztünk, amelyek 75 µl 7,5%-os EDTA oldatot tartalmaztak. Ezután a csöveket centrifugáltuk (3000 rpm, 10 perc), majd 50 µl-es plazma alikvotokat gyűjtöttünk, amelyeket felhasználásig -20°C-on tároltunk.

Az egereket a vérvétel után azonnal perfundáltuk, majd agyukat a korábban leírt módon dolgoztuk fel (ld. a 2.1.1. részt). A perfúzió után a mellékveséket és csecsemőmirigyeket eltávolítottuk, súlyukat megmértük és a testsúlyra normalizáltuk: [szervek súlya (mg)/testsúly (g)].

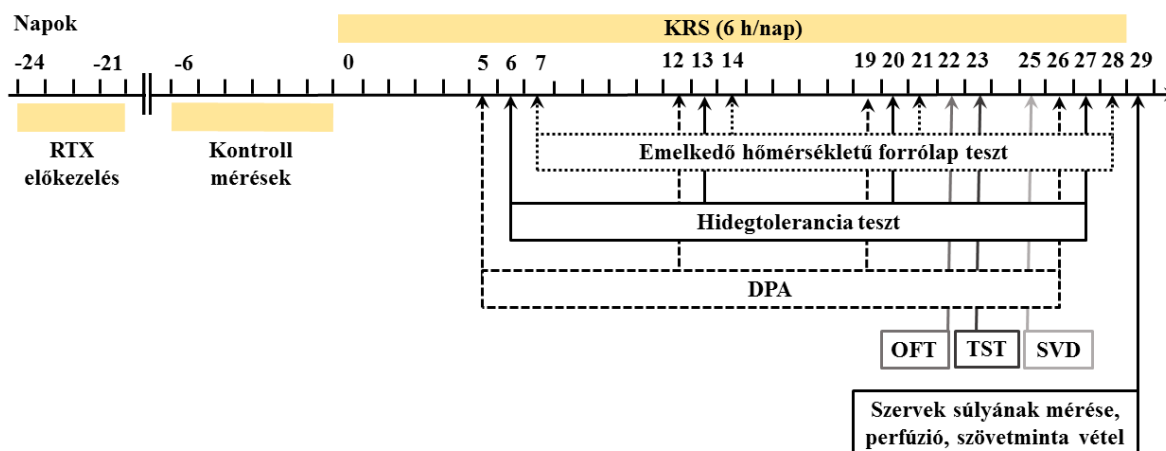
2.3. A KRS

Az kapszaicin-szenzitív szenzoros neuronok KRS-indukált fájdalomban játszott szerepének vizsgálatához szintén 4 csoportot használtunk: nem stresszelt, ill. krónikusan stresszelt előkezelés nélküli és RTX-előkezelt egerek (összesen n=39, 9-11/csoport). Az idegvégződések RTX-el történő deszenzibilizációját 3 héttel a KRS megkezdése előtt végeztük. A deszenzibilizáció befejezése után két héttel kezdtük a kontroll nociceptív méréseket, majd ezek elvégzése után kezdtük a KRS-t (**9. ábra**). Az állatokat 28 napon keresztül minden nap 6 órán át lyukakkal ellátott, jól szellőző 50 ml-es műanyag csövekbe helyeztük, amelyekben mozgásuk korlátozott volt (Ihne és mtsai., 2012). A KRS-t minden alkalommal délelőtt kezdtük, a méréseket délután, legalább 2 órával a *restraint* stressz után végeztük. A nociceptív méréseket a KRS ideje alatt hetente ismételtük, a viselkedéstanulást a 4. héten végeztük. A nem stresszelt állatokkal minden nap a stresszeltekhez hasonlóan bántunk, kivéve a KRS-t.

2.3.1. Perfúzió, szövetfeldolgozás és szervsúly mérés

Az egereket 24 órával az utolsó *restraint* stressz után ketamin-xilazinnal elaltattuk, majd a hátsó lábakat levágtuk, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és további feldolgozásig (ld. citokin koncentrációmérés) -80°C-on tároltuk. Ezután az állatokat a korábban leírtaknak megfelelően perfundáltuk, agyukat és gerincvelőjüket feldolgoztuk és meghatároztuk a relatív mellékvese- és csecsemőmirigy súlyokat (ld. a 2.2.1. részt). A FosB immunhisztokémiát

csoportonként 7, random módon kiválasztott állat agyából és lumbalis gerincvelőjéből végeztük.



9. ábra. A KRS modellben alkalmazott protokoll az RTX előkezelés, a funkcionális tesztek és a terminálás időbeli elrendezésével (DPA: dinamikus plantaris eszteziometria; OFT: *open field* teszt; SVD: sötét-világos doboz teszt; TST: *tail suspension* teszt).

3. Farmakológiai módszerek

3.1. J-2156 kezelés

A J-2156 az sst₄ receptor specifikus agonistája, kis molekulájú szulfonamidopeptidomimetikum (pontos kémiai szerkezete: (1'S,2S)-4-amino-N-(1'-karbamoil-2'-feniletil)-2-(4''-metil-1''-naftalénszulfonamino)-butánamid). Nanomolos affinitással kötődik az sst₄ receptorhoz (amely meghaladja a natív szomatosztatin affinitását) és a többi szomatosztatin receptorhoz képest mintegy 400-szor nagyobb szelektivitást mutat az sst₄-hez. Egy receptor aktivációs tesztben a J-2156 2,5-szer erősebb választ adott, mint maga a szomatosztatin, ezért Engström és mtsai. a vegyületet „szuperagonistának” nevezték (Engström és mtsai., 2005). A vegyület további, farmakológiai szempontból lényeges tulajdonsága, hogy ismételt alkalmazása *in vitro* vizsgálatok szerint nem okoz deszenzibilizációt (Engström és mtsai., 2006).

A J-2156 viselkedésre kifejtett hatásainak vizsgálatához a vegyületet fiziológiás NaCl-oldatban oldottuk, majd 15 perccel a viselkedésteszték előtt intraperitoneális (i.p.) injekcióban adtuk 100 µg/kg dózisban (0,1 ml/10 g testsúly a 10 µg/ml-es oldatból), amely korábbi, a vegyület perifériás fájdalomcsillapító hatását leíró vizsgálatainkban hatásosnak bizonyult

(Sándor és mtsai., 2006). A kontroll csoportokban az állatokat i.p. fiziológias NaCl-oldattal kezeltük (0,1 ml/10 g testsúly).

3.2. RTX előkezelés

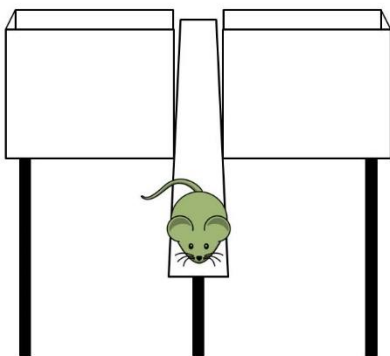
A kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok hosszú távú deszenzibilizációját szisztémás RTX (Sigma Aldrich) kezeléssel végeztük (10, 20, 70 és 100 µg/kg RTX subcutan injekciója négy egymást követő napon). Az idegvégződések funkciójának kiesését a szemtörlés hiányával igazoltuk 10 µl 0,1%-os kapszaicin szembe cseppentése után (Borbély és mtsai., 2015).

4. Vizsgálati módszerek

4.1. Viselkedéstesztek

4.1.1. Emelt keresztpalló teszt (EKP)

Az EKP a rágsálók szorongásának mérésére gyakran használt teszt (Lister, 1987). Az egereket először a 4 karú (2 szabad és 2 falakkal körülvevő kar) EKP középső platformjára helyeztük (**10. ábra**). A viselkedést 5 percen keresztül figyeltük meg és rögzítettük videokamera segítségével, majd meghatároztuk a nyitott karokon töltött időt (amely a szorongással fordítottan arányos). Az EKP karjai 30 cm hosszúak és 5 cm szélesek voltak, a középső platform 5x5 cm-es, az állvány pedig 50 cm magas. Az EKP-t minden kísérlet után etanol oldattal tisztítottuk.

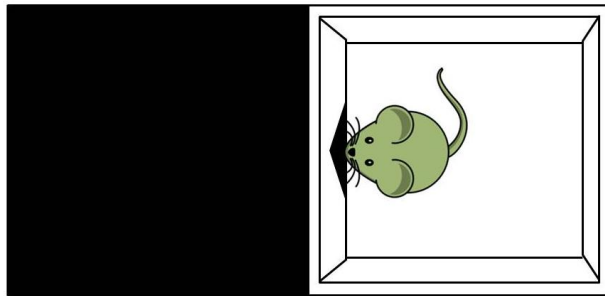


10. ábra. Az emelt keresztpalló teszt (EKP).

4.1.2. Sötét-világos doboz teszt (SVD)

Az SVD szintén a rágsálók szorongásszintjének mérésére alkalmas. A doboz egy sötét és egy világos térfelet tartalmaz (mindkettő 18x20 cm-es 13,5 cm-es fallal körülveve), amelyek között egy lyuk található a padló szintjében (**11. ábra**). Az egereket először a sötét térfelelre helyeztük, majd a viselkedésüket 5 percen keresztül figyeltük meg. A világosban töltött időt, a

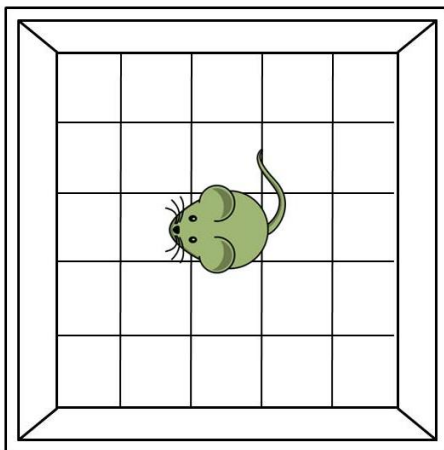
világosba lépések és a világosba lesések számát vizsgáltuk (a fénypreferencia a teszt klasszikus értelmezése szerint fordítottan arányos a szorongással) (Ihne és mtsai., 2012).



11. ábra. A sötét-világos doboz teszt (SVD).

4.1.3. Open field teszt (OFT)

Az egereket egyenként egy felülről megvilágított aréna (45x45 cm 30 cm-es fallal, ill. 60x40 cm 55 cm-es fallal méretű arénákat használtunk) közepén helyeztük el, amelyek padlóját egyforma területekre osztottuk fel (25, ill. 16 terület) (**12. ábra**). Az állatok viselkedését 5 percig rögzítettük videokamerával. A felvételekből a lokomotoros aktivitást (keresztezett területek száma és mozgással töltött idő), ill. a szorongást (középső négyzetekben töltött idő, amely a szorongással fordítottan arányos) jellemző paraméterek határozhatók meg (Gaszner és mtsai., 2012).



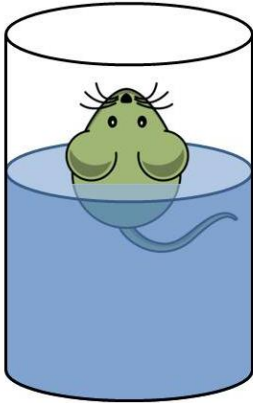
12. ábra. Az open field teszt (OFT).

4.1.4. Forced swim teszt (FST)

Az FST az akut stressz-indukált depresszió-szerű viselkedés vizsgálatára alkalmas (Porsolt és mtsai., 1977). A teszt egy módosított formáját használtuk (Ghasemi és mtsai., 2009), amely során az egereket egyenként 19 cm magasan 23-25°C-os csapvizet tartalmazó átlátszó műanyag hengerekbe helyeztük (**13. ábra**). Az immobilitással (passzív lebegéssel) töltött időt,

amely e tesztben a depresszió-szerű viselkedés markere, a 6 percig tartó teszt utolsó 4 percében mértük.

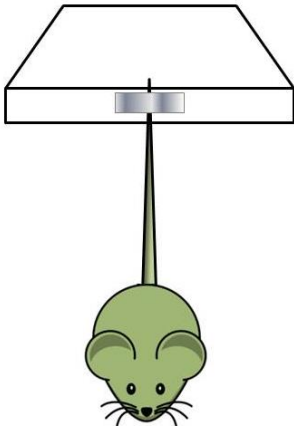
13. ábra. A *forced swim* teszt (FST).



4.1.5. *Tail suspension* teszt (TST)

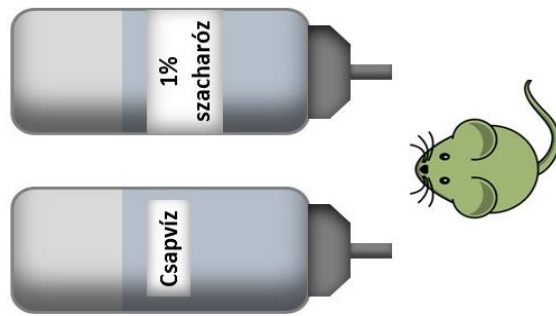
A TST-t szintén az akut stressz-indukált depresszió-szerű viselkedés vizsgálatára alkalmaztuk a korábban leírt módon (Nielsen és mtsai., 2004). Az egereket farkuknál fogva 50 cm magasságban lógattuk fel 6 percre és az immobilitást az utolsó 4 percben mértük (**14. ábra**).

14. ábra. A *tail suspension* teszt (TST).



4.1.6. *Szacharóz preferencia* teszt (SPT)

Az anhedónia jellemzésére alkalmas SPT-ben az állatokat egyenként olyan ketrecekben helyeztük el 48 órára, amelyekben iváskor két palack közül választhattak. Az egyik palackban 150 ml csapvíz, a másikban 150 ml 1 %-os szacharóz oldat volt (**15. ábra**). 24 óránál az oldalpreferencia elkerülése érdekében megcseréltük a palackokat (Jürgenson és mtsai., 2012). A táp *ad libitum* volt elérhető. A teszt után megmértük az elfogyasztott csapvíz és szacharóz oldat mennyiségét és kiszámítottuk a szacharóz preferencia indexet a következő képlet szerint: [elfogyasztott szacharóz oldat tömege/(elfogyasztott csapvíz tömege+elfogyasztott szacharóz oldat tömege)*100].

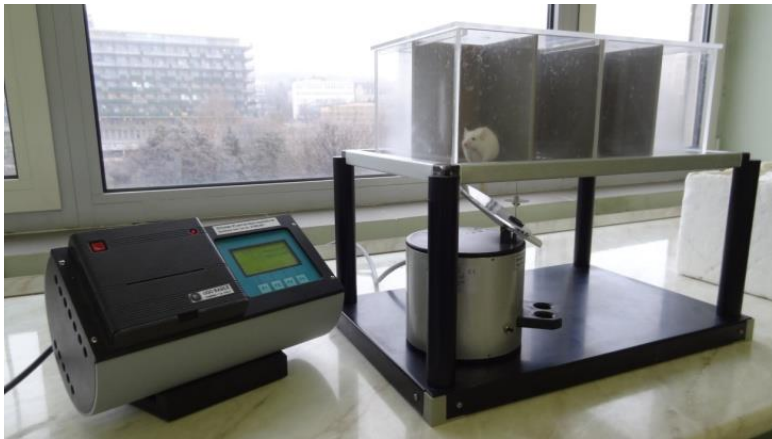


15. ábra. A szacharóz preferencia teszt (SPT).

4.2. Nocicepció tesztek

A kontroll nocicepció méréseket kétszer, két egymást követő napon végeztük a KRS elkezdése előtt, majd a kapott értékeket átlagoltuk és ezeket használtuk „Kontroll” értékeként.

4.2.1. Dinamikus plantáris eszteziometria (DPA)



16. ábra. A dinamikus plantáris eszteziométer (DPA).

A mechanonociceptív küszöböt a hátsó lábakon DPA-val határoztuk meg (Ugo Basile 37400, Comerio, Olaszország). Az egereket műanyag fülkékbe helyeztük, amelyek fémrácson álltak az érintési stimulátor felett. A talpi felszínre kis átmérőjű tompa végű tű segítségével növekvő erő fejtettünk ki (maximális erő: 10 g, amit 4 másodperc alatt értünk el) (**16. ábra**). Azt erőt olvastuk le, amelynél az állat elrántotta a lábát. Három értéket mértünk mindkét lábon, majd a jobb- és baloldal küszöbeinek átlagaival végeztük az analízist (Borbély és mtsai., 2015).

4.2.2. Hidegtolerancia teszt

A hátsó lábak hidegtoleranciáját a lábkirántás látenciájának mérésével határoztuk meg 0°C-os jeges vízből (Tékus és mtsai., 2014). Az egereket finoman kézben tartva hátsó lábukat

egyenként jéghideg vízbe mártottuk (17. *ábra*). A kirántás látenciáját 180 másodperces maximális idővel mértük és a két oldal értékeit átlagoltuk.



17. ábra. A hidegtolerancia teszt.

4.2.3. Emelkedő hőmérsékletű forrólap teszt

A fájdalmas meleg küszöböt emelkedő hőmérsékletű forrólap tesztben mértük (IITC Life Sciences, Woodland Hills, CA, USA). Az egereket egyenként egy fémlapra helyeztük (18. *ábra*), amelynek hőmérséklete 37°C-ról folyamatosan emelkedett egyértelmű nocifenzív reakcióig (az egyik hátsó láb rázása vagy nyalása), vagy a maximális hőmérsékletig (53°C, amely még biztosan nem okoz szöveti sérülést) (Almási és mtsai., 2003).



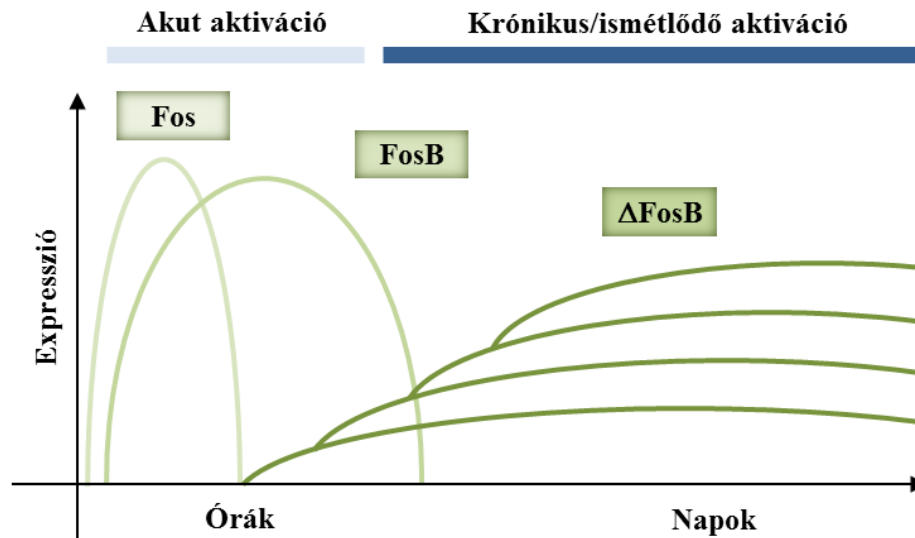
18. ábra. Az emelkedő hőmérsékletű forrólap teszt.

4.3. Immunhisztokémiai módszerek

4.3.1. Fos és FosB immunhisztokémia

A TST, ill. az FST (amelyeket így nemcsak viselkedésként, de akut stresszorként is alkalmaztunk) után a viselkedéses jelenségek háttérében álló mechanizmusok vizsgálatára Fos immunhisztokémiát használtunk számos, a stressz szabályozásában résztvevő subcorticalis agyterületen. A Fos transzkripció faktor fehérje, egyben egy széles körben alkalmazott akut neuronális aktivációs marker, amely erőteljes neuronális aktiváció (pl. akut stressz) hatására a

cfos, ún. azonnali-korai génről expresszálódik és a sejtmagban halmozódik. A fehérje mennyiségének növekedése 2 órával a stimulus után éri el maximumát, majd kb. 4 óra után már csökkenni kezd (**19. ábra**) (Kovács, 1998).



19. ábra. A Fos, FosB és Δ FosB expresszióváltozások időbeli lefolyása (forrás: Nestler és mtsai., 1999).

A FosB egy transzkripció faktor család, amely a *FosB* gén termékeit foglalja magában. A teljes hosszúságú FosB expresszióját akut neuronális aktiváció indukálja, de 9,5 óras féléletidővel degradálódik (Kovács, 1998), míg *splicing* variánsa, a Δ FosB hosszú ideig megmarad és tartós vagy ismételt stimulusok (pl. krónikus stressz) hatására felhalmozódik, így krónikus neuronális aktivációs markerként használható (**19. ábra**). A Δ FosB egyben a krónikus stressz hosszú távú neuronális és viselkedési hatásait is közvetíti (Nestler és mtsai., 1999). A krónikus kísérleteinkben használt antitest a teljes hosszúságú FosB-t és a Δ FosB-t is felismeri, azonban mivel az állatok leölése minden esetben 24 órával az utolsó stresszor után történt, a FosB immunreaktivitás esetünkben a krónikus neuronális aktivációt mutatja (Sterrenburg és mtsai., 2011).

Az immunhisztokémia korábban leírt módszerek szerint történt (Sterrenburg és mtsai., 2011; Gaszner és mtsai., 2012). A metszeteket 0,5% Triton X-100 (Sigma Aldrich) oldattal kezeltük 1 óráig, amit blokkoló pufferrel (2% normál kecske szérumot (*normal goat serum*-NGS) tartalmazó PBS; Jackson Immunoresearch Europe Ltd., Suffolk, Egyesült Királyság) történő 1 órás inkubáció követett. Ezután egy éjszakás kezelést végeztünk nyúlban termelt Fos, ill.

FosB elleni poliklonális antiszérum oldatban (hígítás mindkét antitestnél 1:500, 2% NGS-ben) szobahőmérsékleten. Ezután a metszeteket 1 órán át inkubáltuk biotinizált kecske anti-nyúl IgG 1:200 hígítású (2% NGS-ben) oldatában szobahőmérsékleten. Ezt 1 órás avidin-biotin komplex (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) oldatban való inkubáció követte. Az előhívást 0,02% diaminobenzidint és 0,003% H₂O₂-t tartalmazó oldatban (Tris pufferben) végeztük (amely a CRS kísérlet esetében 0,02% ammónium-nikkel(II)-szulfátot is tartalmazott). A reakció leállítását követően a metszeteket zselatinos lemezekre húztuk, megszártítottuk, xilollal kezeltük, majd DePex-el (Fluka, Heidelberg, Németország) fedtük.

A metszeteket Nikon Microphot FXA mikroszkóppal vizsgáltuk, majd a vizsgálandó agyterületekről Spot RT színes digitális kamerával (Nikon, Tokio, Japán) készítettünk fotókat. A kvantitatív értékelés az eredeti képekről vakon történt ImageJ szoftverrel (1.37 verzió, NIH, Bethesda, MD, USA) vagy manuálisan. A reprezentatív fotókat szürkeárnyalatossá tettük és az optimális kontraszt eléréséhez korrigáltuk Photoshop 7.0.1 szoftverrel (Adobe, San Jose, CA, USA). A pozitív sejtmagok számát legalább 4 metszeten határoztuk meg közelítőleg minden agyterület középső régiójából és a lumbalis gerincvelő L4-5 szegmentumából, a struktúrák teljes keresztmetszeti területén. Az egy állathoz tartozó sejtmag számokat, ill. kétoldali struktúráknál a két oldal eredményeit is átlagoltuk a statisztikai analízishez. Az agyterületeket és sztereotaxiás koordinátáikat Paxinos és Franklin (2003) szerint határoztuk meg. A vizsgált agyterületek antero-posterior lokalizációi a bregmától számítva a következők voltak:

- mPFC (amely magában foglalja a dorsalis anterior cingularis, prelimbic és infralimbicus cortexet) 1,78 mm;
- InsC 0,62 mm;
- ACC 0,26 mm;
- a NIST ovalis, dorsolateralis, dorsomedialis és ventralis almagva (ovNIST, dNIST, dmNIST és vNIST), ill. a dorsalis és ventralis LS (dLS és vLS) 0,14 mm;
- PVN (pPVN és mPVN) -0,82 mm;
- SsC -0,94 mm;
- amygdala (CeA, BLA és a nucleus medialis amygdalae (MeA)) -1,46 mm;
- hippocampus [CA1, CA2, CA3 és gyrus dentatus (GD)]; -1,94 mm;
- DMH -1,58 mm;
- PAG (lPAG és dPAG) és EWcp -3,8 mm;

- dRN -4.36 mm;
- RVM -5,5 mm.

A lumbalis gerinvcélő FHSz-át, amely az I és II Rexed laminákat foglalja magában, az L4-5 szegmentumokban vizsgáltuk.

4.3.2. *Sstr4^{LacZ}* immunhisztokémia

A szöveti β -galaktozidáz detektálására egy korábban már leírt protokollt alkalmaztunk (Fu és mtsai., 2010; Bergman és mtsai., 2014). A metszeteket egy éjszakán át inkubáltuk 4°C-on a primer antitesttel (csirke poliklonális anti- β -galaktozidáz, hígítás:1:20000, Abcam AB9361). Az immunreaktivitás vizualizálására a szenzitív tiramid szignál amplifikáción alapuló kítet (TSATM-Plus Fluorescein System, NEL741B001 KT, PerkinElmer Life Science, Boston MA) alkalmaztunk. A TSA-Plus Fluorescein Kit torma peroxidázt (*horseradish peroxidase* - HRP) használ, amely a fluoreszcens jelölő molekula kovalens kötődését katalizálja direkt módon a kimutatni kívánt célponthoz. A felsokszorozott fluoreszcens jelölés azután fluoreszcens mikroszkóppal detektálható (részletesebben lsd. a gyártó leírásában). Röviden, a metszeteket TNT-pufferben mostuk (0,1 M Tris-HCl pH 7,5; 0,15 M NaCl; 0,05% Tween 20) 15 percig, ezután TNB pufferben (0,1 M Tris-HCl pH 7,5; 0,15 M NaCl; Dupont Blocking Reagent, PerkinElmer) inkubáltuk 30 percig szobahőmérsékleten, majd HRP-konjugált poliklonális anti-csirke szekunder antitesttel (számár anti-csirke IgG-HRP, hígítás 1:200, Jackson Immunoresearch, 703-035-155) kezeltük. Ezt követően a metszeteket TNT pufferben mostuk, majd amplifikációs oldatban 1:100-hoz hígított tiramid-FITC konjugátummal (PerkinElmer) inkubáltuk 10 percig. Az immunreakciók után a metszeteket 2,5% DABCO glicerinnel (Sigma Aldrich) fedtük. A metszeteket Nikon Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóppal (Nikon, Tokio, Japán) vizsgáltuk és fotóztuk, megfelelő filterek, ORCA-ER, C4742-80 digitális kamera és Hamamatsu Photonics Wasabi 150 szoftver (Hamamatsu Photonics K.K., System Division, Hamamatsu City, Japán) használatával.

4.4. Kortikoszteron *radioimmunoassay* (RIA)

A KVS kísérlet után az *Sstr4^{+/+}* és *Sstr4^{-/-}* állatok plazmamintáiból a kortikoszteron RIA-t a korábban leírtaknak megfelelően végeztük (Gaszner és mtsai., 2004). Röviden, 5 μ l plazmát 100 μ l ASB pufferrel hígítottunk (1 g/l zselatint és 1 g/l Na-azidot tartalmazó 0,5 M PBS, pH 7,4), majd 1 ml dietil-éterrel extraháltuk. Ezután az extraktumot beszárítottuk, majd újra feloldottuk 1,25 ml ASB-ben. Ebből az oldatból két parallel mérést végeztünk. A csöveket, amelyek 500 μ l extraktumot (minta tartalma 2 μ l), ³H-kortikoszteront (12000 cpm; NEN,

NET-399, 90-120 Ci/mmol) és 15 nl CS-RCS-57 (Józsa és mtsai., 2005) kortikoszteron antiszérumot tartalmaztak 700 µl össztérfogatban egy éjszakán át inkubáltuk 4°C-on. Ezután a szabad és kötött szteroidokat dextránnal bevont faszénnel különítettük el. Standardként Calbiochem kortikoszteront használtunk kilenc-lépcsős sorozatban 15-től 4000 fmol-ig. A radioaktivitás méréséhez kétfázisú folyadék szcintillációs rendszert használtunk. Az inter- és intra-assay variációs koefficiensek 9,0% és 6,1% voltak.

4.5. Hátsó láb szövetek homogenizálása és citokin koncentrációmérések

A KRS kísérlet után az előkezeletlen és RTX-előkezelt állatok jobb hátsó lábait (n=7-9/csoport) használtuk a citokin mérésekhez. Felolvasztás után megmértük a minták súlyát, majd homogenizáló puffert (50 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, 5 mmol/l CaCl₂, 0,02% NaN₃, 1% Triton X-100 és proteáz inhibitorok (Calbiochem Protease Inhibitor Cocktail Set I, 1:100 mennyiségben hozzáadva közvetlenül a homogenizálás előtt), pH 7,4) adtunk hozzájuk (8 µl/1 mg szövet). Ezután TURRAX-al homogenizáltuk a szöveteket jégen, amíg szövetdarabok már nem voltak láthatók (min. 20 másodpercig). Ezt követően a homogenizátumokat 30 percig inkubáltuk jégen, majd centrifugáltuk 4000 rpm-en, 4°C-on 5 percig. A felülúszót leszívtuk, majd ismét centrifugáltuk 13000 rpm-en, 4°C-on 20 percig. Végül a felülúszóból vett 200 µl-es alikvótokat felhasználásig -80°C-on tároltunk.

Az interferon γ (IFN γ), az interleukin (IL)-1 α , az IL-1 β , az IL-4, az IL-10, a RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*, más néven kemokin CCL5), a KC (kemokin CXCL1) a monocyta kemoattraktáns protein-1 (MCP-1 - *monocyte chemoattractant protein-1*), a tumor nekrozis faktor α (TNF α), a granulocyta kolónia stimuláló faktor (G-CSF - *granulocyte colony stimulating factor*) és az IL-6 koncentrációit *cytometric bead array* (CBA) segítségével határoztuk meg a korábban már leírt módon (Dénes és mtsai., 2015). A méréseket BD™ CBA Flex Set-k (Franklin Lakes, New Jersey USA) felhasználásával végeztük a gyártó protokollja szerint. A mintákat a BD FACSVersé flow citométerrel nyertük és az adatokat FCAP Array v3 szoftverrel értékeltük ki (BD Biosciences). A mérési eredményekből a szöveti citokin koncentrációkat pg/g nedves szövetre számoltuk át a statisztikai analízishez.

