

A bed nucleus of stria terminalis szerepe a tanult és veleszületett félelmi válaszokban

Doktori tézisek

Bruzsik BÍborka

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tóth Máté, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Gyertyán István, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Hernádi István, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Réthelyi János, MD., Ph.D., egyetemi tanár,
klinikaigazgató

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Bódizs Róbert, Ph.D., tudományos főmunkatárs, kutatási
igazgatóhelyettes
Dr. Tóth Attila, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Varga Balázs, Ph.D., tudományos munkatárs

Budapest
2022

1. BEVEZETÉS

A félelem egy alapvető érzélem, mely olyan védekező viselkedési formákhoz vezet, ami a környezeti veszélyek, agresszió és abiotikus fenyegetések okozta sérülések kivédésével segíti az egyed túlélését. A félelemkeltő ingerek lehetnek veleszületetten averzívak vagy korábbi negatív életeseményeken alapuló tanulás során válnak fenyegetővé. Mindkét fenti típusra igaz, hogy csak bizonyos környezetben és közelségben jelentenek valódi veszélyt. Ennél fogva, a fenyegetésre mutatott érzelmi válaszok korrelálnak a fenyegetettség közelségével, és a potenciális, távoli veszélyek okozta szorongás a fenyegetettség fokozódásával félelembe vagy pánikba megy át. A fenyegető környezeti ingerek elkerülése, illetve az ezek megköveteltetésére készülő belső szükségletek folyamatos csereviszonyban állnak. Mind a félelem nélkülség, mind az állandósult szorongás végzetes lehet a túlélés szempontjából, így a fenyegető ingerek korai észrevétele és a fenyegetettség mértékének felmérése elengedhetetlen a döntéshozatalhoz. Ezen funkciók zavara sokszor olyan patológiás állapotokat idéznek elő, mint a szorongásos kórképek és a poszttraumás stressz zavar, amelyekre jellemző a veszélyt és biztonságot jelentő ingerek megkülönböztetésére való csökkent képesség, fokozott éberségi állapot és alacsony ingerküszöb az enyhe fenyegetések kiváltotta félelmi válaszra, illetve a perzisztens, nehezen kioltható félelmi emléknymok berögzülése.

A félelem és szorongás idegrendszeri alapjai nem egyértelműen elkülöníthetőek. Egy az irodalomban sokáig általánosan elfogadott munkahipotézis szerint a centrális amygdala csak az akut félelmi válaszban játszik szerepet, ezzel szemben a tartós szorongásszerű viselkedés kiváltása mögött a bed nucleus of stria terminalis (röviden BNST) elhúzódo aktivitása áll. Ma már tudjuk, hogy ez a hipotézis nem állja meg maradéktalanul a helyét, ugyanis újabb eredmények szerint a centrális amygdala és a BNST egyaránt befolyásolhatja a félelmet, stresszvásazt, illetve a szorongást is. Az utóbbi évtizedben vált lehetővé, hogy a humán BNST-t funkcionális képalkotó eljárásokkal is vizsgálják, mely eredmények azt mutatják, hogy a BNST aktiválódo, mind veleszületett, mind tanult fenyegető ingerekre, mely fokozódo azok közeledésével, sőt elhúzódo aktivitást mutat nem egyértelmű fenyegetettség esetén. Mindezek azt sejtetik, hogy a BNST-nek az anticipátoros félelemben és védekező válaszok szervezésében is szerepet játszik. Ennek megfelelően szorongásos zavarokban a BNST hiperaktivitást mutat fenyegető kontextusban.

A BNST és a centrális amygdala az ún. kiterjesztett amygdala része, utalva ezen agyterületek anatómiai és funkcionális hasonlóságaira. A BNST anatómiailag, sejtípusok

szintjén nagyon hasonló a centrális amygdalához, mindkét struktúra striatális eredetű és főleg gátló GABA-erg sejteket tartalmaz, melyek rendkívül nagy heterogenitást mutatnak a neuropeptid expressziójuk alapján. Feltehetőleg ezek a neurokémiailag különböző neuronok funkcionális szerepükben is eltéréseket mutatnak, mint azt a centrális amygdala egyes sejtípusairól már leírták, azonban a BNST szintjén kevés tanulmány vizsgálódott eddig sejtspecifikus szinten.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy a bed nucleus of stria terminalis (BNST) milyen szerepet játszik a tanult és veleszületett félelmi válaszok szabályozásában.

