HIPOFÍZIS ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID GÉNHIÁNYOS EGEREK STRESSZADAPTÁCIÓS RENDSZEREINEK VIZSGÁLATA AKUT ÉS KRÓNIKUS MODELLEKBEN

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Gasznerné Dr. Kormos Viktória

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

Témavezető: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Pécs, 2017.

TARTALOMJEGYZÉK

I. Általános bevezetés és irodalmi háttér 6

1. Stressz elméleti alapfogalmak 6

1.1. Stressz 6

1.2. Stresszor 6

1.3. Stresszreakció 7

1.4. A stressz agyi szabályozása 9

2. Stresszhez kapcsolódó betegségek 11

2.1. Depresszió 12

2.1.1. A depresszió farmakológiai aspektusai 13

3. Hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) 14

3.1. PACAP és a stressz rendszerek kapcsolata 15

II. Célkitűzések 18

1. Szorongás és akut stressz-reakció vizsgálata PACAP génhiányos egerekben viselkedési és c-Fos immunhisztokémiai módszerekkel 18

2. PACAP génhiányos egerek vizsgálata krónikus variábilis enyhe stressz modellben viselkedési és funkcionális morfológiai módszerekkel 19

III. Kísérleti modellek, vizsgálati módszerek 20

1. Állatok 20

1.1. Akut stressz modell 20

1.2. Krónikus stressz modell 20

2. Viselkedés-vizsgálatok az akut modellben 21

2.1. *Open field* teszt 21

2.2. Sötét-világos doboz (*light-dark box*) teszt 22

2.3. Üveggolyó-elrejtési (*marble burying*) teszt 23

2.4. *Forced swim* teszt 23

3. c-Fos immunhisztokémia az akut modellben 24

4. Krónikus variábilis enyhe stressz paradigma 26

5. Perfundálás, szövetminta gyűjtés és előkészítés a krónikus modellben 27

6. FosB immunhisztokémia 28

7. *Free-floating* CRF-FosB kettős immunfluoreszcens jelölés 28

8. *Free-floating* Ucn1-FosB kettős immunfluoreszcens jelölés 29

9. *Free floating* 5-HT- FosB kettős immunfluoreszcens jelölés 29

10. Mikroszkópia, digitális képalkotás és morfometria 29
10.1. Akut stressz modell 29
10.2. Krónikus stressz modell 30
11. Az immunfestések kontrolljai a krónikus modellben 31
12. CORT *radioimmunoassay* 32
13. Statisztikai értékelés 32
13.1. Akut stressz modell 32
13.2. Krónikus stressz modell 33
IV. Eredmények 34
1. Szorongás és akut stressz-reakció vizsgálata PACAP génhiányos egerekben viselkedési és c-Fos immunhisztokémiai módszerekkel 34
1.1. Viselkedés-vizsgálatok 34
1.1.1. *Open field* teszt 34
1.1.2. Sötét-világos doboz (*light-dark box*) teszt 35
1.1.3. Üveggolyó-elrejtési (*marble burying*) teszt 37
1.1.4. *Forced swim* teszt 37
1.2. A c-Fos immunhisztokémia 38
1.2.1. Tágabb értelemben vett amygdala magkomplex 38
1.2.2. Nucleus paraventricularis hypothalami 42
1.2.3. Nucleus septi lateralis 43
1.2.4. Centrális projekciójú Edinger-Westphal mag 45
1.2.5. Periaqueductalis szürkeállomány 45
1.2.6. Nucleus raphe dorsalis 48
2. PACAP génhiányos egerek vizsgálata krónikus variábilis enyhe stressz modellben viselkedési és funkcionális morfológiai módszerekkel 50
2.1. A modell validálása 50
2.1.1. Testtömeg változás 50
2.1.2. Mellékvese tömeg 50
2.1.3. Kortikoszteron titer 51
2.1.4. *Forced swim* teszt 51
2.2. FosB neuronális aktivációs mintázat az agyban 54
2.2.1.FosB neuronális aktivációs mintázat a nem kezelt WT és PACAP KO egereknél CMVS hatására 54
2.2.1.1. Tágabb értelemben vett amygdala magkomplex 54
2.2.1.2. Hippocampus 56

2.2.1.3. Nucleus septi lateralis 57
2.2.1.4. Nucleus paraventricularis hypothalami 59
2.2.1.5. Periaqueductalis szürkeállomány 59
2.2.1.6. Centrális projekciójú Edinger-Westphal mag 59
2.2.1.7. Nucleus raphe dorsalis 59
2.2.2. FosB neuronalis aktivációs mintázat imipraminnal vagy vivőanyagával kezelt WT és PACAP KO egereknél CMVS hatására 60
2.2.2.1. Tágabb értelemben vett amygdala magkomplex 60
2.2.2.2. Hippocampus 63
2.2.2.3. Nucleus septi lateralis 63
2.2.2.4. Nucleus paraventricularis hypothalami 63
2.2.2.5. Periaqueductalis szürkeállomány 64
2.2.2.6. Centrális projekciójú Edinger-Westphal mag 65
2.2.2.7. Nucleus raphe dorsalis 65
2.3. CRF-FosB kettős immunfluoreszcens jelölés az BSTov területén 65
2.4. Ucn1-FosB kettős immunfluoreszcens jelölés a EWcp területén 67
2.5. 5-HT- FosB kettős immunfluoreszcens jelölés a DR területén 68
V. Eredményeink összefoglalása, megbeszélése az irodalmi adatok tükrében, következtetések 71
1. Szorongás és akut stressz-reakció vizsgálata PACAP génhiányos egerekben viselkedési és c-Fos immunhisztokémiai módszerekkel 71
1.1. Viselkedés-vizsgálatok 71
1.2. A stressz központok FST kiváltotta aktivációs mintázatának értékelése c-Fos segítségével 73
1.2.1. Általános szempontok 73
1.2.2. Nucleus interstitialis striae terminalis 75
1.2.3. Amygdala magkomplex 75
1.2.4. Nucleus paraventricularis hypothalami 76
1.2.5. Centralis projekciójú Edinger-Westphal mag 76
1.2.6. Periaqueductalis szürkeállomány 76
1.2.7. Nucleus raphe dorsalis 77
1.3. Következtetések 77
2. PACAP génhiányos egerek vizsgálata krónikus variábilis enyhe stressz modellben viselkedési és funkcionális morfológiai módszerekkel 78

2.1. A modell validálása 78
2.2. A FosB neuronális aktivitás mintázata 80
2.3. A PACAP hiánya agyterület és stresszorfüggő módon befolyásolja a FosB expressziót 81
2.4. A PACAP KO egerek CRF neuronjai a BSTov területén nem aktiválódnak CVMS hatására 81
2.5. A PACAP hiány CVMS-ben befolyásolja az urokortinerg EWcp működését 82
2.6. A PACAP mutáns egerekben magasabb a DR idegsejtjeinek szerotonin tartalma 82
2.7. Következtetések 83
VI. Új eredmények összefoglalása 84
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 86
IRODALOMJEGYZÉK 88
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK 102
EGYÉB PUBLIKÁCIÓK 103
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 104
FÜGGELÉK 105

I. Általános bevezetés és irodalmi háttér

A nyugati típusú társadalmakban a hangulatzavarok prevalenciája egyre növekszik: a krónikus munkaképtelenség leggyakoribb oka a major depresszió, mely jelentős szociális és gazdasági terheket ró az egészségügyi ellátórendszerekre (WHO, 2016.). A depresszió komplex neurobiológiája és neurokémiai háttere nem teljesen ismert, és kezelése a több elérhető gyógyszercsoport ellenére sem kielégítő, mivel vannak nem reagáló betegek és a széles mellékhatásspektrum miatt sok esetben nem lehet optimális terápiás stratégiát választani. Szükség van ezért a hatékonyabb terápiás megközelítés érdekében a patofiziológiai mechanizmusok pontos megértésére, kulcsmediátorok és célmolekuláik azonosítására, amelyhez új állatmodellek beállítása és jellemzése elengedhetetlen. Számos neuropeptid rendszerről és azok receptorairól kimutatták, hogy fontos tónusos szabályozó szerepe van a stresszadaptációban állatokban és emberben egyaránt. Klinikai vizsgálatok kezdődtek annak feltárására, hogy az újonnan fejlesztett farmakológiai ágensek, melyek a neuropeptid receptorokat veszik célba, hatékony eszközként vethetők-e be a depresszió kezelésében (Lin 2012., Kormos és Gaszner 2013., Catena-Dell'Osso és mtsai., 2013.).

PhD munkám célja a stresszadaptációs rendszerek vizsgálata akut és krónikus egérmodellekben, mely fontos eredményeket jelenthet a depresszió hátterében álló mechanizmusok megértéséhez és az új terápiás megközelítések meghatározásához.

1. Stresszelméleti alapfogalmak

1.1. Stressz

Selye János, a klasszikus stressz-koncepció megalkotója szerint „a stressz a szervezet nem specifikus válasza bármilyen fenyegető igénybevételre" (1936.). A stressz tágabb értelemben a szervezet univerzális reakciója minden olyan valós, vagy valósnak vélt külső vagy belső fenyegető hatásra, mely a szervezet integritását és egyensúlyát veszélyezteti, és a túlélés érdekében az egyént alkalmazkodásra kényszeríti (McEwen 2000.).

1.2. Stresszor

Stresszoroknak nevezzük azokat az ingereket, melyek a stresszreakciót kiváltják. Jellegét tekintve megkülönböztethetünk fizikai (pl. zaj expozíció, hideghatás, hőártalom, trauma, sugárártalom, láz, fájdalom, vérveszteség, toxikus ártalmak,

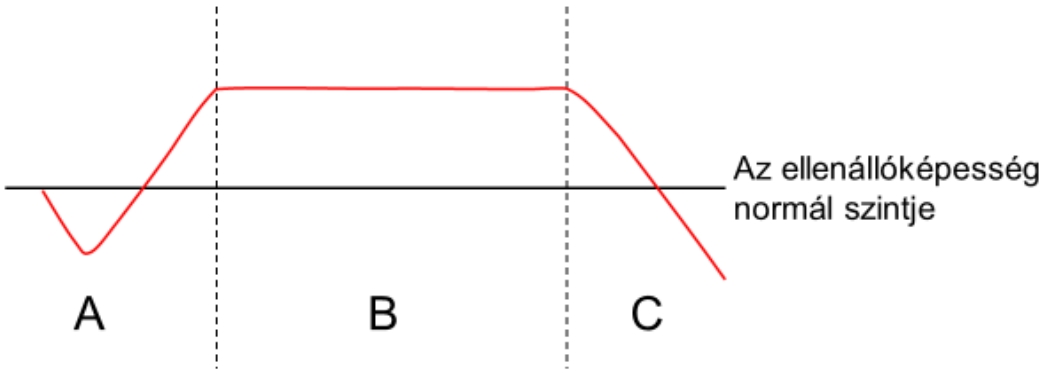
táplálék- és vízmegvonás stb.) és pszichológiai (pl. tömeg, izoláció, félelem, erőszak, gyász, munkahelyi nehézségek, párkapcsolati konfliktusok, egzisztenciális szorongás stb.) stresszorokat. A fizikai stresszorok közvetlen károsító hatásuk miatt azonnali válaszreakciót igényelnek a szervezettől a homeosztázis fenntartásának érdekében, míg a pszichológiai stresszorok esetében nem beszélhetünk direkt károsító hatásokról, az életet valójában nem feltétlenül veszélyeztetik, az egyén azt mégis komoly fenyegetésként éli meg (Carrasco és mtsai., 2003., Ulrich-Lai és mtsai., 2009.). Mivel ugyanaz a stresszor egyénenként különböző mértékű stresszválaszt válthat ki, sőt egyénen belül is változhat a reakció a szervezet pillanatnyi állapotától függően (Seymour 2005.), ezért jelentős kihívást jelent a stressz okozta kórképek terápiája.

1.3. Stresszreakció

A stresszreakció a szervezet stresszorokra adott válasza, típusa függ a stresszor jellegétől (fizikai vagy pszichológiai), minőségétől (diszstressz vagy eustressz), intenzitásától, az egyéni érzékenységtől, az expozíció időtartamától (az akut stressz egyszeri, míg a krónikus stressz ismétlődő vagy folyamatos, elhúzódó stresszhatást jelent), a helyzet kontrollálhatóságának mértékétől és a megküzdési stratégiák sikerességétől.

Az eustressz olyan stresszreakció, melyet pozitívan értékelt stresszor vált ki, időben behatárolt, és bár a szervezetet igénybe veszi, megküzdési képességét nem haladja meg, ellenállóképességét növeli. Ezzel szemben a diszstresszt negatívan értékelt stresszor váltja ki, mely alig kontrollálható, intenzitásától függően hosszútávú fennállása betegségek kialakulásához vezethet.

A stresszreakció időbeli lefolyását az általános adaptációs szindróma fázisaival (Selye 1950. és McEwen 2012.) jellemezhetjük (**1. ábra**).

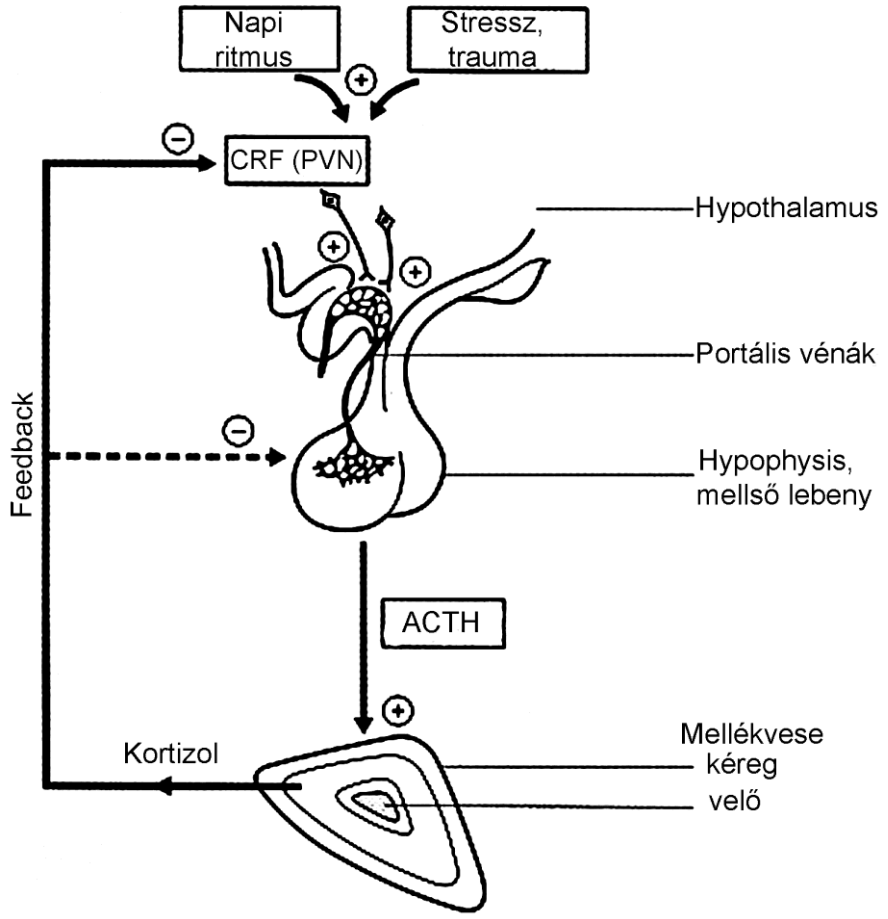


1. ábra: A stresszreakció időbeli lefolyása – az általános adaptációs szindróma fázisai (Selye 1950. és McEwen 2012. alapján) A: vészreakció fázisa, B: rezisztencia fázis, C: kimerülési fázis.

A.) A stresszor felismerését és értékelését a vészreakció követi, mely során olyan energiamobilizáló neuroendokrin változások indulnak, melyek felkészítik a szervezetet az esetleges harcra vagy menekülésre (*fight or flight*). A szimpatikus idegvégződésekből noradrenalin, a mellékvesevelőből adrenalin szabadul fel, ezek hatására pedig gyorsul a légzés és a szívműködés, nő a vérnyomás és a vércukorszint, fokozódik a vázizmok vérellátása, élesednek az érzékszervek, fokozódik az éberség és gyorsulnak a reakciók (Cannon-féle vészreakció). Ezzel párhuzamosan a paraszimpatikus idegrendszer is aktiválódik, mely az ellenregulációért felel, a szimpatikus tónus csökkentésén keresztül. A vészreakciót követően aktiválódik a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely (HPA) (**2. ábra**). A nucleus paraventricularis hypothalami (PVN) parvocelluláris sejtcsoportjából *corticotropin releasing hormone* vagy másnéven *factor* (CRF) és arginin vazopresszin (AVP) szabadul fel, melyek az eminentia mediana-n keresztül a portális keringés révén az adenohipofízis corticotrop sejtjeihez (CRF-1 receptor található rajtuk) jutnak, ahol a pro-opiomelanokortin (POMC) szintézisét serkentik, melyből adrenokortikotrop hormon (ACTH) hasad le. Az ACTH a szisztémás keringés útján a mellékvesekéreg zona fasciculata nevű rétegébe kerül, ahol hatására a glükokortikoidok termelődése fokozódik (emberben legfontosabb a kortizol, rágcsálókban a kortikoszteron, CORT). A glükokortikoidok a véráram útján a célszervekhez jutva fejtik ki komplex hatásukat (metabolizmus fokozása, szív és agy keringésének reguláláa, reprodukció és táplálék felvétel csökkentése, memória és hangulat befolyásolása), és negatív visszacsatolás révén leállítják a stresszválaszt a limbikus rendszeren, a hipothalamuszon és a HPA tengelyen keresztül (Herman és Cullinan 1997., Gaszner 2008., DeKloet 2008., Bonfiglio és mtsai., 2011.). Ezek a változások azt a célt szolgálják, hogy stresszhelyzetben a szervezet képes legyen sikeresen adaptálódni. Ez a fázis átmenetileg az ellenállóképesség csökkenésével jár.

B.) Amennyiben a stresszhatás továbbra is fennáll, kialakul a rezisztencia fázisa, mely során ideális esetben a szervezet az allosztázis (folyamatok összessége, melyek fenntartják a homeosztázist) révén alkalmazkodik a megterheléshez, ellenállóképessége nő (McEwen 1993.). Ezen állapot hosszabb távon nehezen tartható fenn, energia és egyéb forrásigény miatt.

C.) Túl hosszú ideig fennálló és/vagy kezelhetetlen stresszor hatására kialakul a kimerülési fázis, mely során az ellenállóképesség jelentősen csökken (allosztatikus túlterhelés), ez pedig különböző betegségek kialakulásához vezet.



2. ábra: HPA tengely (Nussey és Whitehead 2001. alapján)

1.4. A stressz agyi szabályozása

A stressz hatására aktiválódó perifériás és centrális receptorok az agytörzsbe (locus coeruleus) szállított információn keresztül indítják el a Cannon-féle vészreakciót a szimpato- adrenomedulláris tengely aktivációja révén. Ezzel párhuzamosan afferens pályákon keresztül a limbikus rendszer (amygdala, prefrontális kéreg, hippocampus) és a hipotalamusz felé jut el az információ, melyek a stresszválasz fő szabályozói, a szimpatikus aktivációra, paraszimpatikus aktivációra és a HPA tengelyre kifejtett hatásaik révén (Gaszner 2008., Ulrich-Lai és mtsai., 2009.).

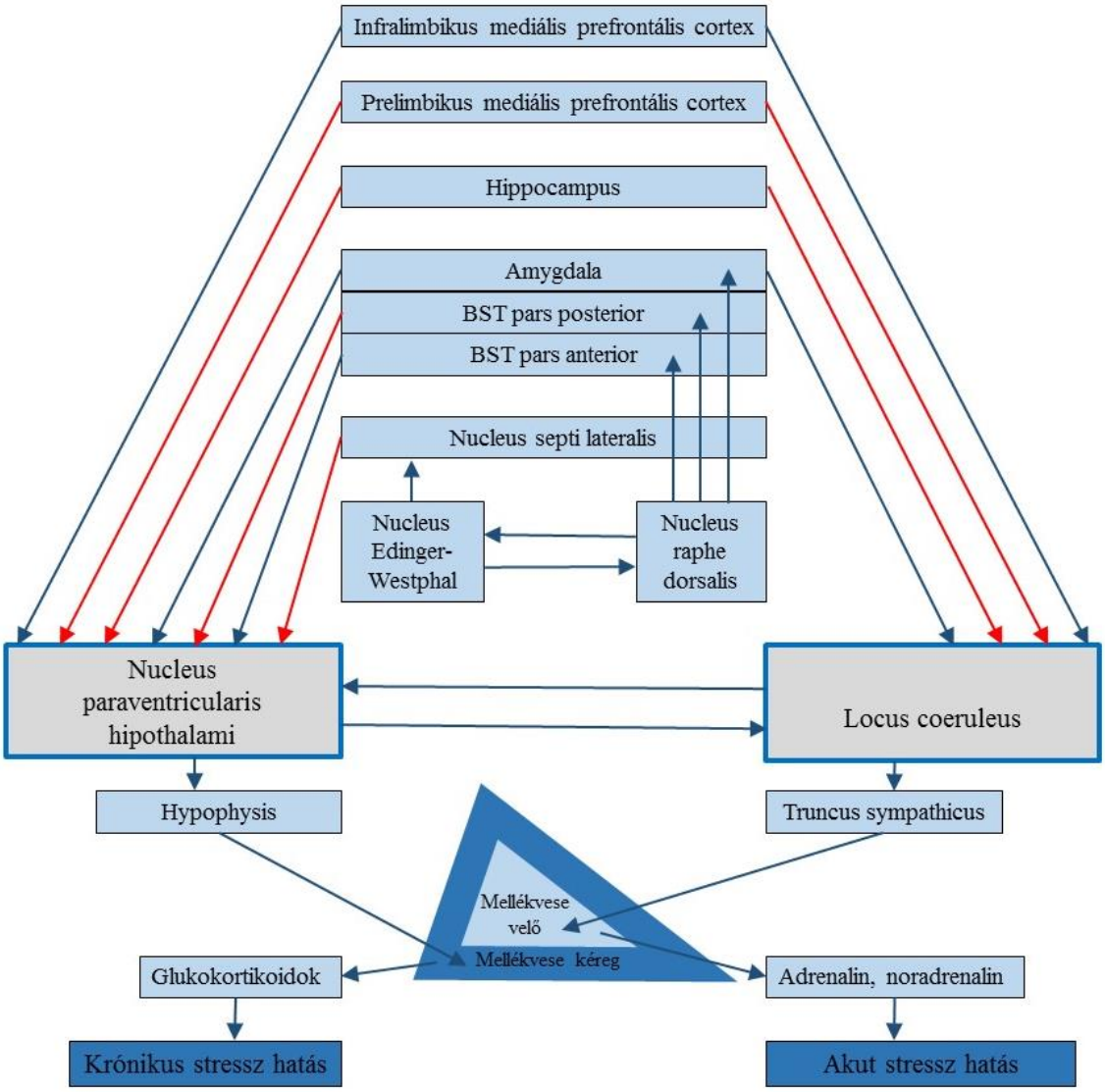
Az amygdala kulcsfontosságú a HPA tengely és az autonóm idegrendszer szabályozása szempontjából. Stressz hatására az amygdala centrális almagja (CeA) aktiválja az autonóm idegrendszert (fizikai és pszichológiai stresszor esetén egyaránt), míg basolateralis (BLA) és medialis (MeA) almagjai a HPA tengelyt (főként pszichológiai stresszor esetén). Az amygdala CRF tartalmú és GABA-erg neuronjai a nucleus

interstitialis striae terminalis-ban (angolul *bed nucleus of the stria terminalis*: BST) átkapcsolva (gátló neuronok gátlása révén) aktiválják a PVN-t (Choi és mtsai., 2007., Ulrich-Lai és mtai., 2009.). A septum laterale (LS) GABA-erg afferentációt küld a PVN neuronjaihoz (Ons és mtsai., 2010., Singewald és mtsai., 2011.).

A mediális prefrontális kéreg (mPFC) prelimbikus része stresszhatás során gátolja a HPA tengely működését és az autonóm aktivációt egyaránt, míg infralimbikus része ezzel épp ellentétes hatású (Choi és mtsai., 2007., Ulrich-Lai és mtsai., 2009.).

A hippocampus csökkenti a fokozott HPA aktivitást, a vérben lévő glükokortikoidok koncentrációját, és a szimpatikus tónust egyaránt (McEwen 2000., de Kloet 2008.).

A hipotalamuszban található PVN a HPA tengely első állomása, gazdag afferentációt kap a limbikus rendszerből, és az agytörzsből. Ilyen agytörzsi központok például a szerotonin (5-HT) tartalmú raphe magok, mint a nucleus raphe dorsalis (DR) (Sawchenko és mtsai., 1983., Liposits és mtsai., 1987., Hornung és mtsai., 2003.) és az urokortin 1 (Ucn1) expresszáló centrális projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp) (Dos Santos és mtsai., 2015.). A PVN az agytörzsi központokon keresztül az autonóm idegrendszer aktivációjában és gátlásában, illetve a paraszimpatikus idegrendszer szabályozásában egyaránt részt vesz (Ulrich Lai és mtsai., 2009.). (**3. ábra**)



3. ábra: A stressz szabályozásának áttekintő vázlata. A kék nyilak a serkentő, a piros nyilak a gátló hatásokat ábrázolják (BST: nucleus interstitialis striae terminalis).

2. Stresszhez kapcsolódó betegségek

Krónikus stressz hatására, amennyiben túl hosszú az adaptációs fázis, a szervezet készültségi reakciója állandósul, és egyensúlyi állapotába visszatérni nehezen, vagy egyáltalán nem képes, kimerülési fázisba lép. A negatív visszacsatolás csökken, a magas glükokortikoid szint állandósul, a locus coeruleus emelkedett noradrenalin szintézise miatt a szimpatikus tónus fokozódik, és az amygdalában fokozódik a CRF expressziója (Ulrich-Lai és mtsai., 2009.). Az amygdalában a dendritek hosszabbodnak és a dendrittüskék száma nő, míg a hippocampusban és a mPFC-ben ennek fordítottját találták (Chattarji és mtsai., 2015.), és ez utóbbit a kognitív funkciók hanyatlása kíséri.

A krónikus stressz számos betegség etiológiai faktora: hipertónia, szívinfarktus, krónikus fejfájás, irritábilis bél szindróma, gyomorfekély, inszomnia, impotencia, pánik

betegség, poszttraumás stressz szindróma, depresszió, a tartósan magas kortizol szint immunszupresszáló hatása miatt infekciók és daganatos betegségek. Dolgozatomban terjedelmi korlátok miatt kizárólag az értekezés szempontjából fontos depressziós kórképet részletezem.

2.1. Depresszió

A depresszió az affektív zavarok közé sorolható kórkép, mely a hangulati élet tartós, negatív irányú eltolódásával jár. Megjelenési formái szerint elkülönítünk unipoláris és bipoláris (mániás epizódokkal kevert) depressziót.

Élettartam prevalenciája 15-25% a nyugati típusú társadalmakban (Kormos és Gaszner 2013.), a betegség által okozott anyagi kár pedig az európai GDP 1%-át teszi ki és a krónikus munkaképtelenség vezető oka (WHO 2016.). A depresszió a pszichológiai, kognitív, vegetatív és szomatikus funkciókat egyaránt érinti. Tünetei szerteágazóak: tartósan negatív érzelmi állapot, hangulatingadozások, szorongás, anhedónia (örömérzésre való képtelenség), csökkent önbizalom, negatív jövőkép, érdeklődés és motiváció csökkenése, koncentrációzavar, feledékenység, bűntudat érzése, öngyilkossági gondolatok, fokozott betegségtudat, munkahelyi teljesítmény csökkenése, szociális aktivitás csökkenése, vegetatív tünetek (inszomnia/hiperszomnia, csökkent/fokozott étvágy, fogyás/hízás, szexuális diszfunkció), és a cirkadián ritmusok (alvás-ébrenlét, testhőmérséklet, hormonszekréció) zavara.

A tünetek hátterében álló neurobiológiai jelenségek közül a teljesség igénye nélkül említésre méltó a noradrenerg, szerotoninerg és dopaminerg rendszer receptorainak funkcióváltozása, a HPA-tengely fokozott működése, magas CRF és plazmakortizol szint, katekolaminok, és metabolitjaik plazma- és liquorkoncentrációjának emelkedése (Carrasco és mtsai., 2003., Meaney és mtsai., 2005., Hillhouse és mtsai., 2006., Hoelsboer és mtsai., 2008., Binder és mtsai., 2010., Kehne és mtsai., 2010.).

Patomehanizmusát klasszikusan a monoamin teóriával magyarázzák, mely szerint a noradrenalin, szerotonin és dopamin neurotranszmitterek alacsony szintje és csökkent felszabadulása felelős a fenti szimptómák kialakulásáért. A tudomány jelen állása szerint azonban, sok egyéb teória (pl.: gyulladásos teória, neuroplaszticitási elmélet) mellett az egyik legelfogadottabb nézet a depresszió három találat elmélete (Mill és mtsai., 2007., deKloet 2008.), mely szerint a depresszió multifaktoriális eredetű betegség, kialakulásához az alábbi három faktor együttes jelenléte szükséges:

1.) Genetikai hajlam: Bizonyos genetikai eltérések növelik a hajlamot a depresszió kialakulására, ilyenek például a pontmutációk, vagy nukleotid polimorfizmusok

a CRF, mineralokortikoid, glükokortikoid, szerotonin és dopamin receptorfehérjék génjeiben (Mill és mtsai., 2007., de Kloet 2008., Olivier és mtsai., 2008., Feder és mtsai., 2009., Bonfiglio és mtsai., 2011., Homberg 2012.).

2.) Epigenetikai faktorok: Bizonyos korai életesemények (pl. anyai stressz, maternális depriváció, gyermekkori abúzusok, közeli hozzátartozó halála, erőszak, trauma) életre szóló epigenomikus változásokat eredményeznek (pl.: DNS-metilációs és acetilációs változások), melyek tovább fokozzák az egyén érzékenységét a későbbi stresszhelyzetekkel szemben, és növelik a depresszió kialakulásának kockázatát (Mill és mtsai., 2007., de Kloet 2008., Heim és mtsai., 2008., Leussis és mtsai., 2012.).

3.) Környezeti stressz: Amennyiben a fent említett rizikófaktorok miatt fokozottan vulnerábilissá vált egyént környezeti stressz éri, nagy valószínűséggel fejlődik ki nála a depressziós kórkép.

2.1.1. A depresszió farmakológiai aspektusai

Számos depresszió modell, a három találat elmélet, valamint az ezek alapján végzett kutatási eredmények messze túlmutatnak a monoaminerg rendszerek kizárólagos kóroki szerepén (Nabeshima és Kim 2013.). A napjainkban rendelkezésre álló farmakoterápia kizárólag ezt a neurotranszmitter csoportot célozza, a monoaminok (szerotonin, noradrenalin, dopamin) preszinaptikus idegvégződésekbe való visszavétele, vagy lebomlásuk gátlása révén. Az alábbi lista röviden összefoglalja a jelenleg használt főbb hatóanyag csoportokat, néhány példával.

1.) Szelektív szerotonin visszavétel gátlók (SSRI): citalopram, fluoxetin, fluvoxamin, paroxetin, sertralin, escitalopram
2.) Triciklikus antidepresszánsok (TCA): clomipramin, maprotilin, imipramin
3.) Reverzibilis monoaminoxidáz-A gátlók (RIMA): moclobemid
4.) Dopamin visszavétel gátlók (DRI): bupropion
5.) Noradrenalin visszavétel gátlók (NRI): reboxetin
6.) Szerotonin receptor antagonista és visszavétel gátlók (SARI): trazodon
7.) Szerotonin-noradrenalin visszavétel gátlók (SNRI): venlafaxin, duloxetin
8.) Szelektív szerotonin visszavétel fokozók (SSRE): tianeptin
9.) Preszinaptikus receptorra ható antidepresszánsok: mianserin, mirtazapin

A gyógyszeres kezelést nehezíti, hogy lassan fejlődik ki a terápiás hatás (2-3 hét), kezdetben elsősorban a mellékhatások jelentkeznek, ami sok esetben akadályozza a

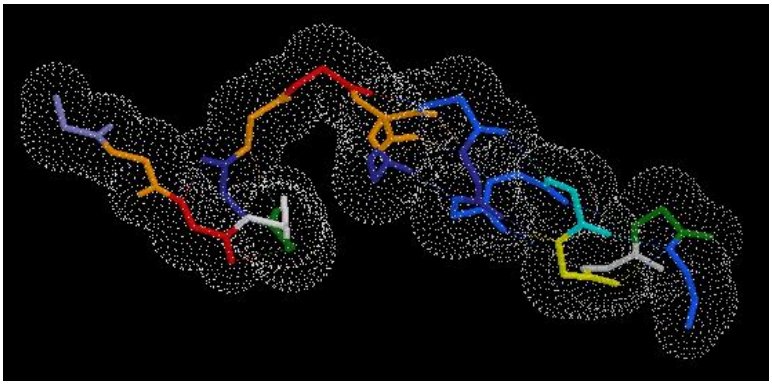
megfelelő együttműködés kialakítását a beteggel, ráadásul megfelelő gyógyszeres kezelés és pszichoterápia mellett is a betegek közel 30%-a terápiarezisztens marad (Catena-Dell'Osso és mtsai., 2013.).

3. Hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)

A PACAP a vazoaktív intesztinális polipeptid (VIP)/szekretin/glukagon család tagja, 27 és 38 aminosavból álló formája ismert. Receptorai közül a PAC1 specifikus a PACAP-ra nézve, míg a VPAC1 és VPAC2 a PACAP-ot és a VIP-t hasonló affinitással köti (Vaudry és mtsai., 2009., Hammack és May 2015.). A PACAP egy pleiotrop neuropeptid, funkcióit számos biológiai folyamatban leírták (Vaudry és mtsai., 2009., Reglődi és mtsai., 2012.), a központi idegrendszerben többek között neurotrop és neuroprotektív hatásokkal rendelkezik (Reglődi 2001., Hammack és mtsai., 2008., Hashimoto és mtsai., 2009.).

A PACAP szerepének tanulmányozására kiválóan alkalmas az Intézetünkben rendelkezésre álló egértörzs, mely a PACAP mutáns alléljeit hordozza (knockout, KO), ezért bennük nem fejeződik ki ez a neuropeptid. Bár ebben az egértörzsben a PACAP funkcióinak gyakorlatilag minden szervrendszerre kiterjedő vizsgálata megtörtént az utóbbi években (Reglődi és mtsai., 2012.), terjedelmi korlátok miatt itt csak a depresszió és a peptid kapcsolatára térnék ki. Irodalmi adatok támasztják alá, hogy ezek az egerek depresszió-szerű viselkedést mutatnak *forced swim* tesztben (FST), és antidepresszáns gyógyszerek visszafordítják ezt a PACAP gén hiányából adódó fenotípust (Hashimoto és mtsai., 2001., 2009.). Mindezek alapján felmerült, hogy ez az állat alkalmas lehet az öröklött depresszió hajlam modellezésére. Ez annak fényében különösen érdekes, hogy Hashimoto és munkatársai (2010.) humán vizsgálatok során megfigyelték, hogy egy a PACAP génre jellemző nukleotid polimorfizmus gyakran jár együtt major depresszióval. Egyéb adatok is alátámasztják a PACAP lehetséges szerepét emberi pszichopatológiákban (Hashimoto és mtsai., 2011.), mivel a PACAP PAC1 receptoron keresztül hatva növeli a DISC1 gén (*disrupted in schizophrenia* 1) expresszióját (Hattori és mtsai., 2007.), melyről kimutatták, hogy mind a skizofrénia (Millar és mtsai., 2000.), mind a major depresszió kialakulásában (Blackwood és mtsai., 2001.) szerepet játszik, továbbá a PACAP (Ressler és mtsai., 2011.) és PAC1 receptor (Almli és mtsai., 2013., Mercer és mtsai., 2016.) génpolimorfizmusok nőkben fontos szerepet játszanak a poszttraumás stressz szindrómák kifejlődésében. A téma fontosságát és népszerűségét jól bizonyítja, hogy az utóbbi években számos rangos folyóiratban jelent meg összefoglaló tanulmány azzal a céllal, hogy megkíséreljék

áttekinteni a PACAP stresszadaptációban betöltött szerepét (Hammack és mtsai., 2010., Pinhasov és mtsai., 2011., Hashimoto és mtsai., 2011., Stroth és mtsai., 2011., Dias és Ressler 2013., Gaszner és Kormos 2013., Hammack és May 2015.). Tekintettel a PhD értekezés terjedelmi korlátaira, az alábbiakban arra térek ki, hogy kutatásunk kezdetén mit tudtunk a PACAP hatásáról a HPA tengelyre, különös tekintettel a PACAP és CRF rendszerek interakcióira, továbbá röviden rávilágítunk a CRF peptidcsaládba tartozó Ucn1 stresszadaptációban betöltött szerepére, és a DR szerotoninerg neuronjainak jelentőségére, mert ezek a területek álltak kísérletsorozatunk középpontjában.



4. ábra: A PACAP szerkezete (http://www.sci.u-toyama.ac.jp)

3.1. PACAP és a stressz rendszerek kapcsolata

A PACAP 1989-ben történt felfedezése után (Miyata és mtsai., 1989.) rövid idő elteltével feltérképezték a neuropeptid központi idegrendszeri eloszlását, és nyilvánvalóvá vált, hogy igen nagy mennyiségben van jelen a PVN-ben (Köves és mtsai., 1991.). Ekkor már jól ismert volt a CRF expressziójának jelentősége ezen a területen (Liposits 1990.), mely azt sugallta, hogy a PACAP-nak lehet szerepe a stresszadaptáció szabályozásában, legalább részben a PVN-CRF neuronok működésének befolyásolása révén. Ennek megfelelően számos laboratóriumban megerősítést nyert, hogy a PACAP agykamrába, illetve közvetlenül a PVN-be injektálva befolyásolja a CRF tartalmú idegsejtek működését. A PACAP hatása több síkon is megjelenik, de leggyakrabban a sejt transzkripciós aktivitásának változását mutató, azonnali génekként indukálódó transzkripciós faktorok marker (pl. c-Fos, Kovács 1998.), illetve azok foszforilált formáinak (CREB) nukleáris immunreaktivitás emelkedését mutatták ki (Agarwal és mtsai., 2005., Norrholm és mtsai., 2005., Das és mtsai., 2007., Kageyama és Suda 2009.). Kiemelendő, hogy a CRF neuronok aktiválódása PACAP hatásra következményes HPA tengely aktiválódást idézett elő.

