

Karolina Andraka

Obwody neuronalne jądra środkowego ciała migdałowatego zaangażowane w społeczny transfer strachu

Praca doktorska wykonana w Pracowni Neurobiologii Emocji Instytutu Biologii Doświadczalnejim. M. Nenckiego PAN

> PROMOTOR: dr hab. Ewelina Knapska, profesor Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M.Nenckiego PAN

> > Warszawa, rok 2020

Składam najserdeczniejsze podziękowania dla dr hab. Eweliny Knapskiej, prof. Instytutu Nenckiego za wsparcie i merytoryczną pomoc.

Dziękuję również wszystkim koleżankom i kolegom z Pracowni Neurobiologii Emocji oraz pracownikom Instytutu Nenckiego za cenne uwagi i życzliwość, która spotykała mnie na każdym kroku.

Pragnę jeszcze osobno wyrazić wdzięczność dr Kseni Meyza, mgr Mateuszowi Kosteckiemu, mgr Kacprowi Kondrakiewiczowi oraz mgr Karolinie Rojek-Sito za owocną współpracę i okazaną pomoc.

> Dziękuję mojej Mamie, Czarkowi, Magdzie oraz Ani za codzienne wsparcie i optymizm.

SPIS TREŚCI

1.	Streszczenie
2.	Abstract
3.	Wykaz skrótów
4.	Wstęp7
	4.1. Eksperymentalny model społecznego transferu strachu
	4.2. Zarażanie emocjonalne a uczenie się przez obserwację11
	4.3. Ekspresja c-Fos w jądrze środkowym ciała migdałowatego (CeA) i jej znaczenie 12
	4.4. Charakterystyka neuroanatomiczna i molekularna CeA14
	4.5. Oksytocyna a przetwarzanie bodźców społecznych i bodźców świadczących o zagrożeniu
	4.6. Neurony wyrażające czynnik uwalniający kortykotropinę (CRF) w CeA18
	4.7. Obwody neuronalne współdzielone przez bodźce o charakterze społecznym i niespołecznym
	4.8. Zarażanie emocjonalne a zjawisko empatii
5.	Cele pracy
6.	Materiały i metody25
	6.1. Opis wykorzystanych zwierząt25
	6.2. Testy behavioralne
	6.3. Analizy immunohistochemiczne

6.4. Doświadczenia optogenetyczne
6.6. Farmakologiczne blokowanie receptora OXY w CeA42
6.7. Mapowanie aktywnych połączeń wstępujących i zstępujących CeA44
6.8. Analiza komunikacji ultradźwiękowej podczas społecznego transferu strachu48
6.9. Analiza statystyczna48
7. Wyniki
7.1. Określenie na ile społeczny transfer strachu i bezpośrednie warunkowanie strachu współdzielą obwody neuronalne w CeA49
 7.2. Porównanie wzorów zachowania podczas interakcji z przestraszonym partnerem (DZIEŃ 1) z efektami stymulacji optogenetycznej neuronów "społecznego strachu" (DZIEŃ 2)
7.3. Zmiany eksploracji u obserwatorów poddanych stymulacji optogenetycznej 58
7.4. Współwystępowanie znacznika aktywacji c-Fos z OXY i hormonem uwalniającym kortykotropinę w CeA63
7.5. Zmiany zachowania obserwatorów podczas testu społecznego transferu strachu w wyniku manipulacji obwodem OXY w CeA
7.6. Wzory eksploracji nowego środowiska przez demonstratorów testowanych niezwłocznie po społecznym transferze strachu z manipulacją obwodem oksytocynowym w CeA obserwatorów
7.7. Zidentyfikowanie funkcjonalnych projekcji do i z CeA w strukturach aktywowanych przez strach przekazywany społecznie
7.8. Komunikacja ultradźwiękowa podczas społecznego transferu strachu74
8. Dyskusja76
8.1. Obwody aktywowane w CeA przez społeczne i niespołeczne bodźce świadczące o zagrożeniu

8.2. Neurony "społecznego strachu" a zachowania mające na celu oszacowanie
ryzyka77
8.3. Modulująca rola OXY oraz neuronów CRF pozytywnych w CeA
w zachowaniach mających na celu oszacowanie ryzyka78
8.4. Rola OXY w CeA a buforowanie społeczne podczas społecznego transferu
strachu
8.5. Aktywacja projekcji wchodzących do CeA przez społeczny transfer strachu 84
8.6. Aktywacja projekcji wychodzących z CeA przez społeczny transfer strachu 88
9. Wnioski
10. Bibliografia

1. Streszczenie

Zarażanie emocjonalne, czyli współdzielenie stanów emocjonalnych pomiędzy osobnikami, jest uważane za jedna z najprostszych form empatii. Zjawisko to można badać wykorzystując zwierzęce modele eksperymentalne, np. model szczurzy. Wcześniej wykazano m.in., że interakcja społeczna z przestraszonym partnerem z klatki (demonstratorem) sprzyja zachowaniom mającym na celu ocenę ryzyka i aktywuje jądro środkowe ciała migdałowatego (CeA) u niepoddanego treningowi szczuraobserwatora. Dodatkowo, strach przenoszony społecznie przyspiesza późniejsze nabywanie reakcji strachu u obserwatora. Głównym tematem tej pracy było zbadanie roli subpopulacji neuronów w CeA aktywowanej podczas społecznego transferu strachu. Aby zlokalizować aktywowane neurony wykorzystano podwójna immunodetekcję c-fos-zależnego konstruktu PSD-95:Venus i endogennego białka c-Fos. Dzięki temu stwierdzono, że subpopulacja neuronów aktywowanych przez społeczny transfer strachu częściowo pokrywa się (w około 65%) z subpopulacją zaangażowaną w bezpośrednie nabywanie reakcji strachu. W celu określenia funkcji neuronów "społecznego strachu" poddano je stymulacji optogenetycznej w znajomym i nowym środowisku. Zaobserwowano, że aktywacja neuronów "społecznego strachu" w CeA w znanym środowisku klatki domowej, w obecności partnera, wywołała pobudzenie behawioralne charakterystyczne dla społecznego transferu strachu. Nie wpłynęła natomiast na zachowania społeczne, sugerując, że neurony te są odpowiedzialne raczej za eksplorację o charakterze niespołecznym. Hipotezę tę potwierdzono w kolejnym eksperymencie, podczas którego aktywowanie neuronów "społecznego strachu" podczas testu w nowym środowisku wywołało zachowania mające na celu aktywną ocenę ryzyka. Następnie scharakteryzowano neurony "społecznego strachu" pod katem współwystępowania białka c-Fos z czynnikiem uwalniającym kortykotropinę (CRF) i oksytocyną (OXY). Zaobserwowano duży poziom współwystępowania zarówno włókien OXY, jak i CRF z neuronami c-Fos pozytywnymi. W następnym kroku zbadano jaki wpływ ma uwalnianie OXY na społeczny transfer strachu. W tym celu, w trakcie społecznego transferu strachu, stymulowano optogenetycznie uwalnianie OXY lub podawano antagonistę receptora OXY do CeA obserwatorów. Zaobserwowano, że zwiększenie poziomu OXY w CeA zmniejszyło występowanie zachowań mających na celu ocenę ryzyka, natomiast jej

