

37. OTDK Biológia szekció

A neuromodulátorok szerepének vizsgálata egerekben
asszociatív tanuláson alapuló sztochasztikus jutalmazás során

Kispál Réka Katalin

Állatorvostudományi Egyetem, Biológia BSc, III. évfolyam

Témavezetők: Dr. Hangya Balázs, tudományos főmunkatárs

Dr. Szabó Írisz, tudományos munkatárs

Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet,

Rendszer-Neurobiológia Kutatócsoport

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
1. BEVEZETÉS.....	4
1.1. A tanulás fontossága és a neurodegeneratív betegségekben betöltött szerepe	4
1.2. A dopamin szerepe a tanulásban	4
1.3. Az acetilkolin szerepe a tanulásban	5
1.4. A noradrenalin szerepe a tanulásban	6
1.5. A pavlovi kondicionálás	7
1.6. A jutalom előrejelzési hiba és a neuromodulátorok kapcsolata	7
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	10
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	11
3.1. Állatok	11
3.2. Műtéti eljárás	11
3.3. Pavlovi kondicionáláson alapuló tanítás	12
3.4. Száloptikás fotometria.....	13
3.5. Statisztikai elemzés	14
3.6. Hisztológia	15
4. EREDMÉNYEK	16
4.1. Az állatok viselkedési eredménye pavlovi kondicionálás során	16
4.2. A dopamin felszabadulás mérésének fotometriai eredménye a pavlovi kondicionálás során	17
4.3. Az acetilkolin felszabadulás mérésének fotometriai eredménye a pavlovi kondicionálás során	19
4.4. A noradrenalin felszabadulás mérésének fotometriai eredménye a pavlovi kondicionálás során	21
5. KÖVETKEZTETÉSEK.....	24
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	26
7. SUMMARY	27
IRODALOMJEGYZÉK.....	28
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	30

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AAV	adeno-asszociált vírus
ACh	acetylcholine = acetilkolin
AD	Alzheimer's disease = Alzheimer-kór
a-GFP	anti-green fluorescent protein = anti-zöld fluoreszcens fehérje
AL	anticipatory licking = várakozó nyalás
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 és a neurodegeneratív betegségekben betöltött szerepe

Az élethez nélkülözhetetlen, hogy prediktáljuk és szabályozzuk bizonyos környezetünkben történő eseményeket. Ezt a képességet az asszociatív tanulás teszi lehetővé, az események közti kapcsolatok észlelése és megértése által [1]. 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 [2]. Az öregedés és neurodegeneratív betegségek esetében a neuronok egyes szubpopulációinak csökkenhet az aktiválhatósága, míg mások hiperaktivációt mutatnak [3]. Az ilyen fajta hiperaktivációt korábban már összefüggésbe hozták a kognitív hanyatlással [4].

A leggyakoribb kognitív hanyatlással járó neurodegeneratív betegség az Alzheimer-kór (Alzheimer's disease: AD). Az AD-betegek a demencia tüneteiről szoktak beszámolni, amely az emlékezéshez, a gondolkodáshoz vagy a döntések meghozatalához szükséges képesség hanyatlását jelenti [5].

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 [6].

1.2. A dopamin szerepe a tanulásban

A kognitív folyamatokban, a jutalommal kapcsolatos tanulási folyamatokban és a motoros rendszerben betöltött kiemelkedően fontos szerepe miatt a dopamin (DA) a legszélesebb körben vizsgált neuromodulátorok közé tartozik [7].

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 [8]. A helyi DA felszabadulás fontos szerepet tölt be a PFC különböző funkcióiban, beleértve a végrehajtó funkcióit, és a figyelemmel és tanulással kapcsolatos szerepét. Ezt alátámasztja a PFC patológiája és a kábítószeres hatása a szinapszisok plaszticitására. Például a PFC-ben található D2 receptor túlaktiválása hosszútávú aktivitás gátlást indukál, amely a hippokampusz-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 [9].

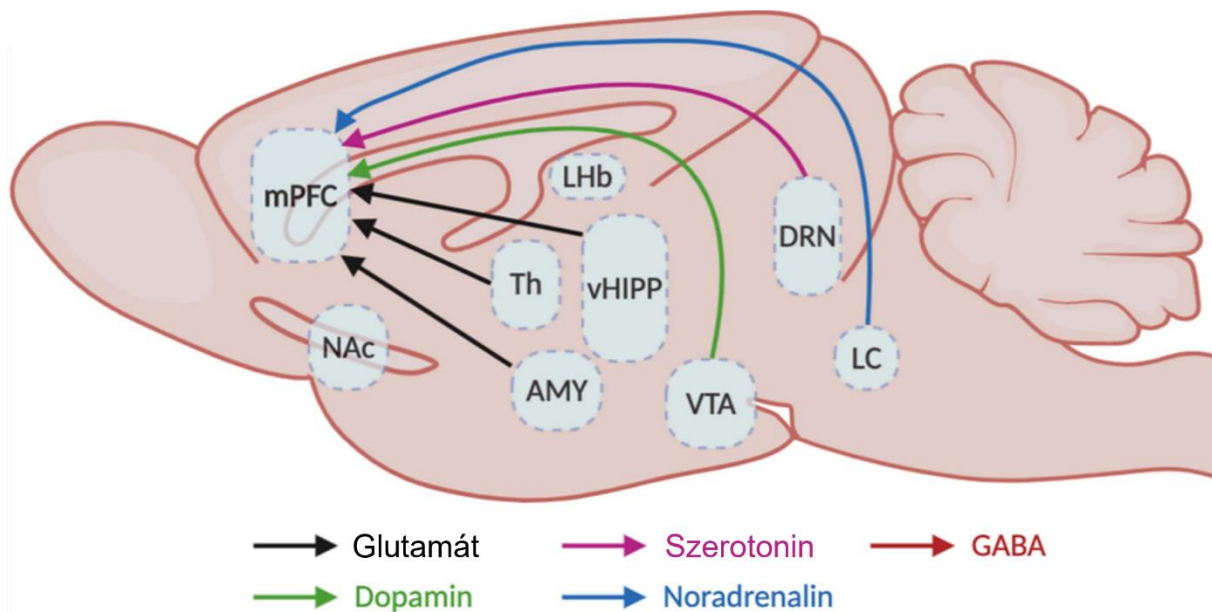
A ventrális tegmentális területéről (ventral tegmental area: VTA) érkező fő dopaminerg projekció a ventrális striátumot (VS) idegzi be, amelyről régóta ismert, hogy erősen érintett a különféle viselkedési és kognitív funkciókban, mint például a jutalomhoz köthető és az averzív tanulás, a motiváció, a függőség, a deklaratív tanulás és a memória kialakulása [10].

1.3. Az acetilkolin szerepe a tanulásban

Az acetilkolinnak (acetylcholine: ACh) fontos szerepe van a tanulásban és a memória kialakulásában. Különösen az új információk megszerzésében szükséges, ugyanis korábbi vizsgálatok során bizonyították, hogy a muskarinos ACh receptorok farmakológiai gátlása megakadályozza az új emlékek létrehozását [11].