A PACAP a hipotalamuszon kívül számos egyéb központi idegrendszeri területben előfordul (Köves és mtsai., 1991., Hannibal 2002.). Figyelemre méltó, hogy igen markáns PACAP tartalmú rostafferentációt a limbikus előagyi területen, a tágabb értelemben vett amygdala területén is találhatunk, mint pl. a BST és a CeA területén (Köves és mtsai., 1991., Hannibal 2002.). Érdekes, hogy ezeken a területeken szintén találhatók CRF expresszáló neuronok, melyek itt is PACAP tartalmú afferentációt kapnak (Köves és mtsai., 1994., Kozicz és mtsai., 1997.). A két peptiderg rendszer közötti interakciót Hammack és munkatársai (2009.) is bizonyították krónikus stressz modellben, ahol a PAC1 receptor és a PACAP mRNS szintjének emelkedését találták a BST területén. Továbbá PACAP injekció a BST területén szorongásos viselkedést vált ki, illetve a PAC1 receptor hiánya csökkent szorongási szinteket eredményez (Otto és mtsai., 2001.). A CRF lentivirális vektor segítségével indukált emelkedett expressziója a BST területén kifejezettebb depressziószerű viselkedést okoz (Regev és mtsai., 2011.), mely alátámasztja a PACAP lehetséges moduláló szerepét (Hammack és mtsai., 2010.) a BST-CRF tekintetében. Az is ismert, hogy a krónikus stressz epigenetikai módosulásokat eredményez a *crf* génen a BST területén, melyet megváltozott CRF expresszió kísér (Sterrenburg és mtsai., 2011.).

Tekintettel arra, hogy a tágabb értelemben vett amygdala (Westenbroek és mtsai., 2003., Badowska-Szalewska és mtsai., 2009., Hammack és mtsai., 2010.), és számos egyéb limbikus terület is, mint a LS (Ons és mtsai., 2010., Singewald és mtsai., 2011.) a DR (Sawchenko és mtsai., 1983., Liposits és mtsai., 1987., Hornung és mtsai., 2003.) kapcsolatban állnak a PVN-nel, részt vesznek a HPA tengely aktivitásának szabályozásában. Jól ismert, hogy ezek a régiók szintén jelentős c-Fos expresszió növekedést mutatnak stressz hatására, és PACAP tartalmú rostok beidegzése alatt is állnak (Hannibal 2002.).

A EWcp (Kozicz és mtsai., 2010., Kozicz 2010.) egy CRF rokon neuropeptid, az Ucn1 fő kifejeződési területe a központi idegrendszerben. Az Ucn1 nagy affinitással kötődik a CRF 2-es típusú receptorához, melyen keresztül szorongásoldó funkcióval bír (Vaughan és mtsai., 1995.). Számos agyterület áll a EWcp neuronok beidegzése alatt, de itt csak a LS-t és a DR-t, mint legfontosabb projekciós területeket említjük meg (Bittencourt és mtsai., 1999.), melyek a HPA tengely, és a hangulat szabályozásában játszanak szerepet. Az urokortinerg EWcp a PVN-CRF neuronokhoz hasonlóan, c-Fos expresszió növekedéssel reagál különböző stresszhatásokra patkányokban (Kozicz 2001., Gaszner és mtsai., 2004., 2009., Rouwette és mtsai., 2011.), egerekben (Korosi és mtsai., 2005., Xu és mtsai., 2011.) és mókuscickányokban (Kozicz és mtsai., 2008a.). Az Ucn1

expresszió növekedését találták öngyilkos emberek agymintáiban az EWcp területén, mely arra utal, hogy a magnak szerepe lehet a hangulatzavarok patogenezisében (Kozicz és mtsai., 2008b.). Kiemelendő, hogy erre a magra is jellemző PACAP-ir rostok jelenléte (Hannibal 2002.), melyek juxtapozícióban helyezkednek el az Ucn1 neuronokkal (Kozicz és mtsai., még nem publikált megfigyelés).

A szerotoninerg DR (Valentino és mtsai., 2010.) neuronok szintén erős c-Fos expresszió növekedéssel reagálnak különböző akut (Bouwknecht és mtsai., 2007.) és krónikus stresszhatásokra patkányban (Gardner és mtsai., 2005., Lim és mtsai., 2015.) és egérben (Liu és mtsai., 2009.). Számos állatmodellből és az emberen végzett megfigyelésből származó adat utal arra, hogy a DR szerotoninerg neuronjainak szerepe van a szorongás és a hangulat kontrollálásában (Challis és Berton 2015.), illetve a hangulatzavarok patogenezisében (Kranz és mtsai., 2010.). Érdekes módon a DR területe szintén tartalmaz PACAP-ir rostokat (Hannibal 2002.). További közvetett bizonyíték a PACAP és a szerotoninerg rendszer közötti kapcsolatra az a megfigyelés, miszerint csökkent 5-hidroxi-indolecetsav mennyiséget mértek PACAP KO egerek agyában (Hashimoto és mtsai., 2001.), mely a szerotonin egyik metabolitja.

II. Célkitűzések

1. Szorongás és akut stressz-reakció vizsgálata PACAP génhiányos egerekben viselkedési és c-Fos immunhisztokémiai módszerekkel

Saját megfigyeléseinkre, és ezzel összhangban lévő irodalmi adatokra támaszkodva állítottuk fel hipotézisünket, hogy a PACAP moduláló hatással bír a stresszadaptációban résztvevő agyi központokra, mely befolyásolja a viselkedést és a c-Fos azonnali géntermék megjelenését.

1. Első célkitűzésünk a PACAP-hiányos és vad típusú egerek viselkedési paramétereinek összehasonlítása volt olyan nemzetközileg az alapkutatásban és a gyógyszergyári vizsgálatokban is széles körben alkalmazott magatartási tesztekben, melyek elsősorban a szorongás és depresszió-szerű viselkedés értékelésére szolgálnak.
2. Az irodalomban nem találtunk átfogó morfológiai jellegű tanulmányt arra vonatkozóan, hogy mi jellemző a stressz magok aktivitására PACAP hiány esetén, ezért második célkitűzésünk az volt, hogy feltérképezzük az akut stressz-indukálta neuronális aktivációs mintázatot a c-Fos marker expressziójának vizsgálatával a stressz-reaktív agyterületeken egérben, különös tekintettel azokra, amelyek PACAP-erg rostok beidegzése alatt állnak és/vagy a PACAP receptorait expresszálják. FST-t követően vad és PACAP génhiányos egereken az alább felsorolt területek immunhisztokémiai vizsgálatát végeztük el: a tágabb értelemben vett amygdalában a dorsolateralis (BSTdl), dorsomedialis (BSTdm), ovalis (BSTov) és ventralis (BSTv) BST-t, a centralis (CeA), basolateralis (BLA) és medialis (MeA) amygdala magokat; a PVN parvocellularis (pPVN) és magnocellularis (mPVN) magjait; a ventralis és dorsalis LS-ot; a dorsalis (dPAG) és lateralis (lPAG) periaqueductalis szürkeállományt; az EWcp-t és a DR-t. A stressz központok reaktivitásának feltérképezése lehetőséget nyújt azon agyterületek azonosítására, amelyeket a PACAP hatása befolyásolhat. Így fény derülhet arra is, hogy mely agyi struktúrák felelősek a PACAP-hiányos állatokban megfigyelt viselkedésbeli különbségekért, továbbá tágabb ismeretekre tehetünk szert a PACAP stressz(mal)adaptációban betöltött szerepéről is.

2. PACAP génhiányos egerek vizsgálata krónikus variábilis enyhe stressz modellben viselkedési és funkcionális morfológiai módszerekkel

1. Annak érdekében, hogy tisztázzuk, hogy a PACAP hiány hogyan modulálja a krónikus stresszhez való adaptációt, első célkitűzésünk volt a PACAP KO egerek tesztelése két héten át tartó krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) depresszió modellben vad típusú társaikkal összehasonlítva.
2. Második célkitűzésünk a triciklikus antidepresszáns imipraminnal kezelt csoportok összehasonlítása volt a vivőanyaggal kezelt kontroll csoportokkal, a CVMS okozta hatások visszafordíthatóságának értékelésére.

A modell validitásának megítélése viselkedés vizsgálati (FST), fizikai (testsúly és mellékvesetömeg változás mérése), endokrinológiai (CORT titer mérése) és funkcionális-morfológiai módszerekkel történt. A stressz krónikus hatásának vizsgálatára a krónikus neuronális aktivációt jelző FosB festést alkalmaztuk az alábbi limbikus PACAP tartalmú területeken: CeA, MeA, BLA, BSTdm, BSTdl, BSTov, BSTv, a hippocampus CA1, CA3 régiói és a gyrus dentatus (DG), a dLS és a vLS. Mivel ezek a területek és a PACAP is befolyásolhatja a PVN parvo- és magnocellularis részének stresszre adott válaszát, a FosB kvantifikációt itt is elvégeztük. További célunk volt a FosB expresszió vizsgálata a szorongásos viselkedéssel összefüggő dPAG és a leszálló antinociceptiv rendszerben részt vevő lPAG területén szintén jelentős PACAP-erg beidegzésük alapján, továbbá a DR és a EWcp területén is. Második lépésben szemikvantitatív kettős immunfluoreszcens jelölések segítségével vizsgáltuk a BSTov-CRF, EWcp-Ucn1, illetve a DR-5-HT rendszerek működését és FosB aktivitását.

III. Kísérleti modellek, vizsgálati módszerek

1. Állatok

1.1. Akut stressz modell

Akut kísérleteinkben 38 darab CD1 törzsbe tartozó, hím PACAP KO egeret vizsgáltunk, összehasonlítva ugyanennyi vad típusú (WT) egérrel. Az állatok heterozigóta tenyészegyedeit Prof. H. Hashimoto munkacsoportja állította elő CD1 törzsben az Osakai Orvostudományi Egyetemen (Hashimoto és mtsai., 2006.) és kollaboráció keretében bocsátotta rendelkezésünkre. A tíz generáción keresztül CD1 törzzsel visszakeresztezett heterozigóta egereket a Pécsi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet állatházában szaporították. Az első generáció utódait polimeráz láncreakció (PCR) módszerével genotipizálták, és a WT és KO egyedeket külön válogatták. A további tenyésztés homozigóta vad típusú és KO vonalakon elkülönítve történt, a genotípus ellenőrzését a további generációkban is elvégezték PCR-ral. A kísérleteinkben szereplő egyedek az első három homozigóta KO generációból származtak.

Az anyai gondoskodás minőségéből adódó esetleges különbségek minimalizálására törekedve, a csoportok egyedeit 4-5 különböző alomból válogattuk össze. Bár a PACAP gén hiánya önmagában nem befolyásolja az anyai gondoskodás minőségét (Shintani és mtsai., 2002.), közvetve, a kisebb alomméret miatt, hatással van rá.

Az állatokat a Pécsi Tudományegyetem Anatómiai Intézet Állatházában standard műanyag ketrecben (365 mm × 207 mm × 144 mm), 12 órás nappali-éjszakai ciklusban tartottuk, 24-25 °C fokon, *ad libitum* ellátva ivóvízzel és rágcsáló táppal.

Kísérleteinket a Pécsi Tudományegyetem Állat Etikai Bizottság engedélyével (Engedélyszámok: BA 02/2000-11-2006, BA 02/2000/25/2011) és az Európai Közösség 1986. november 24-én kelt ajánlásait, továbbá az állatok tartásáról és felhasználásáról szóló 1998. évi XXCIII törvényt minden tekintetben betartva végeztük. Minden esetben törekedtünk az állatok szenvedésének és létszámának minimalizálására.

1.2. Krónikus stressz modell

A tíz generáción keresztül CD1 törzzsel visszakeresztezett PACAP génre nézve heterozigóta egereket szaporítottuk, genotipizáltuk. Ezután PACAP KO és vad típusú egerek pároztatása útján egy heterozigóta generációt hoztunk létre, majd 70 PACAP

heterozigóta nőstény egeret pároztattunk PACAP heterozigóta hímekkel. Kísérleteinkhez azon almokat választottuk ki, melyek egy 36 órás perióduson belül születtek, majd ezekből genotipizálás után 36 felnőtt hím PACAP KO egeret, és 33 vad típusú hím egeret válogattunk ki. Az állatokat 12 csoportba osztottuk (**1. táblázat**). Az almok közti különbségek elkerülése érdekében 4-5 különböző alomból válogattuk össze a különböző csoportok egyedeit. Az állatok felénél 14 napon keresztül CVMS-t alkalmaztunk, a másik felénél csak egy egyszeri 5 perces FST-et végeztünk 10 nappal a perfúzió előtt. Minden fő csoporton belül az állatok harmadát kezeletlenül hagytuk, harmadát intraperitoneálisan (i.p.) adott vivőanyaggal (fiziológiás sóoldat), harmadát pedig i.p. adott imipraminnal (naponta 15mg/testtömeg kg) kezeltük. A kísérlet során 6 egyedet zártunk ki betegség vagy elhullás miatt. Mivel eredményeink szerint az állatok kézbe vétele (*handling*) és/vagy az i.p. injekció növeli adataink szórását, a kezeletlen csoportot külön statisztikai analízisnek vetettük alá (**1. táblázat**).

Az állatok eredete, gondozása, genotipizálása és az etikai vonatkozások megegyeznek a 2.1.1. szakaszban leírtakkal.

1. adathalmaz					2. adathalmaz							
Kontroll		CVMS			Kontroll				CVMS			
Kezeletlen		Kezeletlen			Vivőanyag		Imipramin		Vivőanyag		Imipramin	
WT	KO	WT	KO		WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO
n=6	n=5	n=6	n=5		n=6	n=5	n=4	n=6	n=5	n=4	n=6	n=5

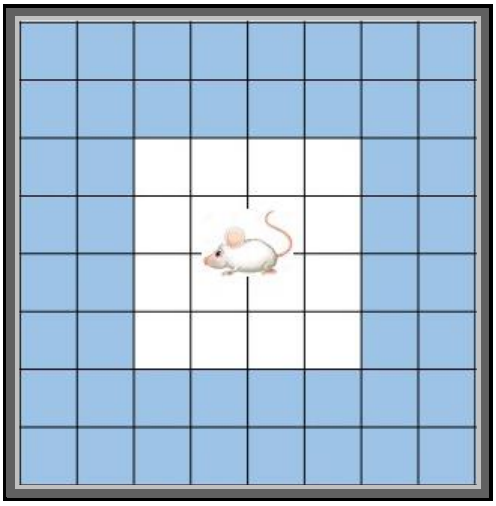
1. táblázat: A krónikus modell kísérleti elrendezésének összefoglalója a csoportok elemszámával. Az 1. adathalmaz az injekciós kezelésben nem részesült csoportok eredményeit tartalmazza. A 2. adathalmaz olyan egerek adatait tartalmazza, amelyek egy további, az intraperitoneális injekciók (imipramin illetve vivőanyaga) által okozott stresszfaktornak is ki voltak téve. CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz; WT: vad típus, KO: a PACAP génhiányos egér

2. Viselkedés-vizsgálatok az akut modellben

2.1. *Open field* teszt

A teszt az állatok lokomotoros aktivitásának és szorongási szintjének vizsgálatára szolgál. Az egereket (n=7/csoport) minden esetben egyesével vizsgáltuk, és ugyanabba a pozícióba helyeztük őket egy meghatározott paraméterekkel rendelkező doboz

(42x42x21 cm, alapterülete négyzethálóval 8x8 részre osztott) közepére, melyben az állatok szabadon mozoghattak **(5. ábra**). Viselkedésüket 5 percen keresztül figyeltük és video kamerával rögzítettünk. A felvételek kiértékelése során a lokomotoros aktivitást (megtett út, mozgással töltött idő), és a szorongási szintet (a fal mellett, illetve a nyílt területen töltött idő, fej emelgetések, ágaskodások, ugrások és tisztálkodások száma) vizsgáltuk. (Kudryavtseva és mtsai., 1991. alapján módosítva)



5. ábra: *Open field* teszt

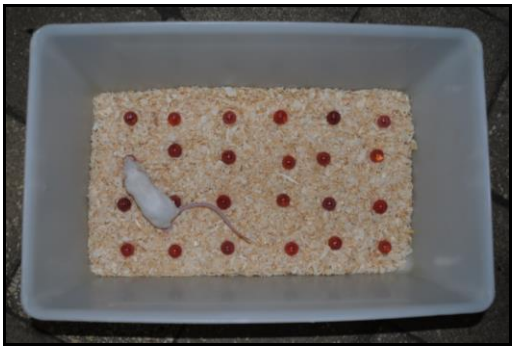
2.2. Sötét-világos doboz (*light-dark box*) teszt

A teszt a szorongás mértékének vizsgálatára szolgál. A teszt során egy olyan dobozt (40×20×27 cm) használtunk, mely két kompartmentre osztott, az egyik sötét, fénytől teljesen elzárt, míg a másik egy 100 W-os izzó által megvilágított rekesz. Az egerek számára a két térfél közötti szabad átjárást egy 16 cm^2 területű nyílás biztosította (**6. ábra**). Az egereket (n=12/csoport) minden esetben egyesével vizsgálva a világos kompartmentbe helyeztük, fejjel a nyílás felé, majd 5 percen keresztül figyeltük viselkedésüket. Detektáltuk a sötét térfélre való első belépésig eltelt időt, a sötét kompartmentbe történő összes belépés számát, a vizsgálat alatt a sötétben töltött teljes időt, valamint a világos térfélre való kitekintések számát. A sötétben való tartózkodás ideje egyenesen arányos a szorongás szintjével. A kísérleteket délelőtt 8 és 12 óra közötti időszakban végeztük a cirkadián ritmus befolyásának kivédése érdekében. (Ihne és mtsai., 2012.)

6. ábra: *Light-dark box* teszt

2.3. Üveggolyó-elrejtési (*marble burying*) teszt

A teszt szintén a szorongás mértékének vizsgálatára szolgál. A kísérletekhez egy 30×30×28 cm-es állattartó ketrecben, melyben sem táplálék, sem ivóvíz nem volt elérhető, 5 cm vastagságú forgács rétegre, 24 darab 1,5 cm átmérőjű színes üveggolyót helyeztünk, egymástól egyenlő távolságra (**7. ábra**). Az egereket (n=12/csoport) egyesével vizsgálva a doboz közepére helyeztük, fejjel ugyanabba az irányba. 30 perc elteltével megszámoltuk, hogy az egér hány üveggolyót temetett el a forgácsalomba. Mivel az egér számára az üveggolyó ismeretlen tárgy, ami vélhetően félelmet kelt benne, azokat részben elássa. Az eltemetett golyók száma arányos a szorongás szintjével. Minden olyan üveggolyó elásottnak minősül, amelynek legalább 2/3 részét forgács borítja. (Njung'e és Handley 1991.)



7. ábra: *Marble burying* teszt

2.4. *Forced swim* teszt

A FST a depressziós magatartás vizsgálatára szolgál (Porsolt és mtsai., 1977., Ghasemi és mtsai., 2009.). A teszthez 11,5 cm átmérőjű, 25 cm magas átlátszó műanyag

hengereket használtunk, melyeket 19 cm magasságig 23 ± 1°C fokos csapvízzel töltöttünk fel (**8. ábra**). Az egereket (n=7/csoport) egyesével a vízbe helyeztük, és 6 percen keresztül videokamerával rögzítettük viselkedésüket. A vizet minden egér után tisztára cseréltük. A felvételek kiértékelése során az immobilitással (a kezdetben aktívan kapálódzó, menekülni vágyó állat később részben passzívan lebeg a víz tetején) töltött időt mértük a teszt utolsó 4 percében, mely egyenesen arányos az anhedónia szintjével, ami a depresszió-szerű viselkedés mértékének fontos paramétere. Akut kísérleteinknél előzőleg nem alkalmaztunk adaptációt, az állatok először találkoztak az említett kísérleti elrendezéssel, számunkra ugyanis az akut stressz hatás által kiváltott c-Fos expresszió mértéke szolgált releváns információként.

8. ábra: *Forced swim* teszt

3. c-Fos immunhisztokémia az akut modellben

Az idegtudományban általános elfogadott, hogy a neuronok aktivációját azonnali gének termékeinek megjelenése jelzi. Ilyen gén a c-fos, melynek fehérje terméke a c-Fos a sejtmagban halmozódva, akut neuronális aktivációs markerként szolgál (Kovács 1998.).

A c-Fos expresszió akut stressz hatására 20 percen belül indul el, 2 óra elteltével éri el maximumát, majd 4 óra múltán kezd csökkenni, ezért az akut modellnél az egereket (n=6/csoport) 2 órával a FST után perfundáltuk a szövettani vizsgálathoz. Kontrollként intakt, FST-en át nem esett WT és KO egereket (n=6/csoport) vizsgáltunk. A mély altatásához intraperitoneálisan adott nátrium-pentobarbitalt (Nembutal 100 mg/testsúly kg; Sanofi, Budapest, Hungary) alkalmaztunk. Az altatószer beadását követően 2-3 perc alatt állt be a narkózis, ezután feltártuk a mellkast, és transzkardiális perfundálást végeztünk 20 ml 0.1 M nátrium-foszfát által pufferelt fiziológiás sóoldattal (PBS; pH 7.4) 2 percig, majd 150 ml hideg 0.2 M Millonig pufferben oldott 4%-os

paraformaldehiddel (pH 7.4) 20 percig. Az egereket dekapitáltuk, ezt követően agyukat kipreparáltuk, melyeket 12 órán át ugyanilyen oldatban posztfixáltunk.

Az agyakat koronális síkban 30 µm vastagságú szeletekre metszettük Lancer Vibratom (Ted Pella Inc., Redding, CA, USA) segítségével. Egyedenként négy sorozatot készítettünk, melyből egyet feldolgoztunk c-Fos immunhisztokémiai vizsgálathoz, hármat pedig *anti-freeze* oldatban (30% glicerin, 20% etilén-glikol és 0.1 M PBS) -20 C° fokon tároltunk, esetleges későbbi vizsgálatok céljára. Az immunhisztokémiához *free-floating* technikát alkalmaztunk. A metszeteket PBS oldatban 3x10 percen keresztül mostuk, ezt követően 30 percen át inkubálást végeztünk 0.5% Triton X-100 (Sigma Chemical) detergenssel, az aspecifikus kötőhelyek blokkolásához pedig 2% normál kecske szérumot (NGS, Jackson Immunoresearch Europe Ltd., Suffolk, UK) tartalmazó PBS oldatot (blokkoló szérum) használtunk 30 percig. A mintákat ezután szobahőmérsékleten egy éjszakán át inkubáltuk c-Fos ellen nyúlban termeltetett poliklonális antiszérum (Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-52, Santa Cruz, CA, USA) 1:500 arányban higított oldatában egy éjszakára, szobahőn. Másnap PBS oldattal 3x10 percen keresztül mostuk a metszeteket, ezt követően a blokkoló szérum és a biotinilált kecske anti-nyúl IgG 1:200 arányú oldatában inkubáltuk 2 órán át, 20 C° fokon. A mintákat hideg PBS-sel öblítettük, majd avidin-biotin-komplex oldatában (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) inkubáltuk 1 órán keresztül 20 C° fokon, majd 3x10 percig mostuk PBS-ben. Végül az előhívást Tris pufferben oldott 0.02% diaminobenzidinnel (DAB; D5637; Sigma Chemical, Zwijndrecht, Hollandia) végeztük 0.00003v/v% H_2O_2 jelenlétében. A reakció során keletkező szabadgyökök hatására a DAB oxidálódik, és az így kialakuló barna színű csapadék megjelenik a sejtek magjában. A színreakciót sztereomikroszkóp segítségével követtük az optimális kontrasztháttér megjelenéséig (10 percen keresztül) majd PBS segítségével állítottuk le. 3x10 perc PBS-sel történő mosás után az agyszeleteket zselatinos tárgylemezre húztuk, majd száradást követően 2x10 perc xilolban történő derítés után DePex-szel (Fluka, Heidelberg, Germany) lefedtük.

A nyúlban termeltetett c-Fos elleni poliklonális antiszérumot (Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-52, Santa Cruz, CA, USA) az emberi c-Fos fehérje 3-16. aminosav szekvenciájának epitópjai ellen termeltették. Korábbi munkáinkkal összhangban (Gaszner és mtsai., 2007., 2009.) kimerítéses teszttel kimutattuk a szérum specificitását azzal a blokkoló peptiddel (sc-52-P, Santa Cruz), amely ellen a szérumot termeltették. Korábbi tanulmányok igazolták továbbá, hogy a szérum nem mutat keresztreaktivitást egyéb Fos-rokon géntermékekkel az egéragyban (Ryabinin és mtsai.,

1999.). Az antitest festés előtti inkubálása a blokkoló peptid jelenlétében minden esetben megakadályozta értékelhető jel megjelenését a festések során. Ezzel összhangban, az antitest elhagyása, vagy a c-Fos szérum normál szérummal történő helyettesítése meggátolta az immunjel megjelenését. A gyártó honlapján elérhető információ szerint (http://datasheaths.scbt.com/sc-52.pdf) a szérum specificitása Western blottal is kimutatható.

4. Krónikus variábilis enyhe stressz paradigma

A CVMS modell (Willner 2005.) esetében két héten keresztül naponta különböző napközbeni és éjszakai stresszoroknak tettük ki az állatokat (**2. táblázat**).

A napközbeni erősebb mértékű, de rövid ideig tartó stresszort 10:00 és 14:00 óra közötti periódusban alkalmaztuk:

- A ferde ketrec stressz esetében a ketreceket 45°-os szögben rögzítettük.
- A rázó stressz alkalmával az egereket laboratóriumi keverő asztalra helyeztük (60/perc frekvenciájú 3 cm átmérőjű körmozgás).
- A „*restraint*” stressz során az állatokat egy 25 mm átmérőjű műagyag perforált csőbe zártuk, melynek kúpos vége nyitott kialakítású.

Az éjszakai enyhébb mértékű, de hosszabb időtartamú stresszort 18:00 és másnap 7:00 óra közötti időszakban alkalmaztuk:

- A szociális izolációs stressz esetén az egereket egyesével külön ketrecbe szeparáltuk.
- A nedves alom stressz alkalmával a ketrecben lévő forgácsot 150 ml csapvízzel benedvesítettük.
- A *„group holding”* esetében nem alkalmaztunk stresszort, hanem normál állatházi körülmények között tartottuk az állatokat.

A napközbeni és az éjszakai stressz után az egyedeket minden esetben az eredeti ketrecükbe és csoportjukba helyeztük vissza. A stresszhez való adaptáció minimalizálásának érdekében a különböző stresszorokat random módon váltogattuk.

Az egerek testsúlyát az első és a hetedik napon a szokásos alomcsere alkalmával mértük. Az utolsó mérést a 15. napon végeztük az anesztéziát követően, a perfúzió előtt.

A stresszelt csoportok egyedeit a CVMS protokoll 14. napján 5 percen át tartó FST-nek vetettük alá, melynek részletei megegyeznek a 2.2.4. fejezetben taglaltakkal. Hogy a FST akut hatásai ne befolyásolják a kontrolljainkat, a nem stresszelt csoportok tagjait 10 nappal a perfúzió előtt tettük ki az 5 percen át tartó FST-nek. A lehetséges krónikus hatásokat elkerülendő, az egereket egyszeri FST-nek vetettük alá, előtesztelés

nélkül. A teszt után az állatokat megszárítottuk, és az eredeti ketrecükbe helyeztük vissza.

Napok	Nappali stresszor	Éjszakai stresszor
1.	Ferde ketrec (2 óra)	Szociális izoláció
2.	Rázó (2 óra, 60/min)	Nincs stressz (*group holding*)
3.	*Restraint* (30 perc)	Nedves alom
4.	Rázó (2 óra, 60/min)	Nincs stressz (*group holding*)
5.	Ferde ketrec (2 óra)	Nedves alom
6.	*Restraint* (30 perc)	Szociális izoláció
7.	*Restraint* (30 perc)	Szociális izoláció
8.	Rázó (2 óra, 60/min)	Nincs stressz (*group holding*)
9.	Ferde ketrec (1 óra)	Nedves alom
10.	Restraint (60 perc)	Szociális izoláció
11.	Rázó (1 óra, 60/min)	Nincs stressz (*group holding*)
12.	*Restraint* (30 perc)	Szociális izoláció
13.	Ferde ketrec (90 perc)	Nincs stressz (*group holding*)
14.	Forced swim teszt	Nedves alom

2. táblázat: A krónikus variábilis enyhe stressz protokoll összefoglalója. (Éjszakai stresszt a 2., 4., 8., 11., és 13. napon nem alkalmaztunk, melyet a nemzetközi irodalom "*group holding*"-ként határoz meg, utalva arra, hogy az állatokat ekkor nem izoláljuk.)

5. Perfundálás, szövetminta gyűjtés és előkészítés a krónikus modellben

A CVMS protokoll 15. napján, a szokásos forgács csere után, a 10:00 és 11:00 óra közötti időszakban az egereknél i.p. adott uretánnal (2.4 g/kg) anesztéziát végeztünk.

Az ugyanazon ketrecben tartott egyedek mindegyike 2 percen belül öntudatlan állapotba került. Testtömegmérés után minden egyednél megnyitottuk a mellkast, és a bal

kamrából injekciós fecskendő segítségével 1 ml vért gyűjtöttünk össze, melyet 50µl 7.5 m/m%-os EDTA-val (Sigma, Zwijndrecht, Hollandia) előtöltött, hűtött csövekbe helyeztünk.

Az állatok perfundálásának módszere a 2.3. fejezetben leírtakkal megegyezik, kivéve hogy az agyak posztfixálását 72 órán át végeztük.

A vérmintákat 3000/perces fordulatszámon 5 percig centrifugáltuk. A plazma felülúszót összegyűjtöttük, és -20°C-on tartottuk 40 µl-es egységekben a CORT *radioimmunoassay* mérésig.

Mindkét mellékvesét eltávolítottuk és tömegüket lemértük (Sartorius AG, Göttingen, Németország), majd az adatokat az állat testtömegére vonatkoztattuk.

A szövetminták előkészítése az immunhisztokémiához megegyezik a 2.3. fejezetben leírtakkal, kivéve hogy a metszést Leica VS1000 vibratommal (Leica Biosystems, Wetzlar, Németország) végeztük.

6. FosB immunhisztokémia

Az eljárás lényegi lépéseit illetően megegyezik a 2.3. fejezetben leírt c-Fos immunhisztokémiával, ezért itt csak az attól eltérő lépések tényszerű felsorolására szorítkozom: az *anti freeze* oldat kimosására a mintákat 60 percig mostuk PBS-ben. A blokkolás NGS-ben 60 percig tartott. Az elsődleges szérum nyúlban termeltetett anti-FosB antitesteket (Santa Cruz, sc-48 Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) tartalmazott. Az ABC-kit oldatait 60 percig alkalmaztuk, a reakció előhívása 7 percet vett igénybe. (Nestler és mtsai., 1999., Perrotti és mtsai., 2004., Sterrenburg és mtsai., 2011., Vialou és mtsai., 2015.)

7. *Free-floating* CRF-FosB kettős immunfluoreszcens jelölés

Az ovBST területén elhelyezkedő CRF neuronok aktivitásának meghatározásához a metszeteket PBS-sel mostuk 6 × 10 percig, majd 60 percig tartó 0.5%-os Triton X-100 kezelés után 5%-os normál szamár szérum (NDS) (Jackson) PBS oldatába helyeztük őket 60 percre. Ezt követően a metszeteket 72 órán keresztül inkubáltuk 4˚C-on a primer antitesteket tartalmazó NDS-ban oldott keverékében, mely poliklonális nyúl anti-FosB (1:250, Santa Cruz, sc-48 Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) és kecske anti-CRF (1:150, Santa Cruz, sc-1759) antitesteket tartalmazott. 2×15 perces PBS-sel való mosást követően a metszeteket Cy3 konjugált szamár anti-nyúl (1:800, Jackson) és biotinilált szamár anti-kecske (1:1000, Jackson) antitesteket és 5%

NDS-t tartalmazó PBS oldatba helyeztük 4˚C-on 24 órára. 2×15 perc PBS-ben való mosás után, a metszeteket Cy5-konjugált streptavidin (1:1000) PBS (Jackson) oldatában inkubáltuk 3 órán keresztül, melyet 2×15 perc mosás követett PBS-ben, ezután a metszeteket zselatinos tárgylemezekre húztuk, és szobahőmérsékleten való szárítás után glicerin-PBS 1:1 arányú oldatával fedtük.

8. *Free-floating* Ucn1-FosB kettős immunfluoreszcens jelölés

Az Ucn1 neuronok aktivitásának meghatározásához a középagy területéről a colliculus superior síkjából válogatott metszeteket PBS-sel mostuk 6 × 10 percig, majd 60 percig tartó 0.5%-os Triton X-100 kezelés után, 2%-os NDS (Jackson) oldatba helyeztük 60 percig. Ezt követően a metszeteket 48 órán keresztül inkubáltuk 4˚C-on a primer antitesteket tartalmazó NDS-ban oldott keverékében, mely poliklonális nyúl anti-FosB (1:250, Santa Cruz, sc-48) és kecske anti-Ucn1 (1:175, Santa Cruz, sc-1825) antitesteket tartalmazott. 2×15 perc PBS-sel mosást követően a metszeteket fluorofór-jelölt szekunder antitestek oldatának keverékébe helyeztük 24 órára, mely Alexa Fluor 488-konjugált szamár anti-kecske (1:200, Jackson) és Cy3 konjugált szamár anti-nyúl (1:800, Jackson) antitesteket tartalmazott PBS-ben. 2×15 perc PBS mosást követően, a metszetek felhúzása, szárítása és fedése következett a CRF-FosB jelölésnél leírt módon.

9. *Free floating* 5-HT- FosB kettős immunfluoreszcens jelölés

A DR kettős jelöléséhez a középagy területéről a colliculus inferior síkjából válogattuk a metszeteket. A jelölés menete megegyezik a fent említett Ucn1-FosB jelölésnél leírtakkal, kivéve hogy primer antitestként monoklonális egér anti-5-HT (1:10.000, ajándék Dr. Lucienne Légertől, Université Claude Bernard, Lyon, France), szekunder antitestként pedig Alexa 488 konjugált szamár anti-egér (1:200, Jackson) antitesteket használtunk.

10. Mikroszkópia, digitális képalkotás és morfometria

10.1. Akut stressz modell

Metszeteinkről digitális fotókat készítettünk *Nikon Microphot FXA* mikroszkóp és *Spot RT color* digitális kamera (Nikon, Tokyo, Japán) segítségével. Állatonként öt különböző síkból származó metszeten számoltuk meg a c-Fos pozitív idegsejteket *Image J* képanalizáló program (*version* 1.37, NIH, Bethesda, MD, USA) segítségével, az eredeti

fotók felhasználásával úgy, hogy az objektivitás érdekében a számlálás időpontjában az adott állat illetve szövettani preparátum csoportbeli hovatartozását nem ismertük. A reprezentatív fotókat szürkeárnyalatossá tettük, és az optimális kontraszt eléréséhez *Photoshop* 7.0.1 szoftver (Adobe, San Jose, CA, USA) segítségével korrigáltuk. A következő agyterületeket vizsgáltuk a Paxinos és Franklin (2003.) által kiadott atlasz alapján: CeA, BLA, MeA, dLS, vLS, mPVN, pPVN, EWcp, dPAG, lPAG, és DR. A BNST elülső magcsoportjának felosztásánál Dong és munkatársai (2001.) által leírt klasszifikációt alkalmaztuk: BSTov, BSTdm, BSTdl, BSTv (Hammack és mtsai., 2010.).

10.2. Krónikus stressz modell

Az immunfluoreszcens preparátumokat *Olympus FluoView 1000* konfokális mikroszkóp segítségével rögzítettük a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Orvosi Biológiai Intézetében. A digitális képeket szekvenciális szkennelés útján *photon count* üzemmódban vettük fel, hogy az egyes fluorofórok emissziós spektrumai közötti kis átfedésekből adódó álpozitív jeltől mentes, szemikvantitatív fluoreszcens jelet kapjunk. A konfokális apertúra 80μm átmérőjű volt. A metszeteket 1024×1024 pixel felbontással 20× objektívvel szkenneltük. Az egyes festékek gerjesztési és emissziós spektrumát a *FluoView* szoftverbe (FV10-ASW; Version 0102) épített beállítások szerint választottuk meg. A festékek gerjesztéséhez az alábbi hullámhosszúságú lézersugarakat használtunk 100%-os intenzitással: Alexa Fluor 488: 488nm; Cy3: 550nm illetve Cy5: 650nm. A fluoreszcens jelet a festékek emissziós spektrumának csúcsán detektáltuk az alábbiak szerint: Alexa Fluor 488: 525nm, Cy3: 570nm, és Cy5: 670nm.

A metszeteket az egyes hullámhosszoknak megfelelő két csatornán szkenneltük és a képeket mentettük. A szoftver a két csatornán vizualizált ugyanazon régiót ábrázoló képeket automatikusan illesztette és egyesítette. A kolokalizációt a két csatornán detektált fluoreszcens jeleket összevetve határoztuk meg, melyekhez zöld és vörös virtuális színeket rendeltünk.

A manuális sejtszámolást az eredeti digitális fotók segítségével végeztük, olyan módon, hogy a számolás időpontjában nem tudtuk melyik csoportokhoz tartoznak az egyes minták. A sejtszámokat öt fotó átlaga alapján határoztuk meg melyeken a vizsgált magok teljes keresztmetszetének területét tekintetbe vettük. Ezeken az értékeken végeztük el a statisztikai analízist.

A fluoreszcens jel intenzitását *Image J* szoftver segítségével (*version* 1.42., NIH, Bethesda, MD) öt eredeti digitális fotón, képenként 10 sejttesten határoztuk meg a CRF, Ucn1 és 5-HT jelét ábrázoló csatorna képeit felhasználva. A vizsgált területeket manuálisan határoztuk meg úgy, hogy a sejtmag területe abba ne kerüljön bele. Az ezen a területen mért denzitást a háttér jel immunjelölés mentes területein gyűjtött mérési adat segítségével korrigáltuk, és az így kalkulált specifikus jeldenzitást (SSD) önkényes egységben kifejezve adtuk meg. Öt metszet egyenként 10 sejtjének adatait átlagolva jutottunk egy adott agyterületen megjelenő antigén SSD értékéhez. A CRF-et az BSTov-ben, az, Ucn1-et az cpEW, míg a 5-HT-t a DR területén mértük a Paxinos és Franklin (2003.) atlasz szerint.

A DAB jelölt FosB immunfestést a 2.10.1. fejezetben részletesen leírt módon digitalizáltuk állatonként 5, egymástól 90 µm távolságról gyűjtött sorozatmetszeten. A sejtszámolást ebben a kísérletben manuálisan végeztük az alábbi magok területén azok teljes keresztmetszeteinek területét figyelembe véve, a Paxinos és Franklin (2003.) atlasz alapján: CeA, BLA, MeA, dLS, vLS, CA1, CA3, DG, mPVN, pPVN, EWcp, dPAG, lPAG, DR. A BST elülső magcsoportját Dong és munkatársai (2001.) klasszifikációja szerint értékeltük: BSTov, BSTdm, BSTdl, BSTv (Hammack és mtsai., 2010.)

11. Az immunfestések kontrolljai a krónikus modellben

A krónikus kísérletben használt CRF antitestet (Santa Cruz, sc-1759 Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) az emberi CRF peptid C terminális fragmentuma ellen termeltették. Specificitását Western blot technikával mutatták ki, melynek eredménye a cég weboldalán elérhető: (http://datasheets.scbt.com/sc-1759.pdf). Kimerítéses tesztekben, a festéshez használt hígításban inkubáltuk a CRF antiszérumot 0,1µg, 1µg, és 10µg szintetikus blokkoló peptiddel (Santa Cruz, sc-1759-P), mely minden esetben megakadályozta a jel megjelenését az BSTov területén. Egy megbízhatóan karakterizált standard CRF antitest (Prof. WW Vale ajándéka, Salk Institute. La Jolla, CA, USA) az általunk használt kecske antiszérumhoz hasonlóan citoplazmatikus jelet adott az BSTov területén. Amennyiben a festés során kihagytuk elsődleges vagy másodlagos antiszérumokkal történő kezelést, vagy helyettesítettük azokat nem immunizált állat szérumával, semmilyen jelet sem kaptunk.

A kecskében előállított Ucn1 ellenes antitestet (Santa Cruz, sc-1825) patkány Ucn1 C terminális fragmentuma ellen termeltették, melyet korábban karakterizáltak (Bachtell 2003., Gaszner és mtsai., 2009.). Ezt az antitestet is összehasonlítottuk egy általánosan

elfogadott nyúlban előállított Ucn1 antitesttel (Prof. WW Vale ajándéka). Mindkét szérum morfológiailag nagyon hasonló képet adott a EWcp területén. Kimerítéses vizsgálatok, illetve az Ucn1 szérum kihagyása, helyettesítése minden esetben meggátolta értékelhető jel kialakulását. A monoklonális egér 5-HT antiszérumot (Dr. Lucienne Léger ajándéka, Université Claude Bernard, Lyon, Franciaország) korábban tesztelték (Léger és mtsai., 1998.). Az antitest elhagyása, vagy normál szérummal történő helyettesítése megelőzte értékelhető jel megjelenését mind WT mind KO állatokban.

Az itt használt FosB antiszérumot (Santa Cruz, sc-48) korábban tesztelték (Wallace és mtsai., 2008., Sterrenburg és mtsai., 2011.), továbbá Western-blot vizsgálat is alátámasztja a specificitását a gyártó honlapján elérhető adatok szerint (http://datasheets.scbt.com/sc-48.pdf.). Ebben a kísérletben is elvégeztük a kimerítéses vizsgálatokat az egéragyon a blokkoló peptid (sc-48-P, Santa Cruz) segítségével, mely megakadályozta a jel megjelenését. Mind az elsődleges, mind a másodlagos szérum elhagyása, és/vagy normál szérummal történő helyettesítése megszüntette a jelet.

12. CORT *radioimmunoassay*

A vérmintákban a CORT szintjét r*adioimmunoassay* segítségével határoztuk meg a korábban közöltekkel mindenben megegyező módszer segítségével (Gaszner és mtsai., 2004., 2009.). Ebben a kísérletben 40µl vérszérum mintát határoztunk meg tríciált kortikoszteron (12,000 cpm; 90–120 Ci/mmol, NET-399; PerkinElmer, Boston, MA) és CS-RCS-57 antiszérum (Józsa és mtsai., 2005.) segítségével. Az *assay*-k közötti és egyazon *assay*-n belüli mérések varianciája 9.1% illetve 6.5% volt.

13. Statisztikai értékelés

13.1. Akut stressz modell

A statisztikai analízist két utas variancia-analízissel (ANOVA; α=5%) végeztük. Az ANOVA teszt statisztikai értékelhetőségének kritériuma az adatok normál eloszlásának (Shapiro-Wilk teszt; Shapiro és Wilk 1965.) és a csoporton belüli variancia homogenitásának (Bartlett's Chi-négyzet teszt; Snedecor és Cochran 1989.) ellenőrzése volt. *Post hoc* analízis a Fisher-féle teszttel történt Statistica 8.0 program segítségével (StatSoft, Tulsa, OK, USA) (α=5%). A viselkedési tesztek statisztikai kiértékeléséhez Student-féle kétmintás t-próbát alkalmaztunk (α=5%). Adatainkat minden esetben

csoportátlagokként adtuk meg, feltűntetve a csoportátlagok standard hibáját (± *standard error of the mean*, SEM).

13.2. Krónikus stressz modell

A bemutatott adatok a kísérleti csoportok átlagát és az átlag standard hibáját reprezentálják. Az adatok eloszlásának normalitását Shapiro–Wilk teszt (Shapiro és Wilk, 1965.), a variancia homogenitását pedig Bartlett-féle Chi-négyzet próbával (Snedecor és Cochran, 1989.) ellenőriztük. A két szigma intervallumon kívül eső adatokat kizártuk a statisztikából. Az 1. számú adatsort két utas varianciaanalízissel (ANOVA) vizsgáltuk. A 2. adatsort multifaktoriális varianciaanalízissel (MANOVA) teszteltük. Minden *post hoc* analízist a Fisher-féle tesztel végeztünk a Statistica 8.0 szoftver (StatSoft, Tulsa, OK) (alpha=5%) segítségével.

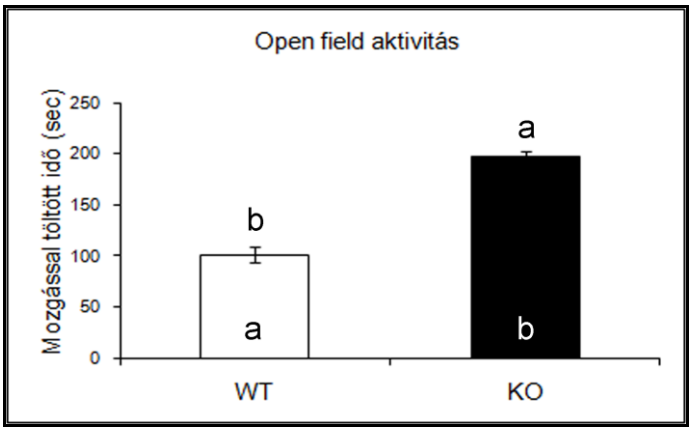
IV. Eredmények

1. Szorongás és akut stressz-reakció vizsgálata PACAP génhiányos egerekben viselkedési és c-Fos immunhisztokémiai módszerekkel

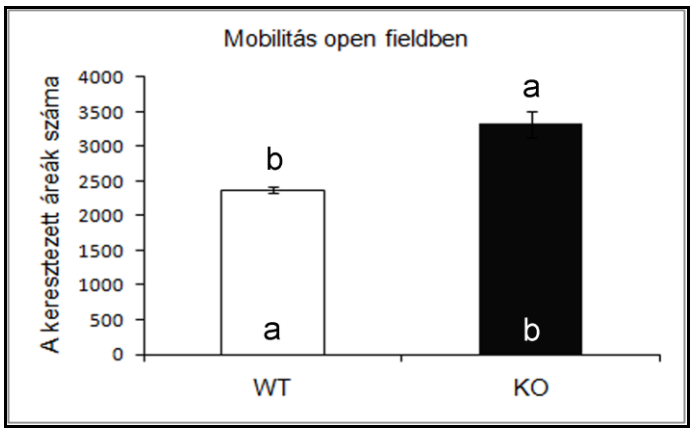
1.1. Viselkedés-vizsgálatok

1.1.1. *Open field* teszt

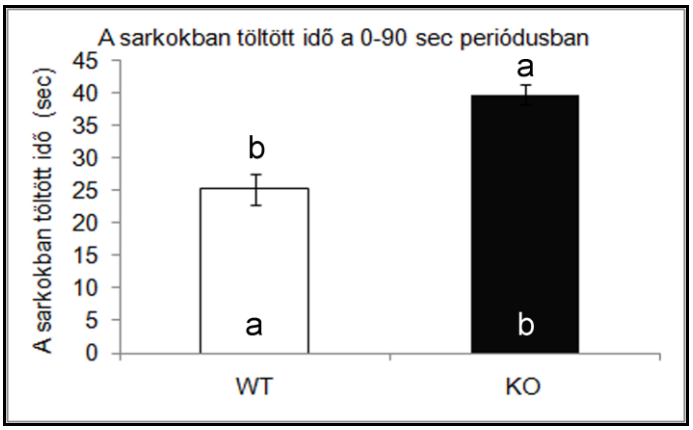
A KO egerek közel kétszer nagyobb aktivitást mutattak az *open field* tesztben (**9. ábra**; p<0.000001), 40%-kal több mezőt kereszteztek (**10. ábra**; p<0.001), valamint az első (0-90 sec) periódusban 37%-kal több ideig tartózkodtak a sarkokban, mint a WT állatok (**11. ábra**; p<0.001). A KO egerek továbbá 58%-kal kevesebb időt töltöttek a nyílt tér középső mezőiben, mint vad típusú társaik (p<0.01). A második periódusban (90-300 sec) nem láttunk szignifikáns különbséget a mobilitást illetően, de a KO egerek 10%-kal hosszabb ideig tartózkodtak a falak mentén elhelyezkedő mezőkben (p=0.065). A hét vizsgált KO egér közül négynél láttunk ugráló magatartást (1.00±0.43 ugrás/állat), míg a vad típusú egerek állatok közül egyiknél sem; ez a különbség statisztikailag szignifikánsnak bizonyult (p<0.05). A többi vizsgált paraméter (fejemelgetések, ágaskodások, mosakodás) tekintetében nem láttunk szignifikáns különbséget (nincs ábrázolva).



9. ábra: *Open field* aktivitási idő. Az oszlopok felett látható betűk a szignifikáns (p<0.000001) különbséget jelölik, a Student-féle páratlan t-teszt szerint (n=7/csoport).



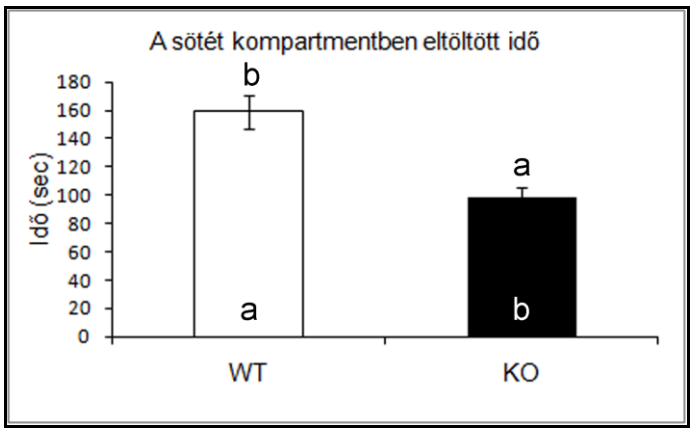
10. ábra: Mobilitás *open field* tesztben. Az oszlopok felett látható betűk a szignifikáns (p<0.001) különbséget jelölik, a Student-féle páratlan t-teszt szerint (n=7/csoport).



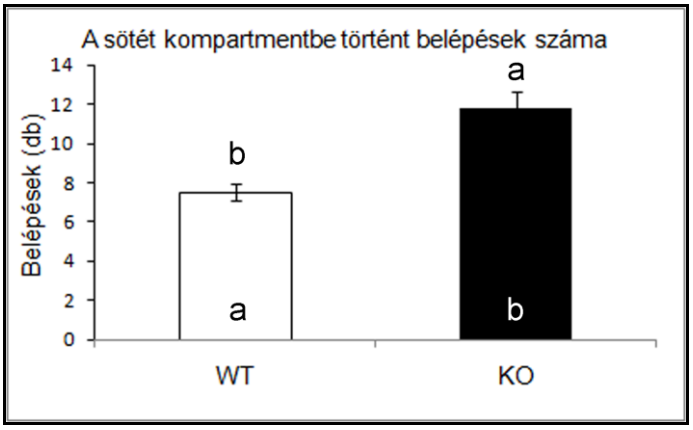
11. ábra: Sarokban töltött idő a 0-90 sec. periódusban. Az oszlopok felett látható betűk a szignifikáns (p<0.001) különbséget jelölik, a Student-féle páratlan t-teszt szerint (n=7/csoport).

1.1.2. Sötét-világos doboz (*light-dark box*) teszt

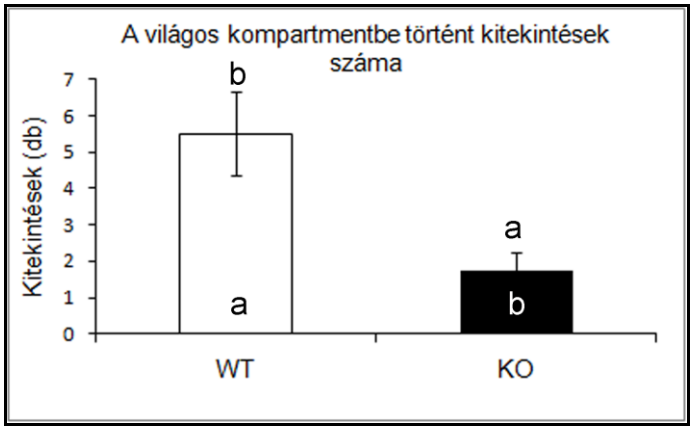
A KO egerek 37.50%-kal kevesebb időt töltöttek a sötét kompartmentben, mint a WT társaik (**12. ábra**; p<0.001), amelyből arra következtethetünk, hogy PACAP hiányában az egerek szorongási szintje alacsonyabb. A KO állatok azonban 36.61%-kal gyakrabban léptek be a sötét kompartmentbe (11.83±0.83 belépés), mint a WT egerek (7.50±0.43 belépés) (**13. ábra**; p<0.001), melynek hátterében a KO egerek fokozott lokomotoros aktivitása állhat. A világos kompartmentbe való kitekintések száma 3.14-szer több volt a vad típusú egerek esetében, mint a KO társaiknál (**14. ábra**; 5.50±1.14 vs. 1.75±0.51; p<0.01). Nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között a sötétbe való első belépésig eltelt idő vizsgálatánál (p=0.23, nincs ábrázolva).



12. ábra: Sötét kompartmentben eltöltött idő. Az oszlopok felett látható betűk a szignifikáns (p<0.001) különbséget jelölik, a Student-féle páratlan t-teszt szerint (n=12/csoport).



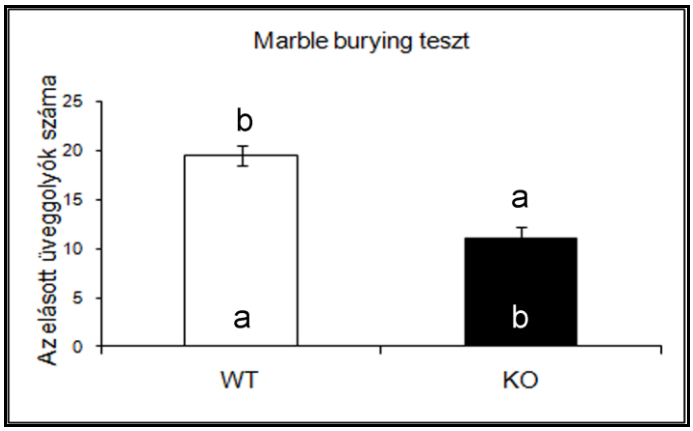
13. ábra: Sötét kompartmentbe történt belépések száma. Az oszlopok felett látható betűk a szignifikáns (p<0.001) különbséget jelölik, a Student-féle páratlan t-teszt szerint (n=12/csoport).



14. ábra: Világos kompartmentbe történt kitekintések száma. Az oszlopok felett látható betűk a szignifikáns (p<0.01) különbséget jelölik, a Student-féle páratlan t-teszt szerint (n=12/csoport).

1.1.3. Üveggolyó-elrejtési (*marble burying*) teszt

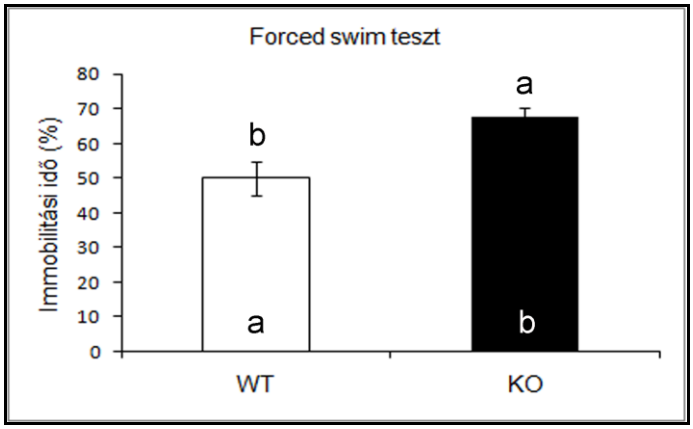
A KO egerek 44%-kal, szignifikánsan kevesebb üveggolyót ástak el, mint a vad típusú társaik (**15. ábra**; p<0.001), amely arra utal, hogy PACAP hiányában az egerek szorongási szintje ebben a modellben is alacsonyabb.



15. ábra: *Marble burying* teszt során elásott üveggolyók száma. Az oszlopok felett látható betűk a szignifikáns (p<0.01) különbséget jelölik, a Student-féle páratlan t-teszt szerint (n=12/csoport).

1.1.4. *Forced swim* teszt

A KO állatok 17.9%-kal, szignifikánsan hosszabb időtartamú immobilitást mutattak, mint a WT egerek (**16. ábra**; p<0.01), amely a PACAP-hiányos egereknél depresszió-szerű viselkedésre utal, az irodalomban leírtakkal összhangban (Hashimoto és mtsai., 2009.).



16. ábra: Immobilitási idő *forced swim* tesztben. Az oszlopok felett látható betűk a szignifikáns (p<0.01) különbséget jelölik, a Student-féle páratlan t-teszt szerint (n=7/csoport).

1.2. A c-Fos immunhisztokémia

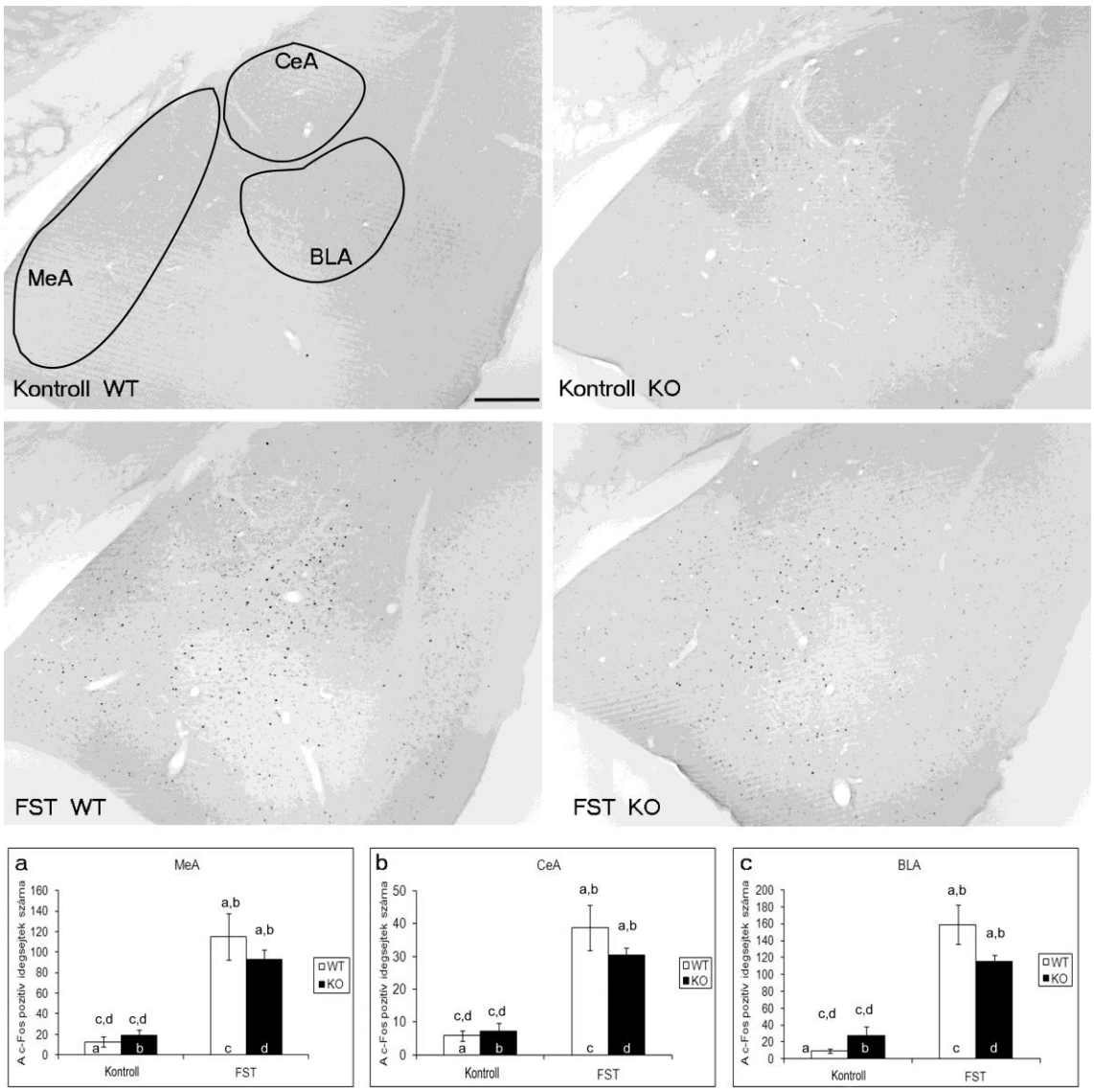
A c-Fos expresszió mértékét a stresszben fontos szerepet játszó agyterületeken FST után vizsgáltuk PACAP KO és WT állatoknál, összehasonlítva naiv, nem stresszelt PACAP-hiányos és vad típusú egerek agymintáival.

1.2.1. A tágabb értelemben vett amygdala magkomplex

A MeA területén csak a stressznek volt szignifikáns hatása ($F_{3,24}$=47.02; p<0.00001), a genotípusnak és az interakciónak nem (**17.a. ábra**).

A CeA területén FST után nyolcszorosára növekedett a c-Fos immunreaktivitás a PACAP-hiányos és a vad típusú állatoknál egyaránt. Stressz hatására az ANOVA szerint szignifikáns Fos expresszió változás történt ($F_{3,24}$=50.97, p<0.00001), azonban szignifikáns hatása sem a genotípusnak ($F_{3,24}$=0.79; p=0.38), sem pedig a stressz-genotípus interakciónak ($F_{3,24}$=1.65; p=0.22) nem volt (**17.b. ábra**).

A BLA területén mind a stressz ($F_{3,24}$=80.27; p<0.000001), mind a stessz-genotípus interakció hatása ($F_{3,24}$=5.51; p<0.04) szignifikáns volt az immunreaktivitásra. FST hatására a *post hoc* teszt szerint a PACAP-hiányos egerek szignifikánsan kisebb mértékű c-Fos válasszal reagáltak, mint a vad típusúak (p<0.04) (**17.c. ábra**).



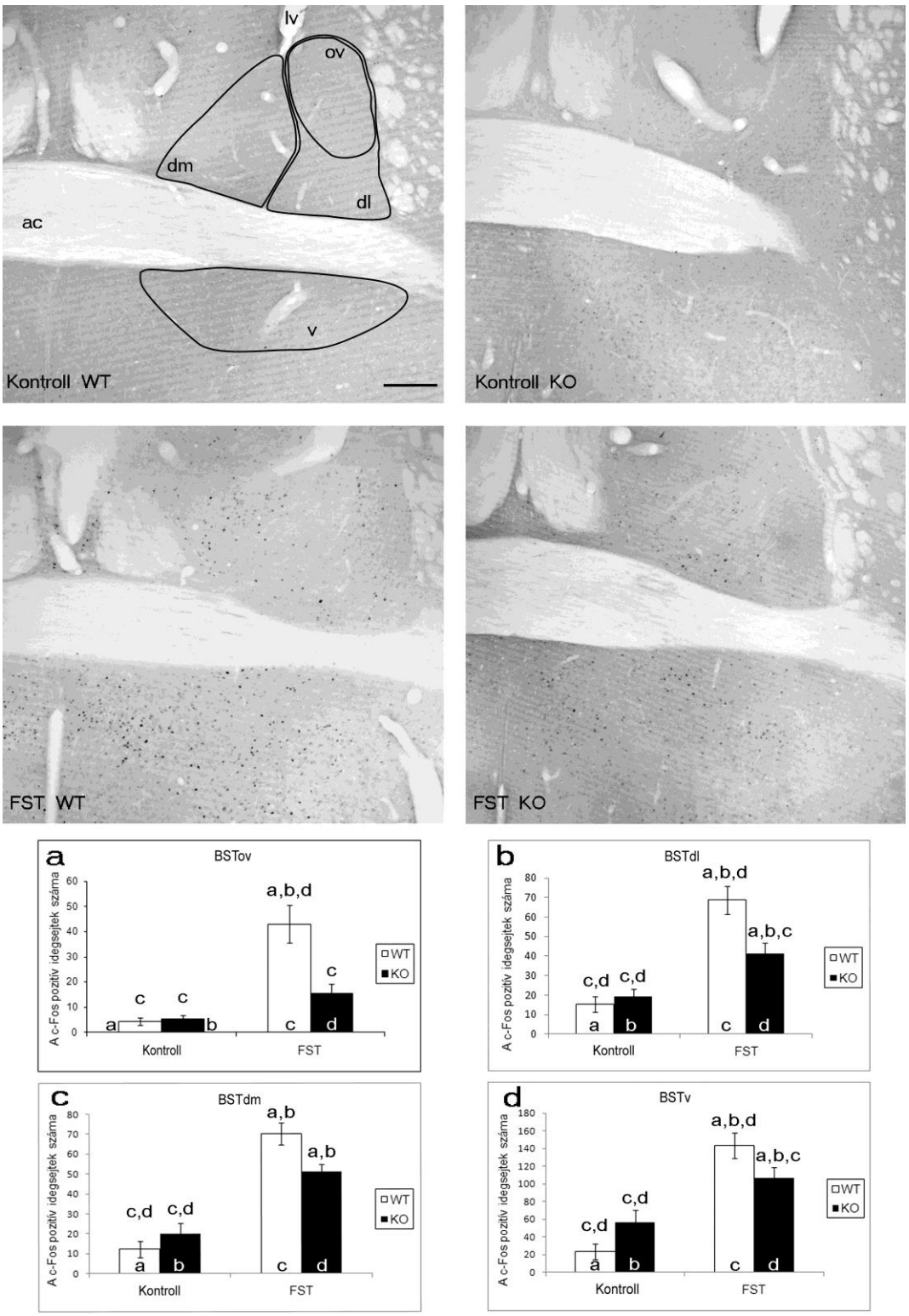
17. ábra: c-Fos immunhisztokémia az amygdala területén, reprezentatív fotók. Kontroll WT: nem stresszelt vad típusú állat; Kontroll KO: nem stresszelt PACAP hiányos (*knockout*, KO) állat; FST WT: *forced swim* teszten átesett vad típusú állat; FST KO: *forced swim* teszten átesett PACAP KO állat. Az oszlopdiagrammok a c-Fos immunreaktív idegsejtek számát mutatják az egyes csoportokban a (a) medialis amygdala (MeA), a (b) centralis amygdala (CeA) és a (c) basolateralis amygdala (BLA) területén. Az oszlopok felett látható betűk az egyes csoportok közötti szignifikáns különbségeket mutatják a Fisher-féle *post hoc* teszt szerint ($p<0.05$). Lépték: 200 µm.

A BSTov területén stressz hatására nyolcszorosára növekedett c-Fos immunreaktivitást tapasztaltunk a WT állatoknál ($p<0.0001$) a kontroll vad egerekhez képest. A stresszelt KO egereknél szignifikánsan kisebb mértékű c-Fos választ találtunk (-63.84%; $p<0.001$) a stresszelt vadakhoz viszonyítva (**18.a. ábra**). A stressz indukálta immunreaktivitás növekedés a PACAP-hiányos egerekben nem érte el szignifikáns mértéket ($p=0.11$). Az ANOVA szerint a stressz ($F_{3,24}=32.52$; $p<0.0001$), a genotípus ($F_{3,24}=9.62$; $p<0.01$), és a stressz-genotípus interakció ($F_{3,24}=10.97$; $p<0.01$) hatása is szignifikáns volt.

A BSTdl területén, összhangban a BSTov magjával, stressz hatására a KO egerek csupán kétszer nagyobb c-Fos expresszió növekedést mutattak, mint a kontroll csoport tagjai ($p<0.05$), míg a WT egereknél stressz hatására négy és félszeres c-Fos választ láttunk ($p<0.00001$). A KO egereknél 40%-kal alacsonyabb volt a stressz indukálta immunreaktivitás növekedés, mint a stresszen átesett WT állatoknál ($p<0.01$). Az ANOVA szerint a stressz ($F_{3,24}=51.05$; $p<0.00001$), a genotípus ($F_{3,24}=4.93$, $p<0.05$), és a stressz-genotípus interakció ($F_{3,24}=9.09$; $p<0.01$) hatása is szignifikánsnak bizonyult (**18.b. ábra**).

A BSTdm területén a stressz erőteljes hatást fejtett ki a c-Fos immunreaktivitásra ($F_{3,24}=40.11$; $p<0.001$), míg a PACAP genotípus és a stressz-genotípus interakció nem volt hatással erre ($F_{3,24}=0.64$; $p=0.43$); $F_{3,24}=3.63$; $p=0.07$). A *post hoc* tesztekben szintén azt tapasztaltuk, hogy a BSTdm területén az FST indukálta c-Fos expresszió mértéke nem függ a PACAP hiányától ($p=0.07$), mert a KO ($p<0.01$) és a WT ($p<0.0001$) egereknél is erőteljes immunreaktivitás-növekedést találtunk (**18.c. ábra**).

A BSTv területén az ANOVA szerint a stressznek ($F_{3,24}=50.94$; $p<0.00001$) és a stressz-genotípus interakciónak is szignifikáns hatása volt ($F_{3,24}=8.40$; $p<0.02$), de önmagában a genotípusnak nem ($F_{3,24}=0.02$, $p=0.08$). A *post hoc* teszt szerint stressz hatására a KO ($p<0.01$) és a WT ($p<0.0001$) egerek is jelentős c-Fos expresszió növekedéssel reagáltak, mely a vad típus esetében erősebb volt, mint a PACAP-hiányos csoportban ($p<0.05$) (**18.d. ábra**).



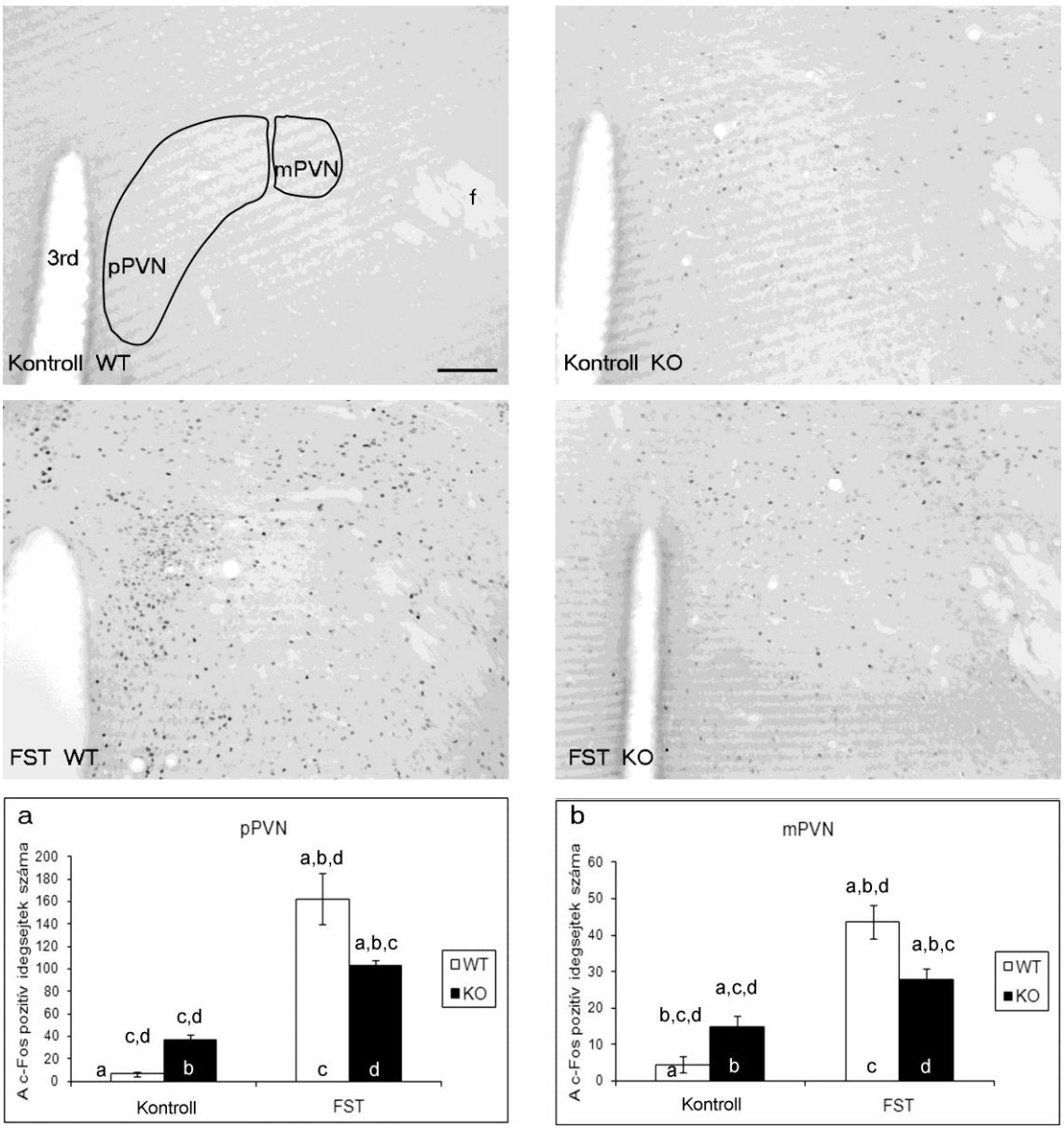
18. ábra: c-Fos immunhisztokémiai preparátumokról készült reprezentatív fotók a nucleus interstitialis striae terminalis (BST) területén. Kontroll WT: nem stresszelt vad típusú állat; Kontroll KO: nem stresszelt PACAP hiányos (*knockout*, KO) állat; FST WT: *forced swim* teszten átesett vad típusú állat; FST KO: *forced swim* teszten átesett PACAP KO állat. Az oszlopdiagrammok a BST ovális (a) (BSTov), dorsolaterális (b) (BSTdl), dorsomediális (c) (BSTdm) és ventrális (d) (BSTv) almagjaiban talált c-Fos immunreaktív idegsejtek számát mutatják. A Kontroll WT panelben látható rövidítések az alábbi anatómiai képleteket jelölik: ac: comissura anterior, lv: ventriculus lateralis, ov: BSTov, dl: BSTdl, dm: BSTdm, v: BSTv. Az oszlopok felett látható betűk az egyes

csoportok közötti szignifikáns különbségeket mutatják a Fisher-féle *post hoc* teszt szerint ($p<0.05$). Lépték: 200 µm.

1.2.2. Nucleus paraventricularis hypothalami

A pPVN területén a stressz ($F_{3,24}=89.16$; $p<0.000001$) és a stressz-genotípus interakció ($F_{3,24}=15.97$; $p<0.01$) is szignifikánsan befolyásolta a c-Fos immunreaktivitást, míg a genotípus nem ($F_{3,24}=1.49$; $p=0.23$). Bár a *post hoc* tesztek szerint mind a KO ($p<0.01$) és mind a WT ($p<0.01$) egerek esetében szignifikáns stressz indukálta c-Fos expresszió növekedést tapasztaltunk, a PACAP-hiányos állatoknál ez szignifikánsan kisebb mértékű volt (-36.46%, $p<0.01$). Érdekes, hogy az alap c-Fos expresszió a szignifikanciát megközelítő mértékben ($p=0.08$) magasabb volt a naiv, nem stresszelt KO egereknél (**19.a. ábra**).

Az mPVN területén, a pPVN-hez hasonlóan, az ANOVA szerint a stressz ($F_{3,24}=64.09$; $p<0.00001$) és a stressz-genotípus interakció ($F_{3,24}=15.97$; $p<0.01$) is szignifikánsan befolyásolja a c-Fos immunreaktivitást, míg a genotípus nem ($F_{3,24}=0.69$ $p=0.41$). A *post hoc* tesztek szerint az mPVN-ben a kontroll KO egereknél 3.2-szer több c-Fos pozitív neuront találtunk, mint a WT állatoknál ($p<0.04$). Az FST közel tízszeres c-Fos expresszió növekedést idézett elő a WT egereknél ($p<0.000001$), míg a PACAP-hiányos állatoknál ez csupán 87% volt ($p<0.02$). Az FST indukálta c-Fos expresszió növekedés az mPVN-ben 36%-kal alacsonyabb volt a PACAP-hiányos állatoknál ($p<0.01$), mint a vad típusú egereknél. Ez esetben is megfigyelhető, hogy a naiv, nem stresszelt KO egereknél 3.2-szer, szignifikánsan magasabb az alap c-Fos expresszió, mint a vad típusnál ($p<0.05$) (**19.b. ábra**).



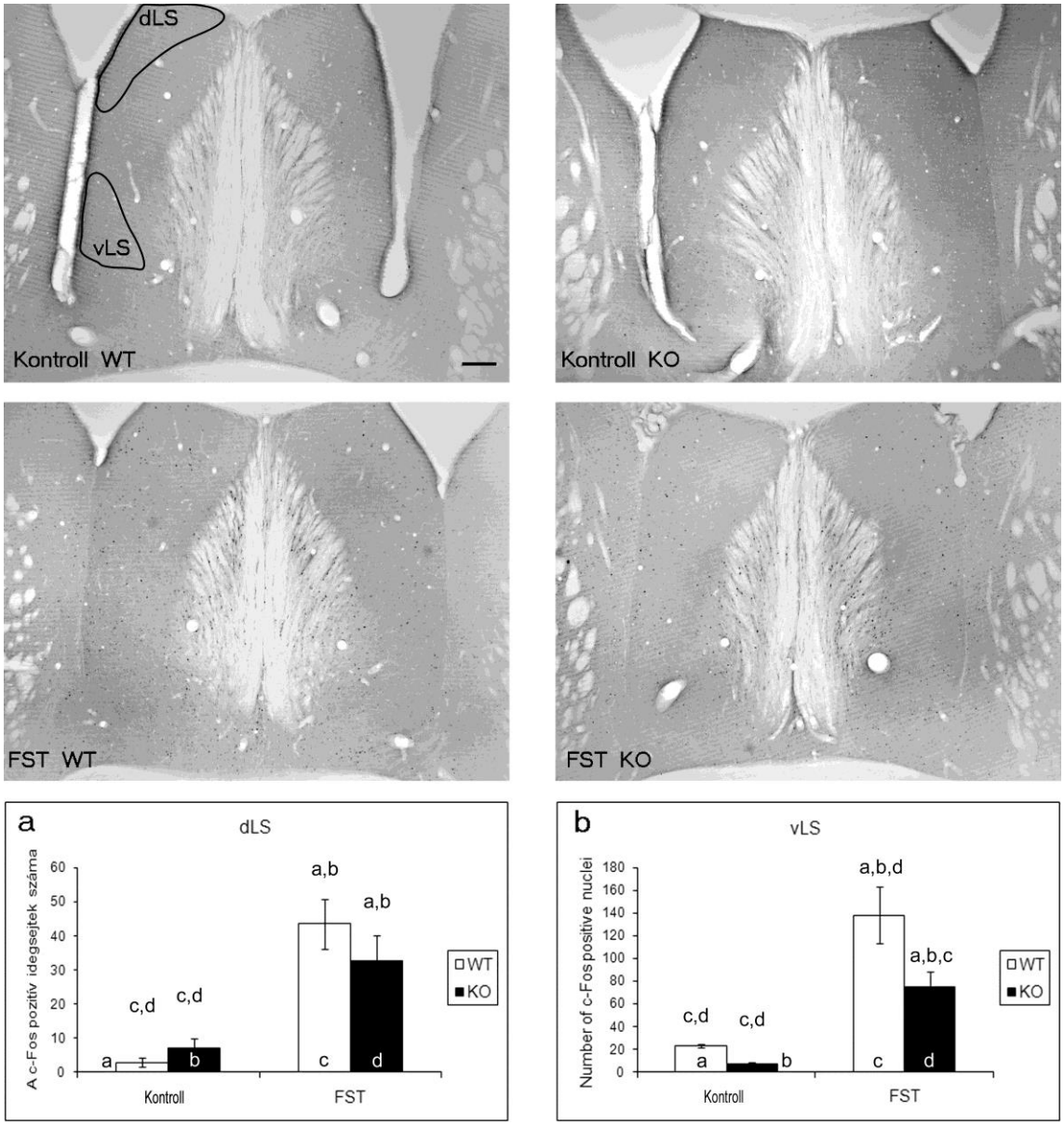
19. ábra: A nucleus paraventricularis hypothalami (PVN) a c-Fos immunhisztokémiai festést követően, reprezentatív képek. Kontroll WT: nem stresszelt vad típusú állat; Kontroll KO: nem stresszelt PACAP hiányos (*knockout*, KO) állat; FST WT: *forced swim* teszten átesett vad típusú állat; FST KO: *forced swim* teszten átesett PACAP KO állat. A hisztogrammok a csoportonkénti átlag c-Fos pozitív sejtek számát mutatják be a PVN parvocelluláris (pPVN) (a), és magnocelluláris (mPVN) (b) almagjaiban. 3rd: ventriculus tertius; f: fornix. Az oszlopok felett látható betűk az egyes csoportok közötti szignifikáns különbségeket mutatják a Fisher-féle *post hoc* teszt szerint ($p<0.05$). Lépték: 100 µm.

1.2.3. Nucleus septi lateralis

A dLS területén az ANOVA szerint a stressz hatása a c-Fos expresszióra szignifikánsnak bizonyult ($F_{3,24}=37.43$; $p<0.0001$), de a genotípus ($F_{3,24}=0.35$; $p=0.55$), és a stressz-genotípus interakció ($F_{3,24}=1.88$; $p=0.19$) hatása nem (**20.a. ábra**).

Ezzel szemben a vLS területén azt tapasztaltuk, hogy az ANOVA szerint a stressz ($F_{3,24}=31.16$; $p<0.0001$) és a genotípus ($F_{3,24}=5.85$; $p<0.01$) hatása is szignifikánsan

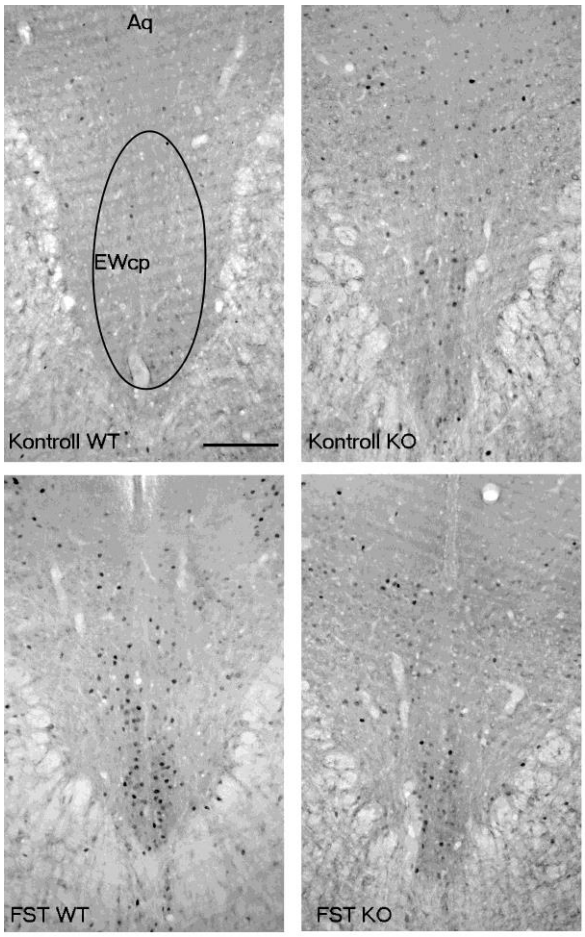
befolyásolta c-Fos expresszió mértékét, viszont az interakcióé ($F_{3,24}$=2.17; p=0.16) nem. A KO egerekben megközelítőleg fele akkora a stressz indukálta c-Fos válasz ezen az agyterületen, mint a WT állatokban (p<0.02) (**20.b. ábra**).

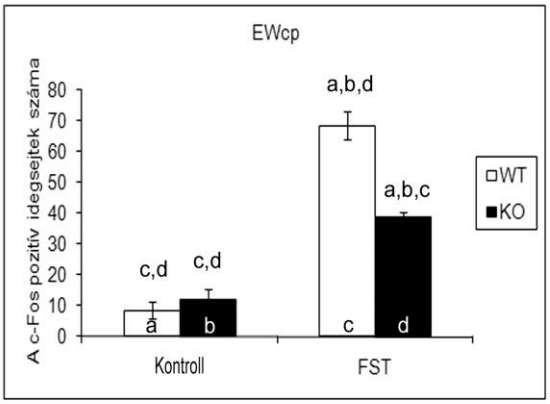


20. ábra: c-Fos immunhisztokémia a laterális septum (LS) területén. Kontroll WT: nem stresszelt vad típusú állat; Kontroll KO: nem stresszelt PACAP hiányos (*knockout*, KO) állat; FST WT: *forced swim* teszten átesett vad típusú állat; FST KO: *forced swim* teszten átesett PACAP KO állat. Az oszlopdiagramm a c-Fos aktiváció mértéket mutatja a dorsalis (a; dLS), és a ventralis LS (b; vLS) területén. Az oszlopok felett látható betűk az egyes csoportok közötti szignifikáns különbségeket mutatják a Fisher-féle *post hoc* teszt szerint (p<0.05). Lépték: 200 µm.

1.2.4. Centrális projekciójú Edinger-Westphal mag

Ebben a középagyi stressz központban az ANOVA szerint szignifikáns hatása volt a stressznek ($F_{3,24}$=164.56; p<0.000001), a genotípusnak ($F_{3,24}$=15.34; p<0.01), és ezek interakciójának egyaránt ($F_{3,24}$=23.87; p<0.001). A WT állatok esetében nyolcszorosára növekedett a c-Fos expresszió (p<0.000001), míg a KO csoportban szignifikánsan kisebb mértékben, csupán négyszeresére (p<0.0001) (**21. ábra**).





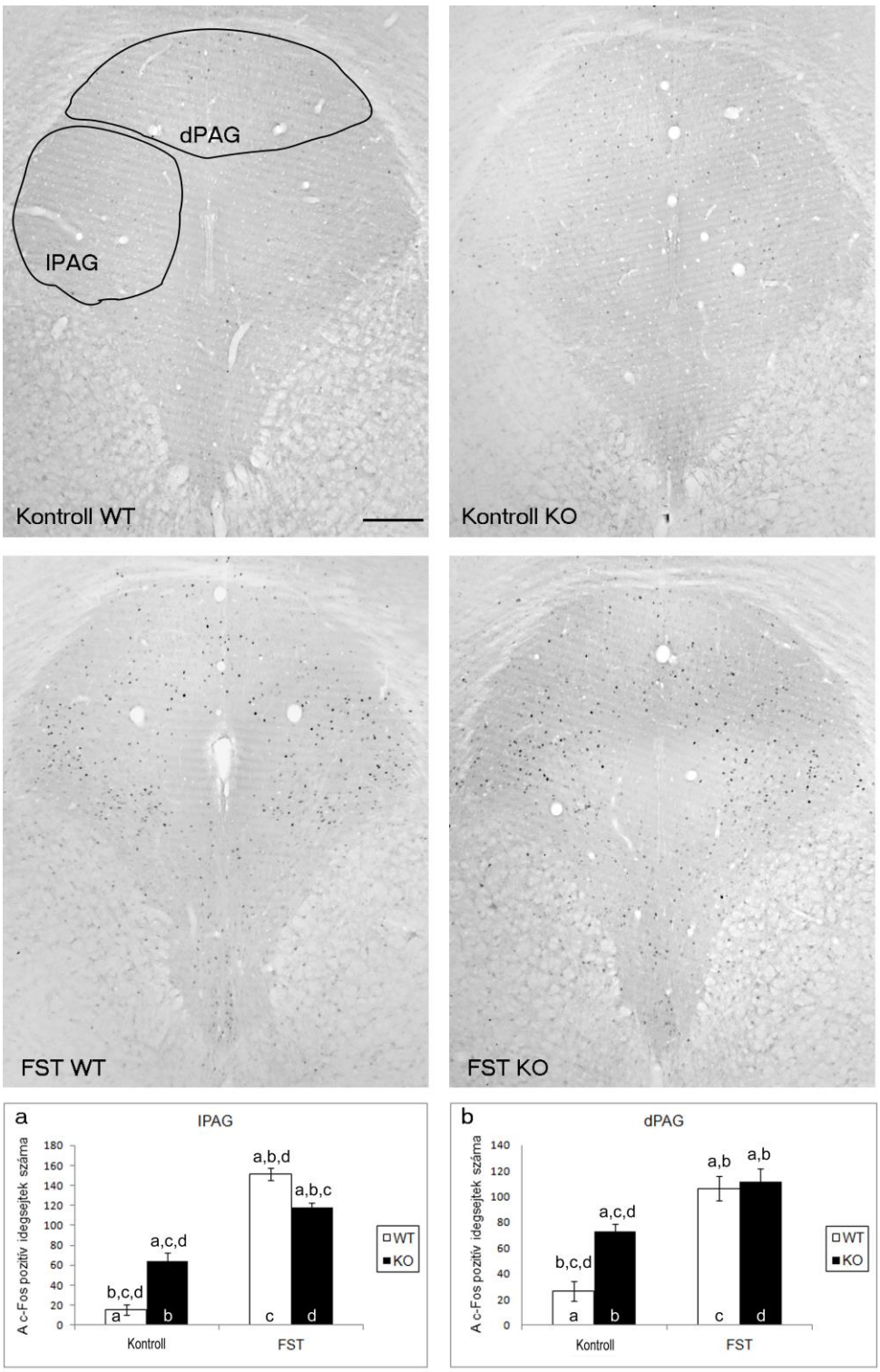
21. ábra. c-Fos immunhisztokémia a centrális projekciójú Edinger-Westphal magból (EWcp). Kontroll KO: nem stresszelt PACAP hiányos (*knockout*, KO) állat; FST WT: *forced swim* teszten átesett vad típusú állat; FST KO: *forced swim* teszten átesett PACAP KO állat. Az oszlopdiagramm a c-Fos aktiváció mértéket mutatja. Aq: aqueductus cerebri. Az oszlopok felett látható betűk a csoportok szignifikáns különbségeit mutatják a Fisher-féle *post hoc* teszt szerint (p<0.05). Lépték: 200 µm.

1.2.5. Periaqueductalis szürkeállomány

A PAG laterális részében az ANOVA szerint a c-Fos immunreaktivitás szignifikáns mértékben függ a stressztől ($F_{3,24}$=225.14; p<0.000001) és a stressz-genotípus interakciótól ($F_{3,24}$=41.45; p<0.00001) egyaránt, azonban önmagában a genotípustól független ($F_{3,24}$=1.59; p=0.22). A *post hoc* tesztek alapján a c-Fos expresszió egyértelmű növekedését láttuk mind a KO (közel kétszeres, p<0.0001), mind pedig a WT (tízszeres, p<0.0000001) csoportoknál. A PACAP-hiányos állatok, vad típusúakhoz viszonyítva (p<0.01), csökkent mértékű c-Fos expressziót mutattak FST hatására. Érdekes, hogy a naiv kontroll csoportokban a KO állatok, mintegy négyszer magasabb

c-Fos immunreaktivitással rendelkeztek, mint vad típusú társaik ($p<0.0001$) (**22.a. ábra**).

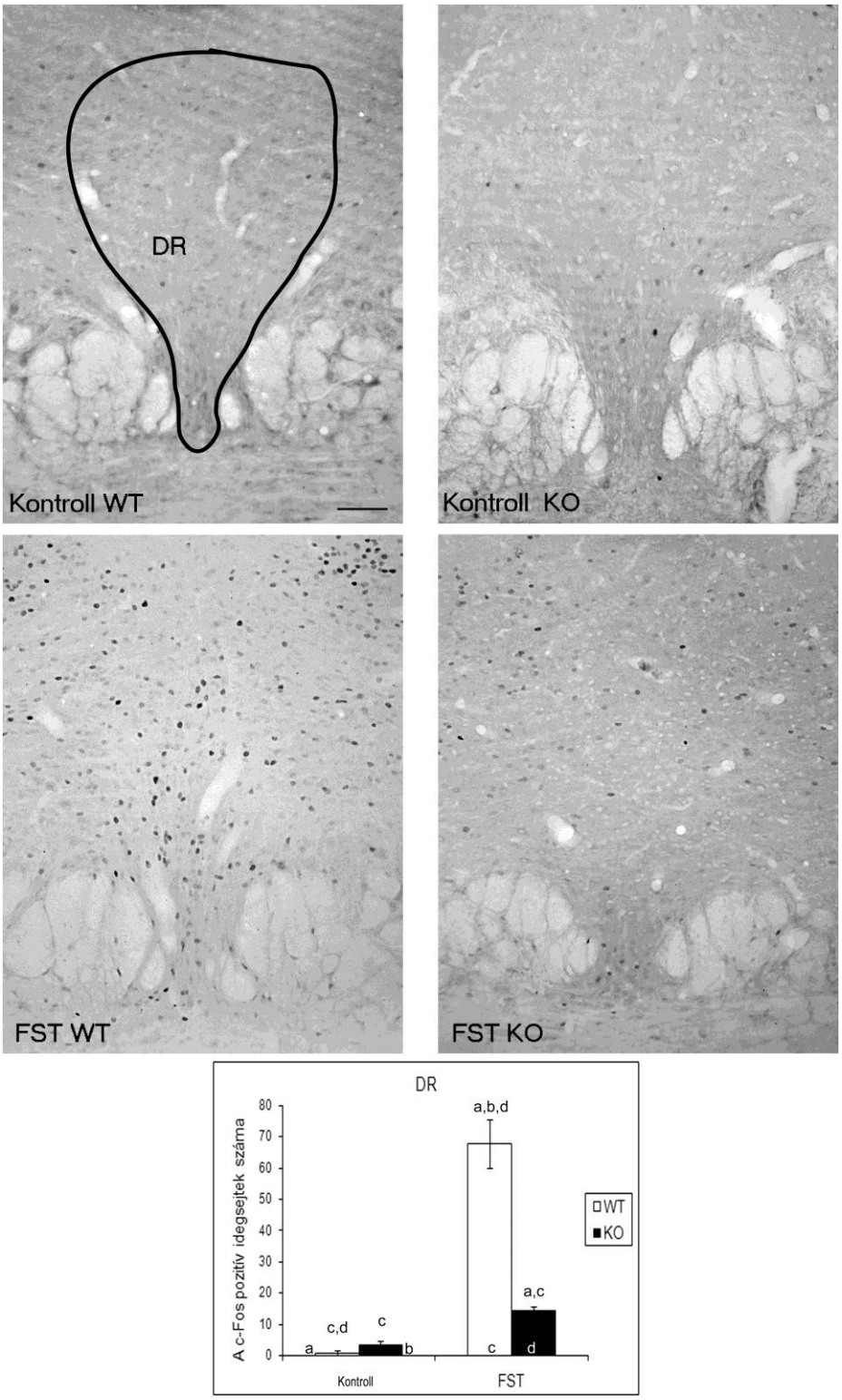
A PAG dorsális részében is az ANOVA szerint szignifikáns stressz ($F_{3,24}=49.38$; $p<0.00001$), genotípus ($F_{3,24}=9.23$; $p<0.01$) és stressz-genotípus interakció ($F_{3,24}=5.93$; $p<0.03$) hatást tapasztaltunk. A kontroll KO csoportban 2.7-szer több c-Fos pozitív neuront találtunk, mint a vad típusnál. FST hatására viszont a WT csoportban közel négyszeresére növekedett a c-Fos expresszió mértéke ($p<0.00001$), míg a KO csoportban csupán 50%-os ($p<0.01$) növekedést láttunk. Érdekes, hogy stressz hatására eltűnik a kontroll csoportoknál megfigyelhető bazális c-Fos immunreaktivitásbeli különbség: mindkét genotípusnál hasonló mennyiségű c-Fos pozitív neuront számláltunk ($p<0.67$) (**22.b. ábra**).



22. ábra: c-Fos immunhisztokémia a periaqueductalis szürkeállományban (PAG), reprezentatív felvételek. Kontroll KO: nem stresszelt PACAP hiányos (*knockout*, KO) állat; FST WT: *forced swim* teszten átesett vad típusú állat; FST KO: *forced swim* teszten átesett PACAP KO állat. Az "a" oszlopdiagrammon a laterális PAG (lPAG), míg a "b" jelűn a dorsalis (dPAG) c-Fos sejtszámait hasonlíthatjuk össze. Az oszlopok felett látható betűk az egyes csoportok közötti szignifikáns különbségeket mutatják a Fisher-féle *post hoc* teszt szerint ($p<0.01$). Lépték: 100 µm.

1.2.6. Nucleus raphe dorsalis

A DR területén az ANOVA szerint a c-Fos expresszió mértékét szignifikánsan befolyásolja a stressz ($F_{3,24}$=96.13; p<0.000001), a genotípus ($F_{3,24}$=40.75; p<0.00001) és a stressz-genotípus interakció ($F_{3,24}$=49.11; p<0.00001) egyaránt. A *post hoc* tesztek szerint FST hatására a vad típusnál hetvenötszörösére emelkedett c-Fos pozitív neuronok száma erősen szignifikánsnak bizonyult (p<0.000001), ezzel szemben a KO egereknél csupán ötszörös növekedést tapasztaltunk, mely szintén szignifikáns (p=0.02) volt. FST hatására a WT állatoknál 4.5-szer több (p<0.00001) c-Fos immunreaktív neuront számoltunk, mint a KO egerek esetében (**23. ábra**).



23. ábra: c-Fos immunhisztokémia a nucleus raphe dorsalisban (DR). Kontroll KO: nem stresszelt PACAP hiányos (*knockout*, KO) állat; FST WT: *forced swim* teszten átesett vad típusú állat; FST KO: *forced swim* teszten átesett PACAP KO állat. Az oszlopdiagramm a c-Fos aktiváció mértékét mutatja. Az oszlopok felett látható betűk az egyes csoportok közötti szignifikáns különbségeket mutatják a Fisher-féle *post hoc* teszt szerint ($p<0.01$). Lépték: 100 µm.

2. PACAP génhiányos egerek vizsgálata krónikus variábilis enyhe stressz modellben viselkedési és funkcionális morfológiai módszerekkel

2.1. A modell validálása

2.1.1. Testtömeg változás

A CVMS hatását az állatok testtömeg változásának mérésével vizsgáltuk. (**24.A. ábra**). A nem kezelt WT egerek esetében (összehasonlítva a **24.A. ábra** ‘a’ és ‘c’ oszlopát; $p<0.02$) a CVMS hatékonyan csökkentette a testtömeget (ANOVA: $F_{3,22}=5.60$; $p<0.04$), míg a KO állatok nem veszítettek testtömegükből. A kezelt állatoknál a kezelés ($F_{7,41}=62.98$; $p<0.000001$) és a genotípus ($F_{7,41}=18.21$; $p<0.001$) hatása is szignifikánsnak bizonyult, míg a stressz hatása a statisztikai határérték alatt volt. A stressz × kezelés ($F_{11,63}=29.55$; $p<0.00001$) interakció szignifikánsnak bizonyult. A CVMS csökkentette a testtömeget a vivőanyaggal kezelt WT egerek esetében (összehasonlítva a **24.B. ábra** ‘a’ és ‘e’ oszlopát; $p<0.05$). Az imipramin nem fordította vissza a CVMS testtömeg változásra kifejtett hatását a WT egerekben, a vivőanyaggal kezelt stresszelt WT egerekkel összehasonlítva (‘e’ és ‘g’ oszlop; $p<0.00001$). A CVMS nem okozott testtömeg változást a KO egereknél a *post hoc* teszt szerint, összehasonlítva a nem kezelt (**24.A. ábra**, ‘b’ és ‘d’ oszlop; $p=0.67$) és a vivőanyaggal kezelt (**24.B. ábra** ‘b’ és ‘f’ oszlop; $p=0.11$) párokat a KO csoportokban. Érdekes, hogy az imipraminnal kezelt CVMS-nek kitett KO egerek (**24.B. ábra** ’h’ oszlop) 2 grammot híztak, összehasonlítva a nem stresszelt imipraminnal kezelt KO állatokkal (**24.B. ábra** ‘d’ oszlop; $p<0.001$) és a stresszelt imipraminnal kezelt WT állatokkal (**24.B. ábra** ‘g’ oszlop; $p<0.00001$) akik veszítettek a testtömegükből.

A testtömegre vonatkozó adatok bizonyítják a stresszor hatékonyságát a WT egerekben, nem úgy mint a PACAP defficiens állatok esetében.

2.1.2. Mellékvese tömeg

A nem kezelt egereknél a stressz ($F_{3,22}=21.97$; $p<0.001$), a genotípus ($F_{3,22}=9.28$; $p<0.01$) és ezek interakciója ($F_{3,22}=8.64$; $p<0.01$) is szignifikáns hatást fejtett ki a mellékvesék tömegére (**24.C. ábra**). A kezelt állatoknál szignifikáns hatása volt a genotípusnak ($F_{7,41}= 7.20$; $p<0.02$), továbbá stressz × kezelés ($F_{7,41}=4.48$; $p<0.05$) és stressz × genotípus ($F_{7,41}=5.30$; $p<0.03$) interakciót találtunk. Az egyik jelentős felfedezésünk ebben a kísérletben az volt, hogy a *post hoc* teszt szerint a kontroll

PACAP KO egerek 57%-kal nagyobb tömegű mellékvesékkel rendelkeznek, mint a vadak (lásd **24.C. ábra** ‘a’ és ‘b’ oszlopát; $p<0.01$). KO egerekben az alapból magasabb mellékvese tömeget sem a kezelés, sem pedig a CVMS nem változtatta meg. A vad típusú egerek esetében szignifikánsan magasabb mellékvese tömeget mértünk a nem kezelt (lásd **24.C. ábra** ‘a’ és ‘c’ oszlopát; $p<0.0001$) és a vivőanyaggal kezelt (**24.D. ábra** ‘a’ *vs.* ‘e’ oszlop; $p<0.02$) csoportokban is CVMS hatására, mely modellünk hatékonyságát támasztja alá. Az imipraminnal kezelt állatok esetében a CVMS nem befolyásolta szignifikáns mértékben a mellékvesék tömegét (**24.D. ábra** ‘e’ és ‘g’ oszlop; $p=0.38$). Amennyiben a stresszelt állatokat hasonlítottuk össze egymással, azt találtuk, hogy sem a kezelés, sem pedig a genotípus nem befolyásolta szignifikáns mértékben a mellékvesék tömegét.

2.1.3. Kortikoszteron titer

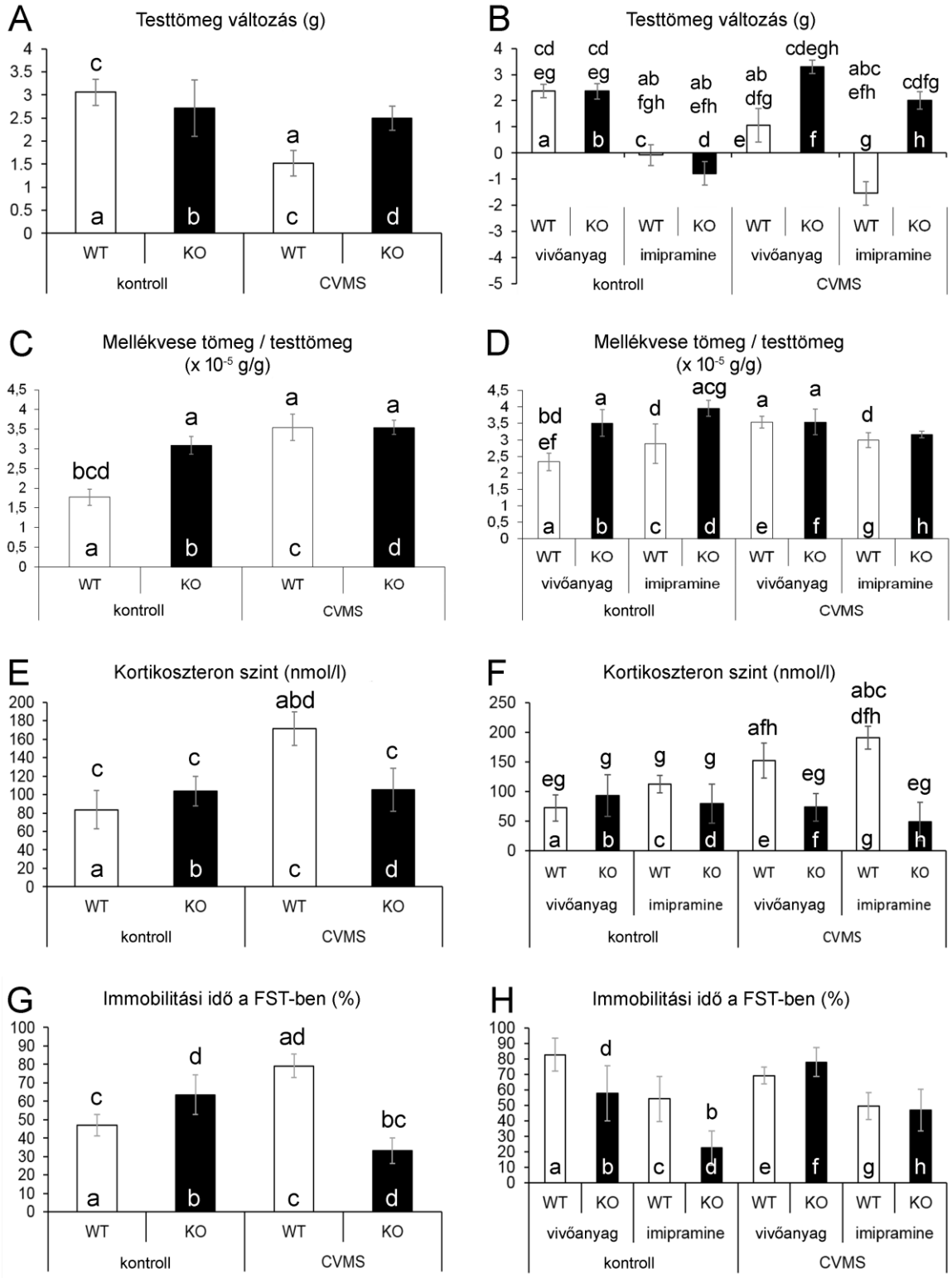
A HPA tengely aktivitásának értékelése plazma CORT titer meghatározással történt. A nem kezelt csoportok (**24.E. ábra**) összehasonlításánál kiderült, hogy a CVMS ($F_{3,22}=4.75$; $p<0.05$) és a stressz × genotípus interakció ($F_{3,22}=4.50$; $p<0.05$) hatékonyan befolyásolja a CORT titereket. A kezelt egerek esetében (**24.F. ábra**) a genotípus ($F_{7,41}=9.75$; $p<0.01$) és a stressz × genotípus interakció ($F_{7,41}=7.89$; $p<0.01$) hatását találtuk, míg az imipramin kezelésnek nem volt szignifikáns hatása. A *post hoc* tesztek szerint a WT egereknél CVMS hatására szignifikáns, közel kétszeres CORT titer emelkedést találtunk [lásd a 24.E. ábrán az ‘a’ és ‘c’ oszlop párokat; ($p<0.02$); a 24.F. ábrán az ‘a’ és ‘e’ oszlopokat; ($p<0.04$); továbbá a ‘c’ és ‘g’ oszlopokat; ($p<0.03$)], ezzel ellentétben a KO egerek esetében a stresszelt és nem streesszelt csoportok összehasonlításánál nem találtunk szignifikáns CORT titer emelkedést [**24.E. ábra** ‘b’ és ‘d’ oszlop; ($p=0.96$), illetve ‘b’ és ‘f’ oszlop párok; ($p=0.60$), továbbá a **24.F. ábra** ‘d’ és ‘h’ oszlop; ($p=0.47$)].

2.1.4. *Forced swim* teszt

A FST-nél mért immobilitási idő a depresszió-szerű viselkedést reprezentálja. A nem kezelt egereknél a stressz × genotípus interakció befolyásolta az immobilitási időt ($F_{3,22}=16.76$; $p<0.001$). A CVMS növelte a depresszió-szerű viselkedést a WT egerek esetében, a kontroll csoportokkal összehasonlítva (lásd a **24.G. ábra** ‘a’ és ‘c’ oszlopát; $p<0.02$), ami alátámasztja CVMS modellünk hatékonyságát. Meglepetésünkre a kontroll KO egerek nem mutattak szignifikáns depresszió-szerű viselkedés mintát, összehasonlítva a WT egerekkel (lásd a **24.G. ábra** ‘a’ és ‘b’ oszlopát; $p=0.15$).

Paradox módon, a CVMS expozíció a KO egerekben alacsonyabb ($p<0.02$) depressziós szintet eredményezett, mint a nem stresszelt KO állatok esetében.

A kezelt csoportokban az imipramin hatása ($F_{11,63}=11.66$; $p<0.01$) szignifikánsnak bizonyult. A *post hoc* tesztek szerint a kontroll KO egereknél az imipramin csökkentette az immobilitási időt, összehasonlítva a vivőanyaggal kezelt csoporttal (**24.H. ábra** ‘b’ és ‘d‘ oszlop), de a stresszelt csoportoknál ez a hatás nem ért el statisztikailag szignifikáns mértéket.



24. ábra: A krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) modellünk validitását alátámasztó eredmények összefoglalója. Az (A), (C), (E), és (G) diagramm az injekciós kezelésben nem részesült egerek eredményeit mutatja. A (B), (D), (F) és (H) grafikonok a kezelt állatok eredményeit mutatják. Az (**A**) és (**B**) grafikon a kísérlet időtartama alatt bekövetkező testtömeg változást mutatja be grammban (g) kifejezve. A (**C**) és a (**D**) ábra a testtömegre vonatkoztatott mellékvese tömeget mutatja (g/g). Az (**E**) és (**F**) hisztogrammok a plazma kortikoszteron szintjét mutatják (nmol/l). A (**G**) és a (**H**) ábra a *forced swim* tesztben (FST) immobilitással töltött idő százalékértéket adja meg. Az oszlopok feletti betűjelek azokat a csoportpárokat jelölik, amelyek között szignifikáns

különbség van a Fisher-féle *post hoc* teszt szerint ($p<0,05$). A világos oszlopok a PACAP vad típusú (WT) egereket, a sötétek a PACAP knockout (KO) egerek eredményeit képviselik.

2.2. FosB neuronális aktivációs mintázat az agyban

A neuronális aktivációt 12 kísérleti csoportban, 18 agyterületen vizsgáltuk FosB immunhisztokémiai módszerrel. Az eredményeket két adathalmazba csoportosítottuk (lásd **1. táblázat**) melyeket az alábbi két alfejezetben tárgyalunk:

2.2.1. A FosB neuronális aktivációs mintázat a nem kezelt WT és PACAP KO egereknél CMVS hatására (1. adathalmaz, 4. táblázat)

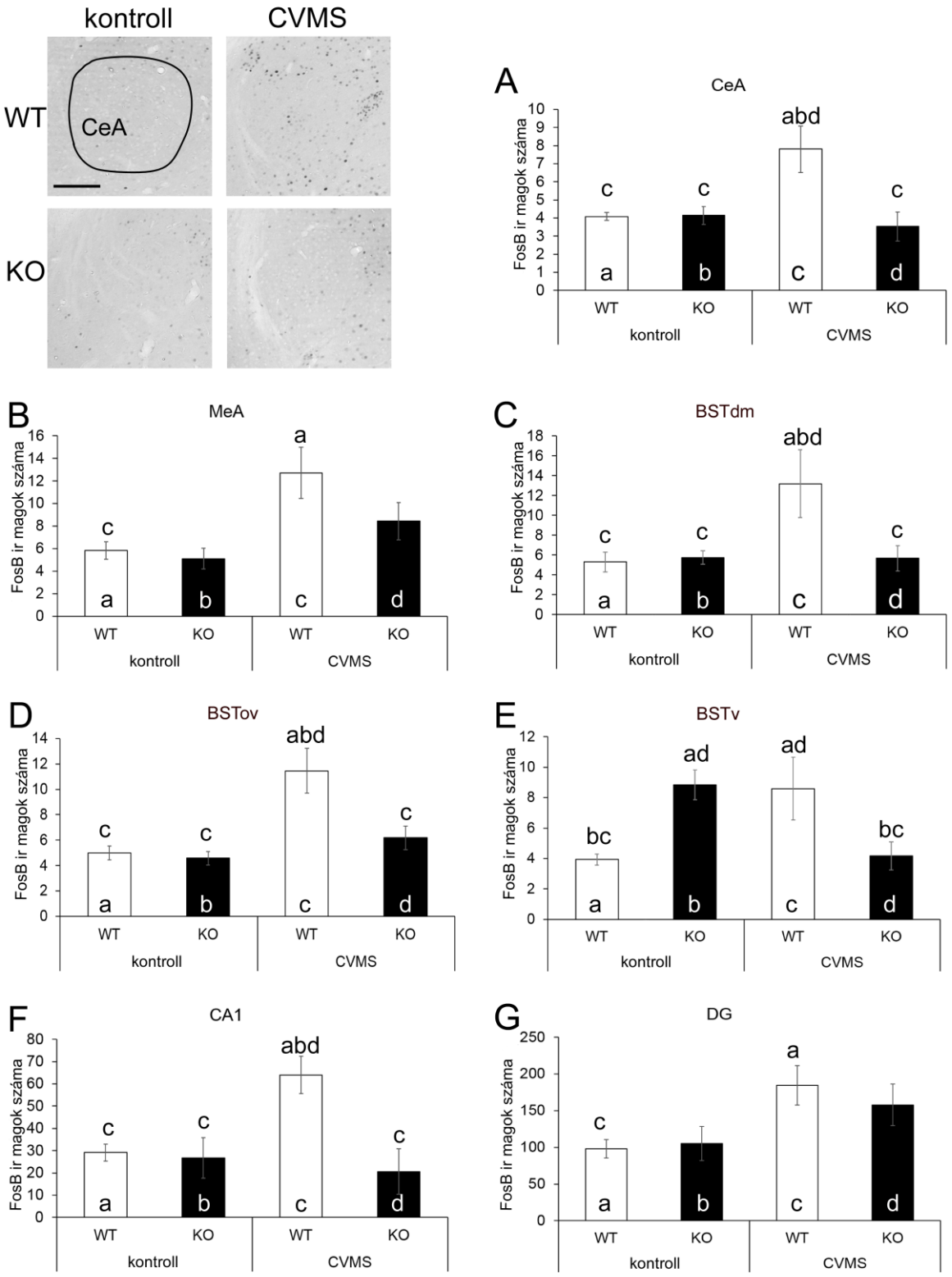
2.2.1.1. Tágabb értelemben vett amygdala magkomplex

A CeA területén (**25.A. ábra**) a CVMS ($F_{3,22}=5.25$; $p<0.04$), a genotípus ($F_{3,22}=8.57$; $p<0.02$) és a stressz × genotípus interakció ($F_{3,22}=9.01$; $p<0.01$) FosB neuronális aktivációra kifejtett hatása is szignifikánsnak bizonyult. A *post hoc* teszt szerint a kontroll csoport párok között nincs szignifikáns különbség (**25.A. ábra**; $p>0.05$). A WT egereknél CVMS hatására közel kétszer több FosB pozitív sejtet számoltunk, mint a kontrolljaiknál (**25.A. ábra** ‘a’ és ‘c’ oszlop; $p<0.01$). A FosB immunreaktivitás nagyságának mértéke szignifikánsan kisebb volt a KO egerek esetében, mint a WT állatoknál (lásd a **25.A. ábra** ‘c’ és ‘d’ oszlopát; $p<0.001$).

A MeA területén (**25.B. ábra**) csak a stressznek ($F_{3,22}=8.55$; $p<0.01$) volt szignifikáns hatása a FosB expresszióra. A WT egerek esetében a FosB expresszió hozzávetőlegesen kétszeres növekedése szignifikánsnak bizonyult (‘a’ *vs.* ‘c’ oszlop; $p<0.02$), de a KO állatok nem reagáltak a CVMS-re ($p=0.20$).

A BLA területén is vizsgáltuk a FosB expressziót, de egyik vizsgált faktor sem fejtett ki statisztikailag jelentős hatást (az adatokat nem tüntettük fel).

Összefoglalva azt mondhatjuk, hogy CVMS-en átesett WT egereknél fokozott FosB expressziót találtunk a CeA és a MeA területén, míg a PACAP géntermék hiánya a CVMS-re adott reakció elmaradását eredményezte ezen agyterületeken.



25. ábra: FosB immunhisztokémia injekciós kezelésben nem részesült egereken. A nucleus centralis amygdalae (CeA) reprezentatív fotói. A hisztogrammok a FosB immunreaktív (ir) neuronok számát mutatják, rendre a CeA (**A**), a nucleus medialis amygdalae (MeA) (**B**), a nucleus interstialis striae terminalis (BST) dorsomedialis (BSTdm) (**C**), ovalis (BSTov) (**D**), ventralis (BSTv) (**E**) divíziói, a hippocampus CA1 áreája (**F**) és a gyrus dentatus (DG) (**G**) területén. Az oszlopok feletti betűjelek azokat a csoportpárokat jelölik, amelyek között szignifikáns különbség van a Fisher-féle *post hoc*

teszt szerint ($p<0.05$). A világos oszlopok a PACAP vad típusú (WT) egereket, a sötétek a PACAP génhiányos (KO) egerek eredményeit képviselik. CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz. Lépték: 100µm.

A BSTdm területén (**25.C. ábra**) a FosB expressziót a stressz ($F_{3,22}=5.65$; $p<0.04$), a genotípus ($F_{3,22}=4.60$; $p<0.05$) és ezek interakciója ($F_{11,63}=6.61$; $p<0.03$) is befolyásolta. A *post hoc* tesztek szerint CVMS hatására a WT egereknél kétszeresére emelkedett a FosB expresszió ($p<0.01$), míg a KO egerek esetében az nem változott (**25.C. ábra**).

Az BSTov területén a stressz ($F_{3,22}=10.12$; $p<0.01$), a genotípus ($F_{3,22}=9.32$; $p<0.02$) és ezek interakciója ($F_{3,22}=7.44$; $p<0.02$) is befolyásolta a FosB expressziót. A PACAP KO állatok BSTov neuronjaiban elmaradt a CVMS indukálta FosB emelkedés (lásd a **25.D. ábra** ‘b’ és ‘d’ oszlopát).

A BSTv területén a stressz és a genotípus nem befolyásolta a FosB expressziót, de ezek interakciója szignifikánsnak bizonyult ($F_{3,22}=12.27$; $p<0.01$). Kiemelendő, hogy magasabb bazális FosB expressziót találtunk a KO egerek esetében, mint a WT állatoknál (**25.E. ábra** ‘a’ és ‘b’ oszlop; $p<0.04$). WT egereknél a CVMS FosB expresszió emelkedést okozott (lásd az ‘a’ és ‘c’ oszlopot). Ezzel ellentétben KO egereknél alacsonyabb FosB expressziót találtunk CVMS hatására, mind a stresszelt WT (‘c’ és ‘d’ oszlop; $p<0.03$) mind pedig a kontroll KO egerek esetében (‘b’ és ‘d’ oszlop; $p<0.03$).

A BST területén végzett FosB neuronális aktivitás mérések összességében azt támasztják alá, hogy a KO állatok kisebb érzékenységet mutatnak a CVMS iránt.

2.2.1.2. Hippocampus

A CA1 régió területén a CVMS nem befolyásolta a FosB expressziót (**25.F. ábra**), de a genotípus ($F_{3,22}=7.00$; $p<0.02$), továbbá a stressz × genotípus ($F_{3,22}=5.62$; $p<0.04$) interakció igen. A *post hoc* tesztek szerint a WT egerek hozzávetőlegesen kétszeres FosB expresszió növekedéssel reagáltak (**25.F. ábra** ‘a’ és ‘c’ oszlop; $p<0.03$), míg a KO egerek nem reagáltak a CVMS-re.

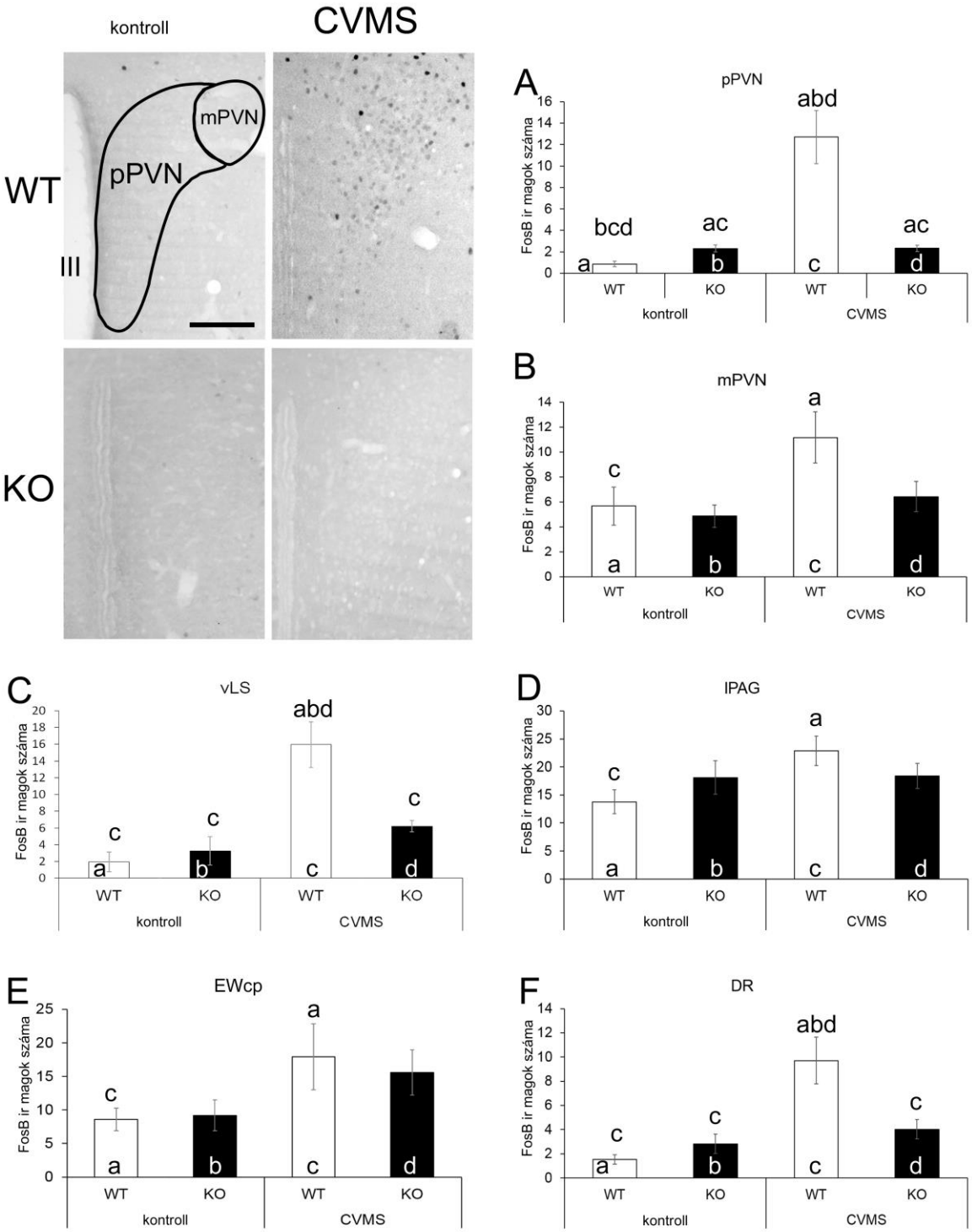
A DG (gyrus dentatus) területén a FosB expressziót a stressz ($F_{11,63}=8.15$; $p<0.02$) befolyásolta, interakciót azonban nem találtunk. A WT egerek esetében a CVMS majdnem kétszeres FosB expresszió növekedést eredményezett (**25.G. ábra** ‘a’ vs. ‘c’ oszlop; $p<0.03$). A stressz-indukálta FosB expresszió emelkedés nem érte el a szignifikáns mértéket a KO állatoknál.

A CA3 régió területén csak negatív eredményeket találtunk (az adatokat nem tüntettük fel).

Összességében KO egerek esetén a DG és a CA1 területén a FosB neuronális aktivitás CVMS hatására nem mutatott érzékenységet.

2.2.1.3. Nucleus septi lateralis

A vLS területén (**26.C. ábra**) ANOVA szerint szignifikáns hatása volt a stressznek ($F_{11,63}$=14.66; $p<0.01$) és a stressz × genotípus interakciónak ($F_{3,22}$=6.20 ; $p<0.04$). WT egerek esetében a CVMS növelte a FosB pozitív sejtek számát (lásd a **26.C. ábra** ‘a’ és ‘c’ oszlopát; $p<0.001$) míg a KO egereknél nem láttunk CVMS indukált FosB pozitivitás növekedést. A stresszelt WT egerek közel háromszoros neuronális aktivitást mutattak a KO állatokkal összehasonlítva ($p<0.01$). A CVMS hatása a FosB neuronális aktivitás emelkedésének mértéke nem érte el a statisztikailag szignifikáns értéket a dLS területén. A kezelés, a genotípus és azok interakciói is hatástalanok voltak (az adatokat nem tüntettük fel).



26. ábra: FosB immunhisztokémia injekciós kezelésben nem részesült egereken. A nucleus paraventricularis hypothalami parvocellularis (pPVN) és magnocellularis (mPVN) területeinek reprezentatív felvételei. A hisztogrammok a FosB immunreaktív (ir) neuronok számát mutatják, rendre a pPVN (**A**), a mPVN (**B**), a nucleus lateralis septi ventralis (vLS) (**C**), a periaqueductalis szürkeállomány lateralis divíziója (lPAG) (**D**) területén, továbbá a centrális projekciójú Edinger-Westphal magban (EWcp) (**E**); és a nucleus raphe dorsalisban (DR) (**F**). A világos oszlopok a PACAP vad típusú (WT) egereket, a sötétek a PACAP génhiányos (KO) egerek eredményeit képviselik. Az oszlopok feletti betűjelek azokat a csoportpárokat jelölik, amelyek között szignifikáns

különbség van a Fisher-féle *post hoc* teszt szerint ($p<0,05$). CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz. III: harmadik agykamra. Lépték: 200 µm.

2.2.1.4. Nucleus paraventricularis hypothalami

A pPVN (**26.A. ábra**) FosB immunreaktivitásának értékelése nagy jelentőséggel bír, figyelembe véve a mag alapvető szerepét a stressz adaptációban. A stressz ($F_{3,22}=50.79$; $p<0.00001$), és a stressz × genotípus interakció ($F_{3,22}=51.28$; $p<0.00001$) erősen szignifikánsnak bizonyult. A *post hoc* tesztek szerint a WT egerek CVMS hatására közel 14-szeres FosB pozitív sejtszám növekedést mutattak (**26.A. ábra** ‘a’ és ‘c’ oszlop; $p<0.000001$). A PACAP KO állatok nem reagáltak a CVMS-re (lásd a ‘b’ és ‘d’ oszlopokat; $p=0.98$).

A mPVN területén (**26.B. ábra**) az ANOVA szerint csak a stressz hatása volt szignifikáns ($F_{3,22}=6.20$; $p<0.03$), a genotípusé és az interakciójé nem. A CVMS csak a WT állatokban növelte hatékonyan a FosB pozitív neuronok számát ($p<0.02$).

2.2.1.5. Periaqueductalis szürkeállomány

A lPAG területén (**26.D. ábra**) a stressz ($F_{3,22}=5.14$; $p<0.04$) és a stressz × genotípus interakció ($F_{3,22}=4.63$; $p<0.05$) befolyásolta a FosB expressziót. A *post hoc* teszt szerint a CVMS képes volt emelni a FosB expressziót a WT egerekben (vö. a **26.D. ábra** ‘a’ és ‘c’ oszlopát; $p<0.01$), nem úgy mint a KO egerek esetében (‘b’ és ‘d’ oszlop; $p=0.94$).

A dPAG területén (**4. táblázat**) csak negatív eredményeket találtunk a FosB expresszió szempontjából (az adatokat nem tüntettük fel).

2.2.1.6. Centrális projekciójú Edinger-Westphal mag

Két utas ANOVA szerint a stressz hatása szignifikánsnak bizonyult ($F_{3,22}=6.56$; $p<0.03$). CVMS hatására a FosB expresszió csak a WT egerekben emelkedett szignifikáns mértékben (összehasonlítva a **26.E. ábra** ‘a’ és ‘c’ oszlopát; $p<0.05$), míg a KO egerek esetében nem.

2.2.1.7. Nucleus raphe dorsalis

A stressz ($F_{3,22}=18.21$; $p<0.001$) és a stressz × genotípus interakció ($F_{3,22}=8.44$; $p<0.01$) hatása statisztikailag bizonyítható volt. A csoportpárok összehasonlításánál azt találtuk, hogy a WT egerek több mint hatszoros FosB expresszió növekedéssel reagáltak a CVMS-re (**26.F. ábra** ‘a’ és ‘c’ oszlop; $p<0.0001$). A DR a KO egerekben nem reagált a CVMS-re FosB expresszió szempontjából.

2.2.2. A FosB neuronális aktivációs mintázat imipraminnal vagy vivőanyagával kezelt WT és PACAP KO egereknél CMVS hatására (2. adathalmaz, 5. táblázat)

2.2.2.1. Tágabb értelemben vett amygdala magkomplex

A CeA területén (**27.A. ábra**) a CVMS ($F_{7,41}$=9.26; p<0.01), a kezelés ($F_{7,41}$=8.43; p<0.01) és a genotípus × kezelés interakciója ($F_{7,41}$=4.22; p<0.05) szignifikáns hatást fejtett ki a FosB neuronális aktivációra. A vivőanyaggal (lásd az 'a' és 'e' oszlopokat; p=0.38) és az imipraminnal való kezelés ('c' és 'g' oszlop) a WT egerekben CVMS hatására nem mutatott FosB expresszió növekedést. Ezzel ellentétben, a KO egerekben az imipraminnal való kezelés növelte a FosB expressziót a CeA területén CVMS hatására ('f' *vs.* 'h' oszlop; p<0.001). A FosB immunreaktivitás nagyságának mértéke szignifikánsan eltompult a KO egereknél, összehasonlítva a WT állatokkal, a vivőanyaggal kezelt csoport párok esetén ('e' és 'f' oszlop; p<0.03). Nincs azonban szignifikáns különbség az imipraminnal kezelt stresszelt KO és WT egerek között ('g' vs. 'h' oszlop; p=0.28).

A MeA területén (**27.B. ábra**) a stressz ($F_{7,40}$=28.46; p<0.0001) és a kezelés ($F_{7,40}$=7.28; p<0.02) is szignifikáns hatást fejtett kis a FosB expresszióra. A hozzávetőlegesen kétszeresére növekedett FosB expresszió szignifikánsnak bizonyult a vivőanyaggal ('a' *vs.* 'e' oszlop; p<0.03) és az imipraminnal kezelt ('c' és 'g' oszlop; p<0.01) WT állatok esetén is. KO egereknél a FosB expresszió szignifikánsan magasabb volt stressz hatására, ha az egereket imipraminnal kezeltük ('d' és 'h' oszlop; p<0.01), míg a vivőanyaggal kezelt KO állatok csak tendenciózus növekedését mutatják a FosB expressziónak ('b' és 'f' oszlop; p=0.069) CVMS hatására.

Összefoglalva tehát a CVMS hatásosan növelte a neuronális aktivitást a WT egerekben a CeA és a MeA területén egyaránt. Az imipramin kezelés szükséges volt ahhoz, hogy létre jöjjön a CVMS-indukálta FosB expresszió növekedés a PACAP KO egereknél a CeA és a MeA területén. A BLA területén semelyik faktor, és azok interakciói sem befolyásolták a FosB expressziót (az adatokat nem tüntettük fel).

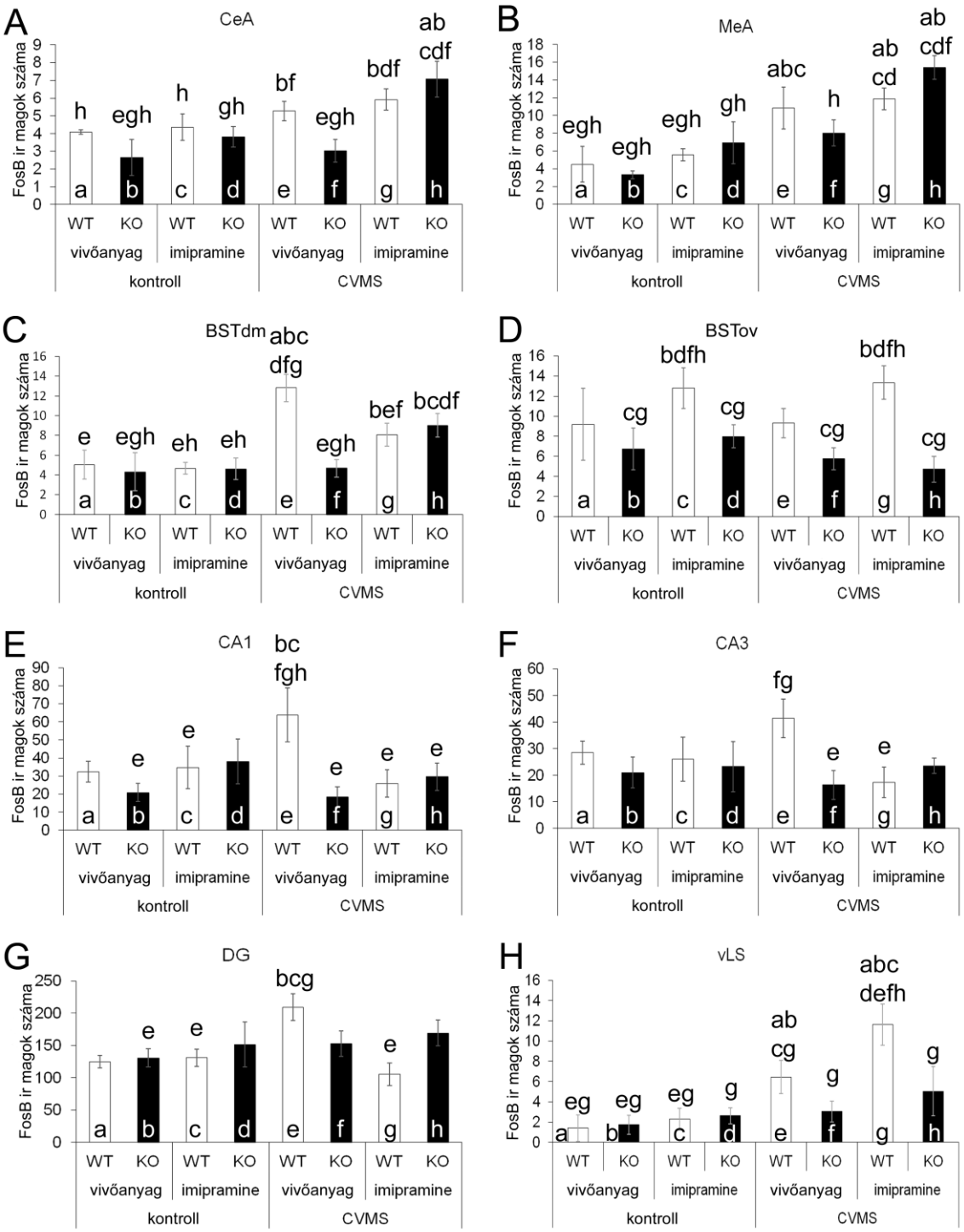
A BSTdm területén (**27.C. ábra**) a FosB expressziót a stressz ($F_{7,40}$=18.33; p<0.001), a genotípus ($F_{7,40}$=4.56; p<0.05), továbbá a kezelés × genotípus interakciója ($F_{7,40}$=6.58; p<0.02) és a stressz × kezelés × genotípus interakciója ($F_{7,40}$=5.05; p<0.04) is befolyásolta. CVMS hatására FosB expresszió növekedése közel kétszeres volt a vivőanyaggal kezelt stresszelt WT egerek esetében, összehasonlítva a kontrolljaikkal (vö. az 'a' és 'e' oszlopot; p<0.001). Érdekes, hogy a CVMS okozta FosB expresszió növekedést az imipramin kezelés megszűntette a WT egereknél, összehasonlítva a

kontroll WT állatokkal (**27.C. ábra** ‘c’ és ‘g’ oszlop; p=0.06) vagy a stresszelt vivőanyaggal kezelt (‘e’ és ‘g’ oszlop; p<0.01) WT egerekkel. A KO állatok viszont magasabb FosB aktivitást mutattak a BSTdm területén, ha imipramin kezelést alkalmaztunk (‘f’ és ‘h’ oszlop; p<0.04).

Az BSTov területén (**27.D. ábra**) a FosB immunreaktív neuronok számát a genotípus ($F_{7,39}$=15.67; p<0.001) befolyásolta. Az imipraminnal kezelt KO egereknél ezen agyterületen 50-100%-kal kevesebb FosB pozitív sejtet számoltunk (p<0.05), mint a megfelelő WT típusú állatoknál (**27.D. ábra**), habár a vivőanyaggal kezelt WT és KO csoport párok között nem volt szignifikáns különbség (összehasonlítva a **27.D. ábra** ‘a’ *vs.* ‘b’ oszlop párokat; p=0.38 és ‘e’ *vs.* ’f’ oszlop párokat; p=0.11).

A BSTdl területén a FosB expressziót szignifikánsan nem befolyásolta a stressz, a genotípus, a kezelés és ezek interakciói sem (az adatokat nem tüntettük fel).

A BSTv területén pedig mindössze a genotípus × kezelés interakciója ($F_{7,41}$=7.81; p<0.01) bizonyult szignifikánsnak azonban a *post hoc* tesztek nem találtak figyelemre méltó különbségeket (az adatokat nem tüntettük fel).



27. ábra: FosB immunreaktivitás injekciós kezelésben részesült egereknél. Az oszlopdiagrammok a FosB immunreaktív (ir) neuronok számát mutatják be rendre a nucleus centralis amygdalae CeA (**A**), a nucleus medialis amygdalae (MeA) (**B**), a nucleus interstitialis striae terminalis (BST) dorsomedialis (BSTdm) (**C**), ovalis (BSTov) (**D**) divíziói, a hippocampus CA1 (**E**) és CA3 áreája (**F**), a gyrus dentatus (DG) (**G**) és a nucleus lateralis septi ventrális (vLS) része (**H)** területén. A világos oszlopok a PACAP vad típusú (WT) egereket, a sötétek a PACAP génhiányos (KO) egerek eredményeit képviselik. Az oszlopok feletti betűjelek azokat a csoportpárokat jelölik, amelyek között szignifikáns különbség van a Fisher-féle *post hoc* teszt szerint ($p<0,05$). CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz.

2.2.2.2. Hippocampus

A FosB expressziót a CA1 ($F_{7,41}$=4.79; p<0.04), a CA3 ($F_{7,41}$=4.44; p<0.05) és a DG területén ($F_{7,40}$=4.41; p<0.05) csak a kezelés × genotípus interakció befolyásolta. CVMS hatására a WT egereknél az imipramin kezelés hatására szignifikánsan csökkent a FosB expresszió [lásd az 'e' és 'g' oszlopot a **27.E. ábrán** a CA1-ban (p<0.01); **27.F. ábrán** a CA3-ban (p<0.02); és a **27.G. ábrán** a DG-ban (p<0.01)].

2.2.2.3. Nucleus septi lateralis

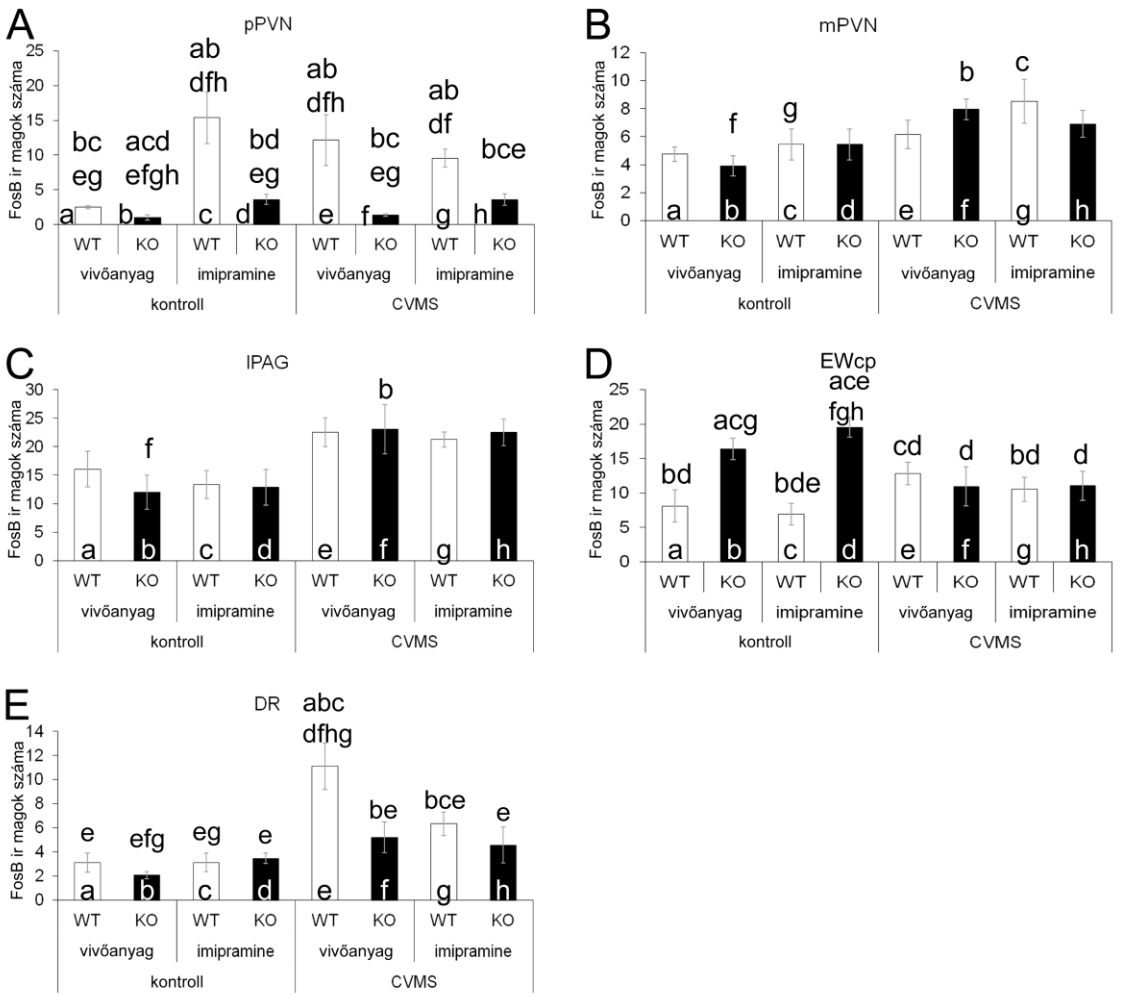
A vLS területén (**27.H. ábra**) a MANOVA szerint szignifikáns hatása volt a stressznek ($F_{7,41}$=20.02; p<0.001), a kezelésnek ($F_{7,41}$=4.92; p<0.04) és a genotípusnak ($F_{7,41}$=5.32; p<0.03), továbbá a stressz × genotípus interakciónak ($F_{7,41}$=6.90; p<0.02) is. A CVMS növelte a FosB expressziót a vivőanyaggal kezelt (lásd a **27.H. ábra** 'a' és 'e' oszlopát; p<0.03) és az imipraminnal kezelt ('c' és 'g' oszlop; p<0.0001) WT egereknél. KO egerek esetében a CVMS egyik csoportban sem növelte a FosB expressziót.

A dLS területén a CVMS nem befolyásolta a FosB neuronális aktivitást szignifikáns mértékben, továbbá a genotípus, a kezelés és ezek interakciói is hatástalanok voltak (az adatokat nem tüntettük fel).

2.2.2.4. Nucleus paraventricularis hypothalami

A pPVN területén a kezelt csoportok esetén (**28.A. ábra**) a stressz ($F_{7,41}$=5.67; p<0.03), a kezelés ($F_{7,41}$=15.14; p<0.001) és a genotípus ($F_{7,41}$=33.91; p<0.00001) hatása is erősen szignifikánsnak bizonyult a FosB immunreaktivitásra. A MANOVA szerint stressz × kezelés ($F_{7,41}$=9.61; p<0.01) interakció is megfigyelhető volt. A *post hoc* teszt szerint a CVMS közel ötszörös, szignifikáns FosB expresszió növekedést okozott a vivőanyaggal kezelt WT csoportban (**28.A. ábra** 'a' és 'e' oszlop; p<0.01). Érdekes, hogy az imipramin kezelés hatalmas FosB expresszió növekedést okozott a kontroll WT egereknél, ('a' és 'c' oszlop; p<0.001), melynek mértéke hasonló volt a CVMS hatásához a vivőanyaggal kezelt WT egerek esetében ('c' és 'e' oszlop; p=0.60). A PACAP KO egerek nem reagáltak a CVMS-re. Az imipramin indukált FosB expresszió növekedés a KO egerek esetében is szignifikánsnak bizonyult (összehasonlítva a 'b' és 'd' oszlopot; p<0.01), de a növekedés mértéke kisebb volt, összehasonlítva a WT állatokkal ('c' és 'd' oszlop; p<0.01).

A mPVN területén (**28.B. ábra**) MANOVA szerint csak a stressznek volt szignifikáns hatása ($F_{7,41}$=8.46; p<0.01), a kezelésnek, a genotípusnak és ezek interakcióinak nem.



28. ábra: FosB immunreaktivitás injekciós kezelésben részesült egereknél. A hisztogrammok a FosB immunreaktív (ir) neuronok számát demonstrálják a hypothalamus parvocellularis (pPVN) (**A**) és magnocellularis (mPVN) (**B**) paraventricularis magjában, a periaqueductalis szürkeállomány laterális divíziója (lPAG) (**C**), a centrális projekciójú nucleus Edinger-Westphal (EWcp) (**D**) és a nucleus raphe dorsalis (DR) (**E**) területén. A világos oszlopok a PACAP vad típusú (WT) egereket, a sötétek a PACAP génhiányos (KO) egerek eredményeit képviselik. Az oszlopok feletti betűjelek azokat a csoportpárokat jelölik, amelyek között szignifikáns különbség van a Fisher-féle *post hoc* teszt szerint ($p<0,05$). CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz.

2.2.2.5. Periaqueductalis szürkeállomány

A lPAG területén (**28.C. ábra**) a CMVS befolyásolta a FosB expressziót ($F_{7,41}=15.53$; $p<0.001$), de a kezelésnek, a genotípusnak és ezek interakciójának nem volt szignifikáns hatása. A CVMS hatékonyan növelte a FosB immunreaktivitást a KO egereknél (‘b’ és ‘f’ oszlop).

A dPAG területén (**4. táblázat**) csak negatív eredményeket kaptunk. (az adatokat nem tüntettük fel).

2.2.2.6. Centrális projekciójú Edinger-Westphal mag

Ezen az agyterületen (**28.D. ábra**) MANOVA szerint a genotípusnak ($F_{7,40}$=11.12; p<0.01) és a stressz × genotípus ($F_{7,40}$=14.43; p<0.001) interakciónak szignifikáns hatása volt a FosB expresszióra. A kontroll csoportok esetén a KO egereknél magasabb volt a FosB pozitív neuronok száma, mint a WT állatoknál (összehasonlítva a **28.D. ábra** 'a' és 'b' oszlop párokat; p<0.02 vagy a 'c' és 'd' oszlopokat; p<0.001), azonban ez a különbség CVMS hatására eltűnt.

2.2.2.7. Nucleus raphe dorsalis

Ezen az agyterületen (**28.E. ábra**) a stressz ($F_{7,41}$=23.87; p<0.0001), a genotípus ($F_{7,41}$=7.00; p<0.02), továbbá a stressz × kezelés ($F_{7,41}$=4.66; p<0.04) és a stressz × genotípus ($F_{7,41}$=4.88; p<0.04) interakciója is szignifikáns hatással bírt a FosB expresszióra. A vivőanyaggal kezelt WT egereknél a CVMS háromszorosára növelte a FosB pozitív neuronok számát (**28.E. ábra** 'a' és 'e' oszlop; p<0.001). Ellenben az imipraminnal kezelt WT állatok esetében a FosB expresszió növekedés szignifikánsan kisebb mértékű volt (**28.E. ábra** 'e' és 'g' oszlop; p<0.01). KO egereknél a CVMS nem növelte a FosB expressziót a DR területén.

2.3. CRF-FosB kettős immunfluoreszcens jelölés az BSTov területén

Az BSTov területén a neuronális aktiváció további értékeléséhez a CRF és a FosB kolokalizációját vizsgáltuk az idegsejteken (**29. ábra**).

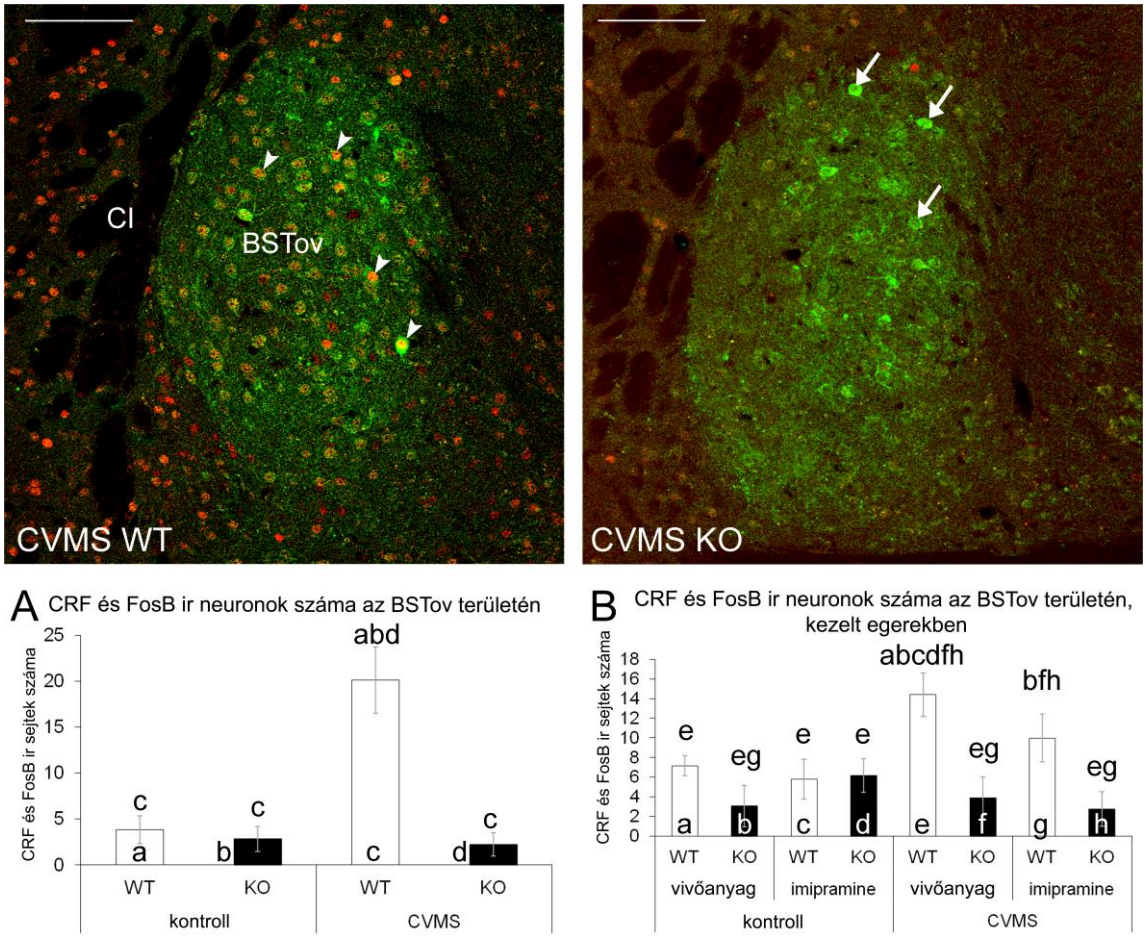
A nem kezelt egerek esetében (1. adathalmaz) a stressz ($F_{3,22}$=7.19; p<0.01) és a genotípus ($F_{3,22}$=10.38; p<0.000); továbbá ezek interakciójának hatása is szignifikánsnak bizonyult ($F_{3,22}$=8.34; p<0.02). A WT állatoknál (**29.A. ábra** 'a' és 'c' oszlop; p<0.0001) egyértelmű FosB expresszió növekedést találtunk a CRF neuronokban, míg a KO egerek esetében ez elmaradt (összehasonlítva a **29.A. ábra** 'b' és 'd' oszlopát; p=0.89).

A kezelt csoportok (2. adathalmaz) összehasonlítása során azt találtuk, hogy a genotípus ($F_{7,41}$=10.47; p<0.02) és a stressz × genotípus interakció ($F_{7,41}$=6.41; p<0.01) hatása szignifikáns volt. A vivőanyaggal kezelt WT csoportok esetében a CVMS szignifikáns FosB expresszió növekedést okozott a CRF neuronokon (**29.B. ábra** 'a' és 'e' oszlop; p<0.04), ellenben az imipraminnal kezelt WT egereknél, ez nem érte el a szignifikancia szintjét ('c' és 'g' oszlop; p=0.16). A *post hoc* tesztek szerint az BSTov CRF neuronjai egyáltalán nem reagáltak a KO állatok esetében.

A CRF immunreaktivitást a SSD meghatározás módszerével is értékeltük, melynek során nem találtunk szignifikáns hatást (**6. és 7. táblázat**) a vizsgált faktorok tekintetében (az adatokat nem tüntettük fel).

A BSTov területén a CRF neuronok számát a genotípus ($F_{7,41}$=7.48; p<0.02) szignifikánsan befolyásolta, azonban a CVMS, a kezelés és ezek interakciója nem (az adatokat nem tüntettük fel).

Összefoglalva tehát, a BSTov CRF neuronjaiban a CVMS indukálta változások nem bizonyultak szignifikánsnak az imipraminnal kezelt WT egereknél. A PACAP KO állatok nem reagáltak a CVMS-re, így az imipramin kezelés nem volt képes visszafordítani a CMVS hatását.



29. ábra: Kettős immunfluoreszcens jelölést ábrázoló reprezentatív felvételek a nucleus interstitialis striae terminalis ovális régiójában (BSTov) krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) után. A zöld jel a *corticotropin releasing factor* (CRF), a piros a FosB aktivitást mutatja CVMS hatására vad típusú (WT) és PACAP génhiányos (KO) egerekben. A nyílhegyek FosB immunreaktív (ir) magokat mutatnak a CRF neuronokban. A nyilak olyan CRF neuronokat jelölnek, melyek nem mutatnak FosB immunreaktivitást. Az (**A**) hisztogramm a BSTov területén CRF és FosB kolokalizációt mutató neuronok számát ábrázolja az injekciós kezelésben nem részesült egerek csoportjaiban. A (**B**) panel a CRF-FosB kolokalizációt mutató neuronok számát mutatja

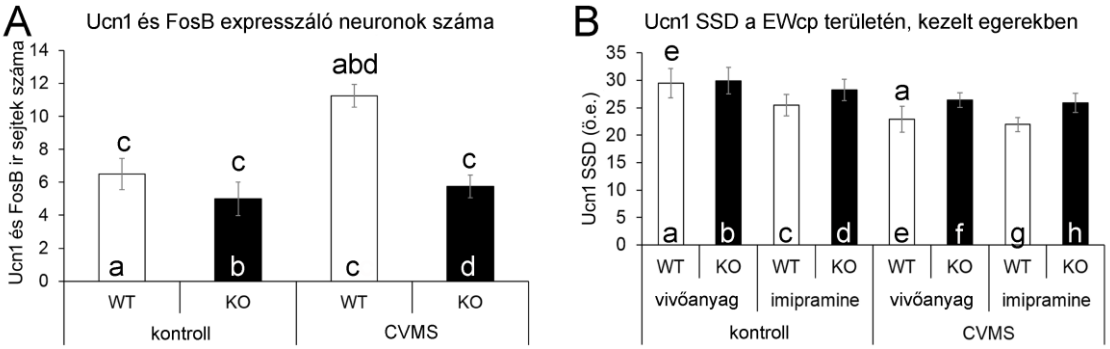
kezelt állatokban. A világos oszlopok a PACAP vad típusú (WT) egerek, a sötétek a PACAP génhiányos (KO) egerek eredményeit reprezentálják. Az oszlopok feletti betűjelek azokat a csoportpárokat jelölik, amelyek között szignifikáns különbség van a Fisher-féle *post hoc* teszt szerint ($p<0,05$). CI: capsula interna, CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz. Lépték: 100µm.

2.4. Ucn1-FosB kettős immunfluoreszcens jelölés az EWcp területén

Az urokortinerg rendszer további vizsgálatához a FosB pozitív Ucn1 neuronok mennyiségi meghatározását végeztük az EWcp területén (**30.A. ábra**). A nem kezelt egereknél az Ucn1-FosB kettősen jelölt neuronok számát a stressz ($F_{3,22}=7.68$; $p<0.02$) és a genotípus ($F_{3,22}=12.44$; $p<0.01$) egyaránt befolyásolta. A *post hoc* tesztek szerint az Ucn1-FosB pozitív sejtek száma hozzávetőlegesen kétszer magasabb a CVMS-nek kitett WT egereknél (összehasonlítva a **30.A. ábra** ‘a’ és ‘c’ oszlopát; $p<0.01$), míg a KO állatok erre nem reagáltak (lásd a ‘c’ és ‘d’ oszlopot; $p=0.57$).

Az Ucn1-FosB pozitív sejtek számának összehasonlításából kiderült, hogy a kezelt csoportokban nincs szignifikáns hatása egyik vizsgált faktornak sem, azonban a genotípusnak erős tendenciája van ($F_{7,41}=4.12$; $p=0.051$) (az adatokat nem tüntettük fel). Az Ucn1 SSD-át is értékeltük. A stressz hatása az Ucn1 immunjelre szignifikánsnak bizonyult ($F_{7,41}=7.98$; $p<0.01$) nem úgy, mint a kezelés és a genotípus hatása (**30.B. ábra**). A *post hoc* tesztek alapján a stresszelt, vivőanyaggal kezelt WT egereknél 22%-kal alacsonyabb Ucn1 SSD-t találtunk az cpEW területén, mint a nem stresszelt csoportban (összehasonlítva a **30.A. ábra** ‘a’ és ‘e’ oszlopát; $p<0.04$). Az Ucn1 neuronok immunreaktivitását csak a genotípus ($F_{3,22}=5.37$; $p<0.04$) befolyásolta, és a KO egerek esetén 15%-kal kevesebb Ucn1 neuront találtunk (az adatokat nem tüntettük fel).

Összefoglalva tehát látható, hogy az Ucn1 befolyásolja a CVMS-re adott választ WT egereknél, azonban az imipramin hatástalan volt. A EWcp-Ucn1 neuronok viszont nem reagáltak a PACAP KO állatok esetében.



30. ábra: Az (**A**) hisztogramm az urokortin1 (Ucn1) és FosB immunreaktív (ir) neuronok számát jelképezi az injekciós kezelésen át nem esett egerekben. A (**B**) panel az Ucn1 neuronok specifikus jeldenzitását (SSD) mutatja kezelt egerekben a centrális projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp) területén önkényes egységben (ö.e.) kifejezve. A világos oszlopok a PACAP vad típusú (WT) egerek, a sötétek a PACAP génhiányos (KO) egerek eredményeit képviselik. Az oszlopok feletti betűjelek azokat a csoportpárokat jelölik, amelyek között szignifikáns különbség van a Fisher-féle *post hoc* teszt szerint ($p<0,05$). CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz.

2.5. 5-HT- FosB kettős immunfluoreszcens jelölés a DR területén

CVMS modellben a PACAP KO egereknél a DR stressz adaptációban betöltött szerepének további vizsgálata céljából meghatároztuk a FosB pozitív 5-HT expresszáló sejtek számát. Habár a PAG területén néhány neuron mutatott FosB immunreaktivitást, és láttunk néhány elszórt FosB pozitív magot a DR területén, de ezek közül egy sem tartozott 5-HT neuronhoz. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a CMVS nem indukál immunfluoreszcenciával kimutatható FosB expressziót a DR 5-HT neuronjaiban. Irodalmi adatok alapján azt feltételezzük, hogy ezek az 5-HT sejteken kívüli FosB pozitív magok a GABA-erg rendszer DR neuronjaihoz tartozhatnak (Nanopoulos és mtsai., 1982., Bagdy és mtsai., 2000., Lin 2015.).

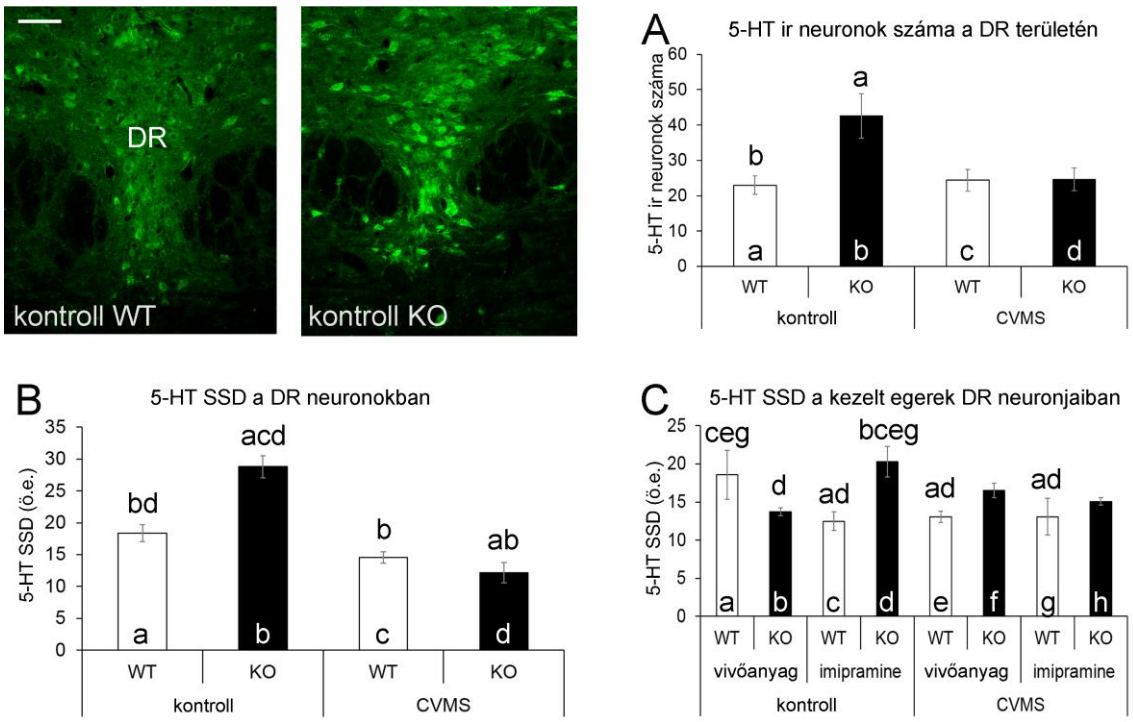
Következő lépésben megszámoltuk a 5-HT termelő idegsejteket a DR területén a nem kezelt egereknél (**31.A. ábra**). A genotípus hatása szignifikánsnak bizonyult ($F_{3,22}=4.84$; $p<0.05$), ellenben a stresszé, és ezek interakciójáé nem. *Post hoc* tesztek szerint a kontroll KO egerek esetében majdnem kétszer több 5-HT neuront számoltunk, mint a WT állatoknál (összehasonlítva a **31.A. ábra** ‘a’ és ‘b’ oszlopát; $p<0.01$). A CVMS hatására ez a különbség eltűnt. A DR 5-HT neuronjainak számát egyik vizsgált faktor sem befolyásolta a kezelt csoportokban (az adatokat nem tüntettük fel).

Az 5-HT-SSD-t is értékeltük (**31.B. ábra**). A nem kezelt egereknél ANOVA szerint a stressz ($F_{3,22}=46.61$; $p<0.00001$), a genotípus ($F3_{3,22}=7.19$; $p<0.02$) és a stressz × genotípus interakció ($F_{3,22}=18.42$; $p<0.001$) hatása erősen szignifikánsnak mutatkozott. A kontroll KO egerek esetében 36.22%-kal magasabb 5-HT-SSD-t találtunk, mint a WT

állatoknál (összehasonlítva a **31.B. ábra** ‘a’ és ‘b’ oszlopát; $p<0.001$), azonban CVMS hatására ez a genotípusok közötti különbség eltűnt.

A kezelt csoportok összehasonlításából kiderül, hogy nincs szignifikáns hatás, azonban a kezelés × genotípus interakció ($F_{7,41}=5.19$; $p<0.04$) továbbá a stressz × kezelés × genotípus harmadrendű interakciója szignifikánsnak bizonyult ($F_{7,41}=7.90$; $p<0.01$). Az imipramin kezelés hatékonyan csökkentette az 5-HT SSD-t hozzávetőlegesen 20%-kal a WT egerek (**31.C. ábra** ‘a’ és ‘c’ oszlop; $p<0.02$) csoportjaiban. Ezzel ellentétben az imipramin kezelés a KO egereknél 32.32%-os növekedést eredményezett az 5-HT-SSD-t illetően a kontrollokban (összehasonlítva a ‘b’ és ‘d’ oszlopot; $p<0.02$). A CVMS szignifikánsan csökkentette az 5-HT immunreaktivitását a vivőanyaggal kezelt WT egereknél (‘a’ és ‘e’ oszlop; $p<0.03$), míg a KO egerek esetében nem találtunk ilyen különbséget (‘b’ és ‘f’ oszlop; $p=0.27$). A CVMS hatása nem csökkentette az 5-HT-SSD-t az imipraminnal kezelt (‘e’ és ‘g’ oszlop; $p=0.93$) WT állatoknál. A stresszelt csoport párok összehasonlításánál nem találtunk szignifikáns különbséget a kezelés és a genotípus alapján ($p>0.05$).

Összefoglalva tehát, a DR az intakt PACAP KO egerekben több 5-HT-t tartalmaz, mint a WT egerek esetében. Az imipramin injekció a kontroll WT és KO egerekben ellentétes hatással bír a DR-5-HT tekintetében. A CVMS hatására eltűnnek ezek a különbségek.



31. ábra: Szerotonin (5-HT, zöld) immunfluoreszcens jelölés a nucleus raphe dorsalis (DR) területén kontroll, nem kezelt PACAP vad típusú (WT) és kontroll kezeletlen PACAP génhiányos, (*knockout*, KO) egerekben. Az (**A**) hisztogramm a szerotonin immunreaktív (ir) neuronok számát és azok specifikus jeldenzitását (**B**) (SSD) mutatja önkényes egységben (ö.e.) kifejezve a DR területén kezeletlen egerekben. A (**C**) panel az 5-HT-SSD értéket kezelt egerekben mutatja. A világos oszlopok a WT egereket, a sötétek a PACAP KO egerek eredményeit képviselik. Az oszlopok feletti betűjelek azokat a csoportpárokat jelölik, amelyek között szignifikáns különbség van a Fisher-féle *post hoc* teszt szerint ($p<0.05$). CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz. Lépték: 50 µm.

V. Eredményeink összefoglalása, megbeszélése az irodalmi adatok tükrében, következtetések

1. Szorongás és akut stressz-reakció vizsgálata PACAP génhiányos egerekben viselkedési és c-Fos immunhisztokémiai módszerekkel

Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a PACAP KO egerek viselkedése eltér a WT állatoktól: *open field* tesztben fokozott lokomotoros aktivitással rendelkeztek, FST-ben kifejezettebb depresszió-szerű viselkedést mutattak, *light-dark box* tesztben és *marble burying* tesztben pedig alacsonyabb szorongási szintet tanúsítottak, mint vad típusú társaik. A PACAP hiánya csökkentette a FST hatására bekövetkező neuronális aktivációt jelző c-Fos expressziót a tágabb értelemben vett amygdala magkomplex, a LS, a PVN, a EWcp és a DR területén. Mindez arra utal, hogy a PACAP az állat hangulatát befolyásoló hatását ezeken az agyterületeken fejti ki.

1.1. Viselkedés-vizsgálatok

Az irodalmi adatokkal összhangban (Hashimoto és mtsai., 2009.) azt tapasztaltuk, hogy a PACAP KO egerek depresszió-szerű viselkedést mutattak FST-ben, 17.9%-kal hosszabb időtartamú immobilitást mutattak, WT társaikkal összehasonlítva. A viselkedés vizsgálatok mellett számos további kutatás alátámasztja a KO egerek markáns depresszió-szerű viselkedését, mint a testhőmérséklet és a kortikoszteron szintek kisebb mértékű cirkadián ritmusa. Az egereket jellemzi továbbá a glükokortikoid receptor mRNS csökkent expressziója a hippocampusban (Hashimoto és mtsai., 2009.), valamint hogy antidepresszáns kezeléssel, illetve a PACAP beadásával sikerült a megfigyelt depresszió-szerű viselkedési mintákat megszűntetni (Hashimoto és mtsai., 2009.).

A FST-ben megfigyelt depresszió-szerű viselkedést korábban részletesen tanulmányozták, és bizonyították, hogy antidepresszáns kezelés az immobilitási időt csökkenti (Cryan és Mombereau 2004., Hashimoto és mtsai., 2009.). Látszólag ellentmondásosnak tűnhet, hogy a PACAP KO egereinknél tapasztalt jelentős szorongási szint csökkenés mellett FST-ben depresszió-szerű viselkedést találtunk, de a magasabb immobilitási idő értelmezhető egy energetikailag takarékos alternatív megküzdési stratégiaként is (Geyer és Markou 1995.), mely valószínűleg agytörzsi monoaminerg rendszerek direkt hatása alatt áll (Schmidt és mtsai., 2009.). PACAP

hiányban a DR területén jelentősen csökkent a c-Fos válasz nagysága, mely mint monoaminerg mechanizmus állhat a megfigyelt viselkedési eltérések hátterében. Ezt alátámasztja az is, hogy a DR szerotoninerg idegsejtjei a peptiderg rendszerekkel interakcióban fontos szerepet játszanak a stresszel való megküzdésben (Valentino és mtsai., 2010.).

Hashimoto és munkatársai 2001-ben közölt munkájával összhangban *open field* tesztben magasabb lokomotoros aktivitást és a PACAP KO állatokra jellemző ugráló viselkedést tapasztaltuk mi is, azonban az ő eredményeikkel ellentétben mi azt találatuk, hogy a PACAP KO állatok kevesebb időt töltenek a központi nyitott területeken, mely megnövekedett szorongási szintre utalhat. Ez az ellentmondás azzal magyarázható, hogy mi 5 percig vizsgáltuk az állatokat *open field* tesztben, míg Hashimoto munkacsoportja egy hosszabb tesztben, a 30. percet meghaladó periódusban mutatott ki szignifikáns különbséget, ahol a génhiányos állatok töltöttek több időt az *open field* központi zónájában. Továbbá a Hashimoto munkacsoport szerint a KO egerek aktívabban explorálják környezetüket, ezért a falnál töltött hosszabb időt az állatok aktívabb kereső-felfedező magatartásával, és nem azok magasabb szorongási szintjével lehet magyarázni. Mindezeket a *light-dark box* és *marble burying* tesztek eredményei is alátámasztották, ahol a KO egerek csökkent szorongási szintet tanúsítottak.

Az alacsonyabb szorongási szinteket már korábban is kimutatták emelt keresztpalló, új objektum felismerési és *emergence* tesztekben (Hashimoto és mtsai., 2001.), legjobb tudomásunk szerint azonban mi vizsgáltuk először ezeket az egereket *marble burying* és *light-dark box* paradigmákban, és a korábbi eredményekkel egybehangzóan egyértelműen a KO egerek csökkent szorongási szintjét találtuk. A KO egerek kevesebb üveggolyót ástak el *marble burying* tesztben, és kevesebb időt töltöttek a sötét kompartmentben *light-dark box* tesztben. Az *open field* teszt eredményeihez hasonlóan, a *light-dark box* tesztben is megfigyelhettük, hogy a mutáns egerek magasabb lokomotoros aktivitással rendelkeznek, ugyanis szignifikánsan többször léptek át egyik kompartmentből a másikba. A világos kompartmentbe való kitekintések számát is vizsgáltuk, melyet a világos térfélre való kilépés meghiúsult kísérleteként értelmeznek, ami magas szorongási szintre utal (Bourin és Hascoët 2003.). Kísérleteinkben a PACAP KO egerek ugyan többször tekintettek ki a világos térfélre, mint vad típusú társaik, de ezt követően gyakoribb volt a sikeres kilépések száma is a világos kompartmentbe, ami viszont alacsonyabb szorongási szintre utal.

A FST-ben tapasztalt depresszió-szerű viselkedés, és a csökkent szorongásra utaló magatartás együttes jelenléte ugyanabban az állatban ellentmondásosnak tűnhet,

azonban a hangulatzavarok és a szorongásos betegségek gyakran együtt jelennek meg (McEvoy és mtsai., 2011.) és nem feltétlenül közös a neurobiológiai hátterük. Nemrégiben kimutatták, hogy a BSTdl-ben a CRF lokális overexpressziója depresszió-szerű fenotípust idéz elő, anélkül hogy a szorongást befolyásolná, míg a CRF overexpressziója a CeA területén csökkenti a stressz-indukálta szorongást, de a depresszió-szerű viselkedésre nincs hatással (Regev és mtsai., 2011.). Tekintettel arra, hogy patkányokban ezek a magok, különösen a CRF neuronok, PACAP tartalmú beidegzéssel rendelkeznek (Hannibal 2002., Kozicz és mtsai., 1997.), feltételezhető hogy a PACAP a CRF neuronokon keresztül agyterület-specifikus módon hatással lehet a viselkedésre. PACAP hiányában a BSTdl területén megfigyelt csökkent c-Fos expresszió arra utalhat, hogy a PACAP elősegítheti e neuronok aktivációját. A CeA területén a PACAP-nak gátló hatása lehet, ugyanis itt a peptid hiánya nem csökkenti a c-Fos expressziót.

1.2. A stressz központok FST kiváltotta aktivációs mintázatának értékelése c-Fos segítségével

1.2.1. Általános szempontok

A c-fos nevű azonnali gén terméke (c-Fos) az idegtudományban általánosan alkalmazott és elfogadott neuronális aktivációs marker (Kovács 2008.). A FST után 2 órával perfundált állatok agymintáin c-Fos immunhisztokémiát végeztünk, és az irodalmi adatokkal összhangban (Stone és mtsai., 2007., Kovács 1998.) azt találtuk, hogy a vad típusú egerekben a FST minden vizsgált agyterületen jelentős c-Fos expresszió-emelkedést okozott. Ennek mértéke azonban függ a vizsgált agyterülettől: például a dLS területén közel négyszeres c-Fos expresszió emelkedést tapasztaltunk, míg a DR területén ez több mint 75-szörös volt (**3. táblázat**). Eszerint az egyes stressz központok különböző mértékben érzékenyek a FST-re, összhangban az irodalmi adatokkal (Duncan és mtsai., 1993., Cullinan és mtsai., 1995., Kovács 1998.).

Kutatásunk legfontosabb eredménye, hogy a FST által kiváltott c-Fos aktiváció PACAP KO egerekben jelentős mértékben elmarad számos (BSTov, BSTdl, BSTv, vLS, EWcp, DR, dPAG, lPAG), de nem minden (CeA, MeA, BSTdm, dLS) vizsgált agyterületen. Ezek alapján feltételezzük, hogy a PACAP hiányában megfigyelt, nagymértékben csökkent szorongási szint hátterében a stressz-magok csökkent érzékenysége állhat.

Az **3. táblázatban** összehasonlítottuk a stressz-genotípus interakció hatásának nagyságát a c-Fos expresszióra. A legerősebb hatást a DR, a EWcp és a lPAG területén

tapasztaltuk a vizsgált agyterületek közül. A leszálló antinociceptív rendszerekhez tartozik a lPAG (Heinricher és mtsai., 2009.), míg a megfigyelt viselkedésbeli eltérésekben a DR és az EWcp játszhatnak fontos szerepet. Mind a szerotoninerg neuronok a DR-ban, mind az Ucn1-et termelő perikarionok az EWcp területén hozzájárulnak a stresszel kapcsolatos hangulatzavarok, és a szorongás kialakulásához (Kozicz és mtsai., 2008., Savitz és mtsai., 2010., Lowry és mtsai., 2008.). A DR neuronok c-Fos expressziója szorongás-szerű viselkedést eredményez (Bouwknecht és mtsai., 2007.); továbbá az EWcp urokortinerg idegsejtjei interakcióba léphetnek a DR szerotoninerg neuronjaival (Kozicz 2010., Neufeld-Cohen és mtsai., 2010.). A DR, a EWcp és a lPAG is PACAP tartalmú rostok beidegzése alatt áll (Hannibal 2002.) és ezekben a magokban a PACAP receptorai is kifejeződnek (Vaudry és mtsai., 2009.), ezért ezeken a területeken adottak a PACAP hatásának neuroanatómiai alapjai.

Más magokban (mPVN, pPVN, BSTov, BSTdl, BSTv, BLA) a stressz-genotípus interakció hatása kevésbé volt markáns, mégis nagymértékben szignifikánsnak bizonyult (3. táblázat). A FST által kiváltott c-Fos expresszió ezekben a magokban is jelentősen kisebb mértékű volt KO egerekben, ami felveti ezen agyterületek szerepét a megfigyelt viselkedésbeli eltérések kialakításában.

Megfigyelésünk szerint bizonyos magokban a stresszválasz csökkent, ami arra utal, hogy a PACAP-nak fontos szerepe lehet e magok stressz aktivációjában, és a stressz által kiváltott szorongás illetve hangulatzavarok kialakulásában. Ezzel összhangban Ressler és munkatársainak (2011.) eredményei szerint a PACAP gén és a PAC1 receptor génjének polimorfizmusai olyan szorongásos kórképekkel állhatnak kapcsolatban, mint a posztttraumás stressz szindróma.

Adataink értékelésekor figyelembe vettük annak lehetőségét, hogy az egyedfejlődés során esetlegesen fellépnek a géntermék hiányát kompenzáló mechanizmusok, melyek gyakran megfigyelhetők genetikailag módosított állatoknál. Girard és munkatársai (2006.) nem találtak a PACAP KO egerekben ilyen receptoriális, vagy ligand szintű kompenzációs mechanizmusokat, ezért feltételezzük, hogy a megfigyelt eltérések a PACAP hiány következményei. Megemlítendő, hogy bár a c-Fos széles körben alkalmazott, jól validált markere a neuronális aktivációnak, a neuronális gátlásról nem ad felvilágosítást (Kovács 2008.), pedig ez utóbbi is fontos szerepet játszhat a megfigyelt viselkedésbeli eltérések hátterében.

1.2.2. Nucleus interstitialis striae terminalis

Hammack és munkatársai (2009.) szerint krónikus stresszben a PAC1 receptor és a PACAP mRNS szintje nő a BST területén. Ismert továbbá, hogy a BST-be adott PACAP infúzió szorongásos viselkedést vált ki, illetve a PAC1 receptor hiánya csökkent szorongási szinteket eredményez. (Otto és mtsai., 2001.). A BSTov és a BSTdl egyaránt erős PACAP tartalmú beidegzést kap, és a PACAP tartalmú axon terminálisok szinaptikus kapcsolatban vannak CRF tartalmú neuronokkal. (Köves és mtsai., 1994., Kozicz és mtsai., 1997.). Ezekben a magokban stresszt követően jelentősen kisebb mértékű c-Fos expresszió növekedést tapasztaltunk PACAP hiányban (rendre: -63.83% és -40.10%). További kísérletek szükségesek annak tisztázására, hogy a stressz által okozott neuronális aktiváció valóban a BSTov és BSTdl CRF tartalmú idegsejtjeiben csökkent-e. Nemrégiben kimutatták, hogy a BSTdl-ben a CRF overexpressziója depresszió-szerű viselkedést idéz elő, anélkül hogy a szorongást befolyásolná, (Regev és mtsai., 2011.) mely további adat azon feltételezés alátámasztására, hogy a BSTdl területén CRF-PACAP interakció állhat fenn. Tisztázandó az is, hogy a PAC1 receptorok jelen vannak-e a CRF neuronokon ezekben a magokban.

1.2.3. Amygdala magkomplex

Az amygdala magkomplex szerepe jól ismert a stresszadaptációban (McEwen és Gianaros 2010.). Az extrahypothalamikus CRF rendszerek közül az amygdaláról bizonyított, hogy működését befolyásolja a stressz (Nijsen és mtsai., 2001., Kim és mtsai., 2010., Rouwette és mtsai., 2011.), valamint ismert, hogy erős PACAP tartalmú beidegzés alatt áll (Hannibal 2002.). Meglepő, hogy a CeA és MeA területén a PACAP géntermék hiányának c-Fos expresszióra kifejtett hatását nem találtuk szignifikánsnak. Ezzel ellentétben a BLA területén szignifikáns interakciót találtunk a stressz és a genotípus között, valamint a c-Fos expresszió szignifikánsan (-27%) alacsonyabb volt. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a BLA és annak csökkent stressz iránti érzékenysége hozzájárulhat a szorongási szintek csökkenéséhez. Regev és munkatársai (2011.) szerint a CeA területén a CRF fokozott expressziója felelős lehet a stressz-indukálta szorongás csökkenéséért. További kutatások szükségesek annak tisztázására, hogy lehet-e interakció a PACAP és CRF között a CeA területén. A MeA területén Tsukiyama és munkatársai (2011.) azt tapasztalták, hogy *restraint* stresszben a c-Fos expresszió csökkent a PACAP KO egerekben, mely ellentmond a mi eredményeinknek. A PACAP hiány általunk megfigyelt gyenge hatása valószínűleg azzal magyarázható, hogy mi nem *restraint* stresszort, hanem FST-et alkalmaztunk. Ezek alapján arra

következtethetünk, hogy a CeA és a MeA nem játszhat döntő szerepet a megfigyelt viselkedésbeli és funkcionális morfológiai változásokban a PACAP mutáns egerekben.

1.2.4. Nucleus paraventricularis hypothalami

A PVN CRF tartalmú neuronjai a HPA tengely fő szabályozói, melyek az oldalkamrába adott PACAP injekció hatására c-Fos expressziót mutatnak (Agarwal és mtsai., 2005.), mely PACAP antagonista adásával kivédhető (Grinevich és mtsai., 1997.). Stroth és Eiden (2010.) szerint a PACAP defficiens egereknél stressz hatására csökken a c-Fos aktiváció és a kortikoszteron válasz egyaránt. A FST hatására fellépő c-Fos aktivációt a PVN területén az irodalmi adatok is alátámasztják patkányban (Badowska-Szalewska és mtsai., 2009.) és egérben is (Stone és mtsai., 2011.). Tsukiyama és munkatársai (2011.) szerint a PACAP KO egerek *restraint* stresszben csökkent c-Fos expressziót, és kortikoszteron reakciót mutatnak, ellenben a hideg expozíció és az éter stressz esetében a PACAP hiány a kortikoszteron választ nem befolyásolta, mely alapján arra következtettek, hogy a PACAP inkább emocionális jellegű stresszorok esetében játszik szerepet. Ezzel a mi eredményeink is összhangban vannak: a FST és a genotípus interakciója erős hatást fejt ki a c-Fos expresszióra, ami FST-et követően jelentősen elmaradt a génhiányos egerekben a vad típussal összehasonlítva.

1.2.5. Centralis projekciójú Edinger-Westphal mag

A EWcp PACAP tartalmú rostok beidegzése alatt áll (Hannibal 2002.), és ismert hogy a PACAP tartalmú terminálisok megközelítik az Ucn1 tartalmú neuronokat az EWcp területén patkányban (Kozicz T., közlés alatt). A PACAP hiány 43.46%-kal csökkenti a c-Fos expresszió mértékét az EWcp területén egérben, mely mag a különféle stresszorok hatására eltérő módon reagál patkányban (Gaszner és mtsai., 2004., 2009.) és egértörzsekben (Ryabinin és mtsai., 1999). Az urokortinerg idegsejtek az EWcp magból elsősorban a DR és a vLS területére vetülnek, ahol a stresszválasz modulálásában vesznek részt (Bittencourt és mtsai., 1999., Kozicz 2007., 2010.).

1.2.6. Periaqueductalis szürkeállomány

A PAG PACAP tartalmú rostok beidegzése alatt áll, és dorsális részének szerepe felmerült a szorongásos kórképek kialakulásában (Graeff és Zangrossi 2010.). A nem stresszelt génhiányos és vad típusú állatok között egy alap c-Fos expresszió különbséget találtunk, mely alapján feltételezhetjük, hogy ez a terület hozzájárulhat a megfigyelt viselkedési eltérésekhez. Érdekes, hogy a FST stresszt követően ez a különbség eltűnik.

A PAG laterális részét, mint a leszálló antinociceptív rendszerek központját, behatóan tanulmányozták (Heinricher és mtsai., 2008.). A PACAP defficiens egerekről korábban kimutattuk, hogy fájdalom modellekben megváltozott c-Fos választ adnak a PAG területén (Sándor és mtsai., 2010.). A lPAG területén erős stressz-genotípus interakciót tapasztaltunk, és a nem stresszelt állatoknál az alap neuronális aktivitásban is különbséget találtunk, mely magyarázhatja a PACAP KO egérre jellemző károsodott nocifenzív viselkedést.

1.2.7. Nucleus raphe dorsalis

Az egyes agyterületeket összehasonlítva azt találtuk, hogy a c-Fos válasz csökkenésének mértékét illetően a legerősebb hatás a DR területén mutatkozott, ahol 78%-os sejtszám csökkenést tapasztaltunk. Ismert, hogy a DR szerotoninerg idegsejtjeinek központi szerepe van a stresszel kapcsolatos szorongási kórképek és hangulatzavarok kialakulásában (Bouwknecht és mtsai., 2007., Lowry és mtsai., 2008., Savitz és mtsai., 2009., Valentino és mtsai., 2010.). Bár a DR csak gyenge PACAP beidegzést kap (Hannibal 2002.), a peptid hiánya nagy hatással van a mag c-Fos reaktivitására, mely arra utal, hogy a PACAP nem csak direkt módon hathat a DR-ra, hanem valamely más agyterület közvetítése útján is. Ilyen terület lehet az EWcp, mely a PACAP rostok által szállított információt továbbítja a DR felé (Kozicz 2010., Neufeld-Cohen és mtsai., 2010.). További kutatások szükségesek annak tisztázására, hogy hogyan működnek a szerotonin rendszerek PACAP hiányban, és hogy miként befolyásolja a DR az ismert viselkedési eltéréseket.

1.3. Következtetések

Eredményeink alátámasztják a korábbi tanulmányokban megfigyelt markáns viselkedésbeli eltéréseket PACAP KO egereken szorongási és depresszió modellekben. Ez az első olyan tanulmány, amely bizonyítja, hogy a PVN és a MeA mellett számos stressz rendszer csökkent azonnali génexpresszióval reagál akut stresszre, és hogy a PACAP hiányának hatása agyterület-specifikus is egyben. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a PACAP hiánynak moduláló szerepe lehet a stressz (mal)adaptáció szabályozásában, mely csökkent szorongási szinthez vezet a peptid hiányában. Eredményeink alapján azonosítottunk néhány olyan agyterületet, melyeknek központi szerepe lehet a megfigyelt viselkedési eltérésekben.

2. PACAP génhiányos egerek vizsgálata krónikus variábilis enyhe stressz modellben viselkedési és funkcionális morfológiai módszerekkel

Munkánk során a CVMS modell (Willner 2005.) vizsgálatát végeztük el PACAP KO egereken azzal a céllal, hogy a depresszió neurobiológiájának mélyebb részleteibe nyerjünk bepillantást, és hogy további vizsgálatokat végezzünk a PACAP stresszadaptációban betöltött szerepének tisztázására. Ez az első tanulmány, mely a PACAP KO állatokat a CVMS modellben vizsgálja antidepresszáns kezelésben részesített csoportok bevonásával a hatás visszafordíthatóságának tesztelése céljából. Az alábbiakban eredményeink fizikai, viselkedési, endokrinológai és funkcionális morfológiai szempontok szerint értelmezzük.

2.1. A modell validitása

A CVMS hatását az állatok csökkent testtömeg-gyarapodása támasztotta alá, mely egyéb CD1 egereken végzett kutatásokkal összhangban van (Boleij és mtsai., 2014., Rabasa és mtsai., 2015., Harris 2015.). A CVMS nem csökkentette a PACAP KO egerek testtömegét, mely Mustafa és mtsai. (2015.) eredményeivel egyezik meg. Az imipramin csökkentette a stressznek ki nem tett WT állatok testtömegét, mely jelenséget más laboratóriumok is kimutatták mind patkányban (Lewis és mtsai., 1983.), mind egérben (Zhao és mtsai., 2015.).

A CVMS modell validitását támasztja alá továbbá a WT egerek mellékvesetömegének CVMS paradigma hatására bekövetkező növekedése is (Bali és mtsai., 2015.). Ezzel ellentétben, a CVMS nem okozott említésre méltó mellékvesetömeg növekedést a PACAP KO egerekben. Ennek magyarázatául szolgálhat az az új megfigyelésünk, mely szerint a stressznek ki nem tett PACAP KO egerek mellékveséje nagyobb tömegű, mint a vad típusú kontrolloké. Az a megfigyelésünk, miszerint a CVMS nem okoz mellékvesetömeg növekedést PACAP KO állatokban, jól korrelál a HPA tengely csökkent aktivitásával, melyet CORT mérések támasztottak alá (jelen tanulmány, Storth és Eiden 2010., Tsukiyama és mtsai., 2011., Mustafa és mtsai., 2015.). A CVMS által kiváltott CORT emelkedés minden stresszelt WT csoportban megfigyelhető volt, mely további érv a modell validitása mellett. Az a megfigyelés, hogy az imipramin nem normalizálta a CORT értékeket a WT egereinknél, azzal az ismert ténnyel magyarázható, hogy az imipramin hatásossága attól is függ, hogy milyen egértörzset vizsgálunk (Ibarguen-Vargas és mtsai., 2008.).

A viselkedési tesztek eredményeit illetően, tekintetbe véve a viszonylag kis elemszámból adódó technikai korlátokat is, megállapíthatjuk, hogy a modell hatékonyan növelte a FST-ben az immobilitási időt WT egerekben, mely a CVMS hatékonyságát támasztja alá. Kezeletlen PACAP KO egereink emelkedett immobilitási szinttel rendelkeztek, habár ez a különbség nem volt szignifikáns a korábbi kísérletek eredményeivel ellentétben (Hashimoto és mtsai., 2001., Gaszner és mtsai., 2012.). Fontos kiemelni, hogy a vivőanyaggal kezelt WT egerek immobilitási szintje viszonylag magas volt (**24.H. ábra** 'a' oszlop) melyet az intraperitoneális injekciók által okozott stresszhatás magyarázhat.

Más kutatócsoportok C67BL6/N alapon létrehozott PACAP génhiányos egereket vizsgálva (Lehmann és mtsai., 2013.) arra a következtetésre jutottak, hogy a PACAP gén deléciója csökkenti a depresszió szintet. Ezzel összhangban Hattori és mtsai. (2012.) C57BL/6J x 129SvEv hibrid alapon tenyésztett PACAP KO egerek vizsgálata során enyhén csökkent depresszió szintet találtak. Az ebben a kísérletben végzett FST eredményeinek értékelése arra utal, hogy a CVMS a PACAP KO állatok viselkedésében mélyreható viselkedési változásokat idézett elő FST-ben. Az eredmények arra utalnak, hogy az enyhe stressz paradox módon csökkenti a depresszió-szerű viselkedést a CD1 alapon tenyésztett PACAP KO egereinknél, és az immobilitási idő az imipramin kezelt kontroll KO egerek szintjére csökkent a Lehmann és mtsai. (2013.) által leírtakkal összhangban.

Összefoglalva, a WT CD1 állatok a stresszhatás okozta klasszikus fizikai, endokrinológiai és viselkedési jeleket mutatják, mely a modell validitását támasztja alá. Meg kell állapítanunk, hogy eredményeink a kísérletben nem támasztják alá a CD1 törzsbe tartozó PACAP KO állatok depresszió-szerű fenotípusát. Mindazonáltal kétségtelen, hogy ezek az állatok csökkent válaszkészséget mutatnak a CVMS expozícióra. Folyamatban lévő kísérletünkben ezért további stressz faktorok hatásának vizsgálatával egészítjük ki a CVMS paradigmát, hogy egy megbízhatóbb depresszió modellt fejleszthessünk ki a PACAP génhiányos egerek felhasználásával (Gaszner és mtsai., 2013., 2014., Farkas és mtsai., 2016.).

2.2. A FosB neuronális aktivitás mintázata

A FosB expresszió feltérképezése egy széles körben használt eszköz az idesejtek aktivitásának értékelésére (Nestler és mtsai., 1999., Perrotti és mtsai., 2004., Sterrenburg és mtsai., 2011., Vialou és mtsai., 2015.). Az általunk használt FosB

antitest a teljes hosszúságú FosB és a delta FosB fehérje minden *splice* variánsát felismeri (Perrotti és mtsai., 2004., Vialou és mtsai., 2015.). Az utóbbi izoforma az, amely a krónikus stressz adaptáció folyamatában szerepet játszik (Nestler és mtsai., 1999., Perrotti és mtsai., 2004., Sterrenburg és mtsai., 2011.). Jelen kísérletünkben a CVMS-nek kitett egereinket 16 órával a perfúzió előtt tettük ki az utolsó enyhe (nedves alom) stresszornak. A teljes hosszúságú FosB és a delta FosB fehérjék felezési idejét tekintetbe véve (Kovács 1998., Carle és mtsai., 2006.) azt feltételezzük, hogy a FosB adataink a delta FosB expressziót mutatják.

A kísérletben azt találtuk, hogy az intraperitoneális vivőanyag illetve az imipramin injekció növelhette a bazális FosB expressziót egyes állatokban. Annak érdekében hogy az ezen csoportok közti összehasonlítást elkerüljük, eredményeinket két adatsorra bontva értékeltünk, melyet a **1.-es táblázat** szemléltet.

A CVMS szignifikáns változást okozott a FosB expresszióban a kísérletünkben vizsgált 18 agyterület közül 11-ben (CeA, MeA, BSTdm, BSTov, DG, vLS, pPVN, mPVN, lPAG, EWcp, DR). Két további stresszérzékeny területet, a hippocampus CA1 áreáját és a BSTv-t, a stresszhatás × genotípus interakció befolyásolta a stressz főhatása nélkül. (**4. táblázat**). Ezek az eredmények további bizonyítékként szolgálnak a CVMS paradigma validitására, mivel a vizsgált stresszadaptációs központok több mint fele érintett volt a modellben.

Az imipramin hatása a FosB expresszióra négy agyterületre korlátozódott (CeA, MeA, vLS, pPVN). Ezen kívül a stressz és a kezelés interakciója a DR területén, valamint a kezelés × genotípus kölcsönhatás a BSTdm, BSTv, CA1, CA3 áreákban és a DG területén befolyásolta a FosB expressziót. A *post hoc* tesztek azt mutatták, hogy a CVMS FosB-re kifejtett hatását a kezelés csak a BSTdm (összehasonlítva a **27.C. ábra** ‘e’ és ‘g’ oszlopát), a hippocampus három régiójában (összehasonlítva a **27.E.-G. ábra** megfelelő ‘e’ és ‘g’oszlopát) és a DR területén (**28.E. ábra** ‘e’ és ‘g’ oszlop) fordította vissza. Az imipramin kezelés FosB kifejeződésre gyakorolt viszonylagos hatástalansága annak is betudható, hogy a PACAP KO egerekben a FosB expresszió növekedés majdnem teljes mértékben elmaradt, ezért a kezelés nem csökkenthette tovább a közel bazális szintű FosB sejtszámokat. Mivel az imipramin kezelés hatásossága a fizikai és endokrinológiai paraméterek tekintetében is korlátozott volt, ezért a jövőbeni kutatások során felmerül annak a lehetősége, hogy hosszabb időtartamú vagy nagyobb dózisú kezelést, esetleg más hatóanyagot használjunk.

Eredményeink értékelése során két fontos limitáló szempontot kell tekintetbe vennünk: Elsőként azt, hogy a FosB jelölés nem mutat ki bizonyos funkcionális szempontból

esetleg nagy jelentőséggel bíró változásokat, melyek az idegsejtek gátlásában nyilvánulnak meg (Kovács 2008.). Másodszor, habár a feltételezhető kompenzatórikus változásokat korábbi kutatások kizárták (Girard és mtsai., 2006.), nem szabad figyelmen kívül hagyni annak lehetőségét, hogy a PACAP KO állatokban valamely számunkra ismeretlen kompenzatórikus változások következhettek be az egyedfejlődés során.

2.3. A PACAP hiánya agyterület és stresszorfüggő módon befolyásolja a FosB expressziót

Az ANOVA teszt kilenc *post hoc* összehasonlítást tett lehetővé a kezeletlen WT és KO egerek esetében CVMS-t követően. Ezek közül nyolc régióban a FosB válasz csökkent (**4. táblázat**). A PACAP KO állatok stressz által kiváltott idegsejtaktivitás mintázatán végzett vizsgálataink arra utalnak, hogy a PACAP stresszor- és agyterület specifikus módon befolyásolja az idegsejtekben megfigyelhető választ mind CVMS-ben (Kormos és mtsai., 2016.) mind a FST-et követően (Gaszner és mtsai., 2012.). A PACAP szükséges a krónikus stresszben bekövetkező FosB válasz kifejlődéséhez a pPVN, CeA, BSTdm, BSTov, BSTv, CA1, vLS és DR területén. Mivel az utóbbi hét limbikus terület afferens összeköttetésben van a PVN-nel, illetve a periPVN régióval (Risold és Swanson 1997., Larsen és mtsai., 1996., Hammack és mtsai., 2010., Ulrich-Lai és Herman., 2009.), nem meglepő hogy a legnagyobb hatást a pPVN területén figyelhettük meg. Kétségtelen az is, hogy a PACAP nagymértékben befolyásolja a PVN reaktivitását (Grinevich és mtsai., 1997., Agarwal és mtsai., 2005., Norrholm és mtsai., 2005., Das és mtsai., 2007., Kageyama és Suda 2009.). A PACAP hiánya funkcionális változásokat okoz a HPA tengely működésében, és valamelyest ellentmondó viselkedési fenotípussal jár (Storth és Eiden., 2010., Tsukiyama és mtsai., 2011., Gaszner és mtsai., 2012., Lehmann és mtsai., 2013.).

2.4. A PACAP KO egerek CRF neuronjai a BSTov területén nem aktiválódnak CVMS hatására

Korábbi munkánk eredményei alapján azt feltételeztük, hogy a CVMS befolyásolhatja a BSTov-CRF neuronok aktivitását. A CVMS megnövelte a FosB aktivitást a CRF neuronokban a WT egerekben, ezzel szemben ezt a PACAP KO állatokban nem figyelhettük meg. A teljes FosB és a CRF-FosB sejtek számának összehasonlítása során arra a következtetésre jutottunk, hogy a FosB immunreaktivitás emelkedése a CRF neuronokra specifikus jelenség az BSTov területén. A CRF sejtek számának értékelése alátámasztja azt, hogy a PACAP hiány befolyásolja az BSTov-CRF neuronokat.

A BST CRF neuronjairól ismert, hogy azok patkányban PACAP tartalmú rostok beidegzése alatt állnak (Köves és mtsai., 1994., Kozicz és mtsai., 1997.). A CVMS növeli mind a PACAP, mind a PAC1 receptor mRNS-einek transzkripcióját a BST-ben, továbbá a BST-be adott PACAP injekció növeli a szorongási szintet, (Hammack és mtsai., 2009.) míg a PAC1 receptor hiánya ellentétes hatással bír. A CRF expresszió megváltoztatása a BST területén növeli a depresszió-szerű viselkedést (Regev és mtsai., 2011.), mely azt sugallja, hogy a PACAP-CRF interakció részt vesz a hangulat szabályozásában (Hammack és mtsai., 2010.). Azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a PACAP KO egerekben megfigyelt csökkent BSTov-CRF aktivitás hozzájárulhat a viselkedési fenotípusban megnyilvánuló változásokhoz.

2.5. A PACAP hiány CVMS-ben befolyásolja az urokortinerg EWcp működését

Sikerült bizonyítanunk feltételezésünket, miszerint a PACAP hiány CVMS során KO egerekben befolyásolja az Ucn1 neuronokat: a PACAP KO egerek Ucn1 neuronjai nem mutattak FosB expresszió emelkedést CMVS hatására, mely korábbi eredményeinkkel összhangban van, ahol a EWcp c-Fos expresszióját tanulmányoztuk (Gaszner és mtsai., 2012.). Továbbá az Ucn1 immunjel denzitása csökkent a WT egereinknél CVMS expozíciót követően, mely egybevág a korábbi tanulmányokban (Korosi és mtsai., 2005., Kozicz és mtsai., 2008.) taglaltakkal. Mindezek alapján arra következtetünk, hogy a PACAP szabályozhatja a EWcp Ucn1 neuronjait, melynek révén a stresszadaptációra többféle módon is kifejtheti hatását.

2.6. A PACAP génhiányos egerekben magasabb a DR idegsejtjeinek szerotonin tartalma

Az egyik fő eredménye kutatásunknak az, hogy a PACAP KO egerekben mind a 5-HT sejtek száma, mind azok szerotonin tartalma emelkedett volt a DR területén, továbbá egy erős, harmadrendű interakciót találtunk a CVMS, a genotípus és a kezelés között, mely arra utal hogy a DR 5-HT neuronjait ez a modell befolyásolja. (**7. táblázat**). Hashimoto és munkatársai (2001.) ezzel egybehangzóan azt figyelték meg, hogy a PACAP KO egerekben csökkent az agy 5-hidroxi-indolecetsav tartalma. Ennek alapján arra következtethetünk, hogy a szerotoninerg rendszert a PACAP hiány befolyásolja, habár Hannibal (2002.) csak gyenge PACAP tartalmú rostsűrűséget figyelt meg a patkány DR területén. Erre magyarázatot szolgáltathat az urokortin1 (Kozicz 2010, Gaszner és mtsai., 2012.) és a CRF. Ezt alátámasztja az is, hogy Waselus és munkatársai (2009.) mindkét CRF receptort kimutatták a DR sejtjein, melyek

megjelenését a stressz eltérően befolyásolja. Mindezek alapján arra következtetünk, hogy az EWcp-Ucn1 és BST-CRF rendszer közvetítheti a PACAP hiány hatását a DR felé. Tekintettel arra, hogy mind a EWcp (Kozicz 2010.) mind a BST közvetlen kapcsolatban áll a DR-szal (Peyron és mtsai., 1998.), meghatározhatják a DR-5-HT neuronok aktivitását, melyek pedig a HPA tengelyre (Jørgensen 2007.) és a viselkedésre (Neufeld-Cohen és mtsai., 2010., Kozicz 2010.) vannak hatással.

2.7. Következtetések

A CVMS alkalmas modell a depresszió tanulmányozására CD1 egértörzsben. A PACAP hiány egérben a HPA csökkent aktivitásával és a pPVN idegsejtjeinek markáns aktivitás-csökkenésével jár együtt. A CVMS által kiváltott FosB aktivitásának csökkent volta azokon a limbikus területeken, melyek a PVN vagy a periPVN területtel összeköttetésben állnak [vLS (Risold és Swanson 1997.), DR (Larsen és mtsai., 1996.) a CeA, a MeA, az BSTov, és a BSTdm (Ulrich-Lai és Herman 2009., Hammack és mtsai., 2010.)] hozzájárulhatnak a HPA tengely csökkent érzékenységéhez. Arra következtethetünk tehát, hogy a PACAP a magasabb rendű központok stresszadaptációja szempontjából is nélkülözhetetlen.

Azok az eredményeink, hogy a a) BSTov CRF- és az b) EWcp Ucn1 neuronjai nem reagálnak a CVMS-re PACAP KO egerekben, továbbá ezen egértörzsben c) a kontrollban magasabb bazális szerotonin tartalom a DR területén CVMS hatására csökkent, hozzájárulhatnak a HPA tengely csökkent aktivitásához és a depresszió-szerű viselkedési mintázathoz. Eredményeink egyik limitációja, hogy ebben a kísérletben a CD1 alapon tenyésztett PACAP KO egerek fenotípusa nem volt egyértelműen depresszióra utaló, illetve az imipramin kezelés nem fordította vissza a stressz fizikai és endokrinológiai hatásait.

További kutatásaink során egyéb stresszorokkal egészítjük ki a CVMS-t annak érdekében, hogy megbízható depresszió modellt fejlesszünk, melyet SSRI kezelés segítségével is validálni szeretnénk (Gaszner és mtsai., 2013., 2014., Farkas és mtsai., 2016.).

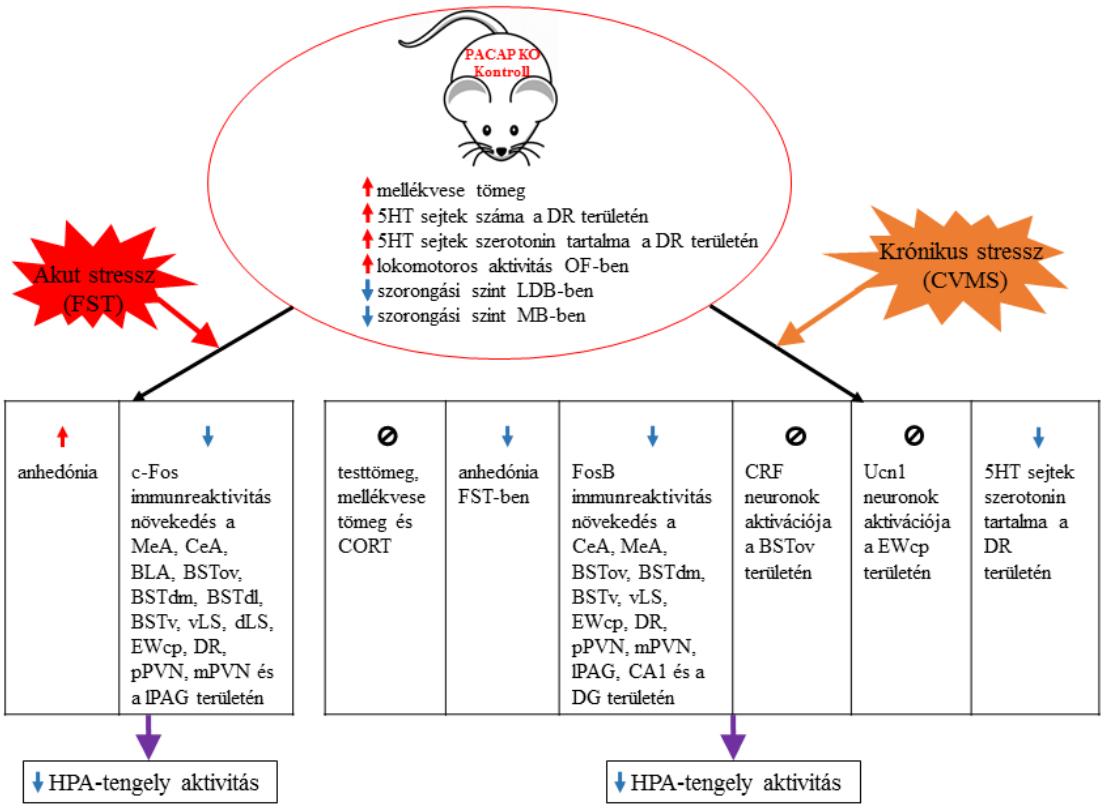
VI. Új eredmények összefoglalása

1. Elsőként bizonyítottuk, hogy a PVN és a MeA mellett számos stressz rendszer csökkent azonnali gén expresszióval reagál PACAP hiányban **akut stressz**re, és hogy a PACAP hiányának hatása agyterület specifikus is egyben. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a PACAP hiánynak moduláló szerepe lehet a stressz (mal)adaptáció szabályozásában, mely csökkent szorongási szinthez vezet. Azonosítottunk néhány olyan agyterületet, melyeknek központi szerepe lehet a megfigyelt viselkedési eltérésekben.

2. Ez az első tanulmány, mely a PACAP KO egereket a **CVMS** modellben vizsgálja antidepresszáns kezelésben részesített csoportok bevonásával, a PACAP stresszadaptációban betöltött szerepének tisztázására. A PACAP hiány e modellben a HPA tengely csökkent aktivitásával és a pPVN idegsejtjeinek markáns aktivitás-csökkenésével jár együtt.

3. A CVMS által kiváltott FosB aktivitás csökkent volta a vLS, DR, a CeA, MeA, BSTov, és a BSTdm területén hozzájárulhatnak a HPA tengely csökkent érzékenységéhez, amelyből arra következtethetünk, hogy a PACAP jelenléte a magasabb rendű központok stresszadaptációja szempontjából is nélkülözhetetlen.

4. Elsőként közöltük, hogy a) a BSTov CRF- és b) az EWcp Ucn1 neuronjai nem reagálnak a CVMS-re PACAP KO egerekben, továbbá ezen egértörzsben c) csökkent a DR bazális szerotonin tartalma. Ezek az anomáliák hozzájárulhatnak a HPA tengely csökkent aktivitásához és a depresszió-szerű viselkedési mintázathoz.



32. ábra: Legfontosabb eredményeink összefoglalása. A piros ellipszissel kiemelt felső panel a nem stresszelt (kontroll) PACAP KO állatokban megfigyelt eltéréseket mutatja a stressznek ki nem tett (kontroll) PACAP vad típusú egerekkel összehasonlítva. A bal alsó táblázat az akut, a jobb alsó a krónikus stressz hatására bekövetkező változásokat reprezentálja ugyanezen egértörzsnél. Piros nyilak a növekedést, kék nyilak a csökkenést, áthúzott karikák pedig a változás hiányát ábrázolják. (Kontroll PACAP KO: nem stresszelt PACAP hiányos állat, 5HT: szerotonin, DR: nucleus raphe dorsalis, OF: *open field* teszt, LDB: *light dark box* teszt, MB: *marble burying* teszt, FST: *forced swim* teszt, CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz, MeA: nucleus medialis amygdalae, CeA: nucleus centralis amygdalae, BLA: nucleus basolateralis amygdalae, BSTov: nucleus interstitialis striae terminalis ovalis almagja, BSTdm: nucleus interstitialis striae terminalis dorsomedialis almagja, BSTdl: nucleus interstitialis striae terminalis dorsolateralis almagja, BSTv: nucleus interstitialis striae terminalis ventralis almagja, vLS: nucleus septi lateralis ventralis része, dLS: nucleus septi lateralis dorsalis része, EWcp: centralis projekciójú Edinger-Westphal mag, pPVN: nucleus paraventricularis hypothalami parvocellularis része, mPVN: nucleus paraventricularis hypothalami magnocellularis része, lPAG: periaqueductalis szürkeállomány lateralis része, CORT: kortikoszteron, CA1: cornu Ammonis 1. számú régiója, DG: gyrus dentatus, CRF: *corticotropin releasing factor*, Ucn1: urokortin 1, HPA-tengely: hipotalamusz-hipofízis-mellékvese-tengely)

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5-HT: szerotonin

ACTH: *adrenocorticotropic hormone*

ANOVA: *analysis of variance* = variancia analízis

BLA: nucleus basolateralis amygdalae

BSTdl: nucleus interstitialis striae terminalis dorsolateralis almagja

BSTdm: nucleus interstitialis striae terminalis dorsomedialis almagja

BSTov: nucleus interstitialis striae terminalis ovalis almagja

BSTv: nucleus interstitialis striae terminalis ventralis almagja

CA1: *cornu Ammonis 1 region of the hippocampal formation* = cornu Ammonis 1. számú régiója

CA3: *cornu Ammonis 3 region of the hippocampal formation* = cornu Ammonis 1. számú régiója

CeA: nucleus centralis amygdalae

CORT: kortikoszteron

CREB: *cAMP responsive element binding factor*

CRF: *corticotropin releasing factor*

CVMS: *chronic variable mild stress* = krónikus variábilis enyhe stressz

DAB: diaminobenzidin

DG: *dentate gyrus* = gyrus dentatus

dLS: nucleus septi lateralis dorsalis része

dPAG: periaqueductalis szürkeállomány dorsalis része (substantia grisea centralis, pars dorsalis)

DR: nucleus raphe dorsalis

EDTA: *ethylene-diamine tetra-acetic acid* = etilén-diamin-tetraecetsav

EWcp: centralis projekciójú Edinger-Westphal mag

FST: *forced swim test* = erőltetett úszás teszt

GABA: *gamma-aminobutyric acid* = gamma-amino-vajsav

HPA axis: *hypothalamo-pituitary-adrenal axis* = hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely

ir: immunreaktív

KO: *knockout* = génhiányos típus

LDB: *light dark box* teszt

lPAG: periaqueductalis szürkeállomány lateralis része (substantia grisea centralis, pars

lateralis)

MANOVA: *multifactorial analysis of variance* = multifaktoriális variancia analízis

MB: *marble burying* teszt

MeA: nucleus medialis amygdalae

mPFC: medialis prefrontalis cortex

mPVN: nucleus paraventricularis hypothalami magnocellularis része

NDS: *normal donkey serum* = normál szamár szérum

NGS: *normal goat serum* = normál kecske szérum

OF: *open field* teszt

PACAP: *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* = hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid

PBS: *phosphate buffered saline* = foszfát pufferelt fiziológiás sóoldat

POMC: pro-opiomelanokortin

pPVN: nucleus paraventricularis hypothalami parvocellularis része

PVN: nucleus paraventricularis hypothalami

SEM: *standard error of the mean* = az átlag standard hibája

SNRI: szerotonin-noradrenalin *reuptake* inhibitor

SSD: *specific signal density*

SSRI: szelektív szerotonin *reuptake* inhibitor

Ucn1: urokortin 1

VIP: vazoaktív intesztinális peptid

vLS: nucleus septi lateralis ventralis része

WT: *wild type* = vad típus

IRODALOMJEGYZÉK

1. Agarwal A, Halvorson LM, Legradi G (2005) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mimics neuroendocrine and behavioral manifestations of stress: Evidence for PKA-mediated expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene. Mol Brain Res 138:45-57.

2. Almli LM, Mercer KB, Kerley K, Feng H, Bradley B, Conneely KN, Ressler KJ (2013) ADCYAP1R1 genotype associates with post-traumatic stress symptoms in highly traumatized African-American females. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.162:262-272.

3. Bachtell RK, Weitemier AZ, Galvan-Rosas A, Tsivkovskaia NO, Risinger FO, Phillips TJ, Grahame NJ, Ryabinin AE (2003) The Edinger-Westphal-lateral septum urocortin pathway and its relationship to alcohol consumption. J Neurosci 23:2477-2487.

4. Badowska-Szalewska E, Klejbor I, Cecot T, Spodnik JH, Moryś J (2009) Changes in NGF/c-Fos double staining in the structures of the limbic system in juvenile and aged rats exposed to forced swim test. Acta Neurobiol Exp 69:448-458.

5. Bagdy E, Kiraly I, Harsing LG Jr (2000) Reciprocal innervation between serotonergic and GABAergic neurons in raphe nuclei of the rat. Neurochem Res. 25:1465-1473.

6. Bali A, Jaggi AS (2015) Preclinical experimental stress studies: protocols, assessment and comparison. Eur J Pharmacol 746:282-292.

7. Binder EB, Nemeroff CB (2010) The CRF system, stress, depression and anxiety–insights from human genetic studies. Mol Psychiatry (6): 574–588.

8. Bittencourt JC, Vaughan J, Arias C, Rissman RA, Vale WW, Sawchenko PE (1999) Urocortin expression in rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. J Comp Neurol 415:285-312.

9. Blackwood DH, Fordyce A, Walker MT, St Clair DM, Porteous DJ, Muir WJ (2001) Schizophrenia and affective disorders-cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. Am J Hum Genet 69:428-433.

10. Boleij H, Willems J, Leijten M, van't Klooster J, Lesscher H, Kirchhoff S, Lavrijsen M, Arndt SS, Ohl F (2014) Chronic social stress does not affect behavioural habituation in male CD1 mice. Behav Brain Res 273:34-44.

11. Bonfiglio JJ, Inda C, Refojo D, Hoelsboer F, Artz E, Silberstein S (2011) The Corticotropin-Releasing Hormone Network and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Molecular and Cellular Mechanism Involved. Neuroendocrinology 94; 12-20.

12. Bourin M, Hascoët M (2003) The mouse light/dark boksz test. Eur J Pharmacol 463:55-65.

13. Bouwknecht JA, Spiga F, Staub DR, Hale MW, Shekhar A, Lowry CA (2007) Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. Brain Res Bull 72:32-43.

14. Carle TL, Ohnishi YN, Ohnishi YH, Alibhai IN, Wilkinson MB, Kumar A, Nestler EJ. (2007) Proteasome-dependent and -independent mechanisms for FosB destabilization: identification of FosB degron domains and implications for DeltaFosB stability. Eur J Neurosci 25:3009-3019.

15. Carrasco GA, Van de Kar LD (2003) Neuroendocrine pharmacology of stress. European Journal of Pharmacology 463 235-272.

16. Catena-Dell'Osso M, Fagiolini A, Marazziti D, Baroni S, Bellantuono C (2013) Non-monoaminergic targets for the development of antidepressants: focus on neuropeptides. Mini-Rev Med Chem 13:2-10.

17. Challis C, Berton O (2015) Top-down control of serotonin systems by the prefrontal cortex: A path toward restored socioemotional function in depression. ACS Chem Neurosci 6:1040-1054.

18. 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.

19. Choi DC, Furay AR, Evanson NK, Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Herman JP (2007) Bed Nucleus of the Stria Terminalis Subregions Differentially Regulate Hypothalamic- Pituitary –Adranal Axis Activity: Implications for the Integration of Limbic Inputs. The Journal of Neuroscience 27 (8) 2025-2034.

20. Cryan J,F, Mombereau C (2004) In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. Mol Psychiatry 9:326-357.

21. Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ (1995) Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. Neuroscience 64:477-505.

22. Das M, Vihlen CS, Legradi G (2007) Hypothalamic and brainstem sources of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide nerve fibers innervating the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. J Comp Neurol 500:761-776.

23. Dias BG, Ressler KJ (2013) PACAP and the PAC1 receptor in post-traumatic stress disorder. Neuropsychopharmacology 38:245-246.

24. Dong HW, Petrovich GD, Watts AG, Swanson LW (2001) Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain. J Comp Neurol 436:430-455.

25. Dos Santos Júnior ED, Da Silva AV, Da Silva KR, Haemmerle CA, Batagello DS, Da Silva JM, Lima LB, Da Silva RJ, Diniz GB, Sita LV, Elias CF, Bittencourt JC (2015) The centrally projecting Edinger-Westphal nucleus--I: Efferents in the rat brain. J Chem Neuroanat. 68:22-38.

26. Duncan GE, Johnson KB, Breese GR (1993) Topographic patterns of brain activity in response to swim stress: assessment by 2-deoxyglucose uptake and expression of Fos-like immunoreactivity. J Neurosci 13:3932-3943.

27. de Kloet ER (2008) About stress hormones and resilience to psychopathology. J Neuroendocrinol 20:885-892.

28. Farkas J, László ÁK, Gaszner T, Gaszner B (2016) Using PACAP heterozygous mice as models of the three hit theory of depression In Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide - PACAP, edited by Dora Reglodi and Andrea Tamas. New York: Springer Nature, pp. 731-741.

29. Feder A, Nestler EJ and Charney DS (2009) Psychobiology and molecular genetics of resilience. Nature Reviews/Neuroscience 10: 446-457.

30. Gaszner B, Csernus V, Kozicz T (2004) Urocortinergic neurons respond in a differentiated manner to various acute stressors in the Edinger-Westphal nucleus in the rat. J Comp Neurol 480:170-179.

31. Gaszner B, Korosi A, Palkovits M, Roubos E, Kozicz T (2007) Neuropeptide Y activates urocortin 1 neurons in the nonpreganglionic Edinger-Westphal nucleus. J Comp Neurol 500:708-719.

32. Gaszner B (2008) Plastic Responses to stress by the Rodent Urocortogenic Edinger-Westphal Nucleus. Radboud University Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands ISBN 978-90-9023714-5.

33. Gaszner B, Jensen KO, Farkas J, Reglodi D, Csernus V, Roubos E, Kozicz T (2009) Effects of maternal separation on dynamics of urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor in the rat non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus. Int J Dev Neurosci 27:439-451.

34. Gaszner B, Farkas J, Bodnar G, Kovacs L, Gaszner T, Gaspar L, Balogh A, Szalontai B, Hashimoto H, Reglodi D, Kormos V (2013) Application of the three hit theory in PACAP hetero-zygous mice: maternal separation and chronic stress influence BNST CRF and cpEW Ucn1 in an inverse manner. J Mol Neurosci 51 (Suppl 1): 192.

35. Gaszner B, Kovacs L, Gaszner T, Gaspar L, Reglodi D, Lorincz K, Farkas J, Hashimoto H. Kormos V (2014) PACAP transgenic mice in the three hit model of depression: The involvement of BNST - CRF, cpEW - Urocortin1 and DR – serotonin 44th Annual Meeting for Neuroscience, Washington DC; Abstract 711.12.

36. Gardner KL, Thrivikraman KV, Lightman SL, Plotsky PM, Lowry CA (2005) Early life experience alters behavior during social defeat: focus on serotonergic systems. Neuroscience 136:181-191.

37. Geyer MA, Markou A (1995) Animal models of psychiatric disorders. In: Bloom FE, Kupfer DJ, eds. Psychopharmacology: the fourth generation of progress. pp. 787-798. New York, Raven Press.

38. Ghasemi M, Montaser-Kouhsari L, Shafaroodi H, Nezami BG, Ebrahimi F, Dehpour AR (2009) NMDA receptor/nitrergic system blockage augments antidepressant-like effects of paroxetine in the mouse forced swimming test. Psychopharmacology (Berl) 206:325-333.

39. Girard BA, Lelievre V, Braas KM, Razinia T, Vizzard MA, Ioffe Y, El Meskini R, Ronnett GV, Waschek JA, May V (2006) Noncompensation in peptide/receptor gene expression and distinct behavioral phenotypes in VIP- and PACAP-deficient mice. J Neurochem 99:499-513.

40. 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 10:207-217.

41. Grinevich V, Fournier A, Pelletier G (1997) Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on corticotropin-releasing hormone (CRH) gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. Brain Res 773:190-196.

42. Hammack SE, Cheung J, Rhodes KM, Schutz KC, Falls WA, Braas KM, May V (2009) Chronic stress increases pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST): roles for PACAP in anxiety-like behavior. Psychoneuroendocrinology 34:833-843.

43. Hammack SE, Roman CW, Lezak KR, Kocho-Shellenberg M, Grimmig B, Falls WA, Braas K, May V (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 42:327-340.

44. Hammack SE, Cooper MA, Lezak KR (2011) Overlapping neurobiology of learned helplessness and conditioned defeat: Implications for PTSD and mood disorders. Neuropharmacology doi:10.1016/j.neuropharm.2011.02.024.

45. Hammack SE, May V (2015) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in stress-related disorders: data convergence from animal and human studies. Biol Psychiatry 78:167-177.

46. Hannibal J (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. J Comp Neurol 453:389-417.

47. Harris RB. (2015) Chronic and acute effects of stress on energy balance: are there appropriate animal models? Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 308:R250-265.

48. Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K, Mori W, Hirose M, Matsuda T, Sakaue M, Miyazaki J, Niwa H, Tashiro F, Yamamoto K, Koga K, Tomimoto S, Kunugi A, Suetake S, Baba A (2001) Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). Proc Natl Acad Sci U S A 98:13355-13360.

49. Hashimoto H, Shintani H, Baba A (2006) New insights into the central PACAP-ergic system from the phenotypes of PACAP- and PACAP receptor-knockout mice. Ann NY Acad Sci 1070:75-89.

50. Hashimoto H, Hashimoto R, Shintani N, Tanaka K, Yamamoto A, Hatanaka M, Guo X, Morita Y, Tanida M, Nagai K, Takeda M, Baba, A (2009) Depression-like behavior in the forced swimming test in PACAP-deficient mice: amelioration by the atypical antipsychotic risperidone. J Neurochem 110:595-602.

51. Hashimoto R, Hashimoto H, Shintani N, Ohi K, Hori H, Saitoh O, Kosuga A, Tatsumi M, Iwata N, Ozaki N, Kamijima K, Baba A, Takeda M, Kunugi H (2010) Possible association between the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene and major depressive disorder. Neurosci Lett 468:300-302.

52. Hashimoto H, Shintani N, Tanida M, Hayata A, Hashimoto R, Baba A (2011) PACAP is implicated in the stress axes. Curr Pharm Des 17:985-989.

53. Hattori T, Baba K, Matsuzaki S, Honda A, Miyoshi K, Inoue K, Taniguchi M, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Shimizu S, Yukioka F, Kumamoto N, Yamaguchi A, Tohyama M, Katayama T (2007) A novel DISC1-interacting partner DISC1-Binding Zinc-finger protein: implication in the modulation of DISC1-dependent neurite outgrowth. Mol Psychiatry 12:398-407.

54. Hattori S, Takao K, Tanda K, Toyama K, Shintani N, Baba A, Hashimoto H, Miyakawa T (2012) Comprehensive behavioral analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) knockout mice. Front Behav Neurosci 6:58.

55. Heim C, D. J. Newport, T. Mletzko, A. H. Miller, C. B. Nemeroff (2008) The link between childhood trauma and depression: Insights from HPA axis studies in humans. Psychoneuroendocrinology. (6):693-710. doi: 10.1016/j.psyneuen.

56. Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb, BM (2009) Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. Brain Res Rev 60:214-225.

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

58. Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamopituitary-adrenocortical responsiveness. Front Neuroendocrinol 24:151-180.

59. Hillhouse EW and Grammatopoulos DK (2006) The Molecular Mechanisms Underlying the Regulation of the Biological Activity of Corticotropin-Releasing Hormone Receptors: Implications for Physiology and Pathophysiology. Endocrine Reviews 27 (3):260–286.

60. Holsboer F, Ising M (2008) Central CRH system in depression and anxiety – Evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists. European Journal of Pharmacology 583 350-357.

61. Homberg JR (2012) The stress-coping (mis)match hypothesis for nature x nurture interactions; Brain Research 1432 114-121.

62. Hornung JP (2003) The human raphe nuclei and the serotonergic system. J Chem Neuroanat 26:331-343.

63. Ibarguen-Vargas Y, Surget A, Touma C, Palme R, Belzung C. (2008) Multifaceted strain-specific effects in a mouse model of depression and of antidepressant reversal. Psychoneuroendocrinology 33:1357-1368.

64. Ihne JL, Fitzgerald PJ, Hefner KR, Holmes A (2012) Pharmacological modulation of stressinduced behavioral changes in the light/dark exploration test in male C57BL/6J mice. Neuropharmacology. 62(1):464-73.

65. Józsa R, Olah A, Cornélissen G, Csernus V, Otsuka K, Zeman M, Nagy G, Kaszaki J, Stebelova K, Csokas N, Pan W, Herold M, Bakken EE, Halberg F (2005) Circadian and extracircadian exploration during daytime hours of circulating corticosterone and other endocrine chronomes. Biomed Pharmacother 59 Suppl 1:S109-116.

66. Jørgensen HS (2007) Studies on the neuroendocrine role of serotonin. Dan Med Bull 54:266-288.

67. Kageyama K, Suda T (2009) Regulatory mechanisms underlying corticotropin-releasing factor gene expression in the hypothalamus. Endocr J 56:335-344.

68. Kehne JH, Cain CK (2010) Therapeutic Utility of Non-Peptidic CRF1 Receptor Antagonists in Anxiety, Depression, and Stress-Related Disorders: Evidence from Animal Models. Pharmacol Ther. 128(3): 460–487.

69. Kim SH, Han JE, Hwang S, Oh, DH (2010) The expression of corticotropin-releasing factor in the central nucleus of the amygdala, induced by colorectal distension, is attenuated by general anesthesia. J Korean Med Sci 25:1646-1651.

70. Kormos V, Gaszner B (2013) Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. Neuropeptides 47:401-419.

71. Korosi A, Schotanus S, Olivier B, Roubos EW, Kozicz T (2005) Chronic ether stress-induced response of urocortin 1 neurons in the Edinger–Westphal nucleus in the mouse. Brain Res 1046:172–179.

72. Kovács KJ (1998) c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. Neurochem Int 33:287-297.

73. Kovács KJ (2008) Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. J Neuroendocrinol 20:665-672.

74. Koves K, Arimura A, Görcs TG, and Somogyvári-Vigh A (1991) Comparative distribution of immunoreactive pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide in rat forebrain. Neuroendocrinology 54:159–169.

75. Koves K, Gorcs TJ, Kausz M, Arimura A (1994) Present status of knowledge about the distribution and colocalization of PACAP in the forebrain. Acta Biol Hung 45:297-321.

76. Kozicz T, Vigh S, Arimura A (1997) Axon terminals containing PACAP- and VIP-immunoreactivity form synapses with CRF- immunoreactive neurons in the dorsolateral division of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. Brain Res 767:109-119.

77. Kozicz T, Min L, Arimura A. (2001) The activation of urocortin immunoreactive neurons in the Edinger-Westphal nucleus followin acute pain stress in rats. Stress 4:85-90.

78. Kozicz T (2007) On the role of urocortin 1 in the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus in stress adaptation. Gen Comp Endocrinol 153:235-240.

79. Kozicz T, Bordewin LA, Czéh B, Fuchs E, Roubos EW (2008a) Chronic psychosocial stress affects corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus and central extended amygdala as well as urocortin 1 in the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus of the tree shrew. Psychoneuroendocrinology 33:741-754.