Ennek megválaszolására kemogenetikailag moduláltuk a BNST specifikus sejtcsoportjait az alábbi kérdéseket vizsgáló kísérletekben:

2.1. A BNST szerepe a félelmi tanulásban:

- 2.1.1.** A kondicionált félelem mely fázisait (megszerzés, konszolidáció, előhívás) szabályozza a BNST?
- 2.1.2.** A tanult félelmi válaszok mely aspektusait modulálja a BNST (pl. kontextuális vagy kulcsingerfüggő félelmi válasz, félelmi generalizáció, kioltódás)?
- 2.1.3.** A BNST szomatosztatint (SST) és kortikotropin-felszabadító hormont (CRH) kifejező sejtjei, hogyan befolyásolják a félelmi emléknymok berögzülését?
- 2.1.4.** A félelmi hálózat egyéb területeinek aktivitását hogyan befolyásolja a BNST konszolidáció alatt?

2.2. A BNST szerepe a veleszületett félelemben:

- 2.2.1.** A fenyegetettség (ragadozószag) intenzitása befolyásolja-e a BNST hatását a félelmi válasz modulálására?
- 2.2.2.** A BNST szomatosztatint és kortikotropin-felszabadító hormont kifejező sejtjei, hogyan befolyásolják a magas, illetve alacsony predációs veszélyre mutatott félelmi válaszokat?

3. MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok

A kísérleteket felnőtt (>8 hetes), hím laboratóriumi egereken végeztük. Az egyes kísérletekben az alábbi törzseket használtuk: C57Bl/6J, vgat-ires-cre, crh-ires-cre és sst-ires-cre egerek (Jackson Laboratory). Az állatokat 3-4-es csoportokban standard körülmények között tartottuk (07.00-19.00 világos szakasz, hőmérséklet $22 \pm 1^\circ\text{C}$, a táp és a víz szabadon hozzáférhető). A viselkedésvizsgálatokat a sötétszakasz első 4 órájában végeztük. Az egereket 3 nappal a félelmi kondicionálás teszt előtt izoláltuk. Minden kísérlet a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézete Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának engedélyével történt.

3.2. Sztereotaxikus műtétek és felhasznált vírusok

A BNST idegsejtjeiben virális transzferrel DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) receptorokat fejeztettünk ki. A sztereotaxikus műtétek előtt az állatokat intraperitoneálisan adott ketamin-xylazin keverékkel altattuk el (16.6 mg/ml ketamine és 0.6 mg/ml xylazin-hydrochloride 0.9%-os fiziológiás sóoldatban oldva, 10 ml/kg). A BNST-be (koordináták a Bregmától: anterior-posterior 10.8 mm, medio-lateral 60.8 mm, dorso-ventral -4.2 mm) leengedett üvegkapillárison keresztül mikroinjektor (Nanoject II , Drummond) segítségével 20-40 nl vírust injektáltunk bilaterálisan. Az üvegpipetta hegyét kihúzás előtt 5 percig a szövetben hagytuk a vírus célterületen belüli diffúziójának biztosításához. A műtétekhez használt víruskonstrukciókat az 1. táblázat foglalja össze. A posztoperatív fájdalomcsillapításhoz szubkután buprenorphine-t (Bupaq; 0.1 mg/kg) használtunk. A viselkedésvizsgálatokat 4 héttel a műtéteket követően kezdtük el.