zintensyfikowało takie zachowania. Ponadto zablokowanie zauważono, że manipulowanie poziomem OXY u obserwatora wywiera wpływ również na zachowanie demonstratora, sugerując wpływ zachowania obserwatora na efektywność społecznego buforownia strachu u demonstratora. Następnie przeprowadzono immunodetekcję białka c-Fos i konstruktu PSD-95: Venus w połączeniu z technikami znakowania połączeń pomiędzy strukturami mózgu i scharakteryzowano funkcjonalne połączenia CeA podczas społecznego transferu strachu. Jako dominujące zidentyfikowano projekcje z części grzbietowej kory przedczołowej i kory wyspy oraz projekcje do substancji szarej okołowodociągowej i jąder szwu. Podsumowując, wykazano, że: (1) neurony "społecznego strachu" modulują eksplorację środowiska w sposób mający na celu wykrycie potencjalnego zagrożenia, (2) zachowania mające na celu ocenę ryzyka są hamowane przez uwolnienie OXY w CeA, (3) neuronalne obwody CeA są częściowo współdzielone przez społeczny transfer strachu i bezpośrednie nabywanie reakcji strachu.

2. Abstract

Emotional contagion, i.e., the sharing of emotional states between individuals, considered to be one of the simplest forms of empathy, can be modeled in rodents. For instance, it has been described earlier that social interaction with a fearful cage mate (the demonstrator) promotes risk assessment and activates the central amygdala (CeA) in an otherwise naïve rat (the observer). Additionally, socially transferred fear subsequently facilitates aversively motivated learning. Here we focused on investigating the mechanistic role of CeA neurons activated by socially transferred fear. We used cfos guided detection of the activated cells. Using double immunodetection for a *c-fos* driven PSD-95: Venus construct and endogenous c-Fos we showed that the CeA 'social fear' neuronal population partially overlaps (about 65%) with neurons activated by directly experienced fear. Then, to assess the function of CeA 'social fear' neurons we optogenetically stimulated them in familiar and novel environment. We showed that the activation of CeA 'social fear' neurons in a familiar environment induced risk assessment behavior, resembling closely the behavior observed during interaction with a fearful partner. Interestingly, the activation did not affect social behavior, suggesting that, instead, CeA 'social fear' neurons play a role in modulation of non-social exploration. This hypothesis was confirmed in the next experiment, in which CeA 'social fear' neurons were activated in the novel environment. Next, we characterized the CeA 'social fear' neurons collocalizing c-Fos with corticotropin releasing factor (CRF) and oxytocin (OXY). We observed high level of co-localization between neurons activated by socially transferred fear, CRF and oxytocinergic fibers. Then, to study the role of OXY in socially transferred fear we optogenetically stimulated the release of OXY or infused an OXY receptor antagonist to the CeA of the observers. We found that OXY in the CeA bidirectionally modulates risk assessment behavior, with increased OXY level reducing, and reduced OXY level increasing it. Manipulation of the OXY level in the CeA of the observers also affected behavior of the demonstrators suggesting the role of proper social interaction in social buffering. Finally, performing immunodetection of c-Fos i PSD-95: Venus construct combined with tracing techniques we characterized the functional connectivity of CeA 'social fear' neurons. We observed dominant projections from the prelimbic cortex and insular cortex, as well as to the periaqueductal gray and raphe nuclei, the structures involved in directly experienced fear and anxiety. In summary, we found that (1) CeA 'social fear' neurons modulate exploration of the environment, in a way that helps to detect potential threats, (2) the risk assessment behavior is suppressed by OXY release in the CeA, (3) the neuronal circuits in the CeA for social and directly experienced fear partially overlap.

3. Wykaz skrótów

ACC (ang. anterior cingulate cortex) – przednia kora zakrętu obręczy

AI (ang. anterior insula) – przednia część kory wyspy

AID (ang. agranular insular cortex, dorsal) – agranularna kora wyspy, część grzbietowa

AIV (ang. *agranular insular cortex, vental*) – agranularna kora wyspy, część brzuszna ANOVA – analiza wariancji

AP (ang. anterior/posterior) - płaszczyzna przednio-tylna czaszki

AP-1 (ang. *activator protein 1*) – czynnik transkrypcyjny, heterodimer zazwyczaj złożony z białka c-Fos i partnera należącego do rodziny Jun

BLA (ang. basolateral amygdala) – jądro podstawno-boczne ciała migdałowatego

CeA (ang. central nucleus) - jądro środkowe ciała migdałowatego

CeL (ang. lateral subdivision) – boczna część jądra środkowego ciała migdałowatego

CeM (ang. *medial subdivision*) – przyśrodkowa część jądra środkowego ciała migdałowatego

c-fos (*c-fos* mRNA i białko c-Fos; ang. *cellular FBJ osteosarcoma virus*) – gen, którego ekspresja jest badana w celu określenia aktywności funkcjonalnej neuronów

c-Fos – białko c-Fos

Cg1 (ang. Cingulate cortex, area 1) – zakręt obręczy, obszar 1

CRF (ang. Corticotropin Releasing Factor) – czynnik uwalniający kortykotropinę

DI (ang. dysgranular insular cortex) – dysgranularna kora wyspy

DRN (ang. raphe nuclei, dorsal) – jądra szwu, część grzbietowa

DV (ang. dorsal/ventral) - płaszczyzna brzuszno-grzbietowa czaszki

eYFP (ang. enhanced yellow fluorescent protein) - białko wzmocnionej żółtej fluorescencji

GFP (ang. green fluorescent protein) - białko zielonej fluorescencji

GI (ang. granular insular cortex) – granularna kora wyspy

HC (ang. *home cage*) – grupa kontrolna zwierząt hodowanych w parach w klatkach domowych, nie poddanych treningom behawioralnym

IEG (ang. immediate early gene) - gen odpowiedzi wczesnej

INS (ang. insula, insular cortex) – kora wyspy

IL (ang. infralimbic cortex) – brzuszna część przyśrodkowej kory przedczołowej

LA (ang. lateral nucleus) - jądro boczne ciała migdałowatego

LM (ang. lateral/medial) – płaszczyzna boczno-przyśrodkowa czaszki

LTP (ang. long term potentiation) – długotrwałe wzmocnienie synaptyczne

lwDR (ang. dorsal raphe lateral wing) - boczne skrzydło części grzbietowej szwu

MRN (ang. raphe nuclei, median) - jądra szwu, część środkowa

mRNA (ang. messenger RNA) - matrycowy RNA

NSo (ang. *non-shocked observer*) – grupa, w której obserwator był poddany interakcji społecznej z demonstratorem po krótkim okresie separacji

NSd (ang. non-shocked demonstrator) – grupa, w której demonstrator był poddany interakcji społecznej z obserwatorem po krótkim okresie separacji i pobycie w klatce eksperymentalnej