A bazolaterális amigdala (BLA) elsősorban a félelmen alapuló tanulásban vesz részt. Az ide érkező ACh projekcióknak fontos szerepe van az érzelmi emlékek rögzítésében [12]. 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 [13].

A rágsálók 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 Broca-féle diagonális köteg horizontális ágából (horizontal diagonal band of Broca: HDB) ACh bemenet is érkezik ide (1. ábra) [14]. Az ACh felszabadulása az mPFC-ben központi szerepet játszik a normál kognitív teljesítményben, különösen a figyelemben [15].



1. ábra: A mediális prefrontális kéregbe érkező projekciók

A mediális prefrontális kéreg afferens vetületeinek sematikus ábrázolása a megfelelő neuromodulátor rendszerekkel [16].

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: thalamus; vHIPP: ventrális hippokampusz; VTA: ventral tegmental area = ventrális tegmentális terület

1.4. A noradrenalin szerepe a tanulásban

A locus coeruleus (LC) noradrenerg rendszer 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 modulációt és a stressz által kiváltott negatív érzelmi állapotokat [17]. A noradrenalinnak (norepinephrine: NE) emellett kulcsfontosságú moduláló szerepe van a stressz és a félelem, valamint a térbeli munkamemória kialakulásában [18].

Az LC egyik sajátos efferens vetülete a BLA felé mutat, az ide érkező NE az érzelmi viselkedésben betöltött szerepéről ismert [19]. 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 [20].

A PFC az NE másik fontos célpontja, itt a legnagyobb az NE terminálisok sűrűsége a kéregben. Az NE befolyásolja a stresszorok feldolgozását és a rájuk vonatkozó választ, a félelemmel kapcsolatos viselkedések szabályozását. A PFC-beli NE szükséges a félelemérzet csökkentéséhez, az érzelmi félelemreakciók felülírásával, és így elősegíti az adaptív viselkedést [21].

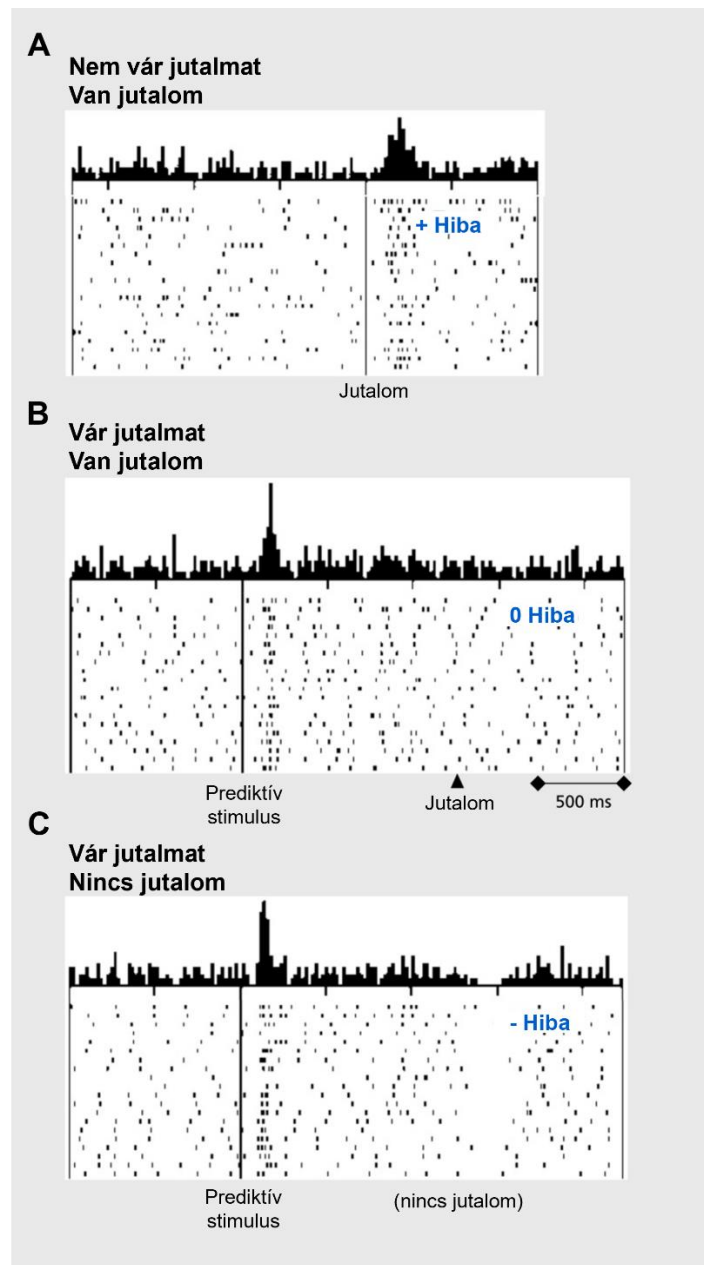
1.5. A pavlovi kondicionálás

A pavlovi kondicionálás egy olyan 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 [22]. 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].

1.6. A jutalom előrejelzési hiba és a neuromodulátorok kapcsolata

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 az 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; nem történik tanulás [23].

Az emberek, majmok és rágcsálók középgagyában a legtöbb DA neuron követi az 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 (2. ábra). 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 [23].



2. ábra: A dopamin neuronok tüzelése asszociatív tanulás során

A dopaminerg neuronokat a nem várt jutalom aktiválja, ami pozitív +RPE (A), nem mutatnak választ a várt jutalomra, ilyenkor nincs RPE (B), és csökkenti az aktivitásukat amikor -RPE van, vagyis várta a jutalmat, de nem kapott (C) [23].

A bazális előagyi 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, a büntetésre egységes választ adnak. A BFCN-k eltérően mérlegelik a pozitív és negatív megerősítésre vonatkozó előrejelzéseket, ez feltehetően egy egyszerű megerősítő tanulási modellel magyarázható, az előrejelzési hibával [24].

Korábban már igazolták, hogy az 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 [25].

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink célja a DA, ACh és NE szerepének vizsgálata volt az asszociatív tanulásban egerekben.

A striátális DA-ról a bevezetésben bemutatott kutatások alapján már tudtuk, hogy követi az RPE változásait, mi kíváncsiak voltunk arra is, hogy a frontális kérgi DA is ezt követi-e.

Továbbá az ACh és NE kapcsolatát is megvizsgáltuk az RPE-vel, hiszen ahogy a korábbiakban bemutattam mindkét neuromodulátor fontos a tanulási folyamatokban.

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 várákózó viselkedés között, illetve annak megváltozása között?