1. táblázat: A kísérletben használt víruskonstrukciók

Víruskonstrukció	Titer	Vektor forrása	Kód
AAV8-hSyn::DIO-mCherry	$4,1 \times 10^{12}$ GC/ml	Addgene	#50 459
AAV8-hSyn::DIO-hM3Dq-mCherry	$4,0 \times 10^{12}$ GC/ml	Addgene	#44 361
AAV8-hSyn::DIO-hM4Di-mCherry	$1,9 \times 10^{13}$ GC/ml	Addgene	#44 362

3.3. Farmakológiai kezelés

A DREADD receptorok aktiválásához az egerek 40 perccel az egyes tesztek előtt clozapin-N-oxid (CNO, Tocris Bioscience; 4936, CAS #34233-69-7) injekciót kaptak (i.p., az első kísérletsorozatban 1, a másodikban 3 mg/kg dózisban, 0.9%-os fiziológias sóoldatban oldva).

3.4. Viselkedésvizsgálatok

3.4.1. Pavlovi félelmi kondicionálás

Az auditoros pavlovi félelmi kondicionálás első napján az egereket egy rácsozott aljú Plexi-műanyag teszt Dobozba (25x25x30 cm) helyeztük (Coulbourn Instruments), melyben az állatok félelmi reakcióját lábsokkal váltottuk ki (=nem kondicionált stimulus, 0.7 mA). A 11 perces teszt alatt az egerek összesen hét darab 1 másodperces áramütést kaptak, melyek mindegyikét egy fél perces, 7 kHz-es sípolás (kulcsinger/kondicionált stimulus=CS) előzte meg (SuperTech Instruments). Az első kulcsingert a 150 másodperccel a teszt kezdete után prezentáltuk, az egyes kulcsingerek közötti intervallum 60-90 s volt.

A kondicionálást követő harmadik napon az egereket 5 percre visszahelyeztük a sokkal társított környezetbe („A környezet”) a kontextuális félelmi memória előhívásának tanulmányozásához. A 4. és 5. napon a kulcsingerfüggő félelmi memória előhívásának vizsgálatához az egereket egy sokkal előzőleg nem társított, a környezettől eltérő teszt Dobozban („B környezet”) vizsgáltuk a kulcsingerek többszöri ismétlésével (15x, illetve 9x, 30 másodperces intervallumokkal). A B környezetben végzett tesztek során a kísérleti szobát vörös fénnel világítottuk meg (20 lux), az elektromos rács aljzatot műanyag aljzatra cseréltük, a teszt Doboz belső falai köré egy hajlított, fehér műanyag betétet helyeztünk, a teszt Dobozt szappanos vízzel tisztítottuk. A kulcsingerek prezentálása előtt mindkét teszt napon egy két és fél perces kulcsinger nélküli alapszakaszt is felvettünk a biztonságos kontextusra való félelmi generalizáció mérésére.

A fent leírt kísérleti elrendezést két kísérletben módosítottuk. A BNST kulcsingerfüggő előhívásban és kulcsingerek közötti diszkriminációban betöltött szerepének vizsgálatához a kondicionálás során két kulcsingert használtunk, melyek közül mindig csak az egyiket társítottuk lábsokkal az állatok között randomizált módon. A két kulcsinger egy 7 kHz-es tiszta hang és egy fehér zaj volt (7-7 ismétléssel). A kulcsingerek kiváltotta félelmet a B környezetben egy kezelés nélküli rövid (4-4 kulcsinger/teszt) és egy BNST kemogenetikai

serkentésével egybekötött, hosszabb előhívás tesztben vizsgáltuk (15x, illetve 4x prezentálva a kondicionált és nem kondicionált kulcsingert).

A félelmi kondicionálás mindegyik tesztjéről videófelvételt készítettünk, melyeken a félelmi választ az egerek ledermedéssel töltött idejével mértük (Noldus EthoVision XT 13 szoftver segítségével).