Okres OFF - faza testu optogenetycznego, w czasie której laser był wyłączony

Okres ON – faza testu optogenetycznego, w czasie której laser był włączony

OXY (ang. oxytocin) – oksytocyna

PAG (ang. periaqueductal gray) - substancja szara okołowodociągowa

PBS (ang. phosphate buffered saline) – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej

PFA – paraformaldehyd

PFC (ang. prefrontal cortex) – przyśrodkowa kora przedczołowa

PL (ang. prelimbic cortex) – grzbietowa część przyśrodkowej kory przedczołowej

PVN (ang. paraventricular nucleus) - jądro przykomorowe

RN (ang. raphe nuclei) – jądra szwu

Sd (ang. *shocked demonstrator*) – grupa, w której demonstrator był poddany warunkowaniu strachu, a następnie interakcji społecznej z naiwnym obserwatorem

So (ang. *shocked observer*) – grupa, w której obserwator miał interakcję z poddanym warunkowaniu strachu demonstratorem

SOM (ang. somatostatin) – somatostatyna

wektory AAV - wektory wirusowe związane z adenowirusami

vlPAG (ang. *ventrolateral periaqueductal gray*) – część brzuszno-boczna substancji szarej okołowodociągowej

4. Wstęp

Strach jest emocją wrodzoną, o bezpośrednim znaczeniu adaptacyjnym (Plutchik, 1980). Bodźce świadczące o niebezpieczeństwie wywołują u zwierząt strach, co skutkuje mobilizacją organizmu i prowadzi do ucieczki lub walki (ang. flight-or-fight response, Cannon, 1915) albo zamierania (ang. freezing, Blanchard i Blanchard, 1969). Sytuacje takie powodują powstawanie śladów pamięciowych w mózgu, pomagając przyjmowaći wypracowywać najbardziej odpowiednie organizmom strategie przetrwania (Ehrlich i in., 2009; Ciocchi i in., 2010; Knapska i in., 2012; Li i in., 2013; Penzo i in., 2014; Janak i Tye, 2015). Gatunki społeczne czerpią korzyści z tworzenia grup, m.in., dlatego, że pojedyncze osobniki otrzymują informacje o zagrożeniu od innych członków stada, bez narażania się na bezpośrednie niebezpieczeństwo. Wokalizacje i feromony alarmowe, charakterystyczna postawa ciała - podobnie jak awersyjne bodźce niespołeczne - wpływają na zachowanie i pamięć zwierząt je odbierających. Prawdopodobnie wiele aspektów teorii klasycznego i instrumentalnego uczenia się może znajdować zastosowanie również w procesach związanych z przetwarzaniem bodźców społecznych (Bandura, 1971; Olsson i in., 2020). Jednakże sposób, w jaki mózg przetwarza informację na temat zagrożenia uzyskiwaną od innych osobników oraz jak moduluje zachowanie osobnika dzięki przetworzeniu takiej informacji nie jest dobrze poznany.

Zjawisko przejmowania pobudzenia emocjonalnego od innych osobników, zwane zarażaniem emocjonalnym, polega na przyjmowaniu stanów motorycznych, fizjologicznych oraz afektywnych drugiego osobnika i najprawdopodobniej tworzy podstawę, z której wyewoluowały wyższe formy empatii (Preston i de Waal, 2002). Zarażanie emocjonalne jest szeroko opisywane głównie wśród ssaków i występuje pomiędzy osobnikami tego samego gatunku (Jeon i in., 2010; de Waal i Preston, 2017; Meyza i in., 2017). Najwięcej badań tego zjawiska przeprowadzono wykorzystując model obserwacyjnego uczenia się, w którym dwa osobniki (szczury lub myszy) zamknięte są w dwóch małych komorach rozdzielonych perforowaną przegrodą. Jedno ze zwierząt obserwuje drugie, poddawane warunkowaniu strachu, w wyniku czego samo uczy się przejawiać strach. Jednakże ograniczona przestrzeń w klatce eksperymentalnej i obecność przegrody w tym modelu uniemożliwiają rejestrowanie pełnej interakcji społecznej partnerów. Na przestrzeni lat powstały modele eksperymentalne do badania zarażania emocjonalnego bardziej dopasowane do profilu etologicznego gryzoni (Knapska i in., 2006; Bruchey i in., 2010; Monfils i Agee, 2019). W niniejszej pracy wykorzystano model społecznego transferu strachu opracowany przez Knapską i in. (2006, 2010). W modelu tym jeden z pary szczurów, hodowanych razem w klatce, tzw. demonstrator, jest zabierany z klatki domowej i poddawany warunkowaniu strachu. Po powrocie do klatki domowej wchodzi on w interakcję z drugim ze szczurów, określanym jako obserwator.

Interakcja z pobudzonym emocjonalnie demonstratorem prowadzi do zmiany zachowania obserwatora, polegającej, m. in., na pobudzeniu motorycznym, wzmożonej eksploracji środowiska, wykonywaniu stójek. W badaniach nad pojedynczymi osobnikami takie zachowanie opisuje się jako szacowanie ryzyka (ang. risk assessment) i jest ono powiązane z lękiem (McNaughton i Corr, 2004). Stwierdzono też, że kontakt z przestraszonym demonstratorem poprawia uczenie się i pamięć warunkowych bodźców awersyjnych (Knapska i in., 2010). Na poziomie molekularnym natomiast obserwuje się podwyższoną ekspresję białka c-Fos (znacznika aktywności neuronalnej) w ciele migdałowatym, między innymi w jądrze środkowym (CeA, Knapska i in., 2006). CeA zaangażowane jest w przetwarzanie bodźców awersyjnych i ekspresję aktywnych oraz pasywnych strategii obronnych w odpowiedzi na zagrożenie, jego boczna cześć wiązana jest też z procesami uwagowymi (Gallagher i Schoenbaum, 1999; Knapska i in., 2006). Z drugiej jednak strony wskazuje się na rolę tego jądra w zachowaniach społecznych związanych z, m.in., agresją, kopulacją i opieką nad potomstwem, a także z motywacją apetytywną (Knapska i in., 2006, 2013; Namburi i in., 2015a; Kim i in., 2017; Lebitko i in., 2020). W związku z tym, celem tej pracy było zbadanie jaką rolę pełni aktywacja CeA w społecznym transferze strachu. W pierwszej kolejności zbadano, na ile subpopulacja neuronów c-Fos pozytywnych w CeA wzbudzana przez społeczny transfer strachu jest tożsama z populacją pobudzaną przez bezpośrednie warunkowanie strachu. Następnie optogenetycznie pobudzano badaną subpopulację w znanych warunkach, w obecności partnera, jak też podczas eksploracji nowego środowiska. Ponieważ doniesienia ostatnich lat wskazują na istotą rolę oksytocyny (OXY, ang. oxytocin) w CeA w ekspresji oraz wygaszaniu reakcji strachu (Hasan i in., 2019), a także ocenie walencji bodźców społecznych (Ferretti i in., 2019; Rogers-Carter i Christianson, 2019), zbadano również, czy i w jaki sposób wydzielanie OXY w CeA moduluje społeczny transfer strachu. Następnie scharakteryzowano funkcjonalne połączenia neuronów w CeA aktywowanych przez społeczny transfer strachu.