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Állatok

Kísérleteinkben C₅₇BL/6J típusú 4 hónapos egereket használtunk, hímeket és nőstényeket egyaránt. Neuromodulátoronként legalább 5 egeret vizsgáltunk, a nemük változó volt (1. táblázat). Átlag súlyuk a kézhez szoktatás előtt $26,4 \pm 3,5$ g volt. 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	Acetilolin szenzor	Noradrenalin szenzor
Hím egér	5 db	2 db	4 db
Nőstény egér	1 db	3 db	1 db

3.2. Műtéti eljárás

A száloptikás fotometriai kísérleteket műtét előzte meg, melyhez ketamin-xilazin (83 mg/kg ketamin és 17 mg/kg xilazin feloldva 0,9% fiziológiás 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, majd 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 -1,10 mm; a kéregtől számítva DV -3,95 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 és az NE vizsgálatához a BLA-ba (β -tól számítva AP -1,20 mm; ML -2,90 mm; a kéregtől számítva DV -3,50 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 bioszenzort expresszálo adeno-asszociált vírust (AAV9-hSyn-Ach-3.0, AAV9-hSyn-GRAB-NE1m) injektáltunk. Mindhárom szenzor esetében területenként 300-300 nl vírust injektáltunk. Ezt követően optikai szálakat (400 μ m) 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.

3.3. Pavlovi kondicionáláson alapuló tanítás

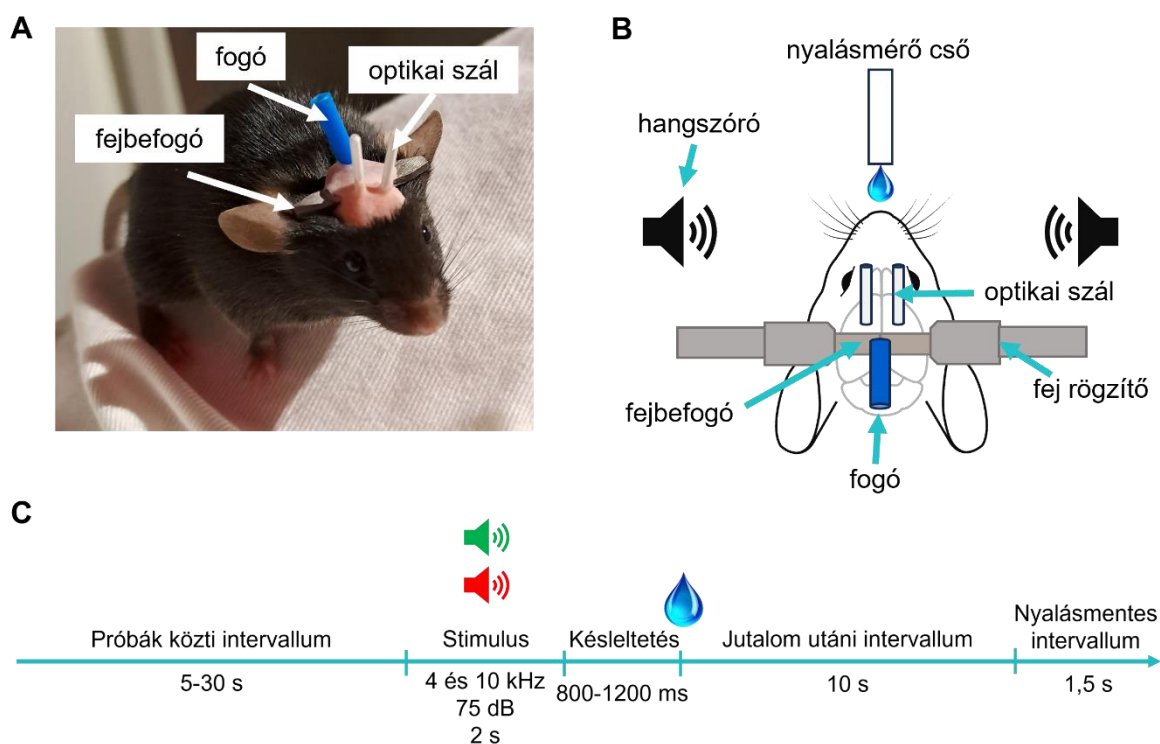
A tanítás egy pavlovi kondicionáláson alapuló hangdetekciós feladatban történt, melyhez az egereket a fejükön lévő titánium tartó segítségével a kísérleti berendezéshez rögzítettük (3. ábra A és B). A kísérleteinkhez az egerek víz korlátozottak voltak, amely azt jelenti, hogy nem *ad libitum* állt rendelkezésükre 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 érzékelte.

A viselkedés kísérletek méréseihez a Bpod Viselkedés Kontroll Rendszert (Sanworks LLC., Amerikai Egyesült Államok) használtuk, amely tranzisztor-tranzisztor logika (TTL) szignálok generálásának felhasználásával a méréseket szinkronizálta 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 vízcsepp volt. Egy tréning több 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. Ez után 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.



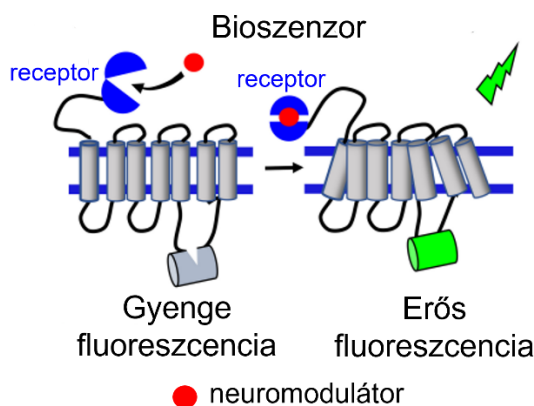
3. ábra: A kísérleti elrendezés és a protokoll

(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

3.4. 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 adeno-asszociált-vírusokat. Az általunk használt bioszenzorok mind olyan módosított G-fehérje kapcsolt receptorok, amelyekhez DA szenzor esetén a DA, az ACh

szenzor esetén az ACh és az NE szenzor esetén az NE 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. 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. Ezeket az összegyűjtött jeleket spektrálisan elválasztja a rendszer, átengedi egy szűrőn, és egy fotodetektorra fókuszálja. Az összegyűjtött jel a fluoreszcencia változását jelenti a kezdeti alapvonalhoz képest [26].



4. ábra A bioszenzorok működési elve

A neuromodulátor bekötése után a receptor konformációja megváltozik, ami a fluoreszcencia fokozódását eredményezi [26]

3.5. Statisztikai elemzés

A viselkedés kísérletek és a száloptikás mérések elemzését egyaránt egyedi Matlab függvényekkel végeztük. Wilcoxon-féle előjeles rangpróbával teszteltük a jutalom jelenlétének vagy hiányának hatását a várakozó nyalások számára és a fotometriai mérésekre nézve. 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 is jelöltük.