3.4.2. Ragadozószag elkerülés teszt

A veleszületett félelmi válaszok vizsgálatához macskavizeletet (házi macska alomból), illetve egy rókaürülékben megtalálható molekula szintetikus analógját (2-metil-tiazolin, 2MT) használtuk. A teszteket elszívó fülke alatt, enyhe megvilágításban (120 lux), $43 \times 27 \times 19$ cm-es arénában végeztük. A macskavizeletet tartalmazó almot egy 50 ml-es centrifugacsőben, a 2MT-t egy műanyag kupakba helyezett szűrőpapírra csepegtetve helyeztük el a teszt doboz egyik sarkában. A ragadozószag forrása körüli 7×11 cm-es zónába történő belépésekkel kvantifikáltuk a szag vizsgálatára irányuló felderítő viselkedést. Az állatok között cseréltük a ragadozószagot tartalmazó edényeket, tesztek között a teszt dobozokat vízzel tisztítottuk és 5 percig szellőztettük levegőelszívás mellett. A 10 perces teszt alatt vizsgált magatartási változókat (zóna belépésszám, ledermedés, ágaskodás, forrástól mért átlagos távolság, megtett út) Noldus EthoVision XT 15 szoftverrel elemeztük, az ágaskodással töltött idő kivételével, amit Solomon coder eseményrögzítő szoftver segítségével manuálisan elemeztünk.

3.4.3. Nyílt tér teszt

A nyílt tér tesztet enyhe megvilágítás (120 lux) mellett végeztük, egy fehér négyszögletes arénában ($40 \times 30 \times 15$ cm), melyet a tesztek között vízzel tisztítottunk. Az állatokat a teszt dobozok sarkába helyeztük, majd 10 percig szabadon felderíthették az arénát. A teszt doboz közepén (20×15 cm-es zónában) töltött idővel mértük az állatok szorongásszerű viselkedését, a megtett úttal pedig a lokomotoros aktivitást. A viselkedési változókat ez esetben is EthoVision szoftverrel, illetve az ágaskodás esetén Solomon coderrel elemeztük.

3.5. Szövetfeldolgozás és immunhisztokémia

Az egereket a perfúzió előtt ketamin-xylazin keverékkel elaltattuk, majd hideg PBS és azt követő 4%-os PFA oldattal transzkardiálisan átmostuk az ereket. A fixálószerrel perfundált agyakat 4% PFA-ban posztfixáltuk 2 órán keresztül, majd 0,01 M PBS-ben oldott 30%-os

cukoroldatban inkubáltuk egy éjszakán át. Az agyakat porított szárazjégen fagyasztottuk, majd fagyasztó mikrotóm segítségével 30 µm vastag metszeteket készítettünk.

A vírusgócok kiterjedésének fénymikroszkópos vizsgálatához a metszeteket 0,01 M PBS-ben oldott 0,5% Triton X-100 és 0,5% H₂O₂ keverékében inkubáltuk 30 percig, majd 2%-os szarvasmarha szérum albuminba (Sigma) helyeztük egy órára. A vörös fluoreszcens fehérje (red fluorescent protein-RFP) ellen nyúlban termelt antitestet (1:4000, Rockland Inc.) 2%-os szarvasmarha szérum albumint és 0.1% Triton X-100-t tartalmazó oldatban inkubáltuk a metszeteken két éjszakán át (4°C-on). Ezt követően többszöri PBS mosás után, biotin-konjugált, számarban termelt anti-nyúl ellenanyagban (Jackson Laboratories) inkubáltuk a metszeteket 2 órán át. A másodlagos ellenanyag kimosása után a jelölést avidin-biotin komplexben (1:1000, Vector Laboratories) amplifikáltuk egy órán keresztül. Végül a peroxidáz reakciót diaminobenzidin-tetrahidroklorid (0.2 mg/ml), nickel-ammónium szulfát (0,1%) és H₂O₂ (0,003%) jelenlétében hívtuk elő. A metszeteket zselatinban húztuk fel a tárgylemezre, majd DPX fedőanyaggal fedtük le. A vírusgócok kiterjedését Olympus DP70 fénymikroszkóiban ellenőriztük.

A c-Fos analízishez az RFP ellenanyagot (1:2000 monoklonális nyúl IgG, Rockland Inc.) és a c-Fos ellenanyagot (1:2000 tengerimalac poliklonális IgG, Synaptic Systems) fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyagokkal detektáltuk (1:500 Cy3-konjugált számar anti-nyúl IgG, 1:500 Alexa Fluor 488-konjugált számar anti-tengerimalac IgG, Jackson Laboratories). A c-Fos jeleket Nikon C2 konfokális lézer-szkennelő mikroszkóppal vagy Zeiss digitális tárgylemez-szkennel segítségével fotóztuk le. A c-Fos-t fix négyszögletes vagy ovális BNST alrégiókba helyezett kereteken belül számoltuk bilaterálisan, 180 µm távolságra lévő metszeteken, melyek értékeit állatonként átlagoltuk.