5. Statisztikai módszerek

Két csoport adatainak összehasonlításakor független mintás t-próbát alkalmaztunk. Négy csoport adatainak összehasonlításakor a vizsgált két faktor és interakciójuk hatásának vizsgálatához két utas varianciaanalízist (*analysis of variance* - ANOVA) használtunk Fisher

post hoc teszttel. A KVS modell esetében az ismételt viselkedésteszték eredményeit ismételt mérésű két utas ANOVA-val és Fisher *post hoc* teszttel analizáltuk. A nociceptív tesztek eredményeinek analizéséhez ismételt mérésű két utas ANOVA-t használtunk Bonferroni *post hoc* teszttel. Az adatsorok normál eloszlásának vizsgálata Shapiro-Wilk teszttel történt, a varianciák homogenitását Bartlett kh-négyzet próbával vizsgáltuk. A t-tesztekből, ill. ANOVA-kból kapott t-, F- és p-értékeket a szövegben, ill. a **Mellékletben** található táblázatokban tüntettük fel. Az ábrákon az adatsorok átlaga látható az átlag standard hibájával (\pm SEM - *standard error of the mean*), ill. a t-tesztek vagy *post hoc* tesztek alapján szignifikáns különbségeket jelöltük a csoportok között. A statisztikai erőt 0,05-nél kisebb p érték esetén tekintettük szignifikánsnak, a szignifikáns értékeket az ábrákon a következők szerint emeltük ki: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$.

6. Etikai vonatkozások

Minden kísérlet megfelelt az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. számú törvény előírásainak, ill. az International Association for the Study of Pain (IASP) ajánlásainak. A kísérleti eljárásokat a Pécsi Tudományegyetem állatkísérletekkel foglalkozó Etikai Bizottsága engedélyezte (engedélyszámok: BA02/2000-25/2011 and BA 02/2000-2/2012). Munkánk során mindent megtettünk a felhasznált állatok számának és szenvedésének minimalizálása érdekében.

EREDMÉNYEK, MEGBESZÉLÉS

1. Az sst4 receptor szerepe a szorongás és depresszió-szerű viselkedés szabályozásában, egérmodellekben

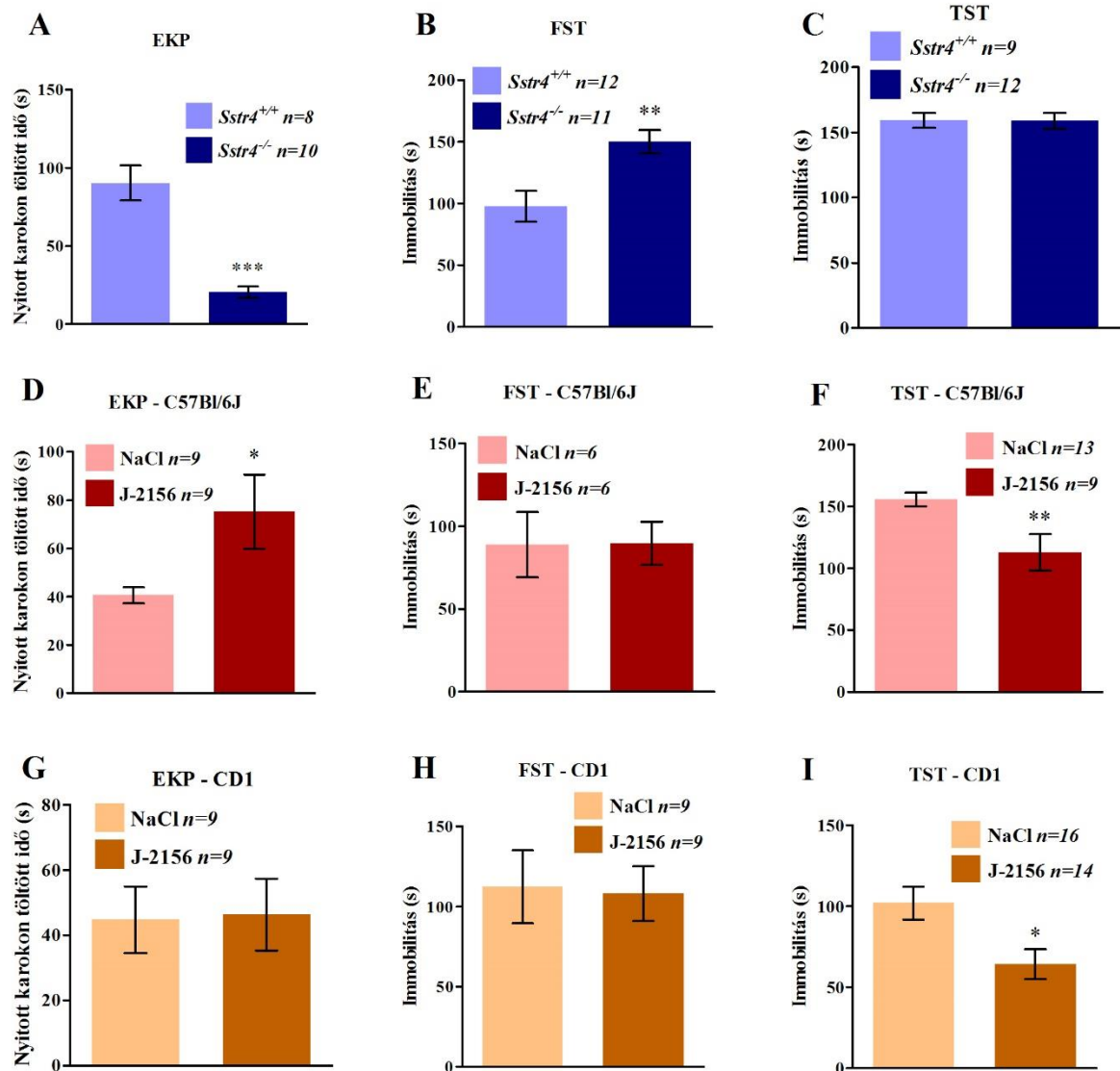
1.1. Eredmények

1.1.1. Az *Sstr4* gén hiánya és az sst4 aktiváció befolyásolja az akut stressz-szituációkban mutatott viselkedést

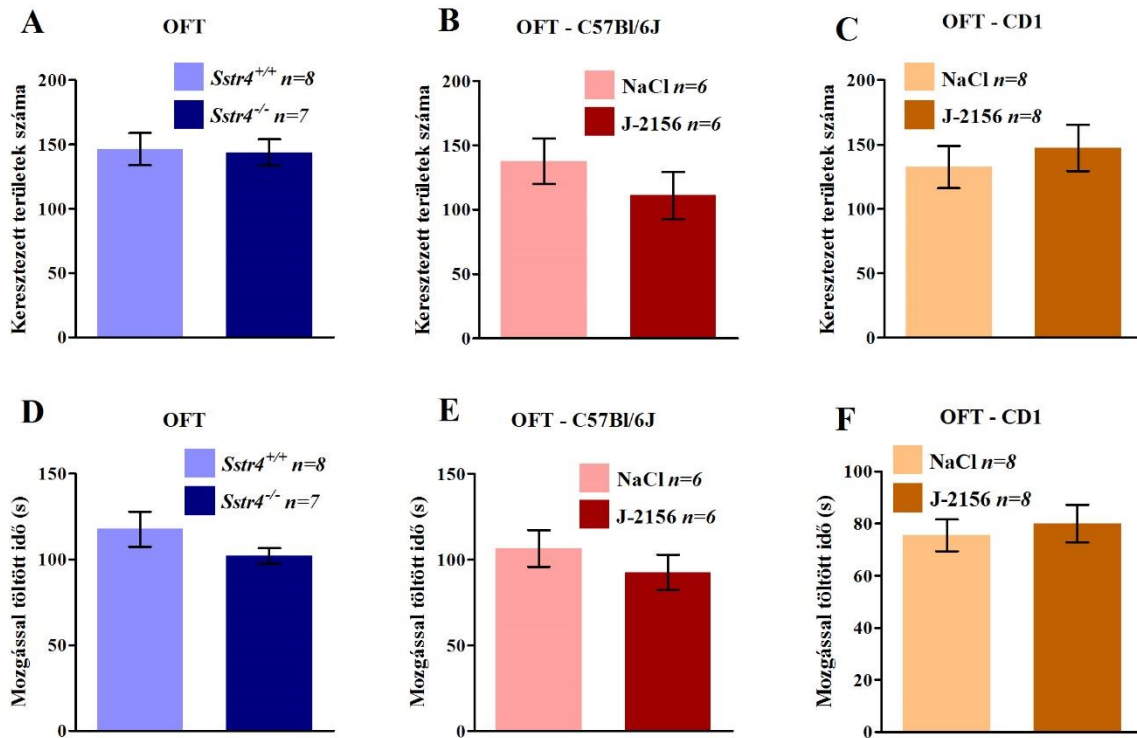
Az EKP-ben az *Sstr4* génhányos állatok szignifikánsan, majdnem 80%-al kevesebb időt töltöttek a nyitott karokon, mint *Sstr4*^{+/+} társaik ($t_{16}=6,52$, $p<0,0001$; **20.A ábra**). Az FST-ben az *Sstr4*^{-/-} egerek szignifikánsan, mintegy 50%-al több időt töltöttek immobilitással, mint a vad típusúak, jelezve a *knockout* egerek nagyobb depresszió-szerű viselkedését ($t_{21}=3,31$, $p=0,0033$; **20.B ábra**), a TST-ben azonban nem volt különbség e csoportok között ($t_{19}=0,068$, $p=0,95$; **20.C ábra**). Az OFT-ben sem a keresztezett területek számát ($t_{13}=0,17$, $p=0,87$; **21.A ábra**), sem a mozgással töltött időt ($t_{13}=1,33$, $p=0,21$; **21.D ábra**) tekintve nem találtunk különbséget az *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} egerek között.

Az *Sstr4* génhányos és vad típusú állatok külön tenyésztésének esetleges viselkedéses fenotípusra kifejtett hatásának kizárásához az FST-t *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} alomtestvérekkel is elvégeztük. A fent leírt különbség egyértelműen reprodukálható volt ($t_9=5,043$, $p=0,0007$), vagyis a külön tenyésztés nem befolyásolja viselkedési eredményeinket.

Az sst4 agonista J-2156 adása C57Bl/6J egerekben szignifikánsan emelte a nyitott karokon töltött időt ($t_{16}=2,21$, $p=0,042$; **20.D ábra**). Bár az agonista ebben az egértörzsben nem befolyásolta az immobilitást FST-ben ($t_{10}=0,028$, $p=0,98$; **20.E ábra**), TST-ben szignifikánsan csökkentette a depresszió-szerű viselkedést ($t_{20}=3,08$, $p=0,0059$; **20.F ábra**). CD1 egerekben a J-2156 nem fejtett ki hatást az EKP-ben ($t_{16}=0,1$, $p=0,92$; **20.G ábra**) és FST-ben ($t_{16}=0,15$, $p=0,88$; **20.H ábra**), azonban jelentős antidepresszáns-szerű hatása volt a TST-ben ($t_{28}=2,71$, $p=0,011$; **20.I ábra**). Az OFT-ben mutatott lokomotoros aktivitást a J-2156 kezelés sem C57Bl/6J (keresztezett területek száma: $t_{10}=1,05$, $p=0,32$; **21.B ábra**; mozgással töltött idő: $t_{10}=0,94$, $p=0,37$; **21.E ábra**) sem CD1 (keresztezett területek száma: $t_{14}=0,61$, $p=0,55$; **21.C ábra**; mozgással töltött idő: $t_{14}=0,48$, $p=0,64$; **21.F ábra**) egerekben nem befolyásolta.



20. ábra. Az *Sstr4* gén-deléció és a J-2156 kezelés viselkedéses hatásai. *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} egerek (A) EPM-ben, (B) TST-ben és (C) FST-ben mutatott viselkedése. A J-2156 hatása C57Bl/6J egerek (D) EPM-ben, (E) TST-ben és (F) FST-ben, ill. CD1 egerek (G) EPM-ben, (H) TST-ben és (I) FST-ben mutatott viselkedésére (*független mintás t-próba; átlagok*±*SEM; *p*<0,05, ***p*<0,01 és ****p*<0,001).



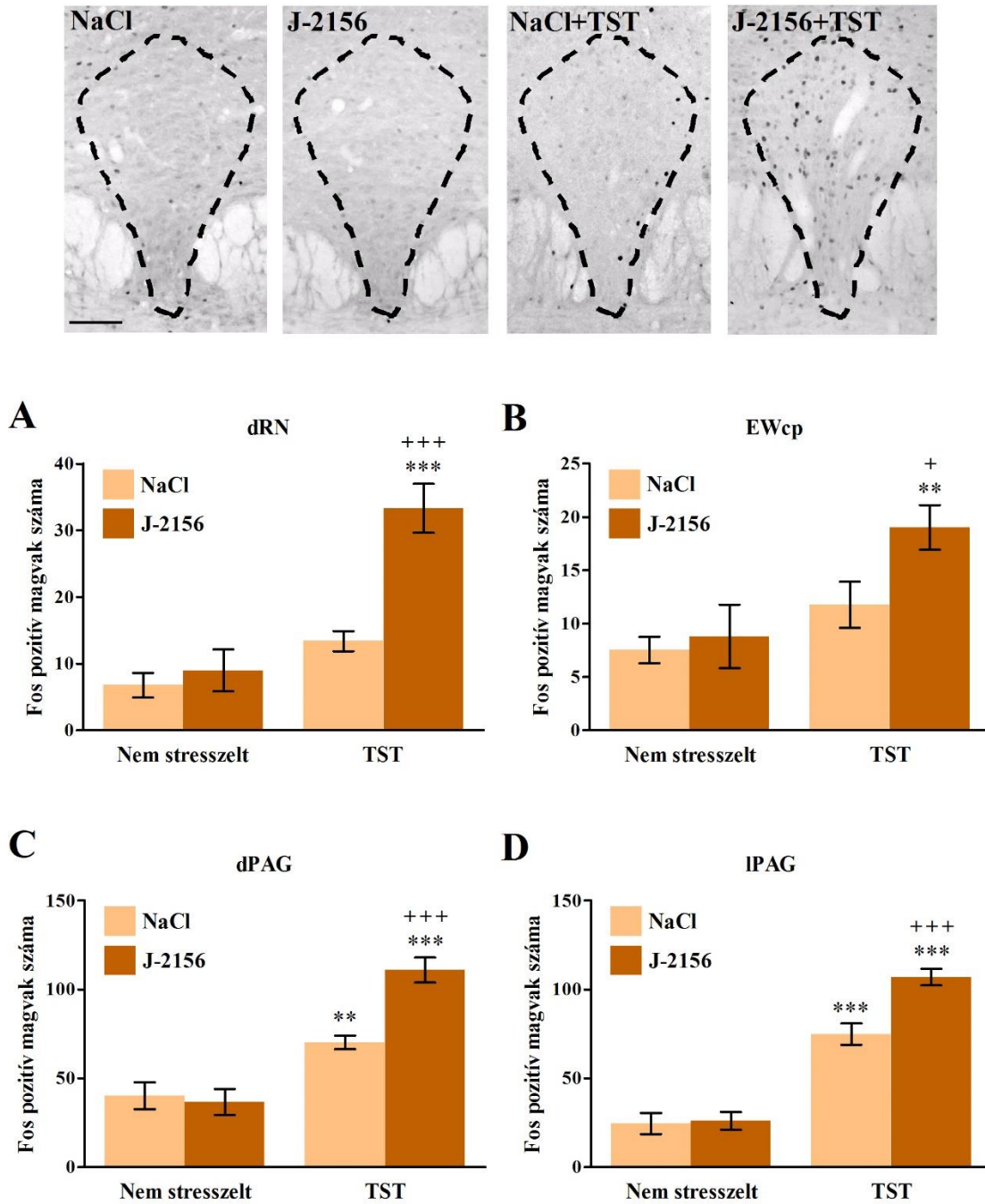
21. ábra. Az *Sstr4* gén-deléció és a J-2156 kezelés nincs hatással a viselkedésre az OFT-ben. *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} egerek (A, D) között nem volt különbség a lokomotoros aktivitás paramétereiben. A J-2156 nem fejtett ki hatást a lokomotoros aktivitásra sem C57Bl/6J (B, E), sem CD1 egerekben (C, F) (független mintás *t*-próba; átlagok±SEM).

1.1.2. Stresszhez kapcsolható agyterületek stressz-indukált aktivációs mintázatának változása *sst4* aktiváció hatására és az *Sstr4* gén hiányában

A J-2156 TST-ben kifejtett antidepresszáns-szerű hatásának hátterében álló mechanizmusok felderítéséhez Fos immunhisztokémiával vizsgáltuk a neuronális aktivációs mintázat változásait TST és/vagy J-2156 kezelés hatására CD1 egerekben. (A kvantitatív kiértékeléshez használt két utas ANOVA-k alapján a TST, a J-2156 és ezek interakciójának hatásait szövegesen lsd. alább, a számszerű eredményeket lsd. a **Melléklet 1. táblázatában**.)

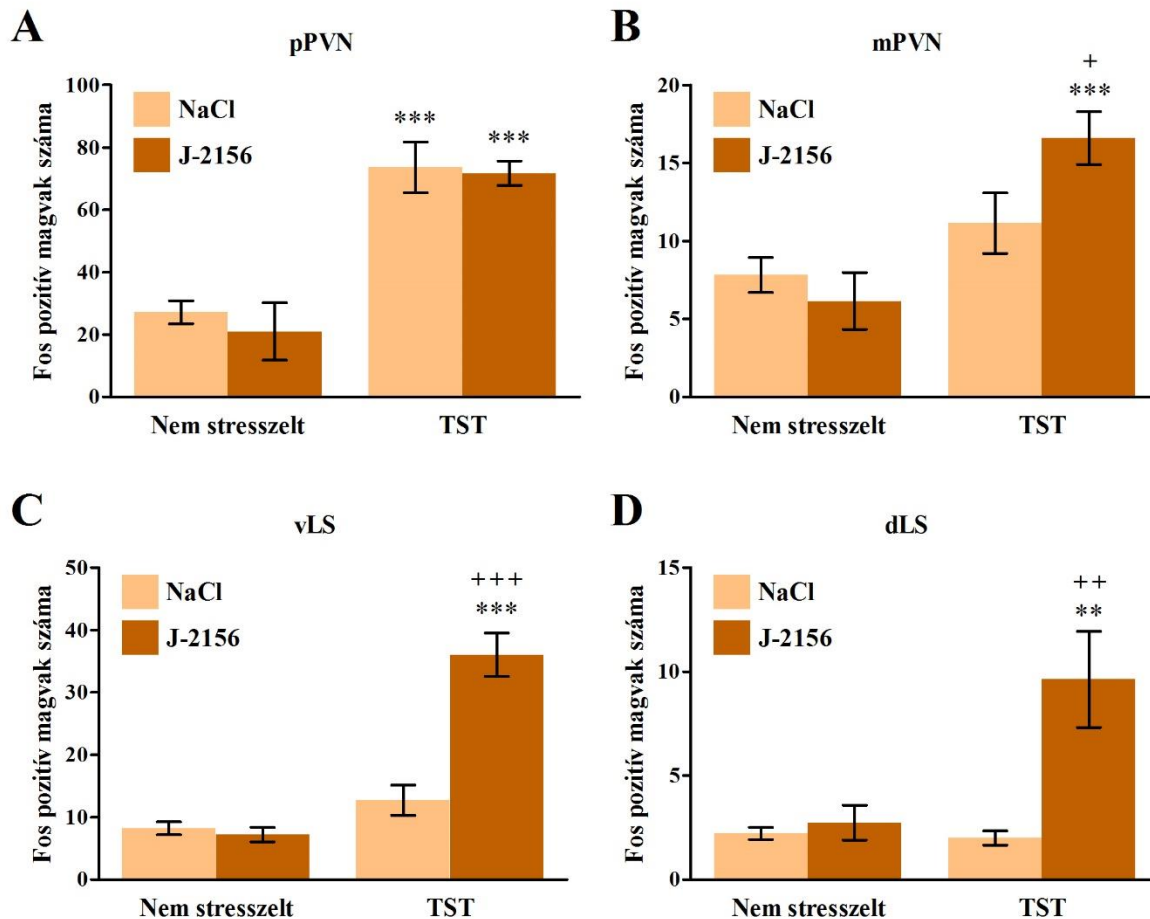
A dRN-ben a kvantitatív értékeléssel a stressz és a J-2156 jelentős hatását mutattuk ki és e két faktor interakciója is szignifikáns hatást fejtett ki a Fos immunreaktivitásra. A J-2156-al kezelt állatokban a Fos pozitív magok számának szignifikáns, több mint 3,5-szeres növekedését találtuk, míg a TST és a J-2156 önmagukban nem fejtettek ki jelentős hatást (**22.A ábra**). Bár az EWcp-ben az agonista és az interakció hatása nem bizonyult jelentősnek,

a stressz hatása a Fos válasza szignifikáns volt. Csak a J-2156-al kezelt állatok mutattak jelentős stressz-indukált Fos expresszió növekedést (**22.B ábra**). A stressz, a J-2156 és az interakció hatása is szignifikáns volt az IPAG-ban és a dPAG-ban, ahol a stresszre adott jelentős Fos választ az agonista kezelés tovább növelte (**22.C,D ábra**).



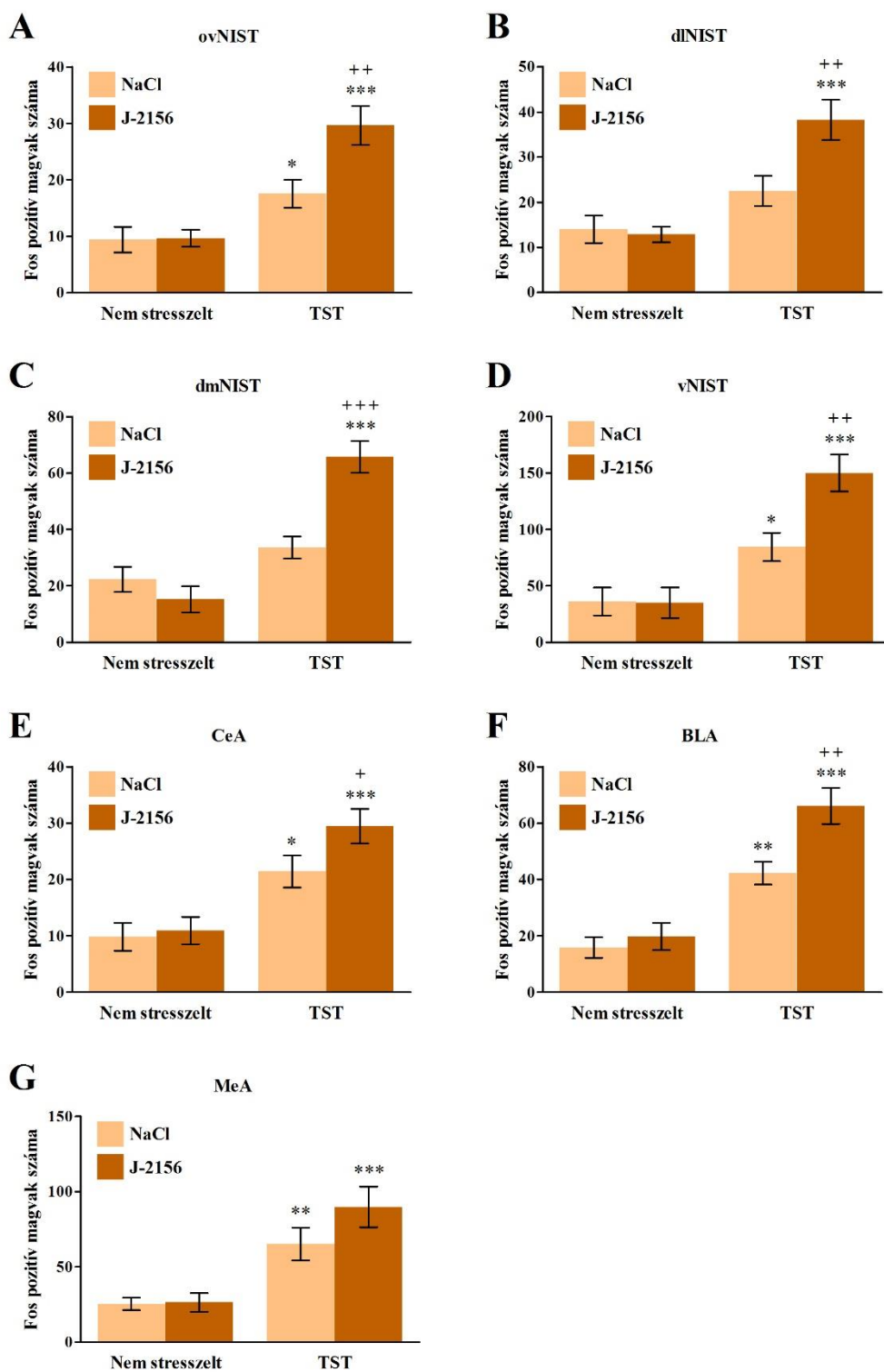
22. ábra. A TST és a J-2156 kezelés hatása a Fos immunreaktivásra agytörzsi stressz-központokban. A reprezentatív képek a dRN-ről készültek, a szaggatott vonal a dRN határát mutatja, a skálavonal 100 μm -nek felel meg. A grafikonok a Fos pozitív sejtmagok számát

mutatják (A) a dRN-ben, (B) az EWcp-ben, (C) a dPAG-ban és (D) az IPAG-ban (két utas ANOVA, Fisher post hoc teszt; átlagok \pm SEM; ** p <0,01 és *** p <0,001 vs. megfelelő nem stresszelt csoportok; + p <0,05 és +++ p <0,001 vs. megfelelő sóoldattal kezelt csoportok; n =6-8/csoport).



23. ábra. A TST és a J-2156 kezelés hatása a Fos immunpozitív sejtmagok számára (A) a pPVN-ben, (B) az mPVN-ben, (C) a vLS-ben és (D) a dLS-ben (két utas ANOVA, Fisher post hoc teszt; átlagok \pm SEM; ** p <0,01 és *** p <0,001 vs. megfelelő nem stresszelt csoportok; + p <0,05, ++ p <0,01 és +++ p <0,001 vs. megfelelő sóoldattal kezelt csoportok; n =6-8/csoport).

A PVN-ben a TST erősen szignifikáns hatást fejtett ki a Fos expresszióra, míg az agonista és az interakció hatása nem volt jelentős. Az immunpozitív magok száma a pPVN-ben mind az NaCl-oldattal, mind a J-2156-al kezelt csoportban megnövekedett, míg ez a válasz az mPVN-ben csak a J-2156-al kezelt állatokban jelentkezett (23.A,B ábra).



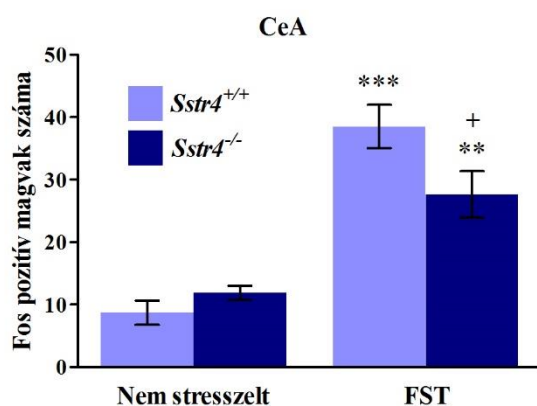
24. ábra. A TST és a J-2156 kezelés hatása a Fos immunpozitív sejtmagok számára (A) az ovNIST-ben, (B) a dlNIST-ben, (C) a dmNIST-ben, (D) a vNIST-ben, (E) a CeA-ban, (F) a BLA-ban és (G) a MeA-ban (két utas ANOVA, Fisher post hoc teszt; átlagok \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ vs. megfelelő nem stresszelt csoportok; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ és +++ $p < 0,001$ vs. megfelelő sóoldattal kezelt csoportok; $n = 6-8$ /csoport).

A TST-nek önmagában nem volt hatása a Fos immunpozitív sejtszámra a dLS-ben és a vLS-ben, míg a J-2156-al kezelt állatokban az LS mindkét része erős választ adott a stresszre (23.C,D ábra). A stressz, az agonista és az interakció hatása is szignifikáns volt ezen agyterületek esetében.

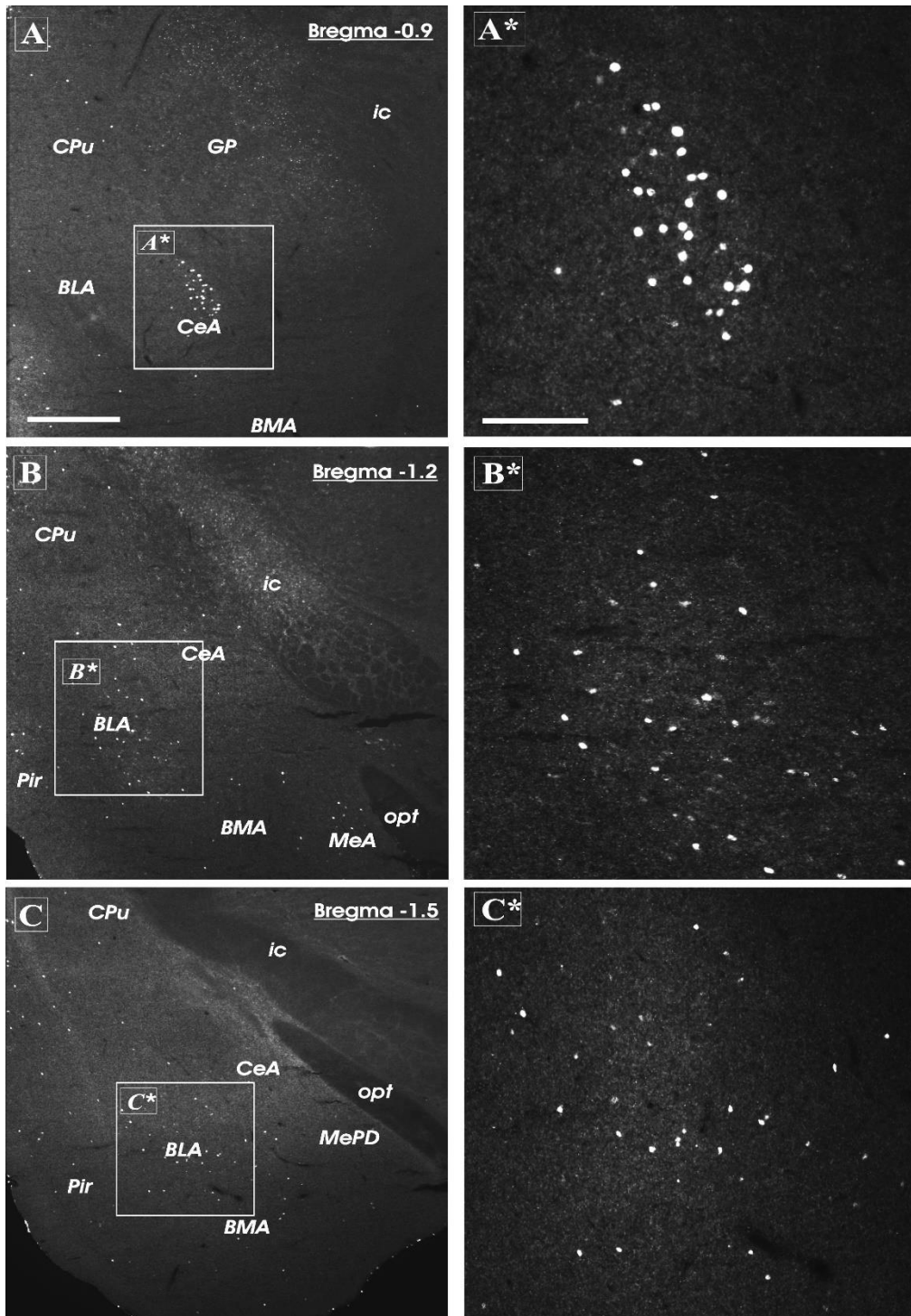
Az ovNIST-ban, dmNIST-ben és vNIST-ben a TST, a J-2156 és az interakciójuk hatása is jelentős volt a Fos immunreaktivitásra, míg a dlNIST-ben csak a stressz és az interakció hatása volt szignifikáns. A stressz-indukált Fos választ erősen növelte az agonista kezelés az ovNIST-ben és a vNIST-ben (24.A,D ábra), míg a növekedés csak a J-2156-al kezelt csoportban jelentkezett a dlNIST-ben és a dmNIST-ben (24.B,C ábra). Az agonista önmagában nem fejtett ki hatást.