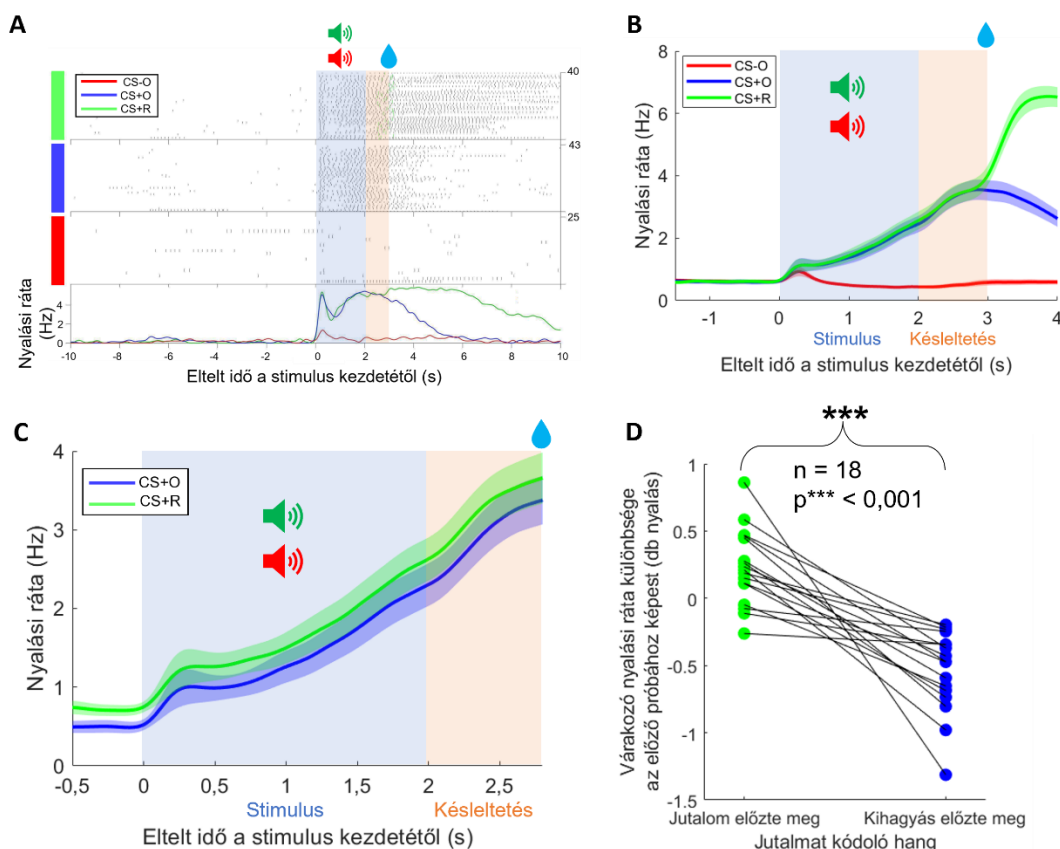
3.6. Hisztológia

A viselkedés 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 fiziológias sóoldattal a vér eltávolításához, majd 4%-os paraformaldehiddel (PFA) is a szövetek tartósításához [27]. Ezután az agy kivételre került, majd 4%-os PFA-ban posztfixáltuk. 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. Végül a primer antitest metszetekre történő ráhelyezése történt 48 órára, jelen esetben ez anti-zöld fluoreszcens fehérje (anti-green fluorescent protein: a-GFP) (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.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az állatok viselkedési eredménye pavlovi kondicionálás során

Kísérleteink során az állatok viselkedését a stimulus által kiváltott AL változásának függvényében vizsgáltuk. Az 5. 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 (5. 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 (5. ábra C). Kísérleteink során tehát elmondható, hogy az egerek viselkedésének megváltozása követte az RPE változását. A 5. D ábrán is jól látható, hogy várakozó nyalási ráta frissülése az RPE-nek megfelelően alakult ($-0,54 \pm 0,31$ vs. $0,24 \pm 0,29$; delta positive condition stimuli omission (dCSPO) max vs. delta positive condition stimuli reward (dCSPR) max).



5. ábra Viselkedés kísérletek eredménye

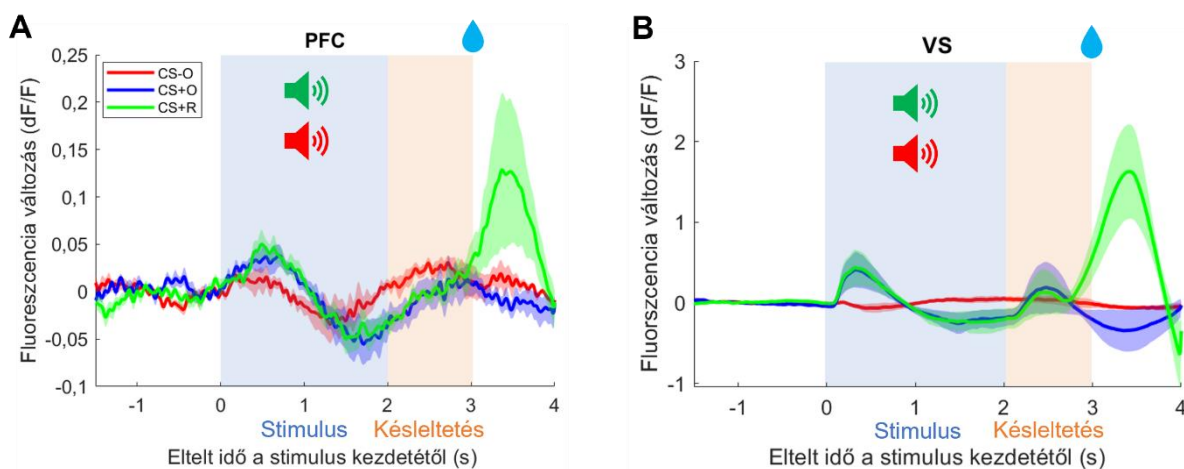
(A) Reprezentatív ábra egy egér egy napi teljesítményéről. Az ábra felső részén az állat egyedülálló nyalásai látszanak a két hang esetében. Az alsó részen pedig az átlagolt nyalásai láthatók. (B) Az állatok várakozó nyalásainak átlagolt görbéje. (C) Az állatok várakozó nyalásainak átlagolt görbéje jutalmazott próba alatt. A szín

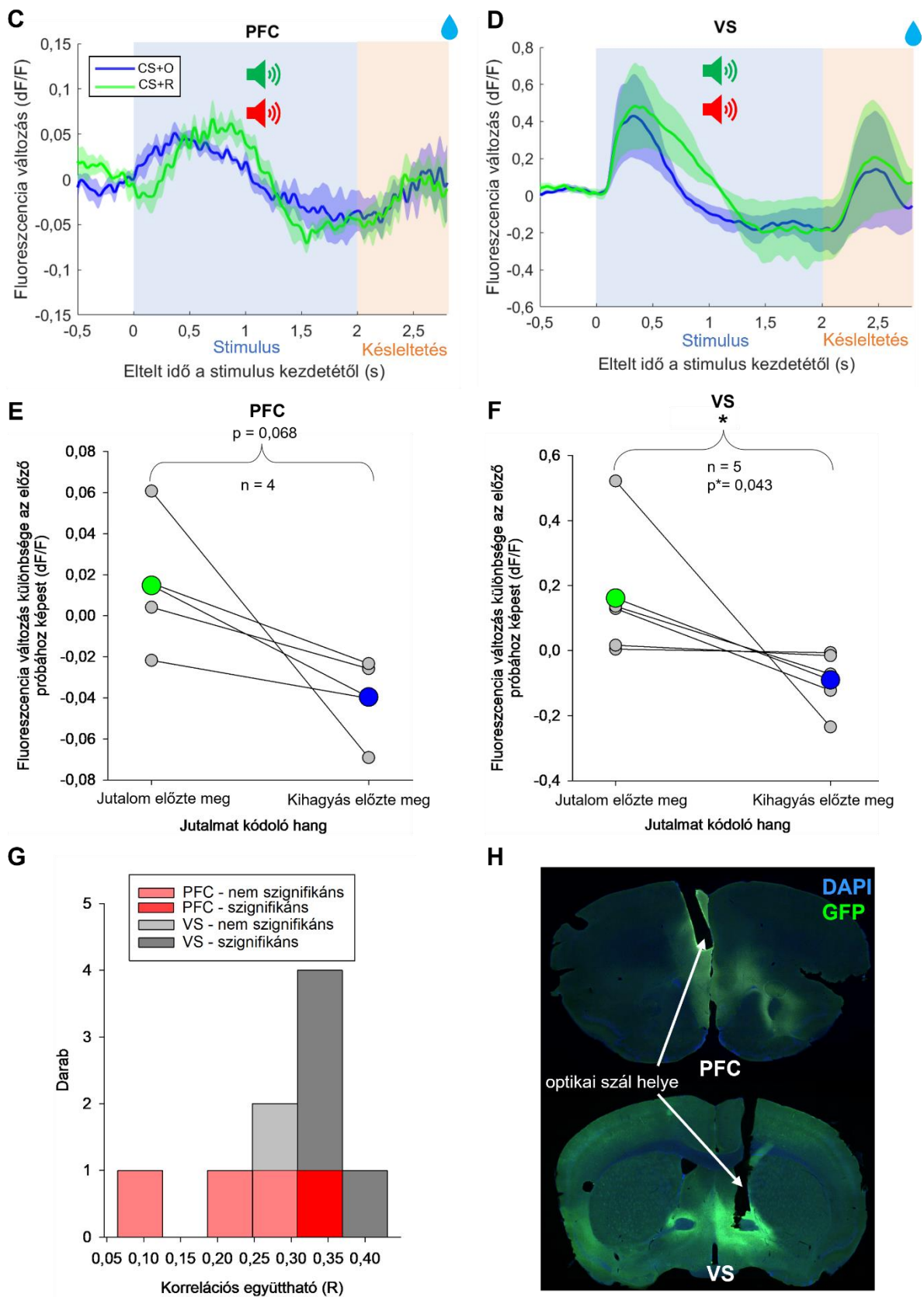
kódolás itt a próbát megelőző próba típusát jelöli. **(D)** A várakozó nyalási ráta különbsége a megelőző próba nyalási rátájához képest (Wilcoxon-féle előjeles rangpróba $p^{**}<0,001$).

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

4.2. 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 (6. 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 (6. ábra C és D). A jutalmazatlan próbák után, a következő jutalmat kódoló próba alatt csökkent a fluoreszcencia változás mértéke a stimulus alatt (6. ábra C és D). A dopamin válasz megerősítésen alapuló frissülése mindkét agyterület esetében megfigyelhető volt, de a VS-ben volt csak szignifikáns (6. ábra E és F) (PFC: $-0,04 \pm 0,02$ vs. $0,02 \pm 0,04$; dCSPO max vs. dCSPR, VS: $-0,09 \pm 0,09$ vs. $0,16 \pm 0,21$; dCSPO max vs. dCSPR). A 100%-ban kihagyást kódoló hang esetén nem történt szignifikáns változás a fluoreszcencia jelben a kezdeti alapvonalhoz képest egyik agyterületen sem (6. ábra A és B). Továbbá, a PFC-ben és a VS-ben egyaránt pozitívan korrelált a fluoreszcencia változás és az AL ráta változása (6. ábra G). Az 6. H ábrán a két vizsgált agyterület fluoreszcencia képe látható. Megfigyelhető rajtuk az optikai szálak helye, illetve zölddel az expresszáldott DA szenzor.





6. ábra: A dopamin fotometriai méréseinek eredménye

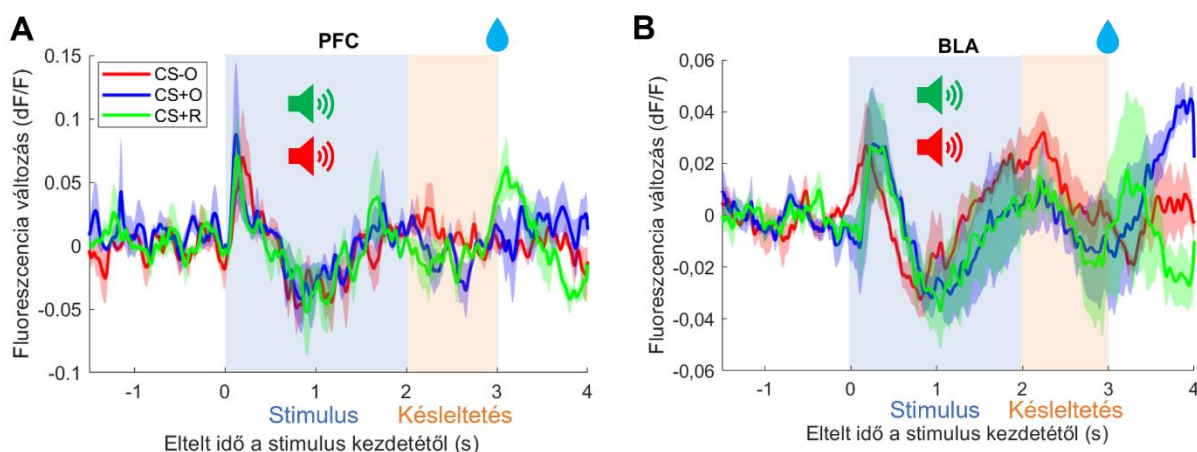
(A) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a prefrontális kéregben (prefrontal cortex: PFC). (B) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a ventrális striátumban (VS). (C) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a PFC-ben

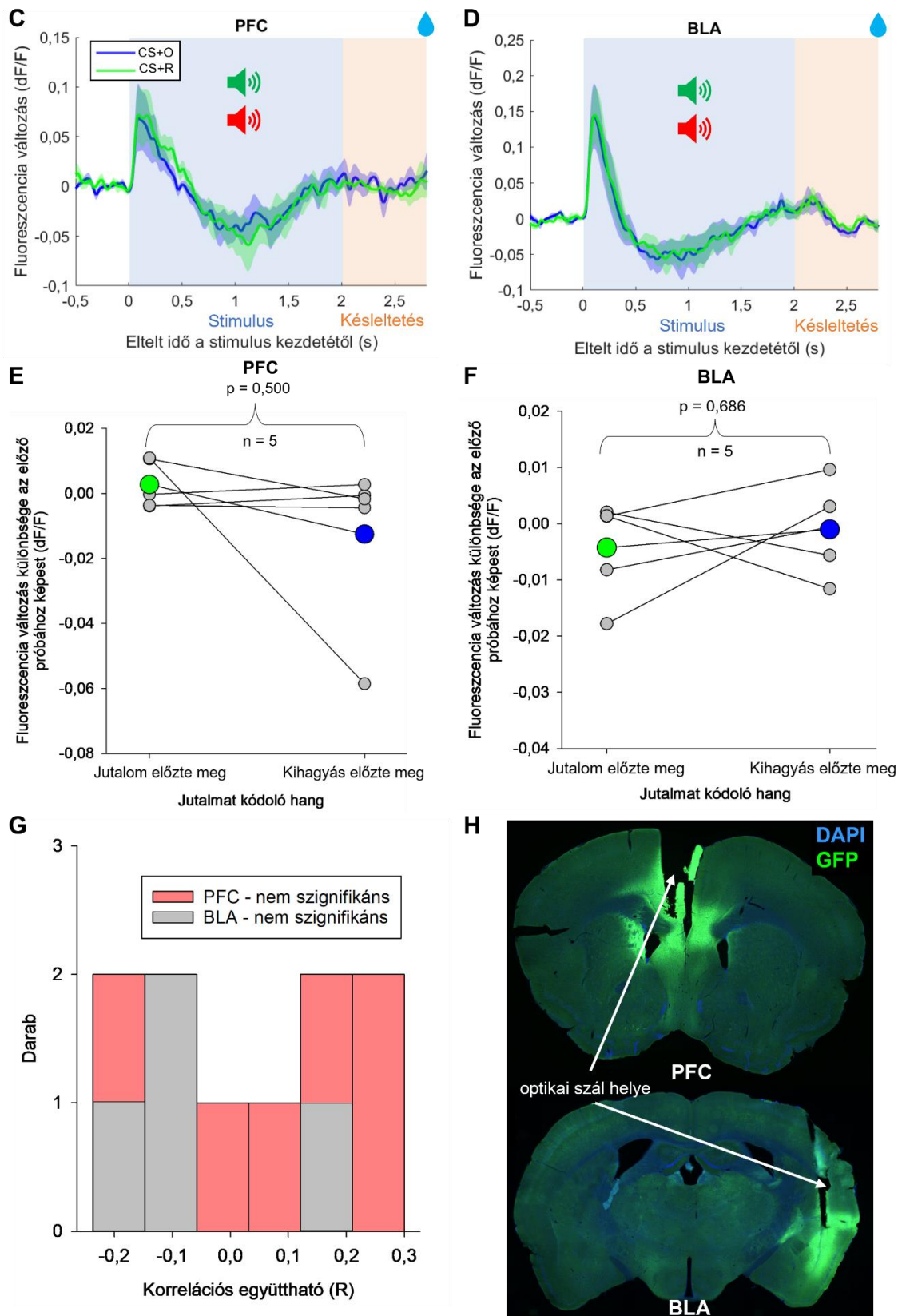
jutalmazott próba alatt. A szín kódolás itt a próbát megelőző próba típusát jelöli. **(D)** A fotometriai mérések átlagolt görbéje a VS-ben jutalmazott próba alatt. A szín kódolás itt a próbát megelőző próba típusát jelöli. **(E)** A dopamin fluoreszcencia változás különbsége a PFC-ben az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest, színessel jelölve az átlagok. **(F)** A dopamin fluoreszcencia változás különbsége a VS-ben az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest, színessel jelölve az átlagok. **(G)** A fluoreszcencia változás és a nyalási ráta korrelációs együtthatóinak eloszlása agyterületenként. **(H)** A vírus injektálás, illetve az optikai szál helye a PFC-ben és a VS-ben. (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

4.3. 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 (7. ábra A és B). A próbát megelőző próba típusa egyik agyterületen sem befolyásolta a rákövetkező próba stimulus alatt mért fluoreszcencia változását (7. ábra C és D), vagyis az ACh felszabadulás mértékét, tehát nem követi az RPE próbánkénti frissülését (7. ábra E és F) (PFC: $-0,01 \pm 0,03$ vs. $0,003 \pm 0,008$; dCSPO max vs. dCSPR; BLA: $-0,001 \pm 0,008$ vs. $-0,004 \pm 0,009$; dCSPO max vs. dCSPR.). A két agyterület fluoreszcencia változása és az AL ráta változása között sem volt megfigyelhető egyértelmű irányú korreláció (7. ábra G). A 7. H ábrán a két vizsgált agyterület fluoreszcens képe látható. Megfigyelhető rajtuk az optikai szálak helye, illetve zölddel az expresszáldott ACh szenzor.





7. ábra: Az acetilkolin fotometriai méréseinek eredménye

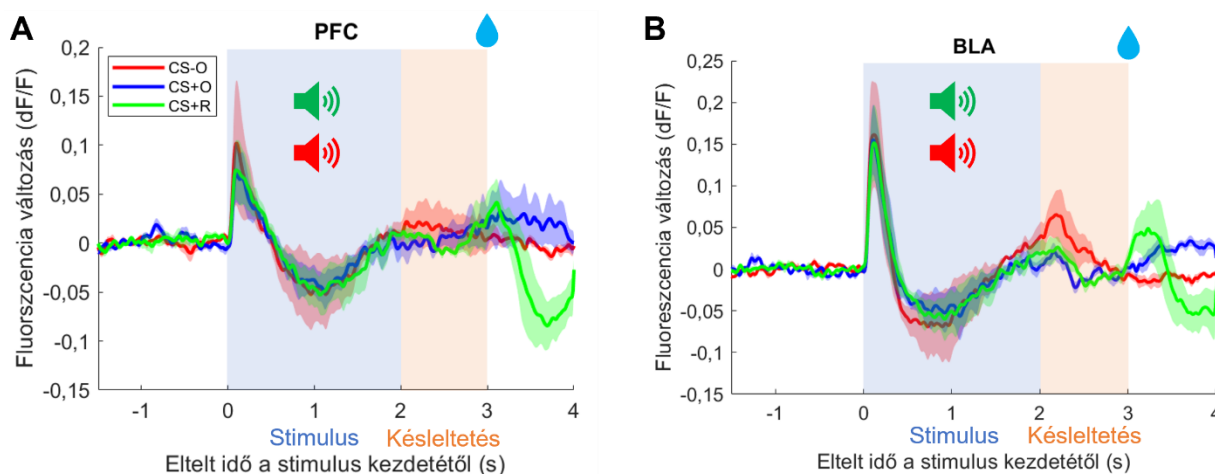
(A) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a prefrontális kéregben (prefrontal cortex: PFC). (B) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a bazolaterális amigdalában (BLA). (C) A fotometriai mérések átlagolt görbéje a PFC-ben jutalmazott próba alatt. A szín kódolás itt a próbát megelőző próba típusát jelöli. (D) A fotometriai mérések

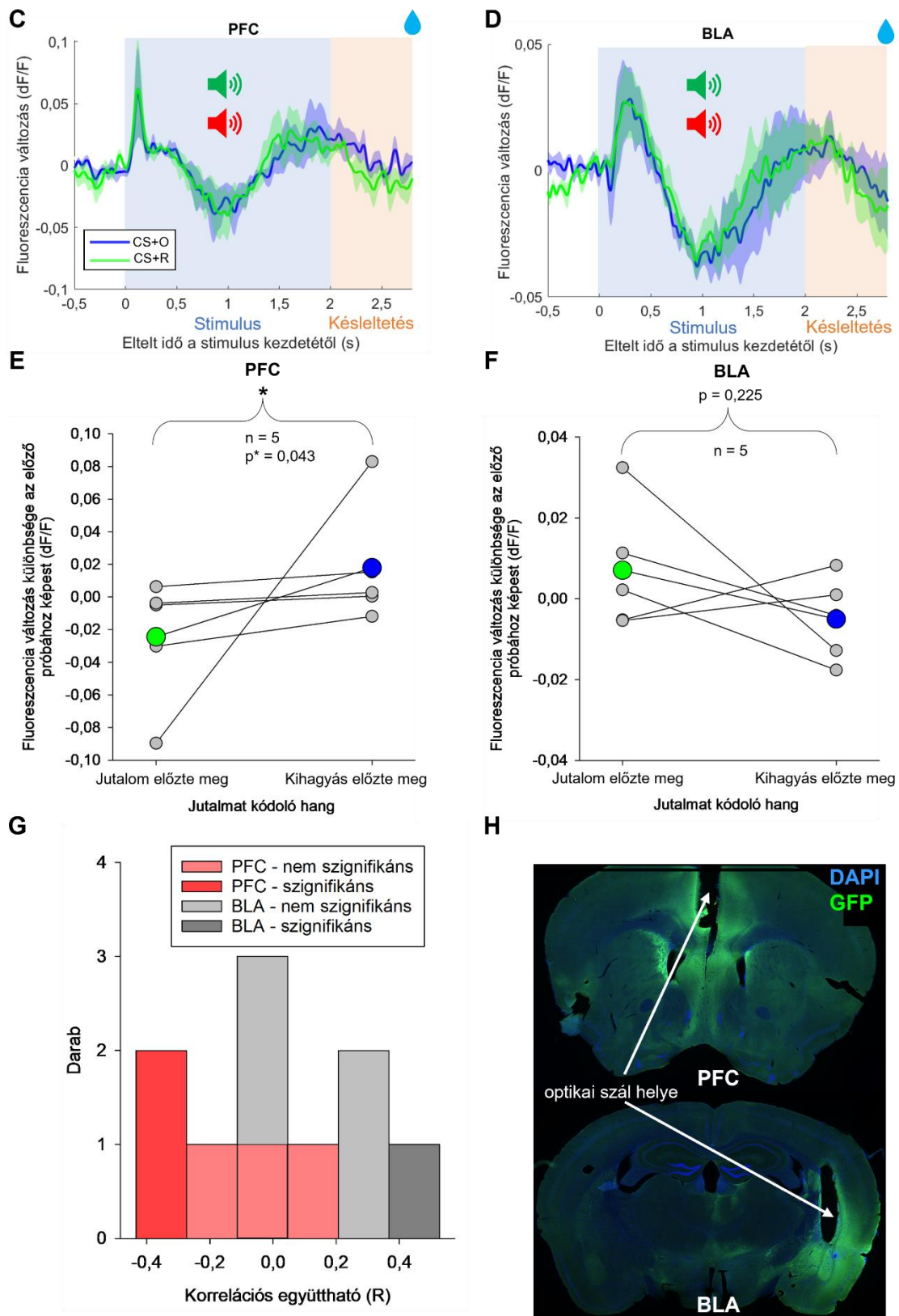
átlagolt görbéje a BLA-ban jutalmazott próba alatt. A szín kódolás itt a próbát megelőző próba típusát jelöli. **(E)** Az acetilkolin fluoreszcencia változás különbsége a PFC-ben az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest, színessel jelölve az átlagok. **(F)** Az acetilkolin fluoreszcencia változás különbsége a BLA-ban az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest, színessel jelölve az átlagok. **(G)** A fluoreszcencia változás és a nyalási ráta korrelációs együtthatóinak eloszlása agyterületenként. **(H)** A vírus injektálás, illetve az optikai szál helye a PFC-ben és a BLA-ban.

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

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

Mint az ACh esetében, mindkét inger hatására növekedett a fluoreszcencia változás, vagyis az NE felszabadulása a stimulus alatt a PFC-ben és a BLA-ban egyaránt (8. ábra A és B). Az 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 az NE szenzorok fluoreszcencia változása, vagyis az NE felszabadulás mértéke, míg a jutalmazatlan próbák után nőtt a fluoreszcencia változás (8. ábra C és E) (PFC: $-0.005 \pm 0,010$ vs. $0,007 \pm 0,016$; dCSPO max vs. dCSPR). A BLA-ban nem volt szignifikáns különbség a fluoreszcencia változásban a két kimenetel között (8. ábra D és F) (BLA: $0,02 \pm 0,04$ vs. $-0.03 \pm 0,04$; dCSPO max vs. dCSPR). A PFC-ben negatív, a BLA-ban leginkább pozitív korrelációt figyeltünk meg a fluoreszcencia változás és az AL ráta változása között (8. ábra G). A 8. H ábrán a két vizsgált agyterület fluoreszcens képe látható. Megfigyelhető rajtuk az optikai szálak helye, illetve zölddel az expresszáldott NE szenzor.





8. 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 különbsége a PFC-ben az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest, színessel jelölve az átlagok. **(F)** A noradrenalin fluoreszcencia változás különbsége a BLA-ban az azt megelőző próba fluoreszcencia változásához képest, színessel jelölve az átlagok. **(G)** A fluoreszcencia változás és a nyalási ráta korrelációs együtthatóinak eloszlása agyterületenként. **(H)** A vírus injektálás, illetve az optikai szál helye a PFC-ben és a BLA-ban. (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, BLA: bazolaterális amigdala. DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol, GFP: green fluorescent protein = zöld fluoreszcens fehérje

5. 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 mind a striátális, mind a frontális kérgi célpontok esetében. Tehát mindkét agyterületen +RPE esetében nőtt a DA felszabadulás és az AL ráta is, -RPE esetében pedig csökkent a felszabadulás és az AL ráta is.

A kolinerg rendszer azonban eredményeink alapján nem követi az RPE próbánkénti változásait, egyik agyterületen sem figyeltünk meg változást a próbánkénti ACh felszabadulásban.

A várttal ellentétben a noradrenerg rendszer az RPE-vel ellentétes aktivitást mutatott a PFC irányába és szignifikáns negatív korrelációt figyelhettünk meg, az NE felszabadulás és az AL ráta között. Ez azt jelenti, hogy +RPE esetében az AL ráta a vártnak megfelelően nőtt, az NE felszabadulás azonban csökkent, -RPE esetén pedig az AL ráta csökkent, az NE felszabadulás pedig nőtt. A BLA esetében az ACh-hoz hasonlóan itt sem tapasztaltunk próbánkénti változást.

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 [28].

A striátális DA és az RPE kapcsolatát már régóta ismerjük, hiszen korábbi kutatások is igazolták már, hogy a DA felszabadulás követi az RPE változásait [23]. Korábbi kutatások is 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 [29]. Eredményeink szintén ezt bizonyítják, tehát nem csak a VS-nek van szerepe az RPE-k kódolásában, hanem a PFC-nek is.

Az ACh esetében korábbi kutatások alapján azt feltételeztük, hogy követni fogja az RPE változásait [13]. Azonban nem frissült próbánként az ACh felszabadulás az RPE-nek megfelelően. Ennek egy lehetséges oka, hogy csak egy-egy tanulási nap után frissül az ACh felszabadulás, nem próbánként, a jövőben erre is tervezünk analízist készíteni.

Az NE szerepe a tanulásban és a figyelemben, ugyan bizonyított [30], de még nem vizsgálták a kapcsolatát a RPE-vel.

Eredményeink bizonyítják, hogy a DA-nak fontos szerepe van a tanulásban, melynek megértése elősegítheti a PD pontosabb megértését, illetve újabb gyógyszer célpontok keresését. Ugyanez elmondható az NE esetében is, melyről korábbi kutatások bizonyítják, hogy mind az AD és a PD esetében is fontos szerepe van a kognitív hanyatlásban [31].

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az RPE a tényleges és a várt jutalom közötti különbség. A megerősítéses tanulás elmélete szerint adott cselekvés értékének frissítése az RPE alapján történik. Kimutatták, hogy a DA felszabadulása a VS-ben az RPE-t követi klasszikus kondicionálás során. Azonban a DA felszabadulása a PFC-ben, amely agyterület az értékalapú döntéshozatalban kulcsfontosságú szerepet tölt be, sokkal kevésbé tanulmányozott. Már bizonyították, hogy a bazális előagyi kolinerg neuronok 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. Célul tűztük ki a DA, ACh és NE szerepének vizsgálatát az asszociatív tanulásban, és felszabadulásuk összefüggésének vizsgálatát az RPE-vel.

Kísérleteink során egereket ($n=15$) tanítottunk egy pavlovi kondicionáláson alapuló hangdetekciós feladatra 50%-os jutalmazási protokollal, amely során két hang (4 és 10 kHz) jelentette a CS-t, az egyik hang 100%-ban kihagyást, az az jutalmazatlan próbát, a másik 50%-ban kihagyást és 50%-ban jutalmat kódolt. Mindeközben a DA, ACh és NE felszabadulást száloptikás fotometriával mértük. Szimultán mértük a DA felszabadulást a PFC-ből és VS-ből, illetve az ACh/NE 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 AL ráta különbsége között mind a VS, mind a PFC esetében. Az ACh esetében egyik agyterületen sem tapasztaltunk hasonlót. A két agyterület fluoreszcencia változása és a várakozó nyalási ráta változása között nem volt megfigyelhető egyértelmű irányú korreláció. Az NE felszabadulás a BLA-ban a DA-hoz hasonló tendenciát 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 várakozó nyalási ráta változása között.

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 azonban eredményeink alapján nem követi az RPE változásait. A várttal ellentétben a noradrenerg rendszer az RPE-vel ellentétes aktivitást mutatott a PFC irányába.

7. SUMMARY

RPE is the difference between actual and expected reward. According to reinforcement learning theory, value is updated based on RPE. The release of DA in the VS was shown to represent RPE during classical condition. However, DA release in the PFC, an area that is crucial to value-based decision making, was much less studied. Cholinergic neurons in the basal forebrain have already been proved to play a key role in associative learning, they are involved in processing stimuli that predict future outcomes. It has been previously demonstrated that the release of norepinephrine NE follows the threat prediction error, but its relationship with RPE has not been investigated yet. We aimed to investigate the role of DA, ACh and NE in associative learning and the correlation of their release with the RPE.

To address this, we trained mice (n=15) on a sound detection Pavlovian conditioning task with a 50% reward schedule that allowed examining clean representations of positive (rewarded trials) and negative (reward omission trials) RPE, while we measured DA, ACh and NE release by fiber photometry, simultaneously measuring DA release in both PFC and VS, and ACh/NE release in both PFC and BLA. Behavioral updating of value representations based on the outcome of the previous trial was indexed by the licking activity of mice in the anticipation of reward.

As expected, AL during the stimulus decreased after omitted rewards but increased after rewarded trials. DA release followed a similar pattern not only in the VS but also in the PFC. Moreover, we found significant positive correlations between DA release and AL rate difference both in VS and PFC. In the case of ACh, we did not experience anything similar in any of the brain areas. No clear correlation was observed between the change in ACh release in any of the brain areas and the change in the anticipatory lick rate. NE release in the BLA followed a similar pattern to DA, but in the PFC, it decreased after rewarded trials and increased after omitted rewards. Furthermore, we observed a negative correlation in the PFC and a mostly positive correlation in the BLA between NE release and anticipatory lick rate difference.

Thus, these results indicate that the dopaminergic system broadcasts similar RPE signals to both striatal and frontal cortical targets. However, the cholinergic system does not follow the changes of the RPE. Contrary to expectations, the noradrenergic system showed opposite activity to the RPE towards the PFC.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Dickinson A (1981) CONDITIONING AND ASSOCIATIVE LEARNING. *British Medical Bulletin* 37:165–168 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a071695>
2. 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>
3. 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>
4. 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>
5. 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, Spirtu 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>
6. 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>
7. 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)
8. 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>
9. 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>
10. 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)
11. 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>
12. 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>
13. 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>
14. 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>
15. 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>
16. 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* 15:699592 <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.699592>
17. 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)
18. 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>
19. 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>

20. 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>
21. 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* 20:1602–161. <https://doi.org/10.1038/nn.4642>
22. Fanselow MS, Poulos AM (2005) The neuroscience of mammalian associative learning. *Annu Rev Psychol* 56:207–234 <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.56.091103.070213>
23. Schultz W (2016) Dopamine reward prediction error coding. *Dialogues Clin Neurosci* 18:23–32 <https://doi.org/10.31887/DCNS.2016.18.1/wschultz>
24. 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>
25. 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. *bioRxiv* 511463 <https://doi.org/10.1101/2022.10.13.511463>
26. Leopold AV, Shcherbakova DM, Verkhusha VV (2019) Fluorescent Biosensors for Neurotransmission and Neuromodulation: Engineering and Applications. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13:1662-5102 <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00474>
27. 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>
28. 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 <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.09.037>
29. 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>
30. 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)
31. 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>

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Hangya Balázsnak, hogy lehetővé tette a TDK munkám elvégzését és szakmai javaslataival segítette dolgozatom elkészítését. Köszönöm társtémavezetőmnek Dr. Szabó Írisznek, hogy megtanított a kísérletekhez szükséges módszerek elvégzésére, felügyelte a TDK dolgozati 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.