3.6. Statisztika

Az adatokat átlag±standard hiba formátumban adtuk meg. A statisztikai analízist a STATISTICA program (Tibco, Tulsa, USA) segítségével végeztük. A csoportok közötti variancianalízist egyutas, faktoriális és ismételt méréses ANOVA segítségével elemeztük Tukey posthoc analízissel kiegészítve. Szignifikáns hatásnak a p<0,05 értékeket tekintettük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A BNST szerepe a pavlovi félelmi kondicionálásban

4.1.1. A BNST aktivitásának vizsgálata a félelmi tanulás és előhívás során

Első kísérletünkben a BNST alrégióspecifikus sejtaktivitását vizsgáltuk a félelmi kondicionálás, illetve kulcsinger-függő előhívás során. Az állatokat 90 perccel a vizsgált tesztek után perfundáltuk, hogy az idegi sejtaktivitás során kifejeződő c-Fos azonnali korai géntermék megjelenését immunhisztokémiailag azonosítsuk. A nem sokkolt, de a tesztdobozban kulcsingernek kitett egerekhez képest a sokkolt állatok BNST-jének szinte valamennyi alrégiójában szignifikánsan magasabb c-Fos expressziót figyeltünk meg, mely különbség nem volt megfigyelhető a kulcsinger-függő félelmi előhívása során. Ebből arra következtethetünk, hogy a BNST a félelmi tanulásban és nem az előhívásban játszik szerepet.

4.1.2. A BNST gátló sejtjeinek kemogenetikai serkentése a félelmi emlényomok berögzülését elősegíti, a kulcsinger-függő előhívást azonban nem befolyásolja

Következő három kísérletünkben a BNST GABA-erg (vezikuláris GABA transzportert kifejező) sejtjeit kemogenetikailag serkentettük a félelmi kondicionálás, az azt követő memória konszolidáció, illetve a kulcsinger-függő előhívás során. A BNST aktivitásának fokozása a kondicionálás alatt nem befolyásolta akutan az állatok félelmi választát, azonban a kulcsinger-függő előhívás során mutatott félelmi válasza magasabb volt azon egereknek, melyeknek a BNST-jét stimuláltuk a kondicionálás alatt.

Ez a hatás reprodukálható volt, ha a BNST-t csak közvetlenül a kondicionálás után, azaz a félelmi emlényomok konszolidációja során serkentettük. Ezzel szemben a BNST stimulációja a kulcsinger-függő előhívás során nem befolyásolta a már berögzült félelmi emlényomok kifejeződését.

4.1.3. A BNST által beidegzett agyterületek aktivitásának változása a BNST konszolidáció alatti serkentése során

Az előző kísérletek alapján arra következtettünk, hogy a BNST befolyásolja a félelmi emlényomok berögzülését, annak előhívásában azonban nem játszik szerepet, tehát feltehetően a félelmi emlényomok konszolidációja nem a BNST-n belül történik meg. Annak tisztázására, hogy a BNST konszolidáció alatti serkentése hogyan befolyásolja az általa beidegzett agyterületek aktivitását, következő kísérletünkben az állatokat 6 órával a félelmi

kondicionálás és azt követő BNST stimulálás után perfundáltuk le és c-Fos immunhisztokémioával felmértük a fő efferens területek (magas RFP rost denzitást mutató) neuronális aktivitását. Eredményeink szerint a kemogenetikai serkentésünk a BNST-ben hatékony volt még 6 órával a kezelést követően is, amit szignifikánsan magasabb c-Fos koexpresszió (RFP+cFos) jelzett a csak riporterfehérjét kifejező kontroll csoporthoz képest. A BNST projekciós területeinek c-Fos analízise arra világított rá, hogy a hypothalamus paraventriculáris magjában csökkent a c-Fos-t kifejező sejtek száma, míg a félelmi hálózat számos agyterületén fokozódott a c-Fos expresszió BNST serkentés hatására, így fokozott aktivitást mértünk a ventrális tegmentális area, dorzális középvonali thalamikus magvak, középagyi szürkeállomány és dorzális raphe területén.