4.1. Eksperymentalny model społecznego transferu strachu

W modelu eksperymentalnym społecznego transferu strachu (Knapska i in., 2006; Ryc. 1), szczury hodowane są w parach. W dniu eksperymentu jeden z nich, zwany demonstratorem jest poddawany warunkowaniu strachu. Zaraz po zakończeniu treningu demonstrator przenoszony jest z powrotem do klatki domowej, gdzie czeka na niego jego partner niepoddany żadnej stymulacji behawioralnej (tzw. obserwator). Szczury mogą wchodzić w swobodną interakcję. W grupie kontrolnej, demonstrator przenoszony jest do nowej klatki o neutralnym zapachu, po czym wraca do klatki domowej, gdzie wchodzi w interakcje z obserwatorem - jest to kontrolna interakcja społeczna po separacji. Obserwacje behawioralne pokazują, że pobudzenie emocjonalne demonstratora zostaje przekazane obserwatorowi. Objawia się to wzmożeniem zachowań eksploracyjnych, takich jak stójki, oraz intensyfikacją reakcji wzdrygnięcia wywołanej głośnym dźwiękiem (ang. acoustic startle response, Knapska i in., 2006). Podczas interakcji obserwatorzy wykazują też wzmożenie społecznych zachowań eksploracyjnych takich jak obwachiwanie demonstratorów, szczególnie części ciała wydzielających feromony (Knapska i in., 2010). Zastosowanie tego modelu u myszy również wykazało wzmożenie społecznych zachowań eksploracyjnych u obserwatorów (Meyza i in., 2015).

Zmiany w zachowaniu obserwatorów pokazują, że demonstratorzy nie muszą znajdować się w bezpośrednim zagrożeniu, żeby przekazywać obserwatorom swoje pobudzenie emocjonalne oraz że wcześniejsza bezpośrednia ekspozycja na bodźce wywołujące strach nie jest wymagana, żeby obserwator przejął owo pobudzenie od demonstratora (Knapska i in., 2006; Knapska i in., 2010). Z etologicznego punktu widzenia szybkie dostosowanie się do stanu demonstratora wpływa na lepszą adaptację do zmian w środowisku zewnętrznym. Obserwacje Knapskiej i in. (2010) wskazują też na to, że społeczny transfer strachu poprawia nabywanie i pamięć warunkowej reakcji strachu u obserwatorów, a także pozytywnie wpływa na wyniki uzyskane w teście aktywnego unikania. Jest prawdopodobne, że obserwatorzy rozpoznają zapach klatki do warunkowania strachu na futrze demonstratora, w ten sposób demonstratorzy przenoszą elementy kontekstu warunkowania strachu, a obserwatorzy wytwarzają asocjację tego zapachu z negatywną walencją stanu emocjonalnego demonstratora. Podobny transfer

obserwowano, w modelach badających przekazywanie informacji na temat bezpieczeństwa pokarmu (informacje na temat zapachu bezpiecznego pokarmu są zbierane z pyska demonstratora, a zapach demonstratora pozostawiony na pokarmie, sprawia, że jest on potem preferowany przez obserwatora w porównaniu z pokarmem o neutralnym zapachu, Bessières i in., 2017).

Co ciekawe, u myszy kontakt z przestraszonym osobnikiem zaburzał uczenie się warunkowej reakcji strachu (Bredy i Barad, 2009). Przyczyny różnic wpływu społecznego transferu na późniejsze warunkowanie strachu opisywane między tymi gatunkami nie są do końca jasne. Różnice te mogą wynikać z innego wyjściowego poziomu lęku i obierania innych strategii radzenia sobie ze stresem. U zwierząt utrzymujących hierarchię społeczną ważnym czynnikiem w przekazywaniu i pobieraniu informacji jest też pozycja w stadzie (Horner i in., 2010), co może być czynnikiem determinującym zajście transferu strachu między osobnikami i być może ta zależność jest silniej wyrażana u myszy. Podsumowując, obserwacje dotyczące społecznego transferu strachu sugerują, że zarażanie emocjonalne u zwierząt nie tylko informuje o obecnych w danej chwili zagrożeniach ze strony środowiska zewnętrznego, ale również moduluje uczenie się reakcji obronnych pozwalających na efektywniejsze uniknięcie zagrożenia w przyszłości.

SPOŁECZNY TRANSFER STRACHU



Rycina 1. Model społecznego transferu strachu. W dniu eksperymentu jeden ze szczurów zwany demonstratorem jest poddawany warunkowaniu strachu. Zaraz po zakończeniu treningu jest on przenoszony z powrotem do klatki domowej, gdzie czeka na niego jego partner, zwany obserwatorem. Szczury mogą wchodzić w swobodną interakcję, podczas której obserwatorzy wykazują wzrost społecznych zachowań eksploracyjnych oraz zachowań mających na celu oszacowanie ryzyka, tzw. stójek.

4.2. Zarażanie emocjonalne a uczenie się przez obserwację

U ludzi przyjmowanie odpowiednich strategii behawioralnych na podstawie interakcji ze środowiskiem społecznym może zachodzić poprzez warunkowanie klasyczne i instrumentalne, ale również poprzez świadome konstruowanie hipotez dotyczących tego, jakie własne działania i w jakich warunkach prowadzą do pożądanych przez jednostkę skutków. Ludzie wykorzystują także modelowanie, tzn. skupianie uwagi na zachowaniu modela, zapamiętywanie go i samodzielne wypróbowywanie w nowych sytuacjach (Bandura, 1971).

Podobne zasady jak podczas uczenia się metodą prób i błędów wydają się mieć zastosowanie w uczeniu się jakie konsekwencje mogą nieść emocje innych (Joiner i in., 2017; Lindström i in., 2018). Ludzie są zdolni uczyć się zachowań prospołecznych, a osoby bardziej empatyczne uczą się takich zachowań szybciej (Lockwood i in., 2016). Uczenie obserwacyjne występuje również u zwierząt i można zaobserwować i tu pewne analogie między uczeniem się bodźców społecznych i bodźców niespołecznych (Laland, 2004; Olsson i Phelps, 2007). Zarówno u ludzi, jak i u zwierząt obserwuje się, że ekspresja emocjonalna demonstratora wpływa na nabywanie i wygaszanie reakcji strachu u obserwatora (Hooker i in., 2006; Knapska i in., 2007; Kiyokawa i in., 2014; Gunnar i in., 2015; Colnaghi i in., 2016). U zwierząt ekspozycja na widok, zapach lub wokalizacje przestraszonego demonstratora powoduje wzmocnioną reakcję na zagrożenie (Inagaki i in., 2014; Lebowitz i in., 2015). U małp przebieg mimikry u obserwatora jest zależny od intensywności ekspresji emocjonalnej demonstratora, sugerując podobny związek do obserwowanego podczas uczenia się pomiędzy bodźcami warunkowymi i bezwarunkowymi (Cook i Mineka, 1989). Zarażanie emocjonalne ułatwia gatunkom stadnym nabywanie informacji o świecie zewnętrznym i funkcjonowanie w środowisku. Oprócz zalet wynikających z uczenia się o korzyściach i zagrożeniach w środowisku, nabycie umiejętności rozpoznawania stanów emocjonalnych innych zainicjowało najprawdopodobniej rozwój empatii. U ludzi, przede wszystkim dzięki rozwinięciu mowy, przekazywanie oraz przechowywanie informacji o środowisku innym członkom społeczności może być bardzo precyzyjne. Zwierzęta informacje o zagrożeniu uzyskuja dzięki odczytywaniu stanów emocjonalnych innych, poprzez feromony alarmowe, wokalizacje itp. Jednak sposób i stopień precyzji takiej komunikacji jest wciąż bardzo mało zbadany.

4.3. Ekspresja c-Fos w jądrze środkowym ciała migdałowatego (CeA) i jej znaczenie

Znakowanie białka c-Fos jest powszechnie stosowane jako narzędzie do mapowania aktywacji mózgu (Knapska i in., 2007). Gen *c-fos* należy do grupy genów wczesnej odpowiedzi (ang. *immediate early genes*; IEGs; Greenberg i in., 1986), a jego produkt - białko c-Fos lokalizuje się w jądrze komórkowym (Curran i in., 1984). Komórka w warunkach podstawowych ma niski poziom białka c-Fos, natomiast po pobudzeniu jego ekspresji mRNA może być wykryte już po 15 minutach (Curran

i Franza, 1988; Kaczmarek i in., 1988). W wyniku translacji mRNA poziom białka podnosi się i osiąga najwyższy poziom w jądrze po ok. 1,5 do 2 godzin po indukcji (Morgan i in., 1987; Yang i in., 1990; Kamińska i in., 1994).

Wiele badań wskazuje na to, że indukcja białka c-Fos w neuronach jest związana z procesem uczenia się i plastyczności neuronalnej i koreluje z nowością danej sytuacji (Hess i in., 1995; Frankland i in., 2004; Martinez i in., 2013; de Hoz i in., 2018). c-Fos bierze, m.in., udział w regulacji ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w plastyczność synaptyczną i powstawanie śladu pamięciowego (Szklarczyk i in., 2002; Michaluk i in., 2011; Knapska i in., 2013).

Mapowanie aktywacji neuronalnej ciała migdałowatego za pomoca białka c-Fos pozwoliło na powiązanie aktywności różnych jego jąder z warunkowaniem, ekspresją i wygaszaniem reakcji strachu, aktywnym unikaniem, społecznym transferem strachu, zachowaniami agresywnymi i opiekuńczymi, a także treningiem apetytywnym (Beck i Fibiger, 1995; Savonenko i in., 1999; Radwanska i in., 2002; Knapska i in., 2006). W badaniach nad rolą CeA w przetwarzaniu bodźców apetytywnych stwierdzono, że zablokowanie subpopulacji neuronów wyrażających c-Fos prowadzi do osłabienia motywacji zwierząt do wykonywania reakcji instrumentalnej prowadzącej do zdobycia nagrody (Lebitko i in., 2020). Natomiast w odniesieniu do bodźców awersyjnych nie stwierdzono wzrostu ekspresji c-fos po treningu warunkowania strachu na kontekst lub bodziec słuchowy w porównaniu do grupy kontrolnej (Kaczmarek i in., 1988; Milanovic i in., 1998; Do-Monte i in., 2015). Zaobserwowano natomiast wzrost poziomu białka c-Fos w neuronach CeA po teście reakcji aktywnego unikania (Martinez i in., 2013). Podsumowując, indukcja białka c-Fos w CeA związana jest z przetwarzanie zarówno pozytywnych, jak i negatywnych emocji, w kontekście niespołecznym, jak i społecznym.

Podwyższony poziom białka c-Fos w CeA obserwatorów poddanych społecznemu transferowi strachu (Knapska i in., 2006) sugeruje istotną rolę tej subpopulacji neuronów w zarażaniu emocjonalnym. Dostępne wcześniej techniki eksperymentalne nie pozwalały na badanie funkcji neuronów aktywowanych w CeA. Możliwości takich dostarczyła optogenetyka, umożliwiająca okresową stymulację aktywności wybranej subpopulacji neuronów w czasie rzeczywistym testu oraz konstrukty genetyczne pozwalające na wywołanie ekspresji białek światłoczułych pod kontrolą promotora *c-fos* (konstrukty niosące sekwencję kodującą rodopsynę ChR2,

ang. *channel rhodopsin* 2, ChR2, światłoczułe białko pozwalające na stymulację aktywności neuronów, których ekspresja zachodzi pod kontrolą promotora *c-fos*).

Biorąc pod uwagę przytoczone powyżej wyniki wcześniejszych badań nad zaangażowaniem CeA w przetwarzanie pozytywnych i negatywnych stanów emocjonalnych można wysunąć dwie hipotezy wyjaśniające silną aktywację tej struktury w społecznym transferze strachu. Obserwowana aktywacja może być wynikiem emocji pozytywnych, związanych np. z przerwaniem izolacji społecznej, czy pozytywnym kontaktem społecznym lub też być związana z emocjami negatywnymi (wykrycie bodźców świadczących o zagrożeniu, zarażanie strachem). W związku z tym, głównym celem tej pracy było wyjaśnienie jaką funkcję pełni subpopulacja neuronów c-Fos pozytywnych aktywowana w CeA w wyniku społecznego transferu strachu i jej związku z pozytywnym i negatywnym pobudzeniem emocjonalnym.

4.4. Charakterystyka neuroanatomiczna i molekularna CeA

Ciało migdałowate pełni kluczową rolę w przetwarzaniu emocji, jest to struktura szczególnie dobrze zbadana pod względem odpowiedzi na warunkowe bodźce awersyjne (LeDoux, 2000). CeA stanowi główne wyjście z ciała migdałowatego do pnia mózgu, co umożliwia efektywną kontrolę reakcji obronnych (LeDoux, 2000). Anatomicznie, jak również funkcjonalnie, CeA dzieli się na część boczną (CeL, ang. lateral) i część przyśrodkową (CeM, ang. medial), różniące się profilem molekularnym (Veinante i Freund-Mercier, 1997; Huber i in., 2005). Czasem wyróżnia się również część kapsularną (CeC, ang. capsular). CeA zbudowane jest ze średniej wielkości, rozgałęzionych i posiadających liczne kolce dendrytyczne neuronów GABA-ergicznych (Cassell i in., 1986). W CeA występuje duża różnorodność ekspresji genów (Moga i Gray, 1985; Veinante i Freund-Mercier, 1997; Zirlinger i in., 2001). W różnych neuronach CeA stwierdzono, m.in., ekspresję następujących genów: hormonu uwalniającego kortykotropinę (gen Crh, ang. Corticotropin Releasing Hormone), receptora serotoniny 2a (gen Htr2a, ang. 5-Hydroxytryptamine Receptor 2A), neurotensyny (gen Nts, ang. Neurotensin), kinazy białkowej C-& (gen Prkcd, ang. Protein Kinase C Delta), somatostatyny (gen Sst, ang. Somatostatin) i tachykininy 2 (gen Tac2, ang. Tachykinin 2) oraz receptora podobnego do receptora kalcytoniny (gen Calcrl, ang. Calcitonin Receptor Like Receptor) (Kim i in., 2017). Do pewnego stopnia

subpopulacje neuronów charakteryzujące się ekspresją wymienionych genów są rozłączne.

Kim i in. (2017) przeprowadzili analizę ekspresji genów w CeA w odniesieniu do zachowań związanych z motywacją apetytywną i awersyjną, analizując za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* koekspresję genu *c-fos* (powszechnie stosowanego jako narzędzie do mapowania aktywacji mózgu; Knapska i in., 2007) z wybranymi znacznikami. Ekspresja genu c-fos była zwiększona w CeC w neuronach Prkcd podczas warunkowego strachu w porównaniu do sesji wygaszania, natomiast testu w odpowiedzi na bodziec bezwarunkowy zaobserwowano zwiększoną koekspresję c-fos z Prkcd i Calcrl. Ekspresja c-fos była również zwiększona w neuronach Prkcd w CeL podczas sesji wygaszania, w porównaniu do nawrotu strachu uwarunkowanego na kontekst. Zaobserwowano również wzrost koekspresji genu c-fos z Prkcd, Sst, Crh/Nts/Tac2 w CeL oraz z Sst i Tac2 w CeM w odpowiedzi na nieograniczony dostęp do picia i jedzenia. Ekspresja *c-fos* była również zwiększona w neuronach *Prkcd* w CeL po podaniu substancji powodującej uczucie sytości oraz w neuronach Prkcd w CeC po podaniu chininy (substancja o awersyjnym, gorzkim smaku). Podsumowując, neurony Prkcd w CeC były aktywowane przez bodźce zagrażające lub awersyjny smak (chinina). Neurony Prkcd w CeL były aktywowane, gdy reakcje obronne były hamowane, a także przez bodźce hamujące zachowania apetytywne. Natomiast neurony Sst, Crh, Nts, Tac2 w CeL oraz neurony Sst, Nts i Tac2 w CeM były aktywowane przez bodźce wyzwalające zachowania apetytywne. W związku z powyższym subpopulacja neuronów c-Fos pozytywnych aktywowanych przez społeczny transfer strachu została poddana wstępnej analizie immunohistochemicznej pod kątem współwystępowania z kilkoma znacznikami molekularnymi mającymi znaczenie podczas ekspresji reakcji obronnych i apetytywnych.

4.5. Oksytocyna a przetwarzanie bodźców społecznych i bodźców świadczących o zagrożeniu

Ze względu na liczne doniesienia świadczące o zaangażowaniu oksytocyny (OXY) w modulowanie reakcji strachu, ale też przetwarzanie bodźców o charakterze społecznym, określenie jej roli podczas społecznego transferu strachu stało się jednym z głównych celów tej pracy.

OXY jest nonapeptydem, swoją strukturą przypominającym wazopresynę, jej analogi pojawiają się w ewolucji już u pierścienic (Oumi i in., 1996). Synteza OXY zachodzi w jądrze przykomorowym wzgórza (PVN), jądrze nadwzrokowym i jądrach dodatkowych podwzgórza (Lipari i in., 1995). U szczurów, syntetyzowanie OXY zaczyna się w drugim dniu życia postnatalnego. Największy wzrost ekspresji receptorów OXY występuje podczas wczesnego rozwoju kory, w okresie krytycznym dla ustalania reprezentacji sensorycznych (Lipari i in., 2001). OXY jest neuroprzekaźnikiem, a projekcje neuronów oksytocynowych oraz jej receptory są obecne w innych regionach mózgu (Knobloch i in., 2012). Badania potwierdzają jej zaangażowanie w wiele zachowań społecznych (Insel i Shapiro, 1992; Nishimori i in., 1996; Ferguson i in., 2001; Insel i Young, 2001; Rilling i Young, 2014; Mitre i in., 2018), zwiazek z przetwarzaniem ale także iei bodźców świadczących o niebezpieczeństwie (Yoshida i in., 2009; Knobloch i in., 2012; Lahoud i Maroun, 2013; Guzmán i in., 2014; Hasan i in., 2019).

Dootrzewnowe podanie OXY u szczurów wzmaga zachowania społeczne takie jak leżenie blisko siebie (ang. adjacent lying), a także wpływa na identyfikacje społeczną (ang. social recognition, Sanchez-Andrade i Kendrick, 2009; Ramos i in., 2013). Iniekcja OXY powodowała również intensyfikacje zachowań typowych dla matek polegających na odnoszeniu młodych do gniazda (ang. maternal pup retrieval) u szczurzyc nie będących matkami (Marlin i in., 2015). OXY powoduje też wzmacnianie wspomnień związanych ze społecznymi, awersyjnymi zdarzeniami (Guzmán i in., 2013a). Szczury, genetycznie zmodyfikowane tak, by wyrażać więcej receptorów OXY wykazywały większą reakcję strachu podczas prezentacji wcześniej uwarunkowanego bodźca społecznego (Guzmán i in., 2013b). Ferretti i in. (2019) zaobserwowali, że selektywne, chemogenetyczne zahamowanie projekcji neuronów OXY z PVN do CeA zaburzyło rozróżnianie emocji u myszy, co wyrażało się spadkiem emocjonalnie osobnikiem. sam zainteresowania pobudzonym Taki efekt zaobserwowano w innym doświadczeniu, u myszy z delecją dysbindyny-1 wiążącą się ze zmniejszoną ekspresją receptorów dla OXY w CeA (ale nie w części podstawnobocznej czy przyśrodkowej ciała migdałowatego). Infuzja rekombinowanego wirusa do CeA powodującego wzrost ekspresji receptorów dla OXY u tych myszy spowodowała natomiast odzyskanie zdolności rozróżniania emocji w zastosowanym w tej pracy teście. Wg. Rogers-Carter i in. (2018) ekspozycja na zestresowanego osobnika wywołuje uwolnienie OXY w korze wyspy, która poprzez modulacje projekcji wyjściowych, skutkuje podchodzeniem do lub unikaniem innych osobników w zależności od ich wieku. Wyjścia z wyspy do ciała prążkowanego brzusznego lub kory przedczołowej promowały interakcję z zestresowanymi młodszymi osobnikami, zaś do części podstawno-bocznej ciała migdałowatego promowały unikanie starszych osobników (Rogers-Carter i in., 2018). W korze OXY moduluje transmisję synaptyczną i formuje plastyczność związaną z zachowaniami opiekuńczymi i identyfikacją społeczną (Marlin i in., 2015; Mitre i in., 2016). U ludzi OXY, m.in., wzmaga empatię (Hurlemann i in., 2010), a także wyostrza rozróżnienie między sobą a innymi (Colonnello i in., 2013). Fischer-Shofty i in. (2010) zaobserwowali, że po podaniu donosowym OXY uczestnicy badania wykazywali większą zdolność do rozpoznawania emocji strachu na prezentowanych twarzach, w porównaniu do kontroli otrzymującej placebo. Podsumowując, OXY może wzmagać eksplorację lub unikanie bodźców społecznych, a także powodować wyostrzenie uwagi w ich kierunku (Theodoridou i in., 2013).

Dotychczasowe badania wiązały OXY przede wszystkim z zachowaniami społecznymi. Jednak niedawne doniesienia wskazują na zaangażowanie obwodów OXY w CeA również w ekspresję i wygaszanie warunkowego strachu. Stwierdzono na przykład, że donosowe podanie OXY powoduje redukcję strachu, prawdopodobnie poprzez blokowanie aktywności ciała migdałowatego (Kirsch i in., 2005). Wykazano, że OXY moduluje strach i lęk, ale nie wyzwala albo nie blokuje ich bezpośrednio (Guzmán i in., 2013a). Wg badań Knobloch i in. (2012) uwalnianie OXY w CeA redukuje reakcję zamierania u zwierząt poprzez aktywowanie lokalnego GABA-ergicznego obwodu w CeL, który hamuje neurony wysyłające projekcje z CeM do innych struktur. Ponadto, wykazano, że 13% z tych neuronów jest aktywnych podczas reakcji strachu i odgrywa kluczową rolę w jej wygaszaniu (Hasan i in., 2019). Podczas reakcji strachu subpopulacja ta wykazuje też zwiększoną transmisję glutaminergiczną do CeM.

Podsumowując, przytoczone badania wskazują, że OXY nie jest specyficznie związana z przetwarzaniem bodźców społecznych, a raczej może być zaangażowana w przetwarzanie i interpretację rozmaitych bodźców sensorycznych. Nie można natomiast wykluczyć potencjalnej specyficzności na poziomie poszczególnych obwodów neuronalnych. Można też stwierdzić, na podstawie przywołanych powyżej prac, że OXY jest związana z ekspresją i pamięcią reakcji strachu, jak również z interpretacją napływających bodźców i uczeniem się nowych zachowań poprzez obwody w CeA (Knobloch i in., 2012), jak również z oceną walencji bodźców społecznych na poziomie ciała migdałowatego (Ferretti i in., 2019) oraz kory wyspy (Rogers-Carter i in., 2018). W świetle tych informacji, postanowiono zbadać rolę OXY w społecznym transferze strachu. Postawiono hipotezę, że OXY moduluje transfer strachu poprzez obniżenie poziomu lęku u obserwatora, a także wzmaga uwagę obserwatora wobec społecznych bodźców takich jak: pobudzenie motoryczne demonstratora, feromony alarmowe oraz wokalizacje.

4.6. Neurony wyrażające czynnik uwalniający kortykotropinę (CRF) w CeA

Czynnik uwalniający kortykotropinę (CRF, ang. corticotropin releasing factor) to neuropeptyd i hormon związany z odpowiedzią organizmu na stres. Stymuluje on przysadkę do uwalniania hormonu adrenokortykotropowego, stanowiąc część osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA, ang. hypothalamus-pituitary-adrenal axis). Pod wpływem czynników stresowych, CRF jest wydzielany przez jądro przykomorowe (PVN, ang. paraventricular nucleus). Jego uwalnianie następuje również w innych strukturach mózgu, m. in., w CeA. Wykazano, że subpopulacja neuronów CRF w CeA odgrywa kluczową rolę w uczeniu się i ekspresji pasywnych i aktywnych strategii radzenia sobie z zagrożeniem (McCall i in., 2015; Fadok i in., 2017; Sanford i in., 2017; Asok i in., 2018; Evans i in., 2018). Uczenie się reakcji strachu jest związane z zależnym od aktywności wzmocnieniem projekcji z jądra podstawno-bocznego ciała migdałowatego na neurony CRF-/SOM+ w CeL, natomiast wygaszanie pamięci strachu wymaga wzmocnienia projekcji na neurony CRF+ (Hartley i in., 2019). Manipulacja optogenetyczna aktywnością neuronów CRF w CeA pokazała, że sa one odpowiedzialne za wzbudzanie aktywności motorycznej w odpowiedzi na zagrożenie, np. ucieczki w paradygmacie aktywnego unikania podczas prezentacji bodźca warunkowego. Efekt ten jest związany z hamowaniem subpopulacji SOM+ (Fadok i in., 2017). Kiedy zagrożenie jest bliskie, neurony CRF inicjują aktywne strategie mające na celu uniknięcie zagrożenia (Evans i in., 2018), a gdy zagrożenie jest odległe promują one aktywną eksplorację (Kim i in., 2017). U zwierząt nie poddanych treningom awersyjnym aktywność neuronów CRF+ promuje zachowania apetytywne, np.

eksplorację środowiska w poszukiwaniu pożywienia (Kim i in., 2017; Hartley i in., 2019).

Podsumowując, neurony CRF w CeA pośredniczą w promowaniu aktywnej eksploracji środowiska zależnej od kontekstu i uprzedniego doświadczenia osobnika oraz wpływają na uczenie się reakcji strachu. Podczas społecznego transferu strachu obserwuje się pobudzenie motoryczne i występowanie zachowań oceniających ryzyko, zaś następnego dnia, w teście warunkowania strachu, obserwuje się szybsze nabywanie reakcji strachu, co mogłoby wskazywać na zaangażowanie subpopulacji CRF+ w CeA w zarażanie emocjonalne. W związku z tym jednym z celów tej pracy było scharakteryzowanie subpopulacji aktywowanej przez społeczny transfer strachu w CeA w kierunku zaangażowania neuronów CRF+.

4.7. Obwody neuronalne współdzielone przez bodźce o charakterze społecznym i niespołecznym

Wydaje się, że przynajmniej częściowo, bodźce społeczne są przetwarzane przez te same obwody neuronalne co bodźce o charakterze niespołecznym (Olsson i in., 2020). U ludzi obszarami najczęściej badanymi w kontekście odpowiedzi na emocje innych są przednia kora zakrętu obręczy (ang. anterior cingulate cortex, ACC, Singer i in., 2004; Lavin i in., 2013; Lockwood, 2016) oraz kora wyspy (ang. insula lub insular cortex, INS, Wicker i in., 2003; Singer i in., 2004; Lamm i Singer, 2010; Kanel i in., 2019; Li i in., 2020). Badania prowadzone na gryzoniach przyniosły podobne rezultaty dla tych obszarów mózgu. U szczurów czasowa dezaktywacja ACC blokuje możliwość odbierania informacji od partnera. Zaburzenie to ma również zwrotny wpływ na partnera, który nie został poddany farmakologicznemu blokowaniu ACC (Han i in., 2019). Duża część neuronów w ACC reaguje zarówno podczas bezpośredniego przeżywania bólu, jak i podczas obserwacji reakcji na szok innego osobnika (Carrillo i in., 2019), co sugeruje mechanizm współdzielenia stanów emocjonalnych przez szczury. Stwierdzono również, że w modelu obserwacyjnego uczenia się strachu, obserwator uczy się asocjacji pomiędzy bodźcem warunkowym a reakcją na szok demonstratora (Twining i in., 2017). Natomiast w modelu społecznego transferu strachu interakcja z pobudzonym emocjonalnie partnerem ułatwia późniejsze nabywanie reakcji strachu (Knapska i in., 2010). Ponadto dane uzyskane przez Han i in. (2019) sugerują, że uprzednie warunkowanie strachu u obserwatorów powoduje u nich dodatkowe wzmocnienie reakcji zamierania podczas obserwacyjnego uczenia się reakcji strachu, a efekt ten jest specyficzny w stosunku do zastosowanego treningu. Przytoczone powyżej dane sugerują, że bezpośrednie i społeczne warunkowanie strachu oparte jest, przynajmniej częściowo, o te same obwody neuronalne.

Kora wyspy, a szczególnie jej przednia część (AI, ang. anterior insula), bierze udział w procesach związanych z przetwarzaniem stanu wewnętrznego własnego organizmu oraz interpretacją stanu innych osób, związanego z empatią (Lamm i Singer, 2010). W szczególności zaobserwowano większą aktywację kory wyspy u osób uzyskujących wyższy wynik w teście Daviesa, oceniającym poziom empatii badanych (Jabbi i in., 2007). Udział kory wyspowej jest też często wymieniany w kontekście badań nad współdzielonymi obwodami u ludzi (Keysers i Gazzola, 2009, 2010; Keysers i in., 2018). Aktywacja kory wyspowej podczas obserwacji twarzy innych osób przeżywających odczucia takie jak wstręt, przyjemność, ale także ból pojawia się w tych samych obszarach, które wiążą się z osobistym doświadczeniem obserwatora (Jabbi i in., 2007; Lindström i in., 2018). U szczurów, Rogers-Carter i in. (2018) hamując optogenetycznie korę wyspy, zaobserwowali obniżoną preferenecję do wchodzenia w interakcję z zestresowanymi młodszymi osobnikami oraz odwracenie wzorca interakcji ze starszymi osobnikami - testowane zwierzęta przestawały ich unikać. Kora wyspy jest więc prawdopodobnie związana z oceną walencji bodźców społecznych, podobnie jak ma to miejsce w przypadku bodźców niespołecznych.

Stworzenie mapy połączeń aktywnych podczas społecznego transferu strachu, w szczególności połączeń z ACC i INS, może dać wgląd w charakter tego rodzaju interakcji społecznej i stanowić podstawę do dalszego, funkcjonalnego badania roli tych połączeń. Mapowanie takie umożliwia też porównanie aktywacji mózgu przez bodziec społeczny świadczący o zagrożeniu z dostępnymi w literaturze doniesieniami o przetwarzaniu awersyjnych bodźców niespołecznych. Dlatego w niniejszej pracy postanowiono opisać połączenia funkcjonalne CeA aktywowane przez strach przekazywany społecznie.

4.8. Zarażanie emocjonalne a zjawisko empatii

Życie w grupie społecznej pojawiło się w ewolucji w wielu taksonach, przejawiając różne poziomy złożoności. Z perspektywy przetrwania i adaptacji do środowiska jest to zjawisko korzystne i wpłynęło na rozwinięcie rozmaitych

mechanizmów odpowiedzialnych za przetwarzanie stanów emocjonalnych członków stada. Zachowania prosopołeczne u ludzi wiązane są ze zdolnością odczuwania stanów psychicznych innych osób - empatią emocjonalną (Decety i in., 2016). Niektóre badania sugerują, że zdolność do współdzielenia stanu emocjonalnego przez gryzonie (Church, 1959; Bartal i in., 2011) i szympansy (Wechkin i in., 1964) są warunkiem okazania pomocy osobnikowi, który przeżywa dyskomfort. Obserwacje te wspierają hipotezę o wspólnym pochodzeniu filogenetycznym zjawiska empatii (de Waal i Preston, 2017) i umieszczają zarażanie emocjonalne w hierarchii rozwoju pomiędzy automatyczną mimikrą a empatią poznawczą.

Stephanie Preston i Frans de Waal zaproponowali model teoretyczny, który opiera się na mechanizmie bezpośredniego mapowania stanu behawioralnego innego osobnika na własne reprezentacje tego stanu (Preston i de Waal, 2002). Mechanizm ten nosi nazwę PAM (ang. Perception-Action Mechanism) i stanowi rdzeń dla wyższych warstw modelu, prowadzących do empatii opartej na procesach kognitywnych. Model ten (zwany też modelem matrioszki, Ryc. 2) składa się z trzech warstw. Najbardziej wewnętrzna z warstw obejmuje zarażanie emocjonalne i automatyczną mimikrę (synchronizację mimiki, wokalizacji, pozycji ciała i ruchów pomiędzy osobnikami). Mimikra może pomóc obserwatorowi w prawidłowym przypisaniu walencji emocji jakie przeżywa demonstrator, jednakże nie jest wystarczająca do ich pełnego współdzielenia (Laird, 1974). Zarażenie emocjonalne jest więc tu wyższą konstrukcją emocjonalną, która może być związana z różnymi rodzajami mimikry i może prowadzić do bardziej skomplikowanych procesów empatycznych. Najbardziej zewnętrzną i zaawansowana warstwe proponowanego modelu stanowi empatia poznawcza (Preston i de Waal, 2002). Model PAM zakłada, że zarażanie emocjonalne nie podlega kontroli. Badania pokazują jednak, że czynniki takie jak kontekst społeczny mają wpływ na występowanie tego zjawiska (Hess i Fischer, 2013; Gonzalez-Liencres i in., 2014). U ludzi umiejętność przejmowania perspektywy rozwija się po czwartym roku życia, co sugeruje, że empatia nie jest wyłącznie wrodzoną zdolnością, a niektóre jej elementy rozwijają się w późniejszym życiu prawdopodobnie poprzez uczenie się, na podstawie interakcji ze środowiskiem społecznym (Adolphs, 2001; Lane i in., 2010; Fadda i in., 2016). W oparciu o mimikrę dziecko nieustannie uczy się nowych skojarzeń i rozwija zdolności społeczne. Towarzyszy temu dojrzewanie obszarów przedczołowych i zwiększona gęstość połączeń nerwowych w przedniej części zakrętu obręczy (Gogtay i in., 2004). Gdy mózg dojrzewa, zgromadzona wiedza zaczyna służyć jako wskaźnik do dalszych działań. Natomiast w wieku dorosłym mimikra może już nie brać udziału w uczeniu obserwacyjnym i pełnić raczej funkcję afiliacyjną (Lakin i Chartrand, 2003). W okresie niemowlęcym mimikra najprawdopodobniej stanowi więc formę komunikacji emocjonalnej i jest prekursorem rozwoju wyższych zdolności poznawczych, w tym empatii.

Podsumowując, mózg najprawdopodobniej posiada wrodzone mechanizmy sprzyjające wystąpieniu zjawiska automatyczna mimikry, które stanowią podstawy dla rozwoju zarażania emocjonalnego. Następnie, przejęty stan emocjonalny zostaje przetworzony przy pomocy narzędzi poznawczych. Wciąