

**A depresszió három találat elméletén alapuló állapotmodell
prediktív validitásának vizsgálata az epigenom
változásainak tükrében**

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Gaszner Tamás

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Reglődi Dóra

Témavezető: Dr. Gaszner Balázs

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Anatómiai Intézet



Pécs, 2022.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	7
1.1. A depresszió prevalenciája, diagnózisa és háttere.....	7
1.2. A hangulatzavarok modellezése az alap kutatásban.....	8
1.3. A három találat elmélet.....	9
1.3.1. Első találat: genetikai predispozíció.....	9
1.3.2. Második találat: epigenetikai hatás.....	10
1.3.3. Harmadik találat: környezeti hatások.....	11
1.3.4. A három találat elmélet gyakorlati alkalmazása.....	12
1.4. Stresszadaptációban szerepet játszó fontosabb agyterületek.....	13
1.4.1. Magasabb rendű limbikus központok.....	13
1.4.2. CRH-rendszerek.....	14
1.4.3. Agytörzsi magvak.....	14
2. Célkitűzés és hipotézis.....	16
3. Módszer.....	17
3.1. Kísérleti állatok és kísérleti elrendezés.....	17
3.2. Viselkedési tesztek.....	19
3.2.1. Light-dark box teszt.....	19
3.2.2. Marble burying teszt.....	19
3.2.3. Tail suspension teszt.....	20
3.2.4. Forced swim teszt.....	20
3.3. Perfúzió és minta előkészítés.....	20
3.4. CORT radioimmunassay.....	21
3.5. Szövetteni vizsgálatok.....	21
3.5.1. Free-floating CRH-FOSB (ovBNST és CeA), UCN1-FOSB (cpEW), 5-HT-FOSB (DR) és TH-FOSB (VTA) kettős immunfluoreszcens jelölés.....	21
3.5.2. Free-floating immunhisztokémia az acetil-lizin H3 hisztonfehérje és a FOSB jelölésére diamino-benzidin kromogénnel.....	22
3.5.3. Immunhisztokémiai kontrollok.....	23
3.6. Mikroszkópia, digitális képalkotás és morfometria.....	24
3.7. Statisztikai analízis.....	25

4. Eredmények.....	26
4.1. A modell validitása.....	26
4.1.1. Testtömegváltozás.....	26
4.1.2. A mellékvese relatív tömege.....	26
4.1.3. A thymus relatív tömege.....	26
4.1.4. CORT-titer.....	28
4.2. Viselkedési tesztek eredményei.....	28
4.2.1. Light-dark box teszt.....	28
4.2.2. Marble burying teszt.....	29
4.2.3. Tail suspension teszt.....	29
4.2.4. Forced swim teszt.....	29
4.3. Szövetani eredmények.....	31
4.3.1. PFC.....	31
4.3.2. Hippocampus.....	33
4.3.3. ovBNST.....	37
4.3.4. CeA.....	40
4.3.5. VTA.....	44
4.3.6. cpEW.....	46
4.3.7. DR.....	49
4.4. A viselkedési és morfológiai megfigyelések közötti összefüggés.....	50
5. Diskusszió.....	51
5.1. Modellünk validitása.....	51
5.2. A viselkedési tesztek eredményeinek értelmezése.....	54
5.3. A morfológiai eredmények értelmezése.....	55
5.3.1. PFC.....	55
5.3.2. Hippocampus.....	56
5.3.3. ovBNST.....	57
5.3.4. CeA.....	57
5.3.5. VTA.....	58
5.3.6. cpEW.....	58
5.3.7. DR.....	59
5.3.8. A viselkedési és funkcionális-morfológiai eredmények közötti összefüggések értelmezése.....	60

5.4. Vizsgálataink limitációi.....	60
6. Következtetések és kitekintés.....	62
7. Új eredmények összefoglalása	63
8. Irodalomjegyzék.....	64
9. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	82
10. Az értekezés alapját nem képező egyéb közlemények.....	83
11. Előadások jegyzéke	84
12. Köszönetnyilvánítás	85
13. A doktori disszertáció alapjául szolgáló eredeti közlemények.....	86

Rövidítések jegyzéke

5-HT: szerotonin

ACTH: adrenocorticotrop hormon

AFR: normál állatházi körülmények közt való tartás (animal facility rearing)

AP1: aktivátor protein 1 komplex

BDNF: brain-derived neurotrophic factor

CA: cornu ammonis

Br: Bregma

CeA: centrális amygdala

CORT: kortikoszteron (corticosterone)

cpEW: centrális projekciójú Edinger-Westphal mag

CRH: corticotropin-releasing hormon

CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz (chronic variable mild stress)

cy: cyanin

DG: gyrus dentatus

DR: nucleus raphe dorsalis (dorsal raphe nucleus)

FST: forced swim teszt

H3K9ac: a 9. lizin aminosaván acetilált H3 hiszton fehérje

HPA-tengely: hypothalamus hypophysis mellékvese tengely

HZ: heterozigóta

ip: intraperitoneális

KO: génkiütött, (knock out)

LDT: light-dark box teszt

MANOVA: többutas variancia-analízis

MBT: üveggolyó elrejtési teszt (marble burying test)

MD: anyai megvonás (maternal deprivation)

MD180: három órás (súlyos) anyai megvonás

NDS: normál szamar szérum (normal donkey serum)

NGS: normál kecske szérum (normal goat serum)

ovBNST: nucleus interstitialis striae terminalis (bed nucleus of stria terminalis) ovális magja

PACAP: hypophysis adenilát cikláz-aktiváló polypeptid (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)

PBS: foszfátpufferelt sóoldat

PCR: polimeráz lánreakció (polymerase chain reaction)

PD: születés utáni nap (postnatal day)

PFC: prefrontális kéreg

PVN: nucleus paraventricularis hypothalami

SSD: specifikus jelzenzítás (specific signal density)

SSRI: szelektív szerotonin-visszavétel gátló (selective serotonin-reuptake inhibitor)

TH: tirozin-hidroxiláz

TST: tail suspension teszt

UCN1: urocortin 1

VTA: ventrális tegmentális área

WT: vad típusú (wild type)

1. Bevezetés

1.1. A depresszió prevalenciája, diagnózisa és háttere

A hangulatzavarok előfordulási gyakorisága meredeken emelkedik. Leggyakoribb formája, a májor depresszió önmagában több mint 280 millió embert érint világszerte (WHO, 2021). A betegségnek a pszichésen kívül kognitív, vegetatív és a szomatikus aspektusai is vannak. A diagnózist pedig a szerteágazó és nagyon széles spektrumon mozgó, időben is fluktuáló súlyosságú tünetek nehezítik. Definíció szerint a májor depressziós epizód diagnózisa akkor állítható fel, ha legalább két hétig fennáll az alábbi tünetek közül legalább öt, melyek közül egy az első kettő közül kerül ki (májor kritérium): depresszív hangulat, érdeklődés vagy örömeire való képesség elvesztése, közösségtől való visszahúzódás, hipo-, vagy hiperfágia, ennek következtében hízás vagy fogyás, alvási szokások megváltozása: inszomnia vagy hiperszomnia, motoros nyugtalanság vagy épp gátoltság, krónikus fáradtság, koncentrációs-, vagy döntési nehézség, tehetetlenség érzése, értéktelenség-érzés, bűntudat, önvád; és ennek következtében fellépő szuicid gondolatok, szándék, esetleg kísérlet. A depresszió hosszútávú, akár évekig-évtizedekig tartó lefolyása miatt az egészségügyi rendszer mellett a társadalmat és a gazdaságot is jelentősen megterheli (Prada, 2014), míg a betegség korai kezdete a produktív életévek nagymértékű csökkenését és az iskolázottsági arány visszaesését eredményezi (Hakulinen és mtsai., 2019). A kórkép fontosságát még jobban kiemeli, hogy az öngyilkossági kísérletek és a befejezett öngyilkosságok száma szoros összefüggést mutat a hangulatzavarok prevalenciájával (Gili és mtsai., 2019). Annak ellenére, hogy az elmúlt évtizedekben széleskörű és mélyreható kutatások folytak az etiológia és a pathomechanizmus feltárására, annak rendkívüli összetettsége miatt még mindig csak néhány töredékét ismerjük ennek a hatalmas „kirakósnek”. A gyógyszerfejlesztés és a betegség hátterének megismerése már az alap kutatás szintjén is nehézségekbe ütközik. Ennek egyik fő oka, hogy a mai napig nincs általánosan elfogadott állatmodellje a betegségnek, melyre égető szükség lenne annak érdekében, hogy a háttérben rejlő folyamatokat alaposabban meg lehessen vizsgálni.

1.2. A hangulatzavarok modellezése az alap kutatásban

A kutatásban gyakran alkalmazunk állatmodelleket. Annak érdekében, hogy egy újonnan kialakított állatmodell megbízhatóságát meg tudjuk ítélni, a modell működését alaposan tesztelni kell. Nincs ez másképp a hangulatzavarok kutatásánál sem és az itt használatos állatmodelleket három klasszikus validitási kritérium szerint kell értékelni, melyek alapelveinek leírását Willnernek köszönhetjük (Willner, 1984). Az első a konstrukciós validitás, ami azt jelenti, hogy a modellnek a betegség ismert rizikófaktoraira, kiváltó tényezőire kell épülnie, vagyis, abban az esetben, ha a kísérleti állatot kitesszük a betegség háttérében álló ismert rizikófaktornak, akkor az tüneteket okoz. A második, a fenomenológiai validitási kritérium szerint az állatnak az emberi betegség során megfigyelt tüneteket kell mutatnia. A harmadik, és talán ez a legnehezebben teljesíthető kritérium, a modell prediktív validitását érinti. Eszerint, a betegség kezelésére emberben már sikerrel használt terápiás eljárásoknak, gyógyszereknek, hatásosnak kell lenniük abban a tekintetben, hogy a betegségre jellemző tüneteket mutató kísérleti állatokban a terápia javulást idézzen elő. Ez alapján a modell használható arra, hogy a jövőbeli kezelések hatékonyságát teszteljük rajta. Ezért hívják prediktív kritériumnak ezt, hiszen az ilyen modell képes „megjósolni” a leendő kezelés hatékonyságát emberen.

Napjainkban a „monoamin teória” (eszerint a betegséget a monoaminok, azaz a szerotoninerg, noradrenerg és dopaminerg rendszerek kóros működése okozza [review tanulmányok: Mulinari, 2012; Czéh és mtsai., 2016; Harro, 2019]) az uralkodó nézet a depresszió kialakulásával kapcsolatban és az ezen elméleten alapuló állatmodelleken fejlesztett gyógyszerkészítmények alkotják a farmakoterápiai eszköztár szinte teljes egészét. A korábban gyakran használt gyógyszercsoportok, úgy, mint triciklusos antidepresszánsok és monoamin visszavétel gátlók kissé kezdenek a háttérbe szorulni. A legújabb kezelési sémák szerint a dopamin-noradrenalin-, és a szerotonin-noradrenalin visszavétel gátlók mellett az első vonalban leggyakrabban a szelektív szerotonin visszavétel gátlókat (selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI) használják (review tanulmányok: Pampallona és mtsai., 2004; Karyotaki és mtsai., 2016; Guidi és mtsai., 2021). Ez utóbbi csoport szinte minden beteg kezelésének alapját képezi. Az SSRI gyógyszer család leggyakrabban használt hatóanyagai a fluoxetin, a paroxetin, a citalopram, az escitalopram és a sertralin. Viszont egyre több adat mutatja, hogy a jelenlegi kezelésekkal a terápiás válasz az esetek legalább 30%-ában nem kielégítő (Catena-Dell'Oso, 2013; Khan és Brown, 2015; Voineskos és

mtsai., 2020). Ez alátámasztja azt a feltételezést, hogy a monoaminerg rendszereken túl más, eddig ismeretlen mechanizmusok is hozzájárulnak a depresszió pszichopathológiai hátteréhez. Az ismeretlen mechanizmusok feltárása érdekében a betegség rendkívüli összetettségéhez mérhető, komplex állatkísérleti megközelítésre van szükség az alap kutatásban. Olyanra, amely lehetőség szerint a legtöbb ismert rizikófaktort tekintetbe veszi, és a Willner-féle kritériumoknak is megfelel.

1.3. A három találat elmélet

Annak érdekében, hogy új, megbízható preklinikai eszközt fejlesszünk a pathomechanizmus tisztázására, a közelmúltban létrehoztunk egy új rágcslómodellt (Farkas és mtsai., 2016, 2017), amely a depresszió egyre szélesebb körben elfogadott három találat elméletén alapul. A három találat elmélet szerint a genetikai, epigenetikai és környezeti tényezők együttes megjelenése okozza a betegséget (de Kloet és mtsai., 2007; Daskalakis és mtsai., 2013).

1.3.1. Első találat: genetikai predispozíció

Számos jól ismert, a központi idegrendszer hangulatszabályozásban fontos szerepet játszó neuronhálózatainak működését befolyásoló (pl. dopamin-, szerotonin-, GABAerg receptorokat érintő), öröklődő genetikai elváltozás ismert, melyek növelik a betegség kialakulásának valószínűségét (lásd az alábbi review-kat: Lacerda-Pinheiro és mtsai., 2014; Mullins és Lewis, 2017; Ormel és mtsai., 2019). Kiemelendő, hogy egyre több bizonyíték utal arra, hogy a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is hozzájárul a hangulat szabályozásához (Agarwal és mtsai., 2005; Stroth és mtsai., 2011; review-k a témában: Pinhasov és mtsai., 2011; Kormos és Gaszner, 2013; Hammack és May, 2015; Lutfy és Shankar, 2019; Boucher és mtsai., 2021). Ismert, hogy a PACAP hiánya csökkenti a hypothalamus hypophysis mellékvese (HPA)-tengely aktivitását a hypothalamus paraventricularis magja (PVN) és a mellékvesekéreg szintjén (Stroth és Eiden, 2010; Tsukiyama és mtsai., 2011; Kormos és mtsai., 2016). Továbbá a funkcionális PACAP gén hiánya a CD1 alapon tenyésztett PACAP knock out (KO) egerekben megváltozott stresszadaptációt és depresszió-szerű viselkedést eredményez (Hashimoto és mtsai., 2001, 2009; Gaszner és mtsai., 2012, 2014; Kormos és mtsai., 2016, Farkas és mtsai., 2017). Érdekes adat ezzel szemben, hogy a C57BL/6J×129SvEv (F1 hibrid) és C57Bl/6N háttérű PACAP KO egerek antidepresszív fenotípust mutatnak (Hattori és mtsai., 2012; Lehmann és mtsai., 2013.).

Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján, a krónikus, variábilis, enyhe stressznek (chronic variable mild stress, CVMS) kitett CD1 PACAP heterozigóta (HZ) egerek alkalmasak a depresszió modellezésére (Farkas és mtsai., 2017). Korábban felmerült PACAP KO egerek használata is a modellben, de ezek, olyan technikai nehézségek mellett, mint például az igen nagyarányú elhullás CVMS során, néhány viselkedési tesztben paradox viselkedést mutattak korábbi állatkísérleteinkben, illetve használatuk transzlációs szempontból is nehezen indokolható. Mivel legjobb tudomásunk szerint az Adcyap1 gén depresszióval összefüggő biallélikus funkcióvesztéses mutációjára vonatkozóan nem állnak rendelkezésre humán adatok. Ellenben az Adcyap1 gén polimorfizmusainak a stresszel összefüggő hangulatzavarokban való megjelenését emberben leírták (Ressler és mtsai., 2011; Lind és mtsai., 2017). Ezek alapján döntöttünk úgy, hogy a három találat elmélet alapján létrehozott modellünkben PACAP HZ egereket használjuk, mivel ezek az egerek mintegy 70%-kal csökkent PACAP szintet mutatnak az agyban (Hashimoto és mtsai., 2011). E megközelítés célja tehát az volt, hogy áthidaljuk a többnyire funkcióvesztő KO mutáns állatokat alkalmazó depressziómodellek és az emberi betegségre jellemző, sokszor a génfunkciót csak kisebb mértékben befolyásoló esetleg heterozigóta genotípusban megjelenő polimorfizmusok közötti jelentős transzlációs szakadékot.

1.3.2. Második találat: epigenetikai hatás

A három találat elmélet alapkoncepciója szerint a második találat az epigenomot érinti. A leggyakrabban vizsgált epigenetikai változások a hiszton-, illetve DNS-metiláció mellett a hisztonfehérjék acetilációja (Strahl és Allis, 2000; Kouzarides, 2007). A hisztonacetilációs mintázatot a hiszton-acetiltransferáz és a hiszton-deacetiláz enzimesaládok közötti egyensúly szabályozza (Kuo és Allis, 1998). A hiszton fehérjéken bekövetkező acetiláció hatására a DNS-szál lazábban tekeredik a fehérjére, mely így jobb hozzáférést biztosít az RNS-polimeráz enzim számára, amely az adaptációban fontos fehérjék transzlációját indíthatja meg. A deacetiláció hatása fordított, a DNS-szál szorosabb feltekeredését eredményezi a hiszton fehérjére, melyhez így csökken az RNS-polimeráz hozzáférése, így a génexpresszió változást megkívánó adaptációs folyamatok dinamikája lassul (Kuo és Allis, 1998). Nincs ez másként a stresszadaptációban sem: irodalmi adat, hogy a CVMS a hisztonacetiláció és metiláció szintjén változtatja meg az epigenetikai mintázatot, mely befolyásolja a stresszválasz szempontjából kulcsfontosságú corticotropin-releasing hormon (CRH)-gén expresszióját is (Sterrenburg és mtsai., 2011). Ezzel

szemben, a hiszton-deacetiláz gátló kezelés enyhíti a depresszió-szerű viselkedést (Covington és mtsai., 2015), illetve az antidepresszáns-kezelésre adott válasz is javul (Levine és mtsai., 2012; Schmauss, 2015). Ezek a tények egyrészt arra utalnak, hogy az epigenetikai változások potenciálisan hozzájárulhatnak a hangulatzavarok kialakulásához azáltal, hogy megágyaznak a későbbi noxáknak, ugyanakkor azt is mutatják, hogy önmagukban nem váltják ki a betegséget. Az egyedre specifikus epigenom kialakulása leginkább az élet korai szakában zajlik, mint például a születés utáni időszak, de ide sorolható az adolescens kor is. Ezeket az időszakokat az epigenom szempontjából vulnérabilis fázisoknak is nevezik (Lange és Schneider, 2010; Ng és Gurdon, 2008). Az ekkor bekövetkező negatív életesemények növelik a depresszió kockázatát állatmodellekben (Nestler, 2012; Rabee és Spengler, 2013) és emberben is (Kim és mtsai., 2019; lásd még az alábbi review-t: Heim és Binder, 2012). Ezért, modellünkben második találatként anyai megvonást (maternal deprivation, MD) alkalmaztunk az élet korai szakaszában bekövetkező viszontagságos események (*early life adversity*) epigenomra gyakorolt hatásának modellezésére (Nishi és mtsai., 2014; review: Jawahar és mtsai., 2015). Kísérleteink tervezése során az acetyl-lizin 9 H3 hiszton (H3K9ac, a H3 hiszton fehérje 9. lizin aminosaván történt acetiláció) vizsgálata mellett döntöttünk, mert ez az egyébként széles körben alkalmazott marker munkacsoportunk -elsősorban morfológiai-eszköztára útján is jól vizsgálható az epigenetikai változások értékelésére.

1.3.3. Harmadik találat: környezeti hatások

A szervezetet érő tartós környezeti stressz játsza a legfontosabb szerepet a hangulatzavarok megjelenésében (review-k a témában: McEwen és mtsai., 2015; Deussing és Chen, 2018). A stressz fogalmát Selye vezette be, mely szerint a stressz a szervezet nem specifikus válasza valamely fenyegető külső hatásra (Selye, 1936), melyet stresszornak nevezünk. A normális stresszadaptáció azonnali (másodperceken belüli) reakciókkal kezdődik, melyeket elsősorban a szimpatikus idegrendszer és a mellékvesevelő szabályoz. A rendszer aktivációjának eredménye adrenalin és noradrenalin felszabadulása a mellékvese velőállományából. Ezen katekolaminok a légzési és keringési rendszert érintő gyors hatásai és az energia raktárak azonnali mobilizálása révén növelik a sikeres stresszadaptáció esélyét akut stresszexpozió esetén. Elhúzódó hatás esetén a HPA-tengely szabályozó szerepe válik jelentőssé (review tanulmány: Dunlavey, 2018). Ennek legfelső szintű központja a PVN, melynek működését magasabb limbikus központok és egyes agytörzsi magok is szabályozzák. A PVN által termelt CRH a hypophysis bazofil sejtjein hatva

adrenocorticotrop hormon (ACTH) felszabadulását idézi elő. Az ACTH a mellékvesekéreg *zona fasciculata* rétegében kortizol (emberben), illetve kortikoszteron (CORT, rágcsálókban) felszabadulását okozza, elindítva a homeosztatiszikus választ (Ulrich-Lai és Herman, 2009). A HPA-tengely depresszióban történő diszregulációja jól dokumentált állatmodellekben (Harvey és mtsai., 2006; Glover és mtsai., 2010; Farkas és mtsai., 2017; Ramot és mtsai., 2017) és humán vizsgálatokban egyaránt (Nemeroff és mtsai., 1984; Juruena és mtsai., 2018; review a témában: Perrin és Pariante, 2020). A hangulatzavarok kutatásában majdnem 40 éve használt krónikus variábilis stressz paradigma népszerűsége könnyen belátható transzlációs jelentőségén alapul. A kísérleti állatokban megfigyelt anhedónia és egyéb depresszió-szerű tünetek megfelelnek az embert a hétköznapi életben érő apróbb, de hosszan fennálló és nem megjósolható stresszorok (egyes névváltozatokban chronic unpredictable stress-ként, krónikus nem megjósolható stresszként aposztrofálják) által okozott hangulatingadozásokhoz (review közlemények: Willner és mtsai., 2019; Czéh és Simon, 2021; Strekalova és mtsai., 2022).

A stressz limbikus rendszerre gyakorolt hatásának vizsgálatára számos neuronális aktivációs marker áll rendelkezésre, melyek közül az egyik legelterjedtebb a FOSB. A FOSB és hosszabb féléletidejű *splice* variánsa, a deltaFOSB, a Jun/Fos proto-onkogén család által kódolt FOS transzkripciós faktorok fehérjetermékei, melyek a JUN fehérjecs család tagjaihoz kötődve kialakítják az aktivátor protein 1 komplexet (AP1). Az AP1 kötőhelye számos gén promóter régiójában megtalálható, így génexpressziós szinten celluláris folyamatokat befolyásolhat, ezáltal kiváló aktivációs marker. A FOSB és a deltaFOSB fokozott transzlációja percekkel a stimulust követően megkezdődik és utóbbi még napokkal, hetekkel a stimulust követően is kimutatható a sejtmagban, így a sejtaktiváció krónikus vizsgálatára alkalmas (Kovács és mtsai., 2022; Nestler és mtsai., 2015).

1.3.4. A három találat elmélet gyakorlati alkalmazása

A fent leírtak alapján, PACAP HZ egereket (első találat), a betegség egyik ismert genetikai predisponáló tényezőjének hordozóit, a születésük után, az epigenom alakulását tekintve vulnerábilis életfázisban, anyai megvonásban részesítettünk (második találat). Ezeket az állatokat később, felnőtt korukban CVMS-nek kitéve (harmadik találat) teljesedik ki a modell, mely a betegség különböző típusú (genetikai, epigenetikai és környezeti) rizikótényezőit is tartalmazza, így megfelel a willneri első (konstrukciós) validitási kritériumnak. Ezek az állatok viselkedési tesztekben depresszió-szerű viselkedést mutattak, megfelelve ezzel a willneri második

(fenomenológiai) validitási kritériumnak (Farkas és mtsai., 2017). Ezeknek az egereknek az emberi terápiában használatos antidepresszánt adva pedig vizsgálhatóvá válik a modell prediktív validitása is. Erre pedig a legalkalmasabb a humán gyógyászatban egyik leghatékosabb körben alkalmazott hatóanyag, a fluoxetin.

1.4. Stresszadaptációban szerepet játszó fontosabb agyterületek

A hangulatzavarok, azon belül is a depresszió kialakulásában már korábban bizonyított kulcsszerepük miatt az alábbi agyterületek és rendszerek funkcionális-morfológiai vizsgálatával kívántuk jobban megérteni a háttérben zajló idegrendszeri változásokat.

1.4.1. Magasabb rendű limbikus központok

A prefrontális kéreg (PFC) a magasabb rendű kognitív funkciók és a viselkedés-szabályozás egyik legfontosabb központja (review a témában: Treadway és mtsai., 2015). Már régóta vizsgálják, hogy ez az agyterület miként járul hozzá a depresszió pathogeneziséhez (George és mtsai., 1994; Pizzagalli és Roberts, 2022). Számos emberen végzett tanulmány látott napvilágot a témában, beleértve funkcionális mágneses rezonancia vizsgálatokat (Mayberg és mtsai., 1999), a PFC károsodását elszenvedett egyéneket vizsgáló közleményeket (Ellenbogen és mtsai., 2005), valamint mély agyi stimulációval kezelt betegekről szóló esettanulmányokat (Mayberg és mtsai., 2005; review: Koenigs és Grafman, 2009). Rágcsálókön végzett vizsgálatok is alátámasztják a PFC komplex szerepét a hangulatzavarok pathofiziológiájában, amelyben szerotoninerg (Albert és mtsai., 2014), GABAerg (Ghosal és mtsai., 2020) és glutamáterg (Veeraiah és mtsai., 2014) mechanizmusok is jelentősen szereppel bírnak. Az anyai megvonásos vizsgálatok megváltozott kognitív funkciókat és túlzott neuronális plaszticitást találtak (Baudin és mtsai., 2012), míg krónikus stressz hatására FOSB immunreaktivitás emelkedést és mikroglia aktivációt írtak le a PFC területén (Hinwood és mtsai., 2012). Kiemelendő, hogy a PFC efferens rostjai beidegzik a hangulatszabályozás egyéb limbikus központjait, köztük az amygdalá-t, a ventrális tegmentális área-t (VTA) és a hippocampust is (Sampath és mtsai., 2017).

A hippocampus valószínűleg a depresszióval kapcsolatban leggyakrabban vizsgált agyterület (review-k a témában: Campbell és MacQueen, 2004; Liu és mtsai., 2017; Bellau és mtsai., 2019). Ismert, hogy a stressz befolyásolja a hippocampus neuronális plaszticitását, így hozzájárul a

depresszió kialakulásához (Xu és mtsai., 1997; Pittenger és Duman, 2008). A stressz csökkenti a hippocampus térfogatát és aktivitását is, a depresszióban szenvedő betegek többségénél, azonban nem egyértelmű, hogy ez a hangulatzavar következménye vagy inkább hajlamosít a depresszió kialakulására (Czéh és mtsai., 2001, 2007). A hippocampus összetett kapcsolatrendszere a HPA-tengellyel, a PFC-vel és a tágabb értelemben vett amygdalával arra utal, hogy központi szerepe lehet a stresszadaptációban és a hangulatszabályozásban (Masi és Brovedani, 2011; Fuchs és mtsai., 2004). A hippocampus három divíziója, a cornu ammonis (CA) 1, CA3 és a gyrus dentatus (DG) alacsonyabb brain-derived neurotrophic factor (BDNF, egy az idegsejtek szinaptikus érését és életben maradását segítő fehérje) szintet mutatnak az anyai megvonást követően, mely változás antidepresszánskezeléssel visszafordítható (MacQueen és mtsai., 2003). Hasonló módon, korábban kimutattuk, hogy a krónikus stressz által kiváltott hippocampalis FOSB immunreaktivitás emelkedés antidepresszánskezeléssel kivédhető (Kormos és mtsai., 2016). Epigenetikai vizsgálatok is alátámasztják a hippocampus szerepét a hangulatzavarokban. Az egér hippocampus GABAerg interneuronjaiban fokozott mértékű DN5-metilációt találtak prenatális stresszt követően, mely az állatok depresszió-szerű viselkedésével párosult (Zhong és mtsai., 2020).

1.4.2. CRH-rendszerek

A tágabb értelemben vett amygdala CRH termelő részei (Carrasco és de Kar, 2003; Waters és mtsai., 2015), a centrális amygdala (CeA) és a nucleus interstitialis striae terminalis (bed nucleus of stria terminalis, BNST) ovális divíziója (ovBNST) részt vesznek a hangulatszabályozásban és a stresszválasz kialakításában is (Choi és mtsai., 2007; Kozicz és mtsai., 2008a; Regev és mtsai., 2011; Laine és mtsai., 2017; Kovács és mtsai., 2019). Érdekes módon ezek a magok PACAP-ot is tartalmaznak (Hannibal, 2002), és viselkedési tesztekben azt találták, hogy a PACAP fő receptorán, a PAC1 receptoron ható antagonistá kezelés visszafordítja a stressz negatív hatásait (Roman és mtsai., 2014). Nem utolsó sorban, ismert, hogy PACAP KO egerekben a stressz hatására bekövetkező aktiváció ezekben a régiókban csökken (Gaszner és mtsai., 2012; Levinstein és mtsai., 2022; Porta-Casteràs és mtsai., 2022; Boucher és mtsai., 2022).

1.4.3. Agytörzsi magvak

A CRH-val rokon urocortin1 (UCN1) elsősorban a középagyi centrális projekciójú Edinger-Westphal magban (cpEW) termelődik. Érdekes, hogy az UCN1-et tartalmazó sejtek PACAP

mRNS-t is expresszálnak (Priest és mtsai., 2021). Szerepüket stressz- és depresszió modellekben is leírták már egérben (Korosi és mtsai., 2005, Kormos és mtsai., 2016, 2022; Farkas és mtsai., 2017), patkányban (Gaszner és mtsai., 2004, 2007, 2009, Ujvari és mtsai., 2022), valamint mókuscickányban is (Kozicz és mtsai., 2008a). Ezeket az eredményeket öngyilkosságok áldozatainak cpEW-mintáin végzett vizsgálataink is alátámasztják (Kozicz és mtsai., 2008b, Kormos és mtsai., 2022), tovább erősítve az állatkísérletes eredményeink transzlációs értékét. Mind az extrahypothalamikus CRH-rendszerek (Lee és mtsai., 2007; Lemos és mtsai., 2011), mind a cpEW urocortinerg sejtjei (Kozicz és mtsai., 2010; Dos Santos Junior és mtsai., 2015) kapcsolatban állnak a nucleus raphe dorsalis (DR) szerotoninerg (5-HT) idegsejtjeivel. E sejtek szintén stressz-indukált aktivitást (Bouwknicht és mtsai., 2007; Zhang és mtsai., 2012) és PACAP mRNS expressziót mutatnak egérben (Lein és mtsai., 2007). A szerotoninerg neurotranszmisszió nagy jelentősége a hangulat szabályzásában a prefrontális kéregben, a hippocampusban és az amygdalában vitán felül áll (Steinbusch és mtsai., 1981; Ma és mtsai., 1991; review-k a témában: Lowry és mtsai., 2008; Venkatraman és mtsai., 2017). Jól ismert továbbá, hogy az agyi jutalmazási rendszerek és ezek működési zavarai erősen összefüggnek a hangulatzavarokkal (review-k a témában: Russo és Nestler, 2013; Heshmati és Russo, 2015). A VTA, mint a mesocortikolimbikus dopaminerg pálya központja pedig bizonyítottan fontos szerepet játszik a depresszió kialakulásában (Nestler és Carlezon, 2006; Peña és mtsai., 2017; Sun és mtsai., 2018). A tirozin-hidroxiláz (TH), mint a dopamin szintézis sebességmeghatározó enzime kiváló markere a magban történt stresszadaptációs változásoknak (Mukherjee és mtsai., 2010; Daubner és mtsai., 2011).

2. Célkitűzés és hipotézis

A Willner-féle konstrukciós és fenotípusos validitási kritériumokat (Willner, 1984) három találat modellünk esetében korábban már bizonyítottuk (Farkas és mtsai., 2017).

Jelen munkánk fő célja Willner harmadik, prediktív validitási kritériumának tesztelése volt. Hipotézisünk szerint a mindhárom találatot hordozó egereknél az antidepresszáns kezelés gold-standarját jelentő szelektív szerotonin-visszavétel gátlóval, fluoxetinnel történő kezelés visszafordítja a depresszió-szerű viselkedést és ennek hatásait, bizonyítva modellünk prediktív validitását.

Ennek igazolására, viselkedési tesztekét végeztünk, továbbá a stresszhatás fizikai és endokrinológiai paramétereit értékeltük, majd funkcionális-morfológiai eszközöket használtunk a PFC, a hippocampus (CA1, CA3, és DG régiók), továbbá az előagy CRH-, a közepagy UCN1-t tartalmazó, a DR szerotoninerg és a VTA dopaminerg rendszereiben, hogy megvizsgáljuk a neuronális aktivitási mintázatokat és az epigenetikai változásokat a három találat modellben.

Azt feltételeztük, hogy a találatok, mint kockázati tényezők kölcsönhatásba lépnek egymással és a fluoxetin kezeléssel, amit a megváltozott CRH, UCN1, 5-HT és TH immunreaktivitás, valamint H3 hiszton acetilációjának, és a FOSB neuronális aktivitási mintázatának változása is tükröz.

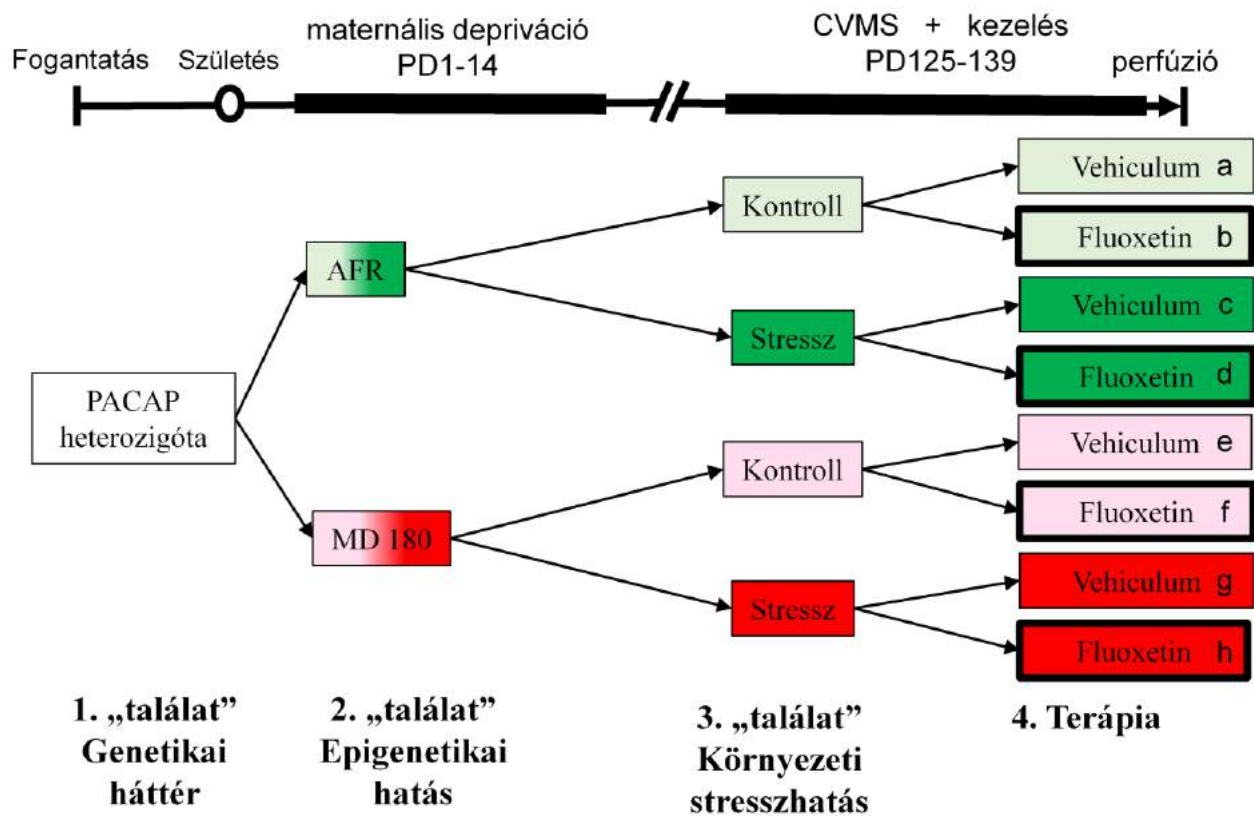
3. Módszer

3.1. Kísérleti állatok és kísérleti elrendezés

A saját tenyésztésű PACAP KO CD1 egértörzsünk tenyésztési eljárása megfelel a korábban publikált protokollnak (Farkas és mtsai., 2017). Röviden összefoglalva, első lépésben egy PACAP HZ egér generációt tenyésztettünk PACAP KO és vad típusú (WT) egérpárok segítségével. Ezt követően, számos PACAP HZ nőtényt és hímét pároztattunk ugyanazon a napon. A kísérlethez végül ebből a pároztatásból tizenhét, egy 72 órás perióduson belül született almot használtunk fel. Az alomkülönbségek csökkentése érdekében az első posztnatális napon (PD1) a kölyköket összekevertük, és random módon egyenlő arányban elosztottuk az anyák közt (*crossfostering*). Tíz almot napi 180 perces anyai megvonásnak (MD180) vetettünk alá PD1-14 között: a kölyköket elválasztottuk az anyjuktól és forgácsalommal bélelt ketrecekbe helyeztük őket egy 32°C-ra beállított melegítőlapra. Hét alom normál állatházi körülmények között nevelkedett (animal facility rearing, AFR). Az utódok genotípusát polimeráz láncreakcióval (PCR) határoztuk meg a PD70-n gyűjtött farokmintákból (a genotipizálással kapcsolatos további részletekért lásd Gaszner és mtsai., 2012).

Mivel korábban megállapítottuk (Farkas és mtsai., 2017), hogy a három találat elméleten alapuló modellünkben a PACAP HZ egerek ideálisak modellállatnak, ebben a kísérletben nem vizsgáltuk a PACAP KO és WT utódokat. A modell komplexitása, valamint, a véges állatházi kapacitás és a teszteredmények ösztrusz ciklus váltakozásából adódó várhatóan nagyobb szórása miatt a nőtény állatok vizsgálatáról is le kellett mondanunk. Tizenhét, illetve huszonöt hím PACAP HZ egeret azonosítottunk PCR segítségével az AFR és az MD180 főcsoportban. Négy alcsoportot hoztunk létre mind az AFR (a csoportok az ábrákon egységesen a-d-vel jelöltek), mind az MD180 főcsoportban (e-h csoportok), ahogy azt az 1. ábra mutatja. Négy alcsoportot (c, d és g, h csoportokat) a PD125-PD139 között CVMS-nek tettünk ki, szemben négy kontroll alcsoporttal (a, b és e, f csoportok), amelyeket nem tettünk ki stresszhatásnak. Az alcsoportok felét naponta intraperitoneális (ip) fluoxetin (20 mg/kg/nap 0,2 ml sóoldatban) injekcióval kezeltük (b, d, f, h csoport), fiziológiás sóoldattal (0,2 ml vivőanyag) injektált alcsoportokkal (a, c, e, g csoport)

szemben (lásd még az 1. ábrát). Az injekció beadásának helyét a hasfalon naponta változtattuk a szövetkárosodás csökkentése érdekében. 4-6 állat alkotott egy-egy alcsoportot (a-h). A CVMS paradigma a korábban publikáltak szerint (Farkas és mtsai., 2016, 2017) napközbeni (döntött ketrecállás, sötét szoba, rázógép) és éjszakai (nedves alom, szociális izoláció, csoportban tartás) az állatok hozzászokásának elkerülése érdekében folyamatosan variált stresszorból állt. Az állatok testtömegét a stresszperiódus első és minden negyedik napján az injekciózás idején mértük.



1. ábra: Az *in vivo* kísérlet idővonala, és kísérleti elrendezés. Az ezen az ábrán használatos betűjelölést (a-h) és a színeködeket a dolgozatban bemutatott összes diagrammon következetesen használjuk a könnyebb átláthatóság érdekében. Zöld háttér: normál állatházi körülmények között tartott (AFR), piros háttér: napi három órás anyai megvonáson átesett (MD180) csoportok. Ezekben belül, a sötétebb árnyalat a krónikus variábilis enyhe stresszt (CVMS) elszenvedett, a világosabb árnyalat a krónikus stressznek ki nem tett, kontroll (Ctrl) állatok csoportjaira utal. A vastag fekete keret a fluoxetin kezelést jelképezi, a vivőanyagot kapott állatokkal szemben. PD: születés utáni nap (postnatal day).

Az állatokat standard méretű (30 x 30 x 28 cm) polikarbonát ketrecekben tartottuk (ketrecenként 4-5 egér), szabályozott hőmérsékleten (24 °C) és páratartalomban (50%), 12 órás világos-sötét periódusokban (a lámpák este 6 órakor kapcsolak le) a Pécsi Tudományegyetem Anatómiai Intézetének állatházában. *Ad libitum* hozzáférést biztosítottunk a standard rágcsálótáphoz és ivóvízhez. A faforgács almot minden második nap cseréltük. Az *in vivo* kísérleteket a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal engedélyezte (engedélyszám: BAI/35/51-122/2016) a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának és a magyar Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács támogató javaslata alapján.

3.2. Viselkedési tesztek

Összesen négy tesztet végeztünk a korábbi munkáinkban leírt módon (Kormos és mtsai., 2016; Farkas és mtsai., 2017, Kormos és mtsai., 2022). A szorongás szintjének felmérésére a light-dark box (LDT) és a marble burying tesztet (MBT) használtuk. A depresszió-szerű viselkedés felmérésére tail suspension (TST) és forced swim tesztet (FST) végeztünk. Az egyes tesztek után az állatokat visszahelyeztük eredeti ketrecekbe. Minden tesztet a viselkedési vizsgálatok kiértékelésében nagy tapasztalattal rendelkező személy elemzett, aki az értékelés idején nem tudta, hogy a vizsgált állat melyik csoportba tartozik.

3.2.1. Light-dark box teszt

A kísérletet egy 40x20x27 cm-es doboz segítségével végeztük, melyet egy 7x7 cm-es nyílással ellátott, átlátszatlan fal választott el két egyenlő méretű részre. A doboz egyik oldala fehérre volt festve és 100 W-os lámpával világítottuk meg, míg a másik rekesz fekete falú és sötét volt (Crawley és Goodwin, 1980). Az egereket a megvilágított rekeszbe helyeztük arccal a nyílás felé fordítva, és 5 percig videokamerával rögzítettük viselkedésüket. A világos területen töltött időt értékeltük.

3.2.2. Marble burying teszt

Az állatokat egyenként ketrecekbe (30x30x28 cm) helyeztük, amelyekbe előzőleg 24 db színes, 15 mm átmérőjű üveggolyót tettünk a friss, 4 cm vastagságú alom tetejére. Az egereknek 30 perc állt rendelkezésére, hogy bejárják a ketrecet az üveggolyókkal. Az állatok szorongásszintjének meghatározására az elrejtett (azaz legalább 2/3 részükig az alomba temetett) golyók számát rögzítettük (Njung'e és Handley, 1991; Farkas és mtsai., 2017).

3.2.3. Tail suspension teszt

Az egereket 6 percre 50 cm-rel egy asztallap felett a farkuknál fogva ragasztószalag segítségével felfüggesztettük. Mozgásukról videófelvétel készült, és a teszt utolsó 4 percében a mozdulatlanul töltött időt (immobilitási idő) értékeltük (Steru és mtsai., 1985; Farkas és mtsai., 2017).

3.2.4. Forced swim teszt

A vizsgálat a Porsolt (1977) teszt Ghasemi (2009) által módosított protokollja szerint történt. Az egereket 11,5 cm átmérőjű, 25 cm magas üveghengerekbe helyeztük, melyeket előzőleg 23 °C-os csapvízzel töltöttünk fel 19 cm-ig. Az immobilitási időt a 6 perces felvételek utolsó 4 percében értékeltük (Farkas és mtsai., 2017).

3.3. Perfúzió és minta előkészítés

Az állatokat a PD140-en 9 és 12 óra között uretán injekció segítségével túlaltattuk (ip; 2,4 mg/kg). Egy ketrec minden állata 2 percen belül megkapta az altató injekciót. A már alvó egerek testtömegét megmértük, majd a mellkas felnyitása után kb. 1 ml bal kamrai vérmintát vettünk 50 µl 7m/m%-os EDTA-oldattal előtöltött fecskendőbe, hogy a vér megalvadását elkerüljük. Ezután, a megnyitott bal kamrán keresztül egy kanült vezetünk az aortába, hogy az állatokat 20 ml jéghideg 0,1 M foszfátpufferelt sóoldattal (PBS, pH 7,4), majd 150 ml 4%-os paraformaldehid-oldattal (Millonig pufferben oldva, pH 7,4) perfundáljuk. A jobb pitvart megnyitottuk, hogy az oldatok a szisztémás keringésen keresztül áramolhassanak. A vérmintákat 5 percig 3000/perc fordulatszámon centrifugáltuk. A plazma felülúszót összegyűjtöttük és -20°C-on tároltuk a CORT radioimmunassay-hez. A perfúzió után a thymust és a mellékvesevelőt eltávolítottuk, tömegüket megmértük. Az agyakat eltávolításuk után 72 órán át 4°C-on posztfixáltuk. A koronális síkú metszeteket vibratóm (Leica VT1000 S, Leica Biosystems, Wetzlar, Németország) segítségével készítettük. Négy sorozat 30 µm vastag metszetet antifreeze oldatban (20% etilén-glikol, 30% glicerin és 0,1 M nátrium-foszfát puffer) -20°C-on tároltuk a festésig.

3.4. CORT radioimmunassay

A radioimmunassay mérés során 5 µl szérum és 100 µl assay puffer (0,5 M PBS, ami 1g/l zselatint és 1g/l nátrium-azid keverékéből áll, pH=7,4) elegyét extraháltuk 1 ml dietil-éterrel. 1,25 ml assay pufferrel rekonstruáltuk a száraz extraktumot, amiből két párhuzamos mérést végeztünk. A csövek 500 µl extraktumot és trícíált CORT-t (12000 cpm; NEN, NET-399,90-120 Ci/mmol), illetve 15 nl/cső CS-RCS-57 antitestet 1:47000 munkahígításban tartalmaztak, összesen 700 µl volumenben. Standard mintaként 9 hígításban CORT-t (Calbiochem, San Diego, CA, USA) használtunk. A csöveket egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk, ezt követően aktív szén segítségével szeparáltuk a dextránnal borított szabad szteroidokat. Kétfázisú folyadék szcintillációs rendszerrel állapítottuk meg a minták aktivitását. Az assay szenzitivitása 30 fmol/cső volt.

3.5. Szövetteni vizsgálatok

3.5.1. Free-floating CRH-FOSB (ovBNST és CeA), UCN1-FOSB (cpEW), 5-HT-FOSB (DR) és TH-FOSB (VTA) kettős immunfluoreszcens jelölés

A vizsgálandó agyi területek ideális síkban készült metszeteit a Paxinos és Franklin (2001) egéragy atlasz alapján válogattuk ki, az alábbi a Bregmához (Br) viszonyított távolságok szerint: ovBNST (Br +0,35 mm és - 0,15 mm között), CeA (Br -1,45 mm és -1,95 mm között), VTA (Br -2,15 mm és -2,65 mm között), cpEW (Br -3,2 mm és -3,8 mm között) DR (Br -4,35 mm és -4,85 mm között).

A festés első lépéseként 6 x 10 perces PBS-mosással eltávolítottuk az antifreeze oldatot, és citrát puffer oldatban (90°C, pH 6, 10 perc) hőindukált antigén helyreállítást végeztünk. Ezután, 60 percig 0,5%-os Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) oldattal permeabilizáltuk a sejtmembránt. Ezt követően 60 percig normál szarumba helyeztük a metszeteket a nem specifikus kötőhelyek blokkolásának céljából (NDS, Jackson Immunoresearch, Europe Ltd., Suffolk, UK), amelyet a CRH-FOSB jelölésnél 5%-ra, az UCN1-FOSB, 5-HT-FOSB és TH-FOSB festési eljárásoknál pedig 2%-ra hígítottunk PBS-ben. Ezt követően a metszeteket az NDS-ben oldott primer antitestek kocktéljába helyeztük. Ezek a következők voltak: nyúl anti-FOSB (1:250, Santa Cruz, sc-48, RRID:AB_631515, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz CA, USA) kombinálva a) kecske anti-CRH-val (1:150, Santa Cruz, sc-1759; RRID: AB_631300) 72 órán keresztül, 4°C-on, b) kecske anti-UCN1-gyel (1:175 Santa Cruz, sc-1825; RRID: AB_2304014)

48 órán keresztül, 4°C-on, c) egér monoklonális anti-5-HT-nal (1:10000, Dr. Lucienne Léger, Université Claude Bernard, Lyon, Franciaország; RRID:AB_2313872) 48 órán keresztül, 4°C-on, vagy d) monoklonális egér anti-TH-zal (1:1000, Sigma-Aldrich; RRID:AB_477569) 16 órán keresztül, 4°C-on. A 2 x 15 perces PBS mosás után a metszeteket a szintén PBS-ben oldott, NDS-t tartalmazó másodlagos antitestek keverékébe helyeztük. A FOSB jelölésére minden esetben cyanin-3 (Cy3) konjugált szamár anti-kecske szérumot (1:800, Jackson Immunoresearch; RRID:AB_2340411) használtunk. Ehhez a CRH immunreakció vizualizálása érdekében biotinizált szamár anti-kecske antiszérumot (1:1000, Jackson Immunoresearch; RRID:AB_2340397) adtunk 24 órán keresztül, 4°C-on. 2 x 15 perces PBS mosást követően a metszeteket 3 órán keresztül cyanine 5 (Cy5) konjugált streptavidin (1:1000, Jackson Immunoresearch; RRID:AB_2337245) PBS-es oldatába helyeztük át. Az UCN1 jelöléshez Alexa 488-konjugált szamár anti-kecske (1:200, Jackson Immunoresearch; RRID:AB_2336933), illetve az 5-HT és TH jelöléshez Alexa 488-konjugált szamár anti-egér (1:500, Jackson Immunoresearch; RRID:AB_2341099) szekunder antiszérumokat adtunk 3 órára. Végül a metszeteket 2 x 15 percig PBS-ben öblítettük, zselatinnal bevont tárgylemezre húztuk, levegőn szárítottuk és PBS-ben oldott 50%-os glicerinnel fedtük.

3.5.2. Free-floating immunhisztokémia az acetil-lizin H3 hisztonfehérje és a FOSB jelölésére diamino-benzidin kromogénnel

A fixáló és az antifreeze eltávolítása céljából végzett 4 x 15 perces PBS mosás után a metszeteket 60 percig 0,5%-os Triton X-100 oldatban permeabilizáltuk. Normál kecskeszérumot (NGS, Jackson Immunoresearch, 60 perc, 2%, PBS-ben oldva) használtunk a nem specifikus kötőhelyek blokkolására. Ezután a metszeteket anti-acetil-lizin 9 H3 hiszton antitestek (1:4000, Sigma Aldrich; Cat# SAB4500347; RRID:AB_10742909) vagy nyúl anti-FOSB (1:500, Santa Cruz, sc-48, RRID: AB_631515, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz CA, USA) 2% NGS-t is tartalmazó oldatába helyeztük, és egy éjszakán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. 2x15 perces PBS öblítés után a metszeteket 60 percig kezeltük biotinizált kecske anti-nyúl IgG oldattal (1:200, Vectastain ABC Elite Kit, Vector Lbs., Burlingame, CA, USA), majd PBS öblítést követően, peroxidáz-konjugált avidin-biotin komplexben (Vectastain ABC Elite Kit) 60 percig inkubáltuk. További PBS mosások után az immunreakciót Tris pufferben (pH 7,4) 0,02% 3,3'diaminobenzidin (DAB, Sigma-Aldrich) és 0,03 m/v% H₂O₂ segítségével hívtuk elő. A jel/háttér arány optimalizálása érdekében a reakciót fénymikroszkóp alatt szemkontroll mellett végeztük, végül PBS pufferben állítottuk le. A PBS-öblítéseket követően a metszeteket zselatinnal bevont tárgylemezre húztuk.

Levegőn való szárítás majd dehidratálás (50%, 70%, 96%, abszolút etanol, 5 perc) után a tárgylemezeket 2x10 percre xilolba helyeztük, végül Depex-szel (Fluka, Heidelberg, Németország) fedtük le.

3.5.3. Immunhisztokémiai kontrollok

A CRH-antitestünket (Santa Cruz, sc-1759) a humán CRH C-terminális peptidfragmentuma ellen termeltették. A gyártó honlapján publikálták (<http://datasheets.scbt.com/sc-1759.pdf>), hogy az antitest specificitását Western blot segítségével ellenőrizték. Az UCN1 antitestet (Santa Cruz, sc-1825) a patkány UCN1 C-terminális peptidfragmentuma ellen termeltették. A szérum specificitását korábbi munkáinkban (Kormos és mtsai., 2016; Farkas és mtsai., 2017) teszteltük egérben. Az 5-HT antitest Dr. Lucienne Léger (Léger és mtsai., 2001) ajándéka. Ezt az antitestet korábban egér agyszövetben teszteltük (Kormos és mtsai., 2016). A TH ellenanyagot (Sigma-Aldrich) az egér TH C-terminális peptidfragmentuma ellen termelték, specificitását Western blot segítségével tesztelték a gyártó honlapján közzétett adatok szerint (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t2928>). Az acetyl-lizin 9 H3 hiszton ellenanyagot egy szintetikus peptid (a fehérje 3-52. savmaradék tartománya) ellen generálták, amely a Lys9 acetylációs helyet is tartalmazza. A szérum specificitását a gyártó egérszöveten tesztelte

(<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sab4500347?lang=hu®ion=HU>). A kísérletben használt FOSB ellenanyagot (Santa Cruz, sc-48) a humán FOSB C-terminális peptidfragmentuma ellen termeltették, amelyet korábban szintén teszteltünk (Sterrenburg és mtsai., 2011; Kormos és mtsai., 2016; Farkas és mtsai., 2017). Az elsődleges vagy másodlagos antiszérumok elhagyása vagy nem immunizált (normál) szérumokkal való helyettesítésük nem eredményezett felismerhető immunjelölődést. A szintetikus blokkoló peptidekkel történő preabszorpció után sem kaptunk detektálható jelet (Kormos és mtsai., 2016; Farkas és mtsai., 2017).

3.6. Mikroszkópia, digitális képalkotás és morфомetria

Az immunfluoreszcencia vizsgálatát és digitalizálását az Olympus Fluoview 1000 konfokális mikroszkóp (FV10-1000S-IX81) segítségével végeztük. A képeket a megfelelő fluorofórok *photon count* üzemmódban történő szekvenciális pásztázásával rögzítettük, hogy elkerüljük az emissziós spektrumok részleges átfedéséből adódó álpozitív jelet, és megbízható szemikvantitatívan értékelhető fluoreszcens jelet kapjunk. A konfokális apertúra beállításai 80 µm, 1024 x 1024 felbontás voltak, 20x objektívvel (NA: 0,75) kiegészítve. A fluorofórok gerjesztési és emissziós spektrumának kiválasztása a Fluoview szoftver alapbeállításainak alkalmazásával történt. A festékek gerjesztéséhez a következő lézersugár hullámhosszokat használtuk: Alexa Fluor 488 esetében 488 nm; Cy3 esetében 550 nm; Cy5 esetében 670 nm. A pásztázás után a csatornák képeit egyenként és illetve is elmentettük és tároltuk. Az egyes csatornához virtuális vörös illetve zöld színeket rendeltünk a kolokalizáló fluoreszcens jelek értékeléséhez.

A sejtszámlálást tapasztalt morfológus végezte manuálisan úgy, hogy nem kapott előzetes információt arról, mely állatokhoz tartoznak az egyes számkódolt képfájlok. A sejtek számát agyterületenként öt digitális képből átlagoltuk, ahol az adott mag/terület teljes keresztmetszeti területét figyelembe vettük. Az immunfluoreszcencia intenzitását ImageJ szoftverrel (v1.42, NIH, Bethesda, MD) mértük. Tíz perikaryont értékeltünk a CRH, UCN1, 5-HT vagy TH esetében 5 eredeti képen, ahol manuálisan jelöltük ki a citoplazmatikus területeket a megfelelő csatorna felvételein. A citoplazmatikus jelerősséget a háttér intenzitással korrigáltuk. Ez utóbbit az immunreaktív sejtek közelében véletlenszerűen kiválasztott immunnegatív területeken mértük. Az így kiszámított specifikus jelintenzitást (SSD) önkényes egységekben (ö.e.) fejeztük ki. A DAB-jelölt acetil-lizin H3 és FOSB immunhisztokémiai vizsgálat preparátumait Nikon Microphot FXA mikroszkóppal értékeltük és digitalizáltuk Spot RT kamera (Nikon, Tokió, Japán) segítségével. Egerenként ebben az esetben is öt felvételt készítettünk minden egyes agyterületről. A megjelölt sejtmagokat az ovBNST, CeA, cpEW, DR és VTA teljes felületét figyelembe véve manuálisan számoltuk meg. A PFC esetében egy 500 x 750 µm-es területet (lásd 3J ábra) értékeltünk. A hippocampusnál a CA1 és CA3 régiók *stratum pyramidale*-jában egy 1200 µm-es sávban, míg a DG szemcsesejtes rétegében szintén 1200 µm-es szélességben számoltuk a sejteket. A

publikáláshoz a kiválasztott reprezentatív képeket Photoshop szoftverrel (Adobe, San Jose, CA) kontrasztosítottuk.

3.7. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzést Statistica szoftverrel (v8.0; Statsoft, Tulsa, OK, USA) végeztük. Minden adatot a csoport átlagaként adtuk meg, és ábráztuk az átlag standard hibáját. A két szigma tartományon túli adatokat kizártuk az értékelésből. Az adatok normalitását Shapiro-Wilk teszttel (Shapiro és Wilk, 1965), míg a variancia homogenitását Bartlett Chi-négyzet próbával (Snedecor és Cochran, 1989) vizsgáltuk. Az adatokat többutas varianciaanalízisnek (MANOVA) vetettük alá, amelyet Tukey *post hoc* tesztek követtek ($\alpha < 5\%$). Az adatsorok mélyebb kapcsolatának feltárása érdekében Spearman-féle korrelációs tesztet is végeztünk.

4. Eredmények

4.1. A modell validitása

4.1.1. Testtömegváltozás

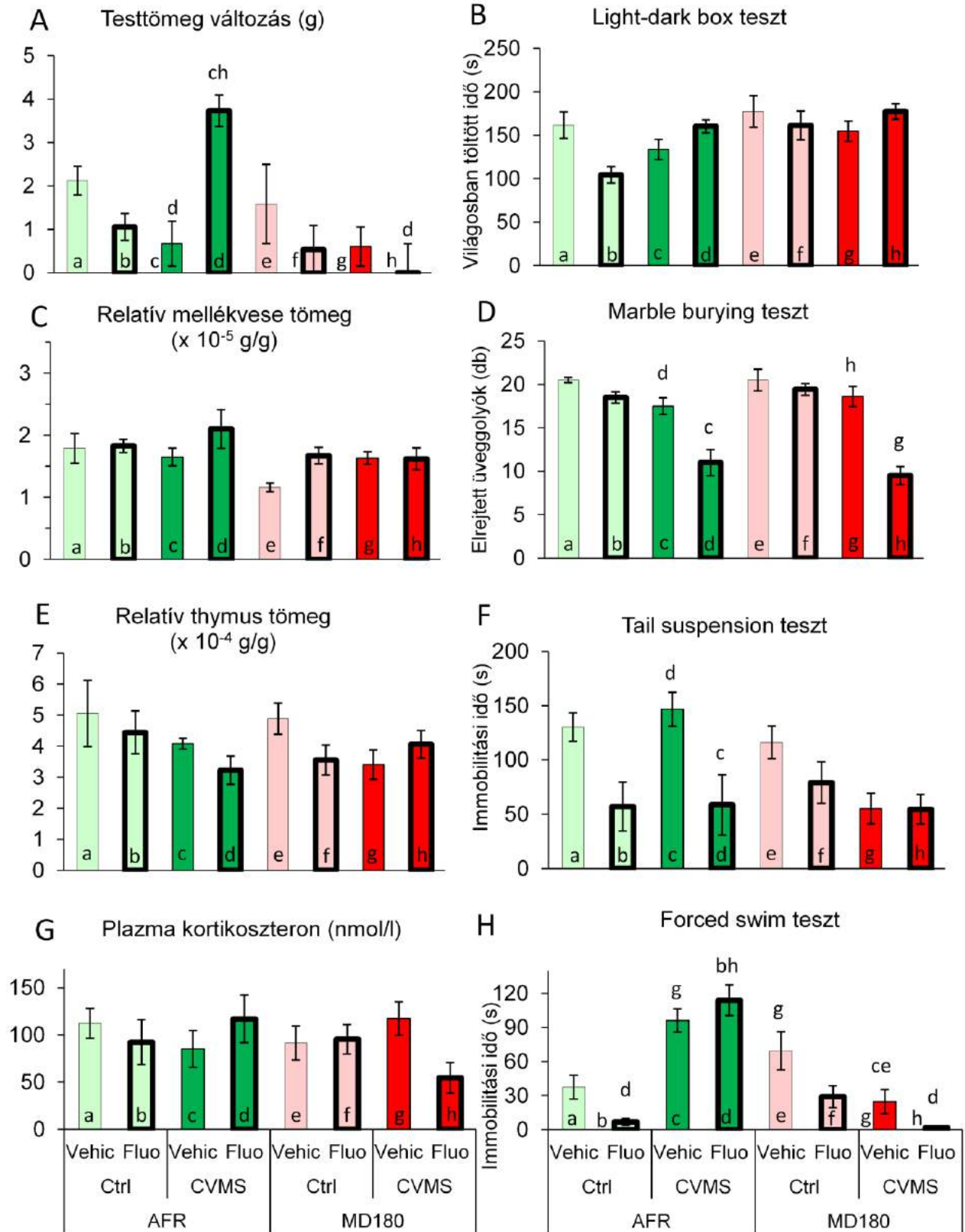
Az állatok testtömegének változását a stressz hatékonyságának bizonyítására használtuk. A MANOVA az anyai gondoskodás fő hatását a testtömegváltozás tekintetében a stressz-időszak második hetében szignifikánsnak mutatta ($F_{1,32}=7,61$; $p<0,01$). Emellett szignifikáns másodrendű hatásokat regisztrált, mint az anyai gondoskodás \times kezelés ($F_{1,32}=4,27$; $p<0,05$); stressz \times kezelés ($F_{1,32}=6,8$; $p<0,02$) és harmadrendű interakciót ($F_{1,32}=4,36$; $p<0,05$) az anyai gondoskodás, a kezelés és a stressz között. A *post hoc* tesztek alapján a CVMS-expozíció csökkent testtömeg gyarapodást eredményezett, amit a fluoxetin kezelés visszafordított az AFR egerekben (lásd 2A ábra, c vs. d oszlop; $p<0,05$). Ezzel szemben, az anyai megvonáson átesett, CVMS-t elszenvedett egerekben az SSRI kezelés hatástalan maradt testtömeg-gyarapodás szempontjából (2A ábra, g vs. h oszlop). Az MD180, stresszelt és kezelt, illetve az ugyenezen csoportba tartozó AFR állatok testtömeg-gyarapodása közötti különbség viszont igen nagy (2A ábra, d vs. h oszlop; $p<0,01$).

4.1.2. A mellékvese relatív tömege

A MANOVA az anyai megvonás fő hatását önmagában ($F_{1,32}=9,38$; $p<0,01$) és a faktorok harmadrendű kölcsönhatását is szignifikánsnak találta a mellékvesék testtömeghez viszonyított tömegének tekintetében ($F_{1,32}=4,57$; $p<0,05$). Ezzel szemben, a *post hoc* teszt nem mutatott ki szignifikáns különbségeket egyik csoportpár között sem (2C ábra).

4.1.3. A thymus relatív tömege

A MANOVA a stressz fő hatását ($F_{1,34}=4,74$; $p<0,04$) és a faktorok hármas kölcsönhatását ($F_{1,34}=11,25$; $p<0,01$) a thymus relatív tömegére nézve szignifikánsnak mutatta. A *post hoc* tesztek alapján a stressz tendenciózusan csökkentette a thymus tömegét az AFR, fluoxetinnel kezelt egerekben a kontrollhoz képest (2E ábra, b vs. d oszlop; $p=0,08$). A Spearman-féle korrelációs teszt is alátámasztotta CVMS paradigmánk megbízhatóságát, kiemelve a test-, és a thymus tömeg-adatok közötti kapcsolatot ($\rho=-0,36$; $p<0,03$).



2. ábra: A fizikai-, és endokrin paraméterek, illetve a viselkedési tesztek eredményeinek összefoglalása. (A) A csoportok testtömegének változása a krónikus variábilis enyhe stressz

(CVMS) időszakában a PD125 és a perfúzió (PD140) között, grammban (g) kifejezve. (C) A mellékvese relatív (testtömegre vonatkoztatott) tömege ($\times 10^{-5}$ g/g). (E) A thymus relatív, (testtömegre vonatkoztatott) tömege, ($\times 10^{-4}$ g/g). (G) Vérplazma kortikoszteron titer (nmol/l). (B) A megvilágított kompartmentben töltött idő a light-dark box teszt során, másodpercekben (s) kifejezve. (D) A marble burying teszt során elrejtett üveggolyók darabszáma (db). Immobilitási idő a (F) tail suspension és (H) a forced swim tesztekben, másodpercben (s) kifejezve. AFR: normál állatházi körülmények között tartott állat, MD180: 180 perces anyai megvonás, Ctrl: kontroll (azaz CVMS-nek nem kitett); Vehic: fiziológiás sóoldatot kapott; Fluo: fluoxetin kezelésben részesült. Az oszlopok feletti betűk a csoportpárok közötti legrelevánsabb *post hoc* statisztikai különbségeket jelölik, amelyek szignifikánsnak bizonyultak ($p < 0,05$).

4.1.4. CORT titer

A HPA-tengely aktivitásának értékelése céljából megmértük a CORT plazmakoncentrációját. A MANOVA a faktorok hármass kölcsönhatását mutatta ($F_{1,33}=4,97$; $p < 0,04$). A *post hoc* teszt eredményei alapján a stresszt elszenvedett, fluoxetinnel kezelt, MD180 állatok tendenciózusan csökkent CORT-szintet mutattak, összehasonlítva a vivőanyaggal kezelt egerekkel (lásd 2G ábra, h vs. g oszlop; $p=0,15$).

4.2. Viselkedési tesztek eredményei

4.2.1. Light-dark box teszt

A MANOVA eredményei alapján az anyai megvonás hatása ($F_{1,33}=7,36$; $p < 0,02$) önmagában, illetve a stressz \times kezelés interakció ($F_{1,33}=9,0$; $p < 0,01$) szignifikánsnak mutatkozott a doboz világos kompartmentjében töltött időtartamra nézve. Habár a *post hoc* tesztek nem mutattak szignifikáns különbséget, a fluoxetinnel kezelt, kontroll, nem deprivált állatok tendenciózusan kevesebb időt töltöttek a megvilágított rekeszben, mint a vehikulummal kezelt egerek (lásd 2B ábra, a vs. b oszlop). Stresszt követően ez a jelenség megfordult (2B ábra, b vs. d oszlop). Az anyai deprivációt elszenvedett csoportok között semmilyen különbség sem mutatkozott (2B. ábra, lásd e-h oszlopok).

4.2.2. Marble burying teszt

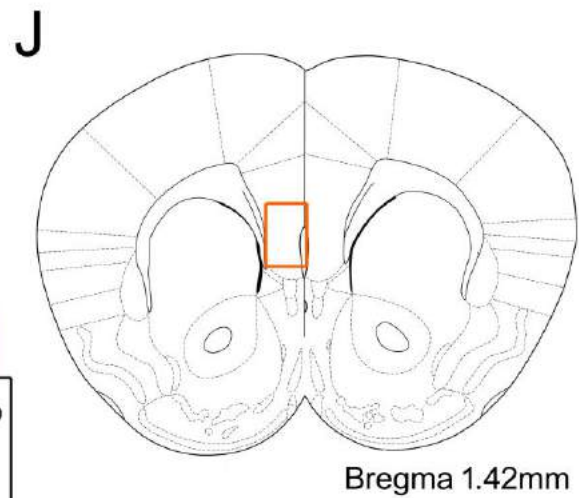
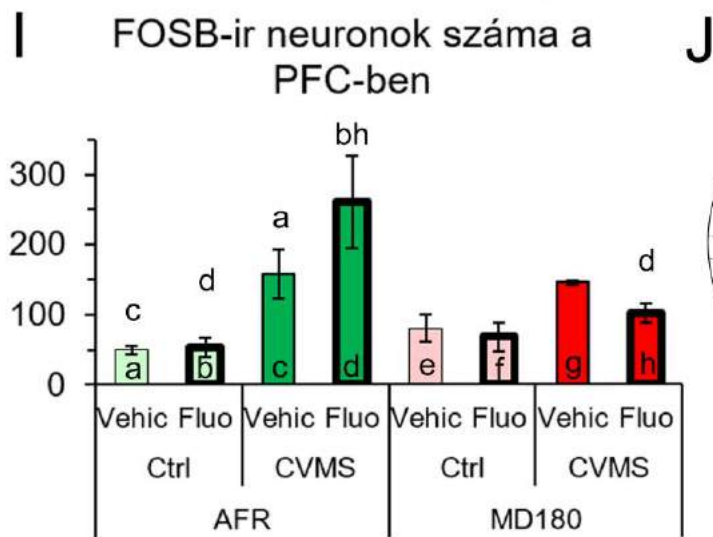
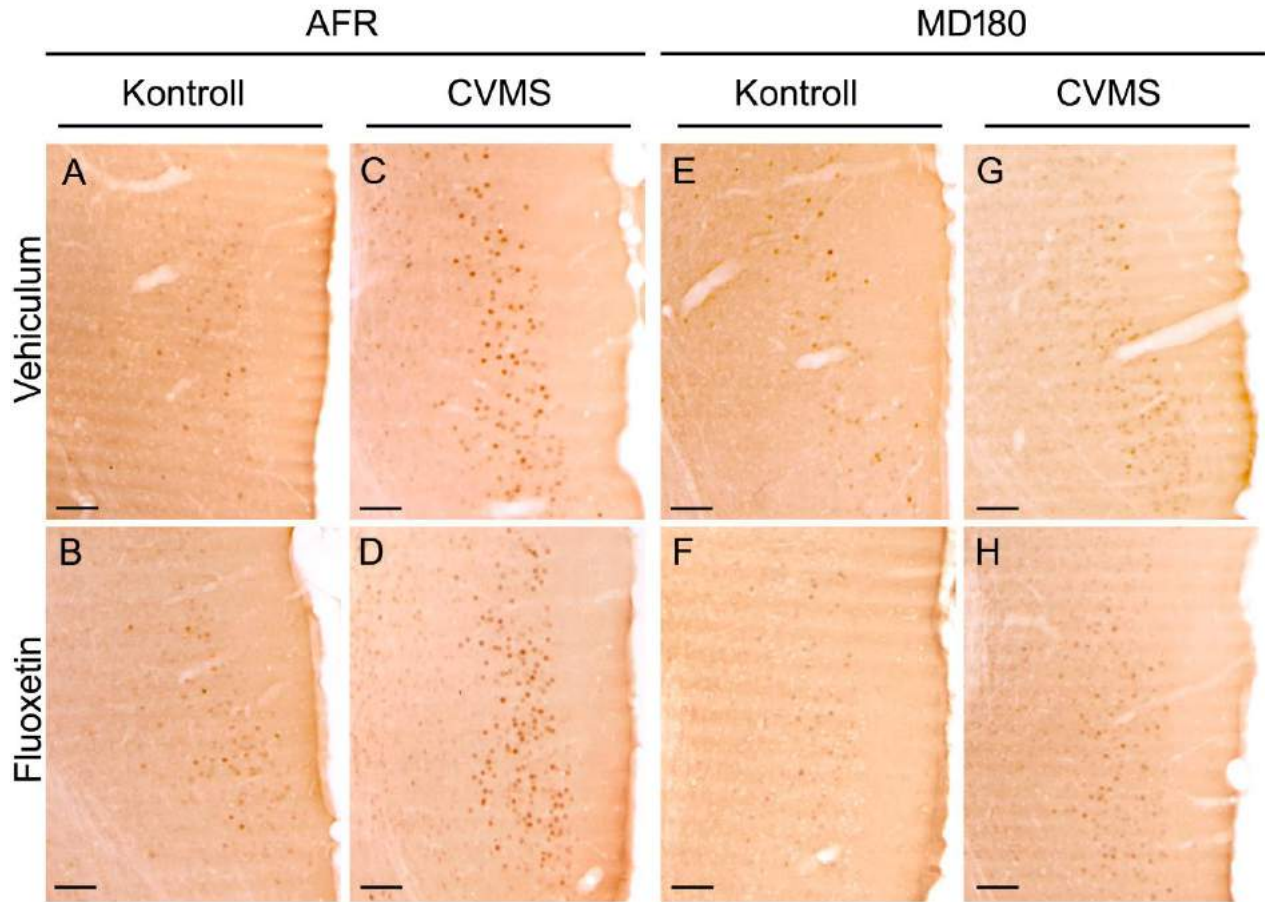
A MANOVA a stressz ($F_{1,32}=52,0$; $p<10^{-6}$), a kezelés ($F_{1,32}=36,4$; $p<10^{-5}$) továbbá a stressz és a kezelés másodrendű kölcsönhatását ($F_{1,32}=16,4$; $p<0,001$) mutatta. A *post hoc* tesztek szerint, a stresszelt és fluoxetinnel kezelt állatok esetében csökkent az elrejtett üveggolyók száma a vivőanyaggal kezelt egerekhez képest, függetlenül az anyai gondoskodás minőségétől (2D ábra, c vs. d oszlop; $p<0,001$ és g vs. h oszlop; $p<10^{-6}$).

4.2.3. Tail suspension teszt

A MANOVA a kezelés fő hatását ($F_{1,34}=14,63$; $p<0,001$) és az anyai gondoskodás \times stressz ($F_{1,34}=6,1$; $p<0,02$), valamint az anyai gondoskodás \times kezelés ($F_{1,34}=5,62$; $p<0,03$) másodrendű hatását találta szignifikánsnak. AFR egereknél a fluoxetin kezelés csökkentette az immobilitási időt a CVMS csoportban (2F ábra, c vs. d oszlop; $p<0,05$), míg a kontrolloknál a fluoxetin hatása tendencia szintű maradt (a vs. b oszlop). Ezzel szemben, az MD180 egerekben a fluoxetin kezelés hatása elveszett a *post hoc* tesztek szerint.

4.2.4. Forced swim teszt

Az anyai gondoskodás minősége ($F_{1,33}=17,6$; $p<0,001$), az antidepresszáns kezelés ($F_{1,33}=13,2$; $p<0,001$) és az anyai gondoskodás és a stressz interakciója ($F_{1,33}=64,4$; $p<10^{-6}$) befolyásolta az immobilitási időt. A *post hoc* tesztek alapján a CVMS-expozíció tendencia szintjén növelte az AFR egerek immobilitási idejét (2H ábra, a vs. c oszlop; $p=0,11$), a stressz ezen hatása fluoxetin kezelés mellett is megfigyelhető volt (2H ábra, b vs. d oszlop; $p<0,05$). Az anyai megvonás nemcsak a stressz hatását változtatta meg (vö. a és c vs. e és g oszloppárok), hanem a fluoxetin kezelés hatékonyságát is a stresszelt állatokban: az AFR egerekben az SSRI növelte, míg az MD180 egerekben csökkentette az immobilitási időt (2H ábra, d vs. h oszlop; $p<10^{-4}$). A fluoxetin kezelés tendenciózusan tovább csökkentette az amúgy is alacsony immobilitási időt a deprivált, stresszelt állatokban (2H ábra, g vs. h oszlop; $p=0,10$).



3. ábra: FOSB immunreaktivitás (ir) a prefrontális kéregben (PFC). Reprezentatív képek illusztrálják FOSB-ir-t a PFC-ben a vivőanyaggal (Vehic) (A) és fluoxetinnel (Fluo) kezelt (B) kontroll (Ctrl), valamint a krónikus variábilis enyhe stressznek kitett (CVMS) és a vivőanyaggal (C) vagy fluoxetinnel injektált AFR egerek esetében. Az anyai megvonás (MD180) befolyásolta a

FOSB-ir-t ahogy azt az (E-H) ábrák mutatják. Az (A-H) képeken látható terület megfelel a PFC kiemelt régiójának a (J) ábrán [Paxinos és Franklin nyomán módosított sémás ábra (Paxinos és Franklin, 2001)]. Az (I) diagramm a FOSB-ir sejtszámot szemlélteti. Az oszlopok feletti betűk a csoportpárok közötti leglényegesebb szignifikáns különbségeket jelölik a post hoc tesztek alapján. AFR: normál állatházi körülmények között tartott állat. Lépték: 100 μ m.

4.3. Szövettani eredmények

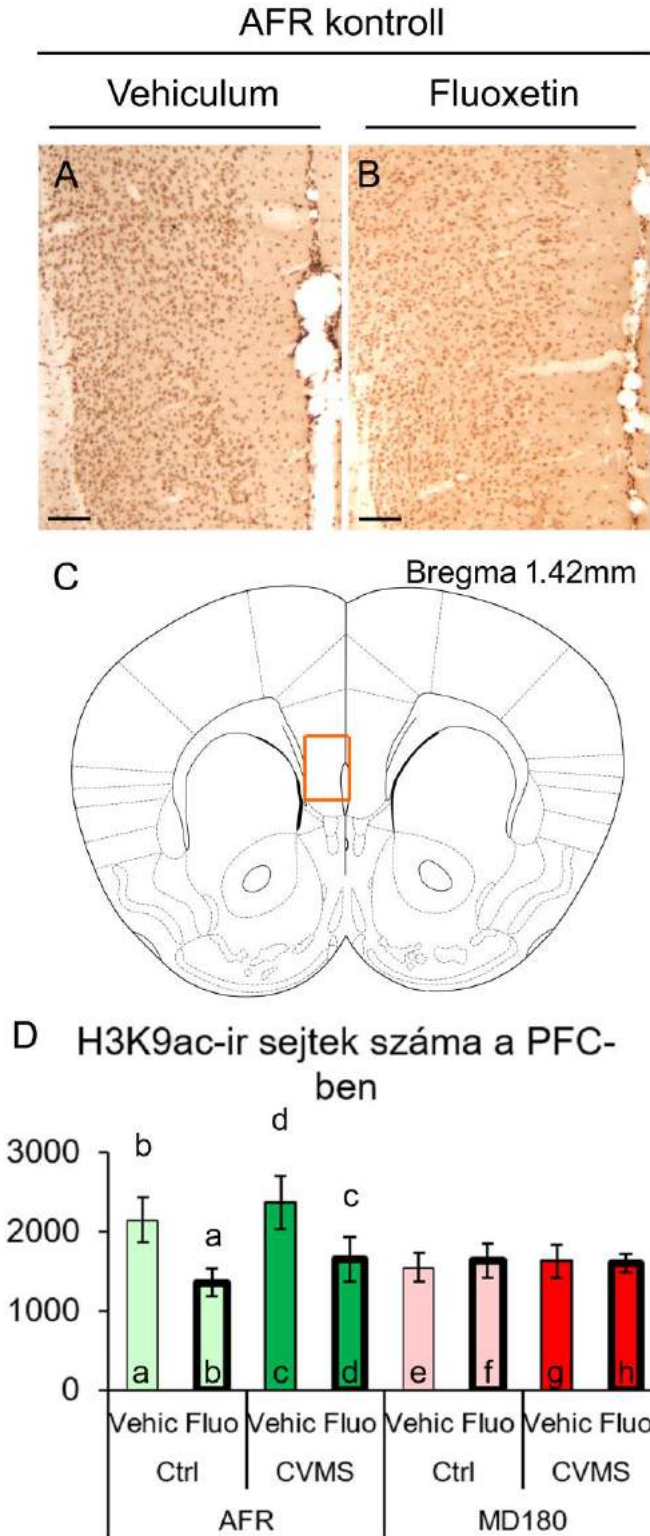
4.3.1. PFC

4.3.1.1. FOSB pozitív sejtek száma

Ebben a festésben viszonylag erős neuronális aktivitás volt megfigyelhető a PFC-ben minden egércsoportban. A stressz fő hatása ($F_{1,32}=28,601$; $p<10^{-4}$), valamint az anyai gondoskodás és a stressz interakciója ($F_{1,32}=5,078$; $p<0,04$) szignifikáns hatást gyakorolt a FOSB pozitív sejtek számára. A *post hoc* teszt alapján, AFR egerekben a CVMS-expozíció a sejtszám szignifikáns emelkedését okozta mind a vivőanyaggal kezelt (vö. 3I ábra a vs. c oszlop; $p<0,001$, valamint a 3A ábrát a 3C ábrával), mind a fluoxetinnel kezelt egerekben (lásd 3I ábra b vs. d oszlop; $p<0,001$, valamint a 3B, D ábra). Ha a CVMS-nek kitett AFR egerek fluoxetint kaptak (lásd a 3I. ábra d oszlop és a 3D ábra képét), magasabb ($p<10^{-4}$) FOSB-sejtszámot láttunk, összehasonlítva a kontroll, fluoxetinnel kezelt, AFR egerekkel (lásd a 3I. ábra b oszlop és a 3C ábra képét). Anyai megvonás után sem a CVMS, sem a fluoxetin kezelés nem befolyásolta a FOSB sejtszámot a PFC-ben (lásd a 3I. ábra e-h oszlopaikat és a 3E-H ábrákat). A FOSB pozitív sejtek száma a stresszelt és fluoxetinnel kezelt MD180 egerekben sokkal alacsonyabb volt ($p<0,01$), mint a megfelelő AFR csoportokban megfigyelték (lásd a 3I. ábra d vs. h oszlop és a 3D, H ábrák).

4.3.1.2. Acetil-lizin H3 pozitív sejtek száma

A MANOVA kimutatta, hogy a fluoxetin kezelés főhatásként ($F_{1,32}=7,72$; $p<0,04$), illetve az anyai gondoskodás és a kezelés interakciója ($F_{1,32}=5,43$; $p<0,03$) szignifikánsan befolyásolta a H3K9ac immunreaktivitást. A *post hoc* tesztek azt mutatták, hogy a fluoxetin kezelés csökkentette a H3K9ac pozitív sejtek számát az AFR, kontroll csoportban (vö. 4A és B ábra, valamint a 4D ábra, a vs. b oszlop; $p<0,04$). Ezzel összhangban a CVMS-nek kitett egerekben a fluoxetin kezelés a H3K9ac pozitív sejtek számának csökkenését okozta (4D ábra, c vs. d oszlop; $p<0,05$). Fontos,



4. ábra: Acetil-lizin 9 H3 hiszton (H3K9ac) immunreaktivitás (ir) a prefrontális kéregben (PFC).
 Reprezentatív képek, amelyek a H3K9ac-ir-t mutató magokat szemléltetik a PFC-ben a

vivőanyaggal (Vehic) (A) és a fluoxetinnel (Fluo) kezelt PACAP heterozigóta, kontroll (Ctrl) normál állatházi körülmények között tartott (AFR) egerek agymetszeteiről. Az (A, B) képeken látható terület megfelel a (C) sémás ábrán kiemelt PFC régióknak [Paxinos és Franklin (2001) nyomán, módosítva]. A betűk a diagrammok oszlopai felett a legrelevánsabb csoportpárok közötti szignifikáns különbségeket jelölik a post hoc tesztek alapján. CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz, MD180: 180 perces anyai megvonás. Lépték: 100 μ m.

hogy az anyai megvonáson átesett, kontroll, vivőanyaggal kezelt egerekben tendenciózusan alacsonyabb sejtszámot észleltünk (4D ábra, a vs. e oszlop; $p=0,068$), illetve, hogy a fluoxetin kezelés nem befolyásolta a sejtszámot az anyai megvonáson átesett egerekben (e-h oszlopok a 4D ábrán).

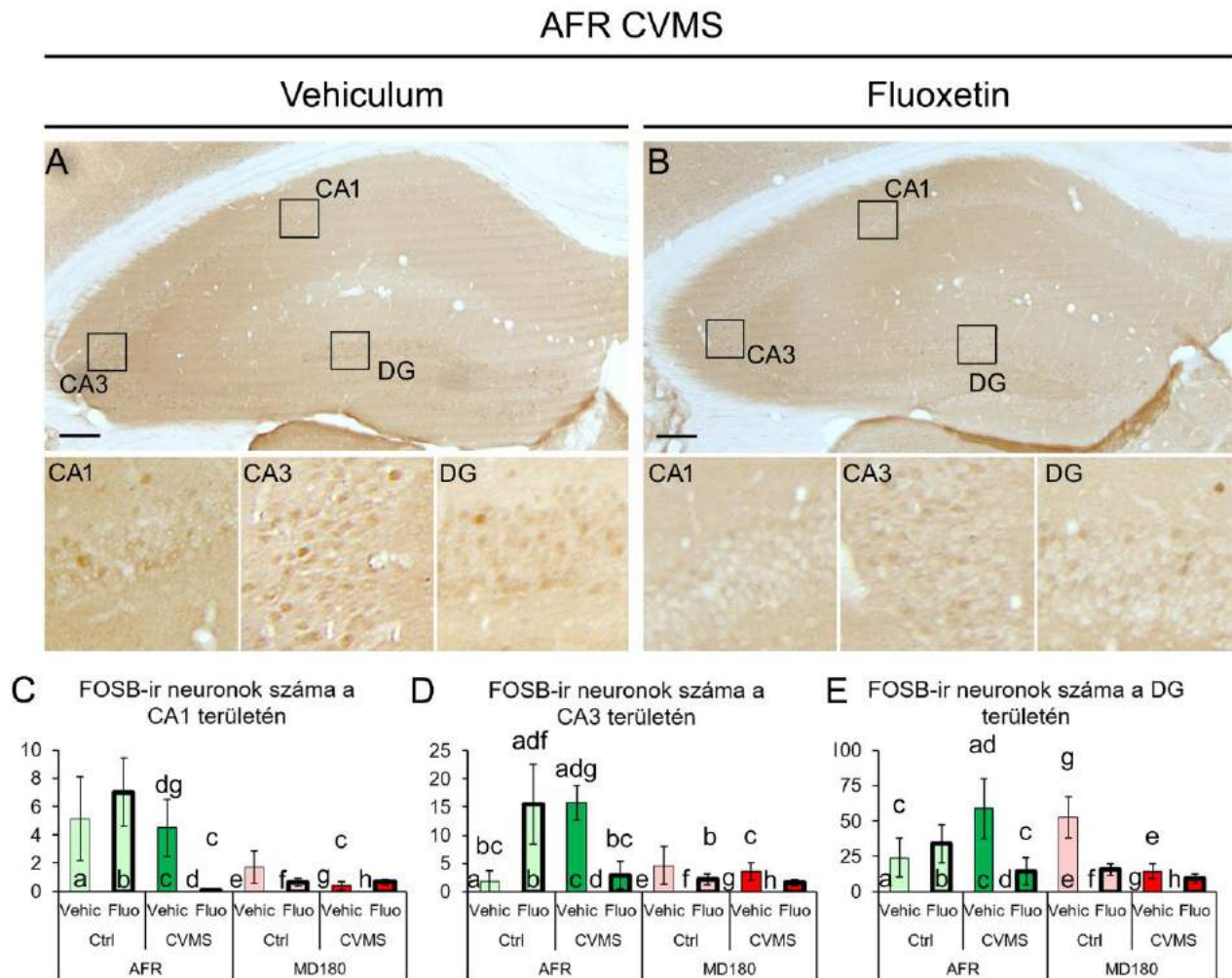
4.3.2. Hippocampus

4.3.2.1. FOSB pozitív sejtek száma

A hippocampusban a FOSB immunreaktivitás gyengébb volt annál, mint amit a PFC-ben megfigyelhettünk. Míg az AFR csoportokban alacsony sejtszámot észleltünk, addig az MD180 egerekben a jel minden alcsoportban szinte kimutathatatlaná vált. A CA1 területen az anyai gondoskodás, mint fő hatás ($F_{1,32}=7,378$; $p<0,01$) és az anyai gondoskodás \times stressz \times kezelés interakciójának hatása ($F_{1,32}=7,235$; $p<0,01$) befolyásolta a FOSB pozitív sejtek számát. A CVMS-nek kitett, AFR egerekben a fluoxetin kezelés szinte kimutathatatlan szintre csökkentette a sejtszámot (lásd az 5A, B ábra képei és az 5C ábra, c vs. d oszlop; $p<0,01$). A vivőanyaggal kezelt, CVMS-en átesett, MD180 egerekben a FOSB-jel szintén nagyon alacsony volt (5C ábra, c vs. g oszlop; $p<0,05$), amit a fluoxetin kezelés nem tudott tovább csökkenteni (g vs. h oszlop a 5C ábrán; $p=0,51$).

A CA3 területen a MANOVA az anyai gondoskodás fő hatását ($F_{1,32}=5,118$; $p<0,05$), valamint a stressz \times kezelés ($F_{1,32}=11,70$; $p<0,02$) és az anyai gondoskodás \times stressz \times kezelés ($F_{1,32}=7,616$; $p<0,01$) interakciókat találta szignifikánsnak. A kontroll, AFR egerekben a fluoxetin növelte a FOSB pozitív sejtek számát (lásd 5D ábra, a vs. b oszlop; $p<0,05$). A CVMS-expozíció szintén növelte a FOSB-jelet az AFR egerekben (5D ábra, a vs. c oszlopok; $p<0,01$), míg a fluoxetin ezt szinte nullára csökkentette (lásd 5D ábra, c vs. d oszlop; $p<0,01$ és az 5A, B ábrák). A maternális

depriváció a fluoxetinre (5D ábra, b vs. f oszlop; $p < 0,01$) és a stresszre (5D ábra c vs. g oszlop; $p < 0,05$) adott FOSB választ megszüntette.



5. ábra: FOSB immunreaktivitás (ir) a hippocampus cornu ammonis (CA) 1, CA3 és a gyrus dentatus (DG) részeiből. Reprezentatív képek, amelyek a FOSB-ir-t mutató magokat szemléltetik a vivőanyaggal (Vehic) (A) és fluoxetinnel (Fluo) kezelt (B) krónikus variábilis enyhe stressznek (CVMS) kitett, normál állatházi körülmények között tartott (AFR) egerek hippocampus-ában. Jól megfigyelhető a viszonylag gyenge jel, amely gyakorlatilag kimutathatatlaná válik, ha az állat korábban három órás anyai megvonásban részesült (MD180). A bekeretezett területek a megfelelő kis nagyítású képek alatti nagyobb nagyítású betétekben láthatók. A diagrammok a FOSB-ir sejtmagok számát szemléltetik a hippocampus CA1 (C), CA3 (D) és DG (E) régióiban. Az oszlopok feletti betűk a diagrammokon a csoportok közötti leglényegesebb szignifikáns különbségeket jelzik a post hoc tesztek alapján. Ctrl: kontroll, Lépték: 200 μ m

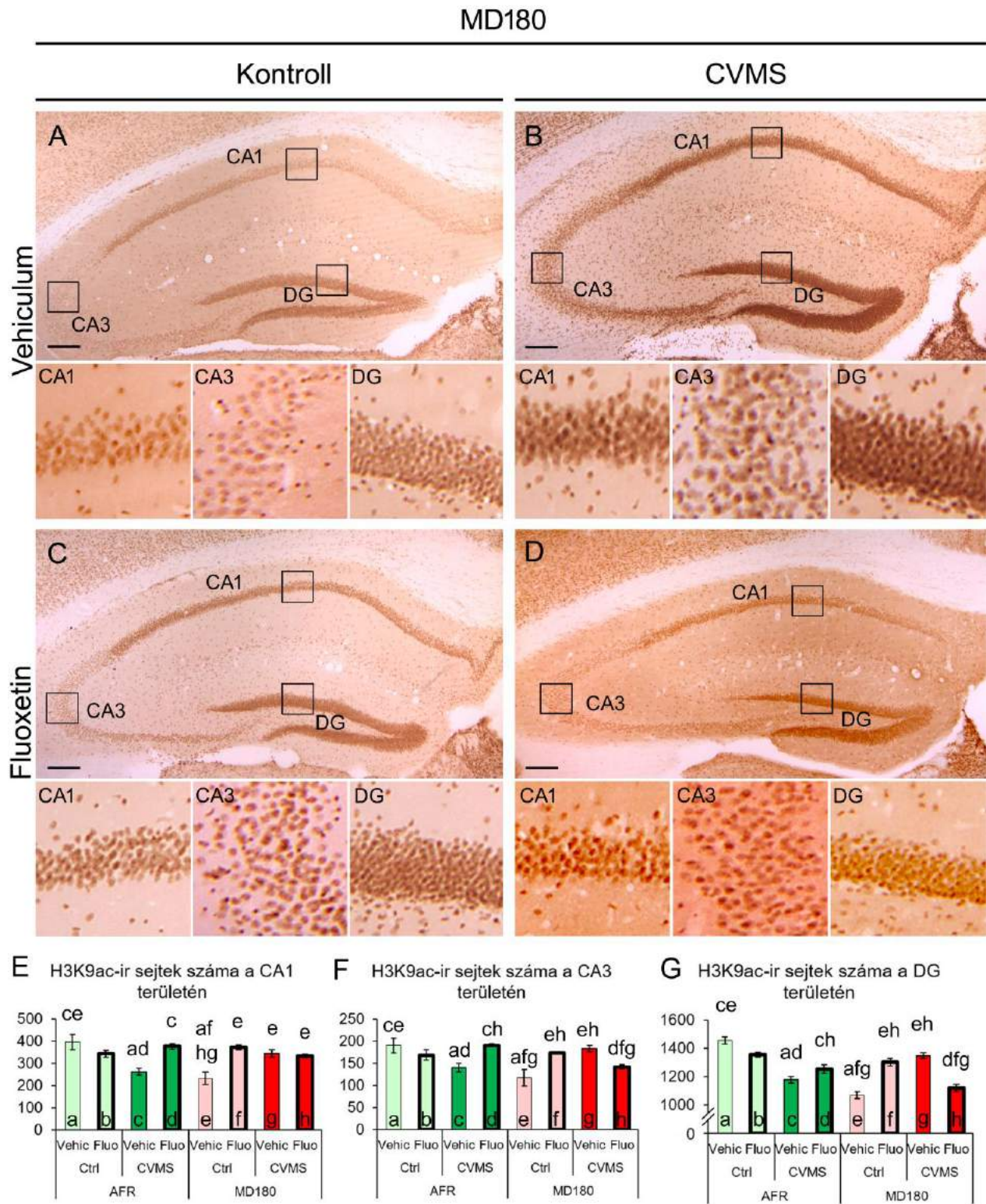
A DG-ban a kezelés fő hatása ($F_{1,32}=7,086$; $p<0,05$) és az anyai gondoskodás, a stressz és a kezelés hármasszinterakciója ($F_{1,32}=9,267$; $p<0,01$) szignifikánsan befolyásolta a FOSB jelet. Az AFR egerekben a stressz-expozíció növelte a FOSB pozitív sejtek számát (5E ábra a vs. c oszlop; $p<0,05$), amit a fluoxetin kezelés visszafordított (lásd az 5E ábra c vs. d oszlop; $p<0,01$ és az 5A, B ábra képeit). MD180 egerekben némi FOSB pozitivitás kimutatható volt a vivőanyaggal kezelt, kontroll állatokban, de ha az egereket CVMS-nek tettük ki, a FOSB jel többé nem volt kimutatható (5E ábra, e vs. g oszlop; $p<0,05$), amit a fluoxetin kezelés nem tudott tovább csökkenteni (5E ábra, g vs. h oszlop; $p<0,5$).

4.3.2.2. Acetil-lizin H3 pozitív sejtek száma

A CA1 régióban az anyai gondoskodás fő hatása szignifikánsnak mutatkozott ($F_{1,32}=11,168$; $p<0,01$). Emellett az anyai gondoskodás és a stressz másodrendű hatását ($F_{1,32}=9,071$; $p<0,01$), illetve, ami még fontosabb, az anyai gondoskodás \times stressz \times kezelés hármasszinterakcióját ($F_{1,32}=30,848$; $p<10^{-5}$) találta szignifikánsnak a MANOVA. Az AFR egerekben a CVMS hatás (6E ábra, a vs. c oszlop; $p<0,001$) csökkentette a H3K9ac immunjelet, melyet a fluoxetin kezelés visszafordított (c vs. d oszlop; $p<0,001$). Az anyai megvonás alacsonyabb H3K9ac immunreaktivitást okozott a kontroll egerekben (6E ábra, a vs. e oszlop; $p<10^{-4}$). Érdekes módon, a CA1 régióban a fluoxetin kezelés (lásd 6E ábra, e vs. f oszlop; $p<10^{-4}$ és a 6A, C ábra) és a CVMS expozíció is (6E ábra, e vs. g oszlop; $p<0,001$ és a 6A, B ábra) növelte a H3K9ac pozitív sejtek számát. A CVMS-nek kitett, MD180 egerek fluoxetin kezelése nem befolyásolta a hiszton acetiláció mértékét a CA1 régióban (lásd a 6E ábra, g és h oszlop; $p=0,66$, valamint a 6B, D ábra képeit).

A CA3 területen az anyai gondoskodás fő hatása ($F_{1,32}=5,454$; $p<0,05$) és az anyai gondoskodás \times stressz \times kezelés interakciója ($F_{1,32}=29,286$; $p<10^{-5}$) szignifikánsan befolyásolta a hiszton acetilációt. A CA1-hez hasonlóan, CVMS-expozíció hatására (6F ábra, a vs. c oszlop; $p<0,01$) az AFR egerek alacsonyabb H3K9ac-immunjelet mutattak, de ha fluoxetinnel kezeltük őket (c vs. d oszlop; $p<0,01$), az acetiláció mértéke ismét magasabb volt. Az anyai megvonás viszonylag alacsony jelet eredményezett a vehikulummal kezelt, kontroll egerekben az AFR-hez képest (6F ábra, a vs. e oszlop; $p<10^{-4}$). A fluoxetin kezelés növelte a hiszton acetilációt az MD180, kontroll egerekben (6F ábra, e vs. f oszlop; $p<0,001$). A CVMS-expozíció pedig szintén növelte az acetilációt (6F ábra, e vs. g oszlop; $p<0,001$), de ha a fluoxetin kezelést az MD180 egerek a CVMS-

expozíciót követően kapták, ami mindhárom "találatot" hordozó eset volt, a hiszton-acetiláció alacsonyabbnak mutatkozott (6F ábra, g vs. h; $p < 0,01$).



6. ábra: Acetil-lizin 9 H3-hisztin (H3K9ac) immunreaktivitás (ir) a hippocampus cornu ammonisban (CA) 1, CA3 és gyrus dentatus (DG) subdivízióiban. Reprezentatív képek illusztrálják a H3K9ac immunreaktivitást háromórás anyai megvonásnak kitett (MD180) állatok alcsoportjaiban: vivőanyaggal (Vehic) (A) és fluoxetinnel (Fluo) kezelt (C) kontroll (Ctrl), valamint vivőanyaggal (B) és fluoxetinnel kezelt (D) krónikus variábilis enyhe stressznek (CVMS) kitett egerek hippocampus-át láthatjuk. A kisebb nagyítású képeken bekeretezett területek nagyobb nagyítású képzetétekben is láthatók a megfelelő kép alatt. A H3K9ac immunreaktivitás dinamikáját szemléltető diagrammok a CA1 (E), CA3 (F) és DG (G) területén mutatják a sejtszámok átlagát csoportonként. Az oszlopok feletti betűjelek a csoportpárok közötti leglényegesebb szignifikáns különbségeket jelzik a post hoc tesztek eredményei alapján. AFR: normál állatházi körülmények között tartott egerek. Lépték: 200 μ m.

A DG-ban az anyai gondoskodás ($F_{1,32}=30,65$; $p<10^{-5}$) és a stressz ($F_{1,32}=15,25$; $p<0,001$) fő hatása, illetve az anyai gondoskodás \times stressz ($F_{1,32}=38,14$; $p<10^{-5}$), a stressz \times kezelés ($F_{1,32}=15,83$; $p<0,001$), valamint az anyai gondoskodás \times stressz \times kezelés ($F_{1,32}=74,61$; $p<10^{-6}$) interakciók is befolyásolták az acetilált sejtek számát a MANOVA eredményei szerint. Az AFR állatokban a H3K9ac immunreaktivitás dinamikája hasonló volt, mint amit a CA1 és CA3 régiókban megfigyeltünk: A CVMS-expozíció csökkentette a sejtszámot (6G ábra, a vs. c oszlop; $p<10^{-6}$), amit a fluoxetin adagolása tendenciózusan megfordított (6G ábra c vs. d oszlop; $p=0,079$). Az MD180-t átélt, kontroll, vivőanyaggal kezelt egereknél az acetiláció mértéke csökkent (6G ábra, a vs. e oszlop; $p<10^{-6}$). A fluoxetin kezelés hatása a sejtszámra a CVMS-expozíciótól függött az MD180 egerekben: a kontroll állatokban a fluoxetin kezelés megemelte az acetilált sejtek számát (e vs. f oszlop, $p<10^{-5}$), míg a stresszelt egerekben az SSRI csökkentette a hisztin acetilációt (g vs. h oszlop; $p<10^{-6}$).

4.3.3. ovBNST

4.3.3.1. A CRH pozitív neuronok száma

A MANOVA alapján a fluoxetin kezelés ($F_{1,27}=84,3$; $p<10^{-9}$) önmagában, valamint az anyai gondoskodás \times kezelés ($F_{1,27}=5,0$; $p<0,04$), a stressz \times kezelés ($F_{1,27}=10,3$; $p<0,01$), valamint az anyai gondoskodás \times stressz \times kezelés interakciói ($F_{1,27}=7,8$; $p<0,01$) befolyásolták a CRH pozitív neuronok számát az ovBNST-ben. A post hoc tesztek kimutatták, hogy az SSRI kezelés tendencia szerűen növelte a CRH neuronok számát az AFR, kontroll (lásd 7A ábra, a vs. b oszlop;

$p=0,06$) és a szignifikancia szintjét meghaladó mértékben a stresszelt állatokban (7A ábra, c vs. d oszlop; $p<0,05$), összhangban az MD180, kontroll állatokban megfigyelhető tendenciával (7A ábra, e vs. f oszlop; $p=0,09$) és az MD180, stresszelt egereknél látható erős hatással (7A ábra, g vs. h oszlop; $p<10^{-3}$). Az utóbbi különbség a legnagyobb, mivel hétszer több pozitív sejtet figyeltünk meg a kezelés után. Fontos, hogy ha az egereket korábban anyai megvonásnak tettük ki, akkor a stresszelt állatok CRH sejtszáma csökkent a kontrollhoz képest (7A. ábra, g vs. e oszlop; $p<0,01$), ellentétben az AFR egerekkel, ahol nem volt változás (7A. ábra, a vs. c oszlop).

4.3.3.2. A CRH és FOSB kettős pozitív neuronok száma

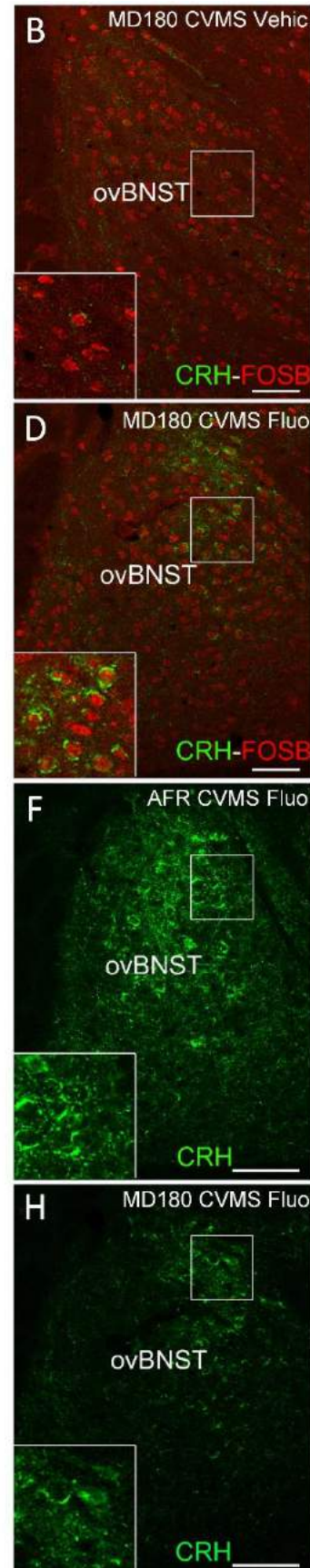
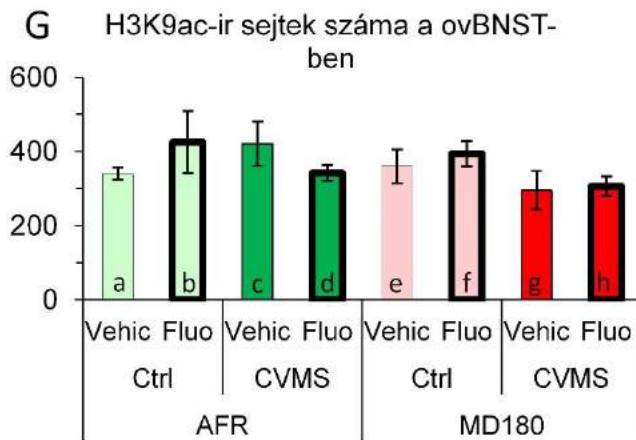
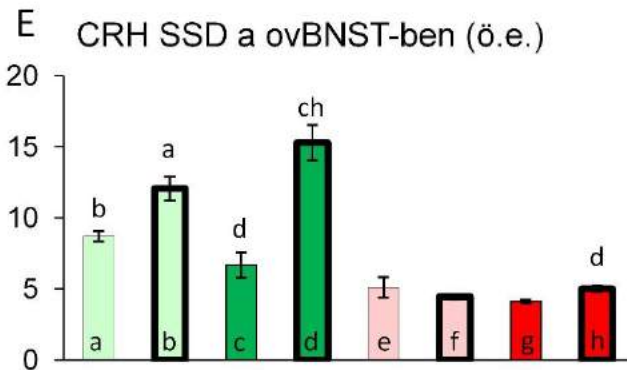
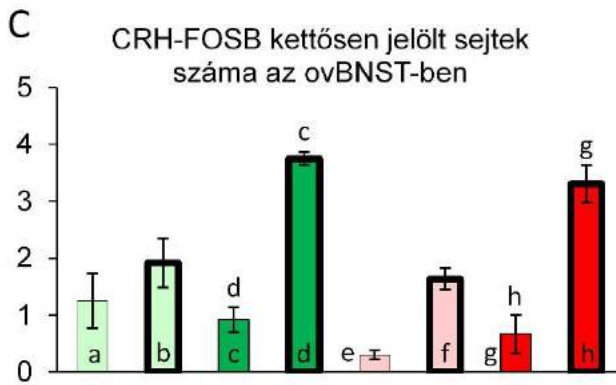
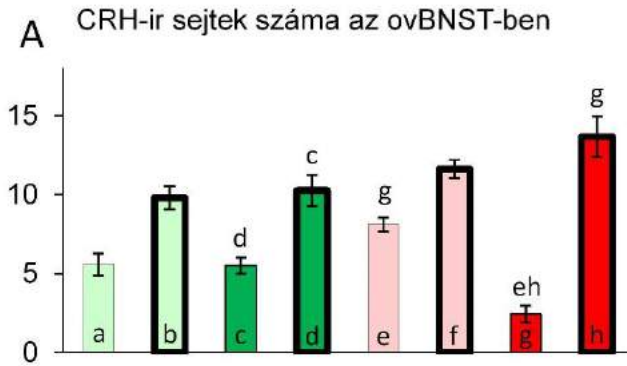
A MANOVA az anyai gondoskodás ($F_{1,27}=5,0$; $p<0,04$), a stressz ($F_{1,27}=17,0$; $p<0,001$), a kezelés ($F_{1,27}=75,5$; $p<10^{-8}$) és a stressz \times kezelés interakciójának ($F_{1,27}=16,3$; $p<0,001$) szignifikáns hatását mutatta ki. A legrelevánsabb *post hoc* különbségeket tekintve kiemelendő, hogy a fluoxetin kezelés növelte a CRH-FOSB kettősen pozitív sejtek számát, függetlenül attól, hogy az egerek normál anyai gondoskodást kaptak (7C ábra, c vs. d oszlop; $p<0,001$) vagy anyai megvonásban részesültek (7C ábra, g vs. h oszlop; $p<0,001$). E különbségek mellett nem elhanyagolható az sem, hogy a CRH-pozitív sejteknek csak 20-30%-a mutatott FOSB-pozitivitást.

4.3.3.3. A CRH specifikus jelendezitása

Az anyai gondoskodás minősége ($F_{1,27}=195,0$; $p<10^{-13}$) és a fluoxetin kezelés ($F_{1,27}=39,6$; $p<10^{-4}$), mint főhatások jelentkeztek. Ezen túl, az anyai gondoskodás \times kezelés ($F_{1,27}=33,6$; $p<10^{-4}$) és a stressz \times kezelés ($F_{1,27}=14,1$; $p<0,001$) interakciók voltak szignifikáns hatásúak. A *post hoc* tesztek alapján az SSRI adása növelte a CRH SSD-t, mind a kontroll (7E ábra; a vs. b oszlop; $p<0,05$), mind a stressznek kitett (7E ábra, c vs. d oszlop; $p<10^{-3}$) egereknél. Érdekes módon az anyai megvonás teljesen megszüntette a fluoxetin kezelés hatását a CRH SSD-t tekintve az ovBNST-ben (vö. 7F, H ábra képei és a 3E ábra, d vs. h oszlop; $p<0,01$).

4.3.3.4. Az acetil-lizin H3 pozitív sejtek száma

Az acetil-lizin H3 pozitív sejtek eredményeinek MANOVA értékelése kimutatta, hogy az anyai gondoskodás minősége ($F_{1,25}=10,4$; $p<0,01$) hatással volt erre az epigenetikai markerre, de a *post hoc* tesztek nem igazoltak releváns különbségeket a csoportpárok között (7G ábra). Figyelemre méltó, hogy az állatok CORT szintje szignifikáns korrelációt mutatott az ovBNST hisztonfehérje acetilációjának mértékével ($\rho=0,51$; $p<0,01$).



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

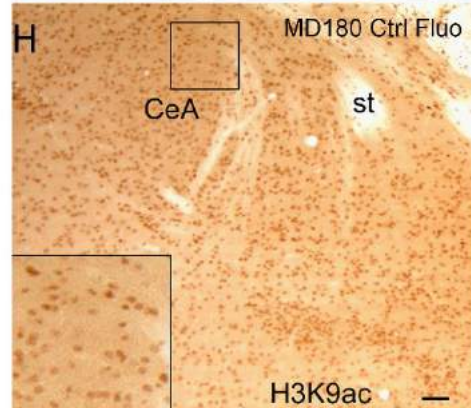
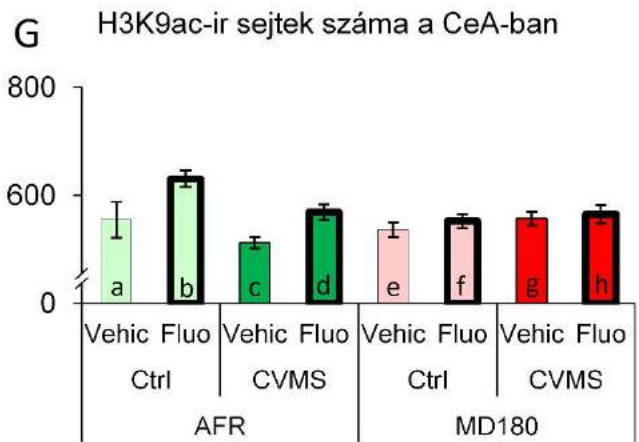
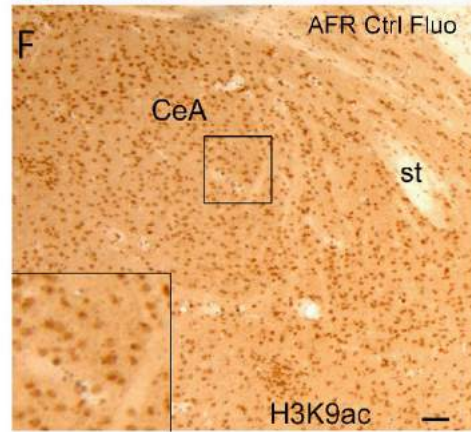
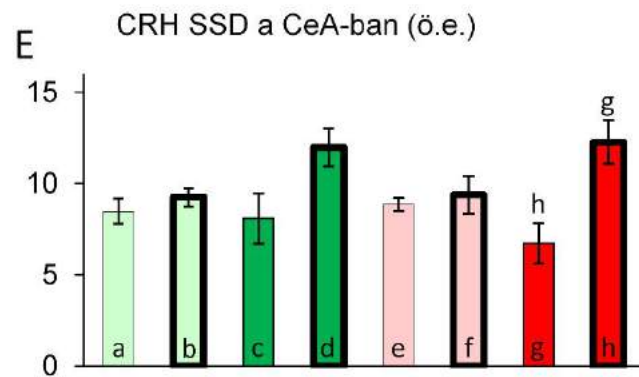
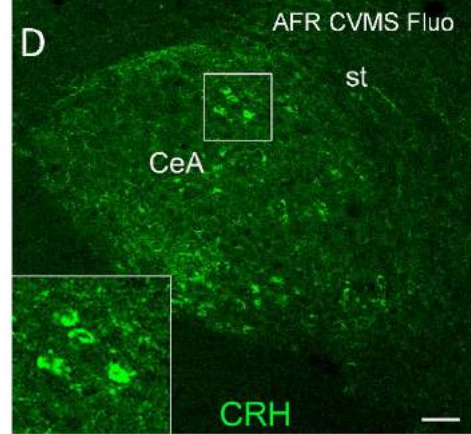
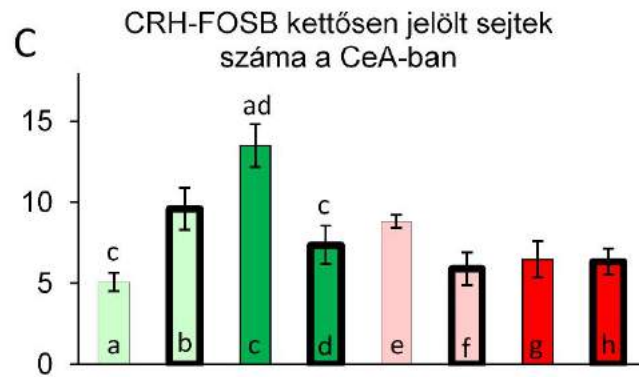
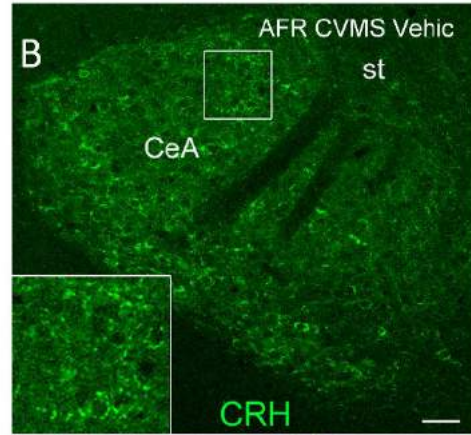
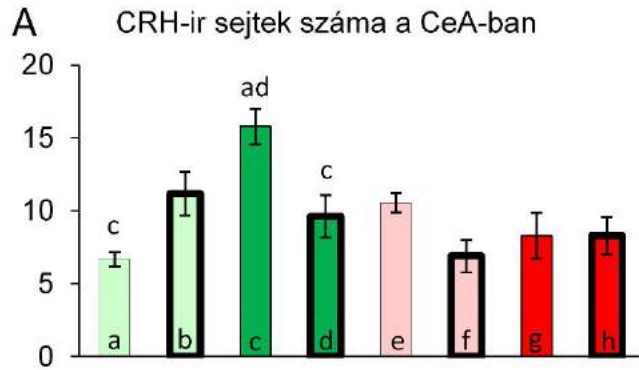
4.3.4. CeA

4.3.4.1. A CRH pozitív neuronok száma

Az anyai gondoskodás fő hatása ($F_{1,25}=7,1$; $p < 0,05$), az anyai gondoskodás \times stressz másodrendű hatása ($F_{1,25}=5,9$; $p < 0,03$), valamint az anyai gondoskodás \times stressz \times kezelés harmadrendű interakciója ($F_{1,25}=16,9$; $p < 0,001$) szignifikáns volt. A CVMS-expozíció az AFR állatokban körülbelül háromszoros emelkedést okozott (8A ábra, a vs. c oszlop; $p < 0,01$) a CRH neuronok számában. Ha ezek a stresszelt állatok fluoxetin kezelést kaptak, a CRH-sejtek száma csökkent (8A ábra, c vs. d oszlop; $p < 0,05$). Teljesen más mintázat volt megfigyelhető az MD180 egerekben: sem a stressz, sem a fluoxetin kezelés nem volt hatással a sejtek számára.

4.3.4.2. A CRH és FOSB kettős pozitív neuronok száma

A MANOVA az anyai gondoskodás fő hatását ($F_{1,25}=7,9$; $p < 0,01$), az anyai gondoskodás \times kezelés ($F_{1,25}=8,1$; $p < 0,01$) és a stressz \times kezelés ($F_{1,25}=7,6$; $p < 0,02$) másodrendű hatását, valamint a három faktor interakcióját ($F_{1,25}=22,2$; $p < 10^{-4}$) is szignifikánsnak mutatta a CRH-FOSB kolokalizáció tekintetében. Az SSRI-kezelés az AFR állatokban tendenciózusan megemelte a CeA-ban a kettősen pozitív sejtek számát (8C ábra, a vs. b oszlop; $p=0,06$), míg a stressz



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

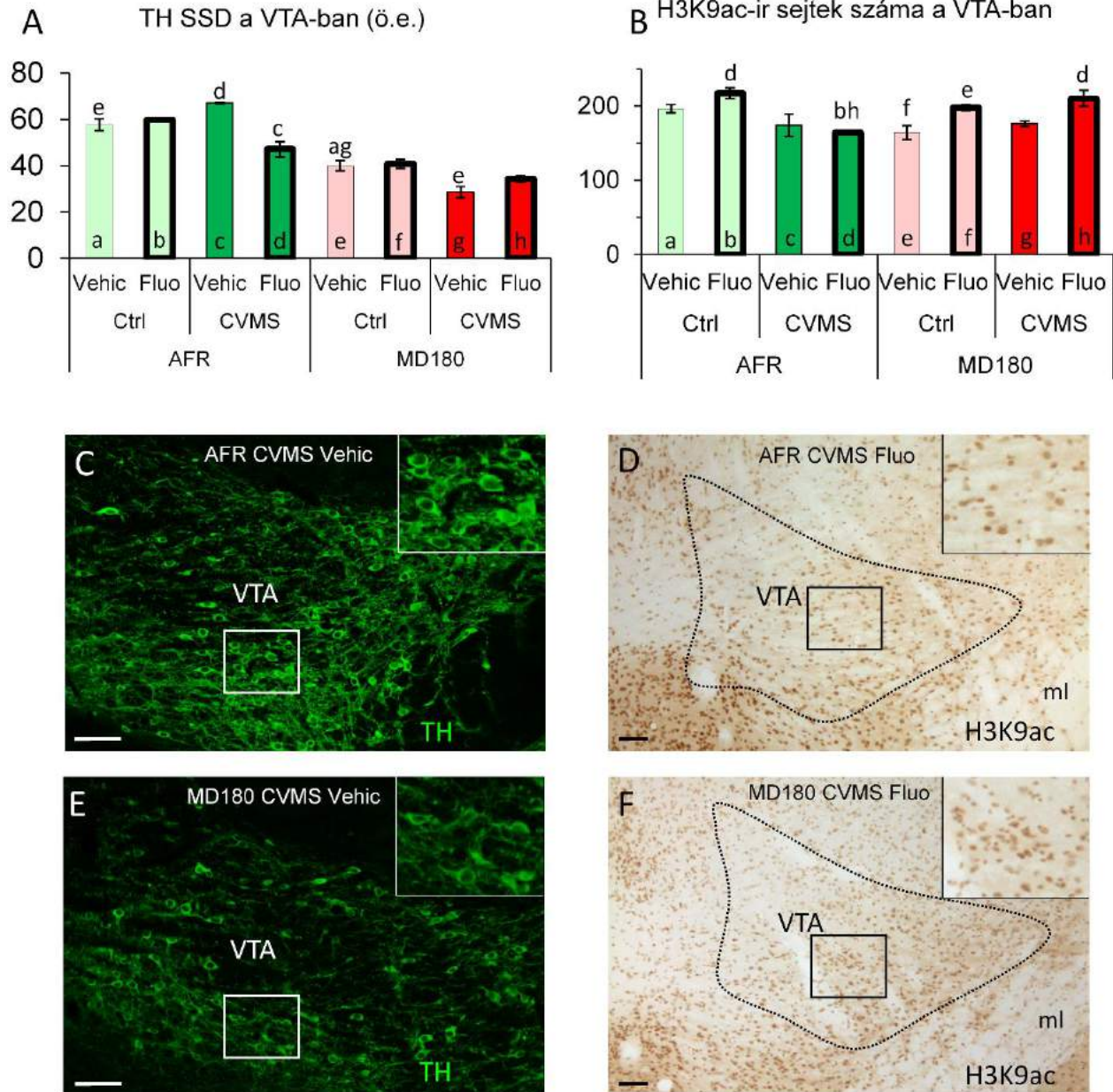
statisztikailag erősebb hatást gyakorolt (8C ábra, a vs. c oszlop; $p < 0,01$). Ha azonban ezek a stressznek kitett egerek fluoxetin kezelést kaptak, a CRH-FOSB sejteik száma csökkent (8C ábra, c vs. d oszlop; $p < 0,01$). Az AFR-hez képest (8C. ábra, a és b oszlop) az anyai megvonás teljesen megszüntette az SSRI-kezelés hatását a kontroll egerekben (8C ábra, e vs. f oszlop; $p = 0,33$). Az előzőekhez hasonlóan, ha a stresszexpozíciót az anyai megvonással együtt kapták az állatok, a fluoxetin kezelésnek nem volt hatása a CRH-FOSB sejtek számára a CeA-ban.

4.3.4.3. A CRH specifikus jeldenzitása

A MANOVA alapján az anyai gondoskodás ($F_{1,23} = 17,5$; $p < 0,001$) és a stressz \times kezelés interakció ($F_{1,23} = 10,1$; $p < 0,01$) is hatással volt a CRH SSD-re. A *post hoc* tesztek szerint a CVMS-ben részesült állatoknál az SSRI-kezelés az AFR esetén a denzitás tendenciaszerű növekedését (8E ábra, c vs. d oszlop; $p = 0,12$), a korábban anyai megvonást kapott egerekben pedig szignifikáns emelkedését (8E ábra, g vs. h oszlop; $p < 0,01$) okozta.

4.3.4.4. Az acetil-lizin H3 pozitív sejtek száma

A MANOVA az SSRI-kezelés fő hatását ($F_{1,26} = 9,5$; $p < 0,01$) és az anyai gondoskodás \times stressz ($F_{1,26} = 7,4$; $p < 0,02$) és az anyai gondoskodás \times kezelés ($F_{1,26} = 4,5$; $p < 0,05$) másodrendű hatásokat szignifikánsnak mutatta. Az SSRI-kezelés az acetil-lizin H3 pozitív sejtek számának tendenciaszerű növekedését okozta az AFR, kontroll állatoknál (8G ábra, a vs. b oszlop; $p = 0,09$), ami nem volt kimutatható az anyai megvonásban részesült egereknél.



9. ábra: Morfológiai eredmények összefoglalása a ventrális tegmentális áréában (VTA). (A) A tirozin-hidroxiláz (TH) specifikus jelendezitása (SSD) a VTA-ban, önkényes egységekben (ö.e.) kifejezve. (B) Az acetil-lizin H3 hiszton (H3K9ac)-immunreaktív (ir) sejtek száma a VTA-ban. Reprezentatív mikrofotók a TH (zöld) immunfluoreszcencia egy (C) normál állatházi körülmények között tartott (AFR) és egy (E) három órás anyai megvonásban részesült (MD180), krónikus variábilis enyhe stressznek kitett (CVMS), fizioiógias sóoldattal injektált (Vehic) állat VTÁ-jából. Reprezentatív felvételek az H3K9ac-ir sejtekről egy (D) AFR, CVMS, Fluo és egy (F) MD180, CVMS, Fluo állat VTÁ-jából. Az oszlopok feletti betűk a legjelentősebb szignifikáns statisztikai

különbségeket jelölik a csoportpárok között a *post hoc* tesztek alapján ($p < 0,05$). *Ctrl*: kontroll (azaz CVMS-nek nem kitett); *ml*: *lemniscus medialis*. Lépték: 100 μ m.

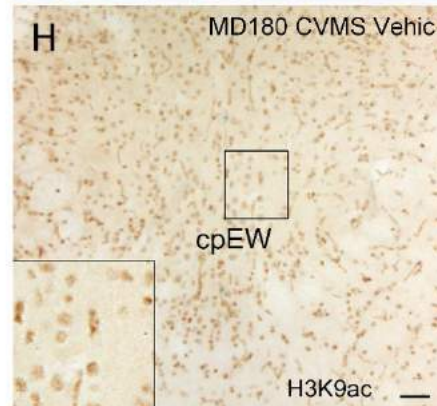
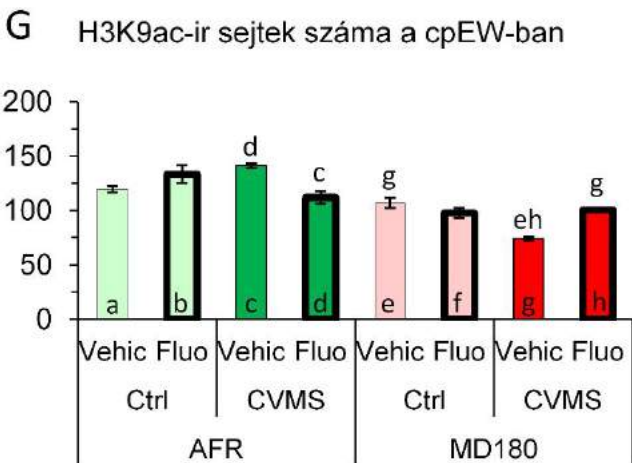
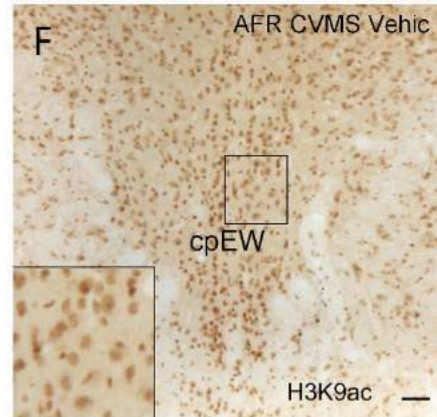
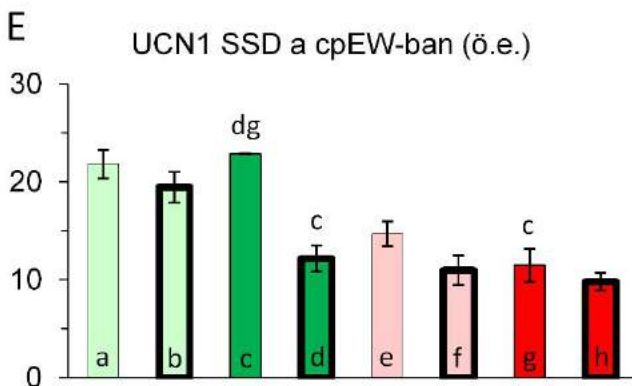
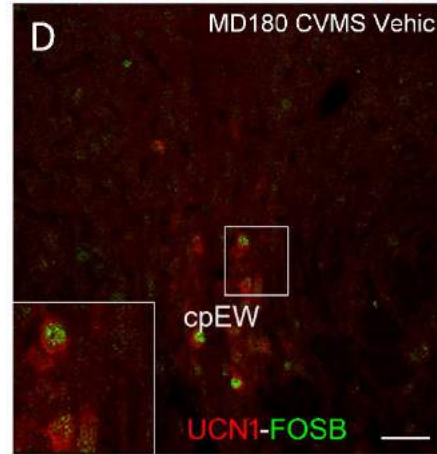
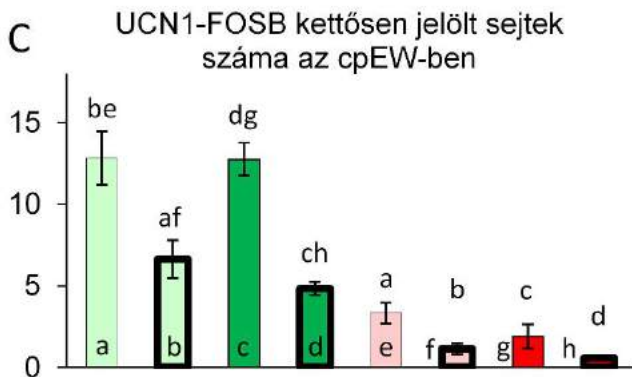
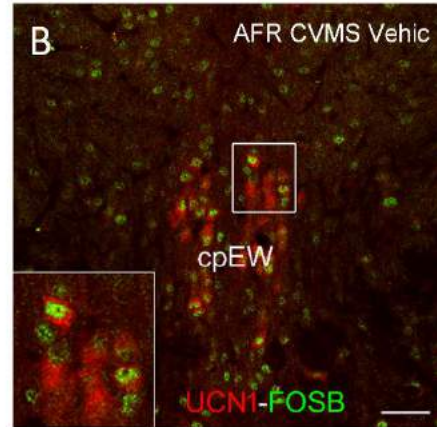
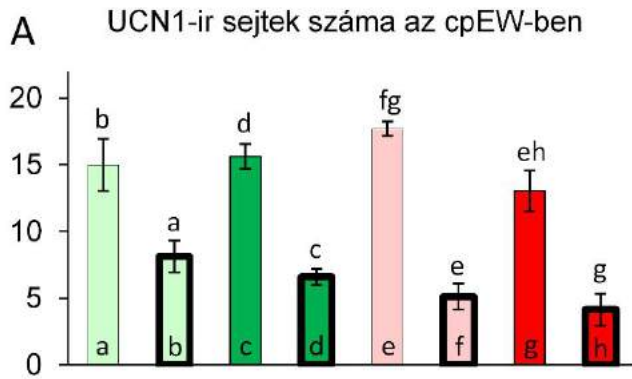
4.3.5. VTA

4.3.5.1. A TH specifikus jelendezítése

A MANOVA az anyai gondoskodás ($F_{1,29}=195,2$; $p < 10^{-13}$) és a stressz ($F_{1,29}=11,4$; $p < 0,01$) szignifikáns hatását mutatta a VTA/TH SSD-re. Az anyai gondoskodás \times stressz ($F_{1,29}=5,5$; $p < 0,05$) és az anyai gondoskodás \times kezelés ($F_{1,29}=15,1$; $p < 0,001$) másodrendű szignifikáns hatásai, valamint a három faktor harmadrendű interakciójának hatásai ($F_{1,29}=18,1$; $p < 0,001$) is bizonyítást nyertek. Az AFR egerekben a fluoxetin adása csökkentette a TH SSD-t (9A ábra, c vs. d oszlop; $p < 0,001$), ahogyan azt a *post hoc* tesztek mutatták. Mind a kontroll (9A ábra, a vs. e oszlop; $p < 0,001$), mind a CVMS-exponált (vö. 9C és E ábra képei, továbbá 9E ábra, c vs. g oszlop; $p < 0,001$) egerek alacsonyabb TH SSD-t mutattak, ha korábban anyai megvonáson estek át, amit az SSRI-kezelés nem befolyásolt. Ezt az eleve alacsonyabb TH SSD-t tovább csökkentette a CVMS (9A. ábra, e vs. g oszlop; $p < 0,05$). Érdekes módon, ez éppen az ellenkezője annak, amit az AFR egereknél megfigyeltünk (vö. a és c oszlop vs. e és g).

4.3.5.2. Az acetil-lizin H3 pozitív sejtek száma

Az acetilált H3-hisztont tartalmazó sejtek számát befolyásolta a stressz ($F_{1,26}=4,8$; $p < 0,04$) és a kezelés ($F_{1,26}=11,5$; $p < 0,01$) is a MANOVA eredményei szerint. Az anyai gondoskodás önmagában nem volt hatással, de a stresszel ($F_{1,26}=18,4$; $p < 0,001$) és a kezeléssel ($F_{1,26}=6,0$; $p < 0,03$) interakcióban ez is befolyásolta az acetiláció mértékét. A *post hoc* tesztek szerint a fluoxetinnel kezelt, AFR egerekben a stressz csökkentette a pozitív sejtek számát (9B ábra, b vs. d oszlop; $p < 0,01$). Az anyai megvonás tendencia szerűen csökkentette az acetil-lizin H3 pozitív sejtek számát (9B ábra, a vs. e oszlop; $p = 0,11$). Ezt az SSRI adása visszafordította a kontrollok esetében (9B ábra, e vs. f oszlop; $p < 0,05$), de a CVMS-t kapott egerekben nem (vö. 9D és F ábra, továbbá az 5E ábra d vs. h oszlop; $p < 0,01$). A stressznek alávetett, MD180 állatokban nem volt szignifikáns változás a kontrollokhöz képest (9B. ábra, e vs. g oszlop) és a fluoxetin acetilációt növelő hatása is a stresszt kapott, MD180 egerekben a szignifikancia szintje alatt maradt (9B ábra, g vs. h oszlop; $p = 0,13$).



10. ábra: Morfológiai eredmények összefoglalása a centrális projekciójú Edinger-Westphal magban (cpEW). (A) Az urocortin1 (UCN1) immunreaktív (ir) sejtek száma a cpEW-ben. (C) UCN1-FOSB kettősen jelölt sejtek száma a cpEW-ben. (B, D) Reprezentatív mikrofotókon látható az UCN1 (piros) és FOSB (zöld) kettős jelölésről a cpEW-ben egy (B) normál állatházi körülmények között tartott (AFR) és egy (D) három órás anyai megvonásban részesült (MD180), krónikus variábilis enyhe stressznek kitett (CVMS), fiziológias sóoldattal injektált (Vehic) állatból. (E) Az UCN1 specifikus jeldenzitása (SSD) a cpEW területén, önkényes egységekben (ö.e.) kifejezve. (G) Acetil-lizin H3 hiszton (H3K9ac)-ir sejtek száma a cpEW-ben. (F, H) Reprezentatív mikrofelveletek a cpEW-ben jelölődött H3K9ac ir sejtekről egy (F) AFR, CVMS, Vehic és egy (H) MD180, CVMS, Vehic állatból. A betűjelek az oszlopok felett a csoportpárok közötti legjelentősebb statisztikai különbségeket jelölik a post hoc tesztek alapján ($p < 0,05$). Ctrl: kontroll (azaz CVMS-nek nem kitett); Lépték: 100 μ m.

4.3.6. cpEW

4.3.6.1. Az UCN1 pozitív neuronok száma

Az anyai gondoskodás ($F_{1,30}=5,6$; $p < 0,03$), a stressz ($F_{1,30}=7,3$; $p < 0,02$) és a kezelés ($F_{1,30}=111,7$; $p < 10^{-10}$) fő hatásai, továbbá az anyai gondoskodás \times stressz kölcsönhatás ($F_{1,30}=4,7$; $p < 0,04$) és a három tényező harmadrendű interakciója ($F_{1,30}=6,3$; $p < 0,02$) mutatkozott szignifikánsnak a MANOVA alapján. A post hoc tesztek szerint a fluoxetin kezelés csökkentette a sejtszámot az AFR, kontroll (10A ábra, a vs. b oszlop; $p < 0,01$), az AFR, stressz (10A ábra, c vs. d oszlop; $p < 0,001$), az MD180, kontroll (10A ábra, e vs. f oszlop; $p < 0,001$) és az MD180, stressz (6A ábra, g vs. h oszlop; $p < 0,001$) csoportokban is a megfelelő vivőanyag-kezelt csoportokhoz képest. Az anyai megvonást elszenvedett állatoknál szintén alacsonyabb volt a sejtek száma a stressz után (10A ábra, e vs. g oszlop; $p < 0,05$), azonban ez a különbség nem volt látható az AFR egereknél (vö. 10A ábra, a és c oszlop vs. e és g).

4.3.6.2. Az UCN1 és FOSB kettős pozitív neuronok száma

Az anyai gondoskodás ($F_{1,31}=189,1$; $p < 10^{-14}$), a stressz ($F_{1,31}=4,6$; $p < 0,04$) és a kezelés ($F_{1,31}=52,0$; $p < 10^{-7}$) fő hatásai, továbbá, az anyai gondoskodás \times kezelés ($F_{1,31}=4,3$; $p < 0,05$) interakciója szignifikánsan befolyásolta az UCN1-FOSB kettős pozitív sejtek számát. A fluoxetin

kezelés csökkentette az UCN1-FOSB sejtszámot mind a kontroll (10C ábra, a vs. b oszlop; $p < 0,05$), mind a stresszt kapott (10C ábra, c vs. d oszlop; $p < 0,001$) AFR egerekben. Az anyai megvonás pedig szintén csökkentette a sejtszámot minden összehasonlításban a megfelelő AFR-kontrollal szemben (lásd 10C. ábra, a vs. e oszlop; $p < 0,001$, b vs. f oszlop; $p < 0,001$, c vs. g oszlop; $p < 0,001$, d vs. h oszlop; $p < 0,001$ és a 10B és D ábra képei).

4.3.6.3. Az UCN1 specifikus jeldenzitása

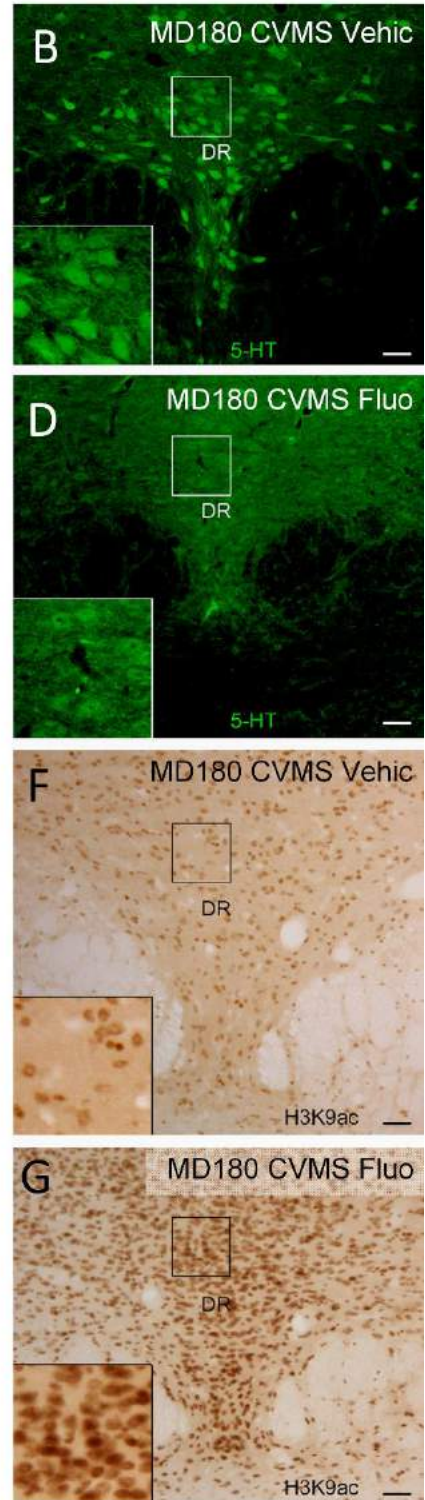
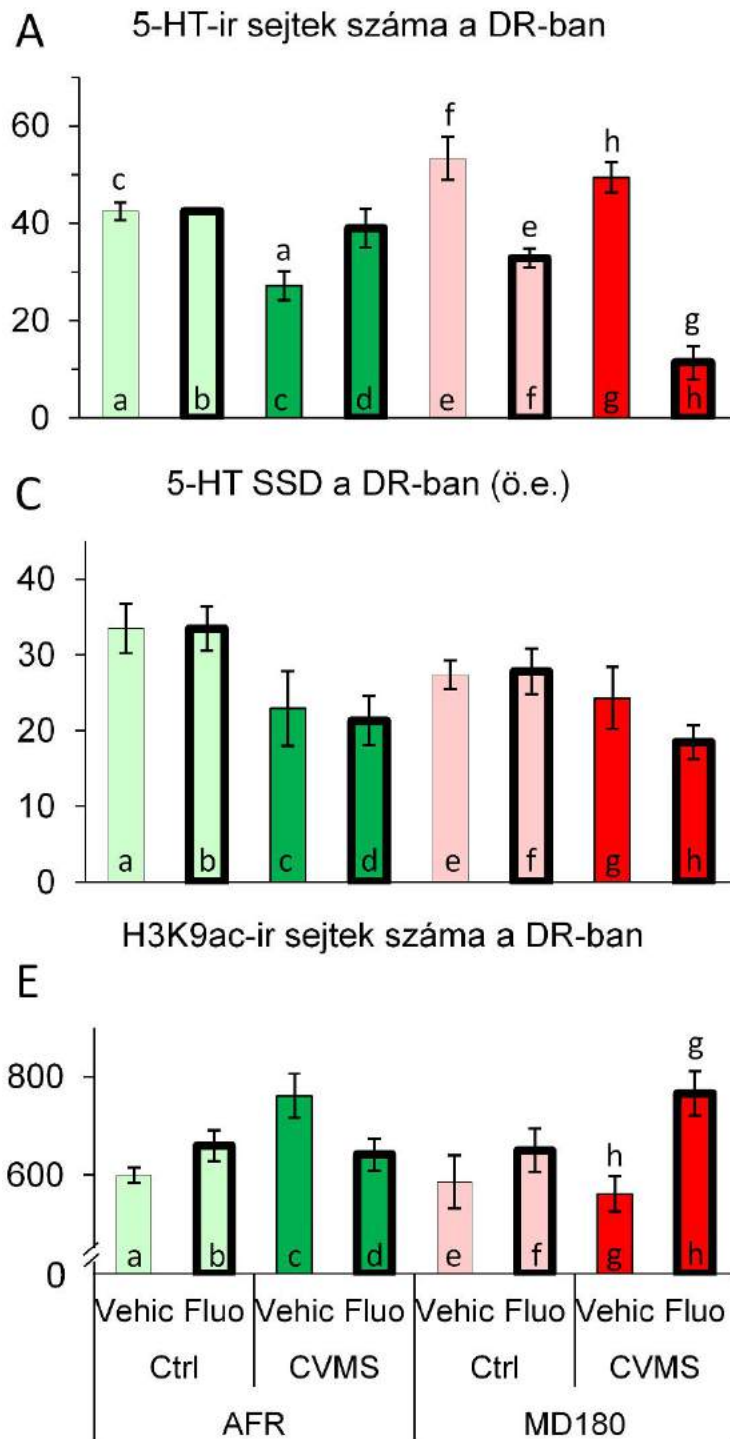
A MANOVA a vizsgált tényezők [anyai gondoskodás ($F_{1,30}=51,6$; $p < 10^{-7}$), stressz ($F_{1,30}=6,8$; $p < 0,02$), kezelés ($F_{1,30}=20,5$; $p < 10^{-4}$)] fő hatásait és harmadrendű interakciójukat ($F_{1,30}=6,4$; $p < 0,02$) is szignifikánsnak mutatta. A *post hoc* tesztek szerint a fluoxetin kezelés a CVMS-t kapott, AFR állatokban (10E ábra, c vs. d oszlop; $p < 0,01$) csökkentette az UCN1 SSD-t. A CVMS-t elszenvedett csoportok anyai megvonása esetén az UCN1 SSD 50%-kal csökkent az AFR-hez képest (10E ábra, c oszlop vs. g; $p < 0,001$).

4.3.6.4. Az acetil-lizin H3 pozitív sejtek száma

A MANOVA kimutatta, hogy az anyai gondoskodás ($F_{1,26}=80,8$; $p < 10^{-7}$) és a stressz ($F_{1,26}=4,5$; $p < 0,05$) elsőrendű, az anyai gondoskodás \times stressz ($F_{1,26}=4,7$; $p < 0,04$), az anyai gondoskodás \times kezelés ($F_{1,26}=5,3$; $p < 0,03$), továbbá a tényezők hármas kölcsönhatása ($F_{1,26}=31,1$; $p < 10^{-4}$) is befolyásolta az acetil-lizin H3 immunreaktív sejtek számát. A *post hoc* tesztek szerint az SSRI-kezelés csökkentette az acetilációt az AFR egerekben (10G ábra, c vs. d oszlop; $p < 0,05$). Az MD180 állatokban a CVMS csökkentette a sejtek számát (10G ábra, e vs. g oszlop; $p < 0,01$), ami pontosan ellentétes hatás az AFR csoportokban megfigyeltekhez képest (vö. 10G ábra, a és c oszlopok vs. e és g, valamint a 10F és H ábrák képei). Fluoxetin kezelést követően azonban a sejtek száma lecsökkent a kontroll állatok szintjére (10G ábra, g vs. h oszlop; $p < 0,05$).

4.3.6.5. Spearman-féle korreláció

Érdekes korrelációs kapcsolatokat találtunk a cpEW-ben kimutatott funkcionális neuromorfológiai változóiban: a cpEW acetilált hisztont tartalmazó sejtjeinek a száma erős pozitív korrelációt mutatott az ovBNST CRH denzitásával ($\rho=0,56$; $p < 0,01$), az UCN1-FOSB kettős pozitív sejtek számával ($\rho=0,74$; $p < 10^{-4}$) és az UCN1-denzitással ($\rho=0,64$; $p < 10^{-3}$) a cpEW-ben.



11. ábra: A morfológiai eredmények összefoglalása a nucleus raphe dorsalisban (DR). (A) A szerotonin (5-HT)-immunreaktív (ir) sejtek száma a DR-ban. (C) Az 5-HT specifikus jeldecitása (SSD) a DR-ban, önkényes egységekben (ö.e.) kifejezve. Mikrofotók az 5-HT (zöld) jelölésről három órás anyai megvonáson átesett (MD180), krónikus variábilis enyhe stressznek kitett

(CVMS), (B) fiziológiás sóoldattal injektált (Vehic) és (D) fluoxetinnel kezelt (Fluo) állatokból. (E) Az acetil-lizin H3 hiszton (H3K9ac)-ir sejtek a DR-ban. (F, G) Mikrofelvételek az acetil-lizin H3-hiszton pozitív sejtekről a DR-ban egy (F) MD180, CVMS, Vehic és egy (G) MD180, CVMS, Fluo állatokból. A betűjelek az oszlopok felett a csoportpárok közötti legjelentősebb statisztikai különbségeket jelölik a *post hoc* tesztek alapján ($p < 0,05$). Ctrl: kontroll (azaz CVMS-nek nem kitett); Lépték: 100 μ m.

4.3.7. DR

4.3.7.1. Az 5-HT pozitív neuronok száma

A MANOVA a stresszt ($F_{1,25}=26,1$; $p < 10^{-4}$) és a kezelést ($F_{1,25}=29,0$; $p < 10^{-4}$), továbbá az anyai gondoskodás \times kezelés ($F_{1,25}=66,4$; $p < 10^{-7}$) és a három faktor interakcióját ($F_{1,25}=11,5$; $p < 0,01$) mutatta szignifikánsnak a DR/5-HT neuronok számának tekintetében. A *post hoc* tesztek szerint, az AFR állatok körében a stressz csökkentette a sejtek számát (lásd 11A ábra, a vs. c oszlop; $p < 0,05$), amely különbség eltűnt, ha SSRI-t kaptak az állatok (11A ábra, a vs. d oszlop; $p = 0,99$). A fluoxetin kezelés csökkentette az 5-HT neuronok számát az MD180 egerekben (11A ábra, e vs. f oszlop; $p < 0,01$). A stressznek önmagában nem volt további hatása az MD180 egerekben, azonban a fluoxetin kezelés erősen csökkentette az 5-HT pozitív neuronok számát a korábban stresszt kapott állatokban (11A ábra, g vs. h oszlop; $p < 0,001$). Az anyai megvonás tehát megfordította az SSRI-kezelés hatását CVMS állatokban (vö. 11A ábra, c és d oszlop vs. g és h).

4.3.7.2. Az 5-HT és FOSB kettős pozitív neuronok száma

A MANOVA alapján nem mutatott szignifikáns hatást egyik tényező sem, illetve azok kölcsönhatásai sem az 5-HT és FOSB kettős pozitív neuronok számára való tekintettel.

4.3.7.3. Az 5-HT specifikus jelendezítése

A MANOVA a stressz fő hatását ($F_{1,25}=11,9$; $p < 0,01$) jelezte az 5-HT SSD-re a DR-ben. De a *post hoc* tesztek nem azonosítottak szignifikáns különbségeket a csoportpárok között.

4.3.7.4. Az acetil-lizin H3 pozitív sejtek száma

A MANOVA az anyai gondoskodás \times kezelés interakció ($F_{1,28}=6,6$; $p<0,02$) szignifikáns hatását és az anyai gondoskodás \times stressz \times kezelés ($F_{1,28}=6,3$; $p<0,02$) harmadrendű hatását mutatta ki az acetil-lizin H3 immunreaktivitásra. A *post hoc* tesztek alapján az acetilált H3 hisztont tartalmazó sejtek száma magasabb volt az MD180, CVMS-t kapott egerekben az SSRI-kezelést követően a kontrollhoz képest (11E ábra, g vs. h oszlop $p<0,05$).

4.3.7.5. Spearman-féle korreláció

A H3 hiszton acetilációja a DR-ban pozitívan korrelált a CRH pozitív ($\rho=0,47$; $p<0,01$) és a CRH-FOSB kettős pozitív sejtek számával is ($\rho=0,46$; $p<0,01$) az ovBNST-ben. Míg a korreláció negatív volt az UCN1 pozitív neuronok számával a cpEW-ben ($\rho=-0,46$; $p<0,01$) és a DR 5-HT pozitív sejtjeinek számával ($\rho=-0,40$; $p<0,04$).

4.4. A viselkedési és morfológiai megfigyelések közötti összefüggés

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

5. Diskusszió

5.1. Modellünk validitása

Miután teszteltük a depresszió három találat elméletén alapuló állatmodellünk konstrukciós és fenomenológiai validitását (Farkas és mtsai., 2017), itt a Willner (1984) által meghatározott harmadik prediktív validitási kritérium vizsgálatát tűztük ki célul. Korábbi vizsgálatainkhoz képest (Farkas és mtsai., 2016, 2017) a kísérleti elrendezést kiegészítettük egy fluoxetinnel kezelt PACAP HZ egércsoporttal. A célunk ezzel az volt, hogy teszteljük, a depressziószerű fenotípust mutató és mindhárom "találatot" hordozó állatok reagálnak-e az SSRI-kezelésre. Ezzel a stratégiával sikeresen reprodukáltuk a konstrukciós és fenomenológiai validitási kritériumokat alátámasztó eredményeket a fizikai paraméterek és a viselkedési tesztek értékelésével, és igazoltuk (12. ábra) a modellünk prediktív validitását is. A CVMS hatékonyságát alátámasztotta a testtömeggyarapodás mértékének csökkenése (2A. ábra) a stressz expozíció második hetében. Ez összhangban van a saját korábbi adatainkkal (Kormos és mtsai., 2016; Farkas és mtsai., 2017) és mások eredményeivel is (Strekalova és mtsai., 2010; Jeong és mtsai., 2013; Boleij és mtsai., 2014; Rabasa és mtsai., 2015; review a témában: Harro, 2019). Az epigenetikai változások a testtömeg-gyarapodás csökkenésével jártak együtt, ami szintén összhangban van más állatmodellek (Husum és mtsai., 2002) és humán vizsgálatok eredményeivel (Osadchiy és mtsai., 2019). Ez azt mutatja, hogy a modellben sikerült az epigenetikai mintázatba beavatkozni az élet korai szakaszára jellemző vulnerábilis fázisban. Ennek további kísérleti bizonyítására morfológiai munkánkat egy epigenetikai marker, az acetil-lizin H3 szemikvantitatív meghatározásával bővítettük. A relatív mellékvese és a thymus tömeg adatok még inkább alátámasztották az anyai megvonás, mint epigenetikai stresszor általános hatékonyságát, ahogyan azt a MANOVA mutatta. Ez összhangban van az anyai megvonás modellel dolgozó más munkacsoportok eredményeivel (Workel és mtsai., 2001) még akkor is, ha a mi kísérleteinkben a *post hoc* tesztek nem mutattak ki szignifikáns különbséget a csoportpárok között. Azt feltételezzük, hogy ehhez egy hosszabb stresszidőszak alkalmazására lett volna szükség (Kioukia-Fougia és mtsai., 2002; Sterlemann és mtsai., 2008; Bali és Jaggi, 2015), de az állatok egyénileg eltérő stresszérzékenységből is következhetett az, hogy egyes esetekben a különbségek nem mutatkoztak statisztikailag szignifikánsnak (Bartolomucci és

12. ábra			AFR		MD180	
			stressz	kezelés	stressz	kezelés
HPA-tengely válasz	fizikai paraméterek	testsúlyváltozás	•	•	•	•
		mellékvese tömeg	•	•	•	•
		thymus tömeg	•	•	•	•
	endokrin paraméterek	CORT	•	•	•	↓
Viselkedési tesztek	szorongás	MBT	•	↓	•	↓
		LDT	•	•	•	•
	depresszió szint	FST	↑	•	↓	↓
		TST	•	↓	↓	•
PFC	FOSB	↑	•	•	•	
	hiszton	•	↓	•	•	
hippocampus	CA1	FOSB	•	•	•	•
		hiszton	↓	•	↑	↑
	CA3	FOSB	↑	↑	•	•
		hiszton	•	↓	↑	↑
	DG	FOSB	•	↑	↓	↓
		hiszton	↓	•	↑	↑
ovBNST	CRH	•	↑	↓	↑	
	CRH-FOSB	•	•	•	↑	
	CRH SSD	•	↑	•	•	
	hiszton	•	•	•	•	
CeA	CRH	↑	↑	•	•	
	CHR-FOSB	↑	↑	•	•	
	CRH SSD	•	•	•	•	
	hiszton	•	↑	•	•	
VTA	TH SSD	↑	•	•	•	
	hiszton	•	•	↑	•	
cpEW	UCN1	•	↓	↓	↓	
	UCN1-FOSB	•	↓	•	↓	
	UCN1 SSD	•	•	•	•	
	hiszton	↑	•	↓	•	
DR	5-HT	↓	•	•	↓	
	5-HT SSD	↓	•	•	•	
	hiszton	•	•	•	•	

12. ábra: Az anyai megvonás stresszre és kezelésre gyakorolt hatásainak összefoglalása. ↑ növekedés, ↓ csökkenés, • nincs hatás. Az „AFR” fő kategórián belül a „stressz” oszlopban az AFR, kontroll, vivőanyag csoportot az AFR, stressz, vivőanyag csoporttal hasonlítottuk össze. A

„kezelés” oszlopban az AFR, kontroll, vivőanyag csoportot az AFR, kontroll, fluoxetin állatokkal hasonlítottuk össze. Az „MD180” fő kategóriában a „stressz” oszlopban az MD180, kontroll, vivőanyag csoportot az MD180, stressz, vivőanyag csoporttal hasonlítottuk össze. A „kezelés” oszlopban az MD180, kontroll, vivőanyag csoportot az MD180, kontroll, fluoxetin állatokkal hasonlítottuk össze. Sárga mezők: az anyai megvonás a stressz VAGY a kezelés hatását befolyásolta. Piros cellák: az anyai megvonás a stressz ÉS a kezelés hatásait is befolyásolta. A sötét háttér paradox/máladaptív változásokra utal. AFR: normál állatházi körülmények között tartott, MD180: anyai megvonást kapott, HPA tengely: hypothalamus hypophysis mellékvese tengely. ovBNST: a nucleus interstitialis striae terminalis ovális almagja, CeA: az amygdala centális magja, VTA: ventralis tegmentalis area, cpEW: centrális projekciójú Edinger-Westphal mag, DR: nucleus raphe dorsalis, CORT: kortikoszteron titer, MBT: marble burying teszt, LBT: light-dark box teszt, FST: forced swim teszt, TST: tail suspension teszt, FOSB: FOSB pozitív sejtek száma, hiszton: acetyl-lizin H3 hiszton immunreaktivitás, CRH: corticotropin-releasing hormon pozitív sejtek száma, SSD: specifikus jeldenzitás, CRH-FOSB: az adott antigén és FOSB szövettani kolokalizációja, TH: tirozin-hidroxiláz, UCNI: az urocortin1 immunreaktív sejtek száma, 5-HT: a szerotonin immunreaktív sejtek száma.

mtsai., 2004). Az anyai depriváció és a stressz együttes alkalmazása után az SSRI-kezelés ugyan enyhén csökkentette a CORT szintet, ez azonban statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak. Állatkísérletes (Brady és mtsai., 1991) és emberben gyűjtött (Young és mtsai., 2004) adatokból ismert, hogy a HPA-tengely túlműködése antidepresszánsok hatására normalizálódhat. Mivel a HPA-tengely túlműködése (Holsboer és mtsai., 1984; Pfohl és mtsai., 1985) csak a depressziós betegek egy alpopulációjára jellemző, a HPA-tengely működésébe történő beavatkozás csak ebben az esetcsoportban kecsegtet figyelemre méltó terápiás előnnyel (Himmerich és mtsai., 2006). További fontos szempont a HPA-tengely aktivitásának értékelése tekintetében, hogy a kísérletben az egerek a perfúziós eljárás előtt altatásban részesültek. Az altatóinjekció beadásából származó akut stressz hatása a CORT titer adatok viszonylag nagy szórását okozhatta, mely ahhoz vezethet, hogy a különbségek már nem mutatkoznak statisztikailag szignifikánsnak. Továbbá, egy hosszabb ideig tartó SSRI-kezelés nagyobb hatást indukálhatott volna, azonban hasonló kísérleti elrendezésben (Kormos és mtsai., 2016) azt tapasztaltuk, hogy két hét alatt már jól kimutatható az antidepresszáns hatás egérben.

5.2. A viselkedési tesztek eredményeinek értelmezése

Az MBT eredményei nyilvánvalóan alátámasztják modellünk érzékenységet prediktív validitás tekintetében, mivel az anyai gondoskodás minőségétől függetlenül a fluoxetin kezelés hatékonyan csökkentette a stresszelt állatok szorongásszintjét. A fluoxetin szorongáscsökkentő hatása az MBT-ben azonban nem volt kimutatható az AFR, kontrollcsoportban. Ez összhangban van a korábbi eredményekkel, amelyek szerint a fluoxetin adagolásának enyhe szorongáskeltő hatása stresszben nem részesült egerekben megfigyelhető (Dulawa és mtsai., 2004). E megfigyelések összecsengenek azzal az eredménnyel, hogy a fluoxetin csak a CVMS-t elszenvedett egerek szorongási szintjét csökkentette, mint ahogy azt más laboratóriumok is megállapították (Todorović és mtsai., 2017). A fluoxetin hatásának hasonló tendenciája volt megfigyelhető az LDT-ben, míg az anyai megvonás teljesen megszüntette a fluoxetin hatékonyságát. Ez tovább hangsúlyozza, hogy az élet korai szakaszában elszenvedett negatív életesemények jelentősen befolyásolják a stresszadaptációt és az antidepresszáns kezelésre adott választ (review a témában: Nemeroff, 2004; Lovallo, 2013; Gruhn és mtsai., 2021). Modellünkben a TST nagyobb érzékenységet mutatott, mint az FST. Az FST kisebb különbségeket talált az egyes csoportok között, és magasabb depresszió szintet mutatott a fluoxetin kezelés után az AFR, stresszben részesült egerekben. Ez a második megállapítás gyakorlatilag minden más eredménnyel ellenkező. Más laboratóriumok eredményei is a TST magasabb érzékenységre hívják fel a figyelmet (Bai és mtsai., 2001), míg az utóbbi időben egyre több elismert szakember van azon a véleményen, hogy a FST-t nem lenne szabad tovább használni a depresszió szintjének mérésére (Molendijk és mtsai., 2015; de Kloet és mtsai., 2016; Commons és mtsai., 2017; Kara és mtsai., 2018). A TST szerint az SSRI-kezelés erőteljesen csökkentette a depresszió szintjét az AFR állatokban. Az anyai megvonás viszont (CVMS nélkül is) csökkenti a fluoxetin kezelés hatékonyságát. Ha valamennyi kockázati tényezőnek ki voltak téve, az állatok már nem tudtak alkalmazkodni (Daskalakis és mtsai., 2013; Farkas és mtsai., 2017). Ezek a viselkedési eredmények felhívják a figyelmet a személyre szabott terápia jelentőségére a hangulatzavarok terápiájában (Kappelmann és mtsai., 2020), amely figyelembe veszi a páciens által hordozott kockázati tényezőket és azok típusát. Ebben a tanulmányban az élet korai szakaszában bekövetkező negatív életesemények és a stresszhatás közötti kölcsönhatásokat vizsgáltuk. Nem zárhatjuk ki, hogy a viselkedési tesztek stresszhatása kölcsönhatásba lépett egymással és feltehetően az MD180 és CVMS hatásával is, ami végső soron befolyásolta

eredményeinket. Mindazonáltal, hogy a körülmények minél standardabbak legyenek, a tesztek minden csoportban ugyanabban a sorrendben, egymást követő napokon alkalmaztuk.

5.3. A morfológiai eredmények értelmezése

5.3.1. PFC

A PFC-ben a FOSB CVMS-reaktivitását az anyai gondoskodás minősége és az SSRI-kezelés egyaránt befolyásolta. A FOSB a stresszkutatásban széleskörűen használt neuronális aktivitási marker, ami azt a reakciót tükrözi, ahogyan egy ingerre adott sejtszintű válasz a géntranszkripció szintjén is megjelenik (Robinson és mtsai., 2014; Nestler, 2015; Kormos és mtsai., 2016; Farkas és mtsai., 2017; Füredi és mtsai., 2017; Kovács és mtsai., 2019, 2022). Az általunk ebben a vizsgálatban használt antitest felismeri mind a teljes hosszúságú FOSB-t, mind annak *splice* variánsát, a deltaFOSB-t (Kovács és mtsai., 2022). E két izoforma dinamikájában különbözik: a teljes hosszúságú FOSB gyorsabb akut választ mutat a stressz-expozícióra, de rövidebb idő alatt eliminálódik. Ezzel szemben, ha az inger ismétlődik, a deltaFOSB felhalmozódik a sejtekben, és még egy hét múlva is kimutatható (Nestler, 2015). Figyelembe véve a teljes hosszúságú FOSB rövidebb felezési idejét, és mivel ebben a vizsgálatban az egereket egy nappal az utolsó stressz-expozíció után perfundáltuk, a detektált FOSB fehérje jelnek a delta izoformának kell megfelelnie, amely a krónikus neuronális aktivációt tükrözi (Perrotti és mtsai., 2004; Nestler, 2015; Kovács és mtsai., 2019). Az a jelenség, hogy a krónikus stressz-expozíció növeli a FOSB ir-t a PFC-ben, jól ismert (Perrotti és mtsai., 2004; Lehmann és Herkenham 2011; Sterrenburg és mtsai., 2011; Laine és mtsai., 2017) és ez teljes összhangban van a vivőanyaggal kezelt CVMS-exponált egereknél talált eredményekkel. A fluoxetin kezelés önmagában szintén növelte a PFC FOSB-tartalmát egy másik vizsgálatban (Vialou és mtsai., 2015), azonban jelen munkánkban ez a növekedés a szignifikancia szintje alatt maradt, ami a rövidebb kezelési idővel (14 illetve 20 nap) magyarázható. Fontos, hogy itt megfigyeltük, hogy ha a CVMS-expozíciót az MD180 talaján alkalmaztuk, sem a CVMS, sem a fluoxetin kezelés nem emelte meg a FOSB aktivitást a PFC-ben. Ennek a jelenségnek nagy transzlációs jelentősége lehet, mivel a FOSB-vel kapcsolatos transzkripciós változásokat egyre inkább a terápiás hatékonyság meghatározására használják a májor depresszió modelljeiben (Vialou és mtsai., 2015). A hiszton acetiláció vizsgálatánál azt találtuk, hogy az AFR egerekben a fluoxetin kezelés csökkent acetilációval társult, de ha az egerek MD180-n estek át,

akkor egy eleve alacsonyabb acetilációs szintet láttunk, amelyet a fluoxetin kezelés már nem befolyásolt. Ez arra utal, hogy a fluoxetinterápia és a korai életkori stressz kölcsönhatásba lép a PFC-ben, ami összhangban van egy korábbi vizsgálattal (Levine és mtsai., 2012), azonban a mi eredményeinkkel ellentétben, Levine és munkatársai azt találták, hogy a fluoxetin terápia növelte az epigenetikai változásokat. Ezt az eltérést azzal magyarázhatjuk, hogy az általunk vizsgált H3 hisztonnal ellentétben Levine és munkatársai (2012.) a H4 hiszton egy acetilációs helyét tesztelték. Egy harmadik, független laboratóriumban Robinson és munkatársai (2014.) szintén azt találták, hogy a krónikus fluoxetin-expozíció csökkentette az epigenetikai változásokat a *nucleus accumbens*-ben.

5.3.2. Hippocampus

Mivel az anyai megvonás nagyon alacsony, szinte kimutathatatlan FOSB jellel társult a hippocampus-ban, le kell szögeznünk, hogy az SSRI kezelésnek nem sok tere volt a FOSB-ir csökkentésére. Ezt a megfigyelést lehetne esetleg azzal magyarázni, hogy technikai hiba történt, amely megakadályozta az immunjel kialakulását, de mivel ugyanazon állatok PFC metszetei ugyanabban a festési folyamatban megbízható jelet adtak, feltételezhetjük, hogy az MD180 egerek alacsony hippocampalis FOSB sejtszámai valódi terület-specifikus megfigyelések. A jelenség alternatív értelmezése lehet, hogy a fluoxetin kezelés hatását az MD180 esetében a FOSB jelöléssel nem lehet kimutatni, de más markerek esetleg tükrözhetnék az SSRI kezelés hatását (Blendy és mtsai., 2006; Yan és mtsai., 2020; Dionisie és mtsai., 2021). Ezt az elképzelést alátámasztják a H3K9ac-jelölés során kapott eredményeink is. A hippocampalis hiszton acetiláció dinamikája különbözött a PFC-ben megfigyelttől. Az MD180 csökkentette a hiszton H3 acetilációt az összes hippocampalis régióban, ami összhangban van Sun és munkatársainak (2021) munkájával. A CVMS csökkentette a H3K9ac ir-t a vivőanyaggal kezelt, AFR egerekben az összes vizsgált régióban, ami egybevág egy korábbi patkányon végzett kísérlet eredményeivel (Hunter és mtsai., 2009), a CA1 régiót kivéve, ahol Ferland és Schrader (2011) nem találtak változást. A fluoxetin kezelés növelte az acetilációt a korábban CVMS-t átélt egerekben. Ez megfelel Hunter és munkatársai (2009) eredményeinek, ahol e hiszton metilációját mérték. Jelen vizsgálatunk azt mutatja, hogy a CVMS-nek kitett, MD180-at is elszenvedett egerekben a fluoxetin acetiláció-növelő hatása megszűnt a CA1-ben, és átfordult egy csökkentő hatásba a CA3-ban és a DG-ban. Ez a mi modellünkben arra utal, hogy az antidepresszánsok hatékonysága függhet a kockázati

tényezők számától és az epigenetikai státusztól, amelyet a modellállat hordoz. Ez végső soron aláhúzhatja az egyénre szabott terápiás megközelítés fontosságát a depresszió kezelésében, a farmakoterápia hatékonyságának növelése érdekében.

5.3.3. ovBNST

Korábbi eredményeinkkel ellentétben a CVMS-expozíció nem indukált jelentős neuronális aktivációt az ovBNST-ben az AFR állatok körében (Farkas és mtsai., 2017), ami a vivőanyagot kapott állatok napi intraperitoneális injekciói által okozott enyhe stressz hatásával lehet magyarázható. Anyai megvonást követően azonban az ugyanerre a stresszre adott válasz nagysága mind a CRH, mind a FOSB sejtek számának tekintetében csökkent. Ez alátámasztja a viselkedési tesztheink azon értelmezését, hogy az MD180 állatoknál maladaptációt látunk. Korrelációs elemzéseink igazolták, hogy a szorongás (MBT-ben) és a depresszió szintje (TST-ben) fordítottan arányos az ovBNST/CRH sejtek FOSB-pozitivitásával, összhangban a korábbi, patkánykísérletekben kapott eredményekkel (Choi és mtsai., 2007). Ehhez hasonlóan, a fluoxetin kezelés által kiváltott CRH/FOSB sejtszám emelkedés látható a legtöbb csoportban, ami erős anxiolitikus és antidepresszáns hatással járt együtt a viselkedési tesztekben. Az ovBNST/CRH-sejtek számának emelkedése fluoxetin kezelés hatására teljes összhangban van más laboratóriumok fehérje- és mRNS-szintű eredményeivel (Torres és mtsai., 1998; Hammack és mtsai., 2010; Surget és mtsai., 2011; Partridge és mtsai., 2016). A CRH SSD mérések nagyon alacsony ovBNST/CRH-tartalmat mutattak ki minden deprivált csoportban, ami arra utal, hogy az anyai depriváció csökkenti e sejtek CRH-tartalmát, hasonlóan mások eredményeihez (Hu és mtsai., 2020). Az ovBNST-ben azonban ezeknek a változásoknak nem találtunk olyan epigenetikai hátterét, amit a H3K9ac jelölés kimutatott volna.

5.3.4. CeA

A CeA stressz hatására történő aktivációja jól ismert jelenség (Kozicz és mtsai., 2008a; Regev és mtsai., 2011; Laine és mtsai., 2017; Kovacs és mtsai., 2019). Modellünkben mi is emelkedett CRH-FOSB számot és egyidejűleg magasabb CRH-denzitást találtunk, ami fokozott aktivitásra utal. A stresszt követő fluoxetin kezelés csökkentette a CRH pozitív neuronok számát. Az ovBNST-ben megfigyeltékhez hasonlóan, az AFR kontroll egerek SSRI kezelése tendenciózusan növelte a CRH-termelő neuronok számát, ami összhangban van korábbi eredményekkel (Xu és mtsai., 1999). Az anyai megvonás hatása alapjaiban rendezte át a neuronális aktivitási mintázatot a kontroll és a

stresszben részesült PACAP HZ egerekben, mivel a fluoxetin kezelés egyaránt csökkentette a CeA aktivitását és CRH tartalmát, a stressz pedig ez után nem aktiválta a magot, és nem növelte a CRH-termelő sejtek számát sem. Ez a megfigyelésünk ismételten kiemeli, hogy a korai életkor szignifikáns negatív életeseményei máladaptív változásokat okoznak a neuronális stresszadaptációban, mely végső soron hozzájárulhat a viselkedési tesztekben tapasztalt eltérésekhez (Bian és mtsai., 2021). A CeA/CRH SSD és az MBT-ben elrejtett üveggolyók száma közötti negatív korreláció egyrészt a fluoxetin erős anxiolitikus hatását bizonyítja stressz után (Partridge és mtsai., 2016), másrészt azt, hogy a magasabb CeA/CRH szint alacsonyabb szorongással jár együtt. Ez a megállapítás paradoxnak tűnik, mivel a magasabb CRH-szint általában fokozott szorongással párosul (Pomrenze és mtsai., 2019), mégis, ha a korai életszakaszban elszenvedett negatív életesemények befolyásolják a stresszválaszt, akkor nem példa nélküli, hogy ennek az ellenkezőjét figyelték meg (Bolton és mtsai., 2018).

5.3.5. VTA

A VTA döntő szerepet játszik a mezolimbikus jutalmazó pálya aktivitásában, amely a hangulatzavarok tüneteit befolyásolja, mint például az anhedónia és a csökkent motiváció (Nestler és Carlezon, 2006). Az anyai megvonás hatása hasonló volt ebben a magban, mint amit a tágabb értelemben vett amygdalában megfigyelhettünk. A TH SSD 40%-os csökkenése az anyai deprivációt elszenvedett utódoknál egybevág korábbi eredményekkel (Peña és mtsai., 2017). Ezek az adatok tovább hangsúlyozzák, hogy a fiatal korban átélt szignifikáns negatív életesemények hosszú távú változásokat okoznak a stresszadaptációban és az antidepresszáns terápiára való érzékenységben (Lovallo, 2013; Hu és mtsai., 2020; review-k a témában: Heim és Binder, 2012; Čater és Majdič, 2021). Bár nem észleltük, hogy a H3 hiszton acetiláció interakcióba lépne a TH SSD-vel, nem zárhatjuk ki, hogy más, itt nem vizsgált epigenetikai mechanizmusok is hozzájárultak a VTA TH SSD hosszú távú változásaihoz. A korábbi eredményekkel összhangban (Levine és mtsai., 2012; Schmauss, 2015) csak a fluoxetin kezelés növelte az acetiláció mértékét. A fluoxetin így növelheti a jutalmazás érzését, így enyhítve a korábban leírt tüneteket, mint az anhedónia és a motiváció hiánya (Nestler és Carlezon, 2006).

5.3.6. cpEW

Az UCN1-termelő neuronok fluoxetin kezelésre adott válasza minden csoportban egységes volt: csökkent UCN1-tartalmat mutattak. Ez az MBT eredményeivel korrelálva megalapozza a

modellünk prediktív validitását, és alátámasztja a cpEW jelentőségét a szorongással kapcsolatos betegségekben, összhangban a korábban publikált adatokkal (Vetter és mtsai., 2002; Gaszner és mtsai., 2004, 2009, 2012; Kozicz és mtsai., 2008a; Kormos és mtsai., 2016, 2022; Ujvari és mtsai., 2022). A korai életkorban elszenvedett stressz nem befolyásolta az urocortinerg sejtek számát, de csökkentette a FOSB-aktivitásukat és az UCN1-tartalmukat. Ez összhangban van a hisztonfehérjék acetilációjának mértékével valamint az acetiláció és az UCN1-denzitás közötti korrelációra vonatkozó eredményekkel, ahol az alacsonyabb acetiláció alacsonyabb UCN1 SSD-vel párosult. A cpEW-ben lévő hiszton acetiláció és az ovBNST-ben lévő CRH SSD közötti további korreláció alátámasztja az urocortinerg rendszer szerepét a BNST (Priest és mtsai., 2021) és a HPA-tengely szabályozásában (Issler és mtsai., 2014). Az a megfigyelés, hogy az AFR állatokkal ellentétben a stresszexpozíció az anyai megvonásban részesített állatokban eredményezte a legalacsonyabb acetilációs szintet, mélyreható maladaptív változásokra utal neuronális szinten. Ez hozzájárulhat az anyai deprivációt követő viselkedési változásokhoz, és összhangban van korábbi eredményeinkkel is (Gaszner és mtsai., 2009), ahol az anyai megvonás hatásai hasonlóak voltak patkányban. Fontos, hogy ezt a legalacsonyabb acetilációs szintet a fluoxetin kezelés növelte, összhangban, a frontális kéregben mások által kapott eredményekkel (Levine és mtsai., 2012). Ez a tény ismételten kiemeli modellünk prediktív validitását.

5.3.7. DR

A DR/5-HT neuronok a HPA-tengely és a limbikus agyterületek fontos regulátorai a hangulatszabályozásban (Peyron és mtsai., 1998). A PACAP KO egereknél megfigyelt viselkedési anomáliák a szerotoninerg rendszer változásainak tulajdoníthatók (Shintani és mtsai., 2006). Itt azt láttuk az AFR egerekben, hogy a stressz csökkentette mind a DR/5-HT sejtek számát, mind az 5-HT SSD-t, összhangban a mi (Gaszner és mtsai., 2012; Kormos és mtsai., 2016) és mások korábbi eredményeivel (Issler és mtsai., 2014). Fontos, hogy fluoxetin kezelést követően az 5-HT-sejtek száma nem különbözött a kontrolltól (Tao és mtsai., 2000; Quentin és mtsai., 2018). Anyai deprivációt követően, más laboratóriumok eredményeivel összhangban, emelkedett sejtszámot találtunk (Gardner és mtsai., 2009). Az anyai megvonást elszenvedett egerekben a stressz önmagában nem befolyásolta a DR/5-HT-t, míg a fluoxetin hatására csökkent a DR/5-HT sejtszám. Ez tovább erősíti a korai életszakaszban elszenvedett averzív életesemények hosszútávú jelentőségét a stresszadaptációs válaszban és a hangulatszabályozásban, összhangban számos más

vizsgálattal (review közlemények: Matthews és Robbins, 2003; Maccari és mtsai., 2014; Čater és Majdič, 2021). Az elrejtett üveggolyók száma az MBT-ben negatív korrelációt mutatott a DR/5-HT sejtek számával és 5-HT SSD mértékével. Ez meggyőzően támasztja alá azt, hogy valódi kapcsolat áll fenn a morfológiai és viselkedési eredményeink között. Mindez egybevágh a szerotoninerg rendszerek jól ismert jelentőségével hangulatszabályozásban, beleértve a hangulatzavarokban vitt szerepüket hangsúlyozó számos kutatási eredményt is (Steinbusch és mtsai., 1981; Ma és mtsai., 1991; Shintani és mtsai., 2006, review a témában: Lowry és mtsai., 2008; Venkatraman és mtsai., 2017). Az anyai megvonást elszenvedett egerekben a stressz nem okozott változást, de CVMS-t követően a fluoxetin adása növelte a hiszton acetilációt. Ezzel összhangban, nagyobb epigenetikai változást figyeltek meg antidepresszáns adása esetén Levine és munkatársai (2012) is. Az 5-HT-pozitív sejtek számának és a DR H3K9ac sejtek számának erős negatív korrelációja rávilágít az epigenetika fontosságára a hangulatszabályozásban. Az 5-HT-sejtek száma és az ovBNST/CRH, valamint a cpEW/UCN1 sejtek száma közötti erős korreláció pedig funkcionális kapcsolatra utal, ami összhangban van Waselus (2009), van der Doelen (2015) és Priest és mtsai. (2021) korábbi neuroanatómiai vizsgálataival.

5.3.8. A viselkedési és funkcionális-morfológiai eredmények közötti összefüggések értelmezése

Ebben a tanulmányban funkcionális neuroanatómiai vizsgálatokat végeztünk számos limbikus központban és megállapítottuk, hogy a vizsgált agyterületek mindegyike hozzájárulhatott a megváltozott hangulati állapothoz. Az ovBNST és a CeA CRH aktivitása negatívan, míg a cpEW/UCN1 és a DR/5-HT pozitívan korrelált az MBT-ben megfigyelt szorongási és a TST-ben regisztrált depresszió szintekkel. Ez a korábban találtakkal összhangban (review a témában: Kormos és Gaszner, 2013) arra utal, hogy ellentétesen járulnak hozzá a hangulati állapot szabályozásához. A VTA-ban a hiszton acetiláció korrelált az FST viselkedéssel, ami arra utal, hogy ez a terület hosszú távon hozzájárul a hangulati állapothoz.

5.4. Vizsgálataink limitációi

Az itt vizsgált agyterületek erősen ösztrogénérzékenyek (Derks és mtsai., 2007; Clark és mtsai., 2012; Kelly és mtsai., 2013; Vandegrift és mtsai., 2017; Le Moene és mtsai., 2019). Ezért, amennyiben a vizsgálatokat nőstény állaton is elvégeztük volna, figyelembe kellett volna vennünk az aktuális ösztrozsciklus fázisának viselkedésbeli, sőt funkcionális-morfológiai hatását. A

hüvelykenetminták gyűjtése a ciklus nyomon követése céljából egy további stresszfaktort jelentene, továbbá, a CVMS-expozíció is kölcsönhatásba léphet a ciklussal. Az állatkísérleti elrendezés bonyolultságát, az állattartó létesítményünk kapacitását és a fent leírtakat figyelembe véve kényszerűségből lemondunk arról, hogy a modellt nőstény egereken teszteljük, ami e vizsgálat fontos korlátja.

Ebben a kísérletben nem alkalmaztunk vad típusú és PACAP knock out állatokat. Ezért nem vizsgáltuk, hogy a PACAP (Hashimoto és mtsai., 2001) csökkent mennyisége önmagában hozzájárul-e a depresszió-szerű fenotípushoz. Mindazonáltal, ezt korábban már kimutattuk (Farkas és mtsai., 2016, 2017) és más laboratóriumok is ezt találták (Hashimoto és mtsai., 2001, 2009; Shintani és mtsai., 2006).

Nem minden területen és minden sejttípusra nézve végeztünk vizsgálatokat a H3K9ac és FOSB szempontjából pozitív jelet adó sejtek neurokémiai karakterisztikájának azonosítása céljából. További kolokalizációs vizsgálatokkal kell majd meghatározni, hogy van-e sejttípus specifikus változás a hiszton acetiláció mértékében vagy a neuronális aktivitás mintázatában a PFC, a hippocampusban vagy a többi vizsgált agyterület esetében.

Tekintettel arra, hogy egyes neurontípusokra nem jellemző a neuronális aktivitási markerek, az azonnali gének expressziója (Hoffman és mtsai., 1994; Dragunow és Faull, 1998). Nem zárhatjuk ki azt sem, hogy a neuronális aktivitás mintázata más képet mutatna, ha a FOSB helyett egy alternatív markert használtunk volna. A FOSB jelölés másik hátránya, hogy nem detektálja a potenciálisan nagyon fontos, gátló jellegű funkcionális változásokat (Bowers és mtsai., 1998; Choi és mtsai., 2007), ami arra utalhatna, hogy a vizsgált területeken csökkent aktivitás és/vagy génexpresszió következhetett be.

6. Következtetések és kitekintés

A humán depresszió három találat elmélete alapján (de Kloet és mtsai., 2007; Daskalakis és mtsai., 2013) a közelmúltban kifejlesztettünk egy a hangulatzavarok vizsgálatára alkalmas modellt PACAP heterozigóta egerekkel, amelyeket anyai megvonásnak és krónikus variábilis enyhe stressznek tettünk ki, valamint igazoltuk a modell megbízhatóságát a Willner-féle (Willner, 1984) konstrukciós és fenotípusos validitási kritériumok szerint (Farkas és mtsai., 2016, 2017). Jelen eredményeink a korábbi eredményeink reprodukálhatóságát is bizonyítják. A harmadik, prediktív validitási kritériumot jelen vizsgálatainkban sikerrel teszteltük, mivel a fluoxetin kezelés helyreállította az MBT-ben mért szorongási és a TST által mutatott depresszió szinteket. Morfológiai adataink arra utalnak, hogy a genetikailag meghatározottan hangulatzavarra érzékenyebb PACAP heterozigóta egereken alkalmazott anyai megvonás, mint a korai életszakaszban fellépő negatív életesemények modellje, mélyreható agyterületspecifikus változásokat okoz a tágabb értelemben vett amygdala CRH-tartalmú magjaiban, a dopaminerg VTA-ban, az urocortinerg cpEW-ben és a szerotoninerg DR-ban, illetve ezek hisztonacetilációjában és stresszadaptációs válaszában. A megfigyelt funkcionális-neuromorfológiai változások komplexitása (12. ábra) tovább erősíti modellünk validitását (Boas és mtsai., 2019).

A modellben bekövetkező egyéb funkcionális-morfológiai változások azonosítására további szisztematikus térképezési vizsgálatokra van szükség, mely olyan újabb, itt nem vizsgált agyterületek vagy neuronkörök azonosításához vezethet, amelyek szintén hozzájárulnak a hangulatzavarok neurobiológiájának egy-egy specifikus aspektusához. A jövőben potenciálisan antidepresszáns gyógyszervegyületként hasznosítható hatóanyagok preklinikai tesztelése ebben a modellben további segítséget nyújthat új terápiás stratégiákat találni a stresszel összefüggő hangulatzavarok kezelésében.

7. Új eredmények összefoglalása

1. Az antidepresszánskezeléssel kiegészített jelen kísérleti elrendezésben sikeresen reprodukáltuk a három találat elmélet egérmodelljének konstrukciós és fenomenológiai validitásával alátámasztó korábbi eredményeinket.

2. Állatkísérletes bizonyítékot találtunk arra nézve, hogy modellünkben egy, a depresszió terápiájának első vonalában használt szerrel, a fluoxetinnel történt kezelés csökkenti az állatok szorongását és depressziószintjét, bizonyítva ezzel modellünk prediktív validitását.

3. Modellünkben funkcionális-morfológiai vizsgálatnak vetettük alá a stresszadaptációban és a hangulat szabályzásában fontos szerepet betöltő limbikus központokat (PFC, hippocampus, ovBNST, CeA, VTA, cpEW, DR), melyek válasza agyterületspecifikus volt. Eredményeink összeesengenek más kutatócsoportok eredményeivel, illetve jelentős korrelációs összefüggéseket mutattak a viselkedési tesztek során látottakkal, bizonyítva, hogy az agyban megfigyelt változások állhatnak a viselkedési tesztek látott eltérések hátterében.

4. Modellünkben a legjelentősebb faktornak az anyai megvonás mutatkozott: a viselkedési tesztek és a vizsgált agyterületek mintegy kétharmadában megváltoztatta az állatok stresszre és/vagy kezelésre adott reakcióját, bizonyítva ezzel az élet korai szakaszában (vulnerábilis fázisában) történő epigenetikai programozódás fontosságát a felnőttkori stresszadaptációban, illetve az antidepresszánsokra adott terápiás válaszban.

8. Irodalomjegyzék

Agarwal A, Halvorson LM, Legradi G. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mimics neuroendocrine and behavioral manifestations of stress: Evidence for PKA-mediated expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005. 138(1):45-57. doi: 10.1016/j.molbrainres.2005.03.016.

Albert PR, Vahid-Ansari F, Luckhart C. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. *Front Behav Neurosci*. 2014. 8:199. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00199.

Bai F, Li X, Clay M, Lindstrom T, Skolnick P. Intra- and interstrain differences in models of "behavioral despair". *Pharmacol Biochem Behav*. 2001. 70(2-3):187-92. doi: 10.1016/s0091-3057(01)00599-8.

Bali A, Jaggi AS. Preclinical experimental stress studies: protocols, assessment and comparison. *Eur J Pharmacol*. 2015. 746:282-92. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.10.017.

Bartolomucci A, Pederzani T, Sacerdote P, Panerai AE, Parmigiani S, Palanza P. Behavioral and physiological characterization of male mice under chronic psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology*. 2004. 29(7):899-910. doi: 10.1016/j.psyneuen.2003.08.003.

Baudin A, Blot K, Verney C, Estevez L, Santamaria J, Gressens P, Giros B, Otani S, Daugé V, Naudon L. Maternal deprivation induces deficits in temporal memory and cognitive flexibility and exaggerates synaptic plasticity in the rat medial prefrontal cortex. *Neurobiol Learn Mem*. 2012. 98(3):207-14. doi: 10.1016/j.nlm.2012.08.004.

Belleau EL, Treadway MT, Pizzagalli DA. The Impact of Stress and Major Depressive Disorder on Hippocampal and Medial Prefrontal Cortex Morphology. *Biol Psychiatry*. 2019. 85(6):443-453. doi: 10.1016/j.biopsych.2018.09.031.

Bian Y, Ma Y, Ma Q, Yang L, Zhu Q, Li W, Meng L. Prolonged Maternal Separation Induces the Depression-Like Behavior Susceptibility to Chronic Unpredictable Mild Stress Exposure in Mice. *Biomed Res Int*. 2021. 2021:6681397. doi: 10.1155/2021/6681397.

Blendy JA. The role of CREB in depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry*. 2006. 59(12):1144-50. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.11.003.

Boleij H, Willems J, Leijten M, van't Klooster J, Lesscher H, Kirchhoff S, Lavrijsen M, Arndt SS, Ohl F. Chronic social stress does not affect behavioural habituation in male CD1 mice. *Behav Brain Res*. 2014. 273:34-44. doi: 10.1016/j.bbr.2014.07.015.

Bolton JL, Molet J, Regev L, Chen Y, Rismanchi N, Haddad E, Yang DZ, Obenaus A, Baram TZ. Anhedonia Following Early-Life Adversity Involves Aberrant Interaction of Reward and Anxiety

Circuits and Is Reversed by Partial Silencing of Amygdala Corticotropin-Releasing Hormone Gene. *Biol Psychiatry*. 2018. 83(2):137-147. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.08.023.

Boucher MN, May V, Braas KM, Hammack SE. PACAP orchestration of stress-related responses in neural circuits. *Peptides*. 2021. 142:170554. doi: 10.1016/j.peptides.2021.170554.

Boucher MN, Aktar M, Braas KM, May V, Hammack SE. Activation of Lateral Parabrachial Nucleus (LPBn) PACAP-Expressing Projection Neurons to the Bed Nucleus of the Stria Terminalis (BNST) Enhances Anxiety-like Behavior. *J Mol Neurosci*. 2022. 72(3):451-458. doi: 10.1007/s12031-021-01946-z.

Bouwknicht JA, Spiga F, Staub DR, Hale MW, Shekhar A, Lowry CA. Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Res Bull*. 2007. 72(1):32-43. doi: 10.1016/j.brainresbull.2006.12.009.

Bowers G, Cullinan WE, Herman JP. Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuits. *J Neurosci*. 1998. 18(15):5938-47. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-15-05938.1998.

Brady LS, Whitfield HJ Jr, Fox RJ, Gold PW, Herkenham M. Long-term antidepressant administration alters corticotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase, and mineralocorticoid receptor gene expression in rat brain. Therapeutic implications. *J Clin Invest*. 1991. 87(3):831-7. doi: 10.1172/JCI115086.

Campbell S, Macqueen G. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *J Psychiatry Neurosci*. 2004. 29(6):417-26.

Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol*. 2003. 463(1-3):235-72. doi: 10.1016/s0014-2999(03)01285-8.

Catena-Dell'Osso M, Fagiolini A, Marazziti D, Baroni S, Bellantuono C. Non-monoaminergic targets for the development of antidepressants: focus on neuropeptides. *Mini Rev Med Chem*. 2013. 13(1):2-10. PMID: 22876945. doi: 10.2174/1389557511307010002

Čater M, Majdič G. How early maternal deprivation changes the brain and behavior? *Eur J Neurosci*. 2022. 55(9-10):2058-2075. doi: 10.1111/ejn.15238.

Choi DC, Furay AR, Evanson NK, Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Herman JP. Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. *J Neurosci*. 2007. 27(8):2025-34. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4301-06.2007.

Commons KG, Cholanians AB, Babb JA, Ehlinger DG. The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. *ACS Chem Neurosci*. 2017. 8(5):955-960. doi: 10.1021/acschemneuro.7b00042.

Covington HE 3rd, Maze I, Vialou V, Nestler EJ. Antidepressant action of HDAC inhibition in the prefrontal cortex. *Neuroscience*. 2015. 298:329-35. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.04.030.

Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* 1980. 13(2):167-70. doi: 10.1016/0091-3057(80)90067-2.

Czéh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A, Fuchs E. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Oct 23;98(22):12796-801. doi: 10.1073/pnas.211427898.

Czéh B, Lucassen PJ. What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2007. 257(5):250-60. doi: 10.1007/s00406-007-0728-0.

Czéh B, Fuchs E, Wiborg O, Simon M. Animal models of major depression and their clinical implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2016. 64:293-310. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.04.004.

Czéh B, Simon M. Benefits of animal models to understand the pathophysiology of depressive disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2021. 106:110049. doi: 10.1016/j.pnpbp.2020.110049.

Daskalakis NP, Bagot RC, Parker KJ, Vinkers CH, de Kloet ER. The three-hit concept of vulnerability and resilience: toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology.* 2013. 38(9):1858-73. doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.06.008.

Daubner SC, Le T, Wang S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys.* 2011. 508(1):1-12. doi: 10.1016/j.abb.2010.12.017.

Deussing JM, Chen A. The Corticotropin-Releasing Factor Family: Physiology of the Stress Response. *Physiol Rev.* 2018. 98(4):2225-2286. doi: 10.1152/physrev.00042.2017.

Dionisie V, Ciobanu AM, Toma VA, Manea MC, Baldea I, Olteanu D, Sevastre-Berghian A, Clichici S, Manea M, Riga S, Filip GA. Escitalopram Targets Oxidative Stress, Caspase-3, BDNF and MeCP2 in the Hippocampus and Frontal Cortex of a Rat Model of Depression Induced by Chronic Unpredictable Mild Stress. *Int J Mol Sci.* 2021. 22(14):7483. doi: 10.3390/ijms22147483.

van der Doelen RH, Arnoldussen IA, Ghareh H, van Och L, Homberg JR, Kozicz T. Early life adversity and serotonin transporter gene variation interact to affect DNA methylation of the corticotropin-releasing factor gene promoter region in the adult rat brain. *Dev Psychopathol.* 2015. 27(1):123-35. doi: 10.1017/S0954579414001345.

Dos Santos Júnior ED, Da Silva AV, Da Silva KR, Haemmerle CA, Batagello DS, Da Silva JM, Lima LB, Da Silva RJ, Diniz GB, Sita LV, Elias CF, Bittencourt JC. The centrally projecting Edinger-Westphal nucleus--I: Efferents in the rat brain. *J Chem Neuroanat.* 2015. 68:22-38. doi: 10.1016/j.jchemneu.2015.07.002.

Dragunow M, Faull R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods.* 1989 Sep;29(3):261-5. doi: 10.1016/0165-0270(89)90150-7.

- Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B, Hen R. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology*. 2004. 29(7):1321-30. doi: 10.1038/sj.npp.1300433.
- Dunlavy CJ. Introduction to the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Healthy and Dysregulated Stress Responses, Developmental Stress and Neurodegeneration. *J Undergrad Neurosci Educ*. 2018.16(2):R59-R60.
- Ellenbogen JM, Hurford MO, Liebeskind DS, Neimark GB, Weiss D. Ventromedial frontal lobe trauma. *Neurology*. 2005. 64(4):757. doi: 10.1212/wnl.64.4.757.
- Farkas J, Kovacs LÁ, Gaszner T, Gaszner B. Using PACAP heterozygous mice as models of the three hit theory of depression. In *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide—PACAP*. 2016. (pp. 731-741). Springer, Cham. ISBN: 978-3-319-35135-3.
- Farkas J, Kovács LÁ, Gáspár L, Nafz A, Gaszner T, Ujvári B, Kormos V, Csernus V, Hashimoto H, Reglődi D, Gaszner B. Construct and face validity of a new model for the three-hit theory of depression using PACAP mutant mice on CD1 background. *Neuroscience*. 2017. 354:11-29. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.04.019.
- Ferland CL, Schrader LA. Regulation of histone acetylation in the hippocampus of chronically stressed rats: a potential role of sirtuins. *Neuroscience*. 2011. 174:104-14. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.10.077.
- Füredi N, Nagy Á, Mikó A, Berta G, Kozicz T, Pétervári E, Balaskó M, Gaszner B. Melanocortin 4 receptor ligands modulate energy homeostasis through urocortin 1 neurons of the centrally projecting Edinger-Westphal nucleus. *Neuropharmacol*. 2017. 118, 26–37. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.03.002.
- Fuchs E, Czéh B, Kole MH, Michaelis T, Lucassen PJ. Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2004. 14 Suppl 5:S481-90. doi: 10.1016/j.euroneuro.2004.09.002.
- Gardner KL, Hale MW, Oldfield S, Lightman SL, Plotsky PM, Lowry CA. Adverse experience during early life and adulthood interact to elevate tph2 mRNA expression in serotonergic neurons within the dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*. 2009. 163(4):991-1001. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.07.055.
- Gaszner B, Csernus V, Kozicz T. Urocortinergic neurons respond in a differentiated manner to various acute stressors in the Edinger-Westphal nucleus in the rat. *J Comp Neurol*. 2004. 480(2):170-9. doi: 10.1002/cne.20343.
- Gaszner B, Korosi A, Palkovits M, Roubos EW, Kozicz T. Neuropeptide Y activates urocortin 1 neurons in the nonpreganglionic Edinger-Westphal nucleus. *J Comp Neurol*. 2007. 500(4):708-19. doi: 10.1002/cne.21177.
- Gaszner B, Jensen KO, Farkas J, Reglodi D, Csernus V, Roubos EW, Kozicz T. Effects of maternal separation on dynamics of urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor in the rat non-

preganglionic Edinger-Westphal nucleus. *Int J Dev Neurosci.* 2009. 27(5):439-51. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2009.05.006.

Gaszner B, Kormos V, Kozicz T, Hashimoto H, Reglodi D, Helyes Z. The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger-Westphal nucleus, ventral lateral septum, and dorsal raphe nucleus. *Neuroscience.* 2012. 202:283-99. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.046.

Gaszner B, Kovacs LA, Gaszner T, Gaspar L, Reglodi D, Loricz K, Farkas J, Hashimoto H, Kormos V. 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, 2014.

George MS, Ketter TA, Post RM. Prefrontal cortex dysfunction in clinical depression. *Depression.* 1994. 2(2), 59-72.

Ghasemi M, Montaser-Kouhsari L, Shafaroodi H, Nezami BG, Ebrahimi F, Dehpour AR. NMDA receptor/nitroergic system blockage augments antidepressant-like effects of paroxetine in the mouse forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl).* 2009. 206(2):325-33. doi: 10.1007/s00213-009-1609-1.

Ghosal S, Duman CH, Liu RJ, Wu M, Terwilliger R, Girgenti MJ, Wohleb E, Fogaca MV, Teichman EM, Hare B, Duman RS. Ketamine rapidly reverses stress-induced impairments in GABAergic transmission in the prefrontal cortex in male rodents. *Neurobiol Dis.* 2020. 134:104669. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104669.

Gili M, Castellví P, Vives M, de la Torre-Luque A, Almenara J, Blasco MJ, Cebrià AI, Gabilondo A, Pérez-Ara MA, A MM, Lagares C, Parés-Badell O, Piqueras JA, Rodríguez-Jiménez T, Rodríguez-Marín J, Soto-Sanz V, Alonso J, Roca M. Mental disorders as risk factors for suicidal behavior in young people: A meta-analysis and systematic review of longitudinal studies. *J Affect Disord.* 2019. 245:152-162. doi: 10.1016/j.jad.2018.10.115.

Glover V, O'Connor TG, O'Donnell K. Prenatal stress and the programming of the HPA axis. *Neurosci Biobehav Rev.* 2010. 35(1):17-22. doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.11.008.

Gruhn MA, Phan KL, Klumpp H, Ajilore O, Gorka SM. Early life adversity as a moderator of symptom change following selective serotonin reuptake inhibitors and cognitive behavioral therapy. *Cognitive Therapy and Research.* 2021. 45(2), 343-354. doi: 10.1007/s10608-020-10158-5.

Guidi J, Fava GA. Sequential Combination of Pharmacotherapy and Psychotherapy in Major Depressive Disorder: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Psychiatry.* 2021. 78(3):261-269. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2020.3650.

Jiménez T, Rodríguez-Marín J, Soto-Sanz V, Alonso J, Roca M. Mental disorders as risk factors for suicidal behavior in young people: A meta-analysis and systematic review of longitudinal studies. *J Affect Disord.* 2019. 245:152-162. doi: 10.1016/j.jad.2018.10.115.

- Hakulinen C, Musliner KL, Agerbo E. Bipolar disorder and depression in early adulthood and long-term employment, income, and educational attainment: A nationwide cohort study of 2,390,127 individuals. *Depress Anxiety*. 2019. 36(11):1080-1088. doi: 10.1002/da.22956.
- Hammack SE, Roman CW, Lezak KR, Kocho-Shellenberg M, Grimmig B, Falls WA, Braas K, May V. Roles for pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) expression and signaling in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) in mediating the behavioral consequences of chronic stress. *J Mol Neurosci*. 2010. 42(3):327-40. doi: 10.1007/s12031-010-9364-7.
- Hammack SE, May V. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in stress-related disorders: data convergence from animal and human studies. *Biol Psychiatry*. 2015. 78(3):167-77. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.12.003.
- Hannibal J. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Comp Neurol*. 2002. 453(4):389-417. doi: 10.1002/cne.10418.
- Harro J. Animal models of depression: pros and cons. *Cell Tissue Res*. 2019. 377(1):5-20. doi: 10.1007/s00441-018-2973-0.
- Harvey BH, Brand L, Jeeva Z, Stein DJ. Cortical/hippocampal monoamines, HPA-axis changes and aversive behavior following stress and restress in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Physiol Behav*. 2006. 87(5):881-90. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.01.033.
- Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K, Mori W, Hirose M, Matsuda T, Sakaue M, Miyazaki J, Niwa H, Tashiro F, Yamamoto K, Koga K, Tomimoto S, Kunugi A, Suetake S, Baba A. Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. 98(23):13355-60. doi: 10.1073/pnas.231094498.
- Hashimoto H, Hashimoto R, Shintani N, Tanaka K, Yamamoto A, Hatanaka M, Guo X, Morita Y, Tanida M, Nagai K, Takeda M, Baba A. Depression-like behavior in the forced swimming test in PACAP-deficient mice: amelioration by the atypical antipsychotic risperidone. *J Neurochem*. 2009. 110(2):595-602. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06168.x.
- Hashimoto H, Shintani N, Tanida M, Hayata A, Hashimoto R, Baba A. PACAP is implicated in the stress axes. *Curr Pharm Des*. 2011. 17(10):985-9. doi: 10.2174/138161211795589382.
- Hattori S, Takao K, Tanda K, Toyama K, Shintani N, Baba A, Hashimoto H, Miyakawa T. Comprehensive behavioral analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) knockout mice. *Front Behav Neurosci*. 2012. 6:58. doi: 10.3389/fnbeh.2012.00058.
- Heim C, Binder EB. Current research trends in early life stress and depression: review of human studies on sensitive periods, gene-environment interactions, and epigenetics. *Exp Neurol*. 2012. 233(1):102-11. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.10.032.
- Heshmati M, Russo SJ. Anhedonia and the brain reward circuitry in depression. *Curr Behav Neurosci Rep*. 2015. 2(3):146-153. doi: 10.1007/s40473-015-0044-3.

- Himmerich H, Binder EB, Künzel HE, Schuld A, Lucae S, Uhr M, Pollmächer T, Holsboer F, Ising M. Successful antidepressant therapy restores the disturbed interplay between TNF-alpha system and HPA axis. *Biol Psychiatry*. 2006. 60(8):882-8. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.03.075.
- Hinwood M, Morandini J, Day TA, Walker FR. Evidence that microglia mediate the neurobiological effects of chronic psychological stress on the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. 2012. 22(6):1442-54. doi: 10.1093/cercor/bhr229.
- Hoffman GE, Le WW, Abbud R, Lee WS, Smith MS. Use of Fos-related antigens (FRAs) as markers of neuronal activity: FRA changes in dopamine neurons during proestrus, pregnancy and lactation. *Brain Res*. 1994. 654(2):207-15. doi: 10.1016/0006-8993(94)90481-2.
- Holsboer F, Von Bardeleben U, Gerken A, Stalla GK, Müller OA. Blunted corticotropin and normal cortisol response to human corticotropin-releasing factor in depression. *N Engl J Med*. 1984. 311(17):1127. doi: 10.1056/NEJM198410253111718.
- Hu P, Maita I, Phan ML, Gu E, Kwok C, Dieterich A, Gergues MM, Yohn CN, Wang Y, Zhou JN, Qi XR, Swaab DF, Pang ZP, Lucassen PJ, Roepke TA, Samuels BA. Early-life stress alters affective behaviors in adult mice through persistent activation of CRH-BDNF signaling in the oval bed nucleus of the stria terminalis. *Transl Psychiatry*. 2020. 10(1):396. doi: 10.1038/s41398-020-01070-3.
- Hunter RG, McCarthy KJ, Milne TA, Pfaff DW, McEwen BS. Regulation of hippocampal H3 histone methylation by acute and chronic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. 106(49):20912-7. doi: 10.1073/pnas.0911143106.
- Husum H, Termeer E, Mathé AA, Bolwig TG, Ellenbroek BA. Early maternal deprivation alters hippocampal levels of neuropeptide Y and calcitonin-gene related peptide in adult rats. *Neuropharmacology*. 2002. 42(6):798-806. doi: 10.1016/s0028-3908(02)00038-2.
- Issler O, Carter RN, Paul ED, Kelly PA, Olverman HJ, Neufeld-Cohen A, Kuperman Y, Lowry CA, Seckl JR, Chen A, Jamieson PM. Increased anxiety in corticotropin-releasing factor type 2 receptor-null mice requires recent acute stress exposure and is associated with dysregulated serotonergic activity in limbic brain areas. *Biol Mood Anxiety Disord*. 2014. 4(1):1. doi: 10.1186/2045-5380-4-1.
- Jawahar MC, Murgatroyd C, Harrison EL, Baune BT. Epigenetic alterations following early postnatal stress: a review on novel aetiological mechanisms of common psychiatric disorders. *Clin Epigenetics*. 2015. 7:122. doi: 10.1186/s13148-015-0156-3.
- Jeong JY, Lee DH, Kang SS. Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2013. 28(4):288-96. doi: 10.3803/EnM.2013.28.4.288.
- Juruena MF, Bocharova M, Agustini B, Young AH. Atypical depression and non-atypical depression: Is HPA axis function a biomarker? A systematic review. *J Affect Disord*. 2018. 233:45-67. doi: 10.1016/j.jad.2017.09.052.

Kappelmann N, Rein M, Fietz J, Mayberg HS, Craighead WE, Dunlop BW, Nemeroff CB, Keller M, Klein DN, Arnow BA, Husain N, Jarrett RB, Vittengl JR, Menchetti M, Parker G, Barber JP, Bastos AG, Dekker J, Peen J, Keck ME, Kopf-Beck J. Psychotherapy or medication for depression? Using individual symptom meta-analyses to derive a Symptom-Oriented Therapy (SOt) metric for a personalised psychiatry. *BMC Med.* 2020. 18(1):170. doi: 10.1186/s12916-020-01623-9.

Kara NZ, Stukalin Y, Einat H. Revisiting the validity of the mouse forced swim test: Systematic review and meta-analysis of the effects of prototypic antidepressants. *Neurosci Biobehav Rev.* 2018. 84:1-11. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.11.003.

Karyotaki E, Smit Y, Holdt Henningsen K, Huibers MJ, Robays J, de Beurs D, Cuijpers P. Combining pharmacotherapy and psychotherapy or monotherapy for major depression? A meta-analysis on the long-term effects. *J Affect Disord.* 2016. 194:144-52. doi: 10.1016/j.jad.2016.01.036.

Khan A, Brown WA. Antidepressants versus placebo in major depression: an overview. *World Psychiatry.* 2015. 14(3):294-300. doi: 10.1002/wps.20241.

Kim Y, Kim K, Chartier KG, Wike TL, McDonald SE. Adverse childhood experience patterns, major depressive disorder, and substance use disorder in older adults. *Aging Ment Health.* 2021. 25(3):484-491. doi: 10.1080/13607863.2019.1693974.

Kioukia-Fougia N, Antoniou K, Bekris S, Liapi C, Christofidis I, Papadopoulou-Daifoti Z. The effects of stress exposure on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thymus, thyroid hormones and glucose levels. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2002. 26(5):823-30. doi: 10.1016/s0278-5846(01)00297-4.

de Kloet ER, Derijk RH, Meijer OC. Therapy Insight: is there an imbalanced response of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in depression? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007. 3(2):168-79. doi: 10.1038/ncpendmet0403.

de Kloet ER, Molendijk ML. Coping with the Forced Swim Stressor: Towards Understanding an Adaptive Mechanism. *Neural Plast.* 2016. 2016:6503162. doi: 10.1155/2016/6503162.

Koenigs M, Grafman J. The functional neuroanatomy of depression: distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex. *Behav Brain Res.* 2009. 201(2):239-43. doi: 10.1016/j.bbr.2009.03.004.

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

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. 330:335-58. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.06.004.

Kormos V, Kecskés A, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, Alomari A, Hegedüs D, Renner É, Palkovits M, Zelena D, Helyes Z, Pintér E, Gaszner B. Peptidergic neurons of the Edinger-

Westphal nucleus express TRPA1 ion channel that is downregulated both upon chronic variable mild stress in male mice and in humans who died by suicide. *J Psychiatry Neurosci*. 2022. 47(3):E162-E175. doi: 10.1503/jpn.210187.

Korosi A, Schotanus S, Olivier B, Roubos EW, Kozicz T. Chronic ether stress-induced response of urocortin 1 neurons in the Edinger-Westphal nucleus in the mouse. *Brain Res*. 2005. 1046(1-2):172-9. doi: 10.1016/j.brainres.2005.04.012.

Kovács LÁ, Berta G, Csernus V, Ujvári B, Füredi N, Gaszner B. Corticotropin-Releasing Factor-Producing Cells in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus and Extended Amygdala Show Age-Dependent FOS and FOSB/DeltaFOSB Immunoreactivity in Acute and Chronic Stress Models in the Rat. *Front Aging Neurosci*. 2019. 11:274. doi: 10.3389/fnagi.2019.00274.

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

Kozicz T, Bordewin LA, Czéh B, Fuchs E, Roubos EW. Chronic psychosocial stress affects corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus and central extended amygdala as well as urocortin 1 in the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus of the tree shrew. *Psychoneuroendocrinology*. 2008a. 33(6):741-54. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.02.012.

Kozicz T, Tilburg-Ouwens D, Faludi G, Palkovits M, Roubos E. Gender-related urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor expression in the adult human midbrain of suicide victims with major depression. *Neuroscience*. 2008b. 152(4):1015-23. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.12.050.

Kozicz T. The missing link; the significance of urocortin 1/urocortin 2 in the modulation of the dorsal raphe serotonergic system. *Mol Psychiatry*. 2010. 15(4):340-1. doi: 10.1038/mp.2009.134.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007. 128(4):693-705. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005.

Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays*. 1998. 20(8):615-26. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199808)20:8<615

Lacerda-Pinheiro SF, Pinheiro Junior RF, Pereira de Lima MA, Lima da Silva CG, Vieira dos Santos Mdo S, Teixeira Júnior AG, Lima de Oliveira PN, Ribeiro KD, Rolim-Neto ML, Bianco BA. Are there depression and anxiety genetic markers and mutations? A systematic review. *J Affect Disord*. 2014.168:387-98. doi: 10.1016/j.jad.2014.07.016.

Laine MA, Sokolowska E, Dudek M, Callan SA, Hyytiä P, Hovatta I. Brain activation induced by chronic psychosocial stress in mice. *Sci Rep*. 2017.7(1):15061. doi: 10.1038/s41598-017-15422-5.

Lange UC, Schneider R. What an epigenome remembers. *Bioessays*. 2010. 32(8):659-68. doi: 10.1002/bies.201000030.

Lee HS, Eum YJ, Jo SM, Waterhouse BD. Projection patterns from the amygdaloid nuclear complex to subdivisions of the dorsal raphe nucleus in the rat. *Brain Res.* 2007. 1143:116-25. doi: 10.1016/j.brainres.2007.01.081.

Lehmann ML, Herkenham M. Environmental enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway. *J Neurosci.* 2011. 31(16):6159-73. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0577-11.2011.

Lehmann ML, Mustafa T, Eiden AM, Herkenham M, Eiden LE. PACAP-deficient mice show attenuated corticosterone secretion and fail to develop depressive behavior during chronic social defeat stress. *Psychoneuroendocrinology.* 2013. 38(5):702-15. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.09.006.

Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen TM, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, Desaki AL, Desta T, Diep E, Dolbeare TA, Donelan MJ, Dong HW, Dougherty JG, Duncan BJ, Ebbert AJ, Eichele G, Estin LK, Faber C, Facer BA, Fields R, Fischer SR, Fliiss TP, Frensley C, Gates SN, Glattfelder KJ, Halverson KR, Hart MR, Hohmann JG, Howell MP, Jeung DP, Johnson RA, Karr PT, Kawal R, Kidney JM, Knapik RH, Kuan CL, Lake JH, Laramie AR, Larsen KD, Lau C, Lemon TA, Liang AJ, Liu Y, Luong LT, Michaels J, Morgan JJ, Morgan RJ, Mortrud MT, Mosqueda NF, Ng LL, Ng R, Orta GJ, Overly CC, Pak TH, Parry SE, Pathak SD, Pearson OC, Puchalski RB, Riley ZL, Rockett HR, Rowland SA, Royall JJ, Ruiz MJ, Sarno NR, Schaffnit K, Shapovalova NV, Sivisay T, Slaughterbeck CR, Smith SC, Smith KA, Smith BI, Sodt AJ, Stewart NN, Stumpf KR, Sunkin SM, Sutram M, Tam A, Teemer CD, Thaller C, Thompson CL, Varnam LR, Visel A, Whitlock RM, Wohnoutka PE, Wolkey CK, Wong VY, Wood M, Yaylaoglu MB, Young RC, Youngstrom BL, Yuan XF, Zhang B, Zwingman TA, Jones AR. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature.* 2007. 445(7124):168-76. doi: 10.1038/nature05453.

Leger L, Charnay Y, Hof PR, Bouras C, Cespuglio R. Anatomical distribution of serotonin-containing neurons and axons in the central nervous system of the cat. *J Comp Neurol.* 2001. 433(2):157-82. Doi: 10.1002/cne.1133

Lemos JC, Zhang G, Walsh T, Kirby LG, Akanwa A, Brooks-Kayal A, Beck SG. Stress-hyperresponsive WKY rats demonstrate depressed dorsal raphe neuronal excitability and dysregulated CRF-mediated responses. *Neuropsychopharmacology.* 2011. 36(4):721-34. doi: 10.1038/npp.2010.200.

Levine A, Worrell TR, Zimnisky R, Schmauss C. Early life stress triggers sustained changes in histone deacetylase expression and histone H4 modifications that alter responsiveness to adolescent antidepressant treatment. *Neurobiol Dis.* 2012. 45(1):488-98. doi: 10.1016/j.nbd.2011.09.005.

Levinstein MR, Bergkamp DJ, Lewis ZK, Tsobanoudis A, Hashikawa K, Stuber GD, Neumaier JF. PACAP-expressing neurons in the lateral habenula diminish negative emotional valence. *Genes Brain Behav.* 2022. e12801. doi: 10.1111/gbb.12801.

- Lind MJ, Marraccini ME, Sheerin CM, Bountress K, Bacanu SA, Amstadter AB, Nugent NR. Association of Posttraumatic Stress Disorder With rs2267735 in the ADCYAP1R1 Gene: A Meta-Analysis. *J Trauma Stress*. 2017. 30(4):389-398. doi: 10.1002/jts.22211.
- Liu W, Ge T, Leng Y, Pan Z, Fan J, Yang W, Cui R. The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex. *Neural Plast*. 2017. 2017:6871089. doi: 10.1155/2017/6871089.
- Lovallo WR. Early life adversity reduces stress reactivity and enhances impulsive behavior: implications for health behaviors. *Int J Psychophysiol*. 2013. 90(1):8-16. doi: 10.1016/j.ijpsycho.2012.10.006.
- Lowry CA, Hale MW, Evans AK, Heerkens J, Staub DR, Gasser PJ, Shekhar A. Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Y Acad Sci*. 2008. 1148:86-94. doi: 10.1196/annals.1410.004.
- Lutfy K, Shankar G. Emerging evidence for the role of pituitary adenylate cyclase-activating peptide in neuropsychiatric disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2019. 167:143-157. doi: 10.1016/bs.pmbts.2019.06.009.
- Ma QP, Yin GF, Ai MK, Han JS. Serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the amygdala in the rat. *Neurosci Lett*. 1991. 134(1):21-4. doi: 10.1016/0304-3940(91)90499-j.
- Maccari S, Krugers HJ, Morley-Fletcher S, Szyf M, Brunton PJ. The consequences of early-life adversity: neurobiological, behavioural and epigenetic adaptations. *J Neuroendocrinol*. 2014. 26(10):707-23. doi: 10.1111/jne.12175.
- MacQueen GM, Ramakrishnan K, Ratnasingan R, Chen B, Young LT. Desipramine treatment reduces the long-term behavioural and neurochemical sequelae of early-life maternal separation. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2003. 6(4):391-6. doi: 10.1017/S1461145703003729.
- Masi G, Brovedani P. The hippocampus, neurotrophic factors and depression: possible implications for the pharmacotherapy of depression. *CNS Drugs*. 2011. 25(11):913-31. doi: 10.2165/11595900-000000000-00000.
- Matthews K, Robbins TW. Early experience as a determinant of adult behavioural responses to reward: the effects of repeated maternal separation in the rat. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003. 27(1-2):45-55. doi: 10.1016/s0149-7634(03)00008-3.
- Mayberg HS, Liotti M, Brannan SK, McGinnis S, Mahurin RK, Jerabek PA, Silva JA, Tekell JL, Martin CC, Lancaster JL, Fox PT. Reciprocal limbic-cortical function and negative mood: converging PET findings in depression and normal sadness. *Am J Psychiatry*. 1999. 156(5):675-82. doi: 10.1176/ajp.156.5.675.
- Mayberg HS, Lozano AM, Voon V, McNeely HE, Seminowicz D, Hamani C, Schwab JM, Kennedy SH. Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Neuron*. 2005. 45(5):651-60. doi: 10.1016/j.neuron.2005.02.014.

- McEwen BS, Bowles NP, Gray JD, Hill MN, Hunter RG, Karatsoreos IN, Nasca C. Mechanisms of stress in the brain. *Nat Neurosci.* 2015. 18(10):1353-63. doi: 10.1038/nn.4086.
- Molendijk ML, de Kloet ER. Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. *Psychoneuroendocrinology.* 2015. 62:389-91. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.08.028.
- Mulinari S. Monoamine theories of depression: historical impact on biomedical research. *J Hist Neurosci.* 2012. 21(4):366-92. doi: 10.1080/0964704X.2011.623917.
- Mullins N, Lewis CM. Genetics of Depression: Progress at Last. *Curr Psychiatry Rep.* 2017. 19(8):43. doi: 10.1007/s11920-017-0803-9.
- Mukherjee S, Coque L, Cao JL, Kumar J, Chakravarty S, Asaithamby A, Graham A, Gordon E, Enwright JF 3rd, DiLeone RJ, Birnbaum SG, Cooper DC, McClung CA. Knockdown of Clock in the ventral tegmental area through RNA interference results in a mixed state of mania and depression-like behavior. *Biol Psychiatry.* 2010. 68(6):503-11. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.04.031.
- Nemeroff CB, Widerlöv E, Bissette G, Walléus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science.* 1984. 14;226(4680):1342-4. doi: 10.1126/science.6334362.
- Nemeroff CB CB. Early-Life Adversity, CRF Dysregulation, and Vulnerability to Mood and Anxiety Disorders. *Psychopharmacol Bull.* 2004. 38(1):14-20.
- Nestler EJ, Carlezon WA Jr. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry.* 2006. 59(12):1151-9. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.09.018.
- Nestler EJ. Epigenetics: Stress makes its molecular mark. *Nature.* 2012. 11;490(7419):171-2. doi: 10.1038/490171a.
- Nestler EJ. Δ FosB: A transcriptional regulator of stress and antidepressant responses. *Eur J Pharmacol.* 2015. 753, 66–72. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.10.034.
- Ng RK, Gurdon JB. Epigenetic inheritance of cell differentiation status. *Cell Cycle.* 2008. 7(9):1173-7. doi: 10.4161/cc.7.9.5791.
- Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T. Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. *Front Neurosci.* 2014. 8:166. doi: 10.3389/fnins.2014.00166.
- Njung'e K, Handley SL. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991. 38(1):63-7. doi: 10.1016/0091-3057(91)90590-x.
- Ormel J, Hartman CA, Snieder H. The genetics of depression: successful genome-wide association studies introduce new challenges. *Transl Psychiatry.* 2019. 9(1):114. doi: 10.1038/s41398-019-0450-5.
- Osadchiy V, Mayer EA, Bhatt R, Labus JS, Gao L, Kilpatrick LA, Liu C, Tillisch K, Naliboff B, Chang L, Gupta A. History of early life adversity is associated with increased food addiction and

sex-specific alterations in reward network connectivity in obesity. *Obes Sci Pract.* 2019. 5(5):416-436. doi: 10.1002/osp4.362.

Pampallona S, Bollini P, Tibaldi G, Kupelnick B, Munizza C. Combined pharmacotherapy and psychological treatment for depression: a systematic review. *Arch Gen Psychiatry.* 2004. 61(7):714-9. doi: 10.1001/archpsyc.61.7.714.

Partridge JG, Forcelli PA, Luo R, Cashdan JM, Schulkin J, Valentino RJ, Vicini S. Stress increases GABAergic neurotransmission in CRF neurons of the central amygdala and bed nucleus stria terminalis. *Neuropharmacology.* 2016. 107:239-250. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.03.029.

Paxinos G, and Franklin KBJ. *The mouse brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition.* 2001. ISBN: 9780128161579

Peña CJ, Kronman HG, Walker DM, Cates HM, Bagot RC, Purushothaman I, Issler O, Loh YE, Leong T, Kiraly DD, Goodman E, Neve RL, Shen L, Nestler EJ. Early life stress confers lifelong stress susceptibility in mice via ventral tegmental area OTX2. *Science.* 2017. 356(6343):1185-1188. doi: 10.1126/science.aan4491.

Perrin AJ, Pariante CM. Endocrine and immune effects of non-convulsive neurostimulation in depression: A systematic review. *Brain Behav Immun.* 2020. 87:910-920. doi: 10.1016/j.bbi.2020.02.016.

Perrotti LI, Hadeishi Y, Ulery PG, Barrot M, Monteggia L, Duman RS, Nestler EJ. Induction of deltaFosB in reward-related brain structures after chronic stress. *J Neurosci.* 2004. 24(47):10594-602. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2542-04.2004.

Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvett M, Luppi PH. Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience.* 1998. 82(2):443-68. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00268-6.

Pfohl B, Sherman B, Schlechte J, Stone R. Pituitary-adrenal axis rhythm disturbances in psychiatric depression. *Arch Gen Psychiatry.* 1985. 42(9):897-903. doi: 10.1001/archpsyc.1985.01790320069009.

Pinhasov A, Neshet E, Gross M, Turgeman G, Kreinin A, Yadid G. The role of the PACAP signaling system in depression. *Curr Pharm Des.* 2011. 17(10):990-1001. doi: 10.2174/138161211795589328.

Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology.* 2008. 33(1):88-109. doi: 10.1038/sj.npp.1301574.

Pizzagalli DA, Roberts AC. Prefrontal cortex and depression. *Neuropsychopharmacol.* 2022. 47(1):225-246. doi: 10.1038/s41386-021-01101-7.

Pomrenze MB, Tovar-Diaz J, Blasio A, Maiya R, Giovanetti SM, Lei K, Morikawa H, Hopf FW, Messing RO. A Corticotropin Releasing Factor Network in the Extended Amygdala for Anxiety. *J Neurosci.* 2019. 39(6):1030-1043. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2143-18.2018.

- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1977. 229(2):327-36.
- Porta-Casteràs D, Cano M, Steward T, Andero R, Cardoner N. The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide system as a sex-specific modulator of hippocampal response to threat stimuli. *Neurobiol Stress*. 2022. 18:100448. doi: 10.1016/j.ynstr.2022.100448.
- Prada SI. Population-level effects of depression diagnosis on Medicare payments and use. *J Am Geriatr Soc*. 2014. 62(9):1805-7. doi: 10.1111/jgs.13014.
- Priest MF, Freda SN, Badong D, Dumrongprechachan V, Kozorovitskiy Y. Peptidergic modulation of fear responses by the Edinger-Westphal nucleus
bioRxiv 2021.08.05.455317; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.08.05.455317>
- Quentin E, Belmer A, Maroteaux L. Somato-Dendritic Regulation of Raphe Serotonin Neurons; A Key to Antidepressant Action. *Front Neurosci*. 2018. 12:982. doi: 10.3389/fnins.2018.00982.
- Raabe FJ, Spengler D. Epigenetic Risk Factors in PTSD and Depression. *Front Psychiatry*. 2013. 4:80. doi: 10.3389/fpsy.2013.00080.
- Rabasa C, Pastor-Ciurana J, Delgado-Morales R, Gómez-Román A, Carrasco J, Gagliano H, García-Gutiérrez MS, Manzanares J, Armario A. 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*. 2015. 25(8):1248-59. doi: 10.1016/j.euroneuro.2015.04.026.
- Ramot A, Jiang Z, Tian JB, Nahum T, Kuperman Y, Justice N, Chen A. Hypothalamic CRFR1 is essential for HPA axis regulation following chronic stress. *Nat Neurosci*. 2017. 20(3):385-388. doi: 10.1038/nn.4491.
- Regev L, Neufeld-Cohen A, Tsoory M, Kuperman Y, Getselter D, Gil S, Chen A. Prolonged and site-specific over-expression of corticotropin-releasing factor reveals differential roles for extended amygdala nuclei in emotional regulation. *Mol Psychiatry*. 2011. 16(7):714-28. doi: 10.1038/mp.2010.64.
- Ressler KJ, Mercer KB, Bradley B, Jovanovic T, Mahan A, Kerley K, Norrholm SD, Kilaru V, Smith AK, Myers AJ, Ramirez M, Engel A, Hammack SE, Toufexis D, Braas KM, Binder EB, May V. Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. *Nature*. 2011. 470(7335):492-7. doi: 10.1038/nature09856.
- Robison A, Vialou V, Sun H-S, LaBonte B, Golden S, Dias C, Turecki G, Tamminga CA, Russo S, Mazei-Robison M et al. Fluoxetine Epigenetically Alters the CaMKII α Promoter in Nucleus Accumbens to Regulate Δ FosB Binding and Antidepressant Effects. *Neuropsychopharmacol*. 2014. 39, 1178–1186. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.319>.
- Roman CW, Lezak KR, Hartsock MJ, Falls WA, Braas KM, Howard AB, Hammack SE, May V. PAC1 receptor antagonism in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) attenuates the endocrine and behavioral consequences of chronic stress. *Psychoneuroendocrinology*. 2014. 47:151-65. doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.05.014.

- Russo SJ, Nestler EJ. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2013. 14(9):609-25. doi: 10.1038/nrn3381.
- Sampath D, Sathyanesan M, Newton SS. Cognitive dysfunction in major depression and Alzheimer's disease is associated with hippocampal-prefrontal cortex dysconnectivity. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2017. 13:1509-1519. doi: 10.2147/NDT.S136122.
- Schmauss C. An HDAC-dependent epigenetic mechanism that enhances the efficacy of the antidepressant drug fluoxetine. *Sci Rep*. 2015. 5:8171. doi: 10.1038/srep08171.
- Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality. *Biometrika*. 1965. 52:591-9. doi: 10.2307/2333709
- Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*. 1936. 138: 3479.
- Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical methods*. Iowa State University Press. 1989. ISBN: 978-0813815619
- Steinbusch HW, Nieuwenhuys R, Verhofstad AA, Van der Kooy D. The nucleus raphe dorsalis of the rat and its projection upon the caudatoputamen. A combined cytoarchitectonic, immunohistochemical and retrograde transport study. *J Physiol (Paris)*. 1981. 77(2-3):157-74. PMID: 6169825.
- Sterlemann V, Ganea K, Liebl C, Harbich D, Alam S, Holsboer F, Müller MB, Schmidt MV. Long-term behavioral and neuroendocrine alterations following chronic social stress in mice: implications for stress-related disorders. *Horm Behav*. 2008. 53(2):386-94. doi: 10.1016/j.yhbeh.2007.11.001.
- Sterrenburg L, Gaszner B, Boerrigter J, Santbergen L, Bramini M, Elliott E, Chen A, Peeters BW, Roubos EW, Kozicz T. Chronic stress induces sex-specific alterations in methylation and expression of corticotropin-releasing factor gene in the rat. *PLoS One*. 2011. 6(11):e28128. doi: 10.1371/journal.pone.0028128.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 1985. 85(3):367-70. doi: 10.1007/BF00428203.
- Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000. 403(6765):41-5. doi: 10.1038/47412.
- Strekalova T, Steinbusch HW. Measuring behavior in mice with chronic stress depression paradigm. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010. 34(2):348-61. doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.12.014.
- Strekalova T, Liu Y, Kiselev D, Khairuddin S, Chiu JLY, Lam J, Chan YS, Pavlov D, Proshin A, Lesch KP, Anthony DC, Lim LW. Chronic mild stress paradigm as a rat model of depression: facts, artifacts, and future perspectives. *Psychopharmacology (Berl)*. 2022. 239(3):663-693. doi: 10.1007/s00213-021-05982-w.

Stroth N, Eiden LE. Stress hormone synthesis in mouse hypothalamus and adrenal gland triggered by restraint is dependent on pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide signaling. *Neuroscience*. 2010. 165(4):1025-30. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.11.023.

Stroth N, Holighaus Y, Ait-Ali D, Eiden LE. PACAP: a master regulator of neuroendocrine stress circuits and the cellular stress response. *Ann N Y Acad Sci*. 2011. 1220(1):49-59. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.05904.x.

Sun H, Zhang X, Kong Y, Gou L, Lian B, Wang Y, Jiang L, Li Q, Sun H, Sun L. Maternal Separation-Induced Histone Acetylation Correlates with BDNF-Programmed Synaptic Changes in an Animal Model of PTSD with Sex Differences. *Mol Neurobiol*. 2021. 58(4):1738-1754. doi: 10.1007/s12035-020-02224-6.

Sun X, Song Z, Si Y, Wang JH. microRNA and mRNA profiles in ventral tegmental area relevant to stress-induced depression and resilience. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018. 86:150-165. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.05.023.

Surget A, Tanti A, Leonardo ED, Laugeray A, Rainer Q, Touma C, Palme R, Griebel G, Ibarguen-Vargas Y, Hen R, Belzung C. Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Mol Psychiatry*. 2011. 16(12):1177-88. doi: 10.1038/mp.2011.48.

Tao R, Ma Z, Auerbach SB. Differential effect of local infusion of serotonin reuptake inhibitors in the raphe versus forebrain and the role of depolarization-induced release in increased extracellular serotonin. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000. 294(2):571-9.

Todorović N, Filipović D. The antidepressant- and anxiolytic-like effects of fluoxetine and clozapine in chronically isolated rats involve inhibition of hippocampal TNF- α . *Pharmacol Biochem Behav*. 2017. 163:57-65. doi: 10.1016/j.pbb.2017.10.006.

Torres G, Horowitz JM, Laflamme N, Rivest S. Fluoxetine induces the transcription of genes encoding c-fos, corticotropin-releasing factor and its type 1 receptor in rat brain. *Neurosci*. 1998. 87(2):463-77. doi: 10.1016/s0306-4522(98)00147-x.

Treadway MT, Waskom ML, Dillon DG, Holmes AJ, Park MTM, Chakravarty MM, Dutra SJ, Polli FE, Iosifescu DV, Fava M, Gabrieli JDE, Pizzagalli DA. Illness progression, recent stress, and morphometry of hippocampal subfields and medial prefrontal cortex in major depression. *Biol Psychiatry*. 2015. 77(3):285-294. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.06.018.

Tsukiyama N, Saida Y, Kakuda M, Shintani N, Hayata A, Morita Y, Tanida M, Tajiri M, Hazama K, Ogata K, Hashimoto H, Baba A. PACAP centrally mediates emotional stress-induced corticosterone responses in mice. *Stress*. 2011. 14(4):368-75. doi: 10.3109/10253890.2010.544345.

Ujvári B, Pytel B, Márton Z, Bognár M, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Berta G, Kecskés A, Kormos V, Farkas B, Füredi N, Gaszner B. Neurodegeneration in the centrally-projecting Edinger-Westphal nucleus contributes to the non-motor symptoms of Parkinson's disease in the rat. *J Neuroinflammation*. 2022. 19(1):31. doi: 10.1186/s12974-022-02399-w.

- Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*. 2009. 10(6):397-409. doi: 10.1038/nrn2647.
- Veeraiah P, Noronha JM, Maitra S, Bagga P, Khandelwal N, Chakravarty S, Kumar A, Patel AB. Dysfunctional glutamatergic and γ -aminobutyric acidergic activities in prefrontal cortex of mice in social defeat model of depression. *Biol Psychiatry*. 2014. 76(3):231-8. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.09.024.
- Venkatraman A, Edlow BL, Immordino-Yang MH. The Brainstem in Emotion: A Review. *Front Neuroanat*. 2017. 11:15. doi: 10.3389/fnana.2017.00015.
- Vetter DE, Li C, Zhao L, Contarino A, Liberman MC, Smith GW, Marchuk Y, Koob GF, Heinemann SF, Vale W, Lee KF. Urocortin-deficient mice show hearing impairment and increased anxiety-like behavior. *Nat Genet*. 2002. 31(4):363-9. doi: 10.1038/ng914.
- Vialou V, Thibault M, Kaska S, Cooper S, Gajewski P, Eagle A, Mazei-Robison M, Nestler EJ, Robison AJ. Differential induction of FosB isoforms throughout the brain by fluoxetine and chronic stress. *Neuropharmacology*. 2015. 99:28-37. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.07.005.
- Villas Boas GR, Boerngen de Lacerda R, Paes MM, Gubert P, Almeida WLDC, Rescia VC, de Carvalho PMG, de Carvalho AAV, Oesterreich SA. Molecular aspects of depression: A review from neurobiology to treatment. *Eur J Pharmacol*. 2019. 851:99-121. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.02.024.
- Voineskos D, Daskalakis ZJ, Blumberger DM. Management of Treatment-Resistant Depression: Challenges and Strategies. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2020. 16:221-234. doi: 10.2147/NDT.S198774.
- Waselus M, Nazzaro C, Valentino RJ, Van Bockstaele EJ. Stress-induced redistribution of corticotropin-releasing factor receptor subtypes in the dorsal raphe nucleus. *Biol Psychiatry*. 2009. 66(1):76-83. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.02.014.
- Waters RP, Rivalan M, Bangasser DA, Deussing JM, Ising M, Wood SK, Holsboer F, Summers CH. Evidence for the role of corticotropin-releasing factor in major depressive disorder. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015. 58:63-78. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.07.011.
- WHO, 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>
- Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 1984. 83(1):1-16. doi: 10.1007/BF00427414.
- Willner P, Gruca P, Lason M, Tota-Glowczyk K, Litwa E, Niemczyk M, Papp M. Validation of chronic mild stress in the Wistar-Kyoto rat as an animal model of treatment-resistant depression. *Behav Pharmacol*. 2019. 30(2 and 3-Spec Issue):239-250. doi: 10.1097/FBP.0000000000000431.
- Workel JO, Oitzl MS, Flutterm M, Lesscher H, Karssen A, de Kloet ER. Differential and age-dependent effects of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of brown norway rats from youth to senescence. *J Neuroendocrinol*. 2001. 13(7):569-80. doi: 10.1046/j.1365-2826.2001.00668.x.

Xu L, Anwyl R, Rowan MJ. Behavioural stress facilitates the induction of long-term depression in the hippocampus. *Nature*. 1997. 387(6632):497-500. doi: 10.1038/387497a0.

Xu Y, Day TA, Buller KM. The central amygdala modulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to systemic interleukin-1beta administration. *Neuroscience*. 1999. 94(1):175-83. doi: 10.1016/s0306-4522(99)00311-5.

Yan L, Xu X, He Z, Wang S, Zhao L, Qiu J, Wang D, Gong Z, Qiu X, Huang H. Antidepressant-Like Effects and Cognitive Enhancement of Coadministration of Chaihu Shugan San and Fluoxetine: Dependent on the BDNF-ERK-CREB Signaling Pathway in the Hippocampus and Frontal Cortex. *Biomed Res Int*. 2020. 2020:2794263. doi: 10.1155/2020/2794263.

Young EA, Altemus M, Lopez JF, Kocsis JH, Schatzberg AF, DeBattista C, Zubieta JK. HPA axis activation in major depression and response to fluoxetine: a pilot study. *Psychoneuroendocrinology*. 2004. 29(9):1198-204. doi: 10.1016/j.psyneuen.2004.02.002.

Zhang J, Fan Y, Li Y, Zhu H, Wang L, Zhu MY. Chronic social defeat up-regulates expression of the serotonin transporter in rat dorsal raphe nucleus and projection regions in a glucocorticoid-dependent manner. *J Neurochem*. 2012. 123(6):1054-68. doi: 10.1111/jnc.12055.

Zhong H, Rong J, Zhu C, Liang M, Li Y, Zhou R. Epigenetic Modifications of GABAergic Interneurons Contribute to Deficits in Adult Hippocampus Neurogenesis and Depression-Like Behavior in Prenatally Stressed Mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2020. 23(4):274-285. doi: 10.1093/ijnp/pyaa020.

9. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

IF(2021): 6,055; Q1

Gaszner T, Farkas J, Kun D, Ujvári B, Füredi N, Kovács LÁ, Hashimoto H, Reglódi D, Kormos V, Gaszner B. Epigenetic and neuronal activity markers suggest the recruitment of the prefrontal cortex and hippocampus in the three-hit model of depression in male PACAP heterozygous mice. *Int J Mol Sci*. 2022. 23(19):11739. doi: 10.3390/ijms231911739.

IF (2021): 6,208; Q1

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 12,263

10. Az értekezés alapját nem képező egyéb közlemények

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

Farkas J, Kovács LÁ, Gáspár L, Nafz A, **Gaszner T**, Ujvári B, Kormos V, Csernus V, Hashimoto H, Reglődi D, Gaszner B. Construct and face validity of a new model for the three-hit theory of depression using PACAP mutant mice on CD1 background. Neuroscience. 2017. 354:11-29. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.04.019.

IF: 3,308

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. 330:335-58. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.06.004.

IF: 3,277

Kormos V, Kecskés A, Farkas J, **Gaszner T**, Csernus V, Alomari A, Hegedüs D, Renner É, Palkovits M, Zelena D, Helyes Z, Pintér E, Gaszner B. Peptidergic neurons of the Edinger-Westphal nucleus express TRPA1 ion channel that is downregulated both upon chronic variable mild stress in male mice and in humans who died by suicide. J Psychiatry Neurosci. 2022. 47(3):E162-E175. doi: 10.1503/jpn.210187.

IF (2021): 5,699

Ujvári B, Pytel B, Márton Z, Bognár M, Kovács LÁ, Farkas J, **Gaszner T**, Berta G, Kecskés A, Kormos V, Farkas B, Füredi N, Gaszner B. Neurodegeneration in the centrally-projecting Edinger-Westphal nucleus contributes to the non-motor symptoms of Parkinson's disease in the rat. J Neuroinflammation. 2022.19(1):31. doi: 10.1186/s12974-022-02399-w.

IF: (2021): 9,549

A disszertáció alapját nem képező egyéb közlemények összesített impakt faktora: 21,833

11. Előadások jegyzéke

Gaszner T, Kovács LÁ, Bodnár G, Gaszner B. A nucleus raphe dorsalis szerotininerg neuronjainak működése a depresszió három találat elmélet modelljében. Doktorandusz workshop, 2015, Pécs.

Gaszner T, Kovács LÁ, Bodnár G, Gaszner B. A nucleus raphe dorsalis szerotininerg neuronjainak működése a depresszió három találat elmélet modelljében. Amerikai Magyar Orvosszövetség Balatonfüredi konferenciája. 2015, Balatonfüred.

Gaszner T, Farkas J, Kovács LÁ, Füredi N, Ujvári B, Gaszner B. Szerotoninerg, extrahypothalamikus CRF expresszáló és urocortin tartalmú neuronok vizsgálata a depresszió három találat elméletének egérmódeljében. Magyar Neuroendokrin Szimpózium, 2016, Szeged.

Gaszner T, Farkas J, Kun D, Kovács LÁ, Füredi N, Ujvári B, Gaszner B. A depresszió három találat elmélet egérmódeljének prediktív validitása a limbikus agyterületek neuronális aktivitásának tükrében. Szenthágothai Idegtudományi központ éves TDK-PhD konferenciája, 2018, Pécs.

Gaszner T, Farkas J, Kun D, Kovács LÁ, Füredi N, Ujvári B, Kormos V, Gaszner B. Predictive validity of the three hit theory of depression in light of activity of limbic brain territories. Pécs-Osijek TDK-PhD conference, 2019, Pécs.

Gaszner T, Farkas J, Kun D, Kovács LÁ, Füredi N, Ujvári B, Kormos V, Gaszner B. Predictive validity of the three hit theory of depression underlines the role of epigenetics. International PhD conference, 2019, Hradec Kralove.

Gaszner T, Farkas J, Kun D, Kovács LÁ, Füredi N, Ujvári B, Kormos V, Gaszner B. Limbic neuronal activity mapping supports the predictive validity of three hit theory of depression in PACAP hereozygous mice. Annual international meeting on VIP, PACAP and related peptides. 2019, Los Angeles.

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönet elsősorban témavezetőmet és egyben mentoromat, Dr. Gaszner Balázst illeti, a kezdő TDK-hallgató korom óta nyújtott –éjszakát, hétvégét és úgy egyáltalán szabadidőt nem ismerő-segítségéért, tanácsaiért, példaértékű kutatói attitűdjéért, oktatói iránymutatásáért, őszinte és segítőkritikáiért. Külön hálás vagyok neki végletekig oldott és közvetlen stílusáért, mellyel a hagyományos mester-tanítvány viszonyt újraértelmezve, produktív és inspiráló légkört hozott létre. Ezeken felül köszönöm fáradhatatlan és precíz munkáját a statisztikai analízisben és az ábraanyag szerkesztésében.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Reglődi Dórának, a doktori iskola vezetőjének, aki egyben az intézetünk vezetője is: támogatásáért, iránymutatásáért és a PACAP gényiányos egerekhez való hozzáférés biztosításáért.

Köszönet illeti kutatócsoportunk minden tagját. Név szerint elsősorban Dr. Farkas Józsefet, akinek az állatkísérletek során végzett munkája nélkül ezen értekezés nem jöhetett volna létre. Köszönöm TDK-hallgatónak, Dr. Kun Dánielnek és kollégámnak Dr. Ujvári Balázsnak a szövettani képek kiértékelésénél nyújtott segítségüket. Köszönet illeti Dr. Kormos Viktóriát, Dr. Füredi Nórát és Dr. Kovács László Ákost munkájukért az állatkísérletek és a szövettani feldolgozás során. Szeretném köszönetemet kifejezni Prof. Dr. Csernus Valérnak, a kortikoszteron mérésekért. Köszönöm asszisztensnőinknek, Orbán Izabellának és Godáné Brumán Beatrixnak áldozatos munkájukat.

Hálás köszönettel tartozom családomnak: Feleségemnek, Leányomnak, Szüleimnek, Nagyszüleimnek és Feleségem szüleinek türelmükért és támogatásukért egyaránt.

Ezen disszertációban összefoglalt tudományos munka finanszírozásáért köszönet illeti támogatókat: Innovációs és Technológiai Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alap, (projektazonosítók: TKP2021-EGA-16 és 2020-4.1.1-TKP2020, pályázati kódok TKP2021-EGA és TKP2020-IKA-08); valamint NKFIH (PD100706 és FK124188) továbbá a NAP 2017-1.2.1-NKP-2017-00002 és MTA-TKI14016 projektek.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Deborah Suchecki,
Federal University of São Paulo, Brazil

REVIEWED BY

Ilana Gozes,
Tel Aviv University, Israel
Sayamwong E. Hammack,
University of Vermont, United States

*CORRESPONDENCE

Balázs Gaszner
balazs.b.gaszner@aok.pte.hu

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Neuroendocrine Science,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

RECEIVED 16 July 2022

ACCEPTED 29 August 2022

PUBLISHED 23 September 2022

CITATION

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

COPYRIGHT

© 2022 Gaszner, Farkas, Kun, Ujvári,
Berta, Csernus, Füredi, Kovács,
Hashimoto, Reglődi, Kormos and
Gaszner. This is an open-access article
distributed under the terms of the
[Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is
permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original
publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

Fluoxetine treatment supports predictive validity of the three hit model of depression in male PACAP heterozygous mice and underpins the impact of early life adversity on therapeutic efficacy

Tamás Gaszner^{1,2}, József Farkas^{1,2}, Dániel Kun^{1,2},
Balázs Ujvári^{1,2}, Gergely Berta³, Valér Csernus¹, Nóra Füredi^{1,2},
László Ákos Kovács^{1,2}, Hitoshi Hashimoto^{4,5,6,7,8},
Dóra Reglődi^{1,9}, Viktória Kormos¹⁰ and Balázs Gaszner^{1,2*}

¹Department of Anatomy, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, ²Research Group for Mood Disorders, Centre for Neuroscience & Szentágotthai Research Centre, University Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, ³Department of Medical Biology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, ⁴Laboratory of Molecular Neuropharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Suita, Osaka, Japan, ⁵Molecular Research Center for Children's Mental Development, United Graduate School of Child Development, Osaka University, Kanazawa University, Hamamatsu University School of Medicine, Chiba University and University of Fukui, Suita, Osaka, Japan, ⁶Division of Bioscience, Institute for Dataability Science, Osaka University, Suita, Osaka, Japan, ⁷Transdimensional Life Imaging Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University, Suita, Osaka, Japan, ⁸Department of Molecular Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita, Osaka, Japan, ⁹ELKH-PTE PACAP Research Group Department of Anatomy, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, ¹⁰Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School & Szentágotthai Research Centre, Molecular Pharmacology Research Group, University of Pécs, Pécs, Hungary

According to the three hit concept of depression, interaction of genetic predisposition altered epigenetic programming and environmental stress factors contribute to the disease. Earlier we demonstrated the construct and face validity of our three hit concept-based mouse model. In the present work, we aimed to examine the predictive validity of our model, the third willnerian criterion. Fluoxetine treatment was applied in chronic variable mild stress (CVMS)-exposed (environmental hit) CD1 mice carrying one mutated allele of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene (genetic hit) that were previously exposed to maternal deprivation (epigenetic hit) vs. controls. Fluoxetine reduced the anxiety level in CVMS-exposed mice in marble burying test, and decreased the depression level in tail suspension test if mice were not deprived maternally. History of maternal deprivation caused fundamental functional-morphological changes in response to CVMS and fluoxetine treatment in the corticotropin-releasing hormone-producing cells of the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdala, in tyrosine-hydroxylase content of ventral tegmental area, in urocortin 1-expressing cells

of the centrally projecting Edinger-Westphal nucleus, and serotonergic cells of the dorsal raphe nucleus. The epigenetic background of alterations was approved by altered acetylation of histone H3. Our findings further support the validity of both the three hit concept and that of our animal model. Reversal of behavioral and functional-morphological anomalies by fluoxetine treatment supports the predictive validity of the model. This study highlights that early life stress does not only interact with the genetic and environmental factors, but has strong influence also on therapeutic efficacy.

KEYWORDS

central amygdala, bed nucleus of stria terminalis, centrally projecting Edinger-Westphal nucleus, ventral tegmental area, dorsal raphe nucleus

1 Introduction

The prevalence of mood disorders like major depression rises boldly affecting more than 280 million people worldwide (1). Depression encumbers society and economy besides healthcare system, being a leading cause of chronic disability. Its early onset results in a large loss of productive life-years and a fallback in educational rate (2). Notably, suicidal attempts and completed suicide are in strong association with mood disorders (3). In spite of extended efforts to reveal the etiology and pathomechanism in the last decades, we still know only some fragments of this enormous puzzle.

An unequivocally accepted animal model would be required to inquire these processes more thoroughly. Most of the studies on animal models for depression focus on monoaminergic systems (for review see: 4–6). Nowadays, pharmacotherapy is mostly based on this concept, but increasing number of data reveal, that the therapeutic response is unsatisfactory at least in 30% of cases (7, 8). This strongly presumes that beyond the monoaminergic systems other, to date unknown mechanisms also contribute to the psychopathology. In order to obtain a new preclinical tool to clarify its background, we recently created a rodent model (9, 10) based on the widely accepted three hit theory of depression which highlights the coexistence of genetic, epigenetic and environmental factors as triggers of the disease (11, 12).

Several well-described inheritable genetic alterations (e.g. dopamine-, serotonin-, GABAergic receptor mutations) increase the probability of the disease (for review see 13–15). Increasing amount of evidence suggests that pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) contributes to mood control (16, 17, for reviews see 18–22). It is known that PACAP deficiency blunts the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis function at the level of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) and adrenal cortex (23–25). Furthermore, the lack of the functional PACAP gene in knock out (KO) mice on

CD1 background results in altered stress adaptation and depression-like behavior (10, 25–29). In contrast, PACAP KO mice on C57BL/6J×129SvEv (F1 hybrid) and C57Bl/6N background show an anti-depressive phenotype (30, 31). In our previous work, we found that combined stress exposure of CD1 PACAP heterozygous (HZ) mice was a suitable model for depression (10). To the best of our knowledge, no human data are available for biallelic loss-of-function mutation in the *ADCYAP1* gene linked to depression, but the recruitment of *ADCYAP1* gene polymorphisms in stress-related mood disorders (32, 33) is known. Based on this information, we decided to use the HZ mice in our three hit model, as they possess reduced PACAP content in the brain (34). The goal of this approach was to bridge the translational abyss between genetics of animal models and human population.

According to the basic concept of the three hit theory, the second ‘hit’ affects the epigenome. A well-investigated epigenetic factor is the acetylation of histone proteins (35, 36). The acetylation pattern is regulated by the balance between histone-acetyltransferase and histone-deacetylase enzyme families (37). Chronic variable mild stress (CVMS) affects the epigenome at the level of histone acetylation (38). Conversely, histone deacetylase inhibitor treatment mitigates depression-like behavior (39) while the response to antidepressant treatment is ameliorated (40, 41). These facts, on the one hand, suggest the potential contribution of epigenetic changes to the development of mood disorders by making the bed for later *noxae*, but also show that they alone do not trigger the disease. The epigenome is evolved mostly during vulnerable periods of life such as the postnatal period (42, 43). Exposure to significant adversities during this phase increase the risk of depression in animal models (44, 45) and humans (46; for review see: 47). Therefore, we (9, 10) applied maternal deprivation for modelling the effect of early life adversities on epigenome (48; for review see: 49) as the second hit.

Prolonged exposure to environmental stress plays likely the most potent role in occurrence of mood disorders (for review see: 50, 51). The normal stress adaptation response is mainly orchestrated by the HPA axis. The dysregulation of the HPA axis is well documented both in animal models for depression (10, 52–54) and in human studies (55, 56; for review see: 57). Based on these, we tested how a third hit, the chronic variable mild stress (CVMS) model of prolonged environmental challenge affects mice carrying a mutated PACAP allele (first, genetic hit) and the history of early life adversity (second, epigenetic hit) too.

As several stress-recruited brain territories contribute to the control of the HPA axis, altered top-down regulation may contribute to the pathophysiology of depression (for review see: 58). For instance, corticotropin-releasing hormone (CRH)-containing divisions of the extended amygdala (59, 60) such as central nucleus of amygdala (CeA) and oval division of the bed nucleus of the stria terminalis (ovBNST) are involved in mood control and stress response (61–65). Interestingly, they contain PACAP (66) also and manipulation by PAC1 receptor antagonist reverses the harmful effects of stress in behavioral tests (67), and their stress reactivity is compromised in PACAP KO mice (28, 68–70). The CRH-related urocortin1 (UCN1) is primarily expressed in the centrally projecting Edinger-Westphal nucleus (cpEW) in the midbrain and these UCN1-containing cells also express PACAP mRNA (71). Their role in stress and depression models was shown in mice (10, 25, 72, 73), rats (74–77), tree shrews (62), and cpEW samples of suicide victims (73, 78) further supporting the translational value of results obtained in animal studies. Both extrahypothalamic CRH systems (79, 80) and cpEW UCN1 cells (81, 82) may interact with the serotonergic (5-HT) cells in the dorsal raphe nucleus (DR) that also show stress-induced activity (83, 84) and PACAP mRNA expression in mice (85). The high significance of serotonergic neurotransmission in mood control in the prefrontal cortex, hippocampus and amygdala is without debate (86, 87; for review see 88, 89). It is also well documented that the brain reward system and its disturbances are strongly associated with mood disorders (for review see: 90, 91). The ventral tegmental area (VTA) as the center of mesocorticolimbic dopaminergic pathway admittedly plays a crucial role in occurrence of depression (92–94).

Although the willnerian a) construct and b) face validity criteria (95) of our three hit model has already been proven (10) the primary aim of the present work was to test Willner's third, predictive validity criterion. Therefore, we hypothesized that the treatment with a standard serotonin-reuptake inhibitor (SSRI), fluoxetine in mice carrying all three hits will reverse the depression-like state. Behavioral tests, physical and endocrinological measures, as well as functional-morphological tools in forebrain CRH-, midbrain UCN1-containing, DR-serotonergic and VTA-dopaminergic systems were used to assess the neuronal activity patterns and epigenetic alterations in the three hit model.

2 Methods

2.1 Animals and experimental design

The breeding procedure of our in-house bred PACAP KO CD1 mouse strain corresponds to the previously published protocol (10). Briefly, a HZ generation was created by crossing PACAP KO and wild type (WT) mice. Then, PACAP HZ females and males were paired on the same day. Seventeen litters born within a 72 h period were used for this study. To reduce litter differences, they were cross-fostered on postnatal day (PD) 1. Ten litters were subjected to 180 min maternal deprivation (MD180) on PD1-14: pups were separated from their dams and placed to cages lined with nesting material on a heating plate (set to 32°C) to keep them warm. Seven litters were reared according to the normal protocol of the facility (animal facility rearing, AFR). The genotype of the offspring was determined by polymerase chain reaction (PCR) using tail clipping samples collected on PD 70 (for further details on genotyping see 28).

Since we had previously found that in our three hit concept-based model PACAP HZ mice are ideal to use (10), we did not examine PACAP KO and WT offspring in this study. Seventeen and twenty-five male HZ mice were identified by PCR in the AFR and MD180 main groups, respectively. Four subgroups were created both in the AFR (groups were marked by a-d in the figures throughout) and MD180 subgroups (groups e-h) as shown in Figure 1. Four subgroups were exposed to CVMS (i.e. groups c, d and g, h) between PD125-PD139 vs. four control subgroups (groups a, b and e, f) that did not experience stress exposure. Half of the subgroups was treated daily by intraperitoneal (ip) fluoxetine (20 mg/kg/day in 0.2 ml saline) injections (group b, d, f, h) vs. physiological saline (0.2 ml vehicle)-injected subgroups (group a, c, e, g; see also Figure 1) for two weeks based on our earlier work (25). The injection site in the abdominal wall was changed daily to reduce tissue damage. The CVMS paradigm comprised mid-day (tilted cage, dark room, shaker) and overnight (wet bedding, social isolation, group holding) challenges as published previously (9, 10). Bodyweight of animals was measured on the first and on every fourth day of stress period at the time of injection procedure.

Animals were kept in standard size (30 x 30 x 28 cm) polycarbonate cages (4-5 mice per cage) on controlled temperature (24°C) and humidity (50%) with 12-hour light-dark periods (lights turned off at 6 pm) at the animal facility of Department of Anatomy, University of Pécs. *Ad libitum* access to standard rodent chaw and drinking water were provided. The wood chips litter was changed every other day.

In vivo experimental procedures were permitted by the National Food Chain Safety Office in Hungary (license number: BA02/2000-39/2016). The license was given based on the scientific approvals of the Animal Welfare Committee at

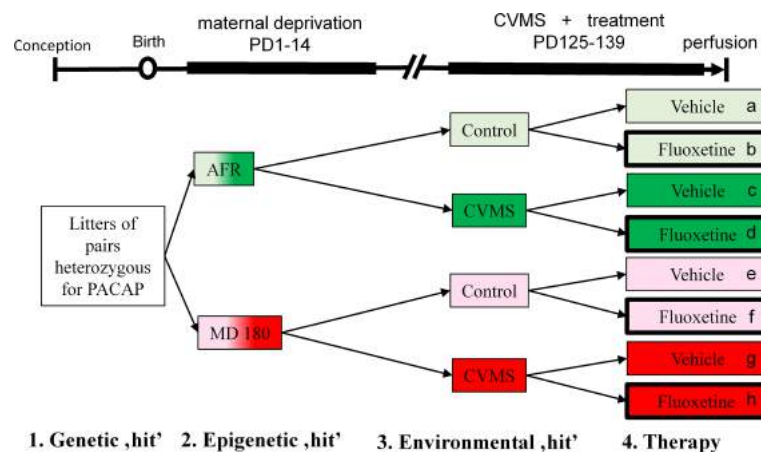


FIGURE 1

Experimental setup and timeline. Lettering (a-h) and corresponding color codes (green: animal facility-reared (AFR) groups, red: groups with history of maternal deprivation, MD180) as well as thick black frames (symbolizing fluoxetine treatment) were used to refer to the same groups throughout the text and other figure diagrams. Control (light shades) and chronic variable mild stress (CVMS)-exposed (dark shades) groups were further divided into vehicle- and fluoxetine-treated subgroups. PD, postnatal day.

Pécs University and the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation in Hungary.

2.2 Behavioral tests

In total four tests were conducted in the same order in all groups as published earlier (9, 10). Light dark box (LDT) and marble burying tests (MBT) were used to assess the anxiety level. Tail suspension (TST) and forced swim tests (FST) were carried out to assess depression-like behavior. After each test, animals were placed back to their original cages. All behavioral tests were evaluated by an experienced person who was not informed about the identity of animals.

2.2.1 Light-dark box test

The 40x20x27 cm box was separated into two equal compartments by a non-transparent wall with a 7x7 cm aperture. One side of the device was painted white and brightly illuminated (300 lux), while the other compartment was black-walled and dim (96). Mice were placed into the lit compartment facing to the aperture and videotaped for 5 min. We evaluated the time spent in dark compartment, number of transitions between compartments and the number of aborted transitions.

2.2.2 Marble burying test

Animals were placed individually into cages (30x30x28 cm) with 24 colored marbles scattered on the surface of fresh woodchips bedding. Mice were allowed to explore the marbles for 30 min in a cage with 40 lux light intensity. The number of

hidden marbles (i.e. embedded to their 2/3 into the nesting material) was registered to evaluate the anxiety level of animals (10, 97).

2.2.3 Tail suspension test

Mice were suspended for 6 minutes on their tails 50 cm above a table by adhesive tape in a light room (100 lux). Cumulative time spent immobile was registered in the last 4 minutes of the video recordings (10, 98).

2.2.4 Forced swim test

Mice were placed into glass cylinders (diameter: 11.5 cm; height: 25 cm) filled by 23°C tap water till the level of 19 cm based on the original description of Porsolt et al. (99) later modified by Ghasemi et al. (100). Total immobility time was evaluated in the last 4 min period of a 6 min swimming (10) test, recorded in a light room (100 lux).

2.3 Perfusion and sample preparation

On PD140 between 9 am and 12 pm, all animals were euthanized by urethane injection (ip; 2.4 mg/kg). All animals of a cage were injected within 2 minutes. Unconscious mice were weighed and after opening the thorax, 1 ml left ventricular blood samples were collected into syringes previously filled with 50 µl 7% (w/w) EDTA solution to prevent clotting. Then, *via* the opened left ventricle, a cannula was introduced into the aorta to perfuse the animals with 20 ml of ice-cold 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) followed by 150 ml 4% paraformaldehyde solution in Millonig buffer (pH 7.4). The

right atrium was opened to allow the passage of fluids through the systemic circulation.

Blood samples were centrifuged for 5 min at 3000 rpm, and plasma supernatants were collected and stored at -20°C for corticosterone (CORT) radioimmunoassay. After perfusion, thymus and suprarenal glands were removed and weighed. Brains were dissected and postfixed at 4°C for 72 hours. Coronal sectioning was performed using a vibratome (Leica VT1000 S, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Four series of 30µm sections were collected and stored in anti-freeze solution (20% ethylene glycol, 30% glycerol and 0.1 M sodium phosphate buffer) at -20°C until labeling.

2.4 Histology

2.4.1 Free floating double-label immunofluorescence for CRH-FOSB (ovBNST and CeA), UCN1-FOSB (in cpEW), 5-HT-FOSB (in DR) and TH-FOSB (in VTA)

The FOSB protein is a product of the *Fosb* gene, member of the Finkel-Biskis-Jenkins murine sarcoma virus-related cellular oncogene family and it is a commonly applied marker of chronic neuronal activity (101). Sections of the brain regions to be studied were manually selected based on the mouse brain atlas by Paxinos and Franklin (102). Sections containing the ovBNST (between Bregma [Br] +0.35mm to -0.15mm) CeA (Br -1.45mm to -1.95mm), VTA (Br -2.15mm to -2.65mm), cpEW (Br -3.2mm to -3.8mm) and DR (Br -4.35mm to -4.85mm) were selected.

After removal of antifreeze solution by 6 x 10 min PBS washes, heat-induced antigen retrieval in citrate buffer solution (90°C, pH 6, 10 min) was applied. Then, 60 min 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) treatment permeabilized cell membranes. Non-specific binding sites were blocked for 60 min by normal donkey serum (NDS, Jackson ImmunoResearch, Europe Ltd., Suffolk, UK) diluted in PBS to 5% for CRH-FOSB labeling and to 2% for UCN1-FOSB, 5-HT-FOSB and TH-FOSB staining procedures. Subsequently, sections were moved into the cocktail of primary antibodies solved in NDS: rabbit anti-FOSB diluted to 1:250 (Santa Cruz, sc-48, RRID:AB_631515, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz CA, USA) combined with a) goat anti-CRH diluted to 1:150 (Santa Cruz, sc-1759; RRID: AB_631300) for 72 h at 4°C, b) goat anti-UCN1 diluted to 1:175 (Santa Cruz, sc-1825; RRID: AB_2304014) for 48 h at 4°C, c) mouse monoclonal anti-5-HT in 1:10.000 dilution (gift from Dr. Lucienne Léger, Université Claude Bernard, Lyon, France; RRID: AB_2313872) for 48 h at 4°C, or monoclonal mouse anti-TH (1:1000, Sigma-Aldrich; RRID:AB_477569) for 16 h at 4°C. After 2 x 15 min PBS washes, sections were placed into the mixture of secondary antibodies also solved in PBS with NDS. Cyanine 3 (Cy3)-conjugated donkey anti-goat serum (1:800, Jackson ImmunoResearch; RRID:AB_2340411) was used to label FOSB in all cases. To this, in order to visualize CRH immunoreaction, a biotinylated donkey anti-goat antiserum (1:1000, Jackson

ImmunoResearch; RRID:AB_2340397) for 24 h at 4°C was added. Following 2 x 15 min PBS washes sections were transferred into a solution of Cyanine 5 (Cy5)-conjugated streptavidin (1:1000, Jackson ImmunoResearch; RRID:AB_2337245) in PBS for 3 hours. For the UCN1 labeling, Alexa 488-conjugated donkey anti-goat (1:200, Jackson ImmunoResearch; RRID:AB_2336933), for 5-HT and TH, Alexa 488-conjugated donkey anti-mouse (1:500, Jackson ImmunoResearch; RRID:AB_2341099) secondary antisera were added for 3 hours. Finally, sections were rinsed in PBS for 2 x 15 min, mounted on gelatin-covered slides, air-dried and ultimately covered with 50% glycerol dissolved in PBS.

2.4.2 Free floating immunocytochemistry for acetyl-lysine H3 histone protein by diamino-benzidine

After 4x15 min PBS washes to remove fixative and anti-freeze solution, sections were permeabilized for 60 min in 0.5% Triton X-100 solution. Normal goat serum (NGS, Jackson ImmunoResearch, 2%, in PBS) was used to block non-specific binding sites. Then, sections were moved into a solution of anti-acetyl-lysine 9 H3 histone antibodies (1:4000, Sigma-Aldrich; Cat# SAB4500347; RRID:AB_10742909) and incubated overnight at room temperature. After 2 x 15 min PBS rinses, sections were treated with biotinylated goat anti-rabbit IgG solution for 60 min (1:200, Vectastain ABC Elite Kit, Vector Labs., Burlingame, CA, USA) followed by PBS rinses and incubation in peroxidase-conjugated avidin-biotin complex (Vectastain ABC Elite Kit) for 60 min. After further PBS washes, the immunoreaction was developed in Tris buffer (pH 7.4) with 0.02% 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich) and 0.0003% (w/v) H₂O₂. To optimize the signal/background ratio, the reaction was performed under visual control using a light microscope. The reaction was stopped in PBS buffer. After PBS rinses, sections were mounted on gelatin-covered slides. After air-drying and dehydration (50%, 70%, 96%, absolute ethanol, 5 min respectively), slides were moved into xylene for 2 x 10 min and covered by Depex (Fluka, Heidelberg, Germany).

2.4.3 Immunohistochemistry controls

Our CRH antibody (Santa Cruz, sc-1759) was raised against a C-terminus peptide fragment of human CRH. Based on the website of manufacturer (<http://datasheets.scbt.com/sc-1759.pdf>) specificity of the antibody was verified by Western blot. The UCN1 antibody (Santa Cruz, sc-1825) was raised against a C-terminus peptide fragment of rat UCN1, and we tested the specificity in our earlier works (10, 25). Our 5-HT antibody was generously provided by Dr. Lucienne Léger (Léger et al., 2001). This antibody was also tested in mouse brain tissue (25). The TH antibody (Sigma-Aldrich) was raised against C-terminus peptide fragment of mouse TH, its specificity was tested by Western blot based on the website of manufacturer (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t2928>). The acetyl-lysine 9 H3 histone

antibody was generated against a synthetic peptide (range of residues 3-52) containing the Lys9 acetylation site. The specificity of the serum was tested by the manufacturer in mouse tissues (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sab4500347?lang=hu®ion=HU>). The FOSB antibody (Santa Cruz, sc-48) used in this experiment was raised against a C-terminus peptide fragment of human FOSB also characterized earlier (10, 25, 38). The omission of either primary or secondary antisera or their replacement by non-immune sera resulted in no detectable labeling. The labeling was also prevented by preabsorption with the synthetic blocking peptides (10, 25).

2.5 Microscopy, digital imaging and morphometry

Study and digitalization of immunofluorescence were performed by the Olympus Fluoview 1000 confocal microscope (FV10-1000S-IX81). Images were captured by sequential scanning in photon count mode for the respective fluorophores to avoid false positive signal caused by the partial overlap of emission spectra and for detection of reliably semi-quantitative fluorescent signal. Confocal aperture settings were 80 μm , 1024 x 1024 resolution completed with a 20x objective (NA: 0.75). Excitation and emission spectra of the fluorophores were selected by applying the built-in settings of Fluoview software. To excite the dyes, the following laser beam wavelength were used: for Alexa Fluor 488, 488 nm; for Cy3, 550 nm; for Cy5, 670 nm. After scanning, pictures of channels were saved and stored both individually and superimposed using virtual red and green colors for evaluation of co-localizing fluorescent signals.

Cell counting was performed manually on non-edited images by an experienced observer who was blinded to the identity of files. Cell counts were averaged from five digital images per brain areas recorded bilaterally in the ovBNST, CeA and VTA, observing the entire territory of the respective nuclei. Considering the anatomical localization of the cpEW and DR, the evaluations were performed in the entire cross section areas next to the midline.

Intensity of immunofluorescence was measured by ImageJ software (v1.42, NIH, Bethesda, MD) evaluating 10 perikarya for CRH, UCN1, 5-HT or TH in 5 non-edited sections by manually selecting cytoplasmic areas in captures of the corresponding channel. The cytoplasmic signal density was corrected for the background signal. The latter was quantified in immunonegative territories selected randomly close to the immunoreactive cells. The calculated specific signal density (SSD) was expressed in arbitrary units (a.u.).

DAB-labeled acetyl-lysine H3 immunohistochemistry was evaluated and digitalized by a Nikon Microphot FXA microscope using a Spot RT camera (Nikon, Tokyo, Japan). Five sections of each brain area per mouse were captured. The count of marked nuclei was evaluated by manual cell counting

considering the whole cross section surface area of ovBNST, CeA, cpEW, DR and VTA.

For publication purposes, selected representative images were contrasted by Photoshop software (Adobe, San Jose, CA).

2.6 Statistics

Statistical analysis was performed by Statistica software (v8.0; Statsoft, Tulsa, OK, USA). All data were expressed as mean and as standard error of the mean. Data beyond the two sigma range were excluded from the assessment. Normality of data was tested by Shapiro-Wilk test (103) while homogeneity of variance was evaluated by Bartlett's Chi-square test (104). Data were subjected to multifactorial analysis of variance (MANOVA) followed by Tukey's *post hoc* tests ($\alpha < 5\%$). To reveal deeper connection of datasets Spearman's rank correlation test was performed.

3 Results

3.1 Validity of our model

3.1.1 Bodyweight change

The animals' bodyweight change was used as an indicator of stress efficacy. MANOVA revealed the main effect of maternal care on bodyweight change in the second week of CVMS significant ($F_{1,32} = 7.61$; $p < 0.01$). Additionally, significant second order effects as maternal care x treatment ($F_{1,32} = 4.27$; $p < 0.05$); stress x treatment ($F_{1,32} = 6.8$; $p < 0.02$) and a third order interaction ($F_{1,32} = 4.36$; $p < 0.05$) of maternal care, treatment and stress were recorded. Based on *post hoc* tests, CVMS exposure resulted in blunted bodyweight gain that was reversed by fluoxetine treatment in AFR mice (see Figure 2A, bar c vs. d; $p < 0.05$). In contrast, in CVMS mice with MD180 history, SSRI treatment remained ineffective on the course of bodyweight gain (Figure 2A, bar g vs. h). The difference between the bodyweight gain of stressed and treated animals with and without maternal deprivation is enormous (Figure 2A, bar d vs. h; $p < 0.01$).

3.1.2 Relative adrenal weight

MANOVA found the main effect of maternal deprivation *per se* ($F_{1,32} = 9.38$; $p < 0.01$) and the third order interaction of factors ($F_{1,32} = 4.57$; $p < 0.05$) on the adrenal weight significant. In contrast, the *post hoc* test did not detect significant differences between any pairs of groups (Figure 2C).

3.1.3 Relative thymus weight

MANOVA revealed the main effect of stress ($F_{1,34} = 4.74$; $p < 0.04$) and the triple interaction of factors ($F_{1,34} = 11.25$; $p < 0.01$) on thymus weight significant. *Post hoc* tests showed that

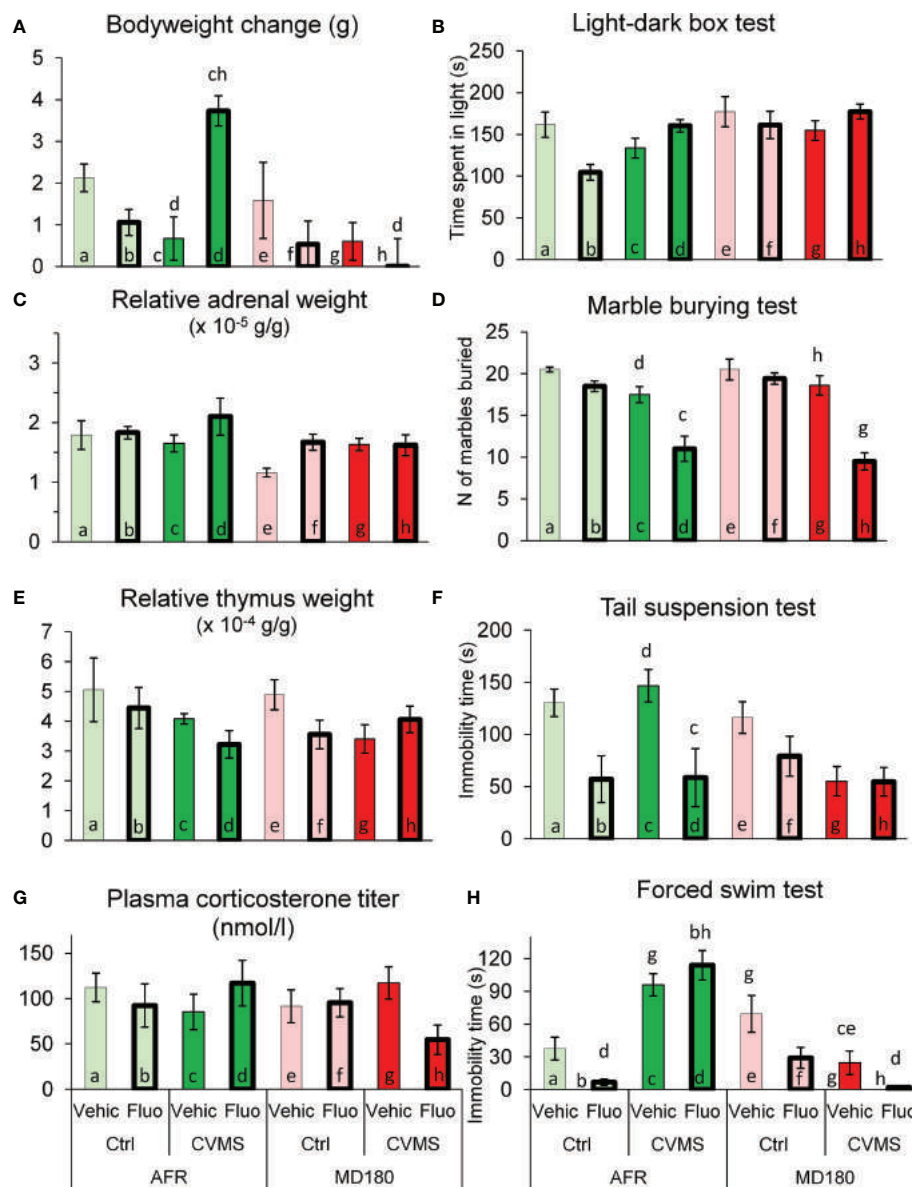


FIGURE 2

Summary of physical, endocrinological parameters and behavioral test results. (A) Bodyweight change of groups in the period of chronic variable mild stress (CVMS) between PD125 and perfusion (PD140), expressed in grams (g). (C) Relative adrenal tissue weight expressed in grams per bodyweight grams ($\times 10^{-5}$ g/g). (E) Relative thymus tissue weight corrected for bodyweight, expressed in grams per bodyweight grams ($\times 10^{-4}$ g/g). (G) Blood corticosterone titers (nmol/l). (B) Time spent in the illuminated compartment during light-dark box test expressed in seconds (s). (D) Number of marbles buried in the marble burying test. (F) Immobility time in tail suspension and (H) forced swim test, expressed in seconds (s). AFR: animal facility-reared, MD180: 180-min of maternal deprivation. Ctrl: control (i.e. not exposed to CVMS); Vehic: physiological saline; Fluo: fluoxetine. Lettering at the top of bars represents the most relevant significant *post hoc* statistical differences between pairs of groups ($p < 0.05$).

stress without a significant statistical power ($p=0.08$) decreased thymus weight in AFR fluoxetine-treated mice compared to controls (Figure 2E, bar b vs. d). Spearman’s rank correlation test supported the reliability of our CVMS paradigm highlighting the link between body and thymus weight data ($\rho=-0.36$; $p < 0.03$).

3.1.4 Corticosterone titer

The CORT titer was determined to assess the HPA-axis activity. ANOVA indicated a triple interaction of factors ($F_{1,33} = 4.97$; $p < 0.04$). Nevertheless, stressed and fluoxetine-treated animals with MD180 history showed a tendentially reduced CORT level,

compared to vehicle-treated mice (see [Figure 2G](#), bar h vs. g; $p=0.15$).

3.2 Behavioral results

3.2.1 Light-dark box test

ANOVA revealed the effect of maternal deprivation ($F_{1,33} = 7.36$; $p < 0.02$) *per se* and the interaction of stress x treatment ($F_{1,33} = 9.0$; $p < 0.01$) significant on time spent in light compartment of the box. However, the *post hoc* tests did not identify significant differences, fluoxetine-treated control, non-deprived animals spent slightly less time in the lit compartment than vehicle-administered mice (see [Figure 2B](#), bar a vs. b). In stress, this tendency was reversed ([Figure 2B](#), bar b vs. d). No differences occurred across groups with the history of maternal deprivation ([Figure 2B](#), see bars e-h).

3.2.2 Marble burying test

Effects of stress ($F_{1,32} = 52.0$; $p < 10^{-6}$), treatment ($F_{1,32} = 36.4$; $p < 10^{-5}$) and the second order interaction of stress and treatment ($F_{1,32} = 16.4$; $p < 0.001$) were indicated by the ANOVA. *Post hoc* tests showed decreased number of hidden marbles in case of stressed and fluoxetine-treated animals compared to vehicle-injected mice regardless the quality of maternal care ([Figure 2D](#), bar c vs. d; $p < 0.001$ and bar g vs. h; $p < 10^{-6}$).

3.2.3 Tail suspension test

MANOVA found the main effect of treatment ($F_{1,34} = 14.63$; $p < 0.001$) and the second order effects of maternal care x stress ($F_{1,34} = 6.1$; $p < 0.02$) as well as maternal care x treatment ($F_{1,34} = 5.62$; $p < 0.03$) significant. In mice from litters of normal maternal care, fluoxetine treatment reduced immobility time in stressed group ([Figure 2F](#), bar c vs. d; $p < 0.05$), while in controls, the effect of fluoxetine remained a tendency (bar a vs. b). In contrast, in maternally deprived offspring, the effect of fluoxetine treatment was lost, according to the *post hoc* tests.

3.2.4 Forced swim test

The quality of maternal care ($F_{1,33} = 17.6$; $p < 0.001$), the antidepressant treatment ($F_{1,33} = 13.2$; $p < 0.001$) and the interaction of maternal care and stress ($F_{1,33} = 64.4$; $p < 10^{-6}$) affected the immobility time. *Post hoc* tests revealed that CVMS exposure tendentially increased the immobility time in AFR mice ([Figure 2H](#), bar a vs. c; $p=0.11$). Fluoxetine treatment was surprisingly associated also with higher immobility time ([Figure 2H](#), bar b vs. d; $p < 0.05$). Maternal deprivation changed not only the effect of stress (compare pairs of bars a and c vs. e and g), but also the efficacy of fluoxetine treatment in stressed animals: in AFR mice, the SSRI increased, while in MD180 mice it decreased the immobility time ([Figure 2H](#), bar d vs. h; $p < 10^{-4}$). Fluoxetine treatment tendentially further reduced the already

low immobility time in maternally deprived stressed animals ([Figure 2H](#), bar g vs. h; $p=0.10$).

3.3 Morphological results

3.3.1 ovBNST

3.3.1.1 Count of CRH positive neurons

Based on MANOVA, fluoxetine treatment ($F_{1,27}=84.3$; $p < 10^{-9}$) *per se*, and the interactions of maternal care x treatment ($F_{1,27} = 5.0$; $p < 0.04$), stress x treatment ($F_{1,27} = 10.3$; $p < 0.01$) as well as a third order effect of maternal care x stress x treatment ($F_{1,27} = 7.8$; $p < 0.01$) affected the CRH neuron count in ovBNST. *Post hoc* tests revealed that SSRI treatment increased the number of CRH neurons in AFR control tendentially (see [Figure 3A](#), bar a vs. b; $p=0.06$) and significantly in stressed animals ([Figure 3A](#), bar c vs. d; $p < 0.05$) in line with a tendency in MD180 control ([Figure 3A](#), bar e vs. f; $p=0.09$) and a strong effect in MD180 stressed animals ([Figure 3A](#), bar g vs. h; $p < 10^{-3}$). The last increment is the largest since seven times more positive cells were observed after treatment. Importantly, if mice were previously exposed to maternal deprivation, the cell number of stressed animals was decreased compared to controls ([Figure 3A](#), bar g vs. e; $p < 0.01$) in contrast to AFR mice, where no change was observed ([Figure 3A](#), bar a vs. c).

3.3.1.2 Count of CRH and FOSB double positive neurons

MANOVA found significant effects of maternal care ($F_{1,27} = 5.0$; $p < 0.04$), stress ($F_{1,27} = 17.0$; $p < 0.001$), treatment ($F_{1,27} = 75.5$; $p < 10^{-8}$) and stress x treatment interaction ($F_{1,27} = 16.3$; $p < 0.001$). To point out the most relevant *post hoc* differences, we saw that fluoxetine treatment increased the CRH-FOSB cell count regardless if mice experienced normal maternal care ([Figures 3B–D](#), bar c vs. d; $p < 0.001$) or suffered MD180 ([Figure 3C](#), bar g vs. h; $p < 0.001$). Besides these differences, we cannot neglect that only 20-30% of CRH positive cells showed FOSB positivity.

3.3.1.3 Specific signal density of CRH

The main effect of quality of the maternal care ($F_{1,27} = 195.0$; $p < 10^{-13}$) and the fluoxetine treatment ($F_{1,27} = 39.6$; $p < 10^{-4}$) as well as the second order effect of maternal care x treatment ($F_{1,27} = 33.6$; $p < 10^{-4}$) and stress x treatment ($F_{1,27} = 14.1$; $p < 0.001$) were significant. According to the *post hoc* test, SSRI administration increased CRH-SSD both in control ([Figure 3E](#); bar a vs. b; $p < 0.05$) and stressed ([Figure 3E](#), bar c vs. d; $p < 10^{-3}$) mice. Interestingly, the history of maternal deprivation completely abolished the effect of fluoxetine treatment on CRH SSD in the ovBNST (compare [Figures 3F, H](#); and bars d vs. h in [Figure 3E](#); $p < 0.01$).

3.3.1.4 Count of acetyl-lysine H3 positive cells

Counting of acetyl-lysine H3 positive cells revealed that the maternal care ($F_{1,25} = 10.4$; $p < 0.01$) affected this epigenetic

marker, but *post hoc* tests did not confirm any relevant differences between pairs of groups (Figure 3G). Notably, CORT levels of animals showed significant correlation with acetylation of the histone protein in ovBNST ($p=0.51$; $p<0.01$).

3.3.2 CeA

3.3.2.1 Count of CRH positive neurons

The main effect of maternal care ($F_{1,25} = 7.1$; $p<0.02$), the second order effect of maternal care x stress ($F_{1,25} = 5.9$; $p<0.03$) as well as the third order interaction of maternal care x stress x treatment ($F_{1,25} = 16.9$; $p<0.001$) were significant. CVMS exposure in AFR animals caused an approximately three-fold elevation (Figure 4A bar a vs. c; $p<0.01$; Figures 4B, D) in the number of CeA/CRH neurons. If these stressed animals received a fluoxetine treatment, their CRH cell count was reduced (Figure 4A bar c vs. d; $p<0.05$). A completely different pattern was observable in MD180 mice, neither stress nor CVMS exposure with fluoxetine treatment had an effect on CeA/CRH cell counts.

3.3.2.2 Count of CRH and FOSB double positive neurons

MANOVA indicated the main effect of maternal care ($F_{1,25} = 7.9$; $p<0.01$), the second order effects of maternal care x treatment ($F_{1,25} = 8.1$; $p<0.01$) and stress x treatment ($F_{1,25} = 7.6$; $p<0.02$), as well as a third order effect of the three factors ($F_{1,25} = 22.2$; $p<0.0001$) on the CRH-FOSB co-localization significant. The SSRI treatment in AFR animals tendentially elevated the count of double labeled cells in the CeA (Figure 4C, bar a vs. b; $p=0.06$) while stress exerted a statistically stronger effect (Figure 4C, bar a vs. c; $p<0.01$). However, if these stressed mice received a fluoxetine treatment, their CRH-FOSB cell count decreased (Figure 4C, bar c vs. d; $p<0.01$). Compared to AFR (Figure 4C, bar a and b), maternal deprivation fully abolished the effect of SSRI treatment in control mice (Figure 4C, bar e vs. f; $p=0.33$). Similarly, if the stress exposure coincided with history of maternal deprivation, the fluoxetine treatment had no effect on CRH-FOSB cell counts in the CeA.

3.3.2.3 Specific signal density of CRH

Based on MANOVA, maternal care ($F_{1,23} = 17.5$; $p<0.001$) and interaction of stress and treatment ($F_{1,23} = 10.1$; $p<0.01$) had an effect on the CeA/CRH SSD. According to *post hoc* tests, in stressed animals SSRI treatment caused a tendentious increase of the cell density in AFR (Figure 4E, bar c vs. d; $p=0.12$) and a significant rise in previously maternally deprived (Figure 4E, bar g vs. h; $p<0.01$) mice.

3.3.2.4 Count of acetyl-lysine H3 positive cells

MANOVA revealed the main effect of SSRI treatment ($F_{1,26} = 9.5$; $p<0.01$) and the second order effects of maternal care x stress ($F_{1,26} = 7.4$; $p<0.02$) and maternal care x treatment ($F_{1,26} = 4.5$; $p<0.05$) significant. SSRI treatment caused a tendency of increase in the acetyl-lysine H3 positive cell counts in AFR controls (Figure 4G,

bar a vs. b; $p=0.09$) (Figures 4F, H) that was not detectable in animals with maternal deprivation history.

3.3.3 VTA

3.3.3.1 Specific signal density of TH

MANOVA showed a significant effect of maternal care ($F_{1,29} = 195.2$; $p<10^{-13}$) and stress ($F_{1,29} = 11.4$; $p<0.01$) on VTA/TH SSD. Significant second order impacts of maternal care x stress $F_{1,29} = 5.5$; $p<0.03$) and maternal care x treatment ($F_{1,29} = 15.1$; $p<0.001$) as well as a third order interaction of the three factors ($F_{1,29} = 18.1$; $p<0.001$) were also found. In AFR mice, fluoxetine administration reduced the TH SSD (Figure 5A, bar c vs. d; $p<0.001$) as shown by *post hoc* tests. Both control (Figure 5A, bar a vs. e; $p<0.001$) and CVMS-exposed (compare Figures 5C, E, moreover bar c vs. g; $p<0.001$ in Figure 5E) mice showed lower TH SSD if they previously underwent maternal deprivation which was not influenced by SSRI treatment. This lower TH SSD was further decreased by CVMS (Figure 5A, bar e vs. g; $p<0.05$). Interestingly, this is the opposite of that we observed in AFR mice (compare bar a and c vs. e and g).

3.3.3.2 Count of acetyl-lysine H3 positive cells

Number of acetylated H3 histone containing cells was affected by stress ($F_{1,26} = 4.8$; $p<0.04$) and treatment ($F_{1,26} = 11.5$; $p<0.01$). Maternal care *per se* had no effect, but in interactions with stress ($F_{1,26} = 18.4$; $p<0.001$) and treatment ($F_{1,26} = 6.0$; $p<0.03$) it influenced the acetyl-lysine H3 cell count. According to the *post hoc* tests, in fluoxetine-treated AFR mice, stress reduced the cell counts (Figure 5B, bar b vs. d; $p<0.01$). Maternal deprivation tendentially decreased the number of acetyl-lysine H3 positive cells (Figure 5B, bar a vs. e; $p=0.11$), which was reversed by SSRI administration in controls (Figure 5B, bar e vs. f; $p=0.05$), but not in stressed mice (compare Figures 5D, F, moreover bars d vs. h in Figure 5E; $p<0.01$). In MD180 animals following CVMS, no significant change was observed compared to controls (Figure 5B, bar e vs. g). The acetylation-increasing effect of fluoxetine remained below the level of significance in stressed MD180 mice (Figure 5B, bar g vs. h; $p=0.13$).

3.3.4 cpEW

3.3.4.1 Count of UCN1 positive neurons

The main effects of maternal care ($F_{1,30} = 5.6$; $p<0.03$), stress ($F_{1,30} = 7.3$; $p<0.02$) and treatment ($F_{1,30} = 111.7$; $p<10^{-10}$), moreover the interaction of maternal care x stress ($F_{1,30} = 4.7$; $p<0.04$) and the third order interaction of the three factors ($F_{1,30} = 6.3$; $p<0.02$) influenced the UCN1 cell count. The fluoxetine treatment decreased the cell counts in AFR control (Figure 6A, bar a vs. b; $p<0.01$), AFR stress (Figure 6A, bar c vs. d; $p<0.001$), MD180 control (Figure 6A, bar e vs. f; $p<0.001$) and also in MD180 stress (Figure 6A, bar g vs. h; $p<0.001$) groups compared to the respective vehicle controls. Animals with maternal deprivation history also showed slightly lower cell count after stress

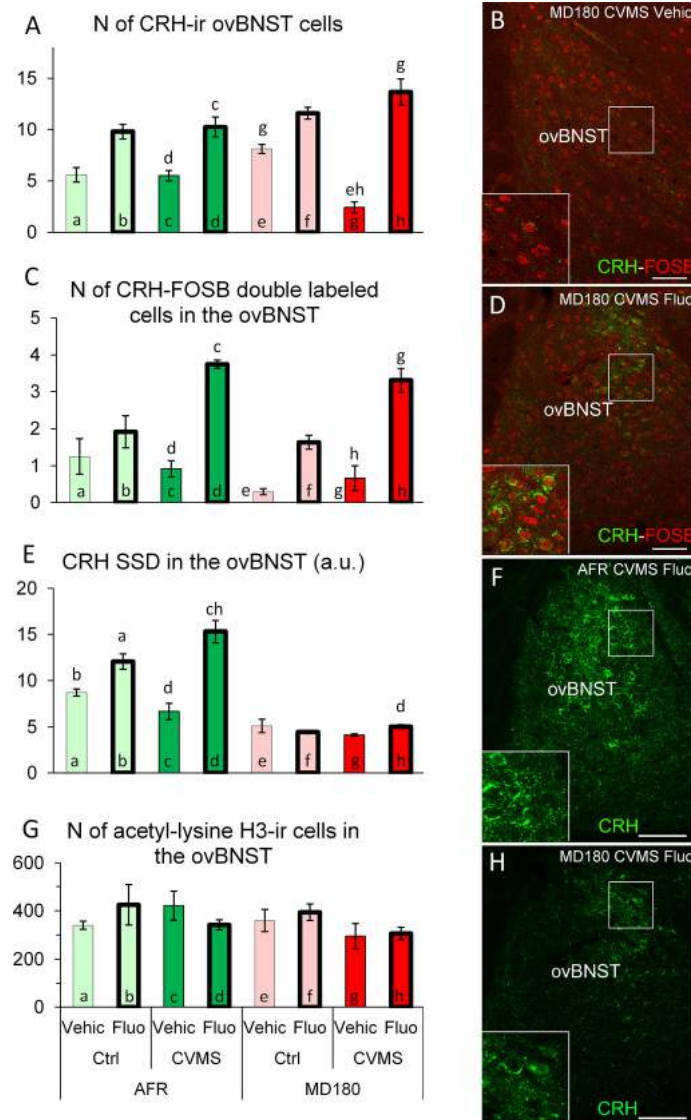


FIGURE 3 Summary of morphological results in the oval division of the bed nucleus of the stria terminalis (ovBNST). **(A)** Number (N) of corticotropin-releasing hormone (CRH)-immunoreactive (ir) cells in the ovBNST. **(C)** N of CRH/FOSB double labeled cells in ovBNST. Microphotographs **(B)** and **(D)** show CRH (green) and FOSB (red) double labeling immunofluorescence in the ovBNST. Representative images of a maternally deprived (MD180), chronic variable mild stress-exposed (CVMS), physiological saline (Vehic)-injected **(B)** and a MD180, CVMS, fluoxetine-injected (Fluo) animal **(D)**. **(E)** Specific signal density (SSD) of CRH in the ovBNST, expressed in arbitrary units (a. u.). Microphotographs of CRH (green) labeling in the ovBNST illustrate **(F)** animal facility-reared (AFR), CVMS, Fluo and an MD180, CVMS, Fluo **(H)** animals. **(G)** N of acetyl-lysine histone H3-ir cells in the ovBNST. Lettering at the top of bars represents the most relevant significant statistical differences between pairs of groups according to the *post hoc* tests ($p < 0.05$). Ctrl: control (i.e. not exposed to CVMS). Bar = 100 μ m.

(Figure 6A, bar e vs. g; $p < 0.05$), however this difference was not visible in AFR mice (compare Figure 6A, bars a and c vs. e and g).

3.3.4.2 Count of UCN1 and FOSB double positive neurons

The main effects of maternal care ($F_{1,31} = 189.1$; $p < 10^{-14}$), stress ($F_{1,31} = 4.6$; $p < 0.04$) and treatment ($F_{1,31} = 52.0$; $p < 10^{-7}$), moreover the maternal care x treatment ($F_{1,31} = 4.3$; $p < 0.05$)

interaction had significant effect on UCN1-FOSB cell counts. Fluoxetine treatment reduced the UCN1-FOSB cell counts both in control (Figure 6C, bar a vs. b; $p < 0.05$) and stressed (Figure 6C, bar c vs. d; $p < 0.001$) AFR mice. Maternal deprivation also decreased the cell count in all comparisons with the respective AFR controls (Figure 6C, bars a vs. e; $p < 0.001$, bars b vs. f; $p < 0.001$, bars c vs. g and images Figures 6B, D $p < 0.001$, moreover bars d vs. h; $p < 0.001$).

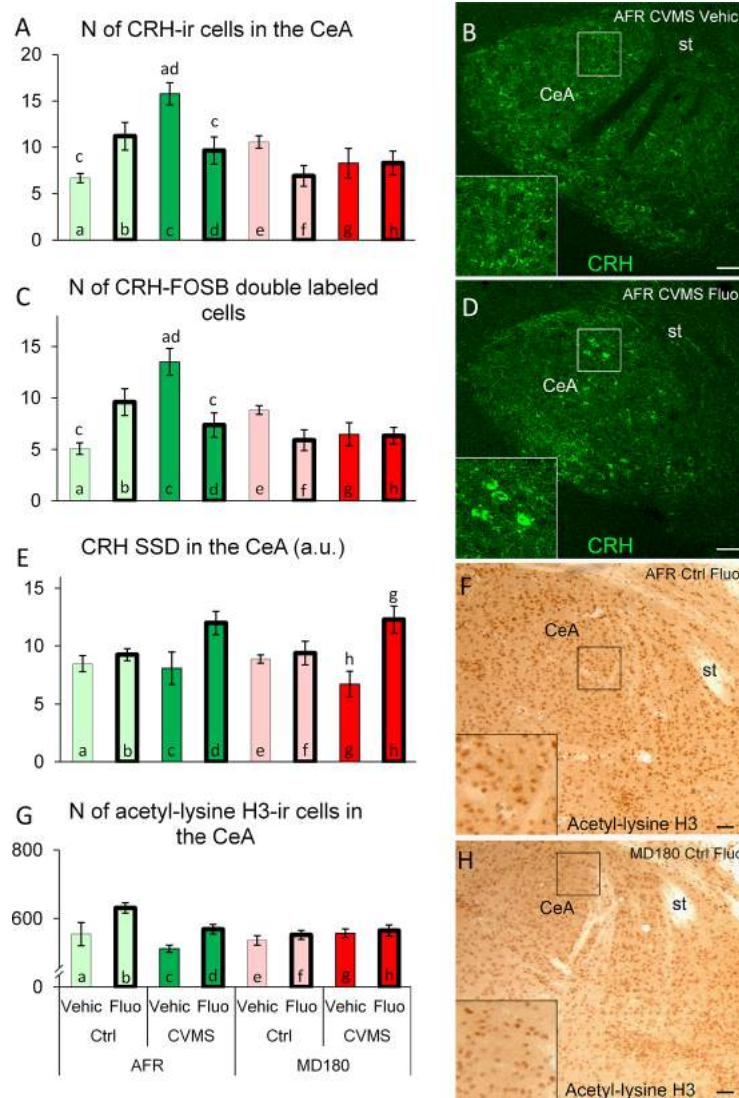


FIGURE 4 Summary of morphological results in the central nucleus of amygdala (CeA). **(A)** Number (N) of corticotropin-releasing hormone (CRH)-immunoreactive (ir) cells in the CeA. **(C)** N of CRH/FOSB double labeled cells in the CeA. Representative microphotographs of CRH (green) immunofluorescence in the CeA of an **(B)** animal facility-reared (AFR), chronic variable mild stress-exposed (CVMS), physiological saline-injected (Vehic) mouse and **(D)** an AFR, CVMS, fluoxetine injected (Fluo) animal **(D)**. **(E)** Specific signal density (SSD) of CRH in the CeA, expressed in arbitrary units (a. u.). **(G)** N of acetyl-lysine H3-ir cells in the CeA. Representative microphotographs of acetyl-lysine H3 histone immunopositive cells in the CeA of an AFR, control (Ctrl), Fluo mouse **(F)** and an MD180, Ctrl, Fluo **(H)** animal. Lettering at the top of bars represents the most relevant significant statistical differences between pairs of groups according to the *post hoc* tests ($p < 0.05$). st: stria terminalis. Bar = 100 μ m.

3.3.4.3 Specific signal density of UCN1

MANOVA revealed the main effects of examined factors [maternal care ($F_{1,30} = 51.6$; $p < 10^{-7}$), stress ($F_{1,30} = 6.8$; $p < 0.02$), treatment ($F_{1,30} = 20.5$; $p < 10^{-3}$)] and their third order interaction ($F_{1,30} = 6.4$; $p < 0.02$) significant. *Post hoc* tests showed that fluoxetine treatment in stressed AFR animals (Figure 6E, bar c vs. d; $p < 0.01$) decreased UCN1 SSD. In maternal deprivation, UCN1 SSD was reduced by 50% compared to AFR (Figure 6E, bar c vs. g; $p < 0.001$).

3.3.4.4 Count of acetyl-lysine H3 positive cells

MANOVA revealed that the first order effects of maternal care ($F_{1,26} = 80.8$; $p < 10^{-7}$) and stress ($F_{1,26} = 4.5$; $p < 0.05$), the second order impacts of maternal care x stress ($F_{1,26} = 4.7$; $p < 0.04$), maternal care x treatment ($F_{1,26} = 5.3$; $p < 0.03$), in addition, the triple interaction of factors ($F_{1,26} = 31.1$; $p < 10^{-4}$) influenced the count of acetyl-lysine H3 immunoreactive cells. According to *post hoc* tests, SSRI treatment decreased the number of acetyl-lysine H3 positive cells in AFR mice

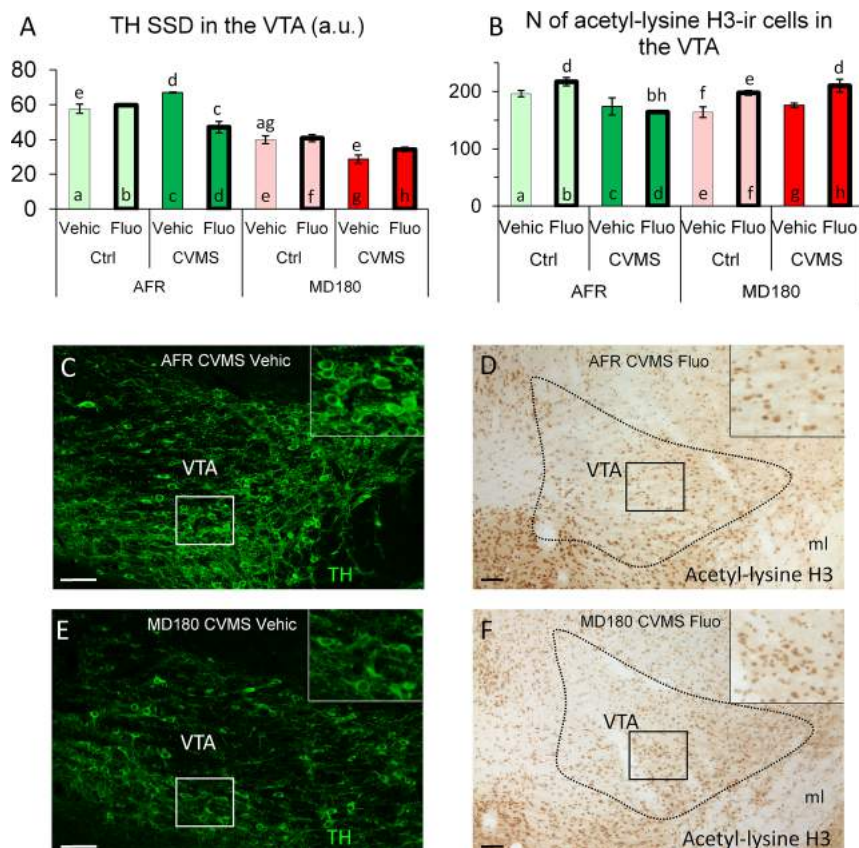


FIGURE 5

Summary of morphological results in the ventral tegmental area (VTA). (A) Specific signal density (SSD) of tyrosine-hydroxylase (TH) in the VTA, expressed in arbitrary units (a. u.). (B) N of acetyl-lysine H3 histone-immunoreactive (ir) cells in the VTA. Microphotographs of TH (green) immunofluorescence in the VTA of an animal facility-reared (AFR), chronic variable mild stress-exposed (CVMS), physiological saline-injected (Vehic) mouse (C) and a maternally deprived (MD180), CVMS, Vehic animal (E). (D, F) Microphotographs of acetyl-lysine H3 histone-ir cells in the VTA of an (D) AFR, CVMS, Fluo and an (F) MD180, CVMS, Fluo animal. Lettering at the top of bars represents the most relevant significant statistical differences between pairs of groups according to the *post hoc* tests ($p < 0.05$). Ctrl: control (i.e. not exposed to CVMS); ml: medial lemniscus. Bar = 100 μ m.

(Figure 6G, bar c vs. d; $p < 0.05$). In animals with maternal deprivation history, CVMS decreased the cell count (Figure 6G, bar e vs. g; $p < 0.01$) which is exactly an opposite effect compared to that observed in AFR groups (compare Figure 6G, bars a and c vs. e and g, as well as images Figures 6F, H). However, following fluoxetine treatment, cell counts returned to the level of non-stressed animals (Figure 6G, bar g vs. h; $p < 0.05$).

3.3.4.5 Spearman's rank correlation

Interesting correlations were found in the functional neuromorphological variables detected in the cpEW: Acetylated histone protein cell count of cpEW showed strong positive correlations with CRH density in ovBNST ($\rho = 0.56$; $p < 0.01$), with UCN1-FOSB double positive cell count ($\rho = 0.74$; $p < 10^{-4}$) and with UCN1 density ($\rho = 0.64$; $p < 10^{-3}$) in cpEW.

3.3.5 DR

3.3.5.1 Count of 5-HT positive neurons

MANOVA detected a significant main effect of stress ($F_{1,25} = 26.1$; $p < 10^{-3}$) and treatment ($F_{1,25} = 29.0$; $p < 10^{-3}$), moreover maternal care \times treatment ($F_{1,25} = 66.4$; $p < 10^{-7}$) and a third order interaction of the three factors ($F_{1,25} = 11.5$; $p < 0.01$) also impacted the count of DR/5-HT neurons. *Post hoc* tests revealed that among AFR animals, stress reduced the cell count (see Figure 7A, bar a vs. c; $p < 0.05$) (Figures 7B, D) which difference disappeared if SSRI was administered (Figure 7A, bar a vs. d; $p = 0.99$). Fluoxetine treatment reduced the number of 5-HT neurons in MD180 mice (Figure 7A, bar e vs. f; $p < 0.01$). Stress had no further effect in MD180 mice, however treatment strongly decreased the number of 5-HT positive neurons in stressed animals with maternal deprivation history (Figure 7A, bar g vs. h; $p < 0.001$). Maternal deprivation, therefore, reversed the effect of SSRI

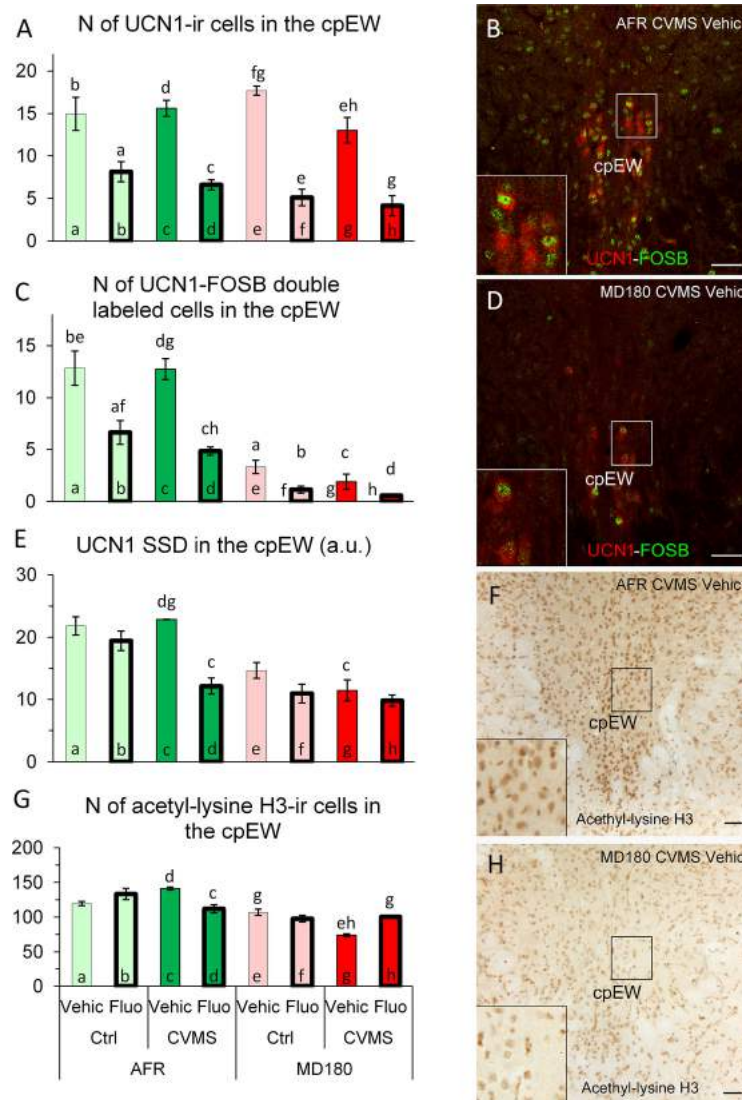


FIGURE 6

Summary of morphological results in the centrally projecting Edinger-Westphal nucleus (cpEW). (A) Number (N) of urocortin1 (UCN1)-immunoreactive (ir) cells in the cpEW. (C) N of UCN1/FOSB double labeled cells in the cpEW. (B, D) Representative microphotographs of UCN1 (green) and FOSB (red) double labeling in the cpEW of an (B) animal facility-reared (AFR), chronic variable mild stress-exposed (CVMS), physiological saline-injected (Vehic) and a (D) maternally deprived (MD180), CVMS, Vehic animal. (E) Specific signal density (SSD) of UCN1 in the cpEW, expressed in arbitrary units (a. u.). (G) N of acetyl-lysine H3 histone-ir cells in the cpEW. (F, H) Representative microphotographs of acetyl-lysine H3 histone immunopositive cells in the cpEW of an (F) AFR, CVMS, Vehic mouse and an (H) MD180, CVMS, Vehic animal. Lettering at the top of bars represents the most relevant significant statistical differences between pairs of groups, according to the *post hoc* tests ($p < 0.05$). Ctrl: control (i.e. not exposed to CVMS); Bar = 100 μ m.

treatment in stressed animals (compare Figure 7A, bars c and d vs. g and h).

3.3.5.2 Count of 5-HT and FOSB double positive neurons

Examining the cell count by MANOVA neither FOSB, nor 5-HT and FOSB double positive neurons showed significant effect at any of the factors or their interactions.

3.3.5.3 Specific signal density of 5-HT

MANOVA indicated the main effect of stress ($F_{1,25} = 11.9$; $p < 0.01$) on 5-HT SSD in the DR. *Post hoc* tests did not identify any significant differences between pairs of groups (Figure 7C).

3.3.5.4 Count of acetyl-lysine H3 positive cells

MANOVA revealed a significant effect of maternal care x treatment ($F_{1,28} = 6.6$; $p < 0.02$) and the third order effect of

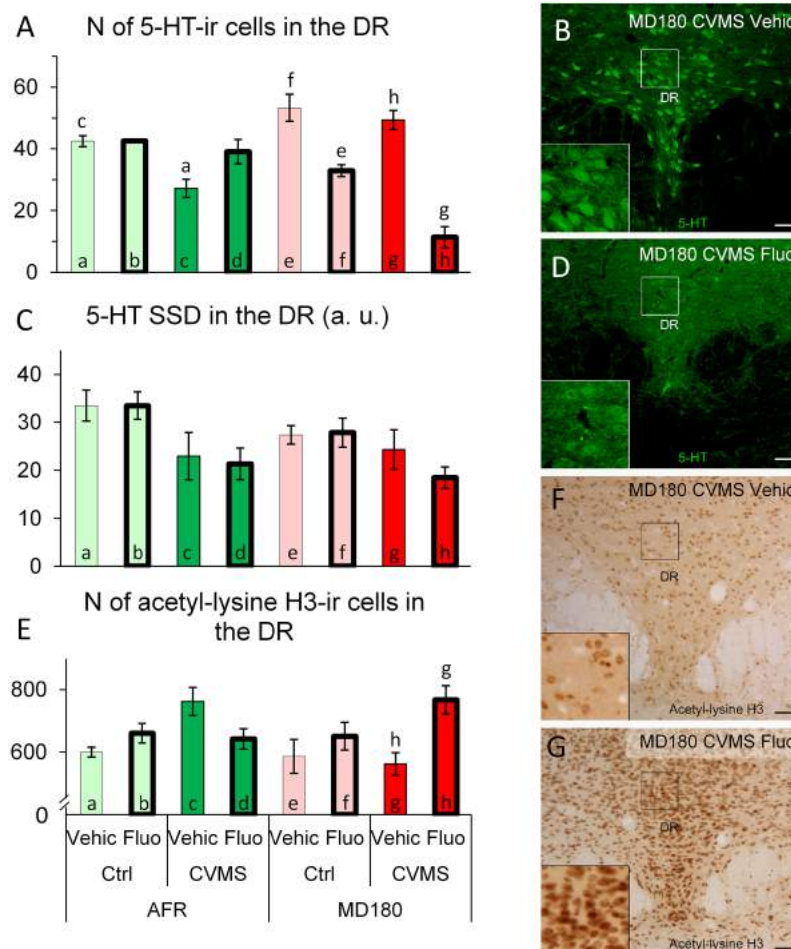


FIGURE 7 Summary of morphological results in the dorsal raphe nucleus (DR). **(A)** Number (N) of serotonin (5-HT)-immunoreactive (ir) cells in the DR. **(C)** Specific signal density (SSD) of 5-HT in the DR, expressed in arbitrary units (a. u.). Microphotographs of 5-HT (green) labeling in the DR of a **(B)** maternally deprived (MD180), chronic variable mild stress-exposed (CVMS), physiological saline-injected (Vehic) and an **(D)** MD180, CVMS, fluoxetine-injected (Fluo) animal. **(E)** N of acetyl-lysine H3 histone-ir cells in the DR. **(F, G)** Microphotographs of acetyl-lysine H3 histone positive cells in the DR of **(F)** an MD180, CVMS, Vehic mouse and an MD180, CVMS, Fluo **(G)** animal. Lettering at the top of bars represents the most relevant significant statistical differences between pairs of groups according to the *post hoc* tests ($p < 0.05$). Ctrl: control (i.e. not exposed to CVMS); Bar = 100 μm .

maternal care x stress x treatment ($F_{1,28} = 6.3$; $p < 0.02$) interaction on acetyl-lysine H3 immunoreactivity significant. *Post hoc* tests represented that count of acetylated H3 histone-containing cells was higher in stressed MD180 mice following SSRI treatment (Figure 7E, bar g vs. h $p < 0.05$; Figures 7F, G).

3.3.5.5 Spearman's rank correlation

Acetylation of histone H3 in the DR correlated positively with CRH positive ($\rho = 0.47$; $p < 0.01$) and CRH-FOSB double positive cell count ($\rho = 0.46$; $p < 0.01$) in ovBNST. While the correlation was negative with the number of UCN1 positive neurons in cpEW ($\rho = -0.46$; $p < 0.01$) and the count of 5-HT positive cells of DR ($\rho = -0.40$; $p < 0.04$).

3.4 Correlation between behavioral and morphological observations

Time spent in the lit compartment during LDT showed negative correlation with histone acetylation of CeA ($\rho = -0.40$; $p < 0.02$). MBT-anxiety level correlated with cpEW/UCN1 ($\rho = 0.36$; $p < 0.03$), 5-HT/DR ($\rho = 0.41$; $p < 0.02$) cell counts, and with 5-HT/DR SSD ($\rho = 0.59$; $p < 0.001$). Moreover, a negative correlation of anxiety level with ovBNST CRH/-FOSB cell count ($\rho = -0.54$; $p < 0.001$) and with CRH/CeA SSD ($\rho = -0.58$; $p < 0.001$) was detected.

TST immobility time correlated negatively with the CRH/ovBNST cell count ($\rho = -0.46$; $p < 0.01$) and positively with the

UCN1/cpEW cell number ($\rho=0.46$; $p<0.01$). FST immobility time showed a strong negative correlation with histone acetylation of VTA ($\rho=-0.57$; $p<0.001$) and a similarly strong, but positive connection with the bodyweight change ($\rho=0.54$; $p<0.001$).

4 Discussion

4.1 Validity of our model

After testing the construct and face validity (10) of our animal model for the three hit theory of depression, here we aimed at investigating the third predictive validity criterion by Willner (95). Compared to our previous studies (9, 10) we

supplemented the experimental setup with a cohort of fluoxetine-treated PACAP HZ mice to test if the animals showing depression-like phenotype and carrying all three ‘hits’ respond to the SSRI treatment. With this strategy, we have successfully reproduced the results supporting the construct and face validity criteria by assessment of physical parameters and behavioral tests and we have also verified (Table 1) the predictive validity of our model.

The efficacy of CVMS was supported by the flattened bodyweight gain curve (Figure 2A) in the second week of the stress period. This is in line with our data (10, 25) and others’ earlier results (105–108; for review see: 6). Epigenetic alterations were associated with decreased bodyweight gain, which is also in agreement with other animal (109) and human studies (110). This supports our successful intervention in the early life

TABLE 1 Summary of maternal deprivation effects on stress and treatment.

			AFR		MD180	
			Stress	Treatment	Stress	Treatment
HPA axis response	Physical parameters	Bodyweight gain	●	●	●	●
		Adrenal weight	●	●	●	●
		Thymus weight	●	●	●	●
	Endocrine parameter	CORT	●	●	●	↓
Behavioral tests	anxiety	MBT	●	↓	●	↓
		LDT	●	●	●	●
	depression level	FST	↑	●	↓	↓
		TST	●	↓	↓	●
Morphology	ovBNST	CRH+	●	↑	↓	↑
		Coloc with FOSB	●	●	●	↑
		CRH SSD	●	↑	●	●
	CeA	CRH+	↑	↑	●	●
		Coloc with FOSB	↑	↑	●	●
		CRH SSD	●	●	●	●
	VTA	Histone	●	↑	●	●
		TH SSD	↑	●	●	●
		Histone	●	●	↑	●
	cpEW	UCN1+	●	↓	↓	↓
		Coloc with FOSB	●	↓	●	↓
		UCN1 SSD	●	●	●	●
	DR	Histone	↑	●	↓	●
5-HT		↓	●	●	↓	
5-HT SSD		↓	●	●	●	
		Histone	●	●	●	●

Yellow: effect of stress OR treatment was affected by maternal deprivation. Red cells: maternal deprivation affected BOTH stress AND treatment effects. Dark background refers to paradoxical/maladaptive changes. ↑ increase, ↓ decrease, ● no effect according to the post hoc tests. Within the main category ‘AFR’, in the ‘Stress’ column, the AFR control vehicle group was compared with the AFR stress vehicle group. In ‘Treatment’ column, the AFR control vehicle group was compared with AFR control fluoxetine animals. In the main category ‘MD180’, in the ‘Stress’ column, the MD180 control vehicle group was compared with the MD180 stress vehicle group. In ‘Treatment’ column, the MD180 control vehicle group was compared with MD180 control fluoxetine animals. AFR, animal facility-reared; MD180, maternally deprived; HPA axis, hypothalamus-pituitary-adrenal axis; ovBNST, oval division of bed nucleus of stria terminalis; CeA, central nucleus of amygdala; VTA, ventral tegmental area; cpEW, centrally projecting Edinger-Westphal nucleus; DR, dorsal raphe nucleus; CORT, corticosterone titer; MBT, marble burying test; LBD, light-dark box test; FST, forced swim test; TST, tail suspension test; CRH+, corticotropin-releasing hormone immunopositive cell count; SSD, specific signal density; Coloc with FOSB, histological co-localization of the given antigen and FOSB; TH, tyrosine-hydroxylase, UCN1+: count of urocortin1 immunoreactive cells, 5-HT+: count of serotonin immunoreactive cells, Histone: acetyl-lysine H3 histone immunoreactivity.

establishment of epigenetic programming in our animals. In order to prove this experimentally, we expanded our morphological work with the quantitation of an epigenetic marker, acetyl histone H3.

Relative adrenal weight and thymus data further supported the overall effectiveness of maternal deprivation as stressor as shown by ANOVA, even though the *post hoc* tests did not detect significant difference between the pairs of groups that is in line with findings in a maternal deprivation model (111). This might have required a longer stress period (112–114) but the animals' individual stress sensitivity may have also abolished the significance in some cases (115).

However, after maternal deprivation and stress, SSRI treatment slightly decreased the CORT level, this was statistically not significant. It is known from animal (116) and human (117) data that the over-activity of the HPA axis may be normalized by antidepressants. Since the HPA axis over-activity (118, 119) is characteristic only for a subpopulation of depressed patients, an intervention into the HPA axis offers remarkable therapeutic advantage only in this group of cases (120). In this experiment, mice underwent an anesthesia before the perfusion procedure. The acute stress effect on the CORT titer might have caused a relatively large error of CORT data abolishing significant differences. On the other hand, a longer period of SSRI treatment could have induced a larger effect, however the we found in a similar experimental setup (25) that in two weeks the anti-depressive effect is already well detectable.

4.2 Behavioral considerations

Results of MBT obviously support the predictive validity of our model because regardless the quality of maternal care, fluoxetine treatment effectively reduced the anxiety level of stressed animals. The anxiety-reducing effect of fluoxetine in MBT was not detected in the AFR control group. This is in line with earlier results suggesting a slight anxiogenic effect of fluoxetine administration in non-stressed mice (121). In agreement with this, fluoxetine reduced the anxiety level of stressed mice only as it was also found by other laboratories (122). A similar tendency of fluoxetine effect was observed in the LDT while the history of maternal deprivation fully abolished the efficacy of fluoxetine. This further underlines that early life adversity affects stress adaptation and response to antidepressant treatment (for review see: 123–125). In our model, TST showed higher sensitivity than FST. FST showed smaller differences between certain groups and higher depression level after fluoxetine treatment in AFR stressed mice. This second finding turns practically against all other results. Findings of other laboratories are in agreement with the higher sensitivity of TST (126), while recently, more and more established researchers are on the opinion that FST should no longer be used to measure depression level (127–130). According to the TST, SSRI treatment potentially reduced depression level in AFR animals.

History of maternal deprivation (without CVMS) blunts the effectiveness of fluoxetine treatment. If all risk factors coincided, animals failed to adapt (10, 12). These behavioral findings ultimately underpin the significance of personalized therapy in mood disorders (131) that considers the number and type of risk factors that the patient carries.

In this study we examined the interactions between adverse early life event and stress exposure. We cannot rule out that the stress effect of the behavioral tests interacted with each other and presumably also with the MD180 and CVMS ultimately affecting our results. Nevertheless, in order to keep the conditions as standard as possible we applied the tests in the same order in all groups on consecutive days.

4.3 Morphological findings

4.3.1 ovBNST

In contrast to our previous findings, CVMS exposure did not induce significant activation in ovBNST among AFR animals (10) which may be explained by the blunting effect of mild stress caused by daily intraperitoneal injections of vehicle animals. However, following maternal deprivation, the magnitude of response to the same stress in both CRH and FOSB cell counts decreased. This supports the conclusion of our behavioral tests, where we saw maladaptation in deprived animals. Our correlation analyses further supported that anxiety (in MBT) and depression levels (in TST) are inversely correlated with FOSB positivity in ovBNST/CRH cells, in agreement with previous findings in rats (61). In line with this, the fluoxetine treatment-induced elevation of CRH/FOSB cell counts in most of the groups. This was associated with potent anxiolytic and antidepressant effect in behavioral tests. Increased ovBNST/CRH cell count upon fluoxetine treatment is in full agreement with results of other studies at protein and mRNA level (132–135). CRH SSD measurements revealed very low ovBNST/CRH content in all deprived groups, suggesting that maternal deprivation reduces CRH content of these cells in line with the results of others (136). However, in the ovBNST these changes have no apparent epigenetic background, as revealed by acetylation of histone H3.

4.3.2 CeA

The CeA, usually activated by stress (62–65) also showed elevated CRH-FOSB count, which was concomitant with higher CRH content suggesting increased activity. Fluoxetine treatment following stress decreased the number of CRH positive neurons. Similar to the ovBNST, SSRI treatment in AFR control mice tendentially increased the number of CRH-producing neurons that is in agreement with earlier findings (137). In line with other brain areas described above, history of maternal deprivation fundamentally rearranged the neuronal activity pattern in control and stressed PACAP HZ mice, because fluoxetine treatment decreased the activity and CRH content of CeA, and

stress failed to activate the nucleus or increase the count of CRH-producing cells. This phenomenon repeatedly supports, that early life adversity caused maladaptive changes at neuronal stress responsivity which ultimately contributed to the anomalies observed behavioral tests as others also proved (138). Negative correlation between CeA/CRH SSD and number of hidden marbles in MBT demonstrates both the potent anxiolytic effect of fluoxetine after stress (135), and that higher CeA/CRH level is associated with lower anxiety. This finding seems to be paradoxical as higher CRH levels are usually associated with increased anxiety (139), but if early life adversities influence the response, it is not without example that the opposite was observed (140).

4.3.3 VTA

VTA plays a crucial role in activity of mesolimbic pathway impacting symptoms of mood disorders like anhedonia and reduced motivation (92). As dopamine is the key neurotransmitter in this system, we examined the immunoreactivity of TH, the rate-limiting enzyme, of dopamine synthesis. Marking tyrosine hydroxylase (TH) is a traditional tool for investigating its activation and estimate the pursuit of mesocorticolimbic pathway (141, 142). The effect of maternal deprivation was similar in this nucleus to that observed the extended amygdala. Moreover, TH SSD was decreased by 40% in offspring that suffered maternal deprivation fitting with earlier findings (93). These data further highlight that early life adversities cause long-term changes in stress adaptation and in responsivity to antidepressant therapy (124, 136; for review see: 47, 143). Although, we did not detect that H3 histone acetylation would interact with TH SSD, we cannot exclude that other, here not examined epigenetic mechanisms contributed to the long-term changes in VTA TH SSD. Consonantly with earlier results (40, 41) only fluoxetine treatment increased the acetylation. This way, fluoxetine may increase the feeling of reward thus mitigating the previously described symptoms like anhedonia and lack of motivation (92).

4.3.4 cpEW

The response of UCN1-producing neurons to fluoxetine treatment was uniform in all groups: they showed decreased UCN1 content. This, in correlation with the results of MBT establish an ensuing evidence of the predictive validity of our model and supports the importance of cpEW in anxiety-related diseases in line with earlier published data (25, 28, 62, 73, 74, 76, 77, 144). Early life stress did not affect the urocortinergic cell count, but decreased their FOSB activity and UCN1 content. It is consonant with the results of acetylation of histone proteins and the correlation between the acetylation and UCN1 density, where lower acetylation was coupled with lower SSD. A further correlation between histone acetylation in the cpEW and CRH density in ovBNST highlights the role of

urocortinergic system in the regulation of BNST (71) and the HPA axis (145). The observation, that in contrast to AFR animals, stress exposure in maternally deprived animals resulted in the lowest acetylation level, suggests profound maladaptive changes at neuronal level. That may contribute to the behavioral alterations following maternal deprivation and it is also in line with our earlier results (76) where effects of maternal deprivation were similar in a rat model. Importantly, this lowest acetylation level was increased by fluoxetine treatment, in line with the findings in frontal cortex (40). This fact repeatedly highlights the predictive validity of our model.

4.3.5 DR

DR/5-HT neurons serve as important regulators of HPA axis and limbic brain territories in mood regulation (146). The behavioral anomalies observed in PACAP KO mice are attributed to alterations of the serotonergic system (147). We found here that in AFR mice, stress decreased both the DR/5-HT cell count and 5-HT SSD in line with our (25, 28) and other's previous results (145). Importantly, after fluoxetine treatment the 5-HT cell count did not differ from the control (148, 149). Following maternal deprivation, an elevated cell count was shown consonantly to the results of other laboratories (150). In maternally deprived mice, stress *per se* did not affect DR/5-HT, while the effect of fluoxetine decreased the DR/5-HT cell counts. This further supports the significance of early life adversities in stress adaptation response and mood control in line with several other studies (for review see: 151–153).

The count of hidden marbles in MBT showed a negative correlation with the number of DR/5-HT cells and their 5-HT SSD. This strongly suggests a true link between our morphological and behavioral findings. This is in line with a large body of evidence underlining the role of the serotonin systems both in mood control and mood disorders (86, 87, 147, for review see: 88, 89). In mice with history of maternal deprivation, stress caused no change, but fluoxetine administration in CVMS increased histone acetylation. In line with this, higher epigenetic modification upon antidepressant administration was observed by Levine et al. (40) also. The strong negative correlation of 5-HT positive cell counts and the number of acetylated histone-containing cells of DR highlights the importance of epigenetics in mood control. The strong correlation between 5-HT cell counts and ovBNST/CRH as well and cpEW/UCN1 cell count suggests a functional connectivity, that is in agreement with earlier neuroanatomical studies by Waselus et al. (154, 155) and Priest et al. (71).

4.3.6 Correlation between behavioral and functional morphological findings

In this study we performed functional neuroanatomical studies in a number of limbic centers and found that all of the examined brain areas may have contributed to the altered mood

status. The ovBNST and CeA CRH activity was inversely, while the cpEW/UCN1 and DR/5-HT directly correlated with MBT anxiety and TST depression levels suggesting their opposing contribution to the control of mood status (for review see: 19). Histone acetylation in the VTA correlated with the FST behavior suggesting the long term contribution of this area to mood status.

4.4 Limitations

The brain areas studied here are highly estrogen sensitive (156–161). Therefore, one has to consider the behavioral and even functional-morphological effect of the actual estrus cycle phase in female animals. Collecting vaginal smear samples to monitor the cycle would be an additional stress factor and the CVMS exposure might also interact with the cycle. Taking the complexity of the animal experimental setup, the capacity of our animal facility and the above described considerations in account, we waived to test the model in female mice that is an important limitation of this study.

In this experiment we did not apply wild type and PACAP knockout animals. Therefore, in this study we did not test if the reduced amount of PACAP (26) *per se* contributes to the depression-like phenotype, however this has been shown earlier in our (9, 10) and in other laboratories (26, 27, 147) also.

4.5 Conclusions and future perspective

Based on the three-hit concept of human depression (11, 12) we recently developed a model for depression studies, using PACAP heterozygous mice subjected to maternal deprivation and chronic variable mild stress and proved the willnerian (95) construct and face validity criteria (9, 10). Our present results demonstrate the reproducibility of our earlier results. The third, willnerian predictive validity criterion was tested in this study successfully as fluoxetine treatment restored MBT anxiety and TST depression level.

Our morphological data suggest that maternal deprivation as the model of early life adversity applied in genetically vulnerable PACAP heterozygous mice causes fundamental brain area-specific changes in the histone acetylation and stress adaptation response of the CRH-containing nuclei of the extended amygdala, dopaminergic VTA, UCN1-expressing cpEW and the serotonergic DR.

The complexity of the observed functional-neuromorphological alterations (Table 1) further supports the validity of our model taking the recruitment of many neurotransmitter and neuromodulator systems in consideration [for review see: (162)]. Further systematic brain mapping studies are required to identify

brain areas or neural circuits, which contribute to some specific aspects of mood disorder neurobiology. Testing of candidate antidepressant compounds in this model may help to find new therapeutic strategies for the management of stress-related mood disorders.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

In vivo experimental procedures were permitted by the National Food Chain Safety Office in Hungary (license number: BA02/2000-39/2016). The license was given based on the scientific approvals of the Animal Welfare Committee at Pécs University and the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation in Hungary.

Author contributions

TG performed the animal experiments evaluated the results and statistics, wrote the first draft of the manuscript. DK, BU, NF, LK performed the animal experiments, immunolabelings and cell counting. JF performed and analyzed the behavioral results. VC performed CORT RIA measurements, analyzed and validated the results. GB contributed to the confocal imaging and morphometrical analyses. HH and DR provided the genetically modified mice and contributed to the manuscript. VK contributed to the planning of study design, result assessment and writing. BG created the study design, contributed to the animal experiment, tissue sampling, imaging, data analysis and statistics, prepared the figures and supervised the manuscript. All authors contributed to and approved the final version of the manuscript.

Funding

This project (TKP2021-EGA-16) has been implemented with the support provided from the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary, financed under the TKP2021-EGA funding scheme and also under the 2020-4.1.1-TKP2020 funding scheme (Project No: TKP2020-IKA-08). The work was also supported by the Hungarian Scientific Research Fund (NKFIH, PD100706 and FK124188) to BG. VK was sponsored by the research grant of the Medical

Faculty, University of Pécs (KA-2019-12), by National Research, Development and Innovation Fund (ÚNKP-22-5-PTE-1740) and by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences (BO/00750/22/5). NF was supported by the research grant of Pécs University Medical School KA-2020-03, and New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology from the source of the National Research, Development and Innovation Fund (ÚNKP-20-4-II-PTE-547). This work was also financed by NAP 2017-1.2.1-NKP-2017-00002; MTA-TKI14016.

Acknowledgments

Authors are thankful for their excellent technical help to Beatrix Brumán and Izabella Orbán.

References

- WHO (2021). Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>.
- Hakulinen C, Musliner KL, Agerbo E. Bipolar disorder and depression in early adulthood and long-term employment, income, and educational attainment: A nationwide cohort study of 2,390,127 individuals. *Depress Anxiety* (2019) 36(11):1080–8. doi: 10.1002/da.22956
- Gili M, Castellví P, Vives M, de la Torre-Luque A, Almenara J, Blasco MJ, et al. Mental disorders as risk factors for suicidal behavior in young people: A meta-analysis and systematic review of longitudinal studies. *J Affect Disord* (2019) 245:152–62. doi: 10.1016/j.jad.2018.10.115
- Mulinari S. Monoamine theories of depression: historical impact on biomedical research. *J Hist Neurosci* (2012) 21(4):366–92. doi: 10.1080/0964704X.2011.623917
- Czéh B, Fuchs E, Wiborg O, Simon M. Animal models of major depression and their clinical implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* (2016) 64:293–310. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.04.004
- Harro J. Animal models of depression: pros and cons. *Cell Tissue Res* (2019) 377(1):5–20. doi: 10.1007/s00441-018-2973-0
- Catena-Dell'Osso M, Fagioli A, Marazziti D, Baroni S, Bellantuono C. Non-monoaminergic targets for the development of antidepressants: focus on neuropeptides. *Mini Rev Med Chem* (2013) 13(1):2–10. doi: 10.2174/1389557511307010002
- Khan A, Brown WA. Antidepressants versus placebo in major depression: an overview. *World Psychiatry* (2015) 14(3):294–300. doi: 10.1002/wps.20241
- Farkas J, Kovacs LÁ, Gaszner T, Gaszner B. Using PACAP heterozygous mice as models of the three hit theory of depression. In: *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide–PACAP*. Cham: Springer (2016), ISBN: . p. 731–41.
- Farkas J, Kovács LÁ, Gáspár L, Nafz A, Gaszner T, Ujvári B, et al. Construct and 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. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.04.019
- de Kloet ER, Derijk RH, Meijer OC. Therapy insight: is there an imbalanced response of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in depression? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* (2007) 3(2):168–79. doi: 10.1038/ncpendmet0403
- Daskalakis NP, Bagot RC, Parker KJ, Vinkers CH, de Kloet ER. The three-hit concept of vulnerability and resilience: toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology*. (2013) 38(9):1858–73. doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.06.008
- Lacerda-Pinheiro SF, Pinheiro Junior RF, Pereira de Lima MA, Lima da Silva CG, Vieira dos Santos Mdo S, Teixeira Júnior AG, et al. Are there depression and anxiety genetic markers and mutations? a systematic review. *J Affect Disord* (2014) 168:387–98. doi: 10.1016/j.jad.2014.07.016
- Mullins N, Lewis CM. Genetics of depression: Progress at last. *Curr Psychiatry Rep* (2017) 19(8):43. doi: 10.1007/s11920-017-0803-9

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

- Ormel J, Hartman CA, Snieder H. The genetics of depression: successful genome-wide association studies introduce new challenges. *Transl Psychiatry* (2019) 9(1):114. doi: 10.1038/s41398-019-0450-5
- Agarwal A, Halvorson LM, Legradi G. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mimics neuroendocrine and behavioral manifestations of stress: Evidence for PKA-mediated expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene. *Brain Res Mol Brain Res* (2005) 138(1):45–57. doi: 10.1016/j.molbrainres.2005.03.016
- Stroth N, Holighaus Y, Ait-Ali D, Eiden LE. PACAP: a master regulator of neuroendocrine stress circuits and the cellular stress response. *Ann N Y Acad Sci* (2011) 1220(1):49–59. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.05904.x
- Pinhasov A, Neshet E, Gross M, Turgeman G, Kreinin A, Yadid G. The role of the PACAP signaling system in depression. *Curr Pharm Des* (2011) 17(10):990–1001. doi: 10.2174/138161211795589328
- Kormos V, Gaszner B. Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. *Neuropeptides* (2013) 47(6):401–19. doi: 10.1016/j.npep.2013.10.014
- Hammack SE, May V. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in stress-related disorders: data convergence from animal and human studies. *Biol Psychiatry* (2015) 78(3):167–77. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.12.003
- Lutfy K, Shankar G. Emerging evidence for the role of pituitary adenylate cyclase-activating peptide in neuropsychiatric disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci* (2019) 167:143–57. doi: 10.1016/bs.pmbts.2019.06.009
- Boucher MN, May V, Braas KM, Hammack SE. PACAP orchestration of stress-related responses in neural circuits. *Peptides*. (2021) 142:170554. doi: 10.1016/j.peptides.2021.170554
- Stroth N, Eiden LE. Stress hormone synthesis in mouse hypothalamus and adrenal gland triggered by restraint is dependent on pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide signaling. *Neuroscience* (2010) 165(4):1025–30. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.11.023
- Tsukiyama N, Saida Y, Kakuda M, Shintani N, Hayata A, Morita Y, et al. PACAP centrally mediates emotional stress-induced corticosterone responses in mice. *Stress* (2011) 14(4):368–75. doi: 10.3109/10253890.2010.544345
- Kormos V, Gáspár L, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, et al. Reduced response to chronic mild stress in PACAP mutant mice is associated with blunted FosB expression in limbic forebrain and brainstem centers. *Neuroscience*. (2016) 330:335–58. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.06.004
- Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K, Mori W, Hirose M, Matsuda T, et al. Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) 98(23):13355–60. doi: 10.1073/pnas.231094498
- Hashimoto H, Hashimoto R, Shintani N, Tanaka K, Yamamoto A, Hatanaka M, et al. Depression-like behavior in the forced swimming test in PACAP-deficient mice: amelioration by the atypical antipsychotic risperidone. *J Neurochem* (2009) 110(2):595–602. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06168.x

28. Gaszner B, Kormos V, Kozicz T, Hashimoto H, Reglodi D, Helyes Z. The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted *c-fos* expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting edinger-westphal nucleus, ventral lateral septum, and dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*. (2012) 202:283–99. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.046
29. Gaszner B, Kovacs LA, Gaszner T, Gaspar L, Reglodi D, Loricz K, et al. PACAP transgenic mice in the three hit model of depression: The involvement of BNST - CRF, cPEW – Urocortin1 and DR – serotonin. In: *44th annual meeting for neuroscience*. Washington DC (2014).
30. Hattori S, Takao K, Tanda K, Toyama K, Shintani N, Baba A, et al. Comprehensive behavioral analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) knockout mice. *Front Behav Neurosci* (2012) 6:58. doi: 10.3389/fnbeh.2012.00058
31. Lehmann ML, Mustafá T, Eiden AM, Herkenham M, Eiden LE. PACAP-deficient mice show attenuated corticosterone secretion and fail to develop depressive behavior during chronic social defeat stress. *Psychoneuroendocrinology* (2013) 38 (5):702–15. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.09.006
32. Ressler KJ, Mercer KB, Bradley B, Jovanovic T, Mahan A, Kerley K, et al. Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. *Nature* (2011) 470(7335):492–7. doi: 10.1038/nature09856
33. Lind MJ, Marraccini ME, Sheerin CM, Bountress K, Bacanu SA, Amstadter AB, et al. Association of posttraumatic stress disorder with rs2267735 in the ADCYAP1R1 gene: A meta-analysis. *J Trauma Stress* (2017) 30(4):389–98. doi: 10.1002/jts.22211
34. Hashimoto H, Shintani N, Tanida M, Hayata A, Hashimoto R, Baba A. PACAP is implicated in the stress axes. *Curr Pharm Des* (2011) 17(10):985–9. doi: 10.2174/138161211795589382
35. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. (2000) 403(6765):41–5. doi: 10.1038/47412
36. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. (2007) 128 (4):693–705. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005
37. Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays*. (1998) 20(8):615–26. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878 (199808)20:8<615
38. Sterrenburg L, Gaszner B, Boerrigter J, Santbergen L, Bramini M, Elliott E, et al. Chronic stress induces sex-specific alterations in methylation and expression of corticotropin-releasing factor gene in the rat. *PLoS One* (2011) 6(11):e28128. doi: 10.1371/journal.pone.0028128
39. Covington HE, Maze I, Vialou V, Nestler EJ. Antidepressant action of HDAC inhibition in the prefrontal cortex. *Neuroscience*. (2015) 298:329–35. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.04.030
40. Levine A, Worrell TR, Zimnisky R, Schmauss C. Early life stress triggers sustained changes in histone deacetylase expression and histone H4 modifications that alter responsiveness to adolescent antidepressant treatment. *Neurobiol Dis* (2012) 45(1):488–98. doi: 10.1016/j.nbd.2011.09.005
41. Schmauss C. An HDAC-dependent epigenetic mechanism that enhances the efficacy of the antidepressant drug fluoxetine. *Sci Rep* (2015) 5:8171. doi: 10.1038/srep08171
42. Lange UC, Schneider R. What an epigenome remembers. *Bioessays*. (2010) 32(8):659–68. doi: 10.1002/bies.201000030
43. Ng RK, Gurdon JB. Epigenetic inheritance of cell differentiation status. *Cell Cycle* (2008) 7(9):1173–7. doi: 10.4161/cc.7.9.5791
44. Nestler EJ. Epigenetics: Stress makes its molecular mark. *Nature*. (2012) 490 (7419):171–2. doi: 10.1038/490171a
45. Raabe FJ, Spengler D. Epigenetic risk factors in PTSD and depression. *Front Psychiatry* (2013) 4:80. doi: 10.3389/fpsy.2013.00080
46. Kim MJ, Farber MJ, Knodt AR, Hariri AR. Corticolimbic circuit structure moderates an association between early life stress and later trait anxiety. *Neuroimage Clin* (2019) 24:102050. doi: 10.1016/j.nicl.2019.102050
47. Heim C, Binder EB. Current research trends in early life stress and depression: review of human studies on sensitive periods, gene-environment interactions, and epigenetics. *Exp Neurol* (2012) 233(1):102–11. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.10.032
48. Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T. Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. *Front Neurosci* (2014) 8:166. doi: 10.3389/fnins.2014.00166
49. Jawahar MC, Murgatroyd C, Harrison EL, Baune BT. Epigenetic alterations following early postnatal stress: a review on novel aetiological mechanisms of common psychiatric disorders. *Clin Epigenetics*. (2015) 7:122. doi: 10.1186/s13148-015-0156-3
50. McEwen BS, Bowles NP, Gray JD, Hill MN, Hunter RG, Karatsoreos IN, et al. Mechanisms of stress in the brain. *Nat Neurosci* (2015) 18(10):1353–63. doi: 10.1038/nn.4086
51. Deussing JM, Chen A. The corticotropin-releasing factor family: Physiology of the stress response. *Physiol Rev* (2018) 98(4):2225–86. doi: 10.1152/physrev.00042.2017
52. Harvey BH, Brand L, Jeeva Z, Stein DJ. Cortical/hippocampal monoamines, HPA-axis changes and aversive behavior following stress and rest in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Physiol Behav* (2006) 87(5):881–90. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.01.033
53. Glover V, O'Connor TG, O'Donnell K. Prenatal stress and the programming of the HPA axis. *Neurosci Biobehav Rev* (2010) 35(1):17–22. doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.11.008
54. Ramot A, Jiang Z, Tian JB, Nahum T, Kuperman Y, Justice N, et al. Hypothalamic CRFR1 is essential for HPA axis regulation following chronic stress. *Nat Neurosci* (2017) 20(3):385–8. doi: 10.1038/nn.4491
55. Nemeroff CB, Widerlöv E, Bissette G, Walléus H, Karlsson I, Eklund K, et al. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* (1984) 226(4680):1342–4. doi: 10.1126/science.6334362
56. Juruena MF, Bocharova M, Agustini B, Young AH. Atypical depression and non-atypical depression: Is HPA axis function a biomarker? a systematic review. *J Affect Disord* (2018) 233:45–67. doi: 10.1016/j.jad.2017.09.052
57. Perrin AJ, Pariante CM. Endocrine and immune effects of non-convulsive neurostimulation in depression: A systematic review. *Brain Behav Immun* (2020) 87:910–20. doi: 10.1016/j.bbi.2020.02.016
58. Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* (2009) 10(6):397–409. doi: 10.1038/nrn2647
59. Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* (2003) 463(1-3):235–72. doi: 10.1016/s0014-2999(03)01285-8
60. Waters RP, Rivalan M, Bangasser DA, Deussing JM, Ising M, Wood SK, et al. Evidence for the role of corticotropin-releasing factor in major depressive disorder. *Neurosci Biobehav Rev* (2015) 58:63–78. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.07.011
61. Choi DC, Furay AR, Evanson NK, Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Herman JP. Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. *J Neurosci* (2007) 27(8):2025–34. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4301-06.2007
62. Kozicz T, Bordewin LA, Czéh B, Fuchs E, Roubos EW. Chronic psychosocial stress affects corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus and central extended amygdala as well as urocortin 1 in the non-preganglionic edinger-westphal nucleus of the tree shrew. *Psychoneuroendocrinology* (2008) 33 (6):741–54. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.02.012
63. Regev L, Neufeld-Cohen A, Tsoory M, Kuperman Y, Getselter D, Gil S, et al. Prolonged and site-specific over-expression of corticotropin-releasing factor reveals differential roles for extended amygdala nuclei in emotional regulation. *Mol Psychiatry* (2011) 16(7):714–28. doi: 10.1038/mp.2010.64
64. Laine MA, Sokolowska E, Dudek M, Callan SA, Hyytiä P, Hovatta I. Brain activation induced by chronic psychosocial stress in mice. *Sci Rep* (2017) 7 (1):15061. doi: 10.1038/s41598-017-15422-5
65. Kovács LÁ, Berta G, Csernus V, Ujvári B, Füredi N, Gaszner B. Corticotropin-releasing factor-producing cells in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and extended amygdala show age-dependent FOS and FOSB/DeltaFOSB immunoreactivity in acute and chronic stress models in the rat. *Front Aging Neurosci* (2019) 11:274. doi: 10.3389/fnagi.2019.00274
66. Hannibal J. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and *in situ* hybridization study. *J Comp Neurol* (2002) 453(4):389–417. doi: 10.1002/cne.10418
67. Roman CW, Lezak KR, Hartsock MJ, Falls WA, Braas KM, Howard AB, et al. PAC1 receptor antagonism in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) attenuates the endocrine and behavioral consequences of chronic stress. *Psychoneuroendocrinology* (2014) 47:151–65. doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.05.014
68. Levinstein MR, Bergkamp DJ, Lewis ZK, Tsoanoudis A, Hashikawa K, Stuber GD, et al. PACAP-expressing neurons in the lateral habenula diminish negative emotional valence. *Genes Brain Behav* (2022):e12801. doi: 10.1111/gbb.12801
69. Porta-Casteràs D, Cano M, Steward T, Andero R, Cardoner N. The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide system as a sex-specific modulator of hippocampal response to threat stimuli. *Neurobiol Stress* (2022) 18:100448. doi: 10.1016/j.yjnstr.2022.100448
70. Boucher MN, Aktar M, Braas KM, May V, Hammack SE. Activation of lateral parabrachial nucleus (LPBn) PACAP-expressing projection neurons to the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) enhances anxiety-like behavior. *J Mol Neurosci* (2022) 72(3):451–8. doi: 10.1007/s12031-021-01946-z
71. Priest MF, Freda SN, Badong D, Dumrongprechachan V, Kozorovitskiy Y. Peptidergic modulation of fear responses by the edinger-westphal nucleus. *bioRxiv* (2021). doi: 10.1101/2021.08.05.455317

72. Korosi A, Schotanus S, Olivier B, Roubos EW, Kozicz T. Chronic ether stress-induced response of urocortin 1 neurons in the edinger-westphal nucleus in the mouse. *Brain Res* (2005) 1046(1-2):172–9. doi: 10.1016/j.brainres.2005.04.012
73. Kormos V, Kecskés A, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, Alomari A, et al. Peptidergic neurons of the edinger-westphal nucleus express TRPA1 ion channel that is downregulated both upon chronic variable mild stress in male mice and in humans who died by suicide. *J Psychiatry Neurosci* (2022) 47(3):E162–75. doi: 10.1503/jpn.210187
74. Gaszner B, Csernus V, Kozicz T. Urocortinergic neurons respond in a differentiated manner to various acute stressors in the edinger-westphal nucleus in the rat. *J Comp Neurol* (2004) 480(2):170–9. doi: 10.1002/cne.20343
75. Gaszner B, Korosi A, Palkovits M, Roubos EW, Kozicz T. Neuropeptide y activates urocortin 1 neurons in the nonpreganglionic edinger-westphal nucleus. *J Comp Neurol* (2007) 500(4):708–19. doi: 10.1002/cne.21177
76. Gaszner B, Jensen KO, Farkas J, Reglodi D, Csernus V, Roubos EW, et al. Effects of maternal separation on dynamics of urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor in the rat non-preganglionic edinger-westphal nucleus. *Int J Dev Neurosci* (2009) 27(5):439–51. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2009.05.006
77. Ujvári B, Pytel B, Márton Z, Bognár M, Kovács LÁ, Farkas J, et al. Neurodegeneration in the centrally-projecting edinger-westphal nucleus contributes to the non-motor symptoms of parkinson's disease in the rat. *J Neuroinflammation* (2022) 19(1):31. doi: 10.1186/s12974-022-02399-w
78. Kozicz T, Tilburg-Ouwens D, Faludi G, Palkovits M, Roubos E. Gender-related urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor expression in the adult human midbrain of suicide victims with major depression. *Neuroscience* (2008) 152(4):1015–23. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.12.050
79. Lee HS, Eum YJ, Jo SM, Waterhouse BD. Projection patterns from the amygdaloid nuclear complex to subdivisions of the dorsal raphe nucleus in the rat. *Brain Res* (2007) 1143:116–25. doi: 10.1016/j.brainres.2007.01.081
80. Lemos JC, Zhang G, Walsh T, Kirby LG, Akanwa A, Brooks-Kayal A, et al. Stress-hyperresponsive WKY rats demonstrate depressed dorsal raphe neuronal excitability and dysregulated CRF-mediated responses. *Neuropsychopharmacology* (2011) 36(4):721–34. doi: 10.1038/npp.2010.200
81. Kozicz T. The missing link; the significance of urocortin 1/urocortin 2 in the modulation of the dorsal raphe serotonergic system. *Mol Psychiatry* (2010) 15(4):340–1. doi: 10.1038/mp.2009.134
82. Dos Santos Júnior ED, Da Silva AV, Da Silva KR, Haemmerle CA, Batagello DS, Da Silva JM, et al. The centrally projecting edinger-westphal nucleus-I: Efferents in the rat brain. *J Chem Neuroanat.* (2015) 68:22–38. doi: 10.1016/j.jchemneu.2015.07.002
83. Bouwknecht JA, Spiga F, Staub DR, Hale MW, Shekhar A, Lowry CA. Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: relationship to c-fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Res Bull* (2007) 72(1):32–43. doi: 10.1016/j.brainresbull.2006.12.009
84. Zhang J, Fan Y, Li Y, Zhu H, Wang L, Zhu MY. Chronic social defeat up-regulates expression of the serotonin transporter in rat dorsal raphe nucleus and projection regions in a glucocorticoid-dependent manner. *J Neurochem* (2012) 123(6):1054–68. doi: 10.1111/jnc.12055
85. Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, et al. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* (2007) 445(7124):168–76. doi: 10.1038/nature05453
86. Steinbusch HW, Nieuwenhuys R, Verhofstad AA, van der Kooy D. The nucleus raphe dorsalis of the rat and its projection upon the caudatoputamen. a combined cytoarchitectonic, immunohistochemical and retrograde transport study. *J Physiol (Paris)* (1981) 77(2-3):157–74.
87. Ma QP, Yin GF, Ai MK, Han JS. Serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the amygdala in the rat. *Neurosci Lett* (1991) 134(1):21–4. doi: 10.1016/0304-3940(91)90499-j
88. Lowry CA, Hale MW, Evans AK, Heerkens J, Staub DR, Gasser PJ, et al. Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Ann NY Acad Sci* (2008) 1148:86–94. doi: 10.1196/annals.1410.004
89. Venkatraman A, Edlow BL, Immordino-Yang MH. The brainstem in emotion: A review. *Front Neuroanat.* (2017) 11:15. doi: 10.3389/fnana.2017.00015
90. Russo SJ, Nestler EJ. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci* (2013) 14(9):609–25. doi: 10.1038/nrn3381
91. Heshmati M, Russo SJ. Anhedonia and the brain reward circuitry in depression. *Curr Behav Neurosci Rep* (2015) 2(3):146–53. doi: 10.1007/s40473-015-0044-3
92. Nestler EJ, Carlezon WA Jr. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry* (2006) 59(12):1151–9. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.09.018
93. Peña CJ, Kronman HG, Walker DM, Cates HM, Bagot RC, Purushothaman I, et al. Early life stress confers lifelong stress susceptibility in mice *via* ventral tegmental area OTX2. *Science*. (2017) 356(6343):1185–8. doi: 10.1126/science.aan4491
94. Sun X, Song Z, Si Y, Wang JH. microRNA and mRNA profiles in ventral tegmental area relevant to stress-induced depression and resilience. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* (2018) 86:150–65. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.05.023
95. Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacol (Berl)*. (1984) 83(1):1–16. doi: 10.1007/BF00427414
96. Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* (1980) 13(2):167–70. doi: 10.1016/0091-3057(80)90067-2
97. Njunge K, Handley SL. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* (1991) 38(1):63–7. doi: 10.1016/0091-3057(91)90590-x
98. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacol (Berl)* (1985) 85(3):367–70. doi: 10.1007/BF00428203
99. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* (1977) 229(2):327–36.
100. Ghasemi M, Montaser-Kouhsari L, Shafaroodi H, Nezami BG, Ebrahimi F, Dehpour AR. NMDA receptor/nitric oxide system blockage augments antidepressant-like effects of paroxetine in the mouse forced swimming test. *Psychopharmacol (Berl)* (2009) 206(2):325–33. doi: 10.1007/s00213-009-1609-1
101. Kovács LÁ, Fűredi N, Ujvári B, Golgol A, Gaszner B. Age-dependent FOSB/ΔFOSB response to acute and chronic stress in the extended amygdala, hypothalamic paraventricular, habenular, centrally-projecting edinger-westphal, and dorsal raphe nuclei in male rats. *Front Aging Neurosci* (2022) 14:862098. doi: 10.3389/fnagi.2022.862098
102. Paxinos G, Franklin KJB. *The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2nd Edition* (San Diego: Academic Press) (2001).
103. Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality. *Biometrika* (1965) 52:591–9. doi: 10.2307/2333709
104. Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical methods. 8th Edition*, Ames: Iowa State University Press (1989).
105. Strekalova T, Steinbusch HW. Measuring behavior in mice with chronic stress depression paradigm. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* (2010) 34(2):348–61. doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.12.014
106. Jeong JY, Lee DH, Kang SS. Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice. *Endocrinol Metab (Seoul)*. (2013) 28(4):288–96. doi: 10.3803/EnM.2013.28.4.288
107. Boleij H, Willems J, Leijten M, van't Klooster J, Lesscher H, Kirchhoff S, et al. Chronic social stress does not affect behavioural habituation in male CD1 mice. *Behav Brain Res* (2014) 273:34–44. doi: 10.1016/j.bbr.2014.07.015
108. Rabasa C, Pastor-Ciurana J, Delgado-Morales R, Gómez-Román A, Carrasco J, Gagliano H, et al. 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* (2015) 25(8):1248–59. doi: 10.1016/j.euroneuro.2015.04.026
109. Husum H, Termeer E, Mathé AA, Bolwig TG, Ellenbroek BA. Early maternal deprivation alters hippocampal levels of neuropeptide y and calcitonin-gene related peptide in adult rats. *Neuropharmacology* (2002) 42(6):798–806. doi: 10.1016/s0028-3908(02)00038-2
110. Osadchiv V, Mayer EA, Bhatt R, Labus JS, Gao L, Kilpatrick LA, et al. History of early life adversity is associated with increased food addiction and sex-specific alterations in reward network connectivity in obesity. *Obes Sci Pract* (2019) 5(5):416–36. doi: 10.1002/osp4.362
111. Workel JO, Oitzl MS, Flutterm M, Lesscher H, Karszen A, de Kloet ER. Differential and age-dependent effects of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of brown norway rats from youth to senescence. *J Neuroendocrinol* (2001) 13(7):569–80. doi: 10.1046/j.1365-2826.2001.00668.x
112. Kioukia-Fougia N, Antoniou K, Bekris S, Liapi C, Christofidis I, Papadopoulou-Daifoti Z. The effects of stress exposure on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thymus, thyroid hormones and glucose levels. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* (2002) 26(5):823–30. doi: 10.1016/s0278-5846(01)00297-4
113. Sterlemann V, Ganea K, Liebl C, Harbich D, Alam S, Holsboer F, et al. Long-term behavioral and neuroendocrine alterations following chronic social stress in mice: implications for stress-related disorders. *Horm Behav* (2008) 53(2):386–94. doi: 10.1016/j.yhbeh.2007.11.001
114. Bali A, Jaggi AS. Preclinical experimental stress studies: protocols, assessment and comparison. *Eur J Pharmacol* (2015) 746:282–92. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.10.017
115. Bartolomucci A, Pederzani T, Sacerdote P, Panerai AE, Parmigiani S, Palanza P. Behavioral and physiological characterization of male mice under chronic psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* (2004) 29(7):899–910. doi: 10.1016/j.psyneuen.2003.08.003

116. Brady LS, Whitfield HJr, Fox RJ, Gold PW, Herkenham M. Long-term antidepressant administration alters corticotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase, and mineralocorticoid receptor gene expression in rat brain. *Ther implications. J Clin Invest* (1991) 87(3):831–7. doi: 10.1172/JCI115086
117. Young EA, Altemus M, Lopez JF, Kocsis JH, Schatzberg AF, DeBattista C, et al. HPA axis activation in major depression and response to fluoxetine: a pilot study. *Psychoneuroendocrinology* (2004) 29(9):198–204. doi: 10.1016/j.psyneuen.2004.02.002
118. Holsboer F, Von Bardeleben U, Gerken A, Stalla GK, Müller OA. Blunted corticotropin and normal cortisol response to human corticotropin-releasing factor in depression. *N Engl J Med* (1984) 311(17):1127. doi: 10.1056/NEJM19841025311718
119. Pfohl B, Sherman B, Schlechte J, Stone R. Pituitary-adrenal axis rhythm disturbances in psychiatric depression. *Arch Gen Psychiatry* (1985) 42(9):897–903. doi: 10.1001/archpsyc.1985.01790320069009
120. Himmerich H, Binder EB, Künzel HE, Schuld A, Lucae S, Uhr M, et al. Successful antidepressant therapy restores the disturbed interplay between TNF- α system and HPA axis. *Biol Psychiatry* (2006) 60(8):882–8. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.03.075
121. Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B, Hen R. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology* (2004) 29(7):1321–30. doi: 10.1038/sj.npp.1300433
122. Todorović N, Filipović D. The antidepressant- and anxiolytic-like effects of fluoxetine and clozapine in chronically isolated rats involve inhibition of hippocampal TNF- α . *Pharmacol Biochem Behav* (2017) 163:57–65. doi: 10.1016/j.pbb.2017.10.006
123. Nemeroff CB. Early-life adversity, CRF dysregulation, and vulnerability to mood and anxiety disorders. *Psychopharmacol Bull* (2004) 38(1):14–20.
124. Lovallo WR. Early life adversity reduces stress reactivity and enhances impulsive behavior: implications for health behaviors. *Int J Psychophysiol* (2013) 90(1):8–16. doi: 10.1016/j.ijpsycho.2012.10.006
125. Gruhn MA, Phan KL, Klumpp H, Ajilore O, Gorka SM. Early life adversity as a moderator of symptom change following selective serotonin reuptake inhibitors and cognitive behavioral therapy. *Cogn Ther Res* (2021) 45(2):343–54. doi: 10.1007/s10608-020-10158-5
126. Bai F, Li X, Clay M, Lindstrom T, Skolnick P. Intra- and interstrain differences in models of “behavioral despair”. *Pharmacol Biochem Behav* (2001) 70(2–3):187–92. doi: 10.1016/s0091-3057(01)00599-8
127. Molendijk ML, de Kloet ER. Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. *Psychoneuroendocrinology*. (2015) 62:389–91. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.08.028
128. de Kloet ER, Molendijk ML. Coping with the forced swim stressor: Towards understanding an adaptive mechanism. *Neural Plast* (2016) 2016:6503162. doi: 10.1155/2016/6503162
129. Commons KG, Cholanians AB, Babb JA, Ehlinger DG. The rodent forced swim test measures stress-coping strategy, not depression-like behavior. *ACS Chem Neurosci* (2017) 8(5):955–60. doi: 10.1021/acscchemneuro.7b00042
130. Kara NZ, Stukalin Y, Einat H. Revisiting the validity of the mouse forced swim test: Systematic review and meta-analysis of the effects of prototypic antidepressants. *Neurosci Biobehav Rev* (2018) 84:1–11. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.11.003
131. Kappelmann N, Rein M, Fietz J, Mayberg HS, Craighead WE, Dunlop BW, et al. Psychotherapy or medication for depression? using individual symptom meta-analyses to derive a symptom-oriented therapy (SOT) metric for a personalised psychiatry. *BMC Med* (2020) 18(1):170. doi: 10.1186/s12916-020-01623-9
132. Torres G, Horowitz JM, Laflamme N, Rivest S. Fluoxetine induces the transcription of genes encoding *c-fos*, corticotropin-releasing factor and its type 1 receptor in rat brain. *Neuroscience*. (1998) 87(2):463–77. doi: 10.1016/s0306-4522(98)00147-x
133. Hammack SE, Roman CW, Lezak KR, Kocho-Shellenberg M, Grimmig B, Falls WA, et al. Roles for pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) expression and signaling in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) in mediating the behavioral consequences of chronic stress. *J Mol Neurosci* (2010) 42(3):327–40. doi: 10.1007/s12031-010-9364-7
134. Surget A, Tanti A, Leonardo ED, Laugeray A, Rainer Q, Touma C, et al. Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Mol Psychiatry* (2011) 16(12):1177–88. doi: 10.1038/mp.2011.48
135. Partridge JG, Forcelli PA, Luo R, Cashdan JM, Schulkin J, Valentino RJ, et al. Stress increases GABAergic neurotransmission in CRF neurons of the central amygdala and bed nucleus stria terminalis. *Neuropharmacology*. (2016) 107:239–50. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.03.029
136. Hu P, Maita I, Phan ML, Gu E, Kwok C, Dieterich A, et al. Early-life stress alters affective behaviors in adult mice through persistent activation of CRH-BDNF signaling in the oval bed nucleus of the stria terminalis. *Transl Psychiatry* (2020) 10(1):396. doi: 10.1038/s41398-020-01070-3
137. Xu Y, Day TA, Buller KM. The central amygdala modulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to systemic interleukin-1 β administration. *Neuroscience* (1999) 94(1):175–83. doi: 10.1016/s0306-4522(99)00311-5
138. Bian Y, Ma Y, Ma Q, Yang L, Zhu Q, Li W, et al. Prolonged maternal separation induces the depression-like behavior susceptibility to chronic unpredictable mild stress exposure in mice. *BioMed Res Int* (2021) 2021:6681397. doi: 10.1155/2021/6681397
139. Pomrenze MB, Tovar-Diaz J, Blasio A, Maiya R, Giovanetti SM, Lei K, et al. A corticotropin releasing factor network in the extended amygdala for anxiety. *J Neurosci* (2019) 39(6):1030–43. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2143-18.2018
140. Bolton JL, Molet J, Regev L, Chen Y, Rismanchi N, Haddad E, et al. Anhedonia following early-life adversity involves aberrant interaction of reward and anxiety circuits and is reversed by partial silencing of amygdala corticotropin-releasing hormone gene. *Biol Psychiatry* (2018) 83(2):137–47. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.08.023
141. Mukherjee S, Coque L, Cao JL, Kumar J, Chakravarty S, Asaithamby A, et al. Knockdown of clock in the ventral tegmental area through RNA interference results in a mixed state of mania and depression-like behavior. *Biol Psychiatry* (2010) 68(6):503–11. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.04.031
142. Daubner SC, Le T, Wang S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys* (2011) 508(1):1–12. doi: 10.1016/j.abb.2010.12.017
143. Čater M, Majdič G. How early maternal deprivation changes the brain and behavior? *Eur J Neurosci* (2022) 55(9–10):2058–75. doi: 10.1111/ejn.15238
144. Vetter DE, Li C, Zhao L, Contarino A, Liberman MC, Smith GW, et al. Urocortin-deficient mice show hearing impairment and increased anxiety-like behavior. *Nat Genet* (2002) 31(4):363–9. doi: 10.1038/ng914
145. Issler O, Carter RN, Paul ED, Kelly PA, Olverman HJ, Neufeld-Cohen A, et al. Increased anxiety in corticotropin-releasing factor type 2 receptor-null mice requires recent acute stress exposure and is associated with dysregulated serotonergic activity in limbic brain areas. *Biol Mood Anxiety Disord* (2014) 4(1):1. doi: 10.1186/2045-5380-4-1
146. Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvet M, Luppi PH. Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience*. (1998) 82(2):443–68. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00268-6
147. Shintani N, Hashimoto H, Tanaka K, Kawagishi N, Kawaguchi C, Hatanaka M, et al. Serotonergic inhibition of intense jumping behavior in mice lacking PACAP (Adcyap1-/-). *Ann NY Acad Sci* (2006) 1070:545–9. doi: 10.1196/annals.1317.079
148. Tao R, Ma Z, Auerbach SB. Differential effect of local infusion of serotonin reuptake inhibitors in the raphe versus forebrain and the role of depolarization-induced release in increased extracellular serotonin. *J Pharmacol Exp Ther* (2000) 294(2):571–9.
149. Quentin E, Belmer A, Maroteaux L. Somato-dendritic regulation of raphe serotonin neurons; a key to antidepressant action. *Front Neurosci* (2018) 12:982. doi: 10.3389/fnins.2018.00982
150. Gardner KL, Hale MW, Oldfield S, Lightman SL, Plotsky PM, Lowry CA. Adverse experience during early life and adulthood interact to elevate tph2 mRNA expression in serotonergic neurons within the dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* (2009) 163(4):991–1001. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.07.055
151. Matthews K, Robbins TW. Early experience as a determinant of adult behavioural responses to reward: the effects of repeated maternal separation in the rat. *Neurosci Biobehav Rev* (2003) 27(1–2):45–55. doi: 10.1016/s0149-7634(03)00008-3
152. Maccari S, Krugers HJ, Morley-Fletcher S, Szyf M, Brunton PJ. The consequences of early-life adversity: neurobiological, behavioural and epigenetic adaptations. *J Neuroendocrinol* (2014) 26(10):707–23. doi: 10.1111/jne.12175
153. Čater M, Majdič G. How early maternal deprivation changes the brain and behavior? *J Neurosci* (2022) 55(9–10):2058–75. doi: 10.1111/ejn.15238
154. Waselus M, Nazzaro C, Valentino RJ, Van Bockstaele EJ. Stress-induced redistribution of corticotropin-releasing factor receptor subtypes in the dorsal raphe nucleus. *Biol Psychiatry* (2009) 66(1):76–83. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.02.014
155. van der Doelen RH, Arnoldussen IA, Ghareh H, van Och L, Homberg JR, Kozicz T. Early life adversity and serotonin transporter gene variation interact to affect DNA methylation of the corticotropin-releasing factor gene promoter region in the adult rat brain. *Dev Psychopathol* (2015) 27(1):123–35. doi: 10.1017/S0954579414001345
156. Derks NM, Roubos EW, Kozicz T. Presence of estrogen receptor beta in urocortin 1-neurons in the mouse non-preganglionic edinger-westphal nucleus. *Gen Comp Endocrinol* (2007) 153(1–3):28–34. doi: 10.1016/j.ygcen.2007.04.009
157. Clark JA, Alves S, Gundlach C, Rocha B, Birzin ET, Cai SJ, et al. Selective estrogen receptor-beta (SERM-beta) compounds modulate raphe nuclei tryptophan hydroxylase-1 (TPH-1) mRNA expression and cause antidepressant-like effects in the forced swim test. *Neuropharmacology*. (2012) 63(6):1051–63. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.07.004
158. Kelly DA, Varnum MM, Krentzel AA, Forger NG. Differential control of sex differences in estrogen receptor α in the bed nucleus of the stria

terminalis and anteroventral periventricular nucleus. *Endocrinology*. (2013) 154 (10):3836–46. doi: 10.1210/en.2013-1239

159. Vandegrift BJ, You C, Satta R, Brodie MS, Lasek AW. Estradiol increases the sensitivity of ventral tegmental area dopamine neurons to dopamine and ethanol. *PLoS One* (2017) 12(11):e0187698. doi: 10.1371/journal.pone.0187698

160. Leger L, Charnay Y, Hof PR, Bouras C, Cespuglio R. Anatomical distribution of serotonin-containing neurons and axons in the central nervous system of the cat. *J Comp Neurol* (2001) 433(2):157–82. doi: 10.1002/cne.1133

161. Le Moëne O, Stavarache M, Ogawa S, Musatov S, Ågmo A. Estrogen receptors α and β in the central amygdala and the ventromedial nucleus of the hypothalamus: Sociosexual behaviors, fear and arousal in female rats during emotionally challenging events. *Behav Brain Res* (2019) 367:128–42. doi: 10.1016/j.bbr.2019.03.045

162. Villas Boas GR, Boerngen de Lacerda R, Paes MM, Gubert P, Almeida WLDC, Rescia VC, et al. Molecular aspects of depression: A review from neurobiology to treatment. *Eur J Pharmacol* (2019) 851:99–121. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.02.024



Article

Epigenetic and Neuronal Activity Markers Suggest the Recruitment of the Prefrontal Cortex and Hippocampus in the Three-Hit Model of Depression in Male PACAP Heterozygous Mice

Tamás Gaszner ^{1,2}, József Farkas ^{1,2}, Dániel Kun ^{1,2}, Balázs Ujvári ^{1,2}, Nóra Füredi ^{1,2}, László Ákos Kovács ^{1,2}, Hitoshi Hashimoto ^{3,4,5,6,7}, Dóra Reglődi ^{1,8}, Viktória Kormos ⁹, and Balázs Gaszner ^{1,2,*}

Citation: Gaszner, T.; Farkas, J.; Kun, D.; Ujvári, B.; Füredi, N.; Kovács, L.Á.; Hashimoto, H.; Reglődi, D.; Kormos, V.; Gaszner, B. Epigenetic and Neuronal Activity Markers Suggest the Recruitment of the Prefrontal Cortex and Hippocampus in the Three-Hit Model of Depression in Male PACAP Heterozygous Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 11739. <https://doi.org/10.3390/ijms231911739>

Academic Editor: Larisa Bobrovskaya

Received: 29 August 2022
Accepted: 29 September 2022
Published: 3 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Department of Anatomy, Medical School, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary
- ² Research Group for Mood Disorders, Centre for Neuroscience Medical School, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary
- ³ Laboratory of Molecular Neuropharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita 565-0871, Osaka, Japan
- ⁴ Molecular Research Center for Children's Mental Development, United Graduate School of Child Development, Osaka University, Kanazawa University, Hamamatsu University School of Medicine, Chiba University and University of Fukui, 2-2 Yamadaoka, Suita 565-0871, Osaka, Japan
- ⁵ Division of Bioscience, Institute for Dataability Science, Osaka University, 1-1 Yamadaoka, Suita 565-0871, Osaka, Japan
- ⁶ Transdimensional Life Imaging Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita 565-0871, Osaka, Japan
- ⁷ Department of Molecular Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita 565-0871, Osaka, Japan
- ⁸ ELKH-PTE PACAP Research Group Department of Anatomy, Medical School, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary
- ⁹ Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary
- * Correspondence: balazs.b.gaszner@aok.pte.hu

Abstract: Depression and its increasing prevalence challenge patients, the healthcare system, and the economy. We recently created a mouse model based on the three-hit concept of depression. As genetic predisposition (first hit), we applied pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide heterozygous mice on CD1 background. Maternal deprivation modeled the epigenetic factor (second hit), and the chronic variable mild stress was the environmental factor (third hit). Fluoxetine treatment was applied to test the predictive validity of our model. We aimed to examine the dynamics of the epigenetic marker acetyl-lysine 9 H3 histone (H3K9ac) and the neuronal activity marker FOSB in the prefrontal cortex (PFC) and hippocampus. Fluoxetine decreased H3K9ac in PFC in non-deprived animals, but a history of maternal deprivation abolished the effect of stress and SSRI treatment on H3K9ac immunoreactivity. In the hippocampus, stress decreased, while SSRI increased H3K9ac immunosignal, unlike in the deprived mice, where the opposite effect was detected. FOSB in stress was stimulated by fluoxetine in the PFC, while it was inhibited in the hippocampus. The FOSB immunoreactivity was almost completely abolished in the hippocampus of the deprived mice. This study showed that FOSB and H3K9ac were modulated in a territory-specific manner by early life adversities and later life stress interacting with the effect of fluoxetine therapy supporting the reliability of our model.

Keywords: histone acetylation; H3K9ac; FOSB; chronic stress; maternal deprivation

1. Introduction

Major depression, with its strikingly increasing prevalence, challenges the affected people, their families, the healthcare system, and even the economy [1]. Basic neuroscience has helped to answer the complex question of how to find new prevention and/or therapeutic strategies for mood disorders. In order to deepen our understanding of a complex disease, with a highly complex multifactorial background [2], a complex animal model is needed in basic research. To create a reliable animal model, we decided to follow the three-hit concept of the disease. According to this, the co-incidence of (a) genetic predisposition, (b) epigenetic factors, and (c) stress exposure may precipitate the symptoms [3,4]. We applied mice carrying a genetic alteration by lacking one functional allele of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on CD1 background [5,6]. We decided to use these heterozygous (HZ) mice because they exhibited reduced PACAP levels in the brain [7] associated with a depression-like phenotype [8], and the role of PACAP has been shown in multiple aspects of stress adaptation response, including the activity of higher-order limbic centers [8,9] and the regulation of the hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis [6,8–20].

In our model, PACAP HZ mice were exposed to maternal deprivation (second hit) that evokes epigenetic changes [6,21] in the vulnerable early life period [22,23], thus increasing the risk to develop a depression-like state in animal models [24,25], in line with human observations [26]. Chronic variable mild stress (CVMS) is also commonly used to induce a depression-like state in rodent models [27]. Therefore, we incorporated this paradigm as the third “hit” and successfully verified the classical Willnerian [28] construct and the face validity of our model [5,6]. Most recently, we also tested the predictive validity of our model by applying fluoxetine, a standard selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) treatment, in our mice carrying all three risk factors in the forced swim, tail suspension, marble burying, and light–dark box tests [21]. We observed that the treatment reversed the increased anxiety and depression-like behavior in PACAP HZ mice that carry all three risk factors [21]. We also recognized that the therapeutic effect on functional–morphological alterations in the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdala, and, in brainstem centers for mood control (i.e., the ventral tegmental area (VTA), centrally projecting the Edinger–Westphal nucleus and the dorsal raphe nucleus) depended on the existence of the epigenetic hit, maternal deprivation [21]. In our most recent work [21], we did not examine all the important players of mood control and stress adaptation response. Considering the fact that major depression has a deep impact on higher-order limbic centers [29,30], we decided to test our model in further limbic areas.

The prefrontal cortex (PFC) is one of the most important brain territories in higher-order cognitive functions and behavior control [31]. The question of how this brain area contributes to the pathogenesis of depression has been investigated for a long time [32,33], including through functional imaging [34], studies on individuals who suffered damage of the PFC [35], and reports on cases treated by deep brain stimulation [36,37]. Functional neuroanatomical studies in rodent models consonantly suggest the complex contribution of the PFC to the psychopathology of depression recruiting serotonergic [38], GABAergic [39], and glutamatergic [40] mechanisms. Molecular studies proved the recruitment of brain-derived neurotrophic-factor-induced intracellular signaling via cAMP response element binding protein [41,42] and the contribution of epigenetic mechanisms [43] in models of depression. Studies on early life adversity have also shown that maternal deprivation altered cognitive functions and exaggerated plasticity [44]. Chronic environmental stress in the PFC of adult animals caused an elevation of microglia activity and induced an increased neuronal activity, as assessed by FOSB immunoreactivity (ir) [45]. FOSB is a protein product of the Finkel–Biskis–Jinkins murine sarcoma virus-related cellular oncogene, and it is a commonly used functional–morphological indicator of chronic neuronal activation [46,47]. Further, efferent PFC projections also suggest that the altered PFC activity may contribute to the behavioral changes attributed to other limbic centers, including the amygdala, VTA, and hippocampus [48].

The hippocampal formation is probably the most often examined brain territory in depression [29,49]. It is known that stress may affect hippocampal neuronal plasticity, which also contributes to the development of depression [41–43,50,51]. Stress exposure reduces the hippocampal volume and activity, as found in the majority of patients who suffer from depression; however, it is not clear whether these phenomena are the consequences of depression, or they should be considered predisposing factors [52,53]. Hippocampal connections with the HPA axis, PFC, and extended amygdala also suggest its central role in stress adaptation response and mood control [54,55]. The three main parts of the hippocampus, the areas of cornu ammonis (CA) 1, CA3, and dentate gyrus (DG), show decreased levels of brain-derived neurotrophic factor upon maternal separation, which was reversible by antidepressant treatment [56]. The elevation of FOSB-ir upon chronic stress was also reversible by antidepressant treatment in our earlier work performed in PACAP knockout (KO) mice [9]. Hippocampal GABAergic interneurons are also sensitive to early life stress affecting the epigenome, as they exert increased DNA methylation upon stress, associated with depression-like behavior in mice [57].

Based on these, in order to further support the validity of our model and to gain deeper insight into the functional–neuromorphological changes that underlie depression, in this study, we decided to focus on the recruitment of the PFC and the CA1 and CA3, as well as DG of the hippocampus. The altered histone acetylation pattern is a commonly used indicator of long-lasting regulatory changes in epigenetic alterations in depression models [58–60]. FOSB is also a reliable marker for long-term changes in neuronal activity in depression models [47,61]. Therefore, we aimed to test if the (a) epigenetic marker acetyl-lysine 9 H3 histone (H3K9ac) and (b) the chronic neuronal activity marker FOSB are affected in these brain regions in our model, and how these changes are influenced by fluoxetine therapy. We hypothesized that, as risk factors, the hits would interact with each other and with the fluoxetine treatment, as mirrored by the altered H3 histone acetylation and the FOSB neuronal activity pattern.

2. Results

2.1. H3K9ac Immunoreactivity

In both areas of interest in all of our experimental groups, we successfully detected a strong nuclear H3K9ac-ir. We compared the number of immunoreactive cells in order to assess the effect of the quality of maternal care, stress exposure, and SSRI treatment on this epigenetic marker.

2.1.1. Prefrontal Cortex

MANOVA revealed that the main effect of the fluoxetine treatment ($F_{1,32} = 7.72$; $p = 0.039$) and the interaction of maternal care and treatment ($F_{1,32} = 5.43$; $p = 0.027$) influenced the H3K9ac immunosignal significantly. Post hoc tests showed that the fluoxetine treatment reduced the number of H3K9ac immunopositive cells in the animal facility-reared (AFR) control group (compare Figure 1A and Figure 1B, as well as bars “a” and “b” in Figure 1D, $p = 0.036$). In line with this, in CVMS-exposed mice, fluoxetine treatment was associated with a reduced number of H3K9ac-ir cells (bars “c” and “d” in Figure 1D, $p = 0.047$). Importantly, in the control vehicle-treated mice with MD180 history, a tendentially lower cell count was detected (compare bars “a” and “e” in Figure 1D, $p = 0.068$), and the fluoxetine treatment did not affect the H3K9ac-ir, in the mice that experienced maternal deprivation (bars “e-h” in Figure 1D).

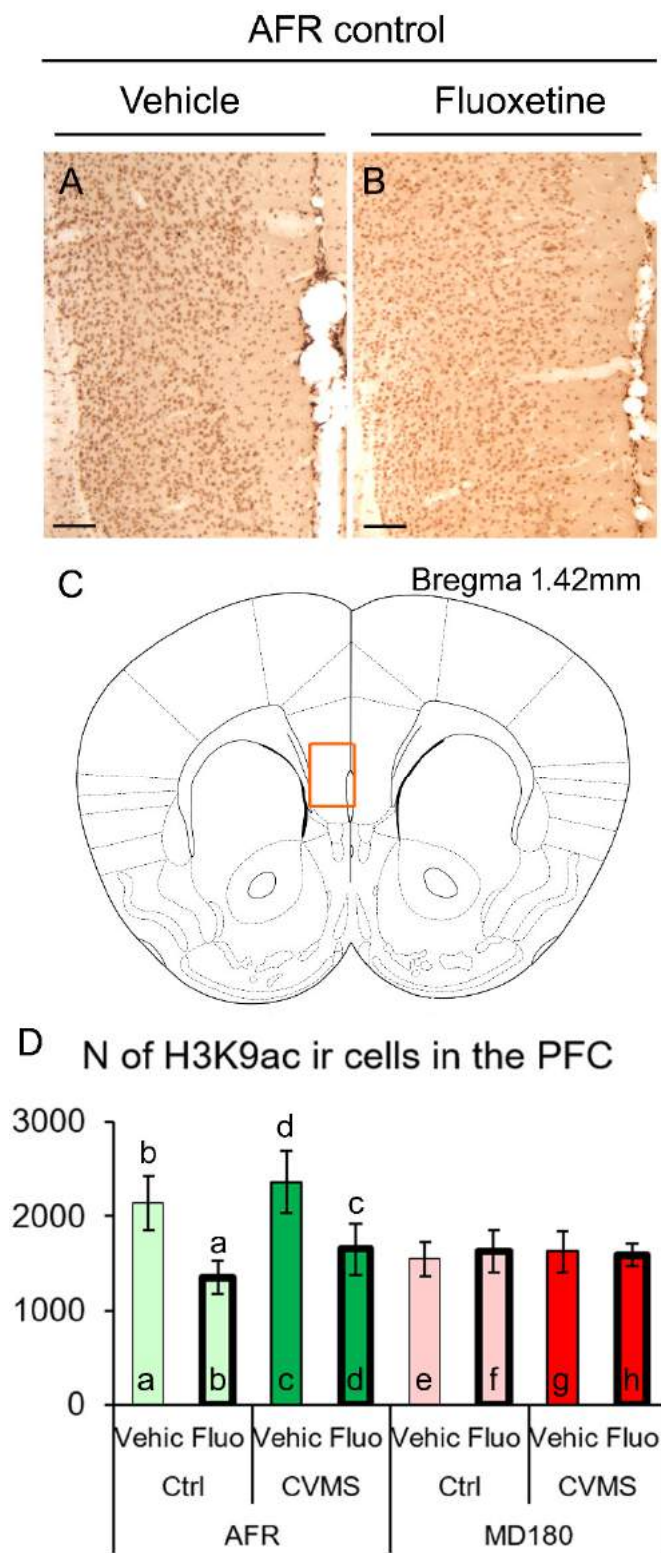


Figure 1. Acetyl-lysine 9 H3 histone (H3K9ac) immunoreactivity (ir) in the prefrontal cortex (PFC). Representative images illustrating H3K9ac-ir nuclei in the PFC of vehicle (Vehic) (A) and fluoxetine (Fluo)-treated PACAP heterozygous control (Ctrl) AFR mice. The imaged area shown in (A,B) corresponds to highlighted PFC region in (C) (scheme modified after Paxinos and Franklin [62]). Histogram (D) illustrates the dynamics of H3K9ac-ir cell counts. Lettering indicates the most relevant significant differences between pairs of groups, according to the post hoc tests (n = 4–6). AFR: animal facility rearing, CVMS: chronic variable mild stress, MD180: 180 min maternal deprivation. Bars: 100 μ m.

2.1.2. Hippocampus

In order to test the possible subdivision-specific epigenetic effects in our model on the hippocampus, we assessed the CA1 and CA3 regions, and DG.

In the CA1 region, the main effect of maternal care appeared to be significant ($F_{1,32} = 11.168$; $p = 0.002$). Additionally, a second-order effect of maternal care and stress ($F_{1,32} = 9.071$; $p = 0.005$) and, more importantly, a maternal care \times stress \times treatment triple interaction was seen ($F_{1,32} = 30.848$; $p < 10^{-5}$). In AFR mice, exposure to CVMS (bars "a" and "c" in Figure 2E, $p < 0.001$) reduced the H3K9ac immunosignal that was reversed by fluoxetine treatment (bars "c" and "d", $p = 0.001$). A history of MD180 was associated with lower H3K9ac-ir in the control mice (see bars "a" and "e" in Figure 2E, $p < 10^{-4}$). Interestingly, in the CA1 region, fluoxetine treatment (compare bars "e" and "f" in Figure 2E, $p < 10^{-4}$, as well as Figure 2A, C) and CVMS exposure (see bars "e" and "g" in Figure 2E, $p < 0.001$, as well as Figure 2A, B) increased the H3K9ac immunosignal. Fluoxetine treatment in the CVMS-exposed MD180 mice did not affect the H3K9ac-ir in the CA1 region (see columns "g" and "h" in Figure 2E, $p = 0.66$, and also images Figure 2B, D).

In the CA3 area, the main effect of maternal care ($F_{1,32} = 5.454$; $p = 0.026$) and a third-order effect of the maternal care \times stress \times treatment interaction ($F_{1,32} = 29.286$; $p < 10^{-5}$) influenced the histone acetylation significantly. Again, upon exposure to CVMS (bars "a" and "c" in Figure 2F, $p = 0.004$), AFR mice showed a lower H3K9ac immunosignal, and if they were treated with fluoxetine (bars "c" and "d", $p = 0.004$), the H3K9ac-ir was higher again. MD180 resulted in a relatively low signal in the vehicle-treated control mice (bars "a" and "e" in Figure 2F, $p < 10^{-4}$). Fluoxetine treatment increased the histone acetylation in MD180 control mice (compare bars "e" and "f" in Figure 2F, $p = 0.001$). Exposure to CVMS increased the H3K9ac-ir (see bars "e" and "g", $p < 0.001$), but if the fluoxetine treatment was administered in MD180 PACAP HZ mice upon CVMS exposure, which was the case that carried all three "hits", the histone acetylation appeared to be lower (compare bars "g" and "h" in Figure 2F, $p = 0.008$).

In the DG, the main effects of maternal care ($F_{1,32} = 30.65$; $p < 10^{-5}$) and stress ($F_{1,32} = 15.25$; $p < 0.001$) affected H3K9ac. MANOVA found that the interactions of maternal care \times stress ($F_{1,32} = 38.14$; $p < 10^{-5}$), stress \times treatment ($F_{1,32} = 15.83$; $p < 0.001$), as well as maternal care \times stress \times treatment ($F_{1,32} = 74.61$; $p < 10^{-6}$) influenced the histone acetylation in the DG. In AFR animals, the dynamics of H3K9ac-ir was similar to that we observed in the CA1 and CA3 regions: CVMS exposure reduced the immunosignal (bars "a" and "c" in Figure 2G, $p < 10^{-6}$), which was tendentially reversed by the fluoxetine administration (see bars "c" and "d" Figure 2G, $p = 0.079$). The control, vehicle-treated mice that experienced MD180 showed a reduced level of H3K9ac-ir (compare bars "a" and "e" in Figure 2G, $p < 10^{-6}$). The effect of fluoxetine treatment on the H3K9ac-ir depended on CVMS exposure in MD180 mice: in the control animals, fluoxetine treatment elevated the level of H3K9ac-ir (see bars "e" and "f", $p < 10^{-5}$), while in CVMS-exposed mice, the SSRI reduced the histone acetylation (compare bars "g" and "h" in Figure 2G, $p < 10^{-6}$).

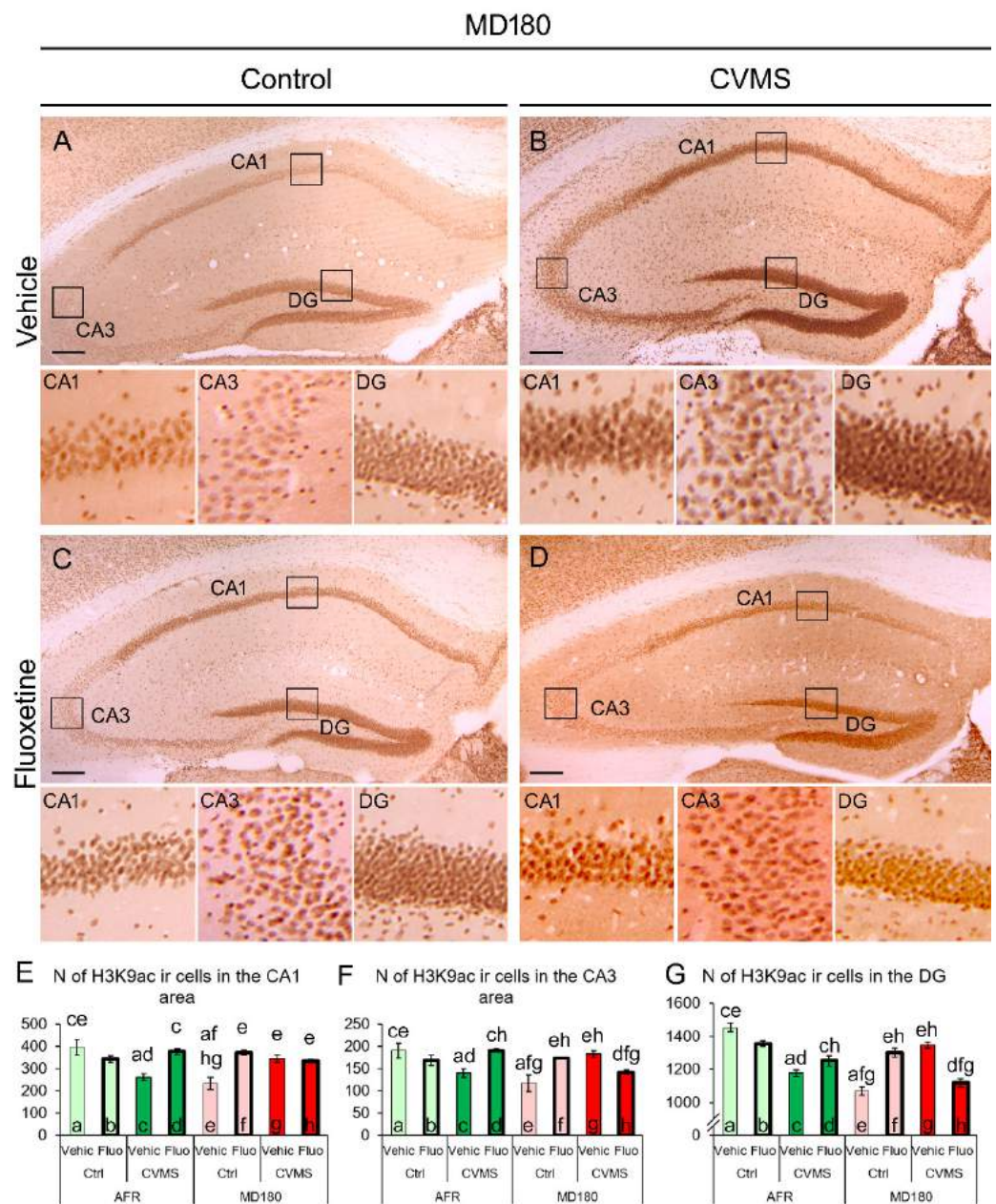


Figure 2. Acetyl-lysine 9 H3 histone (H3K9ac) immunoreactivity (ir) in the cornu ammonis (CA) 1, CA3, and dentate gyrus (DG) of the hippocampus. Representative images illustrate the H3K9ac-ir in vehicle (Vehic) (A) and fluoxetine (Fluo)-injected (C) control (Ctrl) and chronic variable mild stress (CVMS)-exposed vehicle (B) and fluoxetine-injected (D) mice with a history of maternal deprivation (MD180). Boxed areas are shown in higher magnification insets below the respective low magnification image. Histograms illustrate the dynamics of H3K9ac-ir in the CA1 (E), CA3 (F), and DG (G). Lettering indicates the most relevant significant differences between pairs of groups, according to the post hoc tests (n = 4–6). AFR: animal facility rearing. Bars: 200 μ m.

2.2. FOSB Immunoreactivity

The FOSB-ir was also quantified, to determine the neuronal activity in the PFC and the hippocampal areas. The FOSB-ir was successfully detected in the neuronal nuclei both in the PFC and the hippocampus.

2.2.1. Prefrontal Cortex

A relatively strong neuronal activity was observed in the PFC of all the mouse groups in this experiment. The main effect of stress ($F_{1,32}=28.601$; $p < 10^{-4}$), and the interaction of maternal care and stress ($F_{1,32}=5.078$; $p = 0.032$) exerted a significant effect on FOSB-ir. In AFR mice, CVMS exposure caused a significant elevation of the FOSB-ir in both the vehicle-treated (compare bars “a” and “c” in Figure 3I, $p < 0.001$, and Figure 3A with Figure 3C) and fluoxetine-treated mice (bars “b” and “d” in Figure 3I, $p < 0.001$, as well as panels in Figure 3B, D). If fluoxetine was administered in CVMS-exposed AFR mice (see bar “d” in Figure 3I and image Figure 3D), a higher ($p < 10^{-4}$) FOSB cell count was detected, compared with the control fluoxetine-treated AFR mice (see bar “b” in Figure 3I and image Figure 3C). Upon maternal deprivation, neither CVMS nor fluoxetine treatment influenced the FOSB-ir in the PFC (see bars “e-h” in Figure 3I; illustrated also in Figure 3E–H). The count of FOSB-ir cells in the stressed and fluoxetine-treated MD180 mice was much lower ($p = 0.002$) than that observed in the respective AFR groups (see bars “d” and “h” in Figure 3I and images Figure 3D, H).

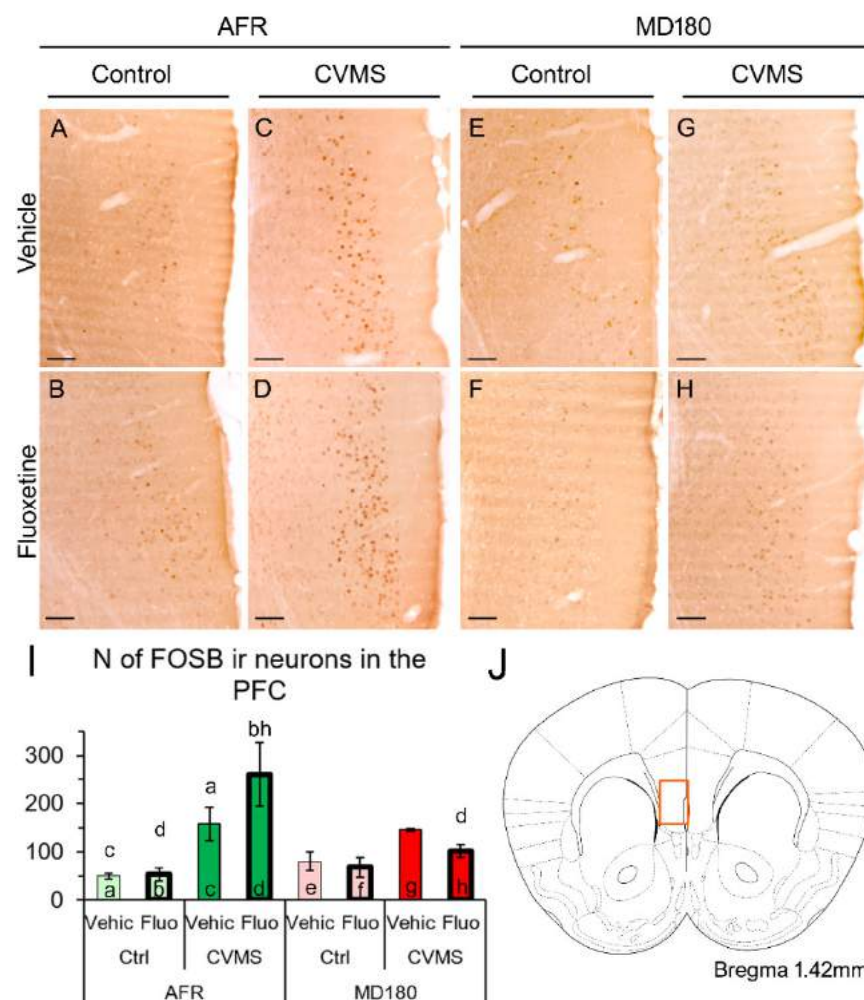


Figure 3. FOSB immunoreactivity (ir) in the prefrontal cortex (PFC). Representative images illustrate FOSB-ir in the PFC of vehicle (Vehic) (A) and fluoxetine (Fluo)-treated (B) control (Ctrl) as well as chronic variable mild stress-exposed (CVMS) and vehicle- (C) or fluoxetine-injected AFR mice. History of maternal deprivation (MD180) affected the FOSB-ir in the respective groups, as illustrated by images (E–H). The imaged area shown in (A–H) corresponds to the highlighted region of PFC in (J) (scheme modified after Paxinos and Franklin [62]). Histogram (I) illustrates the count of FOSB-ir cell nuclei. Lettering indicates the most relevant significant differences between pairs of groups, according to the post hoc tests ($n = 4–6$). AFR: animal facility rearing. Bars: 100 μ m.

2.2.2. Hippocampus

The FOSB-ir in the hippocampus was weaker than that observed in the PFC. While in the AFR groups, we detected low cell numbers, in MD180 mice, the signal became almost undetectable in all the subgroups.

In the CA1 area, the main effect of maternal care ($F_{1,32}=7.378$; $p = 0.010$) and the third-order effect of maternal care \times stress \times treatment interaction ($F_{1,32}=7.235$; $p = 0.011$) affected the FOSB-ir. In CVMS-exposed AFR mice, fluoxetine treatment reduced the FOSB-ir to an almost undetectable level (compare Figure 4A, B moreover bars “c” and “d” in Figure 4C, $p = 0.009$). In vehicle-treated, CVMS-exposed MD180 mice, the FOSB signal was also very low (compare bars “c” and “g”, $p = 0.027$), which could not be further reduced by fluoxetine administration (compare bars “g” and “h” in Figure 4C, $p = 0.51$).

In the CA3 area, ANOVA revealed the main effect of maternal care ($F_{1,32} = 5.118$; $p = 0.031$), as well as the stress \times treatment ($F_{1,32} = 11.70$; $p = 0.018$) and maternal care \times stress \times treatment ($F_{1,32} = 7.616$; $p = 0.009$) interactions, on FOSB-ir to be significant. In the control AFR mice, fluoxetine increased the FOSB cell count (compare bars “a” and “b” in Figure 4D, $p = 0.012$). CVMS exposure also increased the FOSB signal in AFR mice (compare bars “a” and “c” in Figure 4D, $p = 0.008$), while fluoxetine reduced this to the basal level (see bars “c” and “d” in Figure 4D, $p = 0.008$ and images Figure 4A, B). A history of MD180 exposure resulted in the complete absence of FOSB response to fluoxetine (compare bars “b” and “f” in Figure 4D, $p = 0.010$) or CVMS exposure (see columns “c” and “g” in Figure 4D, $p = 0.034$).

In the DG, the main effect of treatment ($F_{1,32}=7.086$; $p = 0.013$) and the triple interaction of maternal care, stress, and treatment ($F_{1,32}=9.267$; $p = 0.005$) influenced the FOSB signal significantly. In AFR mice, stress exposure increased the FOSB cell count (compare bars “a” and “c” in Figure 4E, $p = 0.042$), which was reversed by fluoxetine treatment (see columns “c” and “d” in Figure 4E, $p = 0.002$ and also images Figure 4A, B). In MD180 mice, there was some FOSB immunosignal detectable in vehicle-treated control mice (bar “e” in Figure 4E), but if MD180 mice were exposed to CVMS, the FOSB remained undetectable (compare bars “e” and “g” in Figure 4E, $p = 0.032$), which could not be further decreased by fluoxetine administration (see bars “g” and “h”, $p = 0.43$).

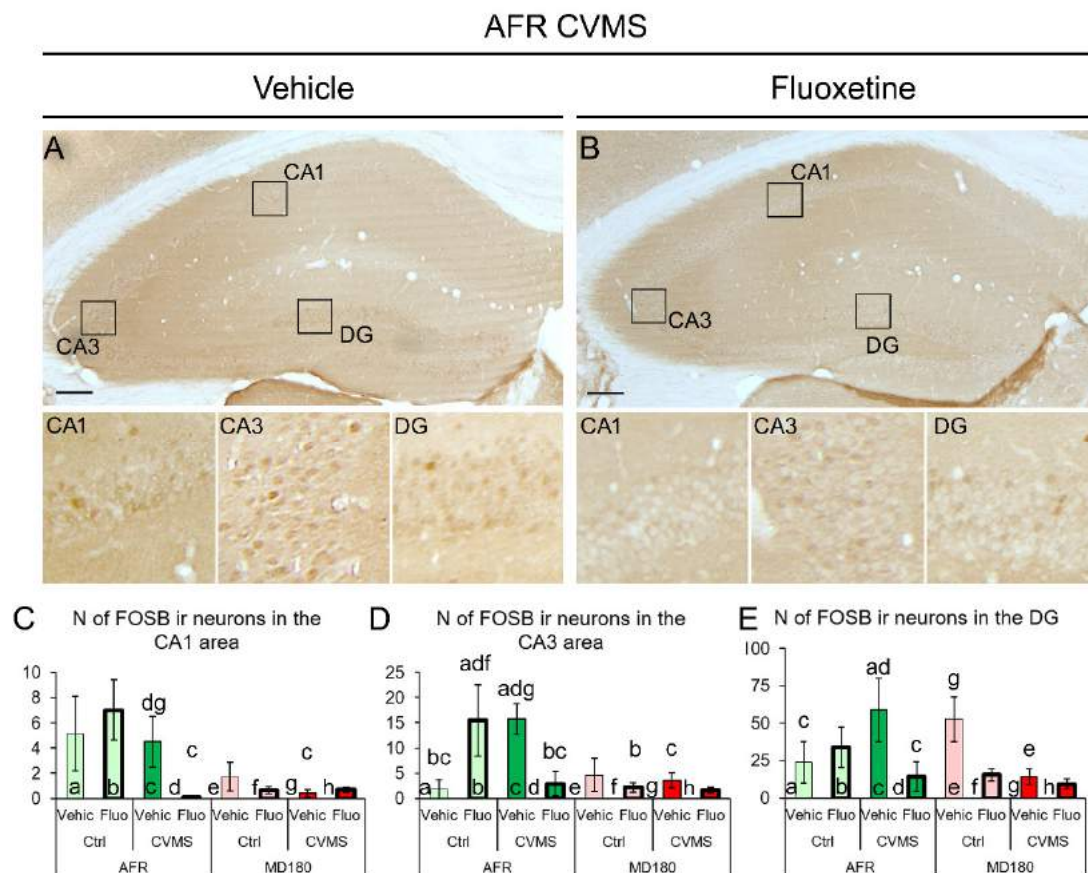


Figure 4. FOSB immunoreactivity (ir) in the cornu ammonis (CA) 1, CA3, and dentate gyrus (DG) of the hippocampus. Representative images illustrating FOSB-ir nuclei in the hippocampus of vehicle (Vehic) (A) and fluoxetine (Fluo)-treated (B) chronic variable mild stress (CVMS)-exposed animal facility-reared (AFR) mice. Note the relatively weak signal in these groups that became practically undetectable in the hippocampus of mice that earlier experienced maternal deprivation (MD180). Boxed areas are shown in higher magnification insets below the respective low magnification images. Histograms illustrate the count of FOSB-ir cell nuclei in CA1 (C), CA3 (D), and DG (E) of the hippocampus. Lettering indicates the most relevant significant differences between pairs of groups, according to the post hoc tests ($n = 4-6$). Ctrl: control, Bars: 200 μ m.

3. Discussion

In our recent studies, we demonstrated that our three-hit-theory-based animal model for depression fulfills the Willnerian construct and the face and predictive validity criteria including (a) the behavioral anomalies as assessed in depression and anxiety tests, (b) the functional–neuromorphological alterations in multiple limbic areas, and (c) the altered physical and endocrinological measures of the stress effect [6,21]. Here, we aimed to examine the functional–morphological changes in the PFC and hippocampus focusing on the epigenetic marker H3K9ac, and on the chronic neuronal activity indicator FOSB. Our results suggested that both limbic regions might contribute to the behavioral changes [5,6,21] observed in this model, as discussed below.

3.1. The H3K9ac-ir Is Affected by Both Maternal Deprivation and Fluoxetine Therapy

Histone acetylation is one of the commonly examined types of epigenetic modifications that do not affect the DNA sequence proper, but contribute to the control of gene expression [63]. The level of acetylation is determined by the dynamics of histone acetyltransferase and histone deacetylase enzymes [64]. In the PFC, we found that in AFR mice, fluoxetine treatment was associated with reduced H3K9ac-ir, but if the mice underwent MD180, a lower H3K9ac level was seen that was not affected by fluoxetine therapy. This

suggests that fluoxetine therapy and early life stress interact in the PFC, which is in line with an earlier study [65]. However, in contrast to our findings, Levine et al. [65] found that fluoxetine therapy potentiated epigenetic changes. This discrepancy may be explained by the difference in the examined histone acetylation site at histone H4. Meanwhile, in another laboratory, Robinson et al. [66] also found that chronic fluoxetine exposure reduced epigenetic changes in the nucleus accumbens.

The dynamics of the hippocampal H3K9ac-ir differed from that in the PFC. MD180 reduced histone H3 acetylation in all the hippocampal divisions, which is in agreement with the work of Sun et al. [58]. CVMS reduced the H3K9ac-ir in the vehicle-treated AFR mice in all the examined hippocampal subdivisions. This is in agreement with an earlier rat study [59], except for the CA1, where no change was found by Ferland and Schrader [59]. Fluoxetine increased the H3K9ac-ir in mice that earlier experienced CVMS. This is well-comparable with the findings by Hunter et al. [60], according to which the methylation of this histone was evaluated. Our present study showed that in the CVMS-exposed mice that also suffered MD180, the acetylation-increasing effect of fluoxetine was abolished in the CA1 and was inverted into a decreasing effect in the CA3 and DG. This, in our model, suggests that the efficacy of antidepressants may depend on the number of risk factors and the epigenetic status that the model animal model carries. This ultimately may underline the importance of the individualized therapeutic approach in the management of depression to increase the efficacy of pharmacotherapy.

3.2. FOSB Reactivity to CVMS Is Influenced Both by Maternal Care Quality and SSRI Treatment

FOSB is a commonly used neuronal activity marker in stress research reflecting that the cellular response to a particular stimulus requires a response at the level of gene transcription [6,9,47,67–70]. The antibody used here recognizes both the full-length FOSB and its variant, the deltaFOSB [70], both of which contribute to the transcription factor activator protein 1 complex. These two isoforms differ in their dynamics: Full-length FOSB displays a faster acute response to stress exposure, but it is eliminated in a shorter period of time [47]. In contrast, if the stimulus was repeated, the deltaFOSB accumulates in the cells and can be detected even after a week [47]. Considering the shorter half-life of the full-length FOSB, and because in this study, the mice were perfused one day after the last stress exposure, the detected FOSB protein signal should correspond to the delta isoform, which mirrors chronic neuronal activation [47,62,65,69,71].

The phenomenon that chronic stress exposure increases the FOSB-ir in the PFC is well-known [62,71–73], and it is in full agreement with our findings in the vehicle-treated CVMS-exposed mice. Fluoxetine treatment per se was also shown to increase the FOSB content in the PFC [74]; however, in the present work, this increase remained below the significant level, which could be explained by the shorter treatment period (i.e., 14 vs. 20 days). Importantly, we observed here that if CVMS exposure was superimposed on the history of MD180, neither CVMS nor fluoxetine therapy elevated the FOSB activity in the PFC. This phenomenon may have great translational relevance, as FOSB-related transcriptional changes were suggested to determine therapeutic efficacy in the management of major depression [74].

As the history of MD180 was associated with a very low, almost undetectable FOSB signal in the hippocampus, it has to be stated that there was not much space for the SSRI treatment to reduce the FOSB-ir. One may argue that a technical error may have occurred that prevented the immunolabeling, but because the PFC sections of the same animals in the same staining process gave a reliable signal, we assume that the low hippocampal FOSB-ir in MD180 mice is a true area-specific observation. An alternative interpretation of this phenomenon could be that the effect of the fluoxetine treatment cannot be detected by FOSB labeling upon MD180, but other markers may still mirror the effect of SSRI treatment [41–43]. Nevertheless, this idea is also supported by our findings in the H3K9ac labeling.

3.3. Limitations

Taking the complexity of the model and the capacity limitations of our animal facility into consideration, we had to restrict the study to male animals. Considering that the examined brain areas are estrogen-sensitive [75,76], the effect of the estrous cycle could have influenced the results by increasing the error due to the random estrous cycle phase of the mice at the time of tissue collection. A regular follow-up examination of the cycle phase in mice by collecting vaginal smears would have also caused an additional stress factor. Therefore, it is a true limitation of this study that we do not know whether the present findings would be characteristic of the examined brain regions in female animals.

In this study, we did not examine the histochemical characteristics of the cells that gave a positive signal for H3K9ac and FOSB. Further co-localization studies have to determine if there is a cell-type-specific alteration in the histone acetylation or neuronal activity pattern in the PFC and the hippocampal subdivisions. Considering that for some types of neurons, the expression of the neuronal activity marker immediate early genes is not characteristic [77,78], we cannot rule out that the pattern of the neuronal activity would show a different picture if we had used an alternative marker instead of FOSB. The other disadvantage of FOSB labeling is that it does not detect potentially very important functional changes with inhibitory nature [79,80], suggesting that the reduced activity and/or gene expression in the examined areas may have occurred. Based on the current findings, further investigations are required to examine how neuroinflammatory mechanisms contribute to the functional changes in the PFC and the hippocampus. Additionally, multiple other indicators of stress effect may be examined in the PFC and the hippocampus, including neurotrophins [81,82] and neurogenesis [83], to further dissect the underlying mechanisms.

Several lines of epigenetic markers have been identified in the past [43,84], and this study was restricted to H3K9ac. In order to gain deeper insight into possible changes at the gene expression level, the examination of multiple markers would be beneficial, and in some selected cell types, promoter-specific studies would be required to test how they are affected in this model [70].

3.4. Conclusion

With respect to the limitations of this study, our three-hit concept-based mouse model for depression in male PACAP HZ mice [5,6,21] reproducibly fulfills the Willnerian criteria [28] of a reliable animal model in male mice at the behavioral, endocrinological [21] and functional–morphological level. In this study, we showed that the pattern of both H3K9ac and FOSB-ir is modulated in a brain-area-specific manner by early life stress and chronic stress in later life, and they interact with the effect of fluoxetine therapy. Considering the complex epigenetic and neuronal activity changes in our model, and taking the significance of the PFC and the hippocampus [31] in mood control into consideration, we conclude that these limbic centers might contribute to the depression-like phenotype [21], further supporting the reliability of our model in male mice.

4. Materials and Methods

4.1. Animals and Experimental Design

The experimental design corresponds to our most recently published works [6,21]. Briefly, male and female PACAP HZ mice were paired, and seventeen litters born within 3 days were used. Litter differences were prevented by cross-fostering on postnatal day (PD) 1. Seven dams with the offspring were subjected to normal animal facility rearing (AFR) protocol. In the case of 10 litters, on PD 1–14, the dam was removed for 180 minutes in order to cause maternal deprivation (MD180). During this period, the pups with the nesting material were placed on a heating plate at 32 °C. The adult offspring was tail-clipped on PD 70, for genotyping via PCR (for details, see [8]).

In total, 17 PACAP HZ male mice were identified in the AFR litters, while 25 PACAP HZ male mice were found in the MD180 litters. We did not use the female offspring in this study, and we also excluded the wild-type and PACAP KO mice, based on our earlier findings [5,6,21].

Both AFR and MD180 mice were randomly assigned to four subgroups, as shown in Table 1. We exposed four subgroups (c, d, and g, h, in Table 1) of the adult offspring to CVMS between PD125 and PD139. In the CVMS protocol, we applied both a mid-day stressor (i.e., tilted cage placement, exposure to a dark room, or placing the cage of the animals on an orbital laboratory shaker) and a challenge in the dark phase (wet nesting material, individual caging of mice as social isolation, or group holding). As controls to the CVMS, four subgroups (a, b, and e, f in Table 1) were left undisturbed. For further technical details on the CVMS protocol, see [5,6,21].

Half of the subgroups (b, d, f, h) were treated with intraperitoneal (ip) fluoxetine (20 mg/kg/day in 0.2 mL saline during the 14 days period of CVMS exposure) injections. The mice in subgroups a, c, e, and g received physiological saline (0.2 mL vehicle ip) injections. Each group (i.e., a–h) consisted of 4–6 animals.

Table 1. Experimental design. Lettering (a–h) and the background color of cells in the “group” row correspond to the labeling of bars in Figures 1–4. Green: animal-facility-reared (AFR) groups; red: groups with history of maternal deprivation (MD180). Control (light shade) and chronic variable mild stress (CVMS)-exposed (dark shade) groups were subdivided into vehicle- and fluoxetine-treated subgroups (thick black frames).

group	AFR				MD180			
	Control		CVMS		Control		CVMS	
	Vehicle	Fluoxetine	Vehicle	Fluoxetine	Vehicle	Fluoxetine	Vehicle	Fluoxetine
a	b	c	d	e	f	g	h	

The mice were kept under standard housing conditions (24 °C, 50% air humidity, 12/12-hour light–dark phases with lights on from 6 am), at the animal facility of the Department of Anatomy, the University of Pécs, in standard (30 cm × 30 cm × 28 cm) polycarbonate cages with 4–5 mice per cage group. The mice had ad libitum access to drinking water and normal standard rodent chow and were placed on fresh nesting material in a clean cage every other day.

4.2. Perfusion and Sample Preparation

In this work, the stored brain tissue samples collected in our most recent study [21] were used. The mice were quickly euthanized using an overdose of urethane injection (ip; 2.4 mg/kg) on PD140, and they were transcardially perfused with 20 mL of 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and with 150 mL 4% paraformaldehyde in a Millonig buffer (pH 7.4) for 20 min [85]. Subsequently, the brains were collected, postfixed, and coronally sectioned using a vibratome (Leica VT1000 S, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Then, 30 µm thick sections were collected in four representative series. Free-floating sections were immersed and stored in an anti-freeze solution at –20 °C until labeling.

Immunolabeling was performed on manually selected sections based on the *Mouse Brain Atlas* by Paxinos and Franklin [62]. The brain sections between Bregma +1.34 mm and +1.94 mm were used to study the PFC. The coronal planes between Bregma –1.58 mm and –2.18 mm were selected to examine the hippocampus.

4.3. Free-Floating Immunocytochemistry for H3K9ac and FOSB by Diaminobenzidine

The sections were rinsed 4×15 min in PBS, permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 1 hour, and blocked with 2% normal goat serum (NGS) (Jackson ImmunoResearch). Then, the sections were placed into a solution of 2% NGS containing anti-acetyl-lysine 9 H3 histone antibodies (1:4000, Sigma-Aldrich; Cat# SAB4500347; RRID: AB_10742909) or into a 2% NGS solution of rabbit anti-FOSB antiserum (1:500, Santa Cruz, sc-48, RRID: AB_631515, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz CA, USA), followed by overnight incubation at 20 °C. Upon washes in PBS, a biotinylated goat anti-rabbit IgG solution was applied for 1 hour (diluted to 1:200, Vectastain ABC Elite Kit, Vector Labs., Burlingame, CA, USA). Subsequently, after rinsing in PBS, the preparations were treated for 1 hour with a peroxidase-conjugated avidin–biotin complex (Vectastain ABC Elite Kit). After further PBS washes, the antibody binding was visualized in a Tris buffer (pH 7.4) containing 0.02% 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich) and 0.03% (w/v) H₂O₂. The reaction was controlled by visual observation in a light microscope and stopped in PBS after 7 min. After several PBS washes, the preparations were mounted on gelatinized slides, air-dried, and dehydrated in ethanol solutions (50%, 70%, 96%, absolute ethanol, 5 min, respectively). After clearing in xylene (2×10 min), the sections were cover-slipped with Depex (Fluka, Heidelberg, Germany).

The H3K9ac antiserum was raised in the rabbit using a synthetic peptide (range of residues 3-52), including the acetylation site at Lys9 in histone H3. The manufacturer published that the serum is specific to mice (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sab4500347?lang=hu®ion=HU>, accessed on 1 October 2022). The FOSB serum (Santa Cruz, sc-48) was generated also in the rabbit, immunized with a C-terminal part of human FOSB protein. This serum was also characterized earlier by our group [6,9,21,70]. The omission of the primary and secondary serum and their replacement with normal serum did not give any recognizable immunosignal in the randomly selected sections of the tissue samples examined in this study. The preabsorption of the antibodies to the synthetic blocking peptides abolished the immunosignal [6,9,21].

4.4. Microscopy, Digital Imaging, and Morphometry

Microscopic preparations were evaluated and digitalized with a Nikon Microphot FXA microscope using a Spot RT camera (Nikon, Tokyo, Japan). From all mouse brains, five selected coronal sections of the PFC and the hippocampus were imaged. The count of immunoreactive nuclei was determined using the manual cell counting multipoint tool of ImageJ software (v1.42, NIH, Bethesda, MD) in non-edited images. All data were collected by an expert neurohistologist colleague who was not informed about the identity of the preparations.

In the case of the PFC, the whole cross-sectional surface area of the PFC in an area of $500 \mu\text{m} \times 750 \mu\text{m}$ (Figure 1C) was evaluated. In the case of the hippocampus, the immunoreactive nuclei were counted in a $1200 \mu\text{m}$ range in the pyramidal layer of CA1 and CA3 regions. In the DG, a $1200 \mu\text{m}$ range of the granular layer was evaluated. The cell counts were averaged from five digital images per brain area, and this number represented the brain area of one animal in the statistics.

For publication purposes, the selected representative images were contrasted, cropped, and edited into photo montages using Photoshop software (Adobe, San Jose, CA, USA).

4.5. Statistics

All data are presented as the mean of the group. The error bars depict the standard error of the mean in all graphs. The statistical evaluation was carried out using Statistica software (v8.0; StatSoft, Tulsa, OK, USA). Few data points beyond the two sigma range were excluded from the assessment. After testing for normality by Shapiro–Wilk test [86] and homogeneity using Bartlett's chi-square test [87], the data were subjected to a

multifactorial analysis of variance (MANOVA) with the categorical predictors “maternal care”, “stress”, and “treatment”. In the case of significant main effects and/or interactions, the differences between the pairs of groups were further assessed by Fisher’s post hoc tests ($\alpha < 5\%$). A logarithmic data transformation was applied if the datasets did not show normal distribution.

Author Contributions: T.G. performed the animal experiments and imaging, evaluated the results and statistics, and wrote the first draft of the manuscript. J.F., D.K., B.U., N.F. and L.Á.K. performed animal experiments, immunolabeling, and cell counting. H.H. and D.R. provided the genetically modified mice and contributed to the manuscript. V.K. contributed to the planning of study design, result assessment, and writing. B.G. created the study design, contributed to animal experiments, tissue sampling, data analysis, and statistics, prepared the figures, and supervised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project (TKP2021-EGA-16) was implemented with the support provided by the National Research, Development, and Innovation Fund of Hungary, financed under the TKP2021-EGA funding scheme and also under the 2020-4.1.1-TKP2020 funding scheme (Project No: TKP2020-IKA-08). Our work was also supported by the Hungarian Scientific Research Fund (NKFIH, PD100706, and FK124188) to B.G. V.K. was sponsored by research grants from the Medical Faculty, University of Pécs (KA-2019-12), National Research, Development, and Innovation Fund (ÚNKP-22-5-PTE-1740) and by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences (BO/00750/22/5). N.F. was supported by research grants from the Pécs University Medical School KA-2020-03, and the New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology from the source of the National Research, Development, and Innovation Fund (ÚNKP-20-4-II-PTE-547). This work was also financed by NAP 2017-1.2.1-NKP-2017-00002 and MTA-TKI14016.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation in Hungary, and the Animal Welfare Committee at Pécs University. Based on these approvals, the licence (protocol code: BA02/2000-39/2016, date: 12 December 2016) was issued by the National Food Chain Safety Office in Hungary.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The raw data collected in this study are available upon request from the corresponding author.

Acknowledgments: Authors are thankful for the excellent technical help of Izabella Orbán.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. WHO. 2021. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression> (accessed on 1 October 2022).
2. Park, C.; Rosenblat, J.D.; Brietzke, E.; Pan, Z.; Lee, Y.; Cao, B.; Zuckerman, H.; Kalantarova, A.; McIntyre, R.S. Stress, epigenetics and depression: A systematic review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2019**, *102*, 139–152. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.04.010>.
3. De Kloet, E.R.; DeRijk, R.H.; Meijer, O.C. Therapy insight: Is there an imbalanced response of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in depression? *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **2007**, *3*, 168–179.
4. Daskalakis, N.P.; Bagot, R.C.; Parker, K.J.; Vinkers, C.H.; de Kloet, E.R. The three-hit concept of vulnerability and resilience: Toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology* **2013**, *38*, 1858–1873. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.06.008>.
5. Farkas, J.; Kovacs, L.Á.; Gaszner, T.; Gaszner, B. Using PACAP heterozygous mice as models of the three hit theory of depression. In *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide—PACAP*; Reglődi, D., Tamás, A., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2016; pp. 731–741.
6. Farkas, J.; Kovács, L.; Gáspár, L.; Nafz, A.; Gaszner, T.; Ujvári, B.; Kormos, V.; Csernus, V.; Hashimoto, H.; Reglődi, D.; et al. Construct and 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.04.019>.
7. Hashimoto, H.; Shintani, N.; Tanida, M.; Hayata, A.; Hashimoto, R.; Baba, A. PACAP is Implicated in the Stress Axes. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 985–989. <https://doi.org/10.2174/138161211795589382>.
8. Gaszner, B.; Kormos, V.; Kozicz, T.; Hashimoto, H.; Reglodi, D.; Helyes, Z. The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger–Westphal nucleus, ventral lateral septum, and dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* **2012**, *202*, 283–299. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.046>.

9. Kormos, V.; Gáspár, L.; Kovács, L.; Farkas, J.; Gaszner, T.; Csernus, V.; Balogh, A.; Hashimoto, H.; Reglódi, D.; Helyes, Z.; et al. 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.004>.
10. Agarwal, A.; Halvorson, L.M.; Legradi, G. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mimics neuroendocrine and behavioral manifestations of stress: Evidence for PKA-mediated expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene. *Mol. Brain Res.* **2005**, *138*, 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.03.016>.
11. Stroth, N.; Eiden, L. Stress hormone synthesis in mouse hypothalamus and adrenal gland triggered by restraint is dependent on pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide signaling. *Neuroscience* **2010**, *165*, 1025–1030. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.11.023>.
12. Stroth, N.; Holighaus, Y.; Ait-Ali, D.; Eiden, L.E. PACAP: A master regulator of neuroendocrine stress circuits and the cellular stress response. *Ann. New York Acad. Sci.* **2011**, *1220*, 49–59. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.05904.x>.
13. Tsukiyama, N.; Saida, Y.; Kakuda, M.; Shintani, N.; Hayata, A.; Morita, Y.; Tanida, M.; Tajiri, M.; Hazama, K.; Ogata, K.; et al. PACAP centrally mediates emotional stress-induced corticosterone responses in mice. *Stress* **2011**, *14*, 368–375. <https://doi.org/10.3109/10253890.2010.544345>.
14. Pinhasov, A.; Neshet, E.; Gross, M.; Turgeman, G.; Kreinin, A.; Yadid, G. The Role of the PACAP Signaling System in Depression. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 990–1001. <https://doi.org/10.2174/138161211795589328>.
15. Reglodi, D.; Kiss, P.; Lubics, A.; Tamas, A. Review on the Protective Effects of PACAP in Models of Neurodegenerative Diseases In Vitro and In Vivo. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 962–972. <https://doi.org/10.2174/138161211795589355>.
16. Reglodi, D.; Kiss, P.; Szabadfi, K.; Atlasz, T.; Gabriel, R.; Horvath, G.; Szakaly, P.; Sandor, B.; Lubics, A.; Laszlo, E.; et al. PACAP is an Endogenous Protective Factor—Insights from PACAP-Deficient Mice. *J. Mol. Neurosci.* **2012**, *48*, 482–492. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9762-0>.
17. Kormos, V.; Gaszner, B. Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: From animals to humans. *Neuropeptides* **2013**, *47*, 401–419. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2013.10.014>.
18. Hammack, S.E.; May, V. Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide in Stress-Related Disorders: Data Convergence from Animal and Human Studies. *Biol. Psychiatry* **2015**, *78*, 167–177. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.12.003>.
19. Lutfy, K.; Shankar, G. Emerging evidence for the role of pituitary adenylate cyclase-activating peptide in neuropsychiatric disorders. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2019**, *167*, 143–157. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.06.009>.
20. Boucher, M.N.; May, V.; Braas, K.M.; Hammack, S.E. PACAP orchestration of stress-related responses in neural circuits. *Peptides* **2021**, *142*, 170554. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170554>.
21. Gaszner, T.; Farkas, J.; Kun, D.; Ujvári, B.; Berta, G.; Csernus, V.; Füredi, N.; Kovács, L.; Hashimoto, H.; Reglódi, D.; et al. Fluoxetine treatment supports predictive validity of the three hit model of depression in male PACAP heterozygous mice and underpins the impact of early life adversity on therapeutic efficacy. *Front. Endocrinol.* **2022**, *13*, 995900. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.995900>.
22. Lange, U.C.; Schneider, R. What an epigenome remembers. *BioEssays* **2010**, *32*, 659–668. <https://doi.org/10.1002/bies.201000030>.
23. Ng, R.K.; Gurdon, J.B. Epigenetic inheritance of cell differentiation status. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 1173–1177. <https://doi.org/10.4161/cc.7.9.5791>.
24. Nestler, E.J. Stress makes its molecular mark. *Nature* **2012**, *490*, 171–172. <https://doi.org/10.1038/490171a>.
25. Raabe, F.J.; Spengler, D. Epigenetic Risk Factors in PTSD and Depression. *Front. Psychiatry* **2013**, *4*, 80. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2013.00080>.
26. Heim, C.; Binder, E.B. Current research trends in early life stress and depression: Review of human studies on sensitive periods, gene–environment interactions, and epigenetics. *Exp. Neurol.* **2012**, *233*, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.10.032>.
27. Willner, P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol. Stress* **2017**, *6*, 78–93. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.08.002>.
28. Willner, P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology* **1984**, *83*, 1–16. <https://doi.org/10.1007/bf00427414>.
29. Liu, W.; Ge, T.; Leng, Y.; Pan, Z.; Fan, J.; Yang, W.; Cui, R. The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex. *Neural Plast.* **2017**, *2017*, 6871089. <https://doi.org/10.1155/2017/6871089>.
30. Belleau, E.L.; Treadway, M.T.; Pizzagalli, D.A. The Impact of Stress and Major Depressive Disorder on Hippocampal and Medial Prefrontal Cortex Morphology. *Biol. Psychiatry* **2019**, *85*, 443–453. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.09.031>.
31. Treadway, M.T.; Waskom, M.L.; Dillon, D.G.; Holmes, A.; Park, M.T.; Chakravarty, M.M.; Dutra, S.J.; Polli, F.E.; Iosifescu, D.V.; Fava, M.; et al. Illness Progression, Recent Stress, and Morphometry of Hippocampal Subfields and Medial Prefrontal Cortex in Major Depression. *Biol. Psychiatry* **2015**, *77*, 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.06.018>.
32. George, M.S.; Ketter, T.A.; Post, R.M. Prefrontal cortex dysfunction in clinical depression. *Depression* **1994**, *2*, 59–72. <https://doi.org/10.1002/depr.3050020202>.
33. Pizzagalli, D.A.; Roberts, A.C. Prefrontal cortex and depression. *Neuropsychopharmacology* **2022**, *47*, 225–246.
34. Mayberg, H.S.; Liotti, M.; Brannan, S.K.; McGinnis, S.; Mahurin, R.K.; Jerabek, P.A.; Silva, J.A.; Tekell, J.L.; Martin, C.C.; Lancaster, J.L.; et al. Reciprocal limbic-cortical function and negative mood: Converging PET findings in depression and normal sadness. *Am. J. Psychiatry* **1999**, *156*, 675–682.
35. Ellenbogen, J.M.; Hurford, M.O.; Liebeskind, D.S.; Neimark, G.B.; Weiss, D. Ventromedial frontal lobe trauma. *Neurology* **2005**, *64*, 757. <https://doi.org/10.1212/wnl.64.4.757>.

36. Mayberg, H.S.; Lozano, A.M.; Voon, V.; McNeely, H.E.; Seminowicz, D.; Hamani, C.; Schwab, J.M.; Kennedy, S.H. Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Neuron* **2005**, *45*, 651–660.
37. Koenigs, M.; Grafman, J. The functional neuroanatomy of depression: Distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex. *Behav. Brain Res.* **2009**, *201*, 239–243. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.03.004>.
38. Albert, P.R.; Vahid-Ansari, F.; Luckhart, C. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: Pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT_{1A} receptor expression. *Front. Behav. Neurosci.* **2014**, *8*, 199. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00199>.
39. Ghosal, S.; Duman, C.H.; Liu, R.-J.; Wu, M.; Terwilliger, R.; Girgenti, M.J.; Wohleb, E.; Fogaca, M.V.; Teichman, E.M.; Hare, B.; et al. Ketamine rapidly reverses stress-induced impairments in GABAergic transmission in the prefrontal cortex in male rodents. *Neurobiol. Dis.* **2020**, *134*, 104669. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104669>.
40. Veeraiah, P.; Noronha, J.M.; Maitra, S.; Bagga, P.; Khandelwal, N.; Chakravarty, S.; Kumar, A.; Patel, A.B. Dysfunctional Glutamatergic and γ -Aminobutyric Acidergic Activities in Prefrontal Cortex of Mice in Social Defeat Model of Depression. *Biol. Psychiatry* **2014**, *76*, 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.09.024>.
41. Blendy, J.A. The role of CREB in depression and antidepressant treatment. *Biol. Psychiatry* **2006**, *59*, 1144–1150.
42. Yan, L.; Xu, X.; He, Z.; Wang, S.; Zhao, L.; Qiu, J.; Wang, D.; Gong, Z.; Qiu, X.; Huang, H. Antidepressant-Like Effects and Cognitive Enhancement of Coadministration of Chaihu Shugan San and Fluoxetine: Dependent on the BDNF-ERK-CREB Signaling Pathway in the Hippocampus and Frontal Cortex. *BioMed Res. Int.* **2020**, *2020*, 2794263.
43. Dionisie, V.; Ciobanu, A.M.; Toma, V.A.; Manea, M.C.; Baldea, I.; Olteanu, D.; Sevastre-Berghian, A.; Clichici, S.; Manea, M.; Riga, S.; et al. Escitalopram Targets Oxidative Stress, Caspase-3, BDNF and MeCP2 in the Hippocampus and Frontal Cortex of a Rat Model of Depression Induced by Chronic Unpredictable Mild Stress. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7483.
44. Baudin, A.; Blot, K.; Verney, C.; Estevez, L.; Santamaria, J.; Gressens, P.; Giros, B.; Otani, S.; Daugé, V.; Naudon, L. Maternal deprivation induces deficits in temporal memory and cognitive flexibility and exaggerates synaptic plasticity in the rat medial prefrontal cortex. *Neurobiol. Learn. Mem.* **2012**, *98*, 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.08.004>.
45. Hinwood, M.; Morandini, J.; Day, T.A.; Walker, F.R. Evidence that Microglia Mediate the Neurobiological Effects of Chronic Psychological Stress on the Medial Prefrontal Cortex. *Cereb. Cortex* **2012**, *22*, 1442–1454. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhr229>.
46. Kovács, K.J. Measurement of immediate-early gene activation-c-fos and beyond. *J. Neuroendocrinol.* **2008**, *20*, 665–672.
47. Nestler, E.J. Δ FosB: A transcriptional regulator of stress and antidepressant responses. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *753*, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.10.034>.
48. Sampath, D.; Sathyanesan, M.; Newton, S.S. Cognitive dysfunction in major depression and Alzheimer's disease is associated with hippocampal–prefrontal cortex dysconnectivity. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2017**, *13*, 1509.
49. Campbell, S.; MacQueen, G. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *J. Psychiatry Neurosci.* **2004**, *29*, 417–426.
50. Xu, L.; Anwyl, R.; Rowan, M.J. Behavioural stress facilitates the induction of long-term depression in the hippocampus. *Nature* **1997**, *387*, 497–500. <https://doi.org/10.1038/387497a0>.
51. Pittenger, C.; Duman, R.S. Stress, Depression, and Neuroplasticity: A Convergence of Mechanisms. *Neuropsychopharmacology* **2008**, *33*, 88–109. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301574>.
52. Czéh, B.; Michaelis, T.; Watanabe, T.; Frahm, J.; de Biurrun, G.; van Kampen, M.; Bartolomucci, A.; Fuchs, E. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 12796–12801. <https://doi.org/10.1073/pnas.211427898>.
53. Czéh, B.; Lucassen, P.J. What causes the hippocampal volume decrease in depression? *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **2007**, *257*, 250–260.
54. Masi, G.; Brovedani, P. The Hippocampus, Neurotrophic Factors and Depression. *CNS Drugs* **2011**, *25*, 913–931. <https://doi.org/10.2165/11595900-000000000-00000>.
55. Fuchs, E.; Czéh, B.; Kole, M.; Michaelis, T.; Lucassen, P.J. Alterations of neuroplasticity in depression: The hippocampus and beyond. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2004**, *14*, S481–S490. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2004.09.002>.
56. MacQueen, G.M.; Ramakrishnan, K.; Ratnasigan, R.; Chen, B.; Young, L.T. Desipramine treatment reduces the long-term behavioural and neurochemical sequelae of early-life maternal separation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2003**, *6*, 391–396. <https://doi.org/10.1017/S1461145703003729>.
57. Zhong, H.; Rong, J.; Zhu, C.; Liang, M.; Li, Y.; Zhou, R. Epigenetic Modifications of GABAergic Interneurons Contribute to Deficits in Adult Hippocampus Neurogenesis and Depression-Like Behavior in Prenatally Stressed Mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2020**, *23*, 274–285. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyaa020>.
58. Sun, H.; Zhang, X.; Kong, Y.; Gou, L.; Lian, B.; Wang, Y.; Jiang, L.; Li, Q.; Sun, H.; Sun, L. Maternal Separation-Induced Histone Acetylation Correlates with BDNF-Programmed Synaptic Changes in an Animal Model of PTSD with Sex Differences. *Mol. Neurobiol.* **2021**, *58*, 1738–1754. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02224-6>.
59. Ferland, C.; Schrader, L. Regulation of histone acetylation in the hippocampus of chronically stressed rats: A potential role of sirtuins. *Neuroscience* **2011**, *174*, 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.077>.
60. Hunter, R.G.; McCarthy, K.J.; Milne, T.A.; Pfaff, D.W.; McEwen, B.S. Regulation of hippocampal H3 histone methylation by acute and chronic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 20912–20917. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911143106>.
61. Perrotti, L.I.; Hadeishi, Y.; Ulery, P.G.; Barrot, M.; Monteggia, L.; Duman, R.S.; Nestler, E.J. Induction of Δ FosB in reward-related brain structures after chronic stress. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 10594–10602.

62. Paxinos, G.; Franklin, K.B.J. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2001.
63. Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **2007**, *128*, 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>.
64. Kuo, M.H.; Allis, C.D. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* **1998**, *20*, 615–626.
65. Levine, A.; Worrell, T.R.; Zimnisky, R.; Schmauss, C. Early life stress triggers sustained changes in histone deacetylase expression and histone H4 modifications that alter responsiveness to adolescent antidepressant treatment. *Neurobiol. Dis.* **2012**, *45*, 488–498. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.09.005>.
66. Robison, A.; Vialou, V.; Sun, H.-S.; LaBonte, B.; Golden, S.; Dias, C.; Turecki, G.; Tamminga, C.A.; Russo, S.; Mazei-Robison, M.; et al. Fluoxetine Epigenetically Alters the CaMKII α Promoter in Nucleus Accumbens to Regulate Δ FosB Binding and Antidepressant Effects. *Neuropsychopharmacology* **2014**, *39*, 1178–1186. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.319>.
67. Füredi, N.; Nagy, Á.; Mikó, A.; Berta, G.; Kozicz, T.; Pétervári, E.; Balaskó, M.; Gaszner, B. Melanocortin 4 receptor ligands modulate energy homeostasis through urocortin 1 neurons of the centrally projecting Edinger-Westphal nucleus. *Neuropharmacology* **2017**, *118*, 26–37.
68. Kovács, L.; Berta, G.; Csernus, V.; Ujvári, B.; Füredi, N.; Gaszner, B. Corticotropin-Releasing Factor-Producing Cells in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus and Extended Amygdala Show Age-Dependent FOS and FOSB/DeltaFOSB Immunoreactivity in Acute and Chronic Stress Models in the Rat. *Front. Aging Neurosci.* **2019**, *11*, 274. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00274>.
69. Kovács, L.Á.; Füredi, N.; Ujvári, B.; Golgol, A.; Gaszner, B. Age-Dependent FOSB/ Δ FOSB Response to Acute and Chronic Stress in the Extended Amygdala, Hypothalamic Paraventricular, Habenular, Centrally-Projecting Edinger-Westphal, and Dorsal Raphe Nuclei in Male Rats. *Front. Aging Neurosci.* **2022**, *14*, 862098.
70. Sterrenburg, L.; Gaszner, B.; Boerrigter, J.; Santbergen, L.; Bramini, M.; Elliott, E.; Chen, A.; Peeters, B.W.M.M.; Roubos, E.W.; Kozicz, T. Chronic Stress Induces Sex-Specific Alterations in Methylation and Expression of Corticotropin-Releasing Factor Gene in the Rat. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e28128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028128>.
71. Perrotti, L.; Weaver, R.; Robison, B.; Renthal, W.; Maze, I.; Yazdani, S.; Elmore, R.; Knapp, D.; Selley, D.; Martin, B.; et al. Distinct patterns of Δ FosB induction in brain by drugs of abuse. *Synapse* **2008**, *62*, 358–369. <https://doi.org/10.1002/syn.20500>.
72. Lehmann, M.L.; Herkenham, M. Environmental Enrichment Confers Stress Resiliency to Social Defeat through an Infralimbic Cortex-Dependent Neuroanatomical Pathway. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 6159–6173. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0577-11.2011>.
73. Laine, M.; Sokolowska, E.; Dudek, M.; Callan, S.-A.; Hyytiä, P.; Hovatta, I. Brain activation induced by chronic psychosocial stress in mice. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15061. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15422-5>.
74. Vialou, V.; Thibault, M.; Kaska, S.; Cooper, S.; Gajewski, P.; Eagle, A.; Mazei-Robison, M.; Nestler, E.J.; Robison, A. Differential induction of FosB isoforms throughout the brain by fluoxetine and chronic stress. *Neuropharmacology* **2015**, *99*, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.07.005>.
75. Shansky, R.M.; Hamo, C.; Hof, P.R.; Lou, W.; McEwen, B.S.; Morrison, J.H. Estrogen Promotes Stress Sensitivity in a Prefrontal Cortex-Amygdala Pathway. *Cereb. Cortex* **2010**, *20*, 2560–2567. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq003>.
76. Spencer, J.L.; Waters, E.M.; Romeo, R.D.; Wood, G.E.; Milner, T.A.; McEwen, B.S. Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. *Front. Neuroendocr.* **2008**, *29*, 219–237. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.08.006>.
77. Dragunow, M.; Faull, R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J. Neurosci. Methods* **1989**, *29*, 261–265. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(89\)90150-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(89)90150-7).
78. Hoffman, G.E.; Le, W.-W.; Abbud, R.; Lee, W.-S.; Smith, M.S. Use of Fos-related antigens (FRAs) as markers of neuronal activity: FRA changes in dopamine neurons during proestrus, pregnancy and lactation. *Brain Res.* **1994**, *654*, 207–215. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90481-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90481-2).
79. Bowers, G.; Cullinan, W.E.; Herman, J. Region-Specific Regulation of Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) mRNA Expression in Central Stress Circuits. *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 5938–5947. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-15-05938.1998>.
80. Choi, D.C.; Furay, A.R.; Evanson, N.K.; Ostrander, M.M.; Ulrich-Lai, Y.M.; Herman, J.P. Bed Nucleus of the Stria Terminalis Subregions Differentially Regulate Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity: Implications for the Integration of Limbic Inputs. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 2025–2034. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4301-06.2007>.
81. Troubat, R.; Barone, P.; Leman, S.; Desmidt, T.; Cressant, A.; Atanasova, B.; Brizard, B.; El Hage, W.; Surget, A.; Belzung, C.; et al. Neuroinflammation and depression: A review. *Eur. J. Neurosci.* **2021**, *53*, 151–171.
82. Dwivedi, Y. Brain-derived neurotrophic factor: Role in depression and suicide. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2009**, *5*, 433–449. <https://doi.org/10.2147/ndt.s5700>.
83. Snyder, J.S.; Soumier, A.; Brewer, M.; Pickel, J.; Cameron, H.A. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature* **2011**, *476*, 458–461.
84. Saavedra, K.; Molina-Márquez, A.M.; Saavedra, N.; Zambrano, T.; Salazar, L.A. Epigenetic Modifications of Major Depressive Disorder. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1279. <https://doi.org/10.3390/ijms17081279>.
85. Szabó, T.; Kormos, V.; Rékási, Z.; Gaszner, B. Epineural Methylene Blue Injection May Aid Localization of Digital Nerves in Dupuytren's Surgery. *Eur. Surg. Res.* **2021**, *63*, 105–113. <https://doi.org/10.1159/000519666>.
86. Shapiro, S.S.; Wilk, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* **1965**, *52*, 591–611.
87. Snedecor, G.W.; Cochran, W.G. *Statistical Methods*, 1st ed.; Iowa State University Press: Ames, IA, USA, 1989.