4.1.4. A BNST^{SST} és BNST^{CRH} sejtek eloszlása és efferensei

Kísérleteink további részében azonosítani kívántuk a BNST GABA-erg sejtjeinek azon altípusát, melyek befolyásolják a félelmi emléknymok berögzülését. A centrális amygdala szomatosztatint (SST) és kortikotropin-felszabadító hormont (CRH) kifejező idegsejtjeiről már korábban leírták, hogy részt vesznek a félelmi tanulásban, ezen sejtek szerepe a BNST-ben azonban még kevésbé tisztázott. SST és CRH riporter egértörzseken végzett analízisünk szerint ez a két sejtípus a BNST egyes alrégióban elszórta oszlanak meg és az idegsejtek jelentős hányadát képezik (~15-25% alrégióként).

Az mCherry vörös fluoreszcens fehérje virális kifejeztetésével összehasonlítottuk e két sejtípus projekcióit az egér agyban. Míg rágcsálók BNST^{CRH} sejtjeinek efferenseit már korábbi tanulmányokban feltérképezték, addig a BNST^{SST} sejtek teljes projekciója korábban nem volt ismert. Eredményeink szerint a két sejtípus efferensei jelentős átfedést mutatnak egymással. A következő agyi régiókban figyeltük meg BNST SST és CRH sejtjeinek abundáns rostrozatát: substantia innominata, laterális hypothalamus, mediális amygdala, centrális amygdala mediális része, premammiláris mag, paraszubthalamikus mag, a hypothalamus és a thalamus paraventriculáris magjában. Érdekes módon különösen sűrű BNST innervációt figyelhetünk meg a középagyi monoaminerg területeken (pl. ventrális tegmentális area, substantia nigra, retrorubrális mező, dorzális raphe/ventrolaterális periacqueductális szürkeállomány, locus coeruleus).

4.1.5. A BNST^{SST} sejtek serkentése elősegíti a kulcsinger-függő félelmi memória berögzülését

Következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a BNST^{SST} sejtek kemogenetikai serkentése vagy gátlása hogyan befolyásolja a kulcsinger-függő félelmi emlényomok berögzülését. Az SST sejtek szelektív serkentése konszolidáció alatt szintén csak a kulcsinger-függő emlényomok berögzülését serkentette, a kontextuális félelmi memóriára nem volt hatással. A SST sejtek gátlása nem befolyásolta a memória konszolidációt. A BNST serkentett állatoknál a kulcsinger-függő félelem fokozódásán kívül a kulcsingerek közötti intervallumokban és a második előhívás teszt kulcsinger előtti alapszakaszában is több ledermedést figyeltünk meg, ami a félelem generalizálódására utalt. Annak tisztázására, hogy ez a generalizáció a sokkal társított és sokkal nem társított, biztonságos környezet rosszabb diszkriminációjából fakadt-e, végeztünk egy kontroll kísérletet, melyben a BNST^{SST} sejteket szintén a konszolidáció alatt stimuláltuk, viszont az állatokat kulcsinger adása nélkül helyeztük vissza a B környezetbe 18 percre. Ez esetben nem figyeltünk meg magasabb félelmi reakciót, ami azt jelzi, hogy az SST sejtek csak kulcsinger-függő félelem fokozásán keresztül váltanak ki generalizált félelmet.

4.1.6. A BNST^{CRH} sejtek nem befolyásolják a félelmi emlényomok berögzülését

A CRH sejtek kemogenetikai modulációja (serkentése és gátlása) konszolidáció alatt nem befolyásolta sem a kontextuális, sem a kulcsinger-függő félelmi emlényomok előhívását. Mivel egy korábbi tanulmány szerint a centrális amygdala CRH sejtjei csak az enyhén averzív ingerek (pl. kis áramerősségű lábsokk) kiváltotta félelmi tanulást befolyásolják, elvégeztünk egy olyan kísérletet, melyben a kondicionálás alatt egy enyhe, 0.4 mA-s lábsokkot társítottunk kulcsingerrel. A BNST^{CRH} sejtek serkentése a kevésbé averzív félelmi emlényomok berögzülését sem befolyásolta.

4.2. A BNST szerepe a veleszületett félelmi válaszokban

4.2.1. A 2MT dózisfüggően befolyásolja a veleszületett félelmi választ egerekben

Kísérletsorozatunk második részében azt vizsgáltuk, hogy a BNST hogyan befolyásolja a veleszületett félelmi válaszokat. A veleszületett félelem kiváltásához a szintetikus róka-specifikus szagmolekulát, 2-metil-tiazolint (2MT) használtunk. Első lépésben azt vizsgáltuk C57BL/6J egereken, hogy a különböző dózisokban alkalmazott 2MT miként befolyásolja a védekező viselkedés különböző változóit. Kísérletünkben négy dóziszból álló 2MT hígítási sort használtunk (250, 50, 10 és 2 µl 1:50-es hígításból). A 2 µl-es dózis nem befolyásolta

szignifikánsan az egerek védekező magatartását és félelmi válaszát a 2MT-nek nem kitett kontroll csoporthoz képest. A 10, 50 és 250 μ l-es dózisok szignifikánsan fokozták a félelmi választ (ledermedéssel töltött időt) és ragadozó szag elkerülést (elkerülés átlagos távolságát), míg az állatok lokomóciója és exploratív viselkedése a 2MT dózis növelésével arányosan csökkent. Ezek alapján további kísérleteinkhez kiválasztottuk a 10 és 50 μ l-es dózist, mint alacsony és magas félelmi választ kiváltó fenyegető ingert.

4.2.2. A BNST^{SST} sejtek gátlása szelektíven az alacsony 2MT-re mutatott félelmi választ csökkenti

A BNST^{SST} sejtek gátlása szignifikánsan növelte az egerek lokomócióját és exploratív viselkedését, míg csökkentette az alacsony dózisú 2MT elkerülését. Meglepő módon a magas dózisú 2MT-re mutatott erős félelmi választ és elkerülést nem befolyásolta az SST sejtek gátlása. Az SST sejtek gátlásának alacsony dózisú 2MT-nél megfigyelt anxiolitikus hatását nyílt tér tesztben nem figyeltük meg. Ebben a tesztben az állatok lokomotoros viselkedését sem befolyásolta a BNST^{SST} sejtek gátlása, tehát az exploratív viselkedést facilitáló (elkerülést csökkentő) hatása csak ragadozószag jelenlétében nyilvánult meg.

4.2.3. A BNST^{CRH} sejtek gátlása a macska vizelet kiváltotta félelmi választ növeli

Érdekes módon, a BNST^{CRH} sejtek gátlása nem befolyásolta a ragadozószag elkerülést sem alacsony, sem magas dózisú 2MT jelenlétében. Mivel korábbi kísérletek szerint a BNST^{CRH} sejtjei aktiválódnak ragadozószag hatására, ezen sejtek gátlását tovább vizsgáltuk egy másik veleszületetten averzív inger, macskavizeletre mutatott félelmi válaszban. Eredményeink szerint a macskavizelet az alacsony dózisú 2MT-nél is gyengébb elkerülést vált ki C57BL/6J egereken. A BNST^{CRH} sejtek gátlása fokozta a macskaszagra mutatott félelmi választ és elkerülést, ami arra utal, hogy ezen sejtek szerepe komplementer az SST sejtekkel és aktivitásuk inkább az aktív felderítő viselkedést segítheti elő alacsony fenyegetettségű szituációkban. Érdekes módon a BNST^{SST} sejtek gátlása nem befolyásolta a macskaszagra mutatott félelmi választ, azaz a BNST különböző sejtípusai különféle fenyegető környezeti ingerekre reagálnak, melyben mind az intenzitásbeli, mind a minőségi tényezők szerepet játszhatnak.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánkban a BNST specifikus sejtjeit vizsgáltuk a pavlovi félelmi tanulásban és a ragadozó szag elkerülésben, melyek alapján az alábbi következtetéseket vonhatjuk le a BNST félelem szabályozásában betöltött szerepéről:

5.1. A magas BNST aktivitás fokozza a kulcsinger-függő félelmi tanulást és memória konszolidációt:

- 5.1.1.** A BNST a kulcsingerfüggő félelmi memória konszolidációját modulálja, előhívását azonban nem.
- 5.1.2.** A kontextuális emléknymok kialakítását és a kulcsingerek közötti diszkriminációt nem befolyásolja a BNST serkentése.
- 5.1.3.** A BNST szomatosztatin tartalmú sejtjei elősegítik a kulcsinger-függő félelmi emléknymok bevésődését, míg a kortikotropin-felszabadító hormont kifejező sejtek nem befolyásolják a pavlovi félelmi tanulást.
- 5.1.4.** A BNST a félelmi konszolidáció során modulálja a hypothalamus paraventriculáris magjának, a dorzális középvonalai thalamikus magvaknak, a ventrális tegmentális areának és a középagyi szürkeállománynak az aktivitását.

5.2. A BNST az alacsony fenyegetettséget jelentő, veleszületett félelmet kiváltó ingerekre mutatott viselkedést kétirányúan befolyásolja:

- 5.2.1.** A BNST elsősorban a nem egyértelmű fenyegetettséget jelentő, alacsony dóziséú ragadozószagra mutatott védekező válaszokat befolyásolja.
- 5.2.2.** A BNST szomatosztatin tartalmú sejtjei a passzív védekezési válaszokat és elkerülést segítik elő.
- 5.2.3.** A BNST kortikotropin-felszabadító hormont kifejező sejtjei alacsony fenyegettség mellett anxiolitikus hatást fejtenek ki az exploratív magatartásformák növelésével.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

1. **Bruzsik B**, Biro L, Zelena D, Sipos E, Szebik H, Sarosdi KR, Horvath O, Farkas I, Csillag V, Finszter CK, Mikics E, Toth M. Somatostatin Neurons of the Bed Nucleus of Stria Terminalis Enhance Associative Fear Memory Consolidation in Mice. *J Neurosci*. 2021 Mar 3;41(9):1982-1995. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1944-20.2020. Epub 2021 Jan 19.
2. **Bruzsik B**, Biro L, Sarosdi KR, Zelena D, Sipos E, Szebik H, Török B, Mikics E, Toth M. Neurochemically distinct populations of the bed nucleus of stria terminalis modulate innate fear response to weak threat evoked by predator odor stimuli. *Neurobiol Stress*. 2021 Oct 29;15:100415. doi: 10.1016/j.ynstr.2021.100415.

A szerző egyéb közleményei:

1. Biro L, Sipos E, **Bruzsik B**, Farkas I, Zelena D, Balazsfi D, Toth M, Haller J. Task Division within the Prefrontal Cortex: Distinct Neuron Populations Selectively Control Different Aspects of Aggressive Behavior via the Hypothalamus. *J Neurosci*. 2018 Apr 25;38(17):4065-4075. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3234-17.2018. Epub 2018 Feb 27
2. Mikics E, Toth M, Biro L, **Bruzsik B**, Nagy B, Haller J. The role of GluN2B-containing NMDA receptors in short- and long-term fear recall. *Physiol Behav*. 2017 Aug 1;177:44-48. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.04.005. Epub 2017 Apr 8.
3. Biro L, Toth M, Sipos E, **Bruzsik B**, Tulogdi A, Bendahan S, Sandi C, Haller J. Structural and functional alterations in the prefrontal cortex after post-weaning social isolation: relationship with species-typical and deviant aggression. *Brain Struct Funct*. 2017 May;222(4):1861-1875. doi: 10.1007/s00429-016-1312-z. Epub 2016 Sep 23.