A TST hatása az amygdala minden magvában szignifikáns volt, míg a J-2156 csak a BLA-ban fejtett ki jelentős hatást a Fos immunpozitivitásra, a CeA-ban és a MeA-ban nem. A *post hoc* teszt szerint a stresszre adott Fos válasz J-2156 adása után szignifikánsan növekedett a CeA-ban és a BLA-ban, míg a MeA-ban nem változott (24.E,F,G ábra).

Mivel az *Sstr4* gén deléciója a depresszió-szerű viselkedés jelentős növekedéséhez vezetett FST-ben, vizsgáltuk az FST-indukált Fos expresszió esetleges változásait a *knockout* állatokban is. A Fos immunreaktivitás szignifikáns növekedését találtuk az FST után az amygdala és a NIST almagjaiban, a pPVN-ben, az mPVN-ben, a dRN-ben és a vLS-ben *Sstr4*^{+/+} egerekben. Az *Sstr4*^{-/-} csoportban a Fos expresszió stressz-indukált növekedése a CeA-ban szignifikánsan kisebb volt, mint a vad típusúakban (25. ábra), míg a többi mag esetében nem találtunk különbséget a vad típusú és génhányos állatok között. (A két utas ANOVA-k eredményeit lsd. a *Melléklet 2. táblázatában*.)



25. ábra. A TST és az *Sstr4* gén-deléció hatása a Fos immunpozitív sejtmagok számára a CeA-ban, (két utas ANOVA, Fisher *post hoc* teszt; átlagok±SEM; ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ vs. megfelelő nem stresszelt csoportok; + $p < 0,05$ vs. megfelelő *Sstr4*^{+/+} csoportok; $n = 5-6$ /csoport).



26. ábra. $Sst4^{LacZ}$ immunjelölés $Sstr4^{-/-}$ egerek amygdalájában. (A-C) Kis nagyítású átnézeti képek az amygdala-piriform kéreg régióból három különböző rostro-caudalis síkban. (A*-C*) Nagyobb nagyítású képek az A, B és C képeken körülhatárolt zónákról (*CPu*: caudate putamen, *GP*: globus pallidus, *ic*: capsula interna, *Pir*: piriform cortex, *opt*: tractus opticus, *BMA*: basomedialis amygdala, *MePD*: medialis amygdala, pars posterodorsalis; skálavonal: A-C 500 μm , A*-C* 200 μm).

1.1.3. Sst4 expresszió a stresszhez kapcsolható agyterületeken

Az sst4 receptort expresszáló neuronok láthatóvá tételéhez sst4^{LacZ} immunhisztokémiát használtunk az amygdala és a dRN környékén különböző rostro-caudalis síkokban. Erős sst4^{LacZ} immunreaktivitást találtunk a neuronok egy kompakt csoportján a rostralis CeA-ban, ill. közepes-erős immunpozitivitás volt látható elszórt neuronokon a basolaterali/basomedialis amygdalában, MeA-ban és piriform cortexben (**26. ábra**). Ezzel ellentétben sst4^{LacZ} immunreaktivitás nem volt kimutatható a PVN-ben, a dRN-ben és a PAG-ban. Elszórt immunreaktivitás volt található a dorsomedialis/lateralis striatumban, ill. a nucleus accumbens köpeny része és a ventrolateralis septum határán (az adatokat nem mutatjuk).

1.2. Összefoglalás, megbeszélés, következtetések

Ezek az első adatok, amelyek az *sst4* aktiváció szorongáscsökkentő és antidepresszáns-szerű hatásait bizonyítják egérmodellekben a receptor genetikai deléciójával és szelektív farmakológiai aktivációjával. A *Sstr4*^{-/-} egerek szorongása és depresszió-szerű viselkedése EKP-ben és FST-ben megemelkedett, míg a J-2156 szorongáscsökkentő hatást fejtett ki EKP-ben C57Bl/6J egerekben és antidepresszáns-szerű hatást a TST-ben mindkét vizsgált egértörzsben. Az *sst4* farmakológiai stimulációja fokozta a TST-re adott Fos választ a dRN-ben, az EWcp-ben, a PAG-ban, a CeA-ban, a BLA-ban, a NIST-ben, a LS-ban és az mPVN-ben, de a pPVN-ben és a MeA-ban nem (1. táblázat). *Sst4*^{LacZ} immunreaktivitás a CeA-ban és a BLA-ban volt kimutatható.

		<i>Sstr4</i> génhány	J-2156	
			C57Bl/6J	CD1
EKP	Nyitott karokon töltött idő	↓	↑	↔
TST	Immobilitás	↔	↓	↓
FST	Immobilitás	↑	↔	↔
OFT	Lokomotoros aktivitás	↔	↔	↔
Akut stresszre adott Fos válasz		↓ FST után, a CeA-ban		↑ TST után, számos agyterületen

1. táblázat. Az *Sstr4* génhány és J-2156 hatásai akut stressz-szituációkban mutatott szorongásra és depresszió-szerű viselkedésre, ill. neuronális Fos expresszióra.

A génhányos állatok EKP-ben mutatott viselkedése az *sst4* receptornak az endogén szomatosztatin szorongáscsökkentő hatásában játszott fontos szerepére utal. Ezzel összhangban az *sst4* exogén stimulációja J-2156-al jelentősen növelte az EKP nyitott karjain töltött időt C57Bl/6J egerekben. Érdekes módon ezt a hatást CD1 egerekben nem láttuk, ami hangsúlyozza a törzskülönbségek jelentőségét az EKP-ben mutatott szorongáscsökkentő hatásokban, amire korábban mások is rámutattak (Sunyer és mtsai., 2007). Érdekes módon, az *Sstr4*^{+/+} állatok kb. 65%-al több időt töltöttek az EKP nyitott karjain, mint a sóoldattal kezelt

egerek a J-2156 kísérletben, pedig mindkét csoport C57Bl/6J alapú volt. Ez a jelenség valószínűleg az i.p. injekció hatásával magyarázható, amely maga is enyhe stresszor (Saldívar-González és mtsai., 1997). Mindez az erősebb stresszornak tekinthető TST és az FST esetében nem volt tapasztalható, vagyis csak az EKP teszt bizonyult érzékenynek az i.p. injekcióra.

Engin és mtsai. mutatták ki az intracerebroventricularisan adott szomatosztatin szorongáscsökkentő hatását EKP-ben patkányokban (Engin és mtsai., 2008). Később eredményeiket az sst₂ receptor aktivációjával magyarázták, mert egy sst₂ agonista adása csökkentette a szorongás paramétereit az EKP-ben, míg az általuk használt sst₄ agonista (intracerebroventricularisan adagolt L-803087) hatástalan volt (Engin és Treit, 2009). Egy másik vizsgálatban a septumba és az amygdalába injektált szomatosztatin szorongáscsökkentő hatása visszafordítható volt egy sst₂ antagonistá adásával (Yeung és Treit, 2012). Ezek a látszólagos ellentmondások a J-2156 speciális farmakológiai sajátosságának („szuperagonista”, lsd. Kísérleti modellek és vizsgálati módszerek 3.1.-et) tulajdoníthatók az L-803087-hez képest, másrészt potenciálisan a fajok közti különbségekből is eredhetnek. Ahogy már említésre került, a törzskülönbségek szerepe a neuropszichiátriai betegségek állatmodelljeiben igen jól dokumentált (Cryan és Mombereau, 2004; Sunyer és mtsai., 2007). Bár a fajok közti különbségekre vonatkozólag a viselkedést és a gyógyszerhatásokat tekintve nem rendelkezünk direkt adatokkal, valószínű, hogy hatásuk legalább olyan jelentős. Mindez felhívja a figyelmet arra, hogy az új gyógyszercélpontok jelentőségét, ill. új vegyületek hatását több fajban, ill. törzsből érdemes vizsgálni.

FST-ben az *Sstr4*^{-/-} állatok jelentősen megnövekedett depresszió-szerű viselkedést mutattak, míg az sst₄ agonista nem csökkentette az immobilitást sem a C57Bl/6J sem a CD1 törzsből. Ugyanakkor, az *Sstr4*^{-/-} állatok viselkedése változatlan volt TST-ben, viszont a J-2156 szignifikánsan csökkentette az immobilitást mind C57Bl/6J, mind CD1 egerekben. Bár a C57Bl/6J és CD1 állatok között jelentős különbség mutatkozott az alap depresszió-szerű viselkedésben, a J-2156 antidepresszáns-szerű hatásának mértéke egyforma volt mindkét alkalmazott tesztben. Korábban már más kutatócsoportok is kimutattak törzskülönbségeket a depresszió-szerű viselkedésben, ezek azonban nem befolyásolták a triciklusos antidepresszáns imipramin hatását (Liu és Gershenfeld, 2001). Mivel ezek alapján a J-2156 hatásának mechanizmusa a két vizsgált törzsből valószínűleg nem különbözik, csak CD1 egereket használtunk az agyi Fos térképezéshez.

Funkcionális eredményeink szerint az FST-ben mutatott viselkedést az sst₄ endogén aktivációja befolyásolja (mivel az *Sstr4*^{-/-} állatokban ez permanensen hiányzik), de az agonistával való stimuláció további antidepresszáns-szerű hatást már nem képes kiváltani. Ugyanakkor, a TST-ben az sst₄ akut exogén stimulációja bizonyult hatásosnak, míg az endogén sst₄ krónikus hiánya nem befolyásolja az immobilitást. A J-2156 korábban már leírt, az endogén szomatosztatintól eltérő speciális farmakológiai sajátosságai az sst₄ aktivációt illetően lehetséges magyarázatul szolgálhatnak a *knockout*-okkal és az agonistával végzett kísérletek közti eltérésekre. Az eredmények az FST-ben és a TST-ben mutatott akut stressz-indukált viselkedés eltérő mechanizmusára is utalhatnak, amelyet más csoportok eredményei is alátámasztanak. Például, a klinikai gyakorlatban széles körben használt SSRI antidepresszánsok hatékonyak a TST-ben, de az FST-ben nem (Cryan és mtsai., 2005). A génhiányos állapot és az akut farmakológiai stimuláció közti alapvető különbség (pl. komplex neuronhálózatok jelentős átrendeződése, ill. kompenzatorikus mechanizmusok működése a *knockout*-okban) szintén magyarázhatja ezeket az eltéréseket.

Az alkalmazott viselkedésteszték paramétereit erősen befolyásolja a lokomotoros aktivitás, azonban mivel sem az *Sstr4* deléció, sem a J-2156 kezelés nem befolyásolta a lokomóciót, a szorongással és depresszió-szerű viselkedéssel kapcsolatos eredményeinkre ez nem volt hatással. Mivel a külön tenyésztett és az alomtestvér *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} állatok hasonló különbségeket mutattak az FST-ben, a tenyésztési módszer sem befolyásolta a viselkedéses eredményeket. Ezt egyéb korábbi eredményeink is alátámasztják, melyek szerint az *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} egyedek genetikai háttere nem befolyásolja a viselkedéses fenotípust más tesztekben (Helyes és mtsai., 2009).

A szorongást és depresszió-szerű viselkedést vizsgáló tesztek egyben akut stressz-szituációk is, így ebben a munkában a TST-t és az FST-t akut stresszorként is használtuk és immunhisztokémiai vizsgálatunkban az ezekre adott Fos választ analizáltuk. A J-2156 Fos immunpozitivitásra kifejtett hatásának vizsgálata megmutatta, hogy bár az agonista önmagában nem befolyásolja a neuronális aktivitást a vizsgált agyterületeken, erősen növeli azok stressz-reaktivitását. Ezek az eredmények meglepőek voltak, tekintetbe véve, hogy a szomatosztatin általában gátló neuropeptidként viselkedik. Mindazonáltal, már korai eredmények is kimutatták, hogy a szomatosztatin (Dodd és Kelly, 1978) és receptorai stimuláló hatások kifejtésére is képesek. Például, az sst₄ aktivációja stimulálja az excitátoros neurotranszmissziót egér hippocampusban (Moneta és mtsai., 2002). Egyes agyterületeken a szomatosztatin preszinaptikus gátló hatását is kimutatták a GABA által közvetített

neurotranszmisszióra (Leresche és mtsai., 2000). Hasonló diszinhíbiós mechanizmus az sst₄ esetén is lehetséges. Mindazonáltal, mivel immunhisztokémiai vizsgálatok szerint az sst₄ elsősorban szomatodendritikus lokalizációjú (Schreff és mtsai., 2000), kézenfekvőnek tűnik egy posztzinaptikus gátló mechanizmus működése, hasonlóan az sst₂ medialis septalis GABAerg neuronokon kifejtett gátló hatásához (Bassant és mtsai., 2005).

Az sst₄ agonista hatására megnövekedett stressz-indukált Fos expressziót csökkent depresszió-szerű viselkedés kísérte a TST-ben. Irodalmi adatok szerint a szorongáscsökkentő és antidepresszáns-szerű hatásokat a Fos immunreaktivitás csökkenése és növekedése egyaránt kísérheti. Egyes tanulmányok a stressz-indukált Fos válasz csökkenését vagy a változás hiányát mutatták ki konvencionális antidepresszánsok hatására, mint például az SSRI fluoxetin, az SNRI venlafaxin (Silva és mtsai., 2012) vagy a nem pontosan ismert hatásmechanizmusú tianeptin (Godsil és mtsai., 2015). Egy másik tanulmányban az alap Fos expresszió növekedését írták le fluoxetin, a triciklusos antidepresszáns nortriptilin és dezipramin, a noradrenalin-dopamin reuptake inhibitor (NDRI) bupropion és a monoamin-oxidáz gátló tranilcipromin (Beck, 1995) hatására. Stressz-indukált Fos válasz növekedést is leírtak a citalopram és a dezipramin esetében (Choi és mtsai., 2013; Shi és mtsai., 2012). Anxiolitikumok esetében hasonlóan ellentmondásosnak tűnő adatokkal rendelkezünk. A diazepam a legtöbb limbikus struktúra esetében csökkenti a Fos reaktivitást kivéve a CeA-ban, ahol növeli azt (Lkhagvasuren és mtsai., 2014). A gaboxadol, egy GABA_A agonista, amely egy transzgenikus egértörzsben (Thy1 α 6) erős szorongáscsökkentő hatást fejt ki, számos agyterületen a Fos expresszió növekedését okozza, vagyis az anxiolitikus hatás a Fos indukciójával is együtt járhat (Hellsten és mtsai., 2015). Mindebből kitűnik, hogy a Fos reaktivitás változásának iránya nagymértékben függ a használt vegyület hatásmechanizmusától és az alkalmazott kezelési protokolltól, azonban egyértelmű, hogy a Fos válasz csökkenése nem kizárólagos mechanizmus sem az antidepresszáns, sem az anxiolitikus vegyületek esetében. Eredményeink jól korrelálnak kutatócsoportunk egy korábban közölt tanulmányával, amely hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid-deficiens egerekben az FST-ben mutatott megnövekedett depresszió-szerű viselkedés mellett csökkent Fos választ mutatott ki (Gaszner és mtsai., 2012). A pontos mechanizmus, amelyen keresztül a stresszhez kapcsolható agyterületek megnövekedett aktivációja csökkenti a depresszió-szerű viselkedést, nem egyértelmű. Az ebben résztvevő neuronok neurokémiai és elektrofiziológiai jellemzése szükséges a jövőben az sst₄ által közvetített neuronális válaszok és antidepresszáns-szerű hatás pontos mechanizmusának felderítéséhez.

A J-2156-al nyert adatok alapján kézenfekvőnek tűnik a feltételezés, hogy az sst4 hiánya a stresszre adott Fos reakció csökkenésével járhat. Mivel az *Sstr4* gén hiánya FST-ben vezetett a depresszió-szerű viselkedés jelentős növekedéséhez, a stressz-indukált Fos válasz esetleges változásait e teszt után vizsgáltuk. Számos agyterület a Fos expresszió növekedésével válaszolt az FST-re. Ez a válasz az *Sstr4*^{-/-} egerek CeA-jában lényegesen kisebb volt, mint a vad típusúakban, a többi agyterület esetében azonban nem találtunk különbséget. Az elvárt széleskörű gátló hatás hiánya alapján a génhányos állatokban egy Fos immunhisztokémiával nem detektálható mechanizmus működése feltételezhető. Mindazonáltal, a CeA csökkent Fos reaktivitása lényeges adat, figyelembe véve, hogy ennek a magnak jelentős szerepe valószínűsíthető az sst4 stimuláció antidepresszáns-szerű hatásában.

A számos vizsgált agyterület közül, amelyek fokozott Fos választ mutattak J-2156 kezelés után, csak az amygdalában mutattak ki sst4 expressziót korábbi vizsgálatokban (Schreff és mtsai., 2000; Selmer és mtsai., 2000a, 2000b). Az sst4^{LacZ} immunjelölés egerben is megerősítette ezeket az adatokat, mivel jelentős immunpozitivitást találtunk a centralis és a basolateralis/basomedialis amygdalában. Az irodalomból ismert a CeA, BLA és MeA emocionális szabályozásban játszott eltérő szerepe és különböző aktivációs mintázata akut stressz során (Butler és mtsai., 2012). A Fos válasz J-2156-indukált növekedése a CeA-ban és a BLA-ban volt kimutatható, ami az ezekben az almagokban jelenlévő sst4 receptorok lényeges szerepére utal a J-2156 antidepresszáns-szerű hatásának közvetítésében. Bár a MeA-ban is találtunk elszórt sst4^{LacZ} pozitív neuronokat, eredményeink alapján ezek jelentősége nem valószínű. Az irodalomból jól ismert az amygdala központi szerepe a stressz mellett a hangulatzavarok és a szorongás patomechanizmusában is (McEwen és Gianaros, 2010). A vele szoros funkcionális kapcsolatban álló, a szorongás szabályozásában alapvető jelentőségű NIST (Hammack és mtsai., 2010) szintén fokozott Fos választ mutatott az agonistával kezelt állatokban. Az amygdala és a NIST efferens projekciókat küldenek más, sst4-et nem expresszáló stressz-központokba (pl. dRN, PAG, PVN) és szabályozzák azok aktivitását (Drevets és mtsai., 2008). A CeA, amely az amygdala fő kimeneti magva, nagyrészt GABAerg neuronokat tartalmaz. A CeA-ban található, egyéb agyterületeket célzó idegsejtek lokális gátló interneuronok szabályozása alatt állnak, utóbbiak stimulációja szorongáscsökkentő hatású (Tye és mtsai., 2011). E lokális interneuronok aktivitásának sst4 aktiváció hatására létrejövő fokozódása és a következményes diszinhibíció egy lehetséges mechanizmus, amelyen keresztül az amygdala szabályozása alatt álló magok aktivitása növekszik, amit a depresszió-szerű viselkedés csökkenése kísér. Összefoglalva, az sst4

stimulációjának a dRN, a PAG, az EWcp és az mPVN aktivációjára kifejtett hatása indirekt módon, az amygdala/NIST-rendszerrel való összeköttetéseiken keresztül jöhet létre és a J-2156 viselkedéses hatásai e hálózat stressz-válaszkésztségének fokozódásával magyarázható.

A szomatosztatint expresszáló számos agyterület közül az amygdala tűnik a legjelentősebbnek a peptid emocionális regulációban játszott szerepe szempontjából. Az irodalomból ismert, hogy akut stressz hatására az amygdalában szomatosztatint szabadul fel (Brodin és mtsai., 1994), ill. hogy az itt található szomatosztatinerget interneuronok aktivációs mintázata a stresszor típusától függ (Butler és mtsai., 2012). A CeA-ban és a BLA-ban a szomatosztatint lokális interneuronokból és/vagy távolabbról projiciáló neuronokból (Viollet és mtsai., 2008) való felszabadulása után hathat az sst₄ receptorokon, így közvetett módon befolyásolva a többi agyterület aktivitását. További vizsgálatokat igényel a pontos mechanizmus, ill. az egyéb receptorokkal, például az sst₂-vel való esetleges interakció tisztázása. Utóbbi nagy mennyiségben expresszálódik az amygdalában és az sst₄-el való kölcsönhatásait más modellekben már kimutatták (Aourz és mtsai., 2011).

Az agytörzsi központok közül a dRN mutatta a legnagyobb mértékű növekedést a stresszre adott válaszban sst₄ stimuláció hatására. Az agyi szerotoninerget beidegzés e hídban található központjának depresszióban és szorongásban szerepe jól ismert (Lowry és mtsai., 2008), így a J-2156 antidepresszáns-szerű hatásában a szerotoninerget transzmisszió stimulációja lényeges komponens lehet. Az urokortinerget stressz-központban (Kozicz és mtsai., 2008), az EWcp-ben a TST önmagában nem befolyásolta a Fos expressziót, azonban érdekes módon a stressz és a J-2156 együtt növelték a neuronális aktivitást. A dPAG a stressz, a félelem és a szorongás szabályozásában fontos agyterület (Graeff és Zangrossi, 2010), míg az lPAG a leszálló fájdalomcsillapító rendszer (Heinricher és mtsai., 2009) része. Mindkettő fokozott stressz-indukált Fos választ mutatott a J-2156-al kezelt állatokban.

Az LS a viselkedéses és neuroendokrin stressz-válasz fontos szabályozója (Singewald és mtsai., 2011), amely a dRN felől kap szerotoninerget beidegzést (Köhler és mtsai., 1982) és igen jelentős Fos expresszió növekedést mutatott a J-2156 kezelés mellett végzett TST után.

Érdekes módon a J-2156 semmilyen hatást nem fejtett ki a pPVN-ben, annak ellenére, hogy a TST hatására jelentős mértékben nőtt e magban a Fos expresszió. Mivel a pPVN a HPA-tengely első eleme (Herman és mtsai., 2003), e neuroendokrin rendszer befolyásolása valószínűleg nem játszik szerepet az sst₄ stimuláció akut antidepresszáns-szerű hatásában. Ezzel ellentétben, az AVP-t és oxitocint termelő mPVN-ben talált fokozott válasz felveti e

neuropeptidok jelentőségének lehetőségét, amelyek a stressz-válasz jól ismert szabályozói (Kormos és Gaszner, 2013).

Munkánk során elsőként mutattuk ki, hogy az sst₄ receptor fontos szerepet játszik a szorongás, depresszió-szerű viselkedés és a stresszhez kapcsolható neuronális hálózatok aktivitásának szabályozásában. A korábbi eredmények a receptor jelentőségét gyógyszerfejlesztési szempontból elsősorban agonistáinak fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatásaira, ill. az endokrin hatások hiányára alapozták (Pintér és mtsai., 2002; Sándor és mtsai., 2006; Helyes és mtsai., 2009). Itt bemutatott adataink alapján ezek mellett az sst₄ az új pszichofarmakológiai ágensek kutatásának is ígéretes célpontja lehet.

2. Az *Sstr4* génihiányos egerek fokozott érzékenysége krónikus stressz-indukált viselkedéses és neuroendokrin változásokra

2.1. Eredmények

2.1.1. Módosult viselkedéses válaszok KVS-re *Sstr4*^{-/-} egerekben

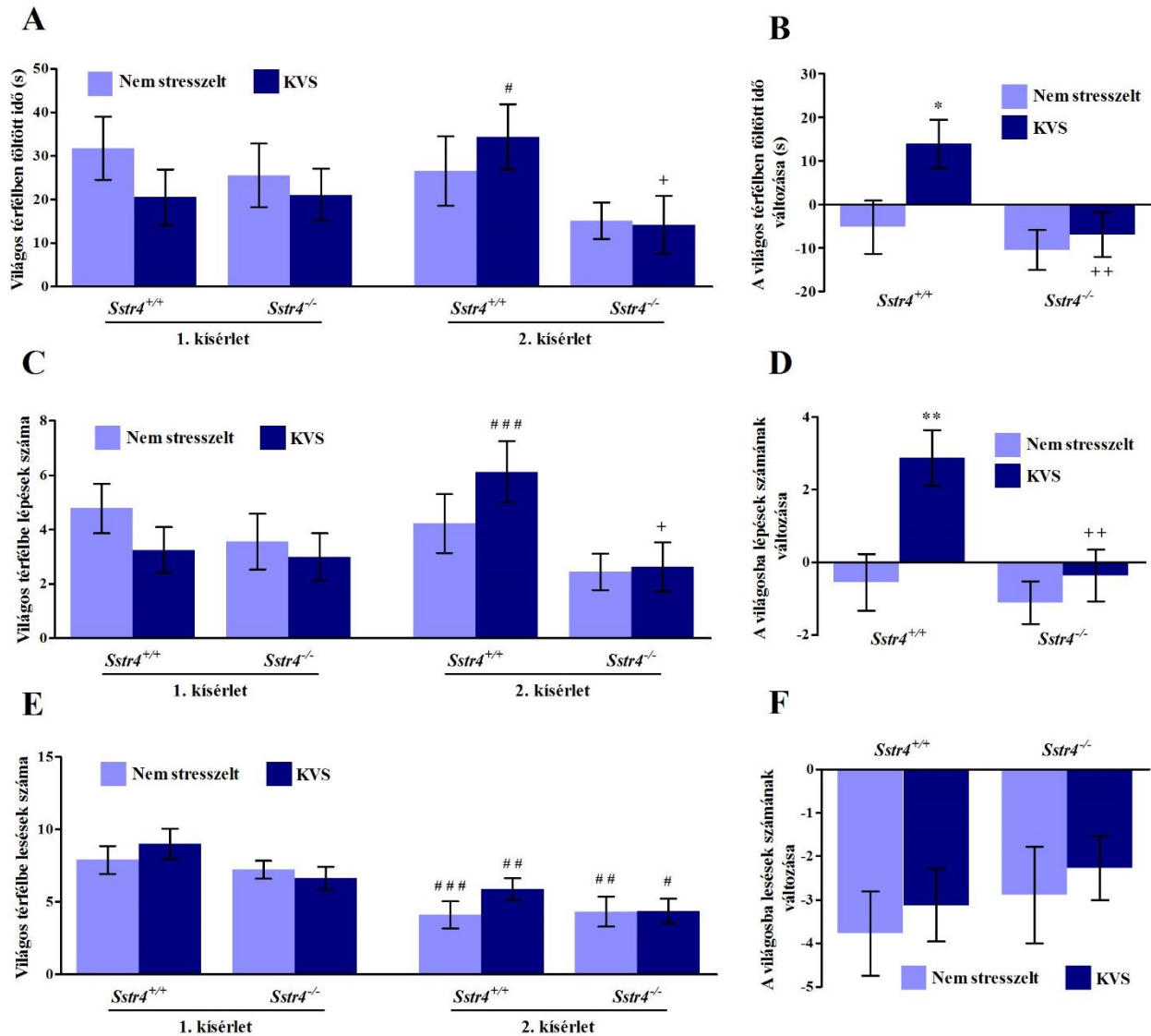
Az állatok viselkedését a KVS előtt („1. kísérlet”) és után („2. kísérlet”) is vizsgáltuk (az ezek összehasonlításához használt ismételt méréses két utas ANOVA eredményeit lsd. a **Melléklet 3. táblázatában**) és a viselkedésváltozásokat is jellemeztük az 1. és 2. kísérletben mért paraméterek különbségeinek kiszámításával minden állat esetén (az eredmények összehasonlításához használt két utas ANOVA eredményeit lsd. a **Melléklet 4. táblázatában**).

Az *Sstr4* génihiányos és vad típusú egerek között az 1. kísérlet során nem találtunk különbséget az SVD-ben sem a világos térfélen töltött időben, sem a világosba lépések vagy lesések számában (**27.A,C,E ábra**). A 2. kísérletben a KVS-nek kitett vad típusú állatok esetében a világosban töltött idő és a világosba lépések száma nem különbözött a nem-stresszelt vad típusúakétól, azonban szignifikánsan növekedett a megfelelő 1. kísérletben kapott adatokhoz képest. A stresszelt *Sstr4*^{-/-} állatok e paraméterei alacsonyabbak voltak, mint a stresszelt *Sstr4*^{+/+} egerekben, azonban a nem stresszelt *knockout*-októl nem különböztek (**27.A,C ábra**). A világosban töltött idő és a világosba lépések számának változásait összehasonlítva azt találtuk, hogy e paraméterek változása (növekedése) a stresszelt vad típusúakban jelentősen különbözött a megfelelő nem-stresszelt csoporttól. Ezzel ellentétben, a KVS nem fejtett ki hatást ezeknek a magatartási paramétereknek a változására az *Sstr4*^{-/-} csoportban (**27.B,D ábra**). A világosba lesések száma a 2. kísérletre minden csoportban egyforma mértékben csökkent (**27.F ábra**).

A TST-ben immobilitással töltött időben nem volt különbség az *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} csoportok között a KVS előtt (1. kísérlet). A krónikus stressz után (2. kísérlet) ez a depresszió-szerű viselkedés növekedett a stresszelt *knockout*-okban ugyanennek a csoportnak az 1. kísérletben mért adataihoz, ill. a 2. kísérleten belül a megfelelő *Sstr4*^{+/+} és a nem-stresszelt *Sstr4*^{-/-} csoportokhoz képest is (**28.A ábra**). Az immobilitás változása jelentősen nagyobb volt a KVS-nek kitett *Sstr4*^{-/-} egerekben a stresszelt vad típusúakhoz és a nem stresszelt génihiányosokhoz hasonlítva is (**28.B ábra**).

Az FST-ben mért immobilitás az 1. kísérletben szignifikánsan nagyobb volt az *Sstr4*^{-/-} állatokban a vad típusúakhoz képest. A KVS után a krónikusan stresszelt *knockout*-ok

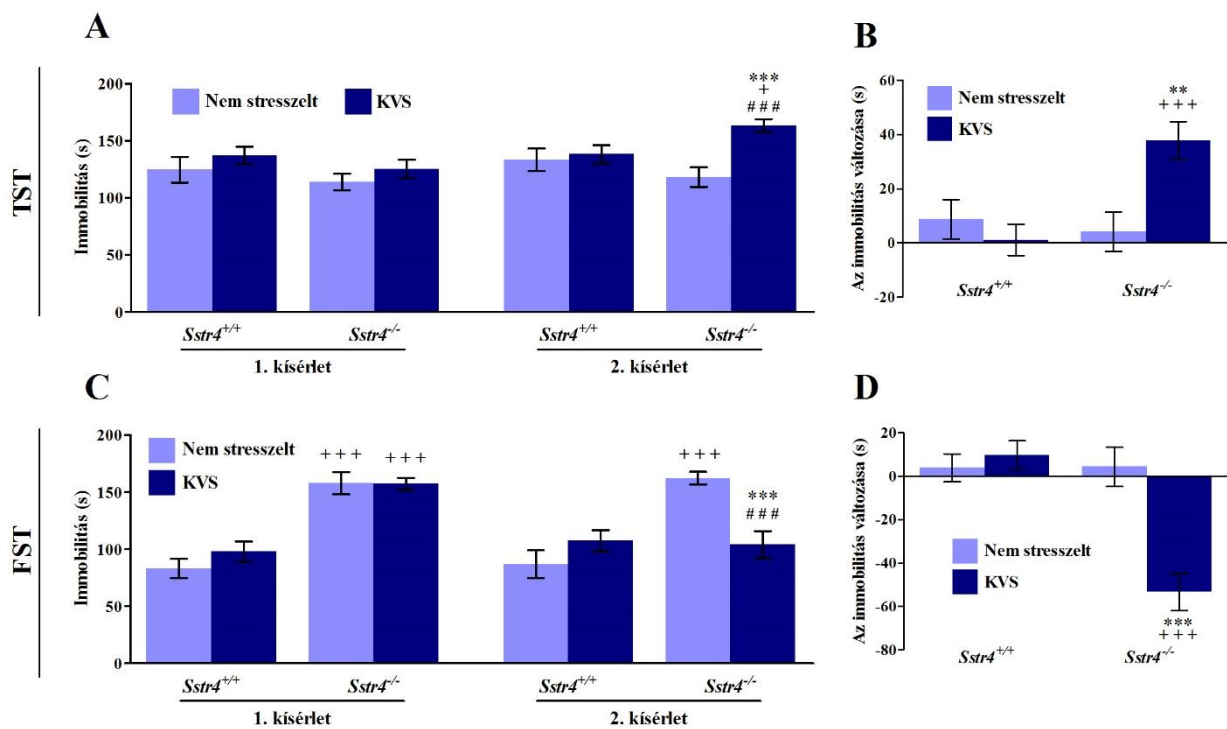
immobilitása csökkent és hasonlóvá vált a vad típusúakéhoz, amelyekben a stressz nem fejtett ki hatást (28.C ábra). Míg a vad típusú és nem-stresszelt génihiányos egerek immobilitása szembetűnően nem változott, a stresszelt *Sstr4*^{-/-} állatokban e paraméter csökkenése jelentős volt (28.D ábra).



27. ábra. Viselkedésváltozások az SVD-ben KVS hatására *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} egerekben. A grafikonok az SVD viselkedési paraméterek (A, C, E) 1. és 2. kísérletben mért abszolút értékeit (ismételt mérés két utas ANOVA, Fisher post hoc teszt; átlagok±SEM; #*p*<0,05, ##*p*<0,01 és ###*p*<0,001 vs. megfelelő „1. kísérlet” mérés; az „1. és 2. kísérleteken” belül: +*p*<0,05 vs. megfelelő *Sstr4*^{+/+} csoportok; *n*=9-11/csoport), ill. (B, D, F) a változásokat mutatják (két utas ANOVA, Fisher post hoc teszt; átlagok±SEM; **p*<0,05 és ***p*<0,01 vs. megfelelő nem stresszelt csoportok; ++*p*<0,01 vs. megfelelő *Sstr4*^{+/+} csoportok; *n*=9-11/csoport).

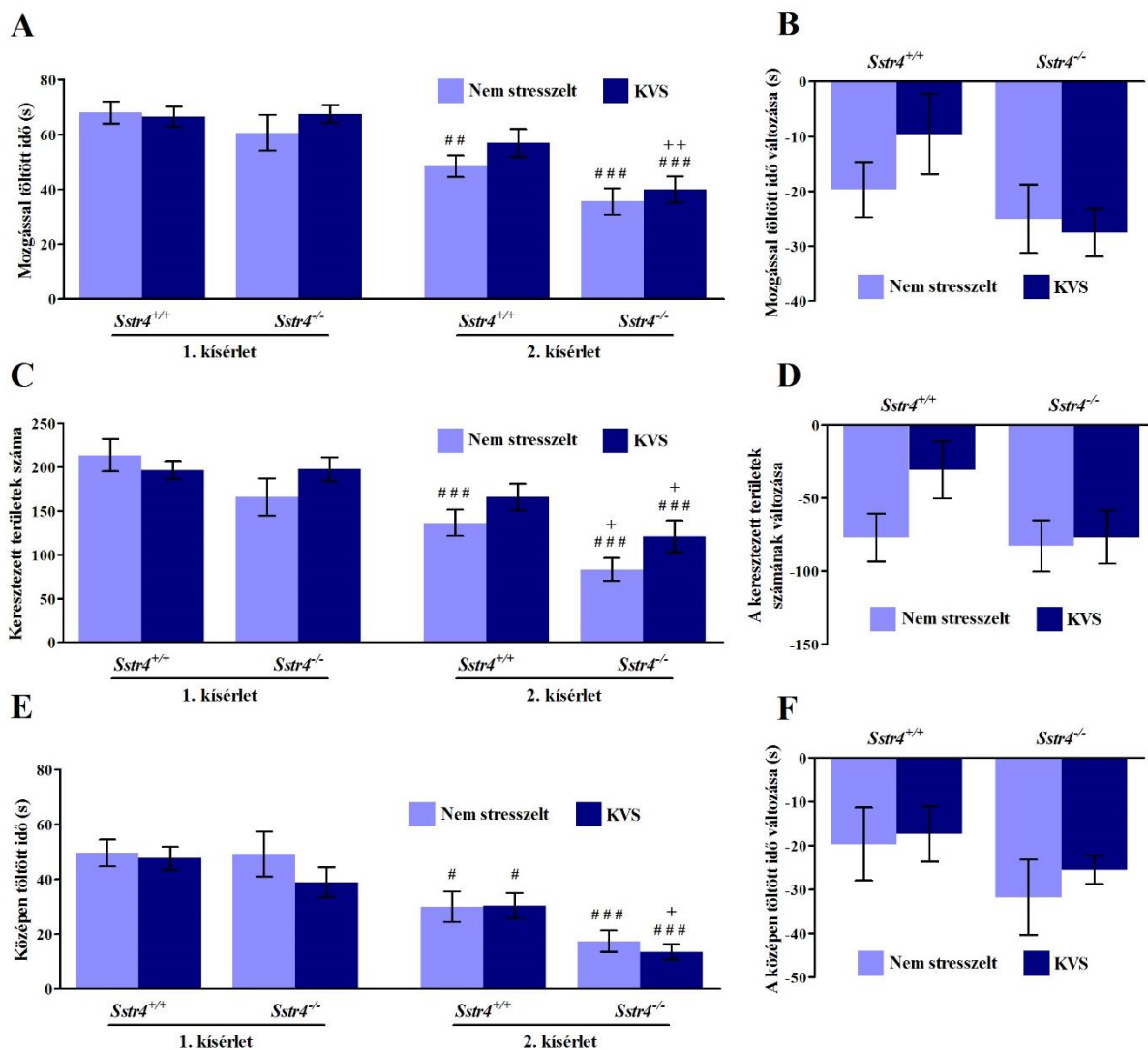
Az OFT-ben a genotípus nem volt hatással a viselkedési paraméterekre az 1. kísérletben. A KVS jelentősen nem befolyásolta az OFT viselkedést, azonban a 2. kísérletben a lokomotoros aktivitás és a közepen töltött idő csökkenésének irányába mutató tendencia volt kimutatható az összes csoportban az 1. kísérlet adataihoz képest és az *Sstr4*^{-/-} állatok paraméterei alacsonyabbnak bizonyultak a vad típusúakéinál. A 2. kísérletben a lokomotoros aktivitás paramétereit tekintve a nem-stresszelt *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-}, ill. a stresszelt génihiányos csoportok is jelentős csökkenést mutattak az 1. kísérlethez viszonyítva. Hasonló csökkenés volt kimutatható az összes csoportban a közepen töltött idő analizisekor. A stresszelt *Sstr4* knockout-ok összes paramétere jelentősen alacsonyabb volt a stresszelt vad típusúakhoz viszonyítva, míg a nem stresszelt csoportok esetében csak a keresztezett területek számában találtunk genotípusok szerinti különbséget (29.A,C,E ábra). Az OFT-ben mutatott viselkedés változásait tekintve nem volt kimutatható különbség a csoportok között (29.B,D,F ábra).

Az SPT-ben nem találtunk szignifikáns eltéréseket a csoportok között sem a szacharóz preferenciát (30.A ábra) sem annak változását vizsgálva (30.B ábra).

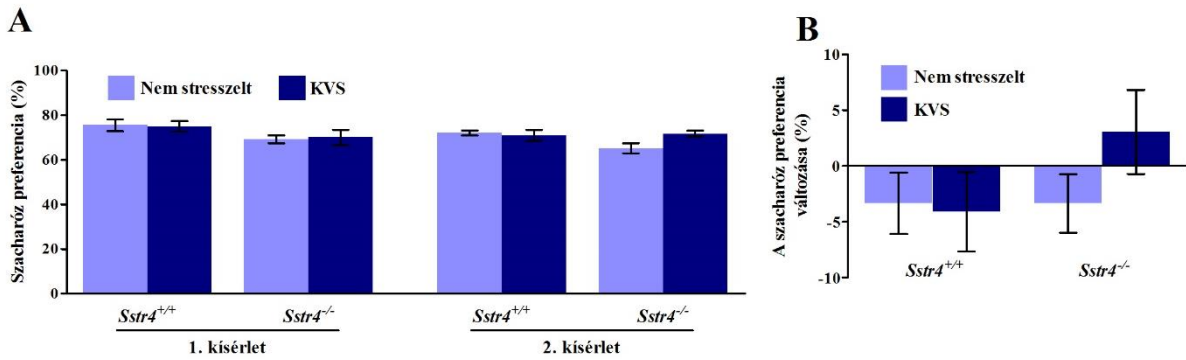


28. ábra. Viselkedésváltozások TST-ben és FST-ben a KVS hatására *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} egerekben. A grafikonok (A) a TST és (C) FST viselkedési paraméterek 1. és 2. kísérletben mért abszolút értékeit (ismételt méréses két utas ANOVA, Fisher post hoc teszt; átlagok±SEM; ###*p*<0,001 vs. megfelelő „1. kísérlet” mérés; az „1. és 2. kísérleteken” belül: +*p*<0,05 és +++*p*<0,001 vs. megfelelő *Sstr4*^{+/+} csoportok, ****p*<0,001 vs. megfelelő nem stresszelt

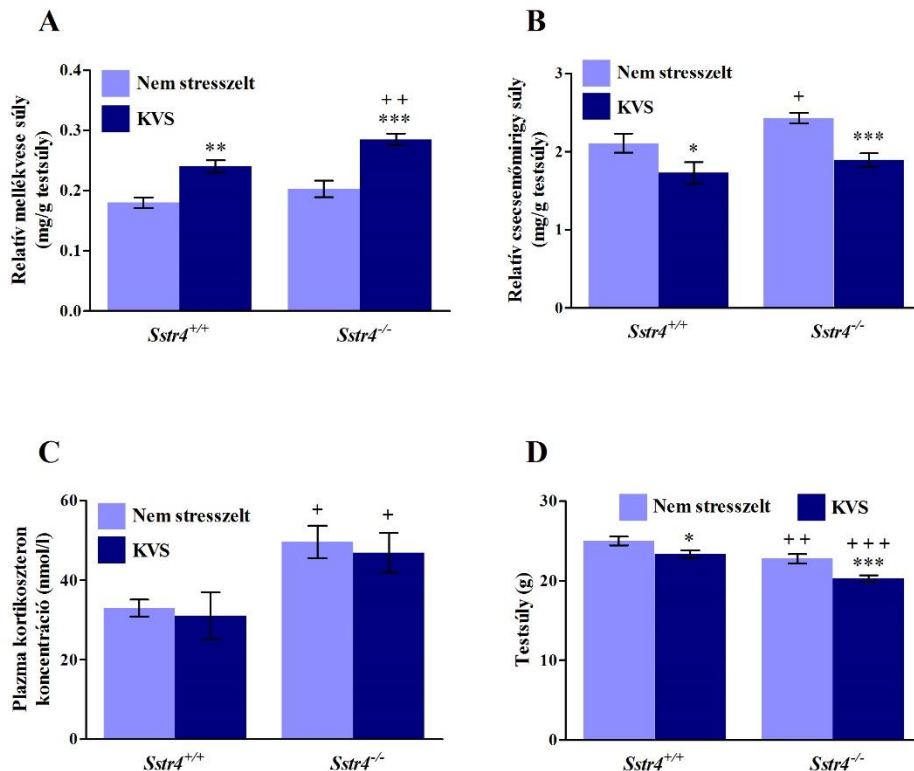
csoporthoz; $n=9-11$ /csoporthoz), ill. a (B) TST és (D) FST viselkedés változásait mutatják (két utas ANOVA, Fisher post hoc teszt; átlagok \pm SEM; $**p<0,01$ és $***p<0,001$ vs. megfelelő nem stresszelt csoportok; $+++p<0,001$ vs. megfelelő $Sstr4^{+/+}$ csoportok; $n=9-11$ /csoporthoz).



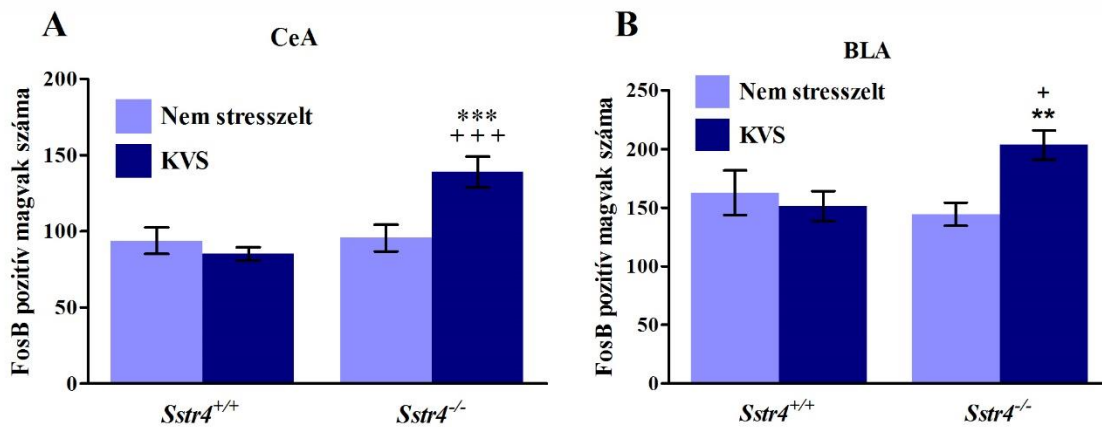
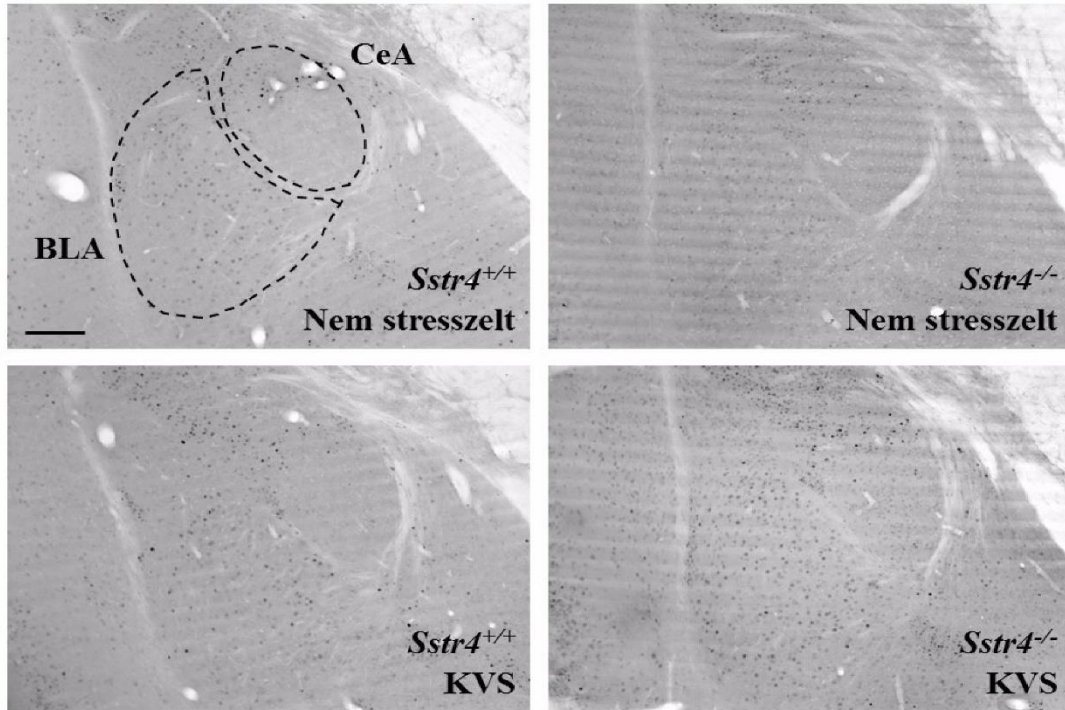
29. ábra. Viselkedésváltozások az OFT-ben KVS hatására $Sstr4^{+/+}$ és $Sstr4^{-/-}$ egerekben. A grafikonok az OFT viselkedési paraméterek (A, C, E) 1. és 2. kísérletben mért abszolút értékeit (ismételt mérés két utas ANOVA, Fisher post hoc teszt; átlagok \pm SEM; $\#p<0,05$, $\#\#p<0,01$ és $\#\#\#p<0,001$ vs. megfelelő „1. kísérlet” mérés; az „1. és 2. kísérleteken” belül: $+p<0,05$ és $++p<0,01$ vs. megfelelő $Sstr4^{+/+}$ csoportok; $n=9-11$ /csoporthoz), ill. (B, D, F) a változásokat mutatják (két utas ANOVA, Fisher post hoc teszt; átlagok \pm SEM; $n=9-11$ /csoporthoz).



30. ábra. Változatlan szacharóz preferencia SPT-ben a KVS után *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} egerekben. A grafikonok a szacharóz preferencia (A) 1. és 2. kísérletben mért abszolút értékeit (ismételt mérés két utas ANOVA, Fisher post hoc teszt; átlagok±SEM; n=9-11/csoport), ill. (B) a változásukat mutatják (két utas ANOVA, Fisher post hoc teszt; átlagok±SEM; n=9-11/csoport).



31. ábra. Neuroendokrin és fizikai paraméterek változásai KVS hatására *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} egerekben. A grafikonok (A) a relatív mellékvese és (B) csecsemőmirigy súly, (C) a plazma kortikoszteron koncentrációk és (D) a testsúly változásait demonstrálják (két utas ANOVA, Fisher post hoc teszt; átlagok±SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ vs. megfelelő nem stresszelt csoportok; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ és +++ $p < 0,001$ vs. megfelelő *Sstr4*^{+/+} csoportok; n=9-11/csoport).



32. ábra. A KVS hatása a FosB immunpozitív sejtmagok számára *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} egerekben. A reprezentatív képek az amygdaláról készültek, a szaggatott vonalak a CeA és a BLA határait mutatják, a skálavonal 200 μm -nek felel meg. A grafikonok a FosB pozitív sejtmagok számát mutatják (A) a CeA-ban és (B) a BLA-ban (két utas ANOVA, Fisher post hoc teszt; átlagok \pm SEM; ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ vs. megfelelő nem stresszelt csoportok; + $p < 0,05$ és +++ $p < 0,001$ vs. megfelelő *Sstr4*^{+/+} csoportok; $n = 9-11$ /csoport).

2.1.2. Neuroendokrin és szomatikus paraméterek változása az *Sstr4* gén-deléció és a KVS hatására

Bár a nem-stresszelt *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} egerek között nem volt különbség a relatív mellékvese súlyban, e paraméter KVS hatására létrejövő növekedése jelentősen nagyobb volt a *knockout* állatokban (**31.A ábra**). A nem-stresszelt génhiányos állatokban a relatív csecsemőmirigy súly jelentősen nagyobb volt, mint a megfelelő vad típusú csoportban, majd a KVS hatására az *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} egerekben is hasonló értékre csökkent (**31.B ábra**). A bazális plazma kortikoszteron koncentrációk szignifikánsan magasabbnak bizonyultak az *Sstr4*^{-/-} állatokban, de az alkalmazott kísérleti elrendezésben a krónikus stressz erre nem volt hatással sem a vad típusú, sem a génhiányos csoportokban (**31.C ábra**). A nem-stresszelt *Sstr4*^{-/-} egerek testsúlya alacsonyabb volt, mint a megfelelő *Sstr4*^{+/+} állatoké, azonban a KVS egyforma mértékben csökkentette azt, a genotípustól függetlenül (**31.D ábra**). (A két utas ANOVA-k eredményeit lsd. a **Melléklet 5. táblázatában**.)

2.1.3. Az *Sstr4* gén-deléció és a KVS hatása a stresszhez kapcsolható agyterületek aktivációs mintázatára

A FosB immunreaktivitást a CeA-ban és a BLA-ban nem befolyásolta a KVS *Sstr4*^{+/+} egerekben, míg a krónikusan stresszelt *Sstr4*^{-/-} állatokban jelentősen növekedett a FosB pozitív sejtmagok száma (**32.A,B ábra**). Ezzel ellentétben, a FosB immunpozitivitás változatlan maradt a KVS után a vad típusú és génhiányos egerekben is a MeA-ban, a NIST almagvaiban, a hippocampusban, a vLS-ben, a dLS-ben, a pPVN-ben és mPVN-ben, a dRN-ben, EWcp-ben, a dPAG-ban és az IPAG-ban. (A két utas ANOVA-k eredményeit lsd. a **Melléklet 6. táblázatában**.)

2.2. Összefoglalás, megbeszélés, következtetések

Ezek az adatok az elsők, amelyek az $ss4$ receptor krónikus stresszre adott válaszokban játszott fontos szerepét bizonyítják a viselkedéses és neuroendokrin változások, ill. a stresszhez köthető agyterületek FosB immunpozitivitásának vizsgálatával. SVD-ben a fénypreferencia enyhén növekedett vad típusú egerekben, ami az *Sstr4* génhíányosokban nem volt kimutatható. Az *Sstr4*^{+/+} állatok depresszió-szerű viselkedése a TST-ben nem változott, míg az *Sstr4*^{-/-} egerek immobilitása jelentősen nőtt a KVS-t követően. Az *Sstr4* génhíányos állatok alap immobilitása FST-ben emelkedett volt (összhangban a korábban leírtakkal) és KVS hatására csökkent, míg vad típusúakban változatlan maradt. A krónikus stressz nem befolyásolta az OFT viselkedést és a szacharóz preferenciát sem a vad típusú, sem a *knockout* csoportokban. A relatív mellékvese súly növekedése nagyobb volt a génhíányos, mint az *Sstr4*^{+/+} egerekben, míg nagyobb alap relatív csecsemőmirigy súlyuk azonos értékre csökkent. A bazális kortikoszteron plazma koncentráció magasabb volt az *Sstr4*^{-/-} állatokban, azonban a KVS az alkalmazott protokoll mellett ezt nem befolyásolta. Az *Sstr4*^{-/-} egerek testsúlya alacsonyabb volt, mint a vad típusúaké, azonban mindkét csoportban azonos mértékben csökkent a KVS hatására. A FosB immunreaktivitás szelektív növekedése volt kimutatható a CeA-ban és a BLA-ban az *Sstr4*^{-/-} állatokban, vad típusúakban azonban nem (**2. táblázat**).

Kísérletes elrendezésünkben a viselkedésteszteket kétszer, a KVS előtt és a krónikus stressz utolsó hetében végeztük el. Hasonló módszert korábban mások is alkalmaztak (Strekalova és mtsai., 2004). Ezzel a megközelítéssel egyrészt kimutathatók voltak a viselkedéses paraméterek alap különbségei a vad típusú és génhíányos egerek között, másrészt ki tudtuk zárni a különbségeket az azonos genotípusú csoportok között. Ezen kívül, a paraméterek változásának kiszámításával és összehasonlításával finomabb viselkedéses különbségek kimutatása is lehetségessé vált. Felvethető, hogy az azonos viselkedéstesztek ismétlése befolyásolhatja az eredményeket a múltbéli élményekre vonatkozó memória révén, azonban mivel a legtöbb viselkedéstesztben az 1. és 2. kísérletben mért értékek a nem-stresszelt csoportokban nem különböztek jelentősen (az OFT kivételével, lsd. alább), az ismétlés hatása önmagában nem tűnik jelentősnek.

Az itt alkalmazott KVS paradigma igen enyhe viselkedéses fenotípust hozott létre vad típusú egerekben, ami összhangban van a hasonló hosszúságú KVS protokollok relatíve gyenge hatását mutató korábbi adatokkal C57Bl/6 egerekben (Monteiro és mtsai., 2015). Ezt általában a modell hátrányának tekintik, figyelembe véve, hogy a legtöbb genetikailag módosított egértörzset C57Bl/6 alapon hozták létre. Kísérleteink során azonban mi

kihasználtuk ezt a tulajdonságot, mivel a *knockout*-okban jelentkező feltűnően erősebb viselkedéses fenotípussal fokozott stressz-érzékenységet lehetett kimutatni.

		<i>Sstr4</i> génihiány hatása nem stresszelt egerekben	KVS hatása	
			<i>Sstr4</i> ^{+/+} egerekben	<i>Sstr4</i> ^{-/-} egerekben
SVD	Fénypreferencia	↔	↑	↔
TST	Immobilitás	↔	↔	↑
FST	Immobilitás	↑	↔	↓
OFT	Lokomotoros aktivitás	↔	↔	↔
Relatív mellékvese súly		↔	↑	↑↑
Relatív csecsemőmirigy súly		↑	↓	↓
Plazma kortikoszteron		↑	↔	↔
Testsúly		↓	↓	↓
FosB expresszió a CeA-ban és BLA-ban		↔	↔	↑

2. táblázat. Az *Sstr4* génihiány hatásai. ill. a KVS-re adott viselkedéses, neuroendokrin és neuronális aktivációs válaszok *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} egerekben.

Sstr4^{+/+} egerekben az SVD-ben talált enyhe fénypreferencia növekedés volt a KVS hatására kialakuló egyetlen kimutatható viselkedéses elváltozás. Ez a korábban már mások által is megfigyelt (Schweizer és mtsai., 2009) hatás a teszt klasszikus értelmezése szerint „rendellenes vagy paradox szorongáscsökkenést” jelentene, krónikus stressz-modellekben azonban „tompult emocionalitásként” is értelmezhető (Ducottet és mtsai., 2003). Egy korábbi kísérletben, amelyben különböző egértörzsekben vizsgálták a KRS hatását, ezt a paradox jelenséget szelektíven a C57Bl/6 törzsből mutatták ki (amely az *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} egerek alapja is) és háttérben glutamáterg neuroplaszticitási változásokat találtak az amygdalában (Mozhui és mtsai., 2010). A fénypreferencia stressz-indukált növekedése megelőzhető szubkrónikus fluoxetin kezeléssel, amely egy klinikailag széles körben használt

szorongáscsökkentő és antidepresszáns szer (Ihne és mtsai., 2012). A KVS hatása az SVD viselkedésre *Sstr4*^{-/-} állatokban nem volt kimutatható, ami az sst₄ receptor jelentőségére utal. Mivel a leírt paradox jelenség kialakulásában nagy szerepe van az amygdala neuroplasztikus változásainak, ahol az sst₄ is nagy mennyiségben expresszálódik (Isd. korábban; Schreff és mtsai., 2000; Selmer és mtsai., 2000a), az itt található receptoroknak fontos szerepe feltételezhető e folyamatban.

A TST-ben és az FST-ben a KVS nem fejtett ki hatást a vad típusú egerek depresszió-szerű viselkedésére. Ez nem meglepő, mivel korábbi, C57Bl/6 egerekkel végzett vizsgálatok eredményei szerint a krónikus stressz csak olyan egyedekben növeli az FST-ben mérhető immobilitást, amelyek anhedóniát mutatnak az SPT-ben (Strekalova és mtsai., 2004) és az itt használt stressz-paradigma egyáltalán nem befolyásolta a szacharóz preferenciát. Mindez összhangban van egyes, krónikus stressz-modellekben a TST-ben és/vagy FST-ben mutatott immobilitás változatlanságát demonstráló irodalmi adatokkal, azonban ellentmond más eredményeknek, amelyek ezek csökkenését vagy növekedését mutatták (Deng és mtsai., 2015; Farley és mtsai., 2012; Mineur és mtsai., 2006). Ezek az ellentmondások felhívják a figyelmet a különböző laboratóriumokban használt eltérő törzsek és krónikus stressz-modellek (időtartam, stresszorok típusa, stb.) jelentőségére.

Szemben a vad típusúakkal, az *Sstr4*^{-/-} egerek depresszió-szerű viselkedése a TST-ben és az FST-ben lényeges változásokon ment keresztül. A TST-ben alap különbség nem volt az immobilitással töltött időt tekintve, ami azonban jelentősen emelkedett volt a génhányos állatokban FST-ben, korábban leírt megfigyeléseinkkel összhangban (Isd. korábban). A KVS után az *Sstr4*^{-/-} egerek TST-ben mutatott immobilitása növekedett, ami fokozott érzékenységre utal a krónikus stressz „depressziogén” hatásával szemben. Ezzel ellentétben, emelkedett bazális immobilitásuk az FST-ben csökkent, ami váratlan volt, mert ez a KVS „antidepresszáns-szerű” hatására utalna a teszt klasszikus értelmezése szerint. Az immobilitás e „paradox” csökkenését azonban KVS-nek kitett patkányokban, ill. a szerotoninerg neuronok léziója és locus coeruleus denerváció után is kimutatták (Harro és mtsai., 2001; Häidkind és mtsai., 2003). Ezekben a tanulmányokban a csökkent immobilitást reaktívabb, ill. impulzívabb viselkedésként értelmezték (az aktív megküzdés, ill. antidepresszáns-szerű hatás helyett). Erre alapozva, elméletileg feltehető, hogy az *Sstr4*^{-/-} egerek viselkedése egy depresszió-szerű állapotból impulzív viselkedésbe fordul a KVS hatására és a mozdulatlan lebegéssel töltött idő így hasonlónak válik az *Sstr4*^{+/+} állatokéhoz. Ezek az ellentétes irányú változások a TST-ben és az FST-ben némileg meglepőek voltak,

mivel mindkét tesztet a depresszió-szerű viselkedés és az antidepresszáns aktivitások tesztelésére fejlesztették ki. Mindazonáltal, mivel alapvető különbségeket mutattak ki e tesztek neurobiológiai háttere (Renard és mtsai., 2003), ill. a konvencionális antidepresszánsokra (Bai és mtsai., 2001) és genetikai manipulációkra (Mombereau és mtsai., 2004) való szenzitivitása között, a TST-ből és FST-ből nyerhető adatok inkább kiegészítik, mint helyettesítik egymást és az eltérő eredmények nem jelentenek ellentmondást (Cryan és mtsai., 2005).

Az OFT-ben a KVS nem fejtett ki hatást egyik viselkedéses paraméterre sem, azonban érdekes módon maga a teszt ismétlése befolyásolta őket. Mindhárom vizsgált paraméter feltűnően csökkent a 2. kísérletben, minden csoportban. Ez a megfigyelés összhangban van korábbi vizsgálatok eredményeivel (Ammassari-Teule és mtsai., 1994; Avgustinovich és mtsai., 2007) és habituációs folyamatoknak tulajdonítható. Megjegyzendő, hogy a korábbi kísérletekben a mérések közötti idő rövidebb volt (1-2 nap), mint a mi elrendezésünkben (3 hét), ami a habituáció hosszú távú hatását mutatja ebben a tesztben. Ráadásul, a második OFT-ben az *Sstr4*^{-/-} állatok némileg alacsonyabb lokomotoros aktivitást és közepén töltött időt mutattak, ami arra utal, hogy a génhíányos egerekben a habituáció erősebb.

Az SPT-ben sem a KVS, sem a genotípus nem volt hatással a szacharóz preferenciára. Bár a KVS általában anhedóniához (csökkent szacharóz preferenciához) vezet KVS modellekben (Willner, 2005), e hatás hiányát mások is leírták rövidebb KVS paradigmák esetén (Lee és mtsai., 2013). Továbbá, ez alapján az *Sstr4* génhíány a krónikus stressz anhedóniát okozó hatásával szemben nem okoz fokozott érzékenységet.

A relatív mellékvese súly, ami a krónikus HPA-tengely aktivitás markere, az *Sstr4*^{-/-} egerekben a KVS hatására nagyobb mértékben nőtt, ami ennek az endokrin rendszernek a fokozott aktivitására utal az *sst4* receptor hiányában. A nagyobb bazális relatív csecsemőmirigy súly *Sstr4*^{-/-} állatokban a KVS után hasonló értékre csökkent, mint a vad típusúakban, ami szintén a HPA-tengely fokozott aktivitását mutatja. A magasabb bazális érték a *knockout*-okban arra utalhat, hogy az *sst4* receptorok részt vesznek a szomatosztatin korábban leírt negatív hatásában a csecsemőmirigy méretére és a thymocyták számára (Petrovic-Dergovic és mtsai., 2004). Nem valószínű, hogy ez a génhíányos állatok alacsonyabb testsúlyának tulajdonítható, mivel az alacsonyabb testsúly általában alacsonyabb relatív csecsemőmirigy súllyal jár (Mukherjee és mtsai., 2004). Sem a stresszelt *Sstr4* génhíányos, sem a vad típusú állatokban nem találtunk emelkedett bazális plazma kortikoszteron szinteket. Ez összhangban van azokkal a korábbi munkákkal, amelyekben

változatlan bazális kortikoszteron koncentrációt írtak le KVS modellben, C57Bl/6 és más egértörzsekben, amikor a plazma mintagyűjtés 1 nappal az utolsó stresszor után történt (Farley és mtsai., 2012). Bár ezek az eredmények nem szolgálnak információval a stresszorok alkalmazása közben vagy röviddel utána bekövetkező kortikoszteron felszabadulásra vonatkozólag, különbségek feltételezhetők ebben, tekintetbe véve a génhiányos állatok nagyobb relatív mellékvese súly növekedését a KVS után. Az *Sstr4*^{-/-} csoportokban a kortikoszteron koncentrációk enyhén, de szignifikánsan magasabbak voltak a vad típusúakhoz hasonlítva, ami szintén az sst4 gátló aktivitására utal a HPA-tengely szabályozásában. Mivel az eddigi adatok alapján az sst4 expresszió a HPA-tengely komponenseiben nem jelentős (Isd. korábban; Schreff és mtsai., 2000; Selmer és mtsai., 2000a), ezek a hatások feltehetően indirekt módon, a magasabb rendű szabályozó struktúrák (pl. amygdala) funkciójának befolyásolása révén jönnek létre.

Immunhisztokémiai vizsgálataink szerint a FosB reaktivitás az *Sstr4*^{-/-} egerekben specifikusan a centrális és basolateralis amygdalában növekedett, míg a vad típusúakban változatlan maradt, ami összefüggésbe hozható a receptor korábban már leírt expressziójával e magokban (Isd. korábban; Schreff és mtsai., 2000; Selmer és mtsai., 2000a). Ezek az eredmények a CeA-ban és BLA-ban található neuronok krónikus aktivitásának fokozódására utalnak, ami magyarázhatja a funkcionális változásokat, figyelembe véve ezeknek a magoknak a stressz szabályozásában játszott alapvető szerepét. A BLA-ban található piramissejtek fokozott excitabilitása közvetíti a krónikus posztnatális stressz hosszú távú anxiogén hatását (Rau és mtsai., 2015) és a BLA projekciói a CeA-ba (ami az amygdala fő kimeneti magva) szabályozzák a szorongás viselkedéses megnyilvánulásait (Tye és mtsai., 2011). A félelmi kondicionálás, ami meglehetősen jól ismert mechanizmusú, az emocionális folyamatokban, szorongásban és hangulatzavarokban is fontos szerepet játszó agyi funkció, neuroplaszticitási változásokon alapul az amygdala gátló neuronhálózataiban (Duvarci és Pare, 2014). Megjegyzendő, hogy ebben a folyamatban a szomatosztatint expresszáló neuronok központi jelentőségét mutatták ki (Li és mtsai., 2013). Hasonló plaszticitási folyamatok, amelyek az sst4 receptort is magukba foglalják, szerepet játszhatnak a KVS-el szembeni érzékenységben is, bár a szomatosztatin, mint neuromodulátor szerepét az amygdala neuronhálózataiban részletesen még nem tisztázták.

A FosB nem csupán a krónikus neuronális aktiváció markere, hanem a stresszhez kapcsolódó neuronális génexpressziós változásokat is szabályozza (Nestler, 2015). Esetünkben a KVS-indukált változások az amygdalában, legalábbis részben, valószínűleg a FosB-n keresztül

jönnek létre. Akut stressz-folyamatokban az sst₄ aktiváció szorongáscsökkentő és antidepresszáns-szerű hatása a Fos expresszió növekedésével járt (Izd. korábban), míg ebben a vizsgálatban a FosB válasz növekedését döntően maladaptív funkcionális eltérések kísérték. Ezek arra utalnak, hogy a két folyamatban eltérő neuronpopulációk és/vagy alárendelt jelátviteli mechanizmusok vesznek részt, amelyek azonosítása további vizsgálatokat igényel.

Az amygdalában létrejövő neuronális aktivitásváltozások következtében feltételezhetően módosul az alárendelt struktúrák, mint a PVN, a PAG vagy a dRN funkciója is. Példaként, a CeA-ból ered a dRN innervációjának jelentős része (Weissbourd és mtsai., 2014), ami az agy szerotoninerg beidegzésének egyik fő forrása és a stresszhez kapcsolódó viselkedés fontos szabályozója (Warden és mtsai., 2012). Bár az említett, amygdala által szabályozott struktúrák aktivitásváltozásai FosB immunhisztokémiával nem voltak detektálhatók, felelősek lehetnek a viselkedéses és neuroendokrin válaszokban megfigyelt módosulásokért, azonban más jelátviteli rendszerek szerepe feltételezhető. Az itt használt módszerek további korlátja, hogy az sst₄ receptoron keresztül létrejövő szomatosztatinerger jelátvitel hiányának és a génihiányos állatokban esetleg létrejövő összetett ideghálózati újraszerveződések, ill. a fejlődés során működésbe lépő kompenzációs mechanizmusok hatásai nem különíthetők el egymástól.

Összefoglalva, az itt bemutatott eredmények az elsők, amelyek bizonyítják az sst₄ receptor komplex szabályozó szerepét a KVS hatására létrejövő válaszokban, ami az emberi hangulatzavarok nagy transzlációs relevanciával bíró állatmodellje. A szorongás, a depresszió-szerű viselkedés és a HPA-tengely aktivitás KRS után kialakuló változásait jelentősen befolyásolja az sst₄ receptor hiánya és ezek a hatások valószínűleg a CeA és a BLA stressz-szenzitivitásának növekedésén keresztül jönnek létre. Mindezek alapján, az előző részben tárgyalt akut stressz-szabályozásban játszott szerepe mellett, az sst₄ receptor a pszichofarmakológiai fejlesztések új ígéretes célpontja lehet.

3. Kapszaicin-érzékeny neuronok szerepének vizsgálata krónikus stressz hatására létrejövő nociceptív válaszokban

3.1. Eredmények

3.1.1. A mechano- és termonocicepció változásai KRS és RTX deszenzibilizáció hatására

A KRS megközelítőleg 20%-os, szignifikáns és stabil mechanonociceptív küszöbcsökkenést (hiperalgéziát) okozott. Nem stresszelt állatokban az RTX kezelés a mechanoszenzitivitást nem befolyásolta, azonban a stressz-indukált mechanikai hiperalgézia szignifikánsan nagyobb volt a deszenzibilizált állatokban (az első héten 30%, utána végig 40% körüli volt) (**33.A ábra**). A hátsó lábak mechanonociceptív küszöbét az alkalmazott kezelések ($F_{3,140}=93,82$, $p<0,0001$), az idő ($F_{4,140}=66,17$, $p<0,0001$) és ezek interakciója ($F_{12,140}=24,24$, $p<0,0001$) is jelentősen befolyásolta.

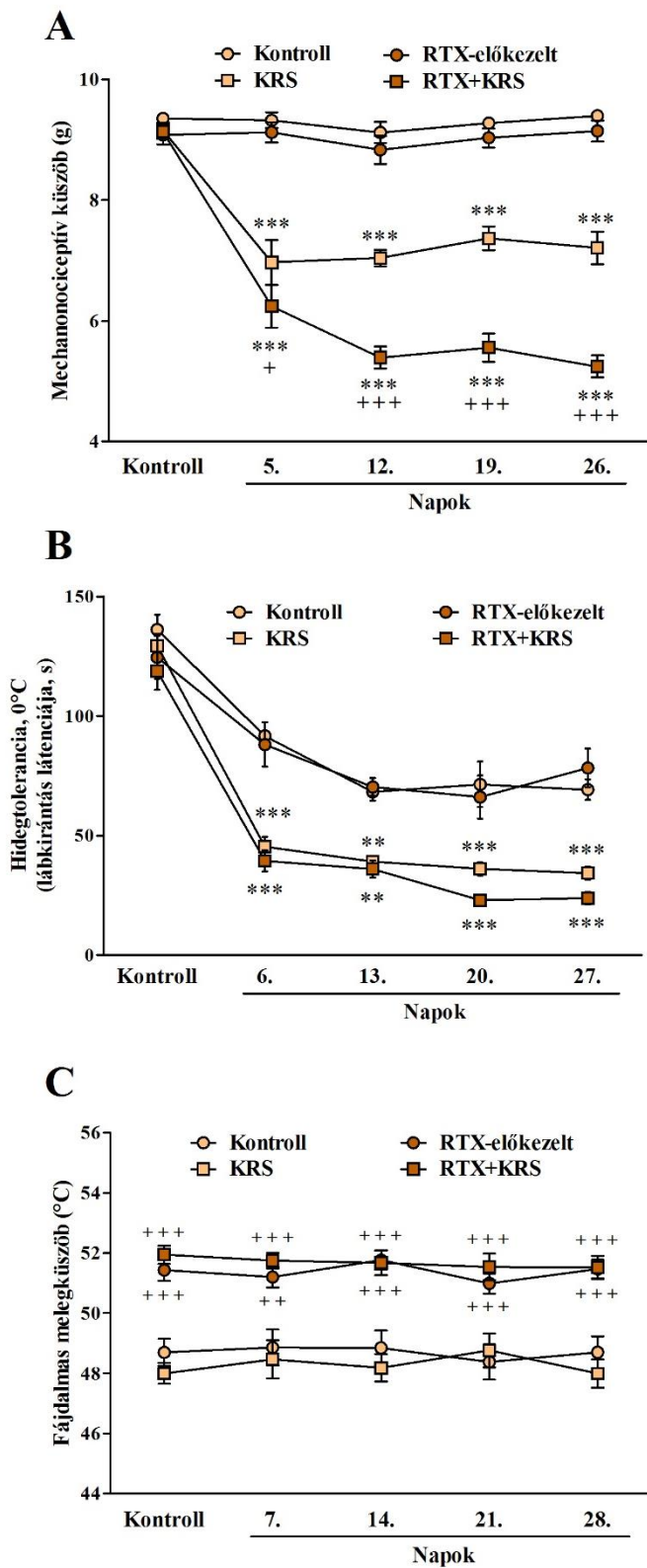
A kontroll mérések után a nem stresszelt csoportok hidegtoleranciája is csökkent, azonban a KRS-nek kitett állatokban szignifikánsan nagyobb mértékben. A KRS hatását a hidegérzékenységre a deszenzibilizáció nem befolyásolta (**33.B ábra**). A kezelések ($F_{3,140}=39,6$, $p<0,0001$), az idő ($F_{4,140}=159,3$, $p<0,0001$) és az interakciójuk ($F_{12,140}=3,82$, $p<0,0001$) is erős hatást fejtett ki a hidegérzékenységre.

Az RTX-előkezelte állatok fájdalmas meleg küszöbe szignifikánsan, kb. 3°C-al magasabb volt, mint az előkezelés nélkülieké. Ez a különbség már a kontroll vizsgálatoknál kimutatható volt és a kísérlet során végig fennmaradt, azonban a KRS nem fejtett ki hatást (**33.C ábra**). Az alkalmazott kezelések szignifikáns hatást fejtettek ki a fájdalmas meleg érzékenységre ($F_{3,140}=21,99$, $p<0,0001$), azonban az idő ($F_{4,140}=0,42$, $p=0,79$) és az interakció ($F_{12,140}=1,09$, $p=0,37$) nem befolyásolták azt.

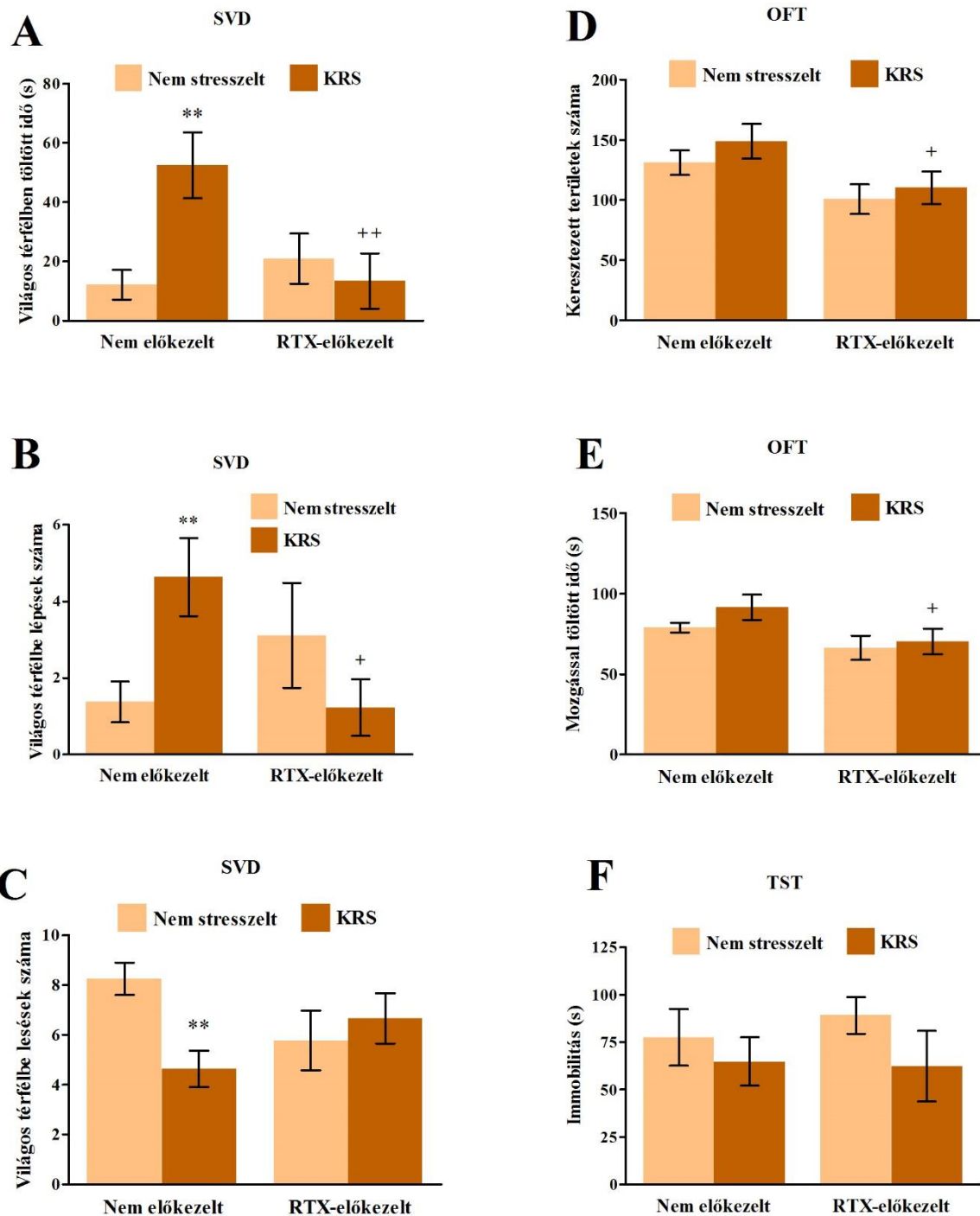
3.1.2. Viselkedésváltozások KRS és RTX deszenzibilizáció után

Az SVD-ben a világosban töltött időt a KRS szignifikánsan megnövelte előkezelés nélküli állatokban, azonban az RTX-előkezelte csoportokban nem (**34.A ábra**). A KRS jelentősen növelte a világosba lépések és csökkentette a kilesések számát, azonban ezek a változások deszenzibilizált állatokban nem voltak kimutathatók (**34.B,C ábra**). A KRS és az RTX kezelés interakciója szignifikáns hatást gyakorolt a világos térfélben töltött időre ($F_{1,35}=6,51$, $p<0,05$) és a világos térfélbe lépések ($F_{1,35}=6,55$, $p<0,05$) és lesések ($F_{1,35}=5,88$, $p<0,05$) számára. A KRS (idő: $F_{1,35}=3,04$, $p=0,09$; belépések: $F_{1,35}=0,47$, $p=0,5$; kilesések: $F_{1,35}=2,15$,

p=0,15) és a deszenzibilizáció (idő: $F_{1,35}=2,61$, $p=0,12$; belépések: $F_{1,35}=0,7$, $p=0,41$; kilesések: $F_{1,35}=0,06$, $p=0,81$) azonban önmagukban nem fejtettek ki hatást.



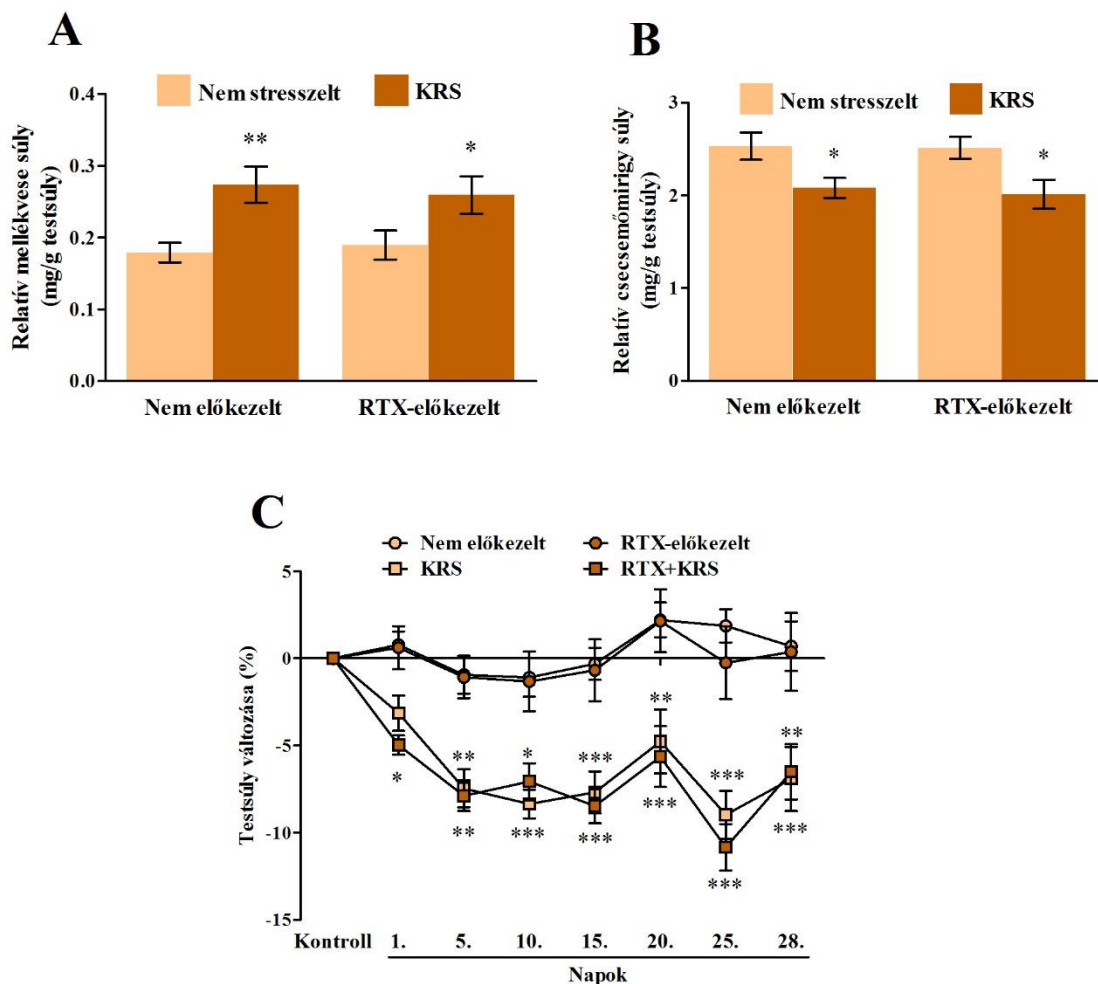
33. ábra. Az RTX deszenzibilizáció és a KRS hatása a nocicepcióra. A grafikonok (A) a mechanociceptív küszöb, (B) a hidegtolerancia (lábkirántási látencia) és (C) a fájdalmas meleg küszöb változásait mutatják (ismételt méréses két utas ANOVA, Bonferroni post hoc teszt; átlagok±SEM; $^+p<0,05$, $^{++}p<0,01$ és $^{+++}p<0,001$ vs. megfelelő nem előkezelt csoportok; $^{**}p<0,01$ és $^{***}p<0,001$ vs. megfelelő nem stresszelt csoportok; $n=9-11/csoport$).



34. ábra. Viselkedésváltozások az RTX előkezelés és a KRS hatására. A grafikonok (A, B, C) az SVD-ben, (D, E) az OFT-ben és (F) a TST-ben mért viselkedésszámokat mutatják (két utas ANOVA, Fisher post hoc teszt; átlagok±SEM; + $p < 0,05$ és ++ $p < 0,01$ vs. megfelelő nem előkezelt csoportok; ** $p < 0,01$ vs. megfelelő nem stresszelt csoportok; $n = 9-11$ /csoport).

OFT-ben csak a KRS-nek kitett előkezeletlen és RTX-kezelt csoportok között volt szignifikáns különbség a keresztezett területek számában és a mozgással töltött időben (**34.D,E ábra**). Az RTX előkezelés jelentősen befolyásolta a keresztezett területek számát ($F_{1,35}=6,85$, $p<0,05$) és a mozgással töltött időt ($F_{1,35}=5,63$, $p<0,05$), azonban sem a KRS (keresztezett területek: $F_{1,35}=1,06$, $p=0,31$; mozgással töltött idő: $F_{1,35}=1,3$, $p=0,26$), sem az interakció (keresztezett területek: $F_{1,35}=0,01$, $p=0,76$; mozgással töltött idő: $F_{1,35}=0,36$, $p=0,55$) nem fejtett ki hatást. Egyik faktor sem befolyásolta a középső területeken töltött időt (KRS: $F_{1,35}=0,82$, $p=0,37$; RTX: $F_{1,35}=0,88$, $p=0,36$; interakció: $F_{1,35}=0,01$, $p=0,92$).

A TST-ben mutatott immobilitást sem a KRS ($F_{1,35}=1,82$, $p=0,19$), sem az RTX előkezelés ($F_{1,35}=0,1$, $p=0,76$), sem az interakció ($F_{1,35}=0,23$, $p=0,64$) nem befolyásolta (**34.F ábra**).



35. ábra. Szomatikus változások a KRS után. A grafikonok (A) a relatív mellékvese és (B) csecsemőmirigy súly, ill. (C) a testsúly változásait mutatják (A, B: két utas ANOVA, Fisher post hoc teszt; C: ismételt méréses két utas ANOVA, Bonferroni post hoc teszt; átlagok \pm SEM; * $p<0,05$, ** $p<0,01$ és *** $p<0,001$ vs. megfelelő nem stresszelt csoportok; $n=9-11$ /csoport).

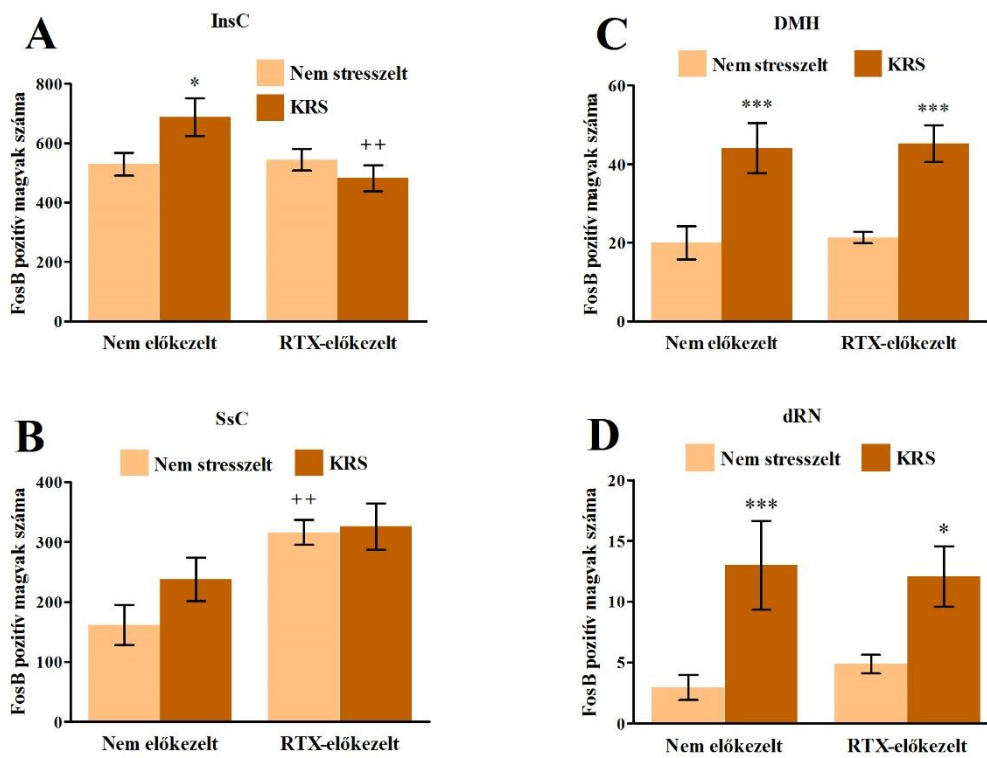
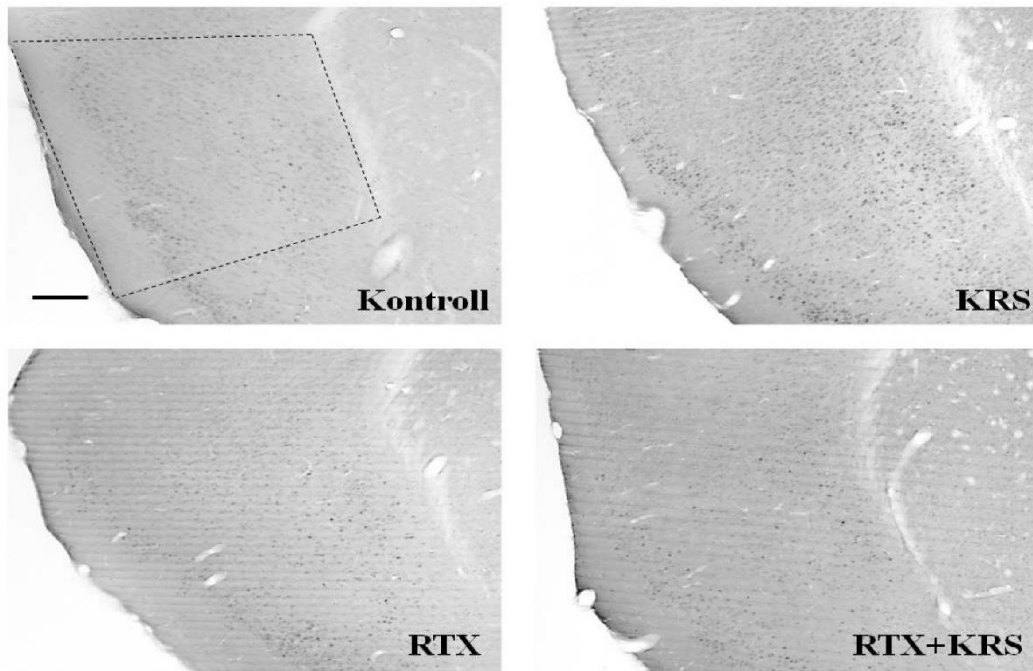
3.1.3. Szomatikus paraméterek változása KRS és RTX deszenzibilizáció után

A krónikus stressz mind az előkezeletlen, mind a deszenzibilizált állatokban szignifikánsan növelte a relatív mellékvese súlyt [mellékvese súly (mg)/testsúly (g)] (**35.A ábra**), míg a relatív csecsemőmirigy súly [csecsemőmirigy súly (mg)/testsúly (g)] jelentősen csökkent, szintén az előkezeléstől függetlenül (**35.B ábra**). A KRS jelentős hatása ($F_{1,35}=13,12$, $p<0,001$) volt kimutatható a relatív mellékvese súlyra az RTX ($F_{1,35}=0,0065$, $p=0,94$) és az interakció ($F_{1,35}=0,3$, $p=0,59$) hatása nélkül. Hasonlóképpen, a KRS jelentősen ($F_{1,35}=12,45$, $p<0,01$) befolyásolta a relatív csecsemőmirigy súlyt, míg az RTX ($F_{1,35}=0,1$, $p=0,75$) és az interakció ($F_{1,35}=0,033$, $p=0,86$) hatástalanok voltak.

A nem stresszelt állatok testsúlya a kísérlet ideje alatt nem változott, míg a stresszelt csoportok 7-8%-os testsúlycsökkenést mutattak, amelyre a deszenzibilizáció nem fejtett ki hatást (**35.C ábra**). A testsúlyt a kísérlet 4 hete alatt erősen befolyásolták a kezelések ($F_{3,245}=34,02$, $p<0,0001$), az idő ($F_{7,245}=8,8$, $p<0,0001$) és a kezelés-idő interakció ($F_{21,245}=7,46$, $p<0,0001$) is.

3.1.4. A KRS és RTX deszenzibilizáció hatása a stresszhez kapcsolható agyterületek aktivációs mintázatára

Az InsC-ben a KRS növelte a FosB pozitív sejtek számát az előkezeletlen állatokban, ez a hatás azonban RTX deszenzibilizáció után nem volt megfigyelhető (**36.A ábra**). Az RTX ($F_{1,24}=4,44$, $p<0,05$), ill. a KRS és RTX közti interakció ($F_{1,24}=5,92$, $p<0,05$) is szignifikánsan befolyásolta a FosB immunpozitivitást, a KRS hatása azonban önmagában nem bizonyult jelentősnek ($F_{1,24}=1,12$, $p=0,3$). Az SsC-ben a FosB pozitivitás jelentősen nagyobb volt a nem stresszelt deszenzibilizált csoportban a megfelelő előkezeletlen csoporthoz képest (**36.B ábra**). Az RTX előkezelés jelentős hatást gyakorolt ($F_{1,24}=13,65$, $p<0,01$) a FosB immunreaktivitásra, a KRS ($F_{1,24}=1,72$, $p=0,2$) és az interakció ($F_{1,24}=1,02$, $p=0,32$) azonban nem befolyásolta azt. A DMH-ban az immunpozitív magok száma mind előkezeletlen, mind deszenzibilizált állatokban növekedett a KRS után (**36.C ábra**). A krónikus stressz szignifikánsan befolyásolta ($F_{1,24}=30,25$, $p<0,001$) a FosB expressziót az RTX ($F_{1,24}=0,26$, $p=0,62$) és az interakció ($F_{1,24}=0,06$, $p=0,81$) hatása nélkül. Ehhez hasonlóan, a dRN-ben a krónikus stressz hatására az RTX előkezeléstől függetlenül nőtt a FosB pozitív magok száma (**36.D ábra**). A stressz itt is jelentős hatást gyakorolt a FosB reaktivitásra ($F_{1,24}=23,49$, $p<0,001$), míg a másik két faktor nem (RTX: $F_{1,24}=0,76$, $p=0,39$; KRS-RTX interakció: $F_{1,24}=1,07$, $p=0,31$).

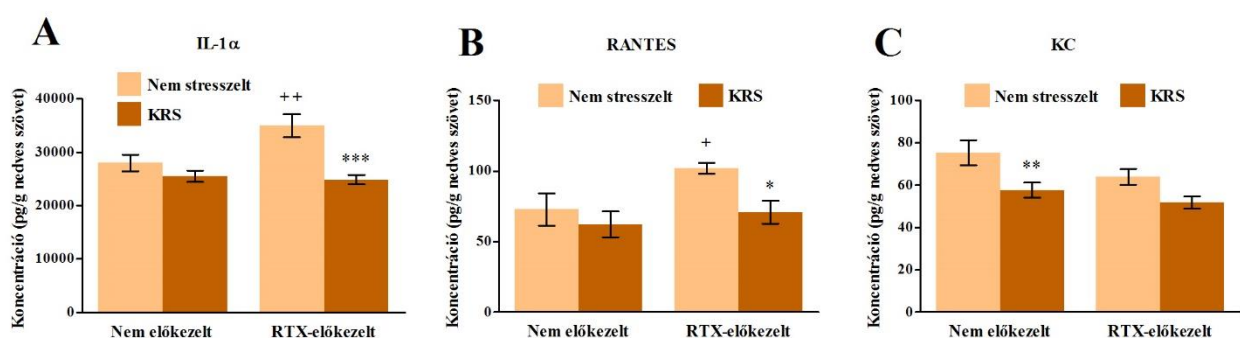


36. ábra. Az RTX deszenzibilizáció és a KRS hatása a FosB immunreaktivásra. A reprezentatív képek az InsC-ről készültek, a szaggatott vonal az InsC határát mutatja, a skálavonal 200 μm -nek felel meg. A grafikonok a FosB pozitív sejtmagok számát mutatják (A) az InsC-ben, (B) az SsC-ben, (C) a DMH-ban és (D) a dRN-ben (két utas ANOVA, Fisher post hoc teszt; átlagok \pm SEM; ++ $p < 0,01$ vs. megfelelő nem előkezelt csoportok; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ vs. megfelelő nem stresszelt csoportok; $n = 7$ /csoport).

A stressz és fájdalom szabályozásában fontos egyéb vizsgált agyterületek, az mPFC, az ACC, a NIST, a PVN, az amygdala, a hippocampus, a PAG és az RVM FosB expressziója nem változott sem az RTX előkezelés sem a KRS hatására. Hasonlóképpen, egyik faktor sem befolyásolta gerincvelői FHSz-ban a FosB immunpozitivitást (a két utas ANOVA-k eredményeit lsd. a *Melléklet 7. táblázatában*).

3.1.5. A KRS és RTX deszenzibilizáció hatása a perifériás citokin koncentrációkra

Az RTX előkezelés szignifikánsan növelte a hátsó láb szöveteinek IL-1 α koncentrációját nem stresszelt állatokban. Ez a hatás krónikus stressznek kitett egerekben nem jelentkezett, bár a stressz önmagában nem fejtett ki hatást (*37.A ábra*). A deszenzibilizáció ($F_{1,28}=4,8$, $p<0,05$), a KRS ($F_{1,28}=19,21$, $p<0,001$) és a kettő interakciója ($F_{1,28}=6,94$, $p<0,05$) is szignifikáns hatást fejtett ki IL-1 α koncentrációra. Ehhez hasonlóan, az RTX szignifikánsan növelte a RANTES koncentrációját, ezt a hatást azonban a krónikus stressz csökkentette (*37.B ábra*). Az RTX ($F_{1,28}=4,45$, $p<0,05$) és a KRS ($F_{1,28}=5,39$, $p<0,05$) a RANTES szintjét is jelentősen befolyásolta, az interakció azonban nem ($F_{1,28}=1,31$, $p=0,26$). A krónikus stressz az előkezeletlen állatokban jelentősen csökkentette a KC koncentrációt (*37.C ábra*). Ebben az esetben a KRS fejtett ki jelentős hatást ($F_{1,28}=11,56$, $p<0,01$), a másik két faktor hatása nélkül (RTX: $F_{1,28}=3,82$, $p=0,062$; interakció: $F_{1,28}=0,41$, $p=0,53$). Az többi vizsgált citokin, az IFN γ , az IL-1 β , az IL-4, az IL-10, az MCP-1, a TNF α , a G-CSF és az IL-6 esetében nem találtunk jelentős különbséget a csoportok között (a két utas ANOVA-k eredményeit lsd. a *Melléklet 8. táblázatában*).



37. ábra. Az RTX deszenzibilizáció és a KRS hatása a citokin koncentrációkra hátsó láb szövetekben. A grafikonok (A) az IL-1 α , (B) a RANTES-ben és (C) a KC szöveti koncentrációk változásait mutatják (két utas ANOVA, Fisher post hoc teszt; átlagok \pm SEM; $^+p<0,05$ és $^{++}p<0,01$ vs. megfelelő nem előkezelt csoportok; $^*p<0,05$, $^{**}p<0,01$ és $^{***}p<0,001$ vs. megfelelő nem stresszelt csoportok; $n=7-9$ /csoport).

3.2. Összefoglalás, megbeszélés, következtetések

Kísérletsorozatunkban kimutattuk, hogy a CRS elsősorban centrális mechanizmusokhoz köthető hiperalgéziát okoz, jelentős viselkedéses eltérések (szorongás, depresszió-szerű viselkedés), perifériás nociceptor aktiváció vagy immunológiai zavarok nélkül. Eredményeink alapján a kapszaicin-érzékeny neuronok fontos szerepet játszanak az SsC neuronális aktivitás és a perifériás citokin termelés szabályozásában. Legfontosabb eredményünként elsőként írtuk le e neuronok protektív hatását a stressz-indukált mechanikai hiperalgéziával szemben, amely feltételezhetően neuroplaszticitási folyamatokhoz köthető a fájdalom és stressz szabályozásában is fontos InsC-ben (3. táblázat). Ez az első szisztematikus kísérletes vizsgálat, amely e specifikus nociceptor populáció és a krónikus stressz interakciójára, ill. ennek fájdalom-feldolgozásban játszott szerepére szolgáltat bizonyítékot.

Az RTX-előkezelt állatokban tapasztalt nagyobb stressz-indukált mechanikai hiperalgézia látszólag ellentétben áll az összes nociceptív érző neuron 50-70%-át kitevő kapszaicin-érzékeny idegsejtek fájdalomérzésben játszott központi szerepével. Ugyanakkor, e neuronpopuláció krónikus fájdalomban jelentkező mechanikai hiperalgéziában játszott szerepe kérdéses. A kapszaicinnal végzett deszenzibilizáció után változatlan (Xu és mtsai., 2015), míg TRPV1 génhányos egerekben magasabb a mechanikai hiperalgézia (Böleskei és mtsai., 2005) különböző neuropátia modellekben. Bár az RTX előkezelés önmagában elhúzódó vázizom-hiperalgéziát okoz (Abdelhamid és mtsai., 2013a), az akut FST után kialakuló muszkuloszkeletális hiperalgéziára nincs hatással (Abdelhamid és mtsai., 2013b). Mindezek alapján egyértelmű, hogy a kapszaicin-érzékeny afferensek az alkalmazott modell mechanizmusától függően általában nem jelentősek vagy protektívek a mechanikai hiperalgézia szempontjából. E neuronok anti-nociceptív aktivitását általában perifériás mechanizmusokkal magyarázzák, mint például az analgetikus peptid, a szomatosztatin felszabadulása (Pintér és mtsai., 2006). Mindazonáltal, mivel modellünkben nincs erőteljes perifériás nociceptor aktiváció, inkább a centrális neuronális aktivációs változások jelentősége valószínűsíthető (ld. alább).

A KRS-indukált hideg hiperalgéziát az RTX-előkezelés nem befolyásolta, vagyis az utóbbi hatása specifikus volt a mechanikai hiperalgéziára és valószínűleg centrális szenzitivizáció révén jön létre. A mechanikai hiperalgézia kialakulásában ugyanis perifériás és centrális mechanizmusok is részt vesznek, a hideg hiperszenzitivitás azonban dominánsan perifériás mechanizmusokhoz köthető (Ji és mtsai., 2007). A krónikus stressz a fájdalmas meleg küszöböt nem befolyásolta, azonban a deszenzibilizáció jelentősen megemelte azt, ami

összhangban van a kapszaicin-érzékeny idegsejtek termonocicepcióban játszott központi szerepével (Bölcskei és mtsai., 2010; Borbély és mtsai., 2015). A KRS-indukált meleg hiperszenzitivitás hiánya összhangban van patkányokkal végzett hasonló KRS vizsgálatok eredményeivel (Bardin és mtsai., 2009) és más állatmodellekből (pl. krónikus ízületi gyulladás; Borbély és mtsai., 2015) nyert adatokkal. Egyéb stressz-paradigmák esetében azonban kimutatták a termális hiperalgéria kialakulását is (Suarez-Roca és mtsai., 2006a; 2006b; Nishiyori és Ueda, 2008). Ezek az irodalmi ellentmondások valószínűleg a különböző vizsgálatokban használt eltérő stresszoroknak és fájdalomteszteknek tulajdoníthatók. A modellünkben talált változatos, modalitás-specifikus változások, ill. a hiper- és anti-nociceptív hatások együttes előfordulása összhangban vannak a klinikai (Üçeyler és mtsai., 2013) és állatkísérletes (Borbély és mtsai., 2015) tapasztalatokkal krónikus fájdalomban.

Mivel az emocionális állapot jelentősen befolyásolja a fájdalomérzést és szabályozást, a szorongást és a depresszió-szerű viselkedést is analizáltuk modellünkben. Az SVD-ben tapasztalt fénypreferencia növekedés, amely krónikus stressz-paradigmák esetében maladaptív válaszként, „tompult emocionalitásként” is interpretálható (Isd. korábban), érdekes módon az RTX-deszenzibilizáció után nem volt kimutatható. A TRPV1 génhíányos egerek csökkent szorongását (Marsch és mtsai., 2007) és depresszió-szerű viselkedését (You és mtsai., 2012), ill. az RTX-deszenzibilizáció antidepresszáns-szerű hatását (Abdelhamid és mtsai., 2014) is leírták már akut stresszhelyzetekben, azonban adataink bizonyították elsőként az RTX hosszantartó hatását a krónikus stresszre adott viselkedéses válaszban. A tapasztalt viselkedéses eltérések az RTX tartós hatására utalnak a centrális TRPV1-et expresszáló elemeken, amelyeket számos stresszhez köthető agyterületen leírtak (pl. hippocampus, amygdala, hypothalamus; Martins és mtsai., 2014). Korábban a [³H]RTX kötődés csökkenését mutatták ki számos agyterületen szisztémás kapszaicin kezelés után patkányokban (Acs és mtsai., 1996). Hasonló változások az RTX kezelés után is bekövetkezhetnek, azonban a perifériás deszenzibilizáció indirekt hatása sem zárható ki.

Direkt összefüggés az SVD-ben mutatott viselkedés és a nociceptív paraméterek között az irodalmi adatok alapján nem feltételezhető. Mivel az RTX-KRS interakció nem befolyásolta az OFT-ben és TST-ben mutatott viselkedést és hatása a fénypreferenciára ellentétes irányú volt a mechanikai hiperalgéria változásával, az utóbbi nem egy általános viselkedési zavar része. A deszenzibilizáció nem befolyásolta a HPA-tengely aktivitását jelző szomatikus paramétereket, vagyis hatásaiban valószínűleg a stressz-indukált endokrin válasz változásai sem vesznek részt.

		RTX előkezelés hatása nem stresszelt egerekben	KRS hatása	
			Nem előkezelt	RTX-előkezelt
Mechanonoczeptív küszöb		↔	↓	↓↓↓
Hídegtolerancia		↔	↓	↓
Fájdalmas melegküszöb		↑	↔	↔
SVD	Fénypreferencia	↔	↑	↔
OFT	Lokomotoros aktivitás	↓	↔	↔
TST	Immobilitás	↔	↔	↔
Relatív mellékvese súly		↔	↑	↑
Relatív csecsemőmirigy súly		↔	↓	↓
Testsúly		↔	↓	↓
FosB expresszió	InsC	↔	↑	↔
	SsC	↑	↔	↔
	DMH és dRN	↔	↑	↑
Perifériás IL-1 α és RANTES koncentráció		↑	↔	↓
Perifériás KC koncentráció		↔	↓	⋮

3. táblázat. Az RTX előkezelés hatásai, ill. a KRS-re adott nociceptív, viselkedéses, neuroendokrin, neuronális és immunológiai válaszok nem előkezelt és RTX-előkezelt egerekben.

Immunhisztokémiai vizsgálataink szerint az RTX-előkezelés hosszú távú hatást képes kifejteni az SsC FosB expressziójára, ami a perifériás bemenet változásának következménye lehet. A kapszaicin-deszenzibilizáció az SsC szomatoszenzoros mechanoreceptív mezőinek kiterjedését okozza (Nussbaumer és Wall, 1985). Ezt az SsC neuronok GABA_A-közvetített

gátló beidegzésének csökkenése okozza, amit fiziológiásan a kapszaicin-érzékeny C-rostokból érkező bemenet tart fent (Farazifard és mtsai., 2005). Mindez összhangban van az RTX-előkezelt állatokban talált nagyobb SsC aktivitással, ami önmagában nem fejt ki hatást a mechanonocicepcióra, de szerepe lehet a KRS-indukált mechanikai hiperalgémia fokozódásában. Ez a feltételezés azokon a klinikai vizsgálatokon alapul, amelyek felvetették a szenzoros-diszkriminatív rendellenességek szerepét krónikus fájdalomban (Pleger és mtsai., 2006).

Modellünkben az RTX-előkezelt állatokban tapasztalt nagyobb KRS-indukált mechanikai hiperalgémia a FosB immunreaktivitás csökkenése kísérte az InsC-ben, ami anti-nociceptív mechanizmus működésére utal ebben a struktúrában. Az ismételt *forced swim* stressz növeli a mechanikai hiperalgémia, ugyanakkor csökkenti a Δ FosB expressziót az InsC-ben egy gyulladási fájdalommodellben (Imbe és Kimura, 2015). Következésképpen, általánosan elfogadott szerepe mellett a krónikus fájdalom kialakulásában és fenntartásában (Quintero, 2013), anti-nociceptív aktivitás is feltételezhető az InsC-ben, ami különösen jelentősnek tűnik a stressz-indukált nociceptív változásokban. Utóbbi valószínűleg az InsC kiterjedt kapcsolatainak tulajdonítható a leszálló anti-nociceptív rendszerek, például a PAG és az RVM felé (Jasmin és mtsai., 2004).

A glutamát szint változásai az InsC-ben (Harris és mtsai., 2008), diszinhibíciós mechanizmusok az SsC-ben (Lim és mtsai., 2015), ill. a kettő közti funkcionális konnektivitás változásai (Kim és mtsai., 2015) egyaránt fontos szerepet játszanak az abnormális fájdalomfeldolgozásban FM-ben. A modellünkben kimutatható aktivitásváltozások e kérgi struktúrákban szintén összefügghetnek funkcionális kapcsolataik módosulásával, azonban a pontos mechanizmusok tisztázásához további vizsgálatok szükségesek. E folyamatok összefügghetnek a perifériás bemenet módosulásával, azonban az RTX közvetlen, hosszú távú hatása sem zárható ki az agyi TRPV1 expresszálo neuronokon.

A DMH és a dRN megnövekedett FosB expressziója a KRS után ezeknek a struktúráknak a jelentőségére utal modellünkben. A DMH fontos szerepet játszik a neuroendokrin és autonóm stressz-válaszban és jelentősége van a stressz hatására létrejövő hiperalgémia kialakulásában is, az RVM fájdalomérzést fokozó neuronjait célzó kolecisztokininerg projekciókon keresztül (Wagner és mtsai., 2013). A dRN szintén fontos szerepet játszik mind a stressz (Lowry és mtsai., 2008) mind a nocicepció (Amorim és mtsai., 2014) szabályozásában. Érdekes módon a FosB immunreaktivitás nem változott a többi vizsgált agyterületen. Mindazonáltal, az InsC és a DMH feltételezhetően egyéb fájdalomszabályozó struktúrák aktivitásának befolyásolása

révén fejtik ki hatásukat, azonban más jelátviteli mechanizmusokon keresztül. Példaként, a KRS az ERK aktivációját okozza az RVM-ben (Imbe és mtsai., 2004), ahol mi nem találtunk FosB expresszió növekedést. Ez feltehetően e két aktivitásfüggő faktor eltérő szabályozásának tulajdonítható (Nygard és mtsai., 2015).

A gerincvelői FHSz a perifériás nociceptorok elsődleges célpontja, amelyben a FosB immunreaktivitás növekedését mutatták ki krónikus fájdalom esetén (Luis-Delgado és mtsai., 2006). Mivel modellünkben az FHSz FosB expressziója nem változott, a spinothalamicus pálya aktivitása a perifériás rostok felől nem fokozódik. Az RTX hatására létrejövő agyi neuroplaszticitási folyamatok a perifériás szomatoszenzoros bemenet olyan változásából eredhetnek, amelyek nem okoznak jelentős, „neuropátia-szerű” aktivitásfokozódást a gerincvelőben.

Széles körben feltételezik, hogy a perifériás szövetekben az anti- és pro-inflammatorikus citokinek egyensúlyának zavara jelentős tényező a krónikus fájdalomállapotokban, például FM-ben, azonban az ezzel kapcsolatos klinikai eredmények igen ellentmondásosak (Salemi és mtsai., 2003; Blanco és mtsai., 2010; Üçeyler és mtsai., 2011; 2014). Mivel modellünkben a KRS jelentősen nem befolyásolta a perifériás citokin termelést, a nociceptív változások valószínűleg nem immunológiai folyamatok következményei. Érdekes módon azonban a kapszaicin-érzékeny neuronok defunkcionalizálása szelektíven növelte az IL-1 α és a RANTES bazális szintjét. Bár a perifériás szenzoros neuronok szerepe a citokinek expressziójának szabályozásában már ismert (Ordovas-Montanes és mtsai., 2015), ezek az első adatok, amelyek a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok szabályozó (gátló) szerepét bizonyítják az IL-1 α és a RANTES bazális („housekeeping”) termelődésében. A KRS jelentősen csökkentette az RTX-indukált változásokat, a KC szintjét pedig csökkentette, ami a stressz és a szenzoros rendszerek közti interakciót bizonyítja a perifériás immunválaszok szintjén.

Összefoglalva, eredményeink elsőként bizonyítják, hogy a kapszaicin-szenzitív neuronok funkcionális sértése specifikusan fokozza a krónikus stressz-indukált mechanikai hiperalgéziát, ami modalitás-függő gátló funkciójukra utal. Kísérletes adataink elősegíthetik a központi- és perifériás érző idegrendszer és a stressz közötti összetett interakciók felderítését, ill. azoknak a meglepő klinikai megfigyeléseknek a megértését, amelyek krónikus fájdalmat és hiperalgéziát kísérő vékonyrost hiányt mutattak ki FM-ben (Üçeyler és mtsai., 2013).

ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS EGYSÉGES ÉRTELMEZÉSE

1. Elsőként mutattuk ki, hogy az sst₄ receptorok aktivációja szorongáscsökkentő és antidepresszáns-szerű hatásokat közvetít akut stressz-szituációkban, egérmodellekben. Ezek a hatások a stresszhez köthető agyterületeken a stresszre adott akut neuronális válasz módosításán keresztül jönnek létre, amiben az amygdalában található sst₄ receptorok szerepe tűnik különösen jelentősnek. Bár a szomatosztatint expresszáló neuronok központi szerepét az emocionális és stressz-szabályozásban számos irodalmi adat támasztja alá, az itt bemutatott eredményeink az elsők, amelyek az sst₄ receptor szerepét bizonyítják e folyamatokban.

2. Bizonyítottuk az sst₄ receptor szerepét a pszichiátriai betegségek szempontjából nagy transzlációs jelentőségű krónikus variábilis stresszre adott válaszokban is. A receptor hiánya komplex módon befolyásolja a krónikus stressz-szenzitivitást, döntően maladaptív viselkedéses változásokat és a HPA-tengely aktivációját elősegítve. Ezek a folyamatok szintén az amygdala stresszre adott válaszához módosításához köthetők. Összefoglalva, adataink arra utalnak, hogy az sst₄ receptor a stresszhez köthető pszichiátriai megbetegedésekben ígéretes gyógyszer-célpont lehet. Ebből a szempontból lényeges megemlíteni az sst₄ aktiváció fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatásait, figyelembe véve a krónikus fájdalomállapotok és a depresszió gyakori együttes előfordulását. Szintén érdemes megjegyezni, hogy a szomatosztatint változatos endokrin hatásainak közvetítésében az sst₄ nem vesz részt (szemben a stressz-szabályozásban szintén jelentős sst₂-vel), így az ebből származó mellékhatásokkal nem kell számolni.

3. Elsőként írtuk le, hogy a kapszaicin-érzékeny neuronok deszenzibilizációja fokozza a krónikus stressz hatására létrejövő mechanikai hiperalgéziát. Ez a hatás az eredmények alapján modalitás-specifikus, nem egy általános viselkedéses vagy endokrin zavar következménye. A jelenség az agyi fájdalom-feldolgozásban résztvevő struktúrák aktivitásának módosulásához köthető, míg a perifériás nociceptorok aktivitásfokozódása és az immunológiai változások szerepe nem valószínű. E következtetéseknek fontos szerepe lehet a stressz és központi, ill. perifériás nociceptív rendszerek interakcióinak megértésében. E kérdés jelentőségét a pszichológiai faktorok krónikus fájdalomállapotokban játszott szerepe emeli ki. Eredményeink hozzájárulhatnak a stresszhez kötődő fájdalomállapotok, például az FM patomechanizmusának megértéséhez, figyelembe véve az utóbbiban kimutatott paradox vékonyrost patológiát.

A stresszhez köthető betegségek nagy klinikai jelentősége miatt a stressz-szabályozás mechanizmusainak tisztázása világszerte intenzív kutatások tárgya. Vizsgálataink a stressz összetett folyamataiban eddig ismeretlen tényezőket derítettek fel. A dolgozatban leírt jelenségek további részletes vizsgálata újabb pszichofarmakológiai és krónikus fájdalomra ható ágensek kifejlesztéséhez járulhat hozzá.

IRODALOMJEGYZÉK

Abdelhamid RE, Kovács KJ, Honda CN, Nunez MG, Larson AA (2013a). Resiniferatoxin (RTX) causes a uniquely protracted musculoskeletal hyperalgesia in mice by activation of TRPV1 receptors. *J Pain*. 14(12):1629-41.

Abdelhamid RE, Kovacs KJ, Pasley JD, Nunez MG, Larson AA (2013b). Forced swim-induced musculoskeletal hyperalgesia is mediated by CRF2 receptors but not by TRPV1 receptors. *Neuropharmacology*. 72:29-37.

Abdelhamid RE, Kovács KJ, Nunez MG, Larson AA (2014). Depressive behavior in the forced swim test can be induced by TRPV1 receptor activity and is dependent on NMDA receptors. *Pharmacol Res*. 79:21-7.

Acs G, Palkovits M, Blumberg PM (1996). Specific binding of [3H]resiniferatoxin by human and rat preoptic area, locus ceruleus, medial hypothalamus, reticular formation and ventral thalamus membrane preparations. *Life Sci*. 59(22):1899-908.

Almási R, Pethő G, Bölskei K, Szolcsányi J (2003). Effect of resiniferatoxin on the noxious heat threshold temperature in the rat: a novel heat allodynia model sensitive to analgesics. *Br J Pharmacol*. 139(1):49-58.

American Psychiatric Association (2013). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th edn., <http://dsm.psychiatryonline.org/doi/book/10.1176/appi.books.9780890425596>

Ammassari-Teule M, Fagioli S, Rossi-Arnaud C (1994). Radial maze performance and open-field behaviours in aged C57BL/6 mice: further evidence for preserved cognitive abilities during senescence. *Physiol Behav*. 55(2):341-5.

Amorim D, David-Pereira A, Marques P, Puga S, Rebelo P, Costa P és mtsai. (2014). A role of supraspinal galanin in behavioural hyperalgesia in the rat. *PLoS One*. 9(11):e113077.

Anand P, Bley K (2011). Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *Br J Anaesth*. 107(4):490-502.

- Anthony TE, Dee N, Bernard A, Lerchner W, Heintz N, Anderson DJ (2014). Control of stress-induced persistent anxiety by an extra-amygdala septohypothalamic circuit. *Cell*. 156(3):522-36.
- Aourz N, De Bundel D, Stragier B, Clinckers R, Portelli J, Michotte Y, Smolders I (2011). Rat hippocampal somatostatin sst3 and sst4 receptors mediate anticonvulsive effects in vivo: indications of functional interactions with sst2 receptors. *Neuropharmacology*. 61(8):1327-33.
- Arancibia S, Rage F, Graugés P, Gómez F, Tapia-Arancibia L, Armario A (2000). Rapid modifications of somatostatin neuron activity in the periventricular nucleus after acute stress. *Exp Brain Res*. 134(2):261-7.
- Arancibia S, Payet O, Givalois L, Tapia-Arancibia L (2001). Acute stress and dexamethasone rapidly increase hippocampal somatostatin synthesis and release from the dentate gyrus hilus. *Hippocampus*. 11(4):469-77.
- Avgustinovich DF, Kovalenko IL, Koryakina LA (2007). Effects of single episodes of severe stress on the behavior of male and female CBA/Lac and C57BL/6J mice. *Neurosci Behav Physiol*. 37(7):731-7.
- Bai F, Li X, Clay M, Lindstrom T, Skolnick P (2001). Intra- and interstrain differences in models of "behavioral despair". *Pharmacol Biochem Behav*. 70(2-3):187-92.
- Baliki MN, Apkarian AV (2015). Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. *Neuron*. 87(3):474-91.
- Baraban SC, Tallent MK (2004). Interneuron diversity series: interneuronal neuropeptides-endogenous regulators of neuronal excitability. *Trends Neurosci*. 27(3):135-42.
- Bardin L, Malfetes N, Newman-Tancredi A, Depoortère R (2009). Chronic restraint stress induces mechanical and cold allodynia, and enhances inflammatory pain in rat: Relevance to human stress-associated painful pathologies. *Behav Brain Res*. 205(2):360-6.
- Bassant MH, Simon A, Poindessous-Jazat F, Csaba Z, Epelbaum J, Dournaud P (2005). Medial septal GABAergic neurons express the somatostatin sst2A receptor: functional consequences on unit firing and hippocampal theta. *J Neurosci*. 25(8):2032-41.
- Beck CH (1995). Acute treatment with antidepressant drugs selectively increases the expression of c-fos in the rat brain. *J Psychiatry Neurosci*. 20(1):25-32.
- Belzung C, Griebel G (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res*. 125(1-2):141-9.

Bergman P, Adori C, Vas S, Kai-Larsen Y, Sarkanen T, Cederlund A és mtsai. (2014). Narcolepsy patients have antibodies that stain distinct cell populations in rat brain and influence sleep patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(35):E3735-44.

Blanco I, Bérítze N, Argüelles M, Cárcaba V, Fernández F, Janciauskiene S. és mtsai. (2010). Abnormal overexpression of mastocytes in skin biopsies of fibromyalgia patients. *Clin Rheumatol*. 29(12):1403-12.

Borbély É, Botz B, Bölskei K, Kenyér T, Kereskai L, Kiss T, és mtsai. (2015). Capsaicin-sensitive sensory nerves exert complex regulatory functions in the serum-transfer mouse model of autoimmune arthritis. *Brain Behav Immun*. 45:50-9.

Borsini F, Podhorna J, Marazziti D (2002). Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology (Berl)*. 163(2):121-41.

Bölskei K, Helyes Z, Szabó A, Sándor K, Elekes K, Németh J és mtsai. (2005). Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain*. 117(3):368-76.

Bölskei K, Tékus V, Dézsi L, Szolcsányi J, Petho G (2010). Antinociceptive desensitizing actions of TRPV1 receptor agonists capsaicin, resiniferatoxin and N-oleoyldopamine as measured by determination of the noxious heat and cold thresholds in the rat. *Eur J Pain*. 14(5):480-6.

Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R (1973). Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*. 179(4068):77-9.

Brodin E, Rosén A, Schött E, Brodin K (1994). Effects of sequential removal of rats from a group cage, and of individual housing of rats, on substance P, cholecystokinin and somatostatin levels in the periaqueductal grey and limbic regions. *Neuropeptides*. 26(4):253-60.

Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M (1992). Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(23):11151-5.

Buskila D, Sarzi-Puttini P (2006). Biology and therapy of fibromyalgia. Genetic aspects of fibromyalgia syndrome. *Arthritis Res Ther*. 8(5):218.

Bushnell MC, Ceko M, Low LA (2013). Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*. 14(7):502-11.

- Butler RK., Finn DP (2009). Stress-induced analgesia. *Prog Neurobiol.* 88(3):184-202.
- Butler RK, White LC, Frederick-Duus D, Kaigler KF, Fadel JR, Wilson MA (2012). Comparison of the activation of somatostatin- and neuropeptide Y-containing neuronal populations of the rat amygdala following two different anxiogenic stressors. *Exp Neurol.* 238(1):52-63.
- Cagnie B, Coppieters I, Denecker S, Six J, Danneels L, Meeus M (2014). Central sensitization in fibromyalgia? A systematic review on structural and functional brain MRI. *Semin Arthritis Rheum.* 44(1):68-75.
- Canli T, Lesch KP (2007). Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. *Nat Neurosci.* 10:1103-9.
- Calhoon GG, Tye KM (2015). Resolving the neural circuits of anxiety. *Nat Neurosci.* 18(10):1394-404.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 389(6653):816-24.
- Chattarji S, Tomar A, Suvrathan A, Ghosh S, Rahman MM (2015). Neighborhood matters: divergent patterns of stress-induced plasticity across the brain. *Nat Neurosci.* 18(10):1364-75.
- Choi SH, Chung S, Cho JH, Cho YH, Kim JW, Kim JM és mtsai. (2013). Changes in c-Fos Expression in the Forced Swimming Test: Common and Distinct Modulation in Rat Brain by Desipramine and Citalopram. *Korean J Physiol Pharmacol.* 17(4):321-9.
- Crettaz B, Marziniak M, Willeke P, Young P, Hellhammer D, Stumpf A, Burgmer M (2013). Stress-induced allodynia-evidence of increased pain sensitivity in healthy humans and patients with chronic pain after experimentally induced psychosocial stress. *PLoS One.* 8(8):e69460.
- Cryan JF, Mombereau C (2004). In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatry.* 9(4):326-57.
- Cryan JF, Mombereau C, Vassout A (2005). The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev.* 29(4-5):571-625.

Csaba Z, Dournaud P (2001). Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides*. 35(1):1-23.

Czéh B, Varga ZK, Henningsen K, Kovács GL, Miseta A, Wiborg O (2015). Chronic stress reduces the number of GABAergic interneurons in the adult rat hippocampus, dorsal-ventral and region-specific differences. *Hippocampus*. 25(3):393-405.

Daskalakis NP, Bagot RC, Parker KJ, Vinkers CH, de Kloet ER (2013). The three-hit concept of vulnerability and resilience: toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology*. 38:1858-73.

de Lecea L, Criado JR, Prospero-Garcia O, Gautvik KM, Schweitzer P, Danielson PE és mtsai. (1996). A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature*. 381(6579):242-5.

Denes A, Coutts G, Lénárt N, Cruickshank SM, Pelegrin P, Skinner J és mtsai. (2015). AIM2 and NLRC4 inflammasomes contribute with ASC to acute brain injury independently of NLRP3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(13):4050-5.

Deng XY, Li HY, Chen JJ, Li RP, Qu R, Fu Q, Ma SP (2015). Thymol produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in mice. *Behav Brain Res*. 291:12-9.

DeSantana JM, da Cruz KM, Sluka KA (2013). Animal models of fibromyalgia. *Arthritis Res Ther*. 15(6):222.

Devall AJ, Santos JM, Lovick TA (2011). Estrous cycle stage influences on neuronal responsiveness to repeated anxiogenic stress in female rats. *Behav Brain Res*. 225(1):334-40.

Diatchenko L, Fillingim RB, Smith SB, Maixner W (2013). The phenotypic and genetic signatures of common musculoskeletal pain conditions. *Nat Rev Rheumatol*. 9(6):340-50.

Dodd J, Kelly S (1978). Is somatostatin an excitatory transmitter in the hippocampus? *Nature*. 273(5664):674-5.

Drevets WC, Price JL, Furey ML (2008). Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct*. 213(1-2):93-118.

Ducottet C, Griebel G, Belzung C (2003). Effects of the selective nonpeptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 27(4):625-31.

- Duvarci S, Pare D (2014). Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron*. 82(5):966-80.
- Engin E, Stellbrink J, Treit D, Dickson CT (2008). Anxiolytic and antidepressant effects of intracerebroventricularly administered somatostatin: behavioral and neurophysiological evidence. *Neuroscience*. 157(3):666-76.
- Engin E, Treit D (2009). Anxiolytic and antidepressant actions of somatostatin: the role of sst2 and sst3 receptors. *Psychopharmacology (Berl)*. 206(2):281-9.
- Engström M, Tomperi J, El-Darwish K, Ahman M, Savola JM, Wurster S (2005). Superagonism at the human somatostatin receptor subtype 4. *J Pharmacol Exp Ther*. 312(1):332-8.
- Engström M, Savola JM, Wurster S (2006). Differential efficacies of somatostatin receptor agonists for G-protein activation and desensitization of somatostatin receptor subtype 4-mediated responses. *J Pharmacol Exp Ther*. 316(3):1262-8.
- Epelbaum J (1986). Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *Prog Neurobiol*. 27(1):63-100.
- Farazifard R, Kiani R, Esteky H (2005). Effects of GABAA receptor inhibition on response properties of barrel cortical neurons in C-fiber-depleted rats. *Brain Res*. 1050(1-2):27-32.
- Farley S, Dumas S, El Mestikawy S, Giros B (2012). Increased expression of the Vesicular Glutamate Transporter-1 (VGLUT1) in the prefrontal cortex correlates with differential vulnerability to chronic stress in various mouse strains: effects of fluoxetine and MK-801. *Neuropharmacology*. 62(1):503-17.
- Forray MI, Gysling K (2004). Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Res Brain Res Rev*. 47(1-3):145-60.
- Fox AS, Oler JA, Tromp do PM, Fudge JL, Kalin NH (2015). Extending the amygdala in theories of threat processing. *Trends Neurosci*. 38(5):319-29.
- Fu W, Le Maître E, Fabre V, Bernard JF, David Xu ZQ, Hökfelt T (2010). Chemical neuroanatomy of the dorsal raphe nucleus and adjacent structures of the mouse brain. *J Comp Neurol*. 518(17):3464-94.

Gastambide F, Lepousez G, Viollet C, Loudes C, Epelbaum J, Guillou JL (2010). Cooperation between hippocampal somatostatin receptor subtypes 4 and 2: functional relevance in interactive memory systems. *Hippocampus*. 20(6):745-57.

Gaszner B, Csernus V, Kozicz T (2004). Urocortineric neurons respond in a differentiated manner to various acute stressors in the Edinger-Westphal nucleus in the rat. *J Comp Neurol*. 480(2):170-9.

Gaszner B, Kormos V, Kozicz T, Hashimoto H, Reglodi D, Helyes Z (2012). 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*. 202:283-99.

Ghasemi M, Montaser-Kouhsari L, Shafaroodi H, Nezami BG, Ebrahimi F, Dehpour AR (2009). NMDA receptor/nitric system blockage augments antidepressant-like effects of paroxetine in the mouse forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)*. 206(2):325-33.

Godsil BP, Bontempi B, Mailliet F, Delagrèze P, Spedding M, Jay TM (2015). Acute tianeptine treatment selectively modulates neuronal activation in the central nucleus of the amygdala and attenuates fear extinction. *Mol Psychiatry*. 20(11):1420-7.

Graeff FG, Zangrossi H Jr (2010). The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 10(3):207-17.

Guilloux JP, Douillard-Guilloux G, Kota R, Wang X, Gardier AM, Martinowich K és mtsai. (2012). Molecular evidence for BDNF- and GABA-related dysfunctions in the amygdala of female subjects with major depression. *Mol Psychiatry*. 17(11):1130-42.

Gustavsson A, Svensson M, Jacobi F, Allgulander C, Alonso J, Beghi E és mtsai. (2011). Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol*. 21:718-79.

Häidkind R, Eller M, Harro M, Kask A, Rinken A, Oreland L, Harro J (2003). Effects of partial locus coeruleus denervation and chronic mild stress on behavior and monoamine neurochemistry in the rat. *Eur Neuropsychopharmacol*. 13(1):19-28.

Hammack SE, Roman CW, Lezak KR, Kocho-Shellenberg M, Grimmig B, Falls WA (2010). 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.* 42(3):327-40.

Harris RE, Sundgren PC, Pang Y, Hsu M, Petrou M, Kim SH és mtsai. (2008). Dynamic levels of glutamate within the insula are associated with improvements in multiple pain domains in fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* 58(3):903-7.

Harro J, Tönissaar M, Eller M, Kask A, Oreland L (2001). Chronic variable stress and partial 5-HT denervation by parachloroamphetamine treatment in the rat: effects on behavior and monoamine neurochemistry. *Brain Res.* 899(1-2):227-39.

Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM (2009). Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev.* 60(1):214-25.

Hellsten KS, Linden AM, Korpi ER (2015). Paradoxical widespread c-Fos expression induced by a GABA agonist in the forebrain of transgenic mice with ectopic expression of the GABA(A) $\alpha 6$ subunit. *Neuroscience.* 293:123-35.

Helyes Z, Pintér E, Sándor K, Elekes K, Bánvölgyi A, Keszthelyi D és mtsai. (2009). Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(31):13088-93.

Herman JP, Cullinan WE (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 20(2):78-84.

Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol.* 24(3):151-80.

Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 29(8):1201-13.

Herman JP, Flak J, Jankord R (2008). Chronic stress plasticity in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Prog Brain Res.* 170:353-64.

Hill MN, Hellems KG, Verma P, Gorzalka BB, Weinberg J (2012). Neurobiology of chronic mild stress: parallels to major depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 36:2085-117.

Hodes GE, Kana V, Menard C, Merad M, Russo SJ (2015). Neuroimmune mechanisms of depression. *Nat Neurosci.* 18:1386-93.

- Hoffman EJ, Mathew SJ (2008). Anxiety disorders: a comprehensive review of pharmacotherapies. *Mt Sinai J Med.* 75(3):248-62.
- Holzer P (1988). Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience.* 24(3):739-68.
- Hong S, Zheng G, Wu X, Snider NT, Owyang C, Wiley JW (2011). Corticosterone mediates reciprocal changes in CB1 and TRPV1 receptors in primary sensory neurons in the chronically stressed rat. *Gastroenterology.* 140(2):627-637.
- Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PP és mtsai. (1995). Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 16(3):86-8.
- Ihne JL, Fitzgerald PJ, Hefner KR, Holmes A (2012). Pharmacological modulation of stress-induced behavioral changes in the light/dark exploration test in male C57BL/6J mice. *Neuropharmacology.* 62(1):464-73.
- Imbe H, Murakami S, Okamoto K, Iwai-Liao Y, Senba E (2004). The effects of acute and chronic restraint stress on activation of ERK in the rostral ventromedial medulla and locus coeruleus. *Pain.* 112(3):361-71.
- Imbe H, Iwai-Liao Y, Senba E (2006). Stress-induced hyperalgesia: animal models and putative mechanisms. *Front Biosci.* 11:2179-92.
- Imbe H, Kimura A (2015). Repeated forced swim stress prior to complete Freund's adjuvant injection enhances mechanical hyperalgesia and attenuates the expression of pCREB and Δ FosB and the acetylation of histone H3 in the insular cortex of rat. *Neuroscience.* 301:12-25.
- Immke DC, Gavva NR (2006). The TRPV1 receptor and nociception. *Semin Cell Dev Biol.* 17(5):582-91.
- Jaggi AS, Bhatia N, Kumar N, Singh N, Anand P, Dhawan R (2011). A review on animal models for screening potential anti-stress agents. *Neurol Sci.* 32(6):993-1005.
- Jancsó N, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J (1967). Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother.* 31(1):138-51.
- Jara-Oseguera A, Simon SA, Rosenbaum T (2008). TRPV1: on the road to pain relief. *Curr Mol Pharmacol.* 1(3):255-69.

- Jasmin L, Burkey AR, Granato A, Ohara PT (2004). Rostral agranular insular cortex and pain areas of the central nervous system: a tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol.* 468(3):425-40.
- Jennings EM, Okine BN, Roche M, Finn DP (2014). Stress-induced hyperalgesia. *Prog Neurobiol.* 121:1-18.
- Jensen KB, Kosek E, Petzke F, Carville S, Fransson P, Marcus H és mtsai. (2009). Evidence of dysfunctional pain inhibition in Fibromyalgia reflected in rACC during provoked pain. *Pain.* 144(1-2):95-100.
- Ji G, Zhou S, Kochukov MY, Westlund KN, Carlton SM (2007). Plasticity in intact A delta- and C-fibers contributes to cold hypersensitivity in neuropathic rats. *Neuroscience.* 150(1):182-93.
- Jones GT, Atzeni F, Beasley M, Flüß E, Sarzi-Puttini P, Macfarlane GJ (2015). The prevalence of fibromyalgia in the general population: a comparison of the American College of Rheumatology 1990, 2010, and modified 2010 classification criteria. *Arthritis Rheumatol.* 67(2):568-75.
- Józsa R, Olah A, Cornélissen G, Csernus V, Otsuka K, Zeman M és mtsai. (2005). Circadian and extracircadian exploration during daytime hours of circulating corticosterone and other endocrine chronomes. *Biomed Pharmacother.* 59 Suppl 1:S109-16.
- Jürgenson M, Aonurm-Helm A, Zharkovsky A (2012). Partial reduction in neural cell adhesion molecule (NCAM) in heterozygous mice induces depression-related behavior without cognitive impairment. *Brain Res.* 1447:106-18.
- Katz RJ, Hersh S (1981). Amitriptyline and scopolamine in an animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 5(2):265-71.
- Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ (1981). Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 5(2):247-51.
- Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Merikangas KR, Walters EE (2005a). Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry.* 62:617-27.
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE (2005b). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry.* 62:593-602.

Khasar SG, Green PG, Levine JD (2005). Repeated sound stress enhances inflammatory pain in the rat. *Pain*. 116(1-2):79-86.

Khasar SG, Burkham J, Dina OA, Brown AS, Bogen O, Alessandri-Haber N és mtsai. (2008). Stress induces a switch of intracellular signaling in sensory neurons in a model of generalized pain. *J Neurosci*. 28(22):5721-30.

Kilpatrick DG, Koenen KC, Ruggiero KJ, Acierno R, Galea S, Resnick HS és mtsai. (2007). The serotonin transporter genotype and social support and moderation of posttraumatic stress disorder and depression in hurricane-exposed adults. *Am J Psychiatry*. 164:1693-9.

Kim J, Loggia ML, Cahalan CM, Harris RE, Beissner F, Garcia R.G és mtsai. (2015). The somatosensory link in fibromyalgia: functional connectivity of the primary somatosensory cortex is altered by sustained pain and is associated with clinical/autonomic dysfunction. *Arthritis Rheumatol*. 67(5):1395-405.

Klengel T, Mehta D, Anacker C, Rex-Haffner M, Pruessner JC, Pariante CM és mtsai. (2013). Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions. *Nat Neurosci*. 16(1):33-41.

Köhler C, Chan-Palay V, Steinbusch H (1982). The distribution and origin of serotonin-containing fibers in the septal area: a combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat. *J Comp Neurol*. 209(1):91-111.

Kormos V, Gaszner B (2013). Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. *Neuropeptides*. 47(6):401-19.

Kovács KJ (1998). c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int*. 33(4):287-97.

Kozicz T, Tilburg-Ouwens D, Faludi G, Palkovits M, Roubos E (2008). Gender-related urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor expression in the adult human midbrain of suicide victims with major depression. *Neuroscience*. 152(4):1015-23.

Krishnan V, Nestler EJ (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature*. 455:894-902.

Krishnan V, Nestler EJ (2010). Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. *Am J Psychiatry*. 167(11):1305-20.

Lannersten L, Kosek E (2010). Dysfunction of endogenous pain inhibition during exercise with painful muscles in patients with shoulder myalgia and fibromyalgia. *Pain*. 151(1):77-86.

- Leblanc H, Anderson JR, Sigel MB, Yen SS (1975). Inhibitory action of somatostatin on pancreatic alpha and beta cell function. *J Clin Endocrinol Metab.* 40(4):568-72.
- Lee HY, Lee GH, Marahatta A, Lin SM, Lee MR, Jang KY és mtsai. (2013). The protective role of Bax inhibitor-1 against chronic mild stress through the inhibition of monoamine oxidase A. *Sci Rep.* 3:3398
- Leresche N, Asproдини E, Emri Z, Cope DW, Crunelli V (2000). Somatostatin inhibits GABAergic transmission in the sensory thalamus via presynaptic receptors. *Neuroscience.* 98(3):513-22.
- Li H, Penzo MA, Taniguchi H, Kopec CD, Huang ZJ, Li B (2013). Experience-dependent modification of a central amygdala fear circuit. *Nat Neurosci.* 16(3):332-9.
- Lim M, Roosink M, Kim JS, Kim DJ, Kim HW, Lee EB és mtsai. (2015). Disinhibition of the primary somatosensory cortex in patients with fibromyalgia. *Pain.* 156(4):666-74.
- Lin LC, Sibille E (2013). Reduced brain somatostatin in mood disorders: a common pathophysiological substrate and drug target? *Front Pharmacol.* 4:110.
- Lin LC, Sibille E (2015). Somatostatin, neuronal vulnerability and behavioral emotionality. *Mol Psychiatry.* 20(3):377-87.
- Lister RG (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl).* 92(2):180-5.
- Liu X, Gershenfeld HK (2001). Genetic differences in the tail-suspension test and its relationship to imipramine response among 11 inbred strains of mice. *Biol Psychiatry.* 49(7):575-81.
- Lkhagvasuren B, Oka T, Nakamura Y, Hayashi H, Sudo N, Nakamura K (2014). Distribution of Fos-immunoreactive cells in rat forebrain and midbrain following social defeat stress and diazepam treatment. *Neuroscience.* 272:34-57.
- Lowry CA, Hale MW, Evans AK, Heerkens J, Staub DR, Gasser PJ, Shekhar A (2008). Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Y Acad Sci.* 1148:86-94.
- Lucassen PJ, Pruessner J, Sousa N, Almeida OF, Van Dam AM, Rajkowska G és mtsai. (2014). Neuropathology of stress. *Acta Neuropathol.* 127(1):109-35.

Luis-Delgado OE, Barrot M, Rodeau JL, Ulery PG, Freund-Mercier MJ, Lasbennes F (2006). The transcription factor DeltaFosB is recruited by inflammatory pain. *J Neurochem.* 98(5):1423-31.

Maletic V, Raison CL (2009). Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. *Front Biosci (Landmark Ed).* 14:5291-338.

Marsch R, Foeller E, Rammes G, Bunck M, Kössl M, Holsboer F és mtsai. (2007). Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. *J Neurosci.* 27(4):832-9.

Martel G, Dutar P, Epelbaum J, Viollet C (2012). Somatostatinergic systems: an update on brain functions in normal and pathological aging. *Front Endocrinol (Lausanne).* 3:154.

Martins D, Tavares I, Morgado C (2014). "Hotheaded": the role of TRPV1 in brain functions. *Neuropharmacology.* 85:151-7.

McEwen BS, Gianaros PJ (2010). Central role of the brain in stress and adaptation: links to socioeconomic status, health, and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1186:190-222.

McEwen BS, Kalia M (2010). The role of corticosteroids and stress in chronic pain conditions. *Metabolism.* 59 Suppl 1:S9-15.

McEwen BS (2012). Brain on stress: how the social environment gets under the skin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109 Suppl 2:17180-5.

McEwen BS, Bowles NP, Gray JD, Hill MN, Hunter RG, Karatsoreos IN, Nasca C (2015). Mechanisms of stress in the brain. *Nat Neurosci.* 18(10):1353-63.

Michelsen KA, Prickaerts J, Steinbusch HW (2008). The dorsal raphe nucleus and serotonin: implications for neuroplasticity linked to major depression and Alzheimer's disease. *Prog Brain Res.* 172:233-64.

Minett MS, Falk S, Santana-Varela S, Bogdanov YD, Nassar MA, Heegaard AM, Wood JN (2014). Pain without nociceptors? Nav1.7-independent pain mechanisms. *Cell Rep.* 6(2):301-12.

Mineur YS, Belzung C, Crusio WE (2006). Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behav Brain Res.* 175(1):43-50.

- Mombereau C, Kaupmann K, Froestl W, Sansig G, van der Putten H, Cryan JF (2004). Genetic and pharmacological evidence of a role for GABA(B) receptors in the modulation of anxiety- and antidepressant-like behavior. *Neuropsychopharmacology*. 29(6):1050-62.
- Moneta D, Richichi C, Aliprandi M, Dournaud P, Dutar P, Billard JM (2002). Somatostatin receptor subtypes 2 and 4 affect seizure susceptibility and hippocampal excitatory neurotransmission in mice. *Eur J Neurosci*. 16(5):843-9.
- Monteiro S, Roque S, de Sá-Calçada D, Sousa N, Correia-Neves M, Cerqueira JJ (2015). An efficient chronic unpredictable stress protocol to induce stress-related responses in C57BL/6 mice. *Front Psychiatry*. 6:6
- Mozhui K, Karlsson RM, Kash TL, Ihne J, Norcross M, Patel S és mtsai. (2010). Strain differences in stress responsivity are associated with divergent amygdala gene expression and glutamate-mediated neuronal excitability. *J Neurosci*. 30(15):5357-67.
- Mukherjee K, Knisely A, Jacobson L (2004). Partial glucocorticoid agonist-like effects of imipramine on hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity, thymus weight, and hippocampal glucocorticoid receptors in male C57BL/6 mice. *Endocrinology*. 145(9):4185-91.
- Nabeshima T, Kim HC (2013). Involvement of genetic and environmental factors in the onset of depression. *Exp Neurol*. 22(4):235-43.
- Nanda SA, Qi C, Roseboom PH, Kalin NH (2008). Predator stress induces behavioral inhibition and amygdala somatostatin receptor 2 gene expression. *Genes Brain Behav*. 7(6):639-48.
- Nestler EJ, Kelz MB, Chen J (1999). DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. *Brain Res*. 835(1):10-7.
- Nestler EJ, Gould E, Manji H, Buncan M, Duman RS, Greshenfeld HK (2002). Preclinical models: status of basic research in depression. *Biol Psychiatry*. 52(6):503-28.
- Nestler EJ (2015). Δ FosB: a transcriptional regulator of stress and antidepressant responses. *Eur J Pharmacol*. 753:66-72.
- Nielsen DM, Carey GJ, Gold LH (2004). Antidepressant-like activity of corticotropin-releasing factor type-1 receptor antagonists in mice. *Eur J Pharmacol*. 499(1-2):135-46.

- Nishiyori M, Ueda H (2008). Prolonged gabapentin analgesia in an experimental mouse model of fibromyalgia. *Mol Pain*. 4:52.
- Nilsson A, Stroth N, Zhang X, Qi H, Fälth M, Sköld K és mtsai. (2012). Neuropeptidomics of mouse hypothalamus after imipramine treatment reveal somatostatin as a potential mediator of antidepressant effects. *Neuropharmacology*. 62(1):347-57.
- Norrholm SD, Ressler KJ (2009). Genetics of anxiety and trauma-related disorders. *Neuroscience*. 164:272-87.
- Nussbaumer JC, Wall PD (1985). Expansion of receptive fields in the mouse cortical barrelfield after administration of capsaicin to neonates or local application on the infraorbital nerve in adults. *Brain Res*. 360(1-2):1-9.
- Nygard SK, Klambatsen A, Balouch B, Quinones-Jenab V, Jenab S (2015). Region and context-specific intracellular responses associated with cocaine-induced conditioned place preference expression. *Neuroscience*. 287:1-8.
- Ordovas-Montanes J, Rakoff-Nahoum S, Huang S, Riol-Blanco L, Barreiro O, von Andrian UH (2015). The Regulation of Immunological Processes by Peripheral Neurons in Homeostasis and Disease. *Trends Immunol*. 36(10):578-604.
- Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F (2010). Central modulation of pain. *J Clin Invest*. 120(11):3779-87.
- Patel YC (1999). Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol*. 20(3):157-98.
- Paul ED, Johnson PL, Shekhar A, Lowry CA (2014). The Deakin/Graeff hypothesis: focus on serotonergic inhibition of panic. *Neurosci Biobehav Rev*. 46 Pt 3:379-96.
- Paxinos G, Franklin K (2003). The mouse brain in stereotaxic coordinates, third ed. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Petrovic-Dergovic DM, Zivković IP, Rakin AK, Kosec DJ, Dimitrijević LjA, Starcević VP és mtsai. (2004). Somatostatin-14 alters the thymus size and relation among the thymocyte subpopulations in peripubertal rats. *Neuropeptides*. 38(1):25-34.
- Pintér E, Helyes Z, Németh J, Pórszász R, Pethő G, Thán M (2002). Pharmacological characterisation of the somatostatin analogue TT-232: effects on neurogenic and non-neurogenic inflammation and neuropathic hyperalgesia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 366(2):142-50.

Pintér E, Helyes Z, Szolcsányi J (2006). Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol Ther.* 112(2):440-56.

Pleger B, Ragert P, Schwenkreis P, Förster AF, Wilimzig C, Dinse H és mtsai. (2006). Patterns of cortical reorganization parallel impaired tactile discrimination and pain intensity in complex regional pain syndrome. *Neuroimage.* 32(2):503-10.

Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 229(2):327-36.

Quintero GC (2013). Advances in cortical modulation of pain. *J Pain Res.* 6:713-25.

Quintero L, Cardenas R, Suarez-Roca H (2011). Stress-induced hyperalgesia is associated with a reduced and delayed GABA inhibitory control that enhances post-synaptic NMDA receptor activation in the spinal cord. *Pain.* 152(8):1909-22.

Rau AR, Chappell AM, Butler TR, Ariwodola OJ, Weiner JL (2015). Increased Basolateral Amygdala Pyramidal Cell Excitability May Contribute to the Anxiogenic Phenotype Induced by Chronic Early-Life Stress. *J Neurosci.* 35(26):9730-40.

Renard CE, Dailly E, David DJ, Hascoet M, Bourin M (2003). Monoamine metabolism changes following the mouse forced swimming test but not the tail suspension test. *Fundam Clin Pharmacol.* 17(4):449-55.

Saldívar-González A, Arias C, Mondragón-Ceballos R (1997). Transient emotional changes elicited by intraperitoneal saline injection: effect of naloxone and flumazenil. *Pharmacol Biochem Behav.* 56(2):211-20.

Salemi S, Rethage J, Wollina U, Michel BA, Gay RE, Gay S, Sprott H (2003). Detection of interleukin 1beta (IL-1beta), IL-6, and tumor necrosis factor-alpha in skin of patients with fibromyalgia. *J Rheumatol.* 30(1):146-50.

Sándor K, Elekes K, Szabó A, Pintér E, Engström M, Wurster S (2006). Analgesic effects of the somatostatin sst4 receptor selective agonist J-2156 in acute and chronic pain models. *Eur J Pharmacol.* 539(1-2):71-5.

Sandoval KE, Farr SA, Banks WA, Niehoff ML, Morley JE, Crider AM, Witt KA (2011). Chronic peripheral administration of somatostatin receptor subtype-4 agonist NNC 26-9100 enhances learning and memory in SAMP8 mice. *Eur J Pharmacol.* 654(1):53-9.

Sandoval KE, Farr SA, Banks WA, Crider AM, Morley JE, Witt KA (2013). Somatostatin receptor subtype-4 agonist NNC 26-9100 mitigates the effect of soluble A β (42) oligomers via a metalloproteinase-dependent mechanism. *Brain Res.* 1520:145-56.

Santis S, Kastellakis A, Kotzamani D, Pitarokoili K, Kokona D, Thermos K (2009). Somatostatin increases rat locomotor activity by activating sst(2) and sst (4) receptors in the striatum and via glutamatergic involvement. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 379(2):181-9.

Schreff M, Schulz S, Händel M, Keilhoff G, Braun H, Pereira G és mtsai. (2000). Distribution, targeting, and internalization of the sst4 somatostatin receptor in rat brain. *J Neurosci.* 20(10):3785-97.

Schweizer MC, Henniger MS, Sillaber I (2009). Chronic mild stress (CMS) in mice: of anhedonia, 'anomalous anxiolysis' and activity. *PLoS One.* 4(1):e4326.

Scholz J, Woolf CJ (2007). The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci.* 10(11):1361-8.

Selmer IS, Schindler M, Humphrey PP, Emson PC (2000a). Immunohistochemical localization of the somatostatin sst(4) receptor in rat brain. *Neuroscience.* 98(3):523-33.

Selmer IS, Schindler M, Humphrey PP, Waldvogel HJ, Faull RL, Emson PC (2000b). First localisation of somatostatin sst(4) receptor protein in selected human brain areas: an immunohistochemical study. *Brain Res Mol Brain Res.* 82(1-2):114-25.

Selye H (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature.* 138: 32.

Selye H (1950). Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J.* 1: 1383-92.

Serra J, Collado A, Solà R, Antonelli F, Torres X, Salgueiro M és mtsai. (2014). Hyperexcitable C nociceptors in fibromyalgia. *Ann Neurol.* 75(2):196-208.

Shi HS, Zhu WL, Liu JF, Luo YX, Si JJ, Wang SJ (2012). PI3K/Akt signaling pathway in the basolateral amygdala mediates the rapid antidepressant-like effects of trefoil factor 3. *Neuropsychopharmacology.* 37(12):2671-83.

Sibille E, Morris HM, Kota RS, Lewis DA (2011). GABA-related transcripts in the dorsolateral prefrontal cortex in mood disorders. *Int J Neuropsychopharmacol.* 14(6):721-34.

Silva M, Aguiar DC, Diniz CR, Guimarães FS, Joca SR (2012). Neuronal NOS inhibitor and conventional antidepressant drugs attenuate stress-induced fos expression in overlapping brain regions. *Cell Mol Neurobiol.* 32(3):443-53.

- Singewald GM, Rjabokon A, Singewald N, Ebner K (2011). The modulatory role of the lateral septum on neuroendocrine and behavioral stress responses. *Neuropsychopharmacology*. 36(4):793-804.
- Sluka KA (2009). In: Mechanisms and Management of Pain for the Physical Therapist. Sluka KA, editor. Seattle: IAPS Press. Pain syndromes: myofascial pain and fibromyalgia; pp. 279–297.
- Smith HS, Bracken D, Smith JM (2011). Pharmacotherapy for fibromyalgia. *Front Pharmacol*. 2:17.
- Sterrenburg L, Gaszner B, Boerrigter J, Santbergen L, Bramini M, Elliott E és mtsai. (2011). Chronic stress induces sex-specific alterations in methylation and expression of corticotropin-releasing factor gene in the rat. *PLoS One*. 6(11):e28128.
- Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA, Gass P (2004). Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology*. 29(11):2007-17.
- Suarez-Roca H, Quintero L, Arcaya JL, Maixner W, Rao SG (2006a). Stress-induced muscle and cutaneous hyperalgesia: differential effect of milnacipran. *Physiol Behav*. 88(1-2):82-7.
- Suarez-Roca H, Silva JA, Arcaya JL, Quintero L, Maixner W, Pinerua-Shuhaibar L (2006b). Role of mu-opioid and NMDA receptors in the development and maintenance of repeated swim stress-induced thermal hyperalgesia. *Behav Brain Res*. 167(2):205-11.
- Sunyer B, Patil S, Frischer C, Höger H, Selcher J, Brannath W, Lubec G (2007). Strain-dependent effects of SGS742 in the mouse. *Behav Brain Res*. 181(1):64-75.
- Szabo S (1998). Hans Selye and the development of the stress concept. Special reference to gastroduodenal ulcerogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 851: 19-27.
- Szolcsanyi J, Szallasi A, Szallasi Z, Joo F, Blumberg PM (1990). Resiniferatoxin: an ultrapotent selective modulator of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 255(2):923-8.
- Szolcsányi J (1996). Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and scopes of an unorthodox neuroregulatory mechanism. *Prog Brain Res*. 113:343-59.

- Szolcsányi J, Bölcskei K, Szabó A, Pintér E, Petho G, Elekes K és mtsai. (2004). Analgesic effect of TT-232, a heptapeptide somatostatin analogue, in acute pain models of the rat and the mouse and in streptozotocin-induced diabetic mechanical allodynia. *Eur J Pharmacol.* 498(1-3):103-9.
- Tékus V, Hajna Z, Borbély É, Markovics A, Bagoly T, Szolcsányi J és mtsai. (2014). A CRPS-IgG-transfer-trauma model reproducing inflammatory and positive sensory signs associated with complex regional pain syndrome. *Pain.* 155(2):299-308.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron.* 21(3):531-43.
- Tripp A, Kota RS, Lewis DA, Sibille E (2011). Reduced somatostatin in subgenual anterior cingulate cortex in major depression. *Neurobiol Dis.* 42(1):116-24.
- Tuboly G, Vécsei L (2013). Somatostatin and cognitive function in neurodegenerative disorders. *Mini Rev Med Chem.* 13(1):34-46.
- Tye KM, Prakash R, Kim SY, Fenno LE, Grosenick L, Zarabi H és mtsai. (2011). Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature.* 471(7338):358-62.
- Üçeyler N, Häuser W, Sommer C (2011). Systematic review with meta-analysis: cytokines in fibromyalgia syndrome. *BMC Musculoskelet Disord.* 12:245.
- Üçeyler N, Zeller D, Kahn AK, Kewenig S, Kittel-Schneider S, Schmid A, és mtsai. (2013). Small fibre pathology in patients with fibromyalgia syndrome. *Brain.* 136(Pt 6):1857-67.
- Üçeyler N, Kewenig S, Kafke W, Kittel-Schneider S, Sommer C (2014). Skin cytokine expression in patients with fibromyalgia syndrome is not different from controls. *BMC Neurol.* 14:185.
- Vale W, Rivier C, Brazeau P, Guillemin R (1974). Effects of somatostatin on the secretion of thyrotropin and prolactin. *Endocrinology.* 95(4):968-77.
- Viollet C, Vaillend C, Videau C, Bluet-Pajot MT, Ungerer A, L'Héritier A és mtsai. (2000). Involvement of sst2 somatostatin receptor in locomotor, exploratory activity and emotional reactivity in mice. *Eur J Neurosci.* 12(10):3761-70.
- Viollet C, Lepousez G, Loudes C, Videau C, Simon A, Epelbaum J (2008). Somatostatinergic systems in brain: networks and functions. *Mol Cell Endocrinol.* 286(1-2):75-87.

WHO (2012).
<http://www.who.int/mental_health/management/depression/wfmh_paper_depression_wmhd_2012.pdf>.

Wagner KM, Roeder Z, Desrochers K, Buhler AV, Heinricher MM, Cleary DR (2013). The dorsomedial hypothalamus mediates stress-induced hyperalgesia and is the source of the pronociceptive peptide cholecystokinin in the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience*. 238:29-38.

Warden MR, Selimbeyoglu A, Mirzabekov JJ, Lo M, Thompson KR, Kim SY és mtsai. (2012). A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge. *Nature*. 492(7429):428-32.

Weissbourd B, Ren J, DeLoach KE, Guenther CJ, Miyamichi K, Luo L (2014). Presynaptic partners of dorsal raphe serotonergic and GABAergic neurons. *Neuron*. 83(3):645-62.

Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)*. 93(3):358-64.

Willner P (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)*. 134:319-29.

Willner P (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*. 52(2):90-110.

Xu L, Scheenen WJ, Roubos EW, Kozicz T (2012). Peptidergic Edinger-Westphal neurons and the energy-dependent stress response. *Gen Comp Endocrinol*. 177(3):296-304.

Xu ZZ, Kim YH, Bang S, Zhang Y, Berta T, Wang F és mtsai. (2015). Inhibition of mechanical allodynia in neuropathic pain by TLR5-mediated A-fiber blockade. *Nat Med*. 21(11):1326-31.

Yeung M, Engin E, Treit D (2011). Anxiolytic-like effects of somatostatin isoforms SST 14 and SST 28 in two animal models (*Rattus norvegicus*) after intra-amygdalar and intra-septal microinfusions. *Psychopharmacology (Berl)*. 216(4):557-67.

Yeung M, Treit D (2012). The anxiolytic effects of somatostatin following intra-septal and intra-amygdalar microinfusions are reversed by the selective sst2 antagonist PRL2903. *Pharmacol Biochem Behav*. 101(1):88-92.

Yoo S, Lim JY, Hwang SW (2014). Sensory TRP channel interactions with endogenous lipids and their biological outcomes. *Molecules*. 19(4):4708-44.

You IJ, Jung YH, Kim MJ, Kwon SH, Hong SI, Lee SY és mtsai. (2012). Alterations in the emotional and memory behavioral phenotypes of transient receptor potential vanilloid type 1-deficient mice are mediated by changes in expression of 5-HT_{1A}, GABA(A), and NMDA receptors. *Neuropharmacology*. 62(2):1034-43.

Yunus MB (2008). Central sensitivity syndromes: a new paradigm and group nosology for fibromyalgia and overlapping conditions, and the related issue of disease versus illness. *Semin Arthritis Rheum*. 37(6):339-52.

Zautra AJ, Parrish BP, Van Puymbroeck CM, Tennen H, Davis MC, Reich JW, Irwin M (2007). Depression history, stress, and pain in rheumatoid arthritis patients. *J Behav Med*. 30(3):187-97.

Zheng G, Hong S, Hayes JM, Wiley JW (2015). Chronic stress and peripheral pain: Evidence for distinct, region-specific changes in visceral and somatosensory pain regulatory pathways. *Exp Neurol*. 273:301-11.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Scheich B, Gaszner B, Kormos V, László K, Adori Cs, Borbély É, Hajna Zs, Tékus V, Böleskei K, Ábrahám I, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs (2015). Somatostatin receptor subtype 4 activation is involved in anxiety and depression-like behavior in mouse models. *Neuropharmacology*. 101:204-215. (IF: 5,106)

Scheich B, Csekő K, Borbély É, Ábrahám I, Csernus V, Gaszner B, Helyes Zs. Higher susceptibility of somatostatin 4 receptor gene-deleted mice to chronic stress-induced behavioral and neuroendocrine alterations. *Közlésre benyújtva a Brain Structure and Function folyóirathoz, bíráló alatt.*

Scheich B, Vincze P, Szőke É, Borbély É, Szolcsányi J, Dénes Á, Környei Zs, Gaszner B, Helyes Zs. Chronic stress-induced mechanical hyperalgesia is controlled by capsaicin-sensitive neurons in the mouse. *Közlésre benyújtva a Neuroscience folyóirathoz.*

Összesített impakt faktor: 5,106

IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK

Scheich B, Kormos V, Tékus V, Hajna Z, Gaszner B, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z (2012). Somatostatin receptor subtype 4 (sst4) plays an inhibitory role in anxiety and depression-like behaviours of mice. *CLINICAL NEUROSCIENCE* 65:(1) p. 57.

Scheich B, Kormos V, Tékus V, Hajna Zs, Borbély É, Gaszner B, László K, Lénárd L, Karádi Z, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs (2012). A szomatosztatin 4 receptor szerepének vizsgálata funkcionális tesztekkel és C-FOS immunhisztokémiával szorongás és depresszió-szerű viselkedés egérmodelljeiben. In: Dr. Csernoch László (szerk.) *A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Anatómusok Társasága, a Magyar Biofizikai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Kongresszusa*. p. 175.

Hajna Zs, Borbély É, László K, **Scheich B**, Berger A, Quinn JP, Lénárd L, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs (2012). A tachykininek és neurokinin 1 (NK1) receptor szorongásban és tanulási folyamatokban betöltött szerepének funkcionális vizsgálata. In: Csernoch László (szerk.) *A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Anatómusok Társasága, a Magyar Biofizikai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Kongresszusa*. p. 111.

Scheich B, Kormos V, Tékus V, Hajna Zs, Borbély É, Gaszner B, László K, Lénárd L, Karádi Z, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs (2012). Functional and immunocytochemical evidence for anxiolytic and antidepressant actions of somatostatin receptor subtype 4 activation in mice. In: Dr. Csillag András (szerk.) *XIV. Conference of the Hungarian Neuroscience Society*. 282 p.

Helyes Zs, **Scheich B**, Kormos V, Tekus V, Hajna Zs, Gaszner B, Pinter E, Szolcsanyi J (2013). Activation of somatostatin receptor subtype 4 (sst4) inhibits anxiety and depression-like behaviours in mouse models *JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY* 125:(1)p. 230. 1 p.

Borbély É, **Scheich B**, Berger A, Paige CJ, Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs (2014). Regulatory role of hemokinin-1 in chronic restraint stress model of mice *J Mol Neurosci*. 53:(Suppl 1) pp. S138-S183.

Összes független citáció: 1

EGYÉB EREDETI PUBLIKÁCIÓ

Borbély É, **Scheich B**, Helyes Zs (2013). Neuropeptides in learning and memory. *Neuropeptides*. 47: 439-50. (IF: 2.546)

Összesített impakt faktor: 2,546

Összes független citáció: 25

KONGRESSZUSI SZÓBELI ELŐADÁSOK JEGYZÉKE

Scheich B.: A krónikus stressz fájdalomfokozó hatásainak vizsgálata egérmodellekben (II. Pécs-Oklahoma Szimpózium, Pécs, Magyarország, 2013.)

Helyes Zs., **Scheich B.**, Borbély É., Vincze P., Menghis A., Keeble J., Szolcsányi J.: Krónikus fájdalom és stressz kapcsolatrendszerének komplex vizsgálata egérmodellekben (A Magyarországi Fájdalom Társaság 2014. évi kongresszusa és a IV. Neurostimulációs Szimpózium a Magyar Neurológiai Társaság részvételével, Pécs, 2014.)

Helyes Zs., **Scheich B.**, Horváth Á., Botz B., Tékus V., Czompa A., Ludmerczki R., Pozsgai G., Boros M., Pintér E., Szolcsányi J., Mátyus P.: A tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatorna szerepe és aktivációs mechanizmusa gyulladás és neuropátia egérmodelljeiben (A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Farmakológiai szekciójának IX. szimpoziuma, Velence, 2015.)

Scheich B. A szomatosztatin 4 receptor szerepe krónikus variábilis stressz viselkedésre kifejtett hatásaiban, egérmodellekben (II. Magyar Neuroendokrinológiai Szimpózium, 2015.)

Scheich B. A szomatosztatin 4 receptor szerepe krónikus variábilis stresszre adott viselkedéses és neuroendokrin válaszokban, egérmodellekben (II. Idegtudományi Centrum/Szentágothai János Kutatóközpont PhD és TDK konferencia, 2015.)

Scheich B. The somatostatin 4 receptor is involved in chronic variable mild stress-induced behavioural and neuroendocrine changes in the mouse (*Neuropeptides 2015, Aberdeen, Egyesült Királyság, 2015.*)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Prof. Dr. Helyes Zsuzsannának és Dr. Gaszner Baláznak TDK, majd PhD hallgatóként végzett munkám során nyújtott irányításukért, tanácsaikért és segítségükért. Hálával tartozom nekik lelkes, kitartó és kiváló oktatóként és kutatóként mutatott szakmai és emberi példájukért, közvetlenségükért és támogatásukért, amire mindig számíthattam.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Pintér Erikának, a Doktori Iskola vezetőjének és intézetvezetőnknek kutatómunkám támogatásáért.

Köszönetemet szeretném kifejezni kollégáimnak, Dr. Borbély Évának, Dr. Bölcskei Katának, Dr. Csekő Katának, Dr. Hajna Zsófiának, Dr. Kormos Viktóriának, Dr. Szőke Évának, Dr. Tékus Valériának és volt TDK hallgatónak, Dr. Vincze Patriciának, hogy együtt dolgozhattam velük a dolgozatban bemutatott munkák során. Köszönettel tartozom a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben dolgozó minden kollégámnak és PhD hallgató társamnak, hogy a kutatómunkámat egy szakmailag és emberileg is kiváló közösségben végezhettem.

Hálás vagyok Prof. Dr. Ábrahám Istvánnak és Prof. Dr. Szolcsányi Jánosnak szakmai tanácsaikért és kutatói példamutatásukért. Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Ádori Csabának, Prof. Dr. Csernus Valérnak, Dr. Dénes Ádámnak, Dr. Környei Zsuzsannának és Dr. László Kristófnak munkám során nyújtott segítségükért, értékes szakmai tanácsaikért.

Hálás vagyok Bagoly Teréz, Gógl Katalin, Önböli Dóra és Szentes Nikolett professzionális asszisztensi munkájáért, amellyel hozzájárultak a kísérletek sikerességéhez. Külön köszönetet szeretnék mondani Orbán Izabella szakmai segítségéért, baráti támogatásáért és a jó hangulatú közös munkáért.

Végül szeretném megköszönni Családomnak, elsősorban Szüleimnek és Nővéremnek rengeteg türelmüket, támogatásukat, bátorításukat és szeretetüket, amivel munkámat is segítették.

MELLÉKLET

	Két utas ANOVA					
	Stressz (TST)		J-2156		Interakció	
	F _{1,23}	p	F _{1,23}	p	F _{1,23}	p
dRN	29,59	<0,01	15,15	<0,01	9,68	<0,01
EWcp	10,7	<0,01	3,73	0,066	1,81	0,19
dPAG	62,2	<0,01	7,86	<0,05	11,2	<0,01
IPAG	147,2	<0,01	9,67	<0,01	8,1	<0,01
pPVN	55,2	<0,01	0,37	0,55	0,11	0,75
mPVN	15,85	<0,01	1,2	0,29	4,26	0,051
vLS	42,54	<0,01	19,05	<0,01	22,77	<0,01
dLS	4,83	<0,05	7,14	<0,05	5,45	<0,05
ovNIST	26,6	<0,01	5,16	<0,05	4,73	<0,05
dINIST	22,43	<0,01	4,18	0,053	5,6	<0,05
dmNIST	38,67	<0,01	6,39	<0,05	15,55	<0,01
vNIST	30,52	<0,01	4,76	<0,05	5,07	<0,05
CeA	28,24	<0,01	2,61	0,12	1,49	0,24
BLA	49,67	<0,01	7,27	<0,05	3,72	0,066
MeA	31,84	<0,01	1,14	0,3	1,09	0,31

1. táblázat. A két utas ANOVA eredményeinek összefoglalása, amelyet a TST és a J-2156, ill. interakciójuk Fos immunpozitív sejtmagszámra kifejtett hatásának analizéséhez használtunk a vizsgált agyterületeken.

	Két utas ANOVA					
	Stressz (FST)		Genotípus		Interakció	
	F _{1,18}	p	F _{1,18}	p	F _{1,18}	p
dRN	17,74	<0,01	0,039	0,85	0,68	0,42
EWcp	1,69	0,21	0,009	0,93	0,36	0,56
dPAG	0,27	0,612	4,06	0,059	0,33	0,58
IPAG	9,14	<0,01	3,96	0,062	0,11	0,75
pPVN	356,6	<0,01	1,26	0,28	1,47	0,24
mPVN	261,6	<0,01	2,2	0,16	0,54	0,47
vLS	69,02	<0,01	3,76	0,068	5,03	<0,05
dLS	8,15	<0,05	6,68	<0,05	0,97	0,34
ovNIST	29,78	<0,01	1,45	0,24	2,61	0,12
dINIST	63,19	<0,01	0,84	0,37	1,48	0,24
dmNIST	80,43	<0,01	0,69	0,42	0,036	0,85
vNIST	98,78	<0,01	0,004	0,95	0,1	0,76
CeA	65,58	<0,01	1,87	0,19	6,19	<0,05
BLA	28,70	<0,01	0,98	0,34	0,28	0,61
MeA	26,47	<0,01	0,1	0,76	4,78	<0,05

2. táblázat. A két utas ANOVA eredményeinek összefoglalása, amelyet az FST és az *Sstr4* gén-deléció, ill. interakciójuk Fos immunpozitív sejtmagszámra kifejtett hatásának analizéséhez használtunk a vizsgált agyterületeken (a vLS és a MeA esetében az interakció, a dLS esetében pedig a genotípus ANOVA-val talált szignifikáns hatása ellenére a *post hoc* tesztben nem találtunk különbséget az *Sstr4*^{+/+} és *Sstr4*^{-/-} csoportok között).

		Ismételt mérés két utas ANOVA													
		KVS		Genotípus		Ismétlés		Interakciók							
								KVS* Genotípus		Ismétlés* KVS		Ismétlés* Genotípus		KVS*Genotípus* Ismétlés	
F _{1,34}	p	F _{1,34}	p	F _{1,34}	p	F _{1,34}	p	F _{1,34}	p	F _{1,34}	p	F _{1,34}	p	F _{1,34}	p
SVD	Világos térfélben töltött idő	0,13	0,72	2,25	0,14	0,65	0,43	0,006	0,94	4,38	<0,05	5,79	<0,05	2,07	0,16
	Világosba lépések száma	<0,01	0,99	3,77	0,06	0,34	0,56	0,045	0,83	8,29	<0,01	6,84	<0,05	3,42	0,073
	Világosba lesések száma	0,58	0,45	2	0,17	42,91	<0,01	1,26	0,27	0,48	0,5	0,89	0,35	<0,01	0,98
TST		6	<0,05	0,17	0,68	14,05	<0,01	1,68	0,2	3,49	0,07	5,37	<0,05	8,86	<0,01
FST		0,5	0,49	38,6	<0,01	5,01	<0,05	8,14	<0,01	10,83	<0,01	15,63	<0,01	16,2	<0,01
OFT	Mozgással töltött idő	1,69	0,2	6,68	0,01	47,55	<0,01	0,09	0,77	0,41	0,53	3,87	0,057	1,14	0,29
	Keresztezett négyzetek száma	2,37	0,13	7,47	<0,01	54	<0,01	1,16	0,29	2,06	0,16	2,02	0,17	1,23	0,28
	Középen töltött idő	1,06	0,31	6,31	<0,05	46,13	<0,01	0,67	0,42	0,38	0,54	2,15	0,15	0,08	0,78
SPT		0,55	0,46	4,78	<0,05	3,38	0,08	1,27	0,27	0,91	0,35	0,94	0,34	1,31	0,26

3. táblázat. Az ismételt mérés két utas ANOVA eredményeinek összefoglalása, amelyet a KVS, az *Sstr4* gén-deléció és a tesztek ismétlésének, ill. ezek interakcióinak viselkedésre kifejtett hatásának analizéséhez használtunk az SVD-ben, a TST-ben, az FST-ben, az OFT-ben és az SPT-ben (SPT-ben az ANOVA a genotípus jelentős hatását mutatta, azonban a *post hoc* teszttel nem találtunk különbséget a csoportok között).

		Két utas ANOVA					
		KVS		Genotípus		Interakció	
		F _{1,34}	p	F _{1,34}	p	F _{1,34}	p
SVD	A világos térfélben töltött idő változása	4.38	<0.05	5.79	<0.05	2.07	0.16
	A világosba lépések számának változása	8.29	<0.01	6.84	<0.05	3.42	0.073
	A világosba lesések számának változása	0.48	0.5	0.89	0.35	<0.001	0.98
TST	Az immobilitás változása	3.49	0.07	5.37	<0.05	8.86	<0.01
FST	Az immobilitás változása	10.83	<0.01	15.63	<0.01	16.2	<0.01
OFT	A mozgással töltött idő változása	0.43	0.52	4.12	0.05	1.21	0.28
	A keresztezett négyzetek számának változása	2.06	0.16	2.02	0.17	1.23	0.28
	A középben töltött idő változása	0.41	0.53	2.29	0.14	0.088	0.77
SPT	A szacharóz preferencia változása	0.72	0.4	1.13	0.3	1.14	0.3

4. táblázat. Az két utas ANOVA eredményeinek összefoglalása, amelyet a KVS és az *Sstr4* gén-deléció, ill. ezek interakciójának a viselkedéssparaméterek változására kifejtett hatásának analizéséhez használtunk az SVD-ben, a TST-ben, az FST-ben, az OFT-ben és az SPT-ben.

	Két utas ANOVA					
	KVS		Genotípus		Interakció	
	F _{1,34}	p	F _{1,34}	p	F _{1,34}	p
Relatív mellékvese súly	44.29	<0.01	9.84	<0.01	1.05	0.31
Relatív csecsemőmirigy súly	18.5	<0.01	5.14	<0.05	0.52	0.47
Plazma kortikoszteron	0.27	0.61	12.58	<0.01	0.006	0.94
Testsúly	17.06	<0.01	27.36	<0.01	0.69	0.41

5. táblázat. A két utas ANOVA eredményeinek összefoglalása, amelyet a KVS és az *Sstr4* gén-deléció, ill. ezek interakciójának a neuroendokrin és szomatikus paraméterekre kifejtett hatásának analizéséhez használtunk.

	Két utas ANOVA					
	KVS		Genotípus		Interakció	
	F _{1,34}	p	F _{1,34}	p	F _{1,34}	p
CeA	4.16	<0.05	10.67	<0.01	9.26	<0.01
BLA	2.98	0.094	1.48	0.23	6.44	<0.05
MeA	1.04	0.32	0.14	0.71	0.48	0.49
ovNIST	0.41	0.53	2.12	0.16	1.46	0.24
dINIST	0.55	0.46	2.08	0.16	0.99	0.33
dmNIST	0.98	0.33	3.49	0.072	0.09	0.77
vNIST	0.33	0.57	3.5	0.070	0.64	0.43
CA1	<0.01	0.997	0.16	0.69	1.18	0.29
CA2	0.091	0.77	0.065	0.8	3.51	0.07
CA3	0.006	0.94	0.8	0.38	3.65	0.065
DG	0.74	0.4	1.94	0.17	2.2	0.15
vLS	0.003	0.96	0.008	0.93	5.12	<0.05
dLS	0.11	0.74	0.1	0.75	4.43	<0.05
pPVN	1.56	0.22	2.39	0.13	2.85	0.1
mPVN	0.14	0.72	0.85	0.36	3.92	0.057
dRN	0.91	0.35	3.29	0.079	1.59	0.22
EWcp	2.16	0.15	3.24	0.081	0.24	0.63
dPAG	0.97	0.33	<0.01	0.98	1.02	0.32
IPAG	4.1	0.052	0.39	0.54	0.78	0.38

6. táblázat. A két utas ANOVA eredményeinek összefoglalása, amelyet a KVS és az *Sstr4* gén-deleció, ill. interakciójuk FosB immunpozitív sejtmagszámra kifejtett hatásának analizéséhez használtunk a vizsgált agyterületeken (a vLS és a dLS esetében az ANOVA az interakció szignifikáns hatását mutatta, azonban a *post hoc* tesztben nem találtunk különbséget a csoportok között).

	Két utas ANOVA					
	KRS		RTX		Interakció	
	F _{1,24}	p	F _{1,24}	p	F _{1,24}	p
mPFC	0,65	0,43	0,003	0,96	0,98	0,33
ACC	2,25	0,15	0,17	0,69	0,62	0,44
ovNIST	1,11	0,3	0,057	0,81	<0,01	0,98
dINIST	0,28	0,6	0,032	0,86	0,062	0,81
dmNIST	0,064	0,8	0,039	0,85	0,007	0,94
vNIST	3,08	0,092	0,23	0,64	0,046	0,83
pPVN	0,19	0,66	0,16	0,69	2,97	0,1
mPVN	0,79	0,38	1,13	0,3	0,005	0,95
CeA	0,068	0,8	0,004	0,95	0,32	0,58
BLA	0,16	0,7	0,023	0,88	0,94	0,34
MeA	0,12	0,73	0,085	0,77	2,2	0,15
CA1	0,27	0,61	0,03	0,86	0,68	0,42
CA2	0,045	0,83	1,02	0,32	0,44	0,52
CA3	0,26	0,62	0,003	0,96	0,061	0,81
DG	0,41	0,53	0,29	0,6	0,52	0,48
IPAG	1,93	0,18	0,34	0,57	0,31	0,58
dPAG	0,32	0,58	0,94	0,34	2,81	0,11
RVM	0,95	0,34	0,39	0,54	<0,01	0,99
FHSz	0,29	0,6	0,46	0,51	0,28	0,6

7. táblázat. A két utas ANOVA eredményeinek összefoglalása, amelyet az RTX deszenzibilizáció és a KRS, ill. interakciójuk FosB immunpozitív sejtmagszámra kifejtett hatásának analíziséhez használtunk a vizsgált agyterületeken és a lumbális gerincvelő FHSz-ben.

	Két utas ANOVA					
	KRS		RTX		Interakció	
	F _{1,28}	p	F _{1,28}	p	F _{1,28}	p
IFNγ	0.12	0.73	1.17	0.29	0.96	0.33
IL-1β	0.91	0.35	0.05	0.82	3.99	0.056
IL-4	0.14	0.71	1.73	0.2	0.1	0.75
IL-10	0.49	0.49	0.015	0.91	0.18	0.67
MCP-1	2.41	0.13	1.12	0.3	1.9	0.18
TNFα	0.33	0.57	5.14	<0.05	0.17	0.68
G-CSF	0.035	0.85	0.73	0.4	0.11	0.74
IL-6	0.02	0.89	0.35	0.56	2.44	0.13

8. táblázat. A két utas ANOVA eredményeinek összefoglalása, amelyet az RTX deszenzibilizáció és a KRS, ill. interakciójuk citokin koncentrációkra kifejtett hatásának analízisekor használtunk a hátsó láb szövetekben (a TNF α esetében az ANOVA az RTX szignifikáns hatását mutatta, azonban a *post hoc* tesztben nem találtunk különbséget a csoportok között).