

Állatorvostudományi Egyetem
Zoológiai Tanszék

Neuromodulátor felszabadulás mérése egerekben asszociatív
feladatok végzése során

Measuring neuromodulator release in mice during associative
tasks

Kispál Réka Katalin

Témavezetők: Dr. Hangya Balázs, tudományos főmunkatárs
Dr. Szabó Írisz, tudományos munkatárs
Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet,
Rendszer-Neurobiológia Kutatócsoport

Belső konzulens: Dr. Puska Gina, adjunktus
Zoológiai Tanszék

2024

ABSZTRAKT

A jutalom predikció hiba (reward prediction error: RPE) a tényleges és a várt jutalom közötti különbség, melynek értékétől függően változik jövőbeli viselkedésünk tanulás során. Célul tűztük ki a dopamin (DA), az acetilkolin (acetylcholine: ACh), a noradrenalin (norepinephrine: NE) és a szerotonin (5-hidroxitriptamin: 5-HT) szerepének vizsgálatát az asszociatív tanulásban, és felszabadulásuk RPE-vel való összefüggésének vizsgálatát.

Egereket tanítottunk egy pavlovi kondicionáláson alapuló hangdetekciós feladatban 50%-os jutalmazási eséllyel, amely lehetővé tette a pozitív (jutalmazott próbák) és a negatív RPE-k (jutalmazatlan próbák) vizsgálatát, miközben száloptikás fotometria segítségével mértük a DA, az ACh, az NE és az 5-HT felszabadulást.

Ahogy az várható volt, a stimulus alatti várakozó nyalás csökkent a kihagyott jutalmak után, de nőtt a jutalmazott próbák után, melyet a DA felszabadulása nem csak a ventrális striátumban (VS), hanem a prefrontális kéregben (prefrontal cortex: PFC) is követett. Az ACh felszabadulása szintén követte az RPE-t mind a bazolaterális amigdalában (BLA), mind a PFC-ben. Meglepő módon mind az NE, mind az 5-HT felszabadulás csökkent a jutalmazott próbák után, és nőtt kihagyott jutalmak után a PFC-ben, de a BLA-ban követte az RPE változásait.

Eredményeink igen fontosak, hiszen lehet, hogy a neurodegeneratív betegségekkel járó demenciák során, melyek az előregedő társadalmunkban kiemelt problémát okoznak, az általunk vizsgált mechanizmusok is sérülnek.

ABSTRACT

Reward prediction error (RPE) is the difference between an actual and an expected reward, and during reinforcement learning our behavior changes depending on the value of the RPE. We aimed to investigate the role of dopamine (DA), acetylcholine (ACh), norepinephrine (NE) and serotonin (5-HT) in associative learning and the correlation of their release with the reward prediction error (RPE).

To address this, we trained mice on a sound detection Pavlovian conditioning task with a 50% reward schedule that allowed examining clean representations of positive (rewarded trials) and negative RPE (reward omission trials), while we measured DA, ACh, NE and 5-HT release by fiber photometry.

As expected, anticipatory licking during the stimulus decreased after omitted rewards but increased after rewarded trials, DA release followed a similar pattern not only in the ventral striatum (VS) but also in the prefrontal cortex (PFC). The release of ACh also followed the RPE in both the basolateral amygdala (BLA) and in the PFC. Both NE and 5-HT release in the PFC decreased after rewarded trials and increased after reward omissions, but in the BLA it followed the updates of the RPE.

These results are important, because it is possible that the mechanisms, we are investigating are also compromised during dementias caused by neurodegenerative diseases, which are a major problem in our aging society.

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS	6
1.1. A tanulás fontossága.....	6
1.2. A pavlovi kondicionálás.....	6
1.3. A tanulás neurodegeneratív betegségekben betöltött szerepe.....	6
2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. A dopamin szerepe a tanulásban.....	8
2.2. Az acetilkolin szerepe a tanulásban.....	8
2.3. A noradrenalin szerepe a tanulásban.....	9
2.4. A szerotonin szerepe a tanulásban.....	10
2.5. A jutalom előrejelzési hiba.....	10
2.6. A jutalom előre jelzési hiba és a neuromodulátorok kapcsolata.....	11
3. CÉLKITŰZÉSEK	14
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	15
4.1. Állatok.....	15
4.2. Műtéti eljárás.....	15
4.3. Pavlovi kondicionáláson alapuló tanítás.....	16
4.4. Száloptikás fotometria.....	18
4.5. Statisztikai elemzés.....	19
4.6. Hisztológia.....	19
5. EREDMÉNYEK	21
5.1. Az állatok viselkedési eredménye pavlovi kondicionálás során.....	21
5.2. A dopamin felszabadulás mérésének fotometriai eredménye a pavlovi kondicionálás során.....	22
5.3. Az acetilkolin felszabadulás mérésének fotometriai eredménye a pavlovi kondicionálás során.....	25
5.4. A noradrenalin felszabadulás mérésének fotometriai eredménye a pavlovi kondicionálás során.....	28
5.5. A szerotonin felszabadulás mérésének fotometriai eredménye a pavlovi kondicionálás során.....	31
6. KÖVETKEZTETÉSEK	35
7. ÖSSZEFOGLALÁS	37
IRODALOMJEGYZÉK	38
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	42

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- 5-HT** 5-hidroxitriptamin = szerotonin
- AAV** adeno-asszociált vírus
- ACh** acetylcholine = acetilkolin
- AD** Alzheimer's disease = Alzheimer-kór
- AL** anticipatory licking = várakozó nyalás
- ALR** anticipatory licking rate = várakozó nyalási ráta
- BFCN** basal forebrain cholinergic neuron = bazális előagyi kolinerg neuron
- BLA** bazolaterális amigdala
- CS** conditioned stimuli = feltételes inger
- CS-O** negative conditioned stimuli-omission = negatív feltételes inger-kihagyás
- CS+O** positive conditioned stimuli-omission = pozitív feltételes inger-kihagyás
- CS+R** positive conditioned stimuli-reward = pozitív feltételes inger-jutalom
- DA** dopamin
- DAPI** 4',6-diamidino-2-fenilindol
- dCSPO** delta positive condition stimuli omission = pozitív feltételes inger kihagyással
- dCSPR** delta positive condition stimuli reward = pozitív feltételes inger jutalommal
- GFP** green fluorescent protein = zöld fluoreszcens fehérje
- HDB** horizontal diagonal band of Broca = Broca-féle diagonális köteg horizontális ága
- HSA** humán szérumalbumin
- LC** *locus coeruleus*
- NE** norepinephrine = noradrenalin
- OFC** orbitofrontal cortex = orbitofrontális kéreg
- PB** phosphate buffer = nátrium-foszfát-puffer
- PFA** paraformaldehid
- PFC** prefrontal cortex = prefrontális kéreg
- RPE** reward prediction error = jutalom előrejelzési hiba
- TBS** tris-buffered saline = trisz-pufferelt sóoldat
- TTL** tranzisztor-tranzisztor logika
- US** unconditioned stimuli = feltétel nélküli inger
- VS** ventrális striátum
- VTA** ventral tegmental area = ventrális tegmentális terület

1. BEVEZETÉS

1.1. A tanulás fontossága

Az életben maradáshoz szükséges feltételek teljesüléséhez nélkülözhetetlen, hogy prediktáljunk és befolyásoljunk bizonyos környezetünkben történő eseményeket. Ennek a képességnek a gyakorlását az asszociatív tanulás teszi lehetővé az események közti kapcsolatok észlelése és megértése által [1]. Asszociatív tanulás során információkat szerezhetünk a különböző környezeti események közötti kapcsolatokról. Ezek az események akkor kapcsolódnak egymáshoz, ha időbeli vagy térbeli közelségben fordulnak elő, és amikor az egyik esemény megbízhatóan előrejelzi a másik esemény bekövetkezését [2].

1.2. A pavlovi kondicionálás

A pavlovi kondicionálás, vagy másnéven klasszikus kondicionálás egy olyan asszociáción alapuló tanulási módszer, amely során egy feltételes inger (conditioned stimuli: CS) egy feltétel nélküli ingerhez (unconditioned stimuli: US) társul. A CS új viselkedést vált ki, melyet azért neveznek így, mert az arra adott reakció feltétele egy biológiailag jelentős US megtapasztalása. A viselkedést magát egy biológiailag fontos inger váltja ki, amely nem függ egy másik ingerrel való feltételes kapcsolattól, ezért nevezik US-nek. Ez a fajta tanulás automatikusan megtörténik, anélkül, hogy az alany bármit is tenne [3]. Ivan Petrovics Pavlov híres kísérletében (1927), amely a klasszikus (pavlovi) kondicionálás alapja, a csengő jelentette a kutya számára a CS-t, az étel pedig a US-t. Az orosz kutató megfigyelte, hogy a kutya nyáleválasztása már a csengő hangjára megindult, akkor is, ha nem követte étel, tehát az US-hez társította a kutya a CS-t [1].

1.3. A tanulás neurodegeneratív betegségekben betöltött szerepe

A tanulás és az emlékezet kialakítása, valamint más összetett kognitív folyamatok megkövetelik a neuronok összekapcsolt hálózatokon keresztül történő összehangolt működését. A neuronális tüzelési minták olyan változásokat indukálnak a szinaptikus plaszticitásban, amelyek szelektíven erősíthetik vagy gyengíthetik a hálózati kapcsolatokat [4]. Az öregedés és neurodegeneratív betegségek esetében a neuronok egyes szubpopulációinak csökkenhet az aktiválhatósága, míg mások hiperaktivációt mutatnak [5]. Az ilyen fajta hiperaktivációt korábban már összefüggésbe hozták a kognitív hanyatlással [6].

A leggyakoribb kognitív hanyatlással járó neurodegeneratív betegség az Alzheimer-kór (Alzheimer's disease: AD). Az AD-betegeket a demencia tüneteiről szokták beszámolni, amely

az emlékezéshez, a gondolkodáshoz vagy a döntések meghozatalához szükséges képesség hanyatlását jelenti [7]. Két klasszikus patológiai tünete az amiloid-béta fehérje plakkok és a tau fehérje aggregátumok felhalmozódása [8, 9]. A kognitív hanyatlás egyik kiváltó oka az AD során a kolinerg neuronok progresszív degenerációja [10]. A motoros funkciók károsodásában a dopamin (DA) neuronok elvesztése fontos szerepet játszik [11]. Mindezek mellett a szerotonerg és a noradrenerg rendszer szerepét is sokszor összefüggésbe hozták AD során kialakuló kognitív funkciók és a memória fokozatos elvesztésével [12, 13].

A Parkinson-kór (Parkinson's disease: PD) a második leggyakoribb neurodegeneratív betegség. A PD meghatározó motoros tüneteinek kívül több nem-motoros tünet is előfordul; mint például a kognitív károsodás, amely a betegség bármely szakaszában előfordulhat. A korai kognitív változások memóriazavarral is kiegészülhetnek, amely növeli a demencia korai progressziójának kockázatát [14]. A PD fő patológias jellemzője α -szinuklein aggregációja [15], amely a DA neuronok progresszív elvesztését okozza a *substantia nigra pars compactában*, és így a DA hiánya nagyban hozzájárul a tünetek kialakulásához [16, 17]. A kóros folyamatok azonban nem csak a dopaminerg rendszeren belülre korlátozódnak. A kolinerg sejtek egyidejű elvesztése szintén a kognitív hanyatláshoz járul hozzá a betegeknél [18]. A noradrenerg rendszer is sérül a betegség során, ez első sorban a figyelem zavar kialakulását okozza [19]. A szerotonerg neuronok progresszív elvesztése is megfigyelhető, mely szerepet játszik a motoros és a nem-motoros tünetek kialakulásában egyaránt [20].

Bár számos bizonyíték alátámasztja a neuromodulátor rendszerek szerepét a demens tünetek kialakulásában, a pontos mechanizmusok azonban még nem ismertek [16, 21].

2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A dopamin szerepe a tanulásban

A kognitív folyamatokban, a jutalommal kapcsolatos tanulási folyamatokban és a motoros rendszerben betöltött kiemelkedően fontos szerepe miatt a DA a legszélesebb körben vizsgált neuromodulátorok közé tartozik [22]. A középagyban található ventrális tegmentális terület (ventral tegmental area: VTA) a dopaminerg rendszer központja, amely sokféle viselkedési funkciót szabályoz, beleértve a jutalom feldolgozást, a stressz modulációt, a tanulást és a memóriát [23].

A prefrontális kérgi (prefrontal cortex: PFC) DA-nak szerepe van a tanulásban és a memória kialakulásában, ezeken belül főként a térbeli munkamemória kialakításában és az érzelmi, illetve asszociatív tanulás folyamatában [24]. A helyi DA felszabadulás fontos szerepet tölt be a PFC különböző funkcióiban, beleértve a végrehajtó funkcióit, és a figyelemmel és tanulással kapcsolatos szerepét. A PFC-ben található D2 receptor túlaktiválása hosszútávú aktivitás gátlást indukál, amely a hippocampusz-PFC közti szinapszisok NMDA (N-metil-D-aszpartát) receptor transzmissziójának csökkenését okozza. Ez a folyamat az egyik kiváltó mechanizmusa lehet a skizofréniával összefüggő kognitív zavaroknak [25].

A VTA-ból érkező fő dopaminerg projekció a ventrális striátumot (VS) idegzi be, amelyről régóta ismert, hogy erősen érintett a különféle viselkedési és kognitív funkciókban, mint például a jutalomhoz köthető és az averzív tanulás, a motiváció, a függőség, a deklaratív tanulás és a memória kialakulása [26].

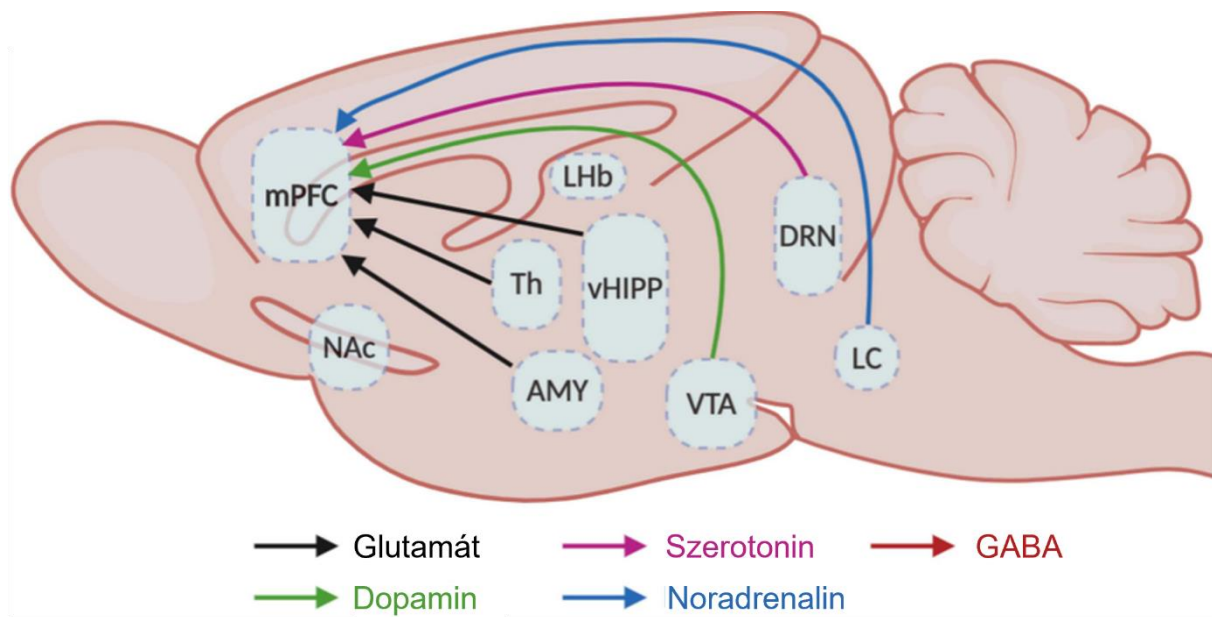
2.2. Az acetilkolin szerepe a tanulásban

Az acetilkolinnak (acetylcholine: ACh) fontos szerepe van a tanulásban és a memória kialakulásában. Különösen az új információk megszerzéséhez szükséges, ugyanis korábbi vizsgálatok során bizonyították, hogy a muszkarinos ACh receptorok farmakológiai gátlása megakadályozza az új emlékek létrehozását [27]. A kolinerg projekciók egyik kiindulási pontja a Broca-féle diagonális köteg horizontális ága (horizontal diagonal band of Broca: HDB), mely a bazális előagy egyik legnagyobb kolinerg struktúrája, az amigdala és a szeptális területek között helyezkedik el [28].