80. Kozicz T, Tilburg-Ouwens D, Faludi G, Palkovits M, Roubos E (2008b) Gender-related urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor expression in the adult human midbrain of suicide victims with major depression. Neuroscience 152:1015-1023.

81. Kozicz T (2010) The missing link; the significance of urocortin 1/urocortin 2 in the modulation of the dorsal raphe serotoninergic system. Mol Psychiatry 15:340-341.

82. Kozicz T, Bittencourt JC, May PJ, Reiner A, Gamlin PD, Palkovits M, Horn AK, Toledo CA, Ryabinin AE (2011) The Edinger-Westphal nucleus: A historical, structural and functional perspective on a dichotomous terminology. J Comp Neurol 519:1413-1434.

83. Kranz GS, Kasper S, Lanzenberger R (2010) Reward and the serotonergic system. Neuroscience 166:1023-1035.

84. Kudryavtseva NN, Bakshtanovskaya IV, Koryakina LA (1991) Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. Pharmacol Biochem Behav. 38:315-320.

85. Larsen PJ, Hay-Schmidt A, Vrang N, Mikkelsen JD (1996) Origin of projections from the midbrain raphe nuclei to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat: a combined retrograde and anterograde tracing study. Neuroscience 70:963–988.

86. Léger L, Charnay Y, Burlet S, Gay N, Schaad N, Bouras C, Cespuglio R (1998) Comparative distribution of nitric oxide synthase- and serotonin-containing neurons in the raphe nuclei of four mammalian species. Histochem Cell Biol. 110:517-525.

87. Lehmann ML1, Mustafa T, Eiden AM, Herkenham M, Eiden LE (2013) PACAP-deficient mice show attenuated corticosterone secretion and fail to develop depressive behavior during chronic social defeat stress. Psychoneuroendocrinology 38:702-715.

88. Leussis MP, Freund N, Brenhouse HC, Thompson BS, Andersen SL (2012) Depressive-Like Behavior in Adolescents after Maternal Separation: Sex Differences, Controllability, and GABA. Developmental Neuroscience 34:210–217.

89. Lewis RW, Harwood JL, Richards RJ (1983) Metabolic effects on the lung, liver and brain following ingestion of imipramine and chlorpromazine by the rat. Drug Chem Toxicol. 6(2):135-53.

90. Lim LW, Prickaerts J, Huguet G, Kadar E, Hartung H, Sharp T, Temel Y (2015) Electrical stimulation alleviates depressive-like behaviors of rats: investigation of brain targets and potential mechanisms. Transl Psychiatry 5:e535.

91. Lin EJ (2012) Neuropeptides as therapeutic targets in anxiety disorders. Curr Pharm Des 18:5709–5727.

92. Liposits Z, Phelix C, Paull WK (1987) Synaptic interaction of serotonergic axons and corticotropin releasing factor (CRF) synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. A light and electron microscopic immunocytochemical study. Histochemistry 86:541-549.

93. Liposits Z (1990) Ultrastructural immunocytochemistry of the hypothalamic corticotropin releasing hormone synthesizing system. Anatomical basis of neuronal and humoral regulatory mechanisms. Prog Histochem Cytochem 21:1-98.

94. Liu X, Tang X, Sanford LD (2009) Stressor controllability and Fos expression in stress regulatory regions in mice. Physiol Behav 97:321-326.

95. 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.

96. McEvoy PM, Grove R, Slade T (2011) Epidemiology of anxiety disorders in the Australian general population: findings of the 2007 Australian National Survey of Mental Health and Wellbeing. Aust N Z J Psychiatry 45:957-967.

97. McEwen BS, Stellar E (1993) Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. Arch Intern Med. 27;153(18):2093-101.

98. McEwen BS (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. Brain Research 886 172–189.

99. 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.

100. 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.

101. Meaney MJ, Szyf M (2005) Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. Dialogues in Clinical Neuroscience Vol7. No. 2.

102. Mercer KB, Dias B, Shafer D, Maddox SA, Mulle JG, Hu P, Walton J, Ressler KJ (2016) Functional evaluation of a PTSD-associated genetic variant: estradiol regulation and ADCYAP1R1. Transl Psychiatry 6:e978.

103. Mill J. and Petronis A (2007) Molecular studies of major depressive disorder: the epigenetic perspective. Molecular Psychiatry 12, 799-814.

104. Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, Devon RS, St Clair DM, Muir WJ, Blackwood DH, Porteous DJ (2000) Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. Hum Mol Genet 9:1415-1423.

105. Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, and Coy DH (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. Biochem Biophys Res Commun 164:567–574.

106. Mustafa T, Jiang SZ, Eiden AM, Weihe E, Thistlethwaite I, Eiden LE (2015) Impact of PACAP and PAC1 receptor deficiency on the neurochemical and behavioral effects of acute and chronic restraint stress in male C57BL/6 mice. Stress. 8:1-11.

107. Nanopoulos D, Belin MF, Maitre M, Vincendon G, and Pujol JF (1982) Immunocytochemical evidence for the existence of GABAergic neurons in the nucleus raphe dorsalis. Possible existence of neurons containing serotonin and GABA. Brain Res 232:375–389.

108. Nabeshima T, Kim HC (2013) Involvement of genetic and environmental factors in the onset of depression. Exp Neurobiol. 22(4):235-43.

109. Nestler EJ, Kelz MB, Chen J (1999) DeltaFosB: a molecular mediator of long term neural and behavioral plasticity. Brain Res 835:10–17.

110. Neufeld-Cohen A, Evans AK, Getselter D, Spyroglou A, Hill A, Gil S, Tsoory M, Beuschlein F, Lowry CA, Vale W, Chen A (2010) Urocortin-1 and -2

double-deficient mice show robust anxiolytic phenotype and modified serotonergic activity in anxiety circuits. Mol Psychiatry 15:426-441.

111. Nijsen MJ, Croiset G, Diamant M, De Wied D Wiegant VM (2001) CRH signalling in the bed nucleus of the stria terminalis is involved in stress-induced cardiac vagal activation in conscious rats. Neuropsychopharmacology 24:1-10.

112. Njung'e K, Handley SL (1991) Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. Pharmacol Biochem Behav 38:63-67.

113. Norrholm SD, Das M, Légrádi G (2005) Behavioral effects of local microinfusion of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) into the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). Regul Pept 128:33-41.

114. Nussey SS, Whitehead SA (2001) Endocrinology BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford UK, ISBN: 1 85996 252 1.

115. Olivier JDA, van der Hart MGC, van Swelm RPL, Dederen PJ, Homberg JR, Cremers T, Deen PMT, Cuppen E, Cools AR, Ellenbroek BA (2008) A study in male and female 5-HT transporter knockout rats: an animal model for anxiety and depression disorders. Neuroscience 152 573-584.

116. Ons S, Rotllant D, Marín-Blasco IJ, Armario A (2010) Immediate-early gene response to repeated immobilization: Fos protein and arc mRNA levels appear to be less sensitive than c-fos mRNA to adaptation. Eur J Neurosci 31:2043-2052.

117. Otto C, Kovalchuk Y, Wolfer DP, Gass P, Martin M, Zuschratter W, Gröne HJ, Kellendonk C, Tronche F, Maldonado R, Lipp HP, Konnerth A, Schütz G (2001) Impairment of mossy fiber long-term potentiation and associative learning in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor-deficient mice. J Neurosci 21:5520-5527.

118. Paxinos G, Franklin K (2003) The mouse brain in stereotaxic coordinatres. 3rd edition. San Diego, Elsevier Academic Press.

119. Perrotti LI, Hadeishi Y, Ulery PG, Barrot M, Monteggia L, Duman RS, Nestler EJ (2004) Induction of deltaFosB in reward-related brain structures after chronic stress. J Neurosci 24:10594–10602.

120. Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvet M, Luppi PH (1998) Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. Neuroscience 82:443–468.

121. Pinhasov A, Nesher E, Gross M, Turgeman G, Kreinin A, Yadid G (2011) The role of the PACAP signaling system in depression. Curr Pharm Des 17:990-1001.

122. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. Arch Int Pharmacodyn Ther 229:327-336.

123. Rabasa C, Pastor-Ciurana J, Delgado-Morales R, Gómez-Román A, Carrasco J, Gagliano H, García-Gutiérrez MS, Manzanares J, Armario A (2015) Evidence against a critical role of CB1 receptors in adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and other consequences of daily repeated stress. Eur Neuropsychopharmacol 25:1248-1259.

124. Regev L, Neufeld-Cohen A, Tsoory M, Kuperman Y, Getselter D, Gil S, Chen A (2011) Prolonged and site-specific over-expression of corticotropin-releasing factor reveals differential roles for extended amygdala nuclei in emotional regulation. Mol Psychiatry 16:714-728.

125. Reglodi D, Somogyvári-Vigh A, Vígh J, Li M, Lengvári I, Arimura A (2001) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is highly abundant in the nervous system of anoxia-tolerant turtle, Pseudemys scripta elegans. Peptides 22(6):873-8.

126. Reglodi D, Kiss P, Szabadfi K, Atlasz T, Gabriel R, Horvath G, Szakaly P, Sandor B, Lubics A, Laszlo E, Farkas J, Matkovits A, Brubel R, Hashimoto H, Ferencz A, Vincze A, Helyes Z, Welke L, Lakatos A, Tamas A (2012) PACAP is an endogenous protective factor-insights from PACAP-deficient mice. J Mol Neurosci 48:482-92.

127. Ressler KJ, Mercer KB, Bradley B, Jovanovic T, Mahan A, Kerley K, Norrholm SD, Kilaru V, Smith AK, Myers AJ, Ramirez M, Engel A, Hammack SE, Toufexis D, Braas KM, Binder EB May V (2011) Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. Nature 470:492-497.

128. Risold PY, Swanson LW (1997) Connections of the rat lateral septal complex Brain Res, Brain Res Rev 24:115–195.

129. Roman CW, Lezak KR, Hartsock MJ, Falls WA, Braas KM, Howard AB, Hammack SE, May V (2014) PAC1 receptor antagonism in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) attenuates the endocrine and behavioral consequences of chronic stress. Psychoneuroendocrinology 47:151-165.

130. Rouwette TP, Kozicz T, Olde Loohuis NF, Gaszner B, Vreugdenhil E, Scheffer GJ, Roubos EW, Vissers KC, Scheenen WJ (2010) Acute pain increases phosphorylation of DCLK-long in the Edinger-Westphal nucleus but not in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. J Pain 11:930-940.

131. Rouwette T, Klemann K, Gaszner B, Scheffer GJ, Roubos E, Scheenen WJ, Vissers K, Kozicz T (2011) Differential responses of corticotropin-releasing factor and urocortin 1 to acute pain stress in the rat brain. Neuroscience 183:15-24.

132. Ryabinin AE, Wang YM, Finn DA (1999) Different levels of Fos immunoreactivity after repeated handling and injection stress in two inbred strains of mice Pharmacol Biochem Behav 63:143-151.

133. Sándor K, Kormos V, Botz B, Imreh A, Bölcskei K, Gaszner B, Markovics A, Szolcsányi J, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Reglodi D, Helyes Z (2010) Impaired nocifensive behaviours and mechanical hyperalgesia, but enhanced

thermal allodynia in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficient mice. Neuropeptides 44:363-371.

134. Sartorius N (2001) The economic and social burden of depression. J Clin Psychiatry 62: Suppl 15:8-11.

135. Savitz J, Lucki I, Drevets WC (2009) 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. Prog Neurobiol 88:17-31.

136. Sawchenko PE, Swanson LW, Steinbusch HW, Verhofstad AA (1983) The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. Brain Res 277:355-360.

137. Schmidt MV, Sterlemann V, Wagner K, Niederleitner B, Ganea K, Liebl C, Deussing JM, Berger S, Schütz G, Holsboer F, Müller MB (2009) Postnatal glucocorticoid excess due to pituitary glucocorticoid receptor deficiency: differential short- and long-term consequences. Endocrinology 150:2709-2716.

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

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

140. Seymour J (2005) Validation of short screening tests for depression: comment on Goring et al. (2004). Int J Geriatr Psychiatry (3):289; author reply 289-90.

141. Shapiro SS, Wilk MB (1965) An analysis of variance test for normality. Biometrika 52:591-599.

142. Shintani N, Mori W, Hashimoto H, Imai M, Tanaka K, Tomimoto S, Hirose M, Kawaguchi C, Baba A (2002) Defects in reproductive functions in PACAP-deficient female mice. Regul Pept 109:45-48.

143. Singewald GM, Rjabokon A, Singewald N, Ebner K (2010) The modulatory role of the lateral septum on neuroendocrine and behavioral stress responses. Neuropsychopharmacology 36:793-804.

144. Snedecor GW, Cochran WG (1989) Statistical methods. 8th edition, Ames, Iowa State University Press

145. Sterrenburg L, Gaszner B, Boerrigter J, Santbergen L, Bramini M, Elliott E, Chen A, Peeters B WMM., Roubos EW, Kozicz T (2011) Chronic stress induces sex-specific alterations in methylation and expression of corticotropin-releasing factor gene in the rat. PLoS One 6:e28128.

146. Stone EA, Lehmann ML, Lin Y, Quartermain D (2007) Reduced evoked fos expression in activity-related brain regions in animal models of behavioral depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 31:1196-1207.

147. Stone EA, Lin Y, Sarfraz Y, Quartermain D (2011) Antidepressant-like action of intracerebral 6-fluoronorepinephrine, a selective full α-adrenoceptor agonist. Int J Neuropsychopharmacol. 14:319-331.

148. Stroth N, Eiden LE (2010) Stress hormone synthesis in mouse hypothalamus and adrenal gland triggered by restraint is dependent on pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide signaling. Neuroscience 165:1025-1030.

149. Tsukiyama N, Saida Y, Kakuda M, Shintani N, Hayata A, Morita Y, Tanida M, Tajiri M, Hazama K, Ogata K, Hashimoto H, Baba A (2011) PACAP centrally mediates emotional stress-induced corticosterone responses in mice. Stress 14:368-375.

150. Ulrich-Lai YM, Herman JP (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. Nat Rev Neurosci 10:397-409.

151. Valentino RJ, Lucki I, Van Bockstaele E (2010) Corticotropin-releasing factor in the dorsal raphe nucleus: Linking stress coping and addiction. Brain Res 1314:29-37.

152. Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L Vaudry H (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. Pharmacol Rev 61:283-357.

153. Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C, et al. (1995) Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. Nature 378:287-92.

154. Vialou V, Thibault M, Kaska S, Cooper S, Gajewski P, Eagle A, Mazei-Robison M, Nestler EJ, Robison AJ (2015) Differential induction of FosB isoforms throughout the brain by fluoxetine and chronic stress. Neuropharmacology 99:28-37.

155. Wallace DL, Vialou V, Rios L, Carle-Florence TL, Chakravarty S, Kumar A, Graham DL, Green TA, Kirk A, Iniguez SD, Perrotti LI, Barrot M, DiLeone RJ, Nestler EJ, Bolanos-Guzman CA (2008) The influence of DeltaFosB in the nucleus accumbens on natural reward related behavior. J Neurosci 28:10272-10277.

156. Waselus M, Nazzaro C, Valentino RJ, Van Bockstaele EJ (2009) Stress-induced redistribution of corticotropin-releasing factor receptor subtypes in the dorsal raphe nucleus. Biol Psychiatry 66:76-83.

157. Westenbroek C, Ter Horst GJ, Roos MH, Kuipers SD, Trentani A, den Boer JA (2003) Gender-specific effects of social housing in rats after chronic mild stress exposure. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 27:21-30.

158. WHO (2016) http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/

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

160. Xu L, Scheenen WJ, Leshan RL, Patterson CM, Elias CF, Bouwhuis S, Roubos EW, Myers MG Jr, Kozicz T (2011) Leptin signaling modulates the activity of urocortin 1 neurons in the mouse nonpreganglionic Edinger-Westphal nucleus. Endocrinology 152:979-988.

161. Zhao J, Jung YH, Jang CG, Chun KH, Kwon SW, Lee J. (2015) Metabolomic identification of biochemical changes induced by fluoxetine and imipramine in a chronic mild stress mouse model of depression Sci Rep. 5:8890. doi: 10.1038/srep08890.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Kormos V*, Gaszner B*, Kozicz T, Hashimoto H, Reglődi D, Helyes Z.
The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger-Westphal nucleus, ventral lateral septum, and dorsal raphe nucleus.
NEUROSCIENCE (2012) 202:283-299.
Impakt faktor: 3.122
Független citáció: 33
* Megosztott elsőszerzős közlemény

Kormos V, Gáspár L, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, Balogh A, Hashimoto H, Reglődi D, Helyes Z, Gaszner B.
Reduced response to chronic mild stress in PACAP mutant mice is associated with blunted FosB expression in limbic forebrain and brainstem centers.
NEUROSCIENCE (2016) 330:335-358.
Impakt faktor: 3.277
Független citáció: 2

Kormos V, Gaszner B.
Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. Review
NEUROPEPTIDES (2013) 47:401-419.
Impakt faktor: 2.546
Független citáció: 116

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 8.945

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények összes független citációja: 151

EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

Sándor K, **Kormos V**, Botz B, Imreh A, Bölcskei K, Gaszner B, Markovics A, Szolcsányi J, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Reglődi D, Helyes Z.
Impaired nocifensive behaviours and mechanical hyperalgesia, but enhanced thermal allodynia in pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide deficient mice.
NEUROPEPTIDES (2010) 44:363-371.
Impakt faktor: 1.917, Független citáció: 15

Markovics A, **Kormos V**, Gaszner B, Lashgarara A, Szőke E, Sándor K, Szabadfi K, Tuka B, Tajti J, Szolcsányi J, Pintér E, Hashimoto H, Kun J, Reglődi D, Helyes Z.
Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays a key role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice.
NEUROBIOLOGY OF DISEASE (2012) 45:633-644.
Impakt faktor: 5.624, Független citáció: 49

Scheich B, Gaszner B, **Kormos V**, László K, Adori Cs, Borbély É, Hajna Zs, Tékus V, Bölcskei K, Ábrahám I, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs.
Somatostatin receptor subtype 4 activation is involved in anxiety and depression-like behavior in mouse models.
NEUROPHARMACOLOGY (2016) 101:204-215.
Impakt faktor: 5.012, Független citáció: 3

Farkas S, Bölcskei K, Markovics A, Varga A, Kis-Varga Á, **Kormos V**, Gaszner B, Horváth C, Tuka B, Tajti J, Helyes Z.
Utility of different outcome measures for the nitroglycerin model of migraine in mice.
JOURNAL OF PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL METHODS (2016) 77:33-44.
Impakt faktor: 2.238, Független citáció: 5

Borbély É, Hajna Z, Nabi L, Scheich B, Tékus V, László K, Ollmann T, **Kormos V**, Gaszner B, Karádi Z, Lénárd L, Paige CJ, Quinn JP, Szolcsányi J, Pintér E, Keeble J, Berger A, Helyes Z.
Hemokinin-1 mediates anxiolytic and anti-depressant-like actions in mice.
BRAIN, BEHAVIOR, AND IMMUNITY (2017) 59:219-232.
Impakt faktor (2016.): 5.964, Független citáció: 1

Farkas J, Kovács LÁ, Gáspár L, Nafz A, Gaszner T, Újvári B, **Kormos V**, Csernus V, Hashimoto H, Reglődi D, Gaszner B.
Construct an face validity of a new model for the three-hit theory of depression using PACAP mutant mice on CD1 background.
NEUROSCIENCE (2017) 354:11-29.
Impakt faktor (2016.): 3.277, Független citáció: 0

Az egyéb publikációk összesített impakt faktora: 24.034

Az egyéb publikációk összesített független citációinak száma: 73

A citációs adatok a *Google Scholar* adatbázisból származnak (2017. 09. 17.)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani elsősorban témavezetőmnek, Prof. Dr. Helyes Zsuzsannának, a TDK munkám megkezdése óta nyújtott oktatómunkájáért, vezetéséért, kutatói példamutatásáért, tanácsaiért, segítségéért, továbbá lendületes, vidám, közvetlen magatartásáért.

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

Külön köszönöm Dr. Gaszner Balázsnak a szövettani feldolgozás és az immunhisztokémia módszerének elsajátításában nyújtott oktatómunkáját, statisztikai analízisben, illetve az ábraanyag szerkesztésében nyújtott időt és fáradtságot nem kímélő segítségét, a lelkesítő támogatást, a példa értékű kutatói szemléletét, szorgalmát, precizitását, kritikusságát, mellyel bevezetett a kutatás világába.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Reglődi Dórának, a PACAP KO egerekhez való hozzáférés biztosításáért, Orbán Izabellának és Dittrich Erzsébetnek asszisztensi munkájáért és baráti támogatásáért, továbbá Prof. Dr. Kozicz Tamásnak szakmai tanácsaiért.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet és az Anatómiai Intézet minden dolgozójának, akik hozzájárultak munkámhoz: Dr. Sándor Katának, Gáspár Lászlónak, Dr. Farkas Józsefnek, Dr. Kovács László Ákosnak, Dr. Gaszner Tamásnak, Prof. Dr. Csernus Valérnak, Godáné Brumán Beatrixnak, és Hilyovszky Klárának.

Hálás köszönettel tartozom Családomnak, különösen Férjemnek és Gyermekeimnek, továbbá Szüleimnek és Férjem Szüleinek szeretetükért, támogatásukért, türelmükért és segítségükért.

A PhD dolgozatban összefoglalt kutatási tevékenység anyagi támogatásáért köszönet illeti a támogatókat: PEPSYS GINOP-2.3.2-15-2016-00050 - Stratégiai K+F műhelyek kiválósága: A peptiderg szignalizáció komplexitása és szerepe szisztémás betegségekben; EFOP-3.6.2 A neuroinflammáció vizsgálata a neurodegenerativ folyamatokban: a molekulától a betegágyig - "Neuroinflammációs mechanizmusok feltérképezése krónikus fájdalomban szerepet játszó centrális szenzitizációban".

FÜGGELÉK

	ANOVA (F és p értékek)			PACAP immun-reaktív rostok relatív denzitása (Hannibal, 2002)	A PACAP KO és vad típusú egerek stresszre adott c-Fos válasz erősségének összehasonlítása	A PACAP KO és vad típusú egerek *c-Fos* stresszválaszának összehasonlítása (Fisher féle *post hoc* tesztek p értékei)
	stressz	genotípus	interakció			
CEA	**F=50.97 p<0.00001**	F=0.79 p=0.38	F=1.62 p=0.22	+++	-21%	p=0.14
MeA	**F=47.02 p<0.0001**	F=0.41 p=0.52	F=1.24 p=0.28	+++	-19%	p=0.23
BLA	**F=80.27 p<0.0001**	F=0.94 p=0.34	**F=5.51 p<0.04**	+	**-27.5%**	**p=0.032**
BSTov	**F=32.52 p<0.0001**	**F=9.26 p<0.01**	**F=10.97 p<0.01**	+++	**-63.84%**	**p=0.0003**
BSTdl	**F=51.05 p<0.0001**	**F=4.93 p<0.05**	**F=9.09 p<0.01**	+++	**-40.1%**	**p=0.0019**
BSTdm	**F=40.10 p<0.0001**	F=0.64 p=0.43	F=3.62 p=0.07	-	-27%	p=0.073
BSTv	**F=50.94 p<0.00001**	F=0.02 p=0.88	**F=8.40 p<0.02**	-	**-25%**	**p=0.046**
dLS	**F=37.43 p<0.0001**	F=0.35 p=0.55	F=1.88 p=0.19	+++	-24.58%	p=0.18
vLS	**F=31.16 p<0.0001**	**F=5.85 p<0.03**	F=2.17 p=0.16	+++	**-45.9%**	**p=0.011**
EWcp	**F=164.56 p<0.000001**	**F=5.34 p<0.01**	**F=23.87 p<0.001**	+	**-43.4%**	**p=0.000012**
DR	**F=96.13 p<0.000001**	**F=40.75 p<0.00001**	**F=49.10 p<0.000001**	+	**-78.61%**	**P<0.0000001**
dPAG	**F=49.38 p<0.00001**	**F=9.23 p<0.01**	**F=5.93 p<0.03**	+++	-4.83%	p=0.67
lPAG	**F=225.14 p=0.000001**	F=1.5971 p=0.22	**F=41.45 p<0.00001**	+++	**-21.72%**	**p=0.0021**
mPVN	**F=64.09 p<0.00001**	F=0.65 p=0.41	**F=15.97 p<0.01**	++++++	**-36.04%**	**p=0.0035**
pPVN	**F=89.16 p<0.0000001**	F=1.49 p=0.23	**F=14.43 p<0.01**	++++++	**-36.46%**	**p=0.0026**

3. táblázat: A c-Fos immunreaktív sejtszámokon végzett statisztikai eredmények összefoglalása, párhuzamba állítva az egyes stresszben szerepet játszó területek PACAP immunreaktív rostjainak denzitásával Hannibal (2002.) alapján, valamint a c-Fos reaktivitás gyengülésének mértékével PACAP hiányban. (A statisztikailag szignifikáns értékeket **félkövér** betűtípussal emeltük ki.)

		Két utas ANOVA			A FosB expresszió különbség nagysága a stressznek kitett WT és KO egerek között (Fisher- féle *post hoc* teszt)
		Főhatások		Interakció	
Agy-terület		CVMS	genotípus	CVMS × genotípus	
CeA	$F_{3,22}$	**5.25**	**8.57**	**9.01**	**-54.74%**
	p	**<0.04**	**<0.02**	**<0.01**	**p<0.001**
MeA	$F_{3,22}$	**8.55**	2.05	1.04	
	p	**<0.01**	0.16	0.32	
BLA	$F_{3,22}$	0.14	0.40	0.70	
	p	0.70	0.53	0.41	
BSTdm	$F_{3,22}$	**5.65**	**4.60**	**6.61**	**-56.96%**
	p	**<0.04**	**<0.05**	**<0.03**	**p<0.01**
BSTdl	$F_{3,22}$	0.05	3.80	2.08	
	p	0.81	0.07	0.17	
BSTov	$F_{3,22}$	**10.12**	**9.32**	**7.44**	**-47.59%**
	p	**<0.01**	**<0.01**	**<0.02**	**p<0.001**
BSTv	$F_{3,22}$	0.03	0.04	**12.27**	**-51.33**
	p	0.84	0.83	**<0.01**	**p<0.03**
CA1	$F_{3,22}$	2.76	**7.00**	**5.62**	**-67.77%**
	p	0.11	**<0.02**	**<0.04**	**p<0.01**
CA3	$F_{3,22}$	0.01	0.14	2.20	
	p	0.99	0.71	0.15	
DG	$F_{3,22}$	**8.15**	0.16	0.48	
	p	**<0.02**	0.69	0.49	
vLS	$F_{3,22}$	**14.66**	3.65	**6.20**	**-61.07%**
	p	**<0.01**	0.08	**<0.04**	**p=0.01**
dLS	$F_{3,22}$	2.27	0.34	0.15	
	p	0.15	0.56	0.70	
pPVN	$F_{3,22}$	**50.79**	2.58	**51.28**	**-81.79%**
	p	**<0.00001**	0.12	**<0.00001**	**p<0.00001**
mPVN	$F_{3,22}$	**6.20**	2.88	2.09	
	p	**<0.03**	0.11	0.16	
dPAG	$F_{3,22}$	0.31	0.005	2.54	
	p	0.58	0.94	0.12	
lPAG	$F_{3,22}$	**5.14**	0.16	**4.63**	-19.47%
	p	**<0.04**	0.69	**<0.05**	p=0.08
EWcp	$F_{3,22}$	**6.56**	0.14	0.32	
	p	**<0.03**	0.70	0.57	
DR	$F_{3,22}$	**18.21**	1.72	**8.44**	**-58.53%**
	p	**<0.001**	0.20	**<0.01**	**p<0.01**

4. táblázat: A két utas varianciaanalízis (ANOVA) segítségével végzett statisztikai elemzések összefoglalója. Az injekciós kezelésben nem részesült egerek mintáin végzett FosB immunfestés eredményei (1. adathalmaz). A jobb oldali oszlop összegzi, hogy a genotípus milyen mértékben befolyásolja a FosB expressziót a Fisher-féle *post hoc* teszt eredményei szerint. Rövidítések: nucleus centralis (CeA), medialis (MeA) et basolateralis (BLA) amygdalae; nucleus dorsomedialis (BSTdm), dorsolateralis (BSTdl), ovalis (BSTov) et ventralis (BSTv) nuclei interstitialis striae terminalis. A hippocampus CA1, CA3 régiói és a gyrus dentatus (DG); ventralis (vLS) és dorsalis (dLS) almagok a nucleus lateralis septi területén; pars parvocellularis (pPVN) et magnocellularis (mPVN) nuclei paraventricularis hypothalami, dorsalis (dPAG) és lateralis (lPAG) periaqueductalis szürkeállomány, EWcp: centrális projekciójú Edinger-Westphal mag; DR: nucleus raphe dorsalis. CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz; WT: vad típusú, KO: a PACAP génhiányos (*knockout*) egér. A szignifikáns értékeket **félkövér** betűtípussal emeltük ki.

		MANOVA						
		Főhatások			Interakciók			
Agy-terület		CVMS	kezelés	genotípus	CVMS × kezelés	CVMS × genotípus	kezelés × genotípus	CVMS × kezelés × genotípus
CeA	$F_{7,41}$	**9.26**	**8.43**	2.14	2.39	0.17	**4.22**	1.40
	p	**<0.01**	**<0.01**	0.15	0.13	0.67	**<0.05**	0.24
MeA	$F_{7,40}$	**28.46**	**7.28**	0.03	0.59	0.01	3.37	0.62
	p	**$<10^{-4}$**	**<0.02**	0.84	0.44	0.91	0.07	0.43
BLA	$F_{7,41}$	1.77	0.30	1.21	1.87	0.11	1.56	0.03
	p	0.19	0.58	0.27	0.18	0.73	0.22	0.84
BSTdm	$F_{7,40}$	**18.33**	0.01	**4.56**	0.01	2.94	**6.85**	**5.08**
	p	**<0.001**	0.90	**<0.05**	0.94	0.09	**<0.02**	**<0.04**
BSTdl	$F_{7,41}$	0.83	0.12	2.23	0.03	0.45	0.04	0.06
	p	0.36	0.72	0.14	0.85	0.50	0.83	0.80
BSTov	$F_{7,39}$	0.53	2.53	**15.67**	0.14	1.02	2.29	0.31
	p	0.47	0.12	**<0.001**	0.70	0.32	0.14	0.58
BSTv	$F_{7,41}$	0.70	1.80	1.11	0.36	0.03	**7.81**	0.05
	p	0.40	0.18	0.29	0.54	0.85	**<0.01**	0.81
CA1	$F_{7,41}$	0.15	0.06	2.92	2.53	1.31	**4.79**	1.37
	p	0.69	0.80	0.09	0.12	0.26	**<0.04**	0.24
CA3	$F_{7,41}$	0.10	0.30	1.32	1.30	0.53	**4.44**	1.05
	p	0.74	0.58	0.25	0.26	0.47	**<0.05**	0.31
DG	$F_{7,40}$	2.39	0.89	0.28	3.17	0.08	**4.41**	2.72
	p	0.13	0.35	0.60	0.08	0.77	**<0.05**	0.11
vLS	$F_{7,41}$	**20.02**	**4.92**	**5.32**	1.76	**6.90**	0.61	0.61
	p	**<0.001**	**<0.04**	**<0.03**	0.19	**<0.02**	0.44	0.43
dLS	$F_{7,41}$	1.18	0.30	1.20	0.65	0.43	0.03	0.12
	p	0.28	0.58	0.28	0.42	0.51	0.85	0.72
pPVN	$F_{7,41}$	**5.67**	**15.14**	**33.91**	**9.61**	0.006	0.29	0.82
	p	**<0.03**	**$<10^{-3}$**	**$<10^{-4}$**	**<0.01**	0.93	0.59	0.37
mPVN	$F_{7,41}$	**8.46**	1.08	0.03	0.06	0.09	0.56	1.53
	p	**<0.01**	0.30	0.85	0.79	0.76	0.45	0.22
dPAG	$F_{7,41}$	2.61	0.0005	1.98	0.03	0.0001	0.48	0.009
	p	0.11	0.98	0.16	0.84	0.99	0.49	0.97
lPAG	$F_{7,41}$	**15.53**	0.17	0.09	0.0001	0.49	0.22	0.10
	p	**<0.001**	0.67	0.76	0.99	0.48	0.63	0.74
EWcp	$F_{7,40}$	0.91	0.01	**11.12**	0.5	**14.43**	1.32	0.10
	p	0.34	0.97	**<0.01**	0.48	**<0.001**	0.25	0.74
DR	$F_{7,41}$	**23.87**	1.60	**7.00**	**4.66**	**4.88**	3.03	0.74
	p	**$<10^{-4}$**	0.21	**<0.02**	**<0.04**	**<0.04**	0.09	0.39

5. táblázat: A multifaktoriális varianciaanalízis (MANOVA) eredményeinek összefoglalója. A FosB immunhisztokémia eredményei, melyek az injekciós kezeléseken átesett állatok mintáiból származnak (2. adathalmaz). Rövidítések: nucleus centralis (CeA), medialis (MeA) et basolateralis (BLA) amygdalae; nucleus dorsomedialis (BSTdm), dorsolateralis (BSTdl), ovalis (BSTov) et ventralis (BSTv) nuclei interstitialis striae terminalis. A hippocampus CA1, CA3 régiói és a gyrus dentatus (DG); ventralis (vLS) és dorsalis (dLS) almagok a nucleus lateralis septi területén; pars parvocellularis (pPVN) et magnocellularis (mPVN) nuclei paraventricularis hypothalami, dorsalis (dPAG) és lateralis (lPAG) periaqueductalis szürkeállomány, EWcp: centrális projekciójú Edinger-Westphal mag; DR: nucleus raphe dorsalis. CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz; WT: vad típusú, KO: a PACAP génhiányos (*knockout*) egér. A szignifikáns értékeket **félkövér** betűtípussal emeltük ki.

Agyterület		Két utas ANOVA			
			CVMS	genotípus	CVMS x genotípus interakció
CeA	CRF-FosB kolokalizáció	$F_{3,22}$	**7.19**	**10.38**	**8.34**
		p	**<0.02**	**<0.01**	**<0.02**
	CRF sejtszám	$F_{3,22}$	0.63	0.21	0.07
		p	0.43	0.65	0.79
	CRF SSD	$F_{3,22}$	0.004	0.53	3.25
		p	0.95	0.47	0.09
EWcp	Ucn1-FosB kolokalizáció	$F_{3,22}$	**7.68**	**12.44**	4.06
		p	**<0.02**	**<0.01**	0.06
	Ucn1 sejtszám	$F_{3,22}$	0.81	**5.37**	0.62
		p	0.38	**<0.04**	0.44
	Ucn1 SSD	$F_{3,22}$	0.14	0.80	0.65
		p	0.71	0.38	0.43
DR	5-HT sejtszám	$F_{3,22}$	3.37	**4.84**	4.56
		p	0.08	**<0.05**	0.052
	5-HT SSD	$F_{3,22}$	**46.61**	**7.19**	**18.42**
		p	**$<10^{-4}$**	**<0.02**	**<0.001**

6. táblázat: A két utas varianciaanalízissel (ANOVA) végzett statisztikai elemzések összefoglalója, mely az injekciós kezelésben nem részesült egerek mintáin végzett kettős jelölések eredményeit elemzi (1. adathalmaz). *Corticotropin releasing factor* (CRF), urokortin 1 (Ucn1) illetve szerotonin (5-HT) jelöléseket végeztünk a FosB kimutatás mellett. (5-HT neuronokban nem figyeltünk meg értékelhető FosB immunjelet.) CeA: nucleus centralis amygdalae, EWcp: centrális projekciójú Edinger-Westphal mag; DR: nucleus raphe dorsalis. CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz; SSD: specifikus jeldenzitás. A szignifikáns értékeket **félkövér** betűtípussal emeltük ki.

Agy-terület			MANOVA						
			Főhatások			Interakciók			
			CVMS	kezelés	genotípus	CVMS x kezelés	CVMS x genotípus	kezelés x genotípus	CVMS x kezelésx genotípus
CeA	CRF-FosB kolokalizáció	$F_{7,41}$	1.37	0.13	**10.47**	2.08	**6.41**	2.28	0.21
		p	0.25	0.72	**<0.01**	0.15	**<0.02**	0.14	0.65
	CRF sejtszám	$F_{7,41}$	1.86	0.37	**7.48**	0.25	0.23	0.85	1.82
		p	0.18	0.57	**<0.02**	0.61	0.62	0.36	0.18
	CRF SSD	$F_{7,41}$	1.89	0.49	0.003	0.15	1.17	0.08	2.73
		p	0.17	0.48	0.95	0.70	0.28	0.76	0.10
EWcp	Ucn1-FosB kolokalizáció	$F_{7,41}$	2.06	0.05	4.12	0.06	2.06	0.95	0.22
		p	0.16	0.81	0.051	0.79	0.16	0.33	0.63
	Ucn1 sejtszám	$F_{7,41}$	0.64	0.81	0.24	1.37	0.003	0.03	2.11
		p	0.42	0.37	0.62	0.24	0.95	0.84	0.15
	Ucn1 SSD	$F_{7,41}$	**7.89**	1.63	3.53	0.54	0.55	0.23	0.11
		p	**<0.01**	0.21	0.06	0.46	0.46	0.63	0.73
DR	5-HT sejtszám	$F_{7,41}$	0.17	0.04	2.67	1.13	0.75	4.18	0.28
		p	0.68	0.83	0.11	0.71	0.39	0.053	0.59
	5-HT SSD	$F_{7,41}$	1.90	0.07	3.68	0.157	0.34	**5.19**	**7.90**
		p	0.17	0.78	0.06	0.69	0.56	**<0.04**	**<0.01**

7. táblázat: A multifaktoriális varianciaanalízis (MANOVA) eredményeinek összefoglalója, mely az injekciós kezelésen átesett egerek mintáin végzett kettős jelölések eredményeit elemzi (2. adathalmaz). *Corticotropin releasing factor* (CRF), urokortin 1 (Ucn1) illetve szerotonin (5-HT) jelöléseket végeztünk a FosB kimutatás mellett. (5-HT neuronokban nem figyeltünk meg értékelhető FosB immunjelet.) CeA: nucleus centralis amygdalae, EWcp: centrális projekciójú Edinger-Westphal mag; DR: nucleus raphe dorsalis. CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz; SSD: specifikus jeldenzitás. A szignifikáns értékeket **félkövér** betűtípussal emeltük ki.