A bazolaterális amigdala (BLA) elsősorban a félelmen alapuló tanulásban vesz részt. Az ide érkező ACh projekcióknak fontos szerepe van az érzelmi emlékek rögzítésében [29]. Emellett részt vesz a korábban semleges ingerekből származó pozitív és negatív kimenetek

előrejelzésének megtanulásában. A bazális előagyi komplex kolinerg sejtjei mind a pozitív, mind a negatív megerősítés hatására tüzelnek [30].

A rágszálók mediális prefrontális kérgé (medial prefrontal cortex: mPFC) részt vesz a viselkedés adaptációjában, kritikus fontosságú a döntéshozatalhoz, és bizonyítottan részt vesz a tanulási folyamatokban. Számos agyi területől érkeznek ide projekciók, így a VTA-ból érkező DA bemenet mellett a HDB-ből ACh bemenet is érkezik [31]. Az ACh felszabadulása az mPFC-ben központi szerepet játszik a normál kognitív teljesítményben, különösen a figyelemben [32].



1. ábra: A mediális prefrontális kéregbe érkező projekciók

A mediális prefrontális kéreg afferens vetületeinek sematikus ábrázolása a megfelelő neuromodulátor rendszerekkel [33].

Rövidítések: AMY: amigdala; DRN: dorsal Raphe nucleus = dorzális Raphe mag; LC: locus coeruleus; LHb: laterális habenula; mPFC: medial prefrontal cortex = mediális prefrontális kéreg; NAc: *nucleus accumbens*; Th: thalamusz; vHIPP: ventrális hippokampusz; VTA: ventral tegmental area = ventrális tegmentális terület

2.3. A noradrenalin szerepe a tanulásban

A *locus coeruleus* (LC) az agytörzsben helyezkedik el, az itt található noradrenerg rendszer központja, egy széles körben elterjedt projekciós hálózatot foglal magába a központi idegrendszerben, amely képes a viselkedés széles skálájának modulálására, beleértve az izgatottságot, a tanulást, a fájdalom érzékelését és a stressz által kiváltott negatív érzelmi állapotokat [34]. A noradrenalinnak (norepinephrine: NE) emellett kulcsfontosságú moduláló szerepe van a stressz és a félelem, valamint a térbeli munkamemória kialakulásában [35].

Az LC egyik sajátos efferens vetülete a BLA felé mutat, az ide érkező NE az érzelmi viselkedésben betöltött szerepéről ismert [36]. A BLA fontos az érzékszervi információk integrálásában, a változatos és ellentétes érzelmi viselkedések létrejöttében, beleértve a szorongást, félelmet, illetve a büntetéssel és a jutalommal kapcsolatos viselkedéseket [37].

A PFC az NE másik fontos célpontja, itt a legnagyobb az NE terminálisok sűrűsége a kéregben. A NE befolyásolja a stresszorok feldolgozását és a rájuk vonatkozó választ, és a félelemmel kapcsolatos viselkedések szabályozását. A PFC-beli NE szükséges a félelemérzet csökkentéséhez, az érzelmi félelemreakciók felülírásával, és így elősegíti az adaptív viselkedést [38].

2.4. A szerotonin szerepe a tanulásban

A szerotonin (5-hidroxitriptamin: 5-HT) egy központi neuromodulátor, amely számos biológiai folyamat szabályozásában játszik szerepet, és a pszichoaktív drogok egyik legfontosabb célpontjai a szerotonerg sejtek [39]. Biológiai funkciója összetett, sokféle folyamatban szerepe van, például a hangulat szabályozásában, a megismerésben, a tanulásban és a memória folyamatokban [40]. A szerotonerg rendszer központja a Raphe mag, amely az agytörzs középvonalában helyezkedik el a középagyban, a hídon és a nyúltvelőn végig nyúlva [41].

A szerotonerg rendszer fő célterülete a PFC, ahova igen sűrű projekciói érkezik. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a prefrontális 5-HT szerepet játszik a rövid távú memóriában, a figyelemben és a kognitív rugalmasságban [42, 43]. Mindezek mellett szabályozza az impulzivitást is és az agykérgi aktivitás modulálásával elősegíti a viselkedés szabályozását [44].

Másik fő projekciós területe a BLA, korábbi kutatások az ide érkező szerotonerg beidegzést főként a félelemmel és a szorongással kapcsolatos viselkedés során vizsgálták [45]. A jutalommal kapcsolatos tanulásban való szerepe azonban sokkal kevésbé vizsgált és ismert, de bizonyított, hogy részt vesz benne [46].

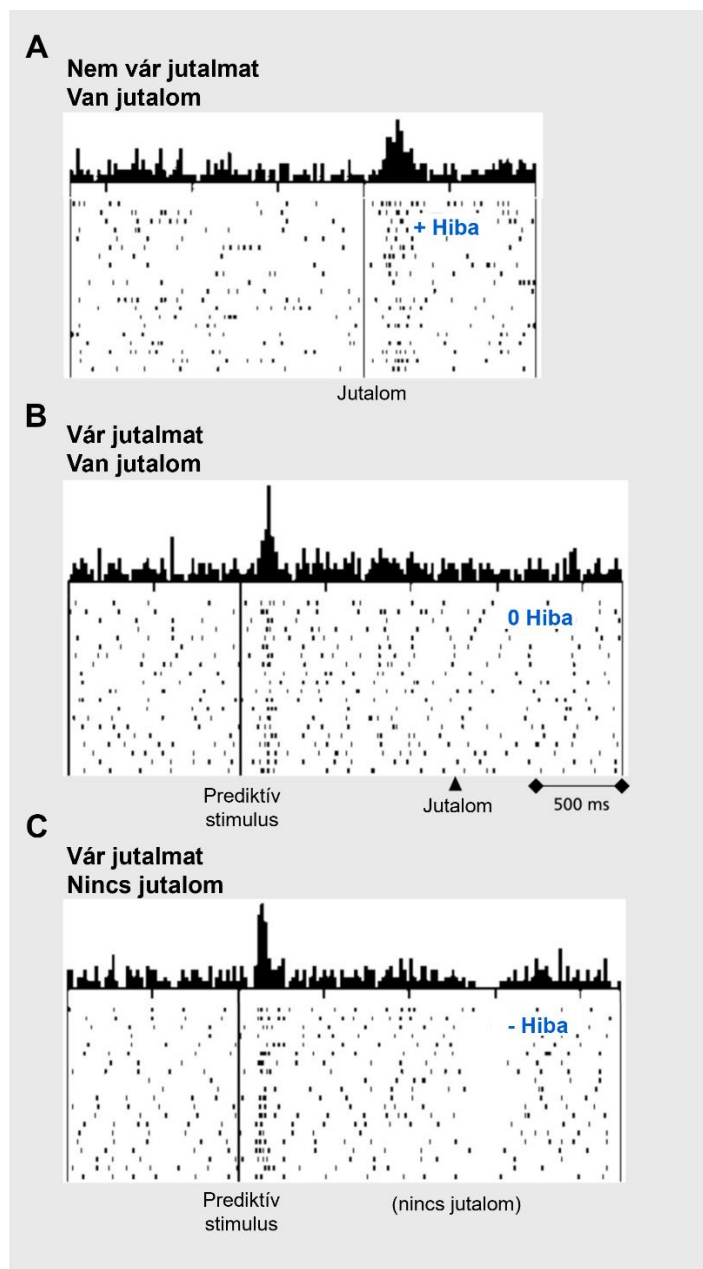
2.5. A jutalom előrejelzési hiba

A jutalom előrejelzési hiba (reward prediction error: RPE) a kapott és a várt jutalom közötti különbségből áll. Kulcsfontosságú a jutalmak felismerésében és a jutalomhoz való jutásra törekedésben. A jövőbeli viselkedés a jutalom és a predikció között tapasztalt különbségtől, azaz a RPE-től függően változik. Ha a jutalom jobb a vártnál (+RPE) az előrejelzés jobb lesz, és többet végezzük azt a viselkedést, amely a jutalmat eredményezte. Ha

a jutalom rosszabb a vártnál (-RPE) az előrejelzés rosszabb lesz, és ezt a cselekvést legközelebb kevésbé végezzük vagy elkerüljük. Mindkét esetben megváltozik a predikció és a viselkedés, tehát tanulásról beszélhetünk. Ezzel szemben, ha a jutalom pontosan olyan, mint a várt, akkor nincs RPE, és változatlan marad a predikció és a viselkedés is; tehát nem történik tanulás [47].

2.6. A jutalom előre jelzési hiba és a neuromodulátorok kapcsolata

Az emberek, majmok és rágcsálók középagyában a legtöbb DA neuron követi a RPE változásait. A vártnál nagyobb jutalom aktiválja őket (+RPE), az előrejelzett jutalmak esetében kiindulási aktivitásnál maradnak, és csökkent aktivitást mutatnak a vártnál kisebb jutalom (-RPE) esetében. Ez lehetővé teszi az idegsejtek számára, hogy a prediktív információt a korábbi ingerek és cselekvések megtanulására használják. Ily módon a DA sejtek aktivitásának megfigyelése hasznos az események hosszú láncolatainak megismeréséhez [47].



2. ábra: A dopamin neuronok tüzelése pavlovi kondicionálás során majomban

Jutalom-előrejelzési hibát (reward prediction error: RPE) kódoló dopaminerg válaszok a jutalom idején és a jutalom-előrejelző vizuális ingerek (a két alsó ábrán) alatt. Mindegyik ábrán az esemény körüli idő hisztogram látható, a függőleges vonalak a dopaminerg neuron tüzelését jelölik, egy sor egy próbának felel meg. Az ábrán látható dopamin neuronokat a nem várt jutalom aktiválja, amely pozitív RPE (A), de nem mutatnak választ a várt jutalomra, ilyenkor nincs RPE (B), illetve gátlódnak, amikor várta a jutalmat, de nem kapott, ekkor az RPE negatív (C) [47].

A bazális előagy kolinerg neuronok (basal forebrain cholinergic neuron: BFCN) fontos szerepet játszanak az asszociatív tanulásban, tehát a jövőbeli kimeneteket előrejelző ingerek feldolgozásában. A jutalmazás önmagában aktiválja BFCN-ket, a váratlan jutalmak azonban erősebb választ váltanak ki belőlük, ám a büntetésre egységes választ adnak. A BFCN-k

eltérően mérlegelik a pozitív és negatív megerősítésre vonatkozó előrejelzéseket, ez feltehetően az RPE-vel magyarázható [48].

Korábban már igazolták, hogy a NE felszabadulása szükséges az asszociatív félelemtanulási emlékek kialakulásához és a felszabadulása követi a veszély előrejelzési hiba modelljét, az RPE-vel való kapcsolatát azonban még nem vizsgálták [49].

Míg a DA neuronokra jellemző az előjeles RPE-k kódolása, addig az 5-HT neuronokat a kolinerg sejtekhez hasonlóan az előjel nélküli RPE-vel hozták összefüggésbe korábbi kutatások. Vagyis a szerotonerg beidegzésű neuronok nem a hiba irányára, hanem annak nagyságára érzékenyek. Ezeket a válaszokat egyfajta „meglepetés” jelként is lehetne jellemezni [50].

3. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink célja a DA, ACh, NE és 5-HT szerepének vizsgálata volt asszociatív tanulás során egerekben.

A striátális DA-ról a bevezetésben bemutatott kutatások alapján már tudtuk, hogy követi az RPE változásait, de mi kíváncsiak voltunk arra is, hogy a frontális kérgi DA is ezt követi-e, hiszen a PFC-nek kulcsfontosságú szerepe van az érték alapú döntéshozatalban.

Továbbá az ACh, NE és 5-HT kapcsolatát is megvizsgáltuk az RPE-vel, hiszen ahogy a korábbiakban bemutattam mindhárom neuromodulátornak fontos szerepe van a tanulási folyamatokban. Mindhárom esetben vizsgáltunk egy mélyagyi területet, amely a BLA volt, és egy frontális kérgi területet is, amely a PFC volt.

Kutatásunk fő kérdései:

- 1) Hogyan függ össze a neuromodulátor felszabadulás az RPE-vel?
- 2) Van-e összefüggés a neuromodulátor felszabadulás és a pavlovi kondicionálás során megfigyelt váratlan viselkedés között, illetve annak megváltozása között?

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Állatok

Kísérleteinkben C₅₇BL/6J típusú 4 hónapos egereket használtunk, hímeket és nőstényeket egyaránt. Neuromodulátoronként legalább 5 egeret vizsgáltunk, a nemük változó volt (1. táblázat). Átlagos testsúlyuk a kézhez szoktatás előtt $26,4 \pm 3,5$ g volt. Az állatok egyesével voltak elhelyezve a ketreceikbe az implantátumok védelmének érdekében, ahol *ad libitum* jutottak rágcsáló táphoz és a vízkorlátozási protokoll megkezdése előtt vízhez is. Az állatok 12/12 órás fény-sötét ciklusban voltak tartva. A kísérleti módszereket a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Állatvédelmi Bizottsága, illetve a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal állat-kutatásetikai bizottsága bírálta el. Az állatkísérleti engedélyszámunk: PE/EA/1003-7/2021. Az European Community's Council 1986. november 24-i irányelveinek (86/609/EEC) megfelelően voltak tartva az állatok.

1. táblázat: Használt egyedek száma nemekre és neuromodulátorokra bontva

	Dopamin szenzor (n)	Acetilcolin szenzor (n)	Noradrenalin szenzor (n)	Szerotonin szenzor (n)
Hím egér	5	4	5	1
Nőstény egér	2	3	3	4

4.2. Műtéti eljárás

A száloptikás fotometriai kísérleteket műtét előzte meg, melyhez ketamin-xilazin (83 mg/kg ketamin és 17 mg/kg xilazin feloldva 0,9% fiziológias sóoldatban) keverékkel altattuk az egereket intraperitoneálisan. 70%-os etanollal és Betadin-nal fertőtlenítettük a kopasz fejbőrt, majd lidokainnal helyi érzéstelenítést végeztünk a fejbőrön és a hallójáratokban egyaránt, ezt követően sztereotaxiás készülékbe helyeztük az állatokat. A fejbőrt felnyitottuk és ismét lidokainos érzéstelenítést alkalmaztunk. A kötőszövetet és a *periosteumot* eltávolítottuk a koponyáról, majd egy szintbe hoztuk a bregmát (β) és a lambdát (λ). A DA vizsgálatához a VS-be (β -tól számítva AP +1,00 mm; ML -1,25 mm; a kéregtől számítva DV -4,00 mm) és a PFC-be (15°-os szögben β -tól számítva AP +1,94 mm; ML +0,86 mm; a kéregtől számítva DV -1,97 mm) DA bioszenzort expresszálo adeno-asszociált vírust (AAV9-hSyn-DA4.4-DA2m) injektáltunk (Nanoject III Programmable Nanoliter Injector, Drummond Scientific, Broomall, Pennsylvania, Amerikai Egyesült Államok). Az ACh, NE és 5-HT vizsgálatához a BLA-ba (β -tól számítva AP -1,20 mm; ML -3,00 mm; a kéregtől számítva DV -3,70 mm) és a PFC-be (β -

tól számítva AP +1,76 mm; ML +0,30 mm; a kéregtől számítva DV -2,10 mm) ACh/NE/5-HT bioszenzort expresszázó adeno-asszociált vírust (AAV9-hSyn-Ach-3.0, AAV9-hSyn-GRAB-NE1m, AAV9-hSyn-GRAB-5HT1.0) injektáltunk. Mind a négy szenzor esetében területenként 300-300 nl vírust injektáltunk. Ezt követően optikai szálakat (400 μm) ültettünk be az említett területek fölé, amelyeket Super Bond C&B-vel (Sun Medical Ltd., Japán) és fogorvosi cementtel rögzítettünk. Ezen kívül egy titánium tartót és egy kis műanyag csövet is rögzítettünk, melyek a fej befogásához szükségesek a tanulás során. A posztoperatív fájdalom csillapításhoz buprenorphine-t (0,1 mg/kg) adtunk be intraperitoneálisan. Az állatok pavlovi kondicionáláson alapuló tanítását a gyógyulási és a vírus expressziós idő lejártával kezdtük meg, amely körülbelül négy hét.

4.3. Pavlovi kondicionáláson alapuló tanítás

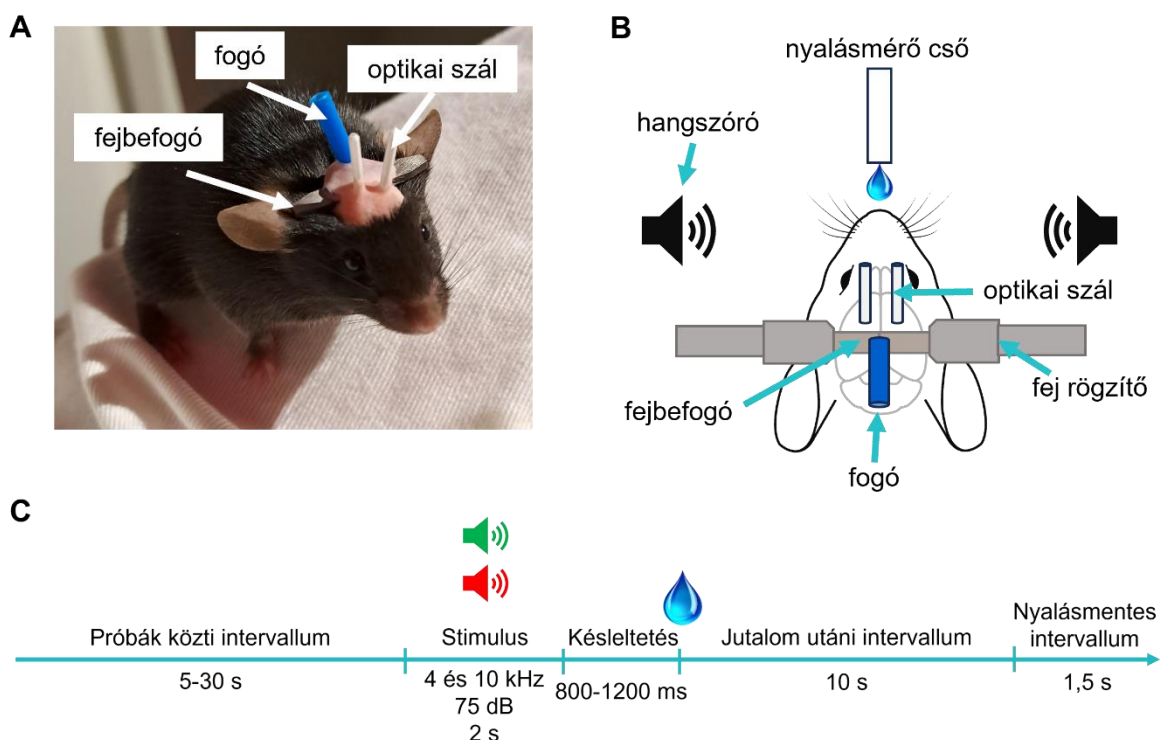
A tanítás egy pavlovi kondicionáláson alapuló hangdetekciós feladatban történt, melyhez az egereket a fejükön lévő titánium tartó segítségével a kísérleti berendezéshez rögzítettük (3. ábra A és B). A kísérleteinkhez az egerek víz korlátozottak voltak, amely azt jelenti, hogy nem *ad libitum* állt rendelkezésükre víz, hanem minden nap kaptak kb. 1 ml mennyiséget. Ez nem járt jelentősebb testtömeg csökkenéssel, illetve segítette a hangdetekciós feladat elsajátítását, amelyben a víz jelentette a jutalmat. Az egerek egy nyalásmérő csőből kaptak vizet (3. ábra B), nyalásaikat egy infravörös szenzor-emitter érzékelt.

A viselkedés kísérletek méréseihez a Bpod Viselkedés Kontroll Rendszert (Sanworks LLC., Amerikai Egyesült Államok) használtuk, amely segítségével tranzisztor-tranzisztor logika (TTL) szignálok generálásának felhasználásával a méréseket szinkronizáltuk az állatok viselkedésével.

A pavlovi kondicionáláson alapuló feladat során a CS-t hangok jelentették. Két különböző frekvenciájú hangot alkalmaztunk: egy 4 és egy 10 kHz-est. Az egyik hang 50%-ban jutalmat, míg a másik mindig kihagyást kódolt, ezek voltak az US-ek. Állatonként változtattuk, hogy melyik hang melyik kimenetelhez tartozott. A jutalom 6 μl 10%-os szacharózos vízcepp volt. Egy tréning nagyjából 120 próbából állt, melyek közt mindig volt egy 5-30 s között változó ideig tartó próbák közti intervallum. Ezt követte a 2 s-os stimulus, mely a két hang valamelyike volt. A hangot egy 800-1200 ms között változó időtartamú késleltetés követte. Ezután érkezett az US-ek egyike, amely az egyik frekvenciájú hang esetében lehetett jutalom vagy kihagyás, a másik esetében pedig kihagyás. Ezt követte minden esetben egy 10 s-os jutalom utáni intervallum, mely arra szolgál, hogy ha kapott jutalmat az állat, azt ez idő alatt el tudta fogyasztani. A próba végét egy nyalásmentes intervallum zárta,

mely 1,5 s, innen addig nem tudott tovább lépni az egér, amíg nem hagyta abba a nyalást (3. ábra C).

A tanulási folyamat során 3 fázisban tanultak az állatok napi egyszer. A teljes kísérletet akkor fejezték be, ha az utolsó fázisban 15 napot tanultak legalább. A tanulás megkezdése előtt 5 napig kézhez szoktattuk az állatokat, ezután kerültek be először a kísérleti berendezésbe. Először csak 15 percig helyeztük be őket, a fejbefogáshoz való habituáció érdekében, ekkor még minden alkalommal kapott az állat jutalmat, ha megnyalta a csövet. Ezt követően kerültek be a hangdetekciós protokoll első fázisába, mely során 40 percig csak egy frekvenciájú hangot hallottak, amely 100%-ban jutalmat kódolt. Addig maradtak ebben a lépésben, amíg nem tanulták meg, hogy a hang jutalmat jelent számukra, tehát amikor már a stimulus alatt megkezdtek a várakozó nyalást (anticipatory licking: AL). Ha ez megtörtént, tovább léptek a második fázisba, amely során már a második hangot is prezentáltuk az állatnak. A korábban leírtaknak megfelelően, amely az első lépésben a jutalmat jelentette, az továbbra is 100%-ban így maradt, a másik hang pedig 100%-ban kihagyást kódolt számukra. Ebben a lépésben is 40 percet töltöttek az állatok. Akkor léphettek tovább, ha megtanulták elkülöníteni a két CS jelentését. Az utolsó fázisban már egy órán át tanultak, ekkor a jutalmat kódoló hang csak az esetek 50%-ban jelentett jutalmat, a további 50%-ban kihagyás következett utána. Az ingerek véletlenszerűen generált sorrendben követték egymást.

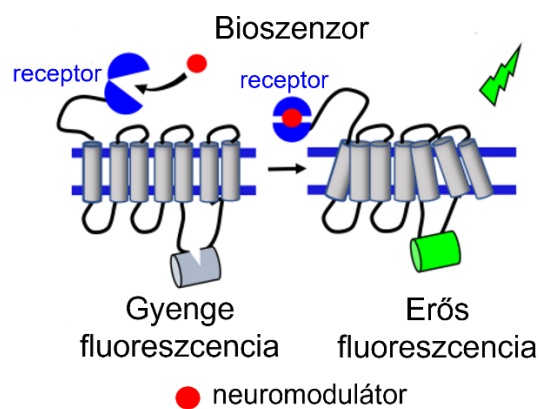


3. ábra: A kísérleti elrendezés és a protokoll

(A) A mérésekhez és a fej rögzítéséhez szükséges implantátum (B) A kísérleti elrendezés sematikus ábrája (C) A tanítási protokoll, amely egy tanítás alatt többször ismétlődik

4.4. Száloptikás fotometria

A viselkedés kísérletek mellett száloptikás fotometriai méréseket is végeztünk a tanulás során. A mérésekhez a fentebb leírt módon injektáltuk a vizsgálni kívánt agyterületekre a bioszenzort expresszáló AAV-ket. Az általunk használt bioszenzorok mind olyan módosított G-fehérje kapcsolt receptorok, amelyekhez DA szenzor esetén a DA, az ACh szenzor esetén az ACh, az NE szenzor esetén az NE és az 5-HT szenzor esetén az 5-HT nagy affinitással kötődik, de ezután a szignalizációs kaszkád sor nem indul el a sejtben. Az így módosított G-fehérje kapcsolt receptorokhoz egy fluoreszcens fehérjét kapcsolnak, mely leggyakrabban zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein: GFP). Az általunk használt bioszenzorok esetében a neuromodulátor bekötése után létrejövő konformáció változás következtében a fluoreszcencia intenzitása megnövekszik (4. ábra). Ezt a változást tudjuk mérni a korábban már említett optikai szálak segítségével, melyeken keresztül meg tudjuk világítani a bioszenzorokat, hogy a fluoreszcencia változást mérni lehessen az alap fluoreszcenciához képest.



4. ábra: A bioszenzorok működési elve

A neuromodulátor bekötése után a receptor konformációja megváltozik, ami a fluoreszcencia fokozódását eredményezi [51]

A méréshez a Doric Lenses 2-site Rendszert (Doric Lenses Inc, Kanada) használtuk, amely lehetővé tette, hogy két agyterületről is tudunk fluoreszcens jelet mérni egy időben. A megvilágítás a rendszeren keresztül LED fénnel történt, amely gerjeszti a bioszenzort, amelyre válaszul az saját jelet bocsát ki. A rendszer egy 465 és egy 405 nm hullámhosszúságú LED-et vezérel. A 465 nm-es jel az adott neuromodulátor felszabadulásával korrelál, ezt normalizáltuk a kontroll 405 nm-es izozbesztikus jellel, ami lehetővé tette az agyszövet mozgásából származó

műtermékek kiszűrését. Ennek háttérmechanizmusában az áll, hogy az adott neuromodulátor kötött és nem kötött fehérjekonformációjának különböző gerjesztési és emissziós spektruma van. Azt a hullámhosszt, amelyen azonos mértékben nyelnek el (tehát, ami a gerjesztési spektrumuk metszéspontja), izozbesztikus pontnak nevezzük. Ha az izozbesztikus pontnak megfelelő hullámhosszú gerjesztést alkalmazunk (itt 405 nm), akkor a mért fluoreszcens jel független attól, hogy van-e kötött neuromodulátor. Az így kapott jel alkalmas arra, hogy a neuromodulátor dependens jelből (465 nm) kivonva a felszabadulással arányos jelet kapjunk [51].

A fluoreszcencia változás (ΔF) mértékének kiszámításához a neuromodulátor felszabadulástól függő szenzorral mért, 465 nm-es jel, és az erre lineárisan illesztett, 405 nm-es izozbesztikus jel közötti különbségét vettük. Ezután százalékos fluoreszcencia-növekedést az alábbi módon számoltuk ki:

$$\frac{\Delta F}{F} = \frac{465 \text{ nm jel} - \text{illesztett } 405 \text{ nm jel}}{\text{illesztett } 405 \text{ nm jel}} * 100$$

5. ábra: Százalékos fluoreszcencia változás

4.5. Statisztikai elemzés

A viselkedés kísérletek és a száloptikás mérések elemzését egyaránt egyedi MatLab függvényekkel végeztük. Páros t-próbával vagy Wilcoxon-féle előjeles rangpróbával teszteltük a jutalom jelenlétének vagy hiányának hatását az állatok viselkedésére és a fotometriai mérésekre nézve. Shapiro-Wilk próbát alkalmaztunk a normalitás vizsgálatra. Pearson korrelációval vizsgáltuk az összefüggést a fotometriai mérések és várakozó nyalások közt. Azt definiáltuk szignifikánsnak, amikor $p \leq 0,05$. A fotometriai mérések átlagolt görbéin a standard hibát jelöltük.

4.6. Hisztológia

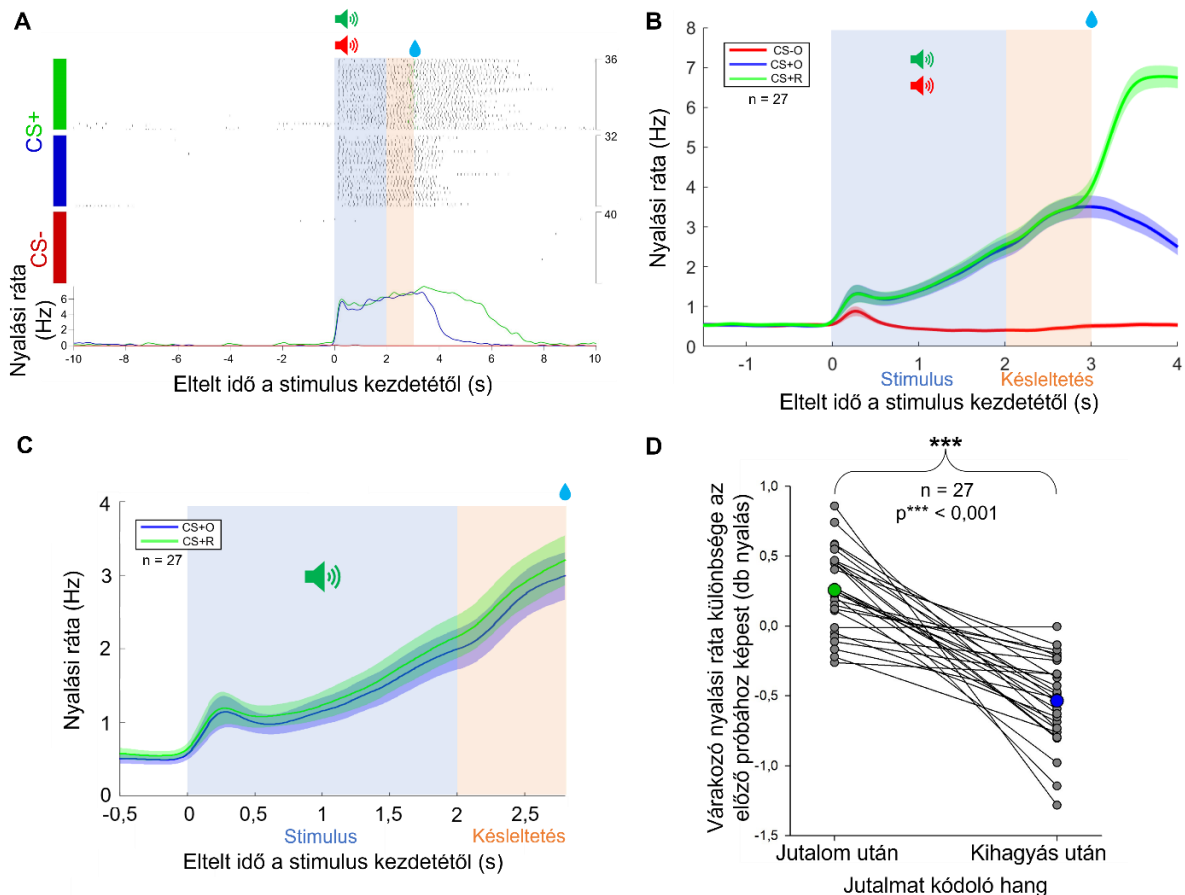
A viselkedési kísérletek végeztével a megfelelő injektálás és optikai szál behelyezésének ellenőrzésére az agyat feldolgoztuk szövettanilag. Az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk, melyhez intraperitoneálisan altattuk őket ketamin-xilazin keverékkel. A perfúzió során a szíven keresztül átmostuk az állat érrendszerét először 0,9%-os fiziológiás sóoldattal a vér eltávolításához, majd 4%-os paraformaldehiddel (PFA) is a szövetek tartósításához. Ezután az agy kivételre került, majd 4%-os PFA-ban posztfixáltuk [52]. Nagyjából 1 nap elteltével a vírus injektálás koordinátáitól függően a megfelelő agyterületek

metszésre kerültek vibratómmal (Leica VT1200S, Leica, Németország), és 50 µm-es metszeteket készítettünk. Kiválasztottuk a megfelelő metszeteket, amelyeken a vizsgált agyterületek megtalálhatóak voltak, illetve látható volt az optikai szál helye, ezek kerültek festésre. Először nátrium-foszfát pufferrel (phosphate buffer: PB) mostuk át őket háromszor 10 percen át, majd trisz-pufferelt sóoldattal (tris-buffered saline: TBS) szintén háromszor 10 percen át. A következő lépésben blokkoltuk a metszeteket az aspecifikus kötődés elkerülése érdekében. A blokkolás során 1%-os humán szérumalbumin (HSA) és 0,1%-os TRITON-X-100 keverékébe helyeztük őket egy órára. A TRITON-X-100-ra a metszetek permeabilizálásához volt szükség. Végül a primer antitest metszetekre történő ráhelyezése történt 48 órára, jelen esetben ez anti-GFP fehérje (ThermoFisher Scientific, A10262, Amerikai Egyesült Államok) 1:2000 hígításban. A két nap elteltével először háromszor 15 percig TBS-ben átmostuk a metszeteket, majd rákerült a szekunder antitest a metszetekre, amely Goat Anti-Chicken (ThermoFisher Scientific, A-11039, Amerikai Egyesült Államok) 1:1000 hígításban. A következő nap ismét átmostuk kétszer 10 percen át TBS-sel, majd PB-vel. Ezután rákerült a 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) festék, amely a sejtmagokat festi 1:10000 hígításban. Mikor végeztünk a festéssel ismét átmostuk a metszeteket PB-vel háromszor 10 percen át. Ezt követően tárgylemezre kerültek Aqua-poly/Mount (Polysciences Inc., 18606-20, Amerikai Egyesült Államok) fedőanyaggal. Végezetül pedig Panoramic MIDI Slidescannerrel (3DHISTECH Kft., Budapest, Magyarország) beszkeneltük a metszeteket és ellenőriztük (SlideViewer, 3DHISTECH Kft., Budapest, Magyarország), hogy megfelelő helyre történt-e a vírus injektálása és az optikai szálak behelyezése.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Az állatok viselkedési eredménye pavlovi kondicionálás során

Kísérleteink során az állatok viselkedését a stimulus által kiváltott AL változásának függvényében vizsgáltuk. A 6. A nyalási raszter ábrán egy kísérleti nap összes viselkedési próbája látható próba típusok szerint felosztva. Látható, hogy az állatok a stimulus és a késleltetés alatt megnövekedett számú AL-lel válaszolnak a jutalmat jelző hang esetén, míg a kihagyást jelző hang esetén nem, ez látható a csoport átlagon is (6. ábra B). Az állatok viselkedését az adott próbákat megelőző próbák típusa szerint vizsgálva azt találtuk, hogy a jutalmazott próbák után megnőtt az AL száma a rákövetkező jutalmat kódoló hang alatt (6. ábra C). Kísérleteink során tehát elmondható, hogy az egerek viselkedésének megváltozása követte az RPE változását. A 6. D ábrán is jól látható, hogy várakozó nyalási ráta (anticipatory licking rate: ALR) frissülése a RPE-nek megfelelően alakult, azaz jutalmazott próbák után növekedett a nyalási ráta, jutalmazatlanok után pedig csökkent ($-0,54 \pm 0,31$ darab nyalás vs. $0,26 \pm 0,30$ darab nyalás; delta positive condition stimuli omission (dCSPO) max vs. delta positive condition stimuli reward (dCSPR) max).



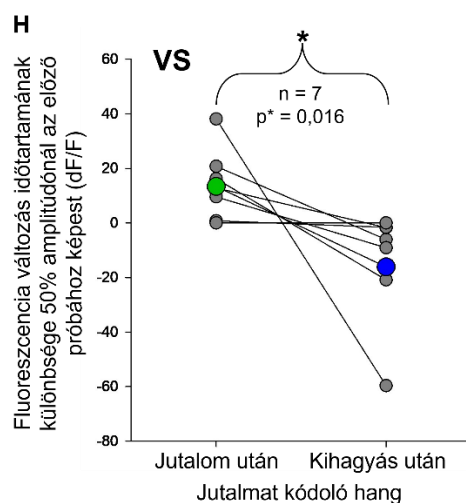
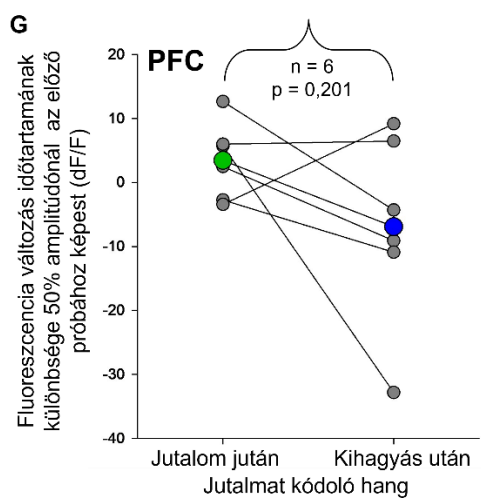
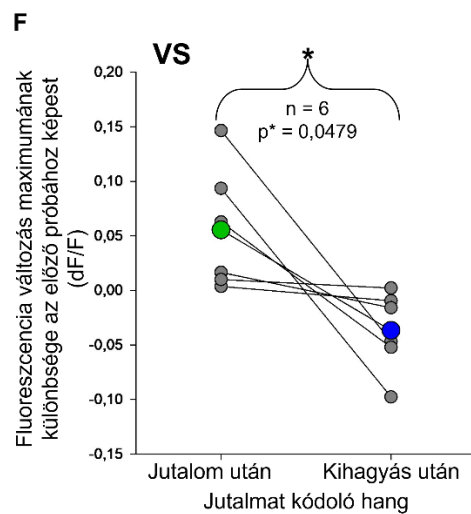
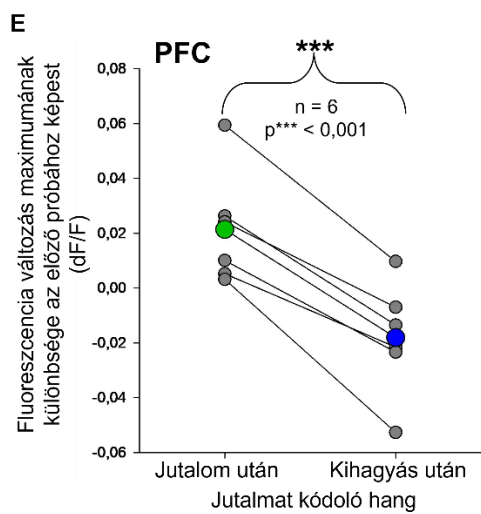
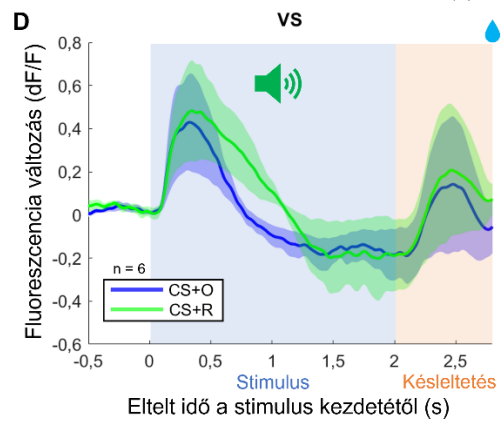
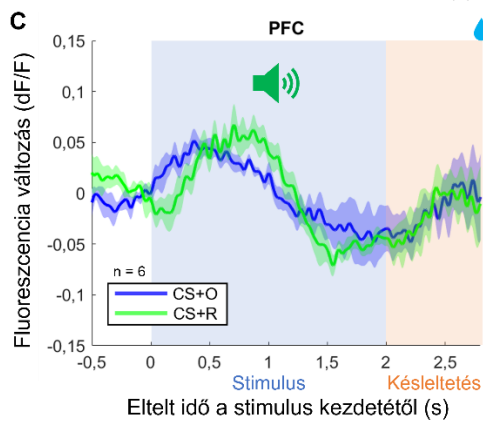
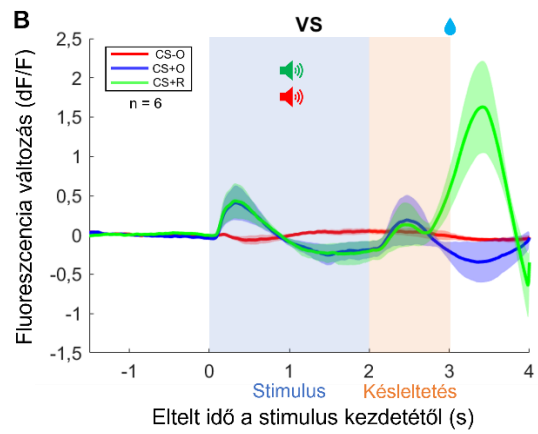
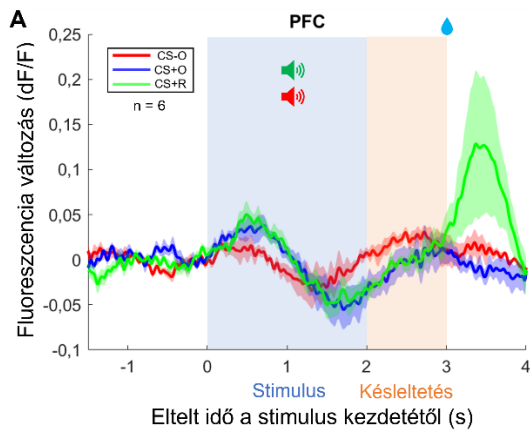
6. ábra. ábra Viselkedés kísérletek eredménye

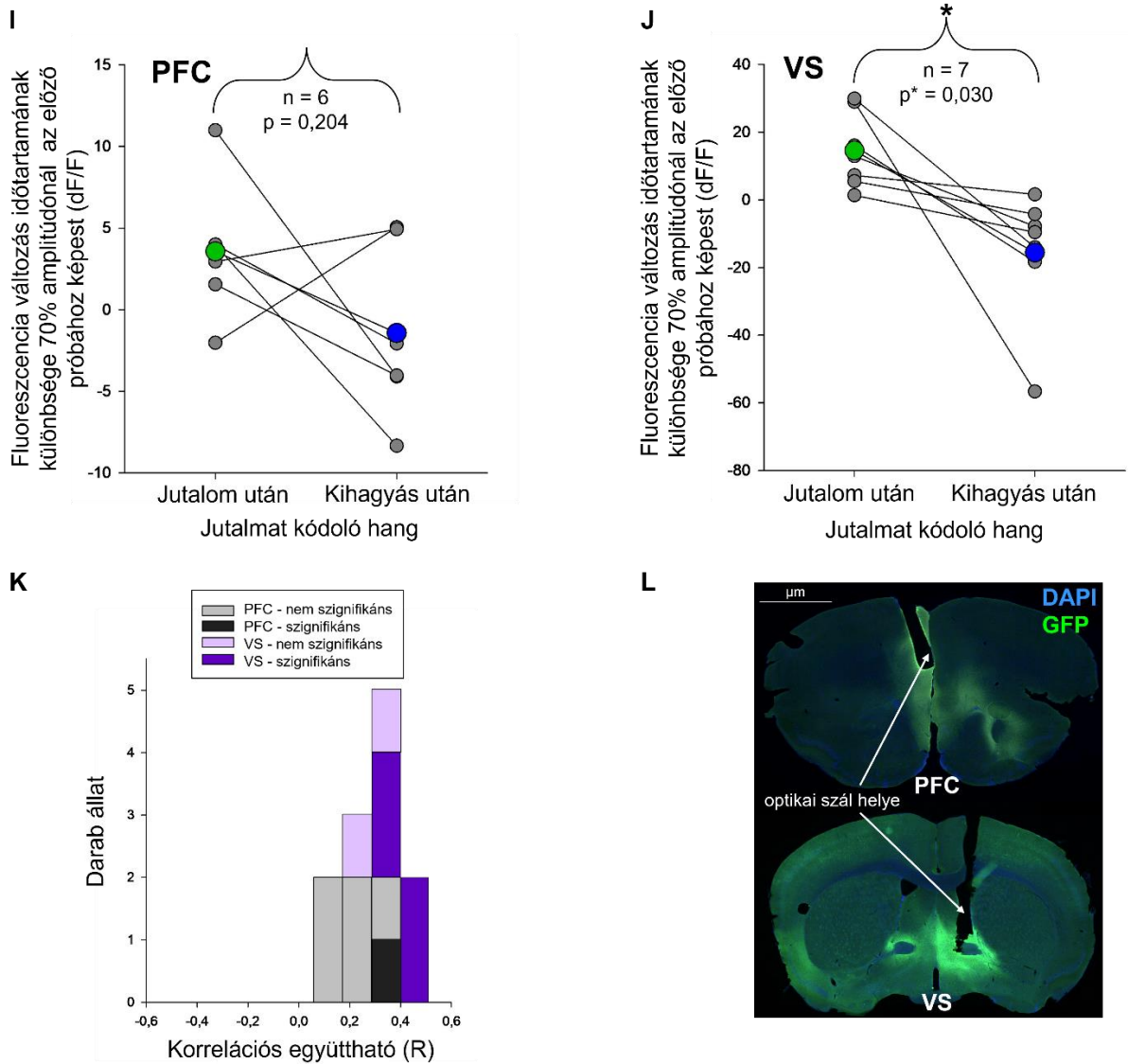
(A) Reprezentatív ábra egy egér egy napi teljesítményéről. Az ábra felső részén az állat egyedülálló nyalásai látszanak a két hang esetében. Az alsó részen pedig az átlagolt nyalásai láthatók. (B) Az állatok várakozó nyalásainak átlagolt görbéje. (C) Az állatok várakozó nyalásainak átlagolt görbéje jutalmazott próba alatt. A szín kódolás itt a próbát megelőző próba típusát jelöli. (D) A várakozó nyalási ráta különbsége a megelőző próba nyalási rátájához képest (Páros t-próba $p^{***}<0,001$).

Rövidítések: CS-O: negative conditioned stimuli-omission = negatív feltételes inger-kihagyás, CS+O: positive conditioned stimuli-omission = pozitív feltételes inger-kihagyás, CS+R: positive conditioned stimuli-reward = pozitív feltételes inger-jutalom

5.2. A dopamin felszabadulás mérésének fotometriai eredménye a pavlovi kondicionálás során

A pavlovi kondicionálás során kialakult asszociáció eredményeképp a jutalmat jelző hang esetében növekedett a fluoreszcencia intenzitás, vagyis a DA felszabadulás a stimulus alatt, mind a PFC-ben, mind pedig a VS-ben (7. ábra A és B). Itt is megvizsgáltuk, hogy milyen hatással volt az aktuális próbát megelőző próba kimenetele a következő próba stimulus alatt mérhető DA felszabadulására. A jutalmazott próbák után nőtt a fluoreszcencia változás, vagyis a DA felszabadulás mértéke a rákövetkező jutalmat kódoló hangot tartalmazó próbák esetében a stimulus alatt (7. ábra C és D). A jutalmazatlan próbák után, a következő jutalmat kódoló próba alatt csökkent a fluoreszcencia változás mértéke a stimulus alatt (7. ábra C és D). A dopamin válasz megerősítésen alapuló frissülése mindkét agyterület esetében megfigyelhető volt a fluoreszcencia változás maximumában (7. ábra E és F) (PFC: $-0,02 \pm 0,02$ ms vs. $0,02 \pm 0,02$ ms; dCSPO max vs. dCSPR max, VS: $-0,04 \pm 0,04$ ms vs. $0,06 \pm 0,06$ ms; dCSPO max vs. dCSPR max). A VS-ben mind e mellett a fluoreszcencia változás időtartamában is látható volt ez a változás 50%-os ($-16,11 \pm 7,71$ ms vs. $13,37 \pm 5,29$ ms; dCSPO dur vs. dCSPR dur) és 70%-os amplitúdónál ($-15,57 \pm 19,23$ ms vs. $14,57 \pm 11,24$ ms; dCSPO dur vs. dCSPR dur) is egyaránt (7. ábra H és J). Ezzel szemben a PFC-ben a fluoreszcencia változás időtartama nem követte az RPE frissülését szignifikánsan (7. ábra G és I) (50%: $-6,92 \pm 15,08$ ms vs. $3,44 \pm 6,05$ ms; dCSPO dur vs. dCSPR dur; 70%: $-1,43 \pm 5,37$ ms vs. $3,57 \pm 4,27$ ms; dCSPO dur vs. dCSPR dur). A 100%-ban kihagyást kódoló hang esetén nem történt szignifikáns változás a fluoreszcencia jelben a kezdeti alapvonalhoz képest egyik agyterületen sem (7. ábra A és B). Továbbá, a PFC-ben és a VS-ben egyaránt pozitívan korrelált a fluoreszcencia változás és az ALR változása (7. ábra K). Az 7. L ábrán a két vizsgált agyterület fluoreszcencia képe látható. Megfigyelhető rajtuk az optikai szálak helye, illetve zölddel az expresszáldott DA szenzor.





7. ábra: A dopamin fotometriai méréseinek eredménye

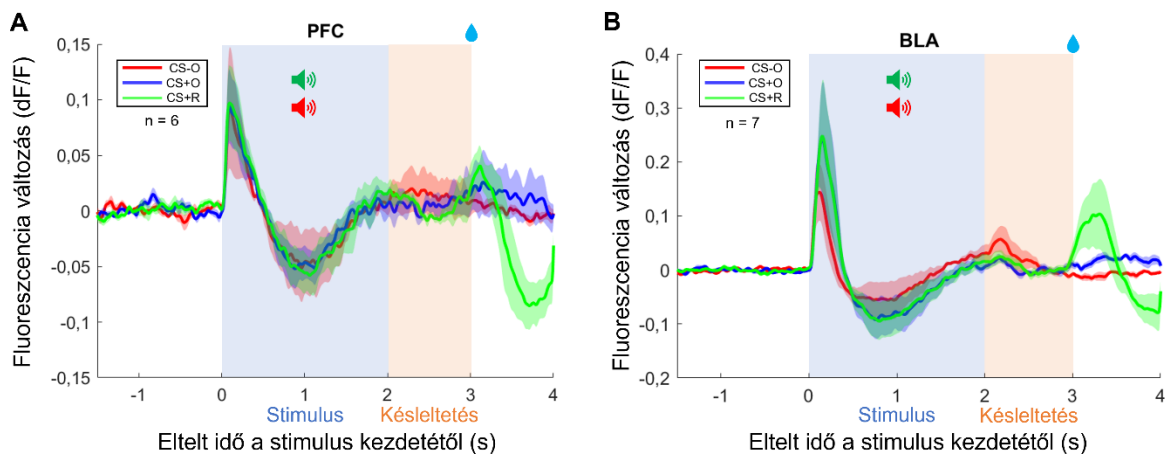
(A) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a prefrontális kéregben (prefrontal cortex: PFC). (B) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a ventrális striátumban (VS). (C) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a PFC-ben jutalmazott próba alatt. A szín kódolás itt a próbát megelőző próba típusát jelöli. (D) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a VS-ban jutalmazott próba alatt. A szín kódolás itt a próbát megelőző próba típusát jelöli. (E) A dopamin fluoreszcencia változás maximumának különbsége a PFC-ben az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (F) A dopamin fluoreszcencia változás maximumának különbsége a VS-ban az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (G) A dopamin fluoreszcencia változás időtartamának különbsége 50% amplitúdónál a PFC-ben az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (H) A dopamin fluoreszcencia változás időtartamának különbsége 50% amplitúdónál a VS-ban az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (I) A dopamin fluoreszcencia változás időtartamának különbsége 70% amplitúdónál a PFC-ben az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (J) A dopamin fluoreszcencia változás időtartamának különbsége 70% amplitúdónál a VS-ban az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (K) A fluoreszcencia változás és a nyalási ráta korrelációs együtthatóinak eloszlása agyterületenként (L) A vírus

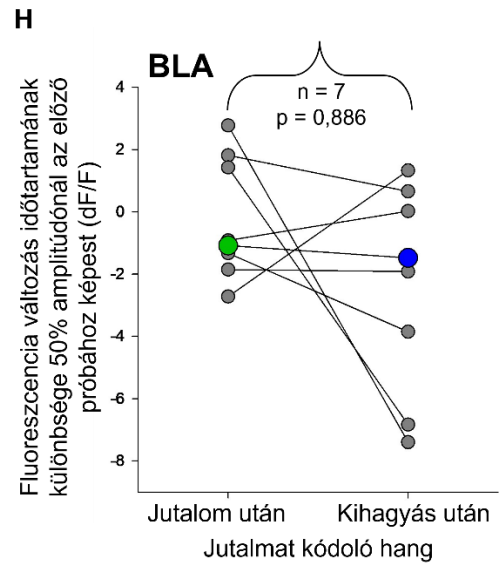
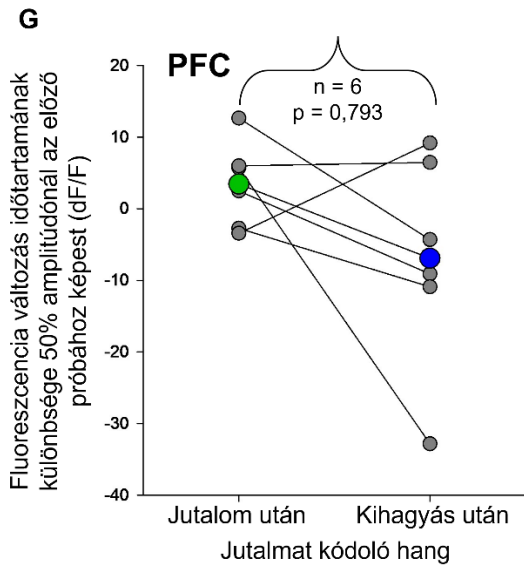
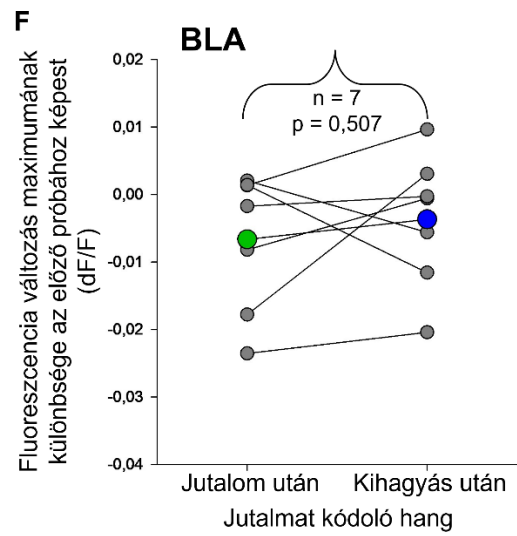
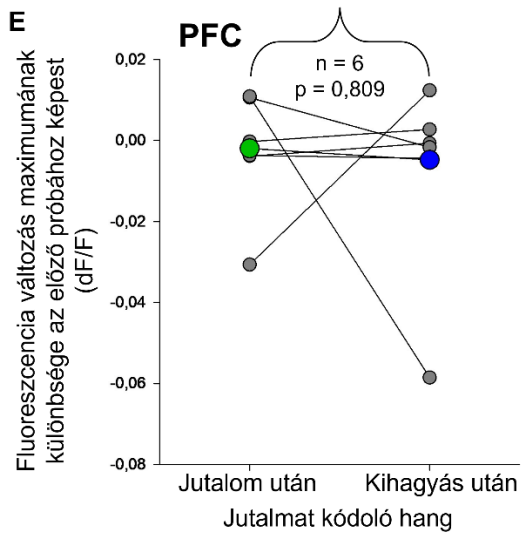
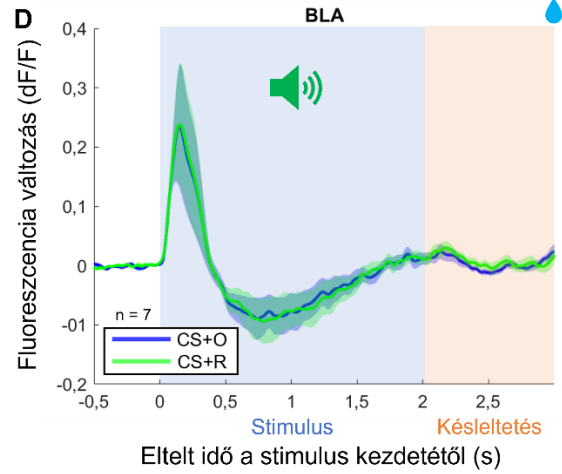
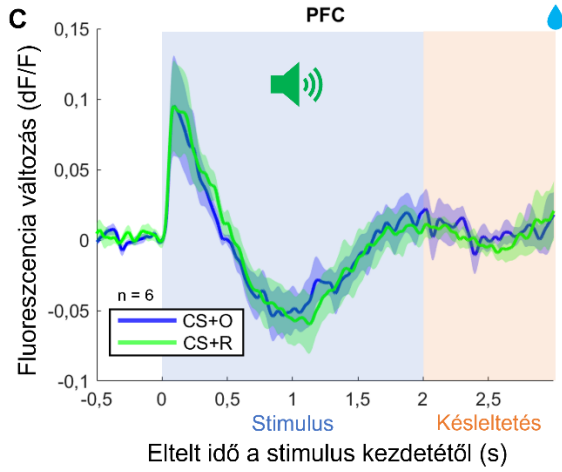
injektálás, illetve az optikai szál helye a PFC-ben és a VS-ban. (Páros t-próba $p^* < 0,05$; Wilcoxon-féle előjeles rangpróba $p^* < 0,05$; Pearson korreláció $p^* < 0,05$)

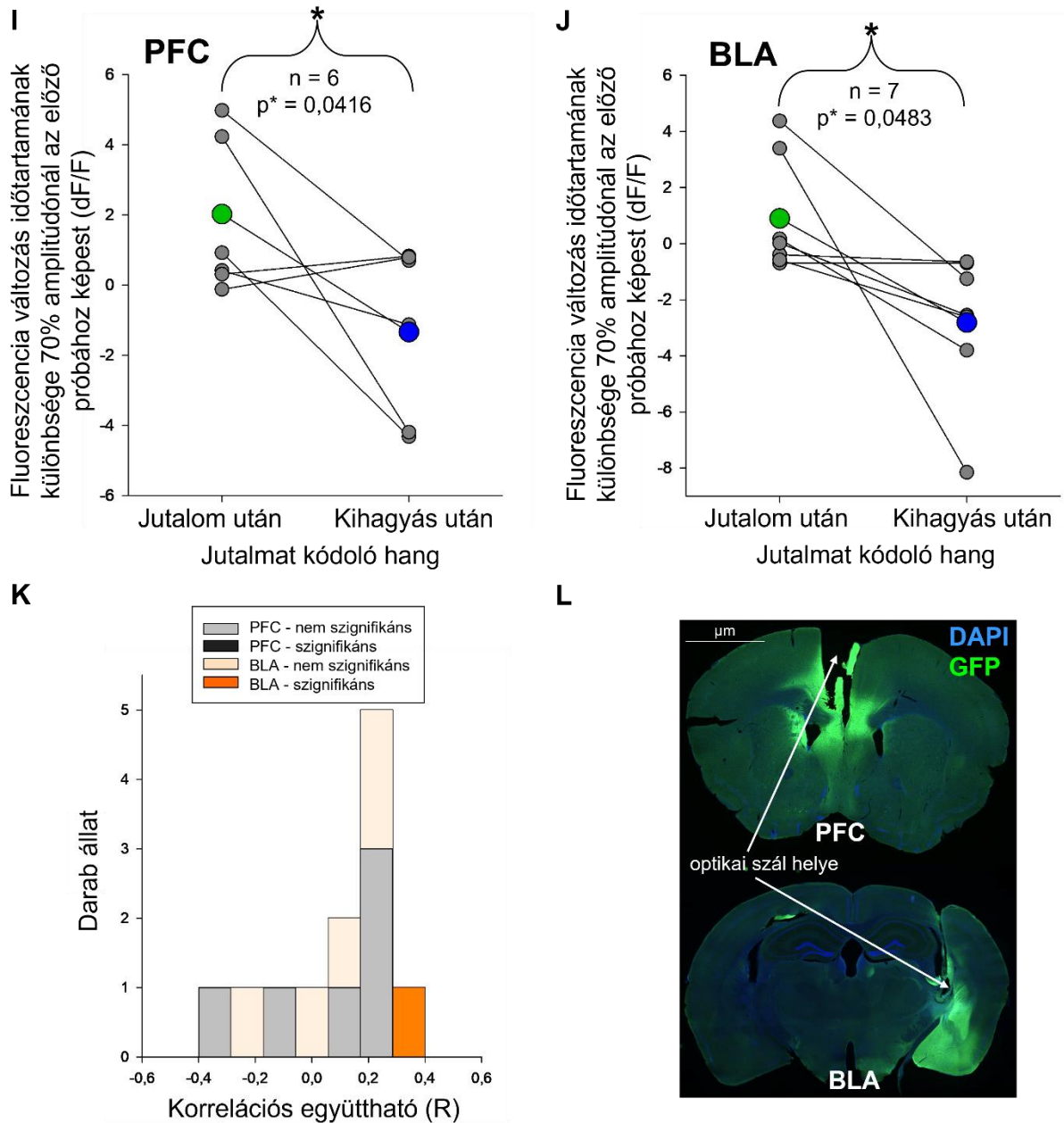
Rövidítések: CS-O: negative conditioned stimuli-omission = negatív feltételes inger-kihagyás, CS+O: positive conditioned stimuli-omission = pozitív feltételes inger-kihagyás, CS+R: positive conditioned stimuli-reward = pozitív feltételes inger-jutalom. PFC: prefrontal cortex = prefrontális kéreg, VS: ventrális striátum. DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol, GFP: green fluorescent protein = zöld fluoreszcens fehérje

5.3. Az acetilkolin felszabadulás mérésének fotometriai eredménye a pavlovi kondicionálás során

Mindkét inger hatására növekedett a fluoreszcencia változás az ACh esetében a stimulus alatt a PFC-ben és a BLA-ban egyaránt (8. ábra A és B). A próbát megelőző próba típusa egyik agyterületen sem befolyásolta a rákövetkező próba stimulus alatt mért fluoreszcencia változás maximumát (8. ábra C, D, E és F) (PFC: $-0,005 \pm 0,02$ ms vs. $-0,002 \pm 0,01$ ms; dCSPO max vs. dCSPR max; BLA: $-0,004 \pm 0,08$ ms vs. $-0,007 \pm 0,01$ ms; dCSPO max vs. dCSPR max). A fluoreszcencia változást 50%-os amplitúdónál vizsgálva sem volt a frissülés megfigyelhető egyik vizsgált, agyterületen sem (8. ábra G és H) (PFC: $-0,27 \pm 3,89$ ms vs. $0,267 \pm 1,52$ ms; dCSPO dur vs. dCSPR dur; BLA: $-1,48 \pm 4,52$ ms vs. $-1,09 \pm 3,36$ ms; dCSPO dur vs. dCSPR dur). Ezzel szemben 70%-os amplitúdónál szignifikáns volt a különbség a fluoreszcencia változás időtartamában (8. ábra I és J) (PFC: $-1,34 \pm 2,27$ ms vs. $2,02 \pm 2,12$ ms; dCSPO dur vs. dCSPR dur; BLA: $-2,82 \pm 2,62$ ms vs. $0,90 \pm 2,08$ ms; dCSPO dur vs. dCSPR dur). Mind a frontális kérgi, mind a mélyagyi területen jutalmazott próbák után növekedett az időtartam, míg kihagyott jutalmak után csökkent. A két agyterület fluoreszcencia változása és az ALR változása között nem volt megfigyelhető egyértelmű irányú korreláció (8. ábra K). A 8. L ábrán a két vizsgált agyterület fluoreszcens képe látható. Megfigyelhető rajtuk az optikai szálak helye, illetve zölddel az expresszáldott ACh szenzor.







8. ábra: Az acetilkolin fotometriai méréseinek eredménye

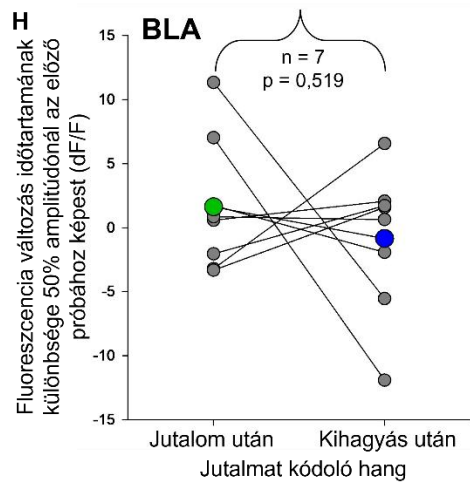
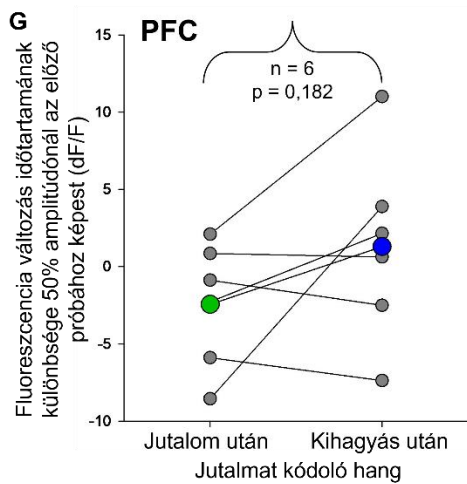
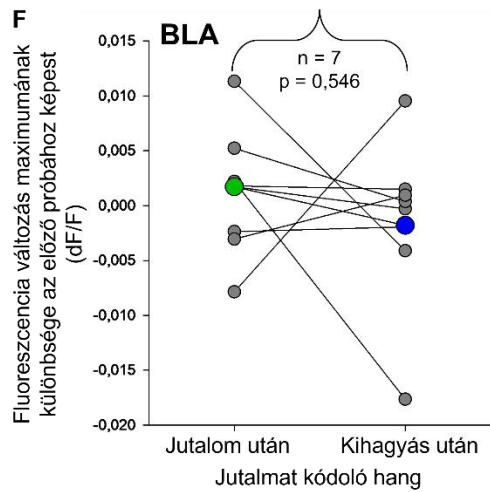
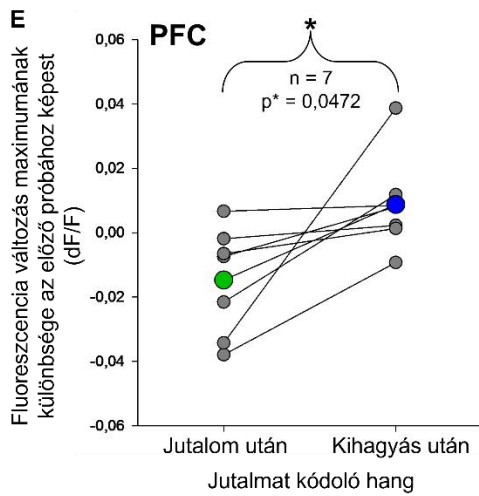
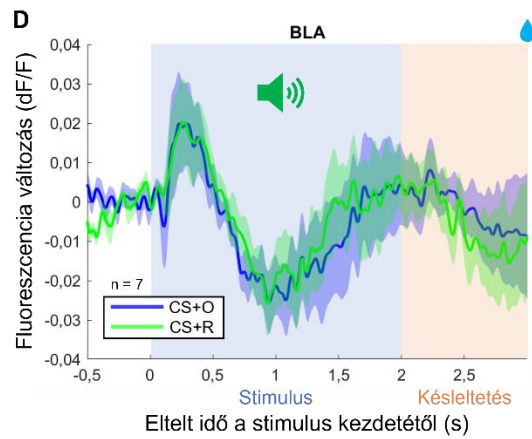
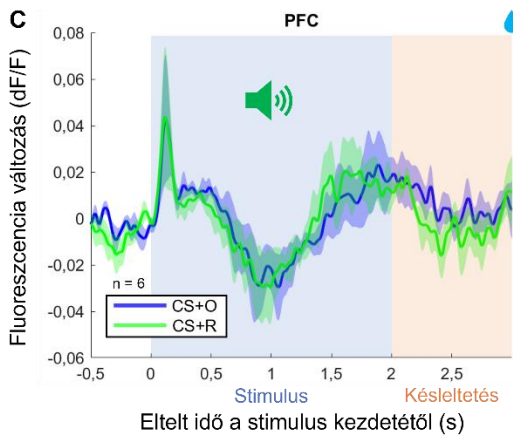
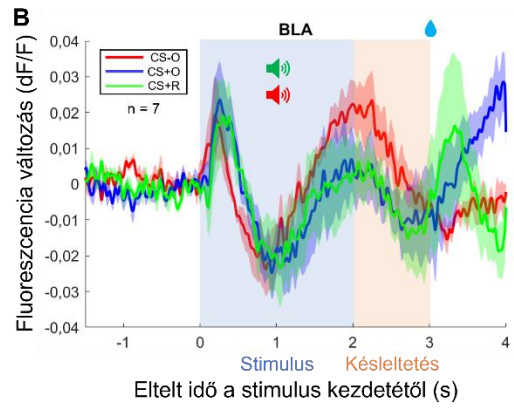
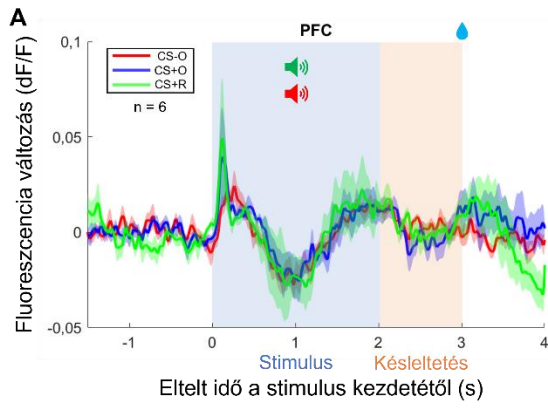
(A) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a prefrontális kéregben (prefrontal cortex: PFC). (B) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a bazolaterális amigdalában (BLA). (C) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a PFC-ben jutalmazott próba alatt. A szín kódolás itt a próbát megelőző próba típusát jelöli. (D) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a BLA-ban jutalmazott próba alatt. A szín kódolás itt a próbát megelőző próba típusát jelöli. (E) Az acetilkolin fluoreszcencia változás maximumának különbsége a PFC-ben az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (F) Az acetilkolin fluoreszcencia változás maximumának különbsége a BLA-ban az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (G) Az acetilkolin fluoreszcencia változás időtartamának különbsége 50% amplitúdónál a PFC-ben az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (H) Az acetilkolin fluoreszcencia változás időtartamának különbsége 50% amplitúdónál a BLA-ban az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (I) Az acetilkolin fluoreszcencia változás időtartamának különbsége 70% amplitúdónál a PFC-ben az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (J) Az acetilkolin

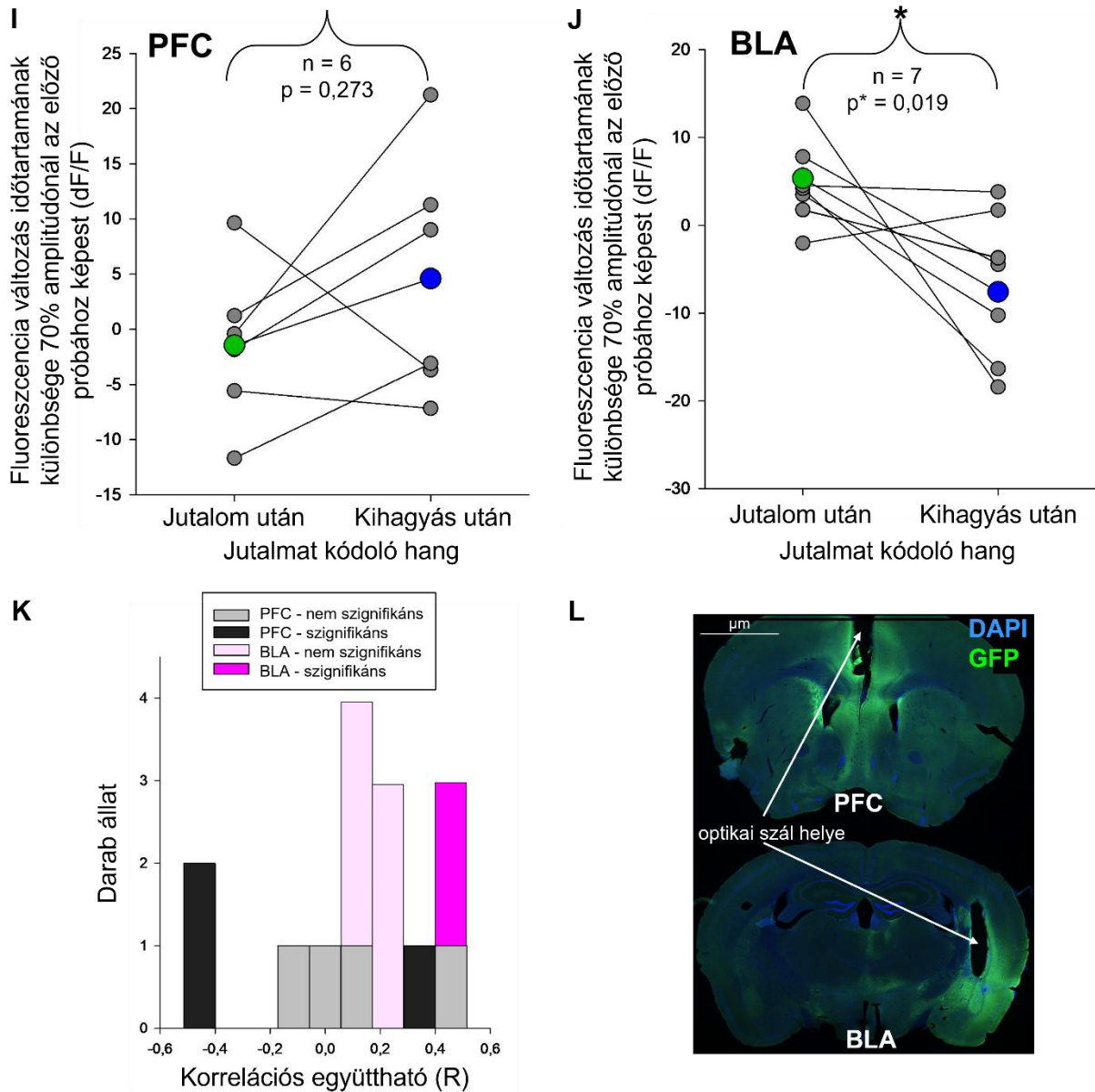
fluoreszcencia változás időtartamának különbsége 70% amplitúdónál a BLA-ban az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. **(K)** A fluoreszcencia változás és a nyálási ráta korrelációs együtthatóinak eloszlása agyterületenként **(L)** A vírus injektálás, illetve az optikai szál helye a PFC-ben és a BLA-ban. (Páros t-próba $p^* < 0,05$; Pearson-korreláció $p^* < 0,05$)

Rövidítések: CS-O: negative conditioned stimuli-omission = negatív feltételes inger-kihagyás, CS+O: positive conditioned stimuli-omission = pozitív feltételes inger-kihagyás, CS+R: positive conditioned stimuli-reward = pozitív feltételes inger-jutalom. PFC: prefrontal cortex = prefrontális kéreg, BLA: bazolaterális amigdala. DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol, GFP: green fluorescent protein = zöld fluoreszcens fehérje

5.4. A noradrenalin felszabadulás mérésének fotometriai eredménye a pavlovi kondicionálás során

Hasonlóan az ACh-hoz, mindkét inger hatására növekedett a fluoreszcencia változás, vagyis a NE felszabadulása a stimulus alatt a PFC-ben és a BLA-ban egyaránt (9. ábra A és B). A NE felszabadulást az adott próbákat megelőző próbák típusa szerint vizsgálva azt találtuk, hogy a PFC-ben a jutalmazott próbák után csökkent a rákövetkező jutalmat kódoló hang alatt a NE szenzorok fluoreszcencia változásának maximuma, vagyis az NE felszabadulás mértéke, míg a jutalmazatlan próbák után nőtt a fluoreszcencia változás maximuma (9. ábra C és E) ($0,007 \pm 0,017$ ms vs. $-0,012 \pm 0,020$ ms; dCSPO max vs. dCSPR max). A BLA-ban nem volt szignifikáns különbség a fluoreszcencia változás maximumában a két kimenetel között (9. ábra D és F) ($-0,003 \pm 0,009$ ms vs. $-0,001 \pm 0,008$ ms; dCSPO max vs. dCSPR max). Az időtartam 50%-os amplitúdójára nem volt hatással egyik agyterületen sem az előző próba típusa (9. ábra G és H) (PFC: $3,92 \pm 8,68$ ms vs. $-3,74 \pm 4,07$ ms; dCSPO dur vs. dCSPR dur; BLA: $-6,8 \pm 13,49$ ms vs. $4,14 \pm 5,57$ ms; dCSPO dur vs. dCSPR dur). 70%-os amplitúdónál a PFC-ben nem volt megfigyelhető szignifikáns változás (9. ábra I) ($4,59 \pm 11,02$ ms vs. $-1,44 \pm 7,11$ ms; dCSPO dur vs. dCSPR dur). A BLA-ban azonban az ACh-hoz hasonlóan megfigyelhető volt az RPE frissülése szerinti fluoreszcencia időtartam változás (9. ábra J) ($7,59 \pm 7,86$ ms vs. $5,35 \pm 4,28$ ms; dCSPO dur vs. dCSPR dur). A jutalmazott próbák után növekedett az időtartam, jutalmazatlan próbák után pedig csökkent. A PFC-ben negatív, a BLA-ban leginkább pozitív korrelációt figyeltünk meg a fluoreszcencia változás és az ALR változása között (9. ábra K). A 9. L ábrán a két vizsgált agyterület fluoreszcens képe látható. Megfigyelhető rajtuk az optikai szálak helye, illetve zölddel az expresszáldott NE szenzor.





9. ábra: A noradrenalin fotometriai méréseinek eredménye

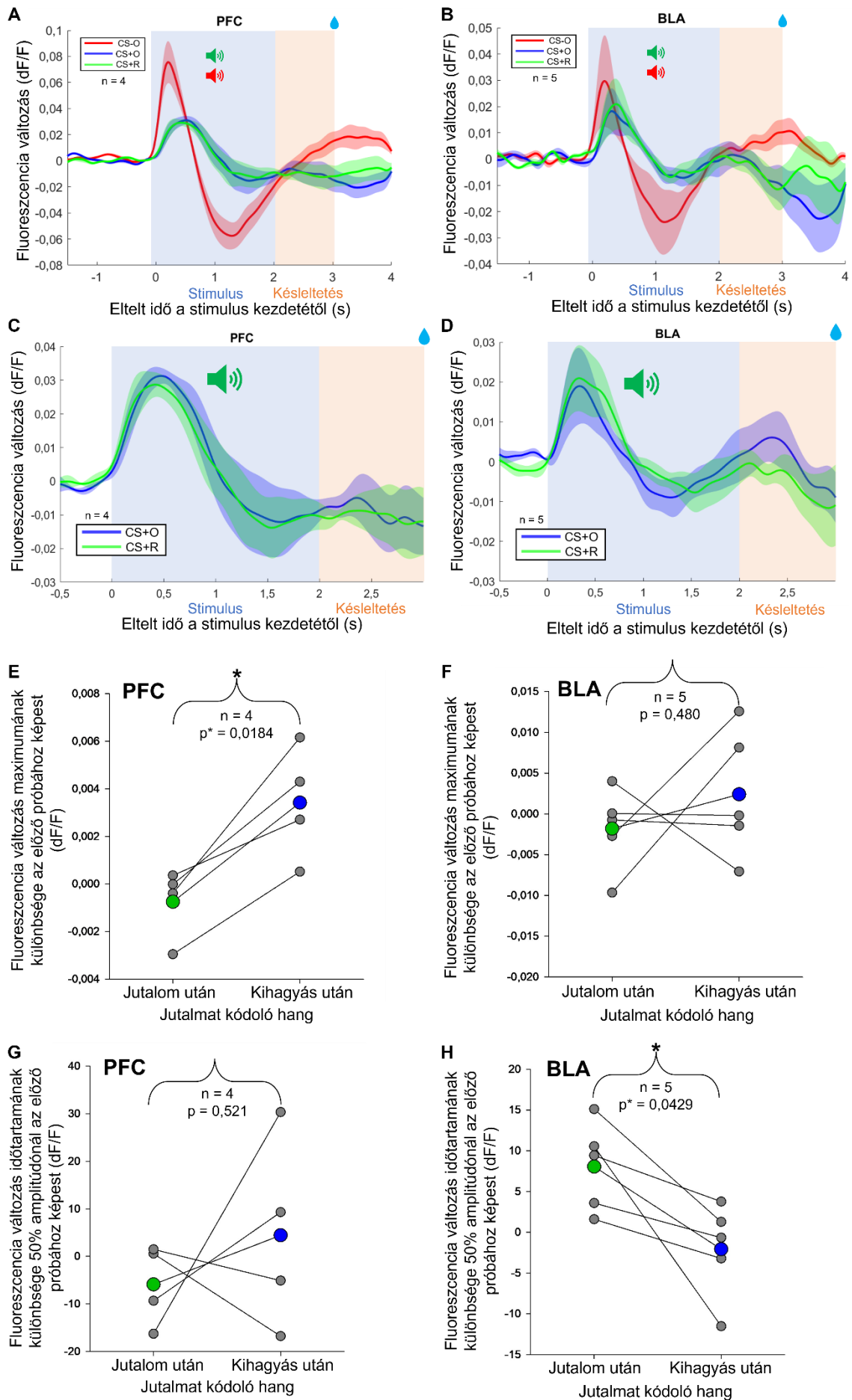
(A) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a prefrontális kéregben (prefrontal cortex: PFC). (B) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a bazolaterális amigdalában (BLA). (C) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a PFC-ben jutalmazott próba alatt. A szín kódolás itt a próbát megelőző próba típusát jelöli. (D) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a BLA-ban jutalmazott próba alatt. A szín kódolás itt a próbát megelőző próba típusát jelöli. (E) A noradrenalin fluoreszcencia változás maximumának különbsége a PFC-ben az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (F) A noradrenalin fluoreszcencia változás maximumának különbsége a BLA-ban az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (G) A noradrenalin fluoreszcencia változás időtartamának különbsége 50% amplitúdónál a PFC-ben az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (H) A noradrenalin fluoreszcencia változás időtartamának különbsége 50% amplitúdónál a BLA-ban az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (I) A noradrenalin fluoreszcencia változás időtartamának különbsége 70% amplitúdónál a PFC-ben az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (J) A noradrenalin fluoreszcencia változás időtartamának különbsége 70% amplitúdónál a BLA-ban az azt megelőző

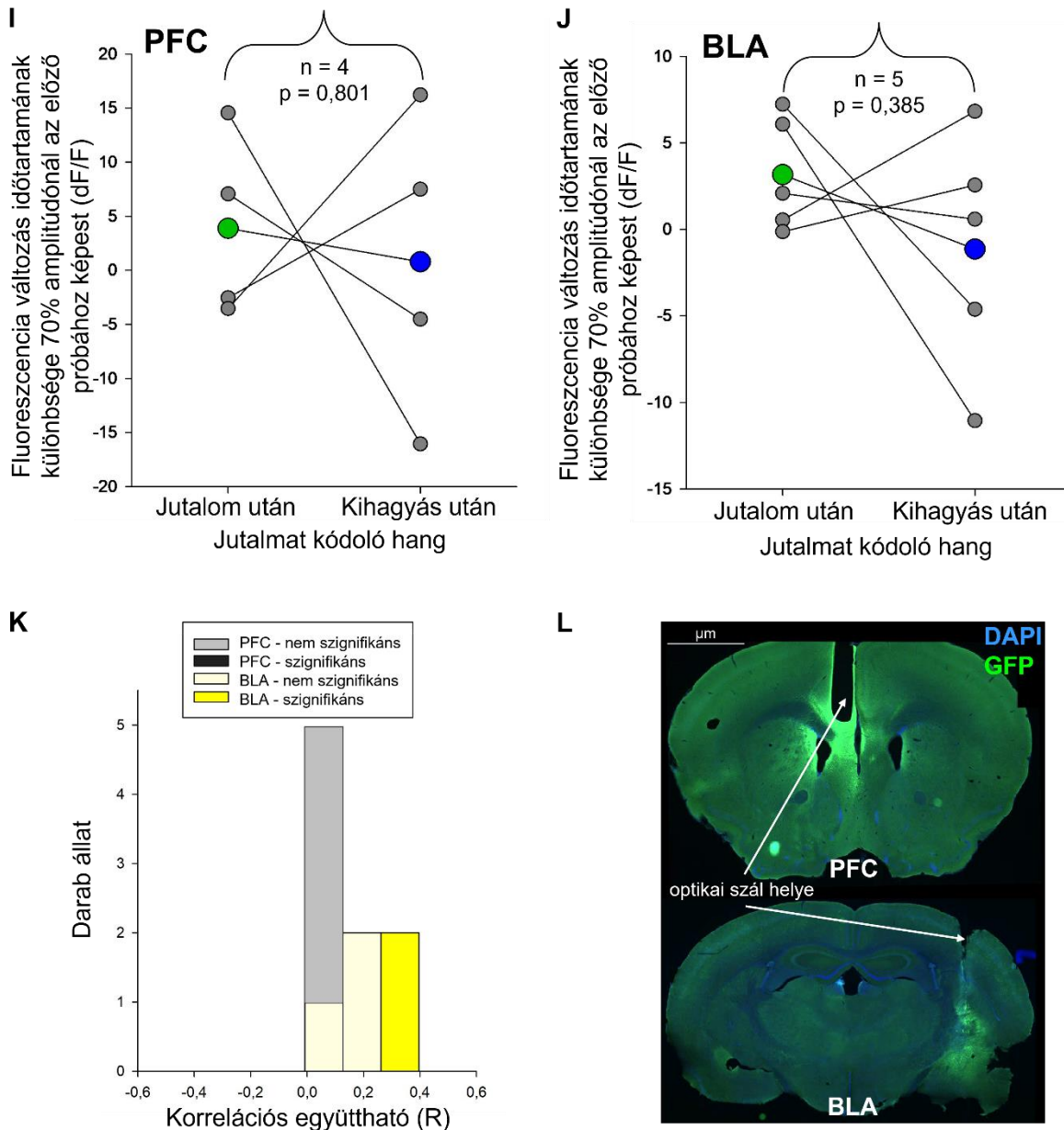
próba fluoreszcencia változásához képest. **(K)** A fluoreszcencia változás és a nyalási ráta korrelációs együtthatóinak eloszlása agyterületenként. **(L)** A vírus injektálás, illetve az optikai szál helye a PFC-ben és a BLA-ban. (Páros t-próba $p < 0,05$; Pearson korreláció $p < 0,05$)

Rövidítések: CS-O: negative conditioned stimuli-omission = negatív feltételes inger-kihagyás, CS+O: positive conditioned stimuli-omission = pozitív feltételes inger-kihagyás, CS+R: positive conditioned stimuli-reward = pozitív feltételes inger-jutalom. PFC: prefrontal cortex = prefrontális kéreg, BLA: bazolaterális amigdala. DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol, GFP: green fluorescent protein = zöld fluoreszcens fehérje

5.5. A szerotonin felszabadulás mérésének fotometriai eredménye a pavlovi kondicionálás során

Az 5-HT szintén mindkét CS esetében megnövekedett fluoreszcencia változással válaszolt a vizsgált agyterületeken (10. ábra A és B). A jutalmat kódoló hang utáni kimenetekre a két agyterületen különböző válasz volt megfigyelhető (10. ábra C és D). A PFC-ben a NE-hez hasonlóan az RPE-vel ellentétes frissülés volt megfigyelhető a fluoreszcencia változás maximumában (10. ábra E), a jutalmazott próbák után csökkent, míg kihagyott jutalmak után növekedett a maximum ($0,003 \pm 0,002$ ms vs. $-0,001 \pm 0,002$ ms; dCSPO max vs. dCSPR max). Ezzel szemben a BLA-ban nem volt a két kimenetnek hatása a fluoreszcencia maximumára (10. ábra F) ($0,002 \pm 0,008$ ms vs. $-0,002 \pm 0,005$ ms; dCSPO max vs. dCSPR max). A fluoreszcencia változás amplitúdóját vizsgálva 50%-nál a PFC-ben nem volt hatása a próbát megelőző próbának (10. ábra G) ($-4,44 \pm 20,29$ ms vs. $-5,89 \pm 8,49$ ms; dCSPO dur vs. dCSPR dur). A BLA-ban azonban megfigyelhető volt az RPE-nek megfelelő frissülés, jutalmazott próbák után nőtt, jutalmazatlanok után pedig csökkent az időtartam (10. ábra H) ($-2,07 \pm 5,57$ ms vs. $8,05 \pm 5,46$ ms; dCSPO dur vs. dCSPR dur). A próbák kimenetele egyik agyterületen sem volt hatással a fluoreszcencia változására 70%-os amplitúdónál (10. ábra I és J) (PFC: $0,79 \pm 14,08$ ms vs. $3,89 \pm 8,57$ ms; dCSPO dur vs. dCSPR dur; BLA: $-1,14 \pm 6,90$ ms vs. $3,17 \pm 3,31$ ms; dCSPO dur vs. dCSPR). A PFC fluoreszcencia változása és az ALR változása között nem volt megfigyelhető korreláció, ezzel szemben a BLA-ban szignifikáns pozitív korreláció volt megfigyelhető. (10. ábra K). A 10. L ábrán a két vizsgált agyterület fluoreszcens képe látható. Megfigyelhető rajtuk az optikai szálak helye, illetve zölddel az expresszáldott 5-HT szenzor.





10. ábra: A szerotonin fotometriai méréseinek eredménye

(A) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a prefrontális kéregben (prefrontal cortex: PFC). (B) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a bazolaterális amigdalában (BLA). (C) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a PFC-ben jutalmazott próba alatt. A szín kódolás itt a próbát megelőző próba típusát jelöli. (D) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a BLA-ban jutalmazott próba alatt. A szín kódolás itt a próbát megelőző próba típusát jelöli. (E) A szerotonin fluoreszcencia változás maximumának különbsége a PFC-ben az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (F) A szerotonin fluoreszcencia változás maximumának különbsége a BLA-ban az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (G) A szerotonin fluoreszcencia változás időtartamának különbsége 50% amplitúdónál a PFC-ben az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (H) A szerotonin fluoreszcencia változás időtartamának különbsége 50% amplitúdónál a BLA-ban az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (I) A szerotonin fluoreszcencia változás időtartamának különbsége 70% amplitúdónál a PFC-ben az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest. (J) A szerotonin fluoreszcencia változás időtartamának különbsége 70% amplitúdónál a BLA-ban az azt megelőző próba

fluoreszcencia változásához képest. **(K)** A fluoreszcencia változás és a nyalási ráta korrelációs együtthatóinak eloszlása agyterületenként. **(L)** A vírus injektálás, illetve az optikai szál helye a PFC-ben és a BLA-ban. (Páros t-próba $p^* < 0,05$; Pearson korreláció $p^* < 0,05$)

Rövidítések: CS-O: negative conditioned stimuli-omission = negatív feltételes inger-kihagyás, CS+O: positive conditioned stimuli-omission = pozitív feltételes inger-kihagyás, CS+R: positive conditioned stimuli-reward = pozitív feltételes inger-jutalom. PFC: prefrontal cortex = prefrontális kéreg, BLA: bazolaterális amigdala. DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol, GFP: green fluorescent protein = zöld fluoreszcens fehérje

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a vártnak megfelelően az AL-ben bekövetkező változások önmagukban jelzik az RPE változásait asszociatív tanulás során, amellyel korrelál a dopaminerg rendszer aktivitása nem csak a striátális, de a frontális kérgi célpontok esetében is. Ez alapján elmondható, hogy a DA felszabadulása reprezentálja az állatok viselkedését. Tehát mindkét agyterületen +RPE esetében nőtt a DA felszabadulás és az ALR is, -RPE esetében pedig csökkent a felszabadulás és az ALR is.

A kolinerg rendszer a DA-hoz hasonló próbánkenti frissülést mutatott a felszabadulás időtartamára nézve mind a mélyagyi és a frontális kérgi vizsgált agyterületeken is. Jutalmazott próbák után növekedett az ACh felszabadulás időtartama, míg jutalmazatlan próbák után csökkent.

Meglepő módon a noradrenerg rendszer az RPE-vel ellentétes felszabadulást mutatott a PFC-ben, és szignifikáns negatív korrelációt figyelhettünk meg az NE felszabadulás és az ALR között. Ez azt jelenti, hogy +RPE esetében az ALR a vártnak megfelelően nőtt, az NE felszabadulás azonban csökkent, -RPE estén pedig az ALR csökkent, az NE felszabadulás pedig nőtt. A BLA esetében követte az RPE változásait a fluoreszcens jel változása, jutalmazott próbák után növekedett a változás időtartama, kihagyott jutalmak után pedig csökkent, mellyel pozitívan korrelált ALR változása is.

A szerotonerg rendszer esetében a NE-hez hasonló frissülés volt megfigyelhető. A frontális kérgi területen tehát ellentétes frissülést láthattunk, míg a mélyagyi területen a felszabadulás követte a RPE frissülését. Továbbá a BLA-ban pozitív korreláció volt megfigyelhető a szerotonin felszabadulása és az ALR közt.

Kutatásunk Namboodiri és munkatársai cikkéből indult, melyben az orbitofrontális kéreg (orbitofrontal cortex: OFC) neuronjainak kapcsolatát vizsgálták az RPE-vel. Azt találták, hogy ezeknek a neuronoknak az átlagos jutalom válasza jelzi a relatív jelentőségét a jutalomnak. Ugyanis +RPE után az OFC neuronjainak aktivitása nőtt az AL-el együttesen, -RPE után pedig ezek a mért értékek csökkentek. Ez a kutatás és a miénk is erősíti így azt a hipotézist, hogy a PFC részt vesz a tanulási paraméterek kódolásában és szabályozásában [53].

A striátális DA és az RPE kapcsolatát már régóta ismerjük, hiszen korábbi kutatások is igazolták már, hogy a DA felszabadulás követi az RPE változásait [47]. Korábban bizonyították, hogy a PFC-nek az értékalapú döntéshozatalban széles körű szerepe van, részt vesz az elérhető jutalmak közti érték különbség összehasonlításában és magát a döntéshozatali folyamatot irányítja [54]. Eredményeink szintén ezt bizonyítják, tehát nem csak a VS-nek van szerepe az

RPE-k kódolásában, hanem a PFC-nek is. Eddig azonban az nem volt tisztázott, hogy az RPE frissülése milyen időskálán történik meg, kísérleteink alapján elmondhatjuk, hogy a DA mindkét vizsgált agyterületen próbánkénti frissülést mutat.

Az ACh esetében kutatócsoportunk korábban már igazolta, hogy követi az RPE változásait [55], eddig azonban szintén tisztázatlan volt, hogy ez a frissülés tanulási naponként vagy próbánként figyelhető meg. Eredményeink alátámasztják, hogy az ACh a DA-hoz hasonlóan próbánkénti frissülést mutat.

A NE szerepe a tanulásban és a figyelemben, ugyan bizonyított [56], de még nem vizsgálták a kapcsolatát a RPE-vel. A PFC-beli ellentétes frissülésének egyik lehetséges oka, hogy a DA-val ellentétes a felszabadulása [57]. Egy másik lehetséges oka az lehet, hogy egy fajta figyelem fenntartó jelként szolgál, amikor az állat számára megváltozik a stimulus értéke [58]. Ezt értelmezhetjük úgyis, hogy egy „reset gombként” működik, amely megszakítja a folyamatban lévő információfeldolgozást, és így gátolja a korábban felhalmozott tudás felhasználását az új lehetőségek feltárása érdekében [59, 60].

A PFC-ben lehetséges, hogy a kihagyott jutalmak utáni megnövekedett szerotonin felszabadulás az állat türelmének fenntartását szolgálja, hiszen tudja, hogy valamikor fog jutalmat kapni, csak azt nem, hogy pontosan mikor [61]. Továbbá lehetséges, hogy a BLA-ban az 5-HT a DA-val együttesen irányítja a tanulást az RPE pozitív kódolásával, míg a PFC-ben a jutalom hiánya okozta DA hiány miatt megnövekedett aktivitással kódolja a -RPE-t [62].

Eredményeink bizonyítják, hogy mind a négy neuromodulátornak fontos szerepe van a tanulásban. Jó kiindulási alapot biztosítanak további kutatások alapjául, például tanítási protokollunk alkalmas lehet neurodegeneratív betegségek vizsgálatára, hiszen lehetséges, hogy a demencia során az általunk vizsgált mechanizmusok is sérülnek. A neuromodulátorok együttes hatásának megértése hasznos lehet az AD és a PD pontosabb megértésében, illetve újabb gyógyszer célpontok keresésében [63]. Ez kiemelkedő fontosságú ugyanis a népesség elöregedésének növekedése világszerte növeli a krónikus degeneratív betegségek, a központi idegrendszeri károsodások és a demenciák előfordulását [64].

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az RPE a tényleges és a várt jutalom közötti különbség. Kimutatták, hogy a DA felszabadulása a VS-ben az RPE-t követi klasszikus kondicionálás során. Azonban a DA felszabadulása a PFC-ben sokkal kevésbé tanulmányozott. Már bizonyították, hogy a BFCN-k fontos szerepet játszanak asszociatív tanulás során a jövőbeli kimeneteket előrejelző ingerek feldolgozásában. Korábban már igazolták, hogy az NE felszabadulása követi a veszély előrejelzési hiba modelljét, a RPE-vel való kapcsolatát azonban még nem vizsgálták. Az 5-HT-t az előjel nélküli RPE-k kódolásával hozták a korábbiakban összefüggésbe. Célul tűztük ki a DA, ACh, NE és 5-HT szerepének vizsgálatát az asszociatív tanulásban, és felszabadulásuk összefüggésének vizsgálatát az RPE-vel.

Kísérleteink során egereket tanítottunk egy pavlovi kondicionáláson alapuló hangdetekciós feladatra 50%-os jutalmazási protokollal, amely során két hang jelentette a CS-t, az egyik hang 100%-ban kihagyást, azaz jutalmazatlan próbát, a másik 50%-ban kihagyást és 50%-ban jutalmat kódolt. Mindeközben a DA, ACh, NE és 5-HT felszabadulást szálóptikás fotometriával mértük. Szimultán mértük a DA felszabadulást a PFC-ből és VS-ből, illetve az ACh/NE/5-HT felszabadulást a PFC-ből és a BLA-ból. A viselkedésbeli változást az egerek stimulus alatti AL aktivitásán keresztül vizsgáltuk.

Ahogy az várható volt az AL-k száma csökkent a kihagyott jutalmak után, de növekedett a jutalmazott próbák után. A DA felszabadulás nem csak a VS-ben, hanem a PFC-ben is hasonló mintát követett. Ezenkívül szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a DA felszabadulása és az ALR különbsége között mind a VS, mind a PFC esetében. Az ACh a DA-hoz hasonlóan próbánkénti frissülést mutatott mindkét vizsgált agyterületen. Az NE felszabadulás a BLA-ban a DA-hoz hasonló változást követett, a PFC-ben azonban a jutalmazott próbák után csökkent, a kihagyott jutalmak után pedig nőtt. Továbbá a PFC-ben negatív, a BLA-ban leginkább pozitív korrelációt figyeltünk meg az NE felszabadulás és a ALR változása között. Az 5-HT felszabadulása az NE-hez hasonlóan a BLA-ban és a PFC-ben ellentétes frissülést mutatott.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az AL-ben bekövetkező változások önmagukban jelzik az RPE változásait asszociatív tanulás során, amellyel korrelál a dopaminerg rendszer aktivitása mind a striátális, mind a frontális kérgi célpontok esetében. A kolinerg rendszer is követi az RPE próbánkénti változásait. A noradrenerg és a szerotonerg rendszer a BLA-ban követte az RPE-t, míg a várttal ellentétben a PFC irányába az RPE-vel ellentétes aktivitást mutatott.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Dickinson A (1981) CONDITIONING AND ASSOCIATIVE LEARNING. *British Medical Bulletin* 37:165–168. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a071695>
2. Takehara-Nishiuchi K (2022) Neuronal ensemble dynamics in associative learning. *Curr Opin Neurobiol* 73:102530. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102530>
3. Fanselow MS, Poulos AM (2005) The Neuroscience of Mammalian Associative Learning. *Annual Review of Psychology* 56:207–234. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.56.091103.070213>
4. D'Amelio M, Rossini PM (2012) Brain excitability and connectivity of neuronal assemblies in Alzheimer's disease: From animal models to human findings. *Progress in Neurobiology* 99:42–60. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.07.001>
5. Dunn AR, Kaczorowski CC (2019) Regulation of intrinsic excitability: Roles for learning and memory, aging and Alzheimer's disease, and genetic diversity. *Neurobiology of Learning and Memory* 164:107069. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.107069>
6. Haberman RP, Koh MT, Gallagher M (2017) Heightened cortical excitability in aged rodents with memory impairment. *Neurobiology of Aging* 54:144–151. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.12.021>
7. Vermunt L, Sikkes SAM, van den Hout A, Handels R, Bos I, van der Flier WM, Kern S, Ousset P-J, Maruff P, Skoog I, Verhey FRJ, Freund-Levi Y, Tsolaki M, Wallin ÅK, Olde Rikkert M, Soininen H, Spuru L, Zetterberg H, Blennow K, Scheltens P, Muniz-Terrera G, Visser PJ, Vellas B, Reynish E, Ousset PJ, Andrieu S, Burns A, Pasquier F, Frisoni G, Salmon E et al. (2019) Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimer's & Dementia* 15:888–898. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.04.001>
8. Kerbler GM, Fripp J, Rowe CC, Villemagne VL, Salvado O, Rose S, Coulson EJ, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2015) Basal forebrain atrophy correlates with amyloid β burden in Alzheimer's disease. *Neuroimage Clin* 7:105–113. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2014.11.015>
9. Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:101–112. <https://doi.org/10.1038/nrm2101>
10. Chen Z-R, Huang J-B, Yang S-L, Hong F-F (2022) Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer's Disease. *Molecules* 27:. <https://doi.org/10.3390/molecules27061816>
11. Kang S, Jeon S, Lee Y-G, Ye BS (2023) Striatal dopamine transporter uptake, parkinsonism and cognition in Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 30:3105–3113. <https://doi.org/10.1111/ene.15995>
12. Geldenhuys WJ, Van der Schyf CJ (2011) Role of Serotonin in Alzheimer's Disease. *CNS Drugs* 25:765–781. <https://doi.org/10.2165/11590190-000000000-00000>
13. Ponnusamy R, McNERNEY MW, Moghadam S, Salehi A (2019) Assessing disease-modifying effects of norepinephrine in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Brain Res* 1702:3–11. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.09.035>
14. Chandler JM, Nair R, Biglan K, Ferries EA, Munsie LM, Changamire T, Patel N (2021) Characteristics of Parkinson's Disease in Patients with and without Cognitive Impairment. *Journal of Parkinson's Disease* 11:1381–1392. <https://doi.org/10.3233/JPD-202190>
15. Stefanis L (2012) α -Synuclein in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a009399. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>
16. Samii A, Nutt JG, Ransom BR (2004) Parkinson's disease. *The Lancet* 363:1783–1793. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16305-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16305-8)

17. Arkadir D, Bergman H, Fahn S (2014) Redundant dopaminergic activity may enable compensatory axonal sprouting in Parkinson disease. *Neurology* 82:1093–1098. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000243>
18. Perry EK, Curtis M, Dick DJ, Candy JM, Atack JR, Bloxham CA, Blessed G, Fairbairn A, Tomlinson BE, Perry RH (1985) Cholinergic correlates of cognitive impairment in Parkinson's disease: comparisons with Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 48:413–421
19. Benarroch EE (2018) Locus coeruleus. *Cell Tissue Res* 373:221–232. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2649-1>
20. Politis M, Wu K, Loane C, Kiferle L, Molloy S, Brooks DJ, Piccini P (2010) Staging of serotonergic dysfunction in Parkinson's Disease: An *in vivo* 11C-DASB PET study. *Neurobiology of Disease* 40:216–221. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.028>
21. Grothe M, Heinsen H, Teipel SJ (2012) Atrophy of the cholinergic Basal forebrain over the adult age range and in early stages of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 71:805–813. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.06.019>
22. Nieoullon A (2002) Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Progress in Neurobiology* 67:53–83. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00011-4](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00011-4)
23. Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, Ungless MA (2008) Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* 152:1024–1031. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.01.046>
24. Puig MV, Rose J, Schmidt R, Freund N (2014) Dopamine modulation of learning and memory in the prefrontal cortex: insights from studies in primates, rodents, and birds. *Front Neural Circuits* 8:93. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00093>
25. Banks PJ, Burroughs AC, Barker GRI, Brown JT, Warburton EC, Bashir ZI (2015) Disruption of hippocampal–prefrontal cortex activity by dopamine D2R-dependent LTD of NMDAR transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:11096–11101. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512064112>
26. Salamone JD, Correa M (2002) Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behavioural Brain Research* 137:3–25. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00282-6](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00282-6)
27. Winters BD, Bussey TJ (2005) Removal of cholinergic input to perirhinal cortex disrupts object recognition but not spatial working memory in the rat. *Eur J Neurosci* 21:2263–2270. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04055.x>
28. Schliebs R, Arendt T (2011) The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* 221:555–563. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.058>
29. Ballinger EC, Ananth M, Talmage DA, Role LW (2016) Basal Forebrain Cholinergic Circuits and Signaling in Cognition and Cognitive Decline. *Neuron* 91:1199–1218. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.006>
30. Hangya B, Ranade SP, Lorenc M, Kepecs A (2015) Central Cholinergic Neurons Are Rapidly Recruited by Reinforcement Feedback. *Cell* 162:1155–1168. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.057>
31. Howland JG, Ito R, Lapish CC, Villaruel FR (2022) The rodent medial prefrontal cortex and associated circuits in orchestrating adaptive behavior under variable demands. *Neurosci Biobehav Rev* 135:104569. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104569>
32. Ährlund-Richter S, Xuan Y, van Lunteren JA, Kim H, Ortiz C, Pollak Dorocic I, Meletis K, Carlén M (2019) A whole-brain atlas of monosynaptic input targeting four different cell types in the medial prefrontal cortex of the mouse. *Nat Neurosci* 22:657–668. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0354-y>

33. Bittar TP, Labonté B (2021) Functional Contribution of the Medial Prefrontal Circuitry in Major Depressive Disorder and Stress-Induced Depressive-Like Behaviors. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 15:. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.699592>
34. Berridge CW, Waterhouse BD (2003) The locus coeruleus–noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Research Reviews* 42:33–84. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(03\)00143-7](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(03)00143-7)
35. Gibbs ME, Hutchinson DS, Summers RJ (2010) Noradrenaline release in the locus coeruleus modulates memory formation and consolidation; roles for α - and β -adrenergic receptors. *Neuroscience* 170:1209–1222. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.07.052>
36. Robertson SD, Plummer NW, Jensen P (2016) Uncovering diversity in the development of central noradrenergic neurons and their efferents. *Brain Research* 1641:234–244. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.11.023>
37. Stuber GD, Sparta DR, Stamatakis AM, van Leeuwen WA, Hardjoprajitno JE, Cho S, Tye KM, Kempadoo KA, Zhang F, Deisseroth K, Bonci A (2011) Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking. *Nature* 475:377–380. <https://doi.org/10.1038/nature10194>
38. Uematsu A, Tan BZ, Ycu EA, Cuevas JS, Koivumaa J, Junyent F, Kremer EJ, Witten IB, Deisseroth K, Johansen JP (2017) Modular organization of the brainstem noradrenaline system coordinates opposing learning states. *Nat Neurosci* 20:1602–1611. <https://doi.org/10.1038/nn.4642>
39. Terry AV, Buccafusco JJ, Wilson C (2008) Cognitive dysfunction in neuropsychiatric disorders: selected serotonin receptor subtypes as therapeutic targets. *Behav Brain Res* 195:30–38. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.12.006>
40. Ligneul R, Mainen ZF (2023) Serotonin. *Curr Biol* 33:R1216–R1221. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.09.068>
41. Walker EP, Tadi P (2024) Neuroanatomy, Nucleus Raphe. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)
42. Liy-Salmeron G, Meneses A (2008) Effects of 5-HT drugs in prefrontal cortex during memory formation and the ketamine amnesia-model. *Hippocampus* 18:965–974. <https://doi.org/10.1002/hipo.20459>
43. Scholes KE, Harrison BJ, O'Neill BV, Leung S, Croft RJ, Pipingas A, Phan KL, Nathan PJ (2007) Acute serotonin and dopamine depletion improves attentional control: findings from the stroop task. *Neuropsychopharmacology* 32:1600–1610. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301262>
44. Winstanley CA, Theobald DEH, Dalley JW, Glennon JC, Robbins TW (2004) 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor antagonists have opposing effects on a measure of impulsivity: interactions with global 5-HT depletion. *Psychopharmacology (Berl)* 176:376–385. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1884-9>
45. Asan E, Steinke M, Lesch K-P (2013) Serotonergic innervation of the amygdala: targets, receptors, and implications for stress and anxiety. *Histochem Cell Biol* 139:785–813. <https://doi.org/10.1007/s00418-013-1081-1>
46. Pereyra AE, Mininni CJ, Zanutto BS (2021) Serotonergic modulation of basolateral amygdala nucleus in the extinction of reward-driven learning: The role of 5-HT bioavailability and 5-HT_{1A} receptor. *Behavioural Brain Research* 404:113161. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113161>
47. Schultz W (2016) Dopamine reward prediction error coding. *Dialogues Clin Neurosci* 18:23–32
48. Hegedüs P, Sviatkó K, Király B, Martínez-Bellver S, Hangya B (2023) Cholinergic activity reflects reward expectations and predicts behavioral responses. *iScience* 26:105814. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105814>

49. Basu A, Yang J-H, Yu A, Glaeser-Khan S, Feng J, Krystal JH, Li Y, Kaye AP (2022) Prefrontal norepinephrine represents a threat prediction error under uncertainty. 2022.10.13.511463
50. Matias S, Lottem E, Dugué GP, Mainen ZF Activity patterns of serotonin neurons underlying cognitive flexibility. *eLife* 6:e20552. <https://doi.org/10.7554/eLife.20552>
51. Leopold AV, Shcherbakova DM, Verkhusha VV (2019) Fluorescent Biosensors for Neurotransmission and Neuromodulation: Engineering and Applications. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13:
52. Hegedüs P, Velencei A, Belval C-H de, Heckenast J, Hangya B (2021) Training protocol for probabilistic Pavlovian conditioning in mice using an open-source head-fixed setup. *STAR Protocols* 2:100795. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100795>
53. K Namboodiri VM, Hobbs T, Trujillo-Pisanty I, Simon RC, Gray MM, Stuber GD (2021) Relative salience signaling within a thalamo-orbitofrontal circuit governs learning rate. *Curr Biol* 31:5176-5191.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.09.037>
54. Murray EA, Rudebeck PH (2018) Specializations for reward-guided decision-making in the primate ventral prefrontal cortex. *Nat Rev Neurosci* 19:404–417. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0013-4>
55. Cholinergic activity reflects reward expectations and predicts behavioral responses: *iScience*. [https://www.cell.com/iscience/fulltext/S2589-0042\(22\)02087-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2589004222020879%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/iscience/fulltext/S2589-0042(22)02087-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2589004222020879%3Fshowall%3Dtrue). Accessed 1 Apr 2024
56. Doya K (2002) Metalearning and neuromodulation. *Neural Netw* 15:495–506. [https://doi.org/10.1016/s0893-6080\(02\)00044-8](https://doi.org/10.1016/s0893-6080(02)00044-8)
57. Pascucci T, Ventura R, Latagliata EC, Cabib S, Puglisi-Allegra S (2007) The Medial Prefrontal Cortex Determines the Accumbens Dopamine Response to Stress through the Opposing Influences of Norepinephrine and Dopamine. *Cerebral Cortex* 17:2796–2804. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm008>
58. Dayan P, Yu AJ (2006) Phasic norepinephrine: a neural interrupt signal for unexpected events. *Network* 17:335–350. <https://doi.org/10.1080/09548980601004024>
59. Yu AJ, Dayan P (2005) Uncertainty, neuromodulation, and attention. *Neuron* 46:681–692. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.026>
60. Cremer A, Kalbe F, Müller JC, Wiedemann K, Schwabe L (2023) Disentangling the roles of dopamine and noradrenaline in the exploration-exploitation tradeoff during human decision-making. *Neuropsychopharmacology* 48:1078–1086. <https://doi.org/10.1038/s41386-022-01517-9>
61. Miyazaki K, Miyazaki KW, Sivori G, Yamanaka A, Tanaka KF, Doya K (2020) Serotonergic projections to the orbitofrontal and medial prefrontal cortices differentially modulate waiting for future rewards. *Sci Adv* 6:eabc7246. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc7246>
62. Fischer AG, Ullsperger M (2017) An Update on the Role of Serotonin and its Interplay with Dopamine for Reward. *Front Hum Neurosci* 11:484. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2017.00484>
63. Holland N, Robbins TW, Rowe JB (2021) The role of noradrenaline in cognition and cognitive disorders. *Brain* 144:2243. <https://doi.org/10.1093/brain/awab111>
64. Ishola IO, Jacinta AA, Adeyemi OO (2019) Cortico-hippocampal memory enhancing activity of hesperetin on scopolamine-induced amnesia in mice: role of antioxidant defense system, cholinergic neurotransmission and expression of BDNF. *Metab Brain Dis* 34:979–989. <https://doi.org/10.1007/s11011-019-00409-0>

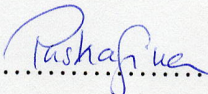
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Hangya Balázsnak, hogy lehetővé tette diplomamunkám elvégzését és szakmai javaslataival segítette dolgozatom elkészítését. Köszönöm társtémavezetőmnek Dr. Szabó Írisznek, hogy megtanított a kísérletekhez szükséges módszerek elvégzésére, felügyelte a szakdolgozati munkám és tanácsaival segítette az előrehaladásom. Köszönöm belső konzulensemnek Dr. Puska Ginának, hogy javaslataival segítette dolgozatom elkészítését. Köszönettel tartozom továbbá Lengyel Katalinnak az immunhisztokémiai módszerek elsajátításában, illetve elvégzésében való segítségért.

Belső konzulensi ellenjegyzés

Alulírott **Dr. Puska Gina**, mint belső konzulens nyilatkozom, hogy **Kispál Réka Katalin**, III. évfolyamos hallgató „**Neuromodulátor felszabadulás mérése egerekben asszociatív feladatok végzése során**” című dolgozatát átolvastam és jóváhagytam, beadásra és védésre alkalmasnak tartom. Továbbá nyilatkozom, hogy a feltöltött szakdolgozat plágiumellenőrzésen sikeresen átesett és az esetlegesen feltárt egyezőség az Egyetemi iránymutatásoknak/szabályoknak megfelel.

Budapest, 2024. év.....⁰⁴.....hó ²³.....nap.

.....


belső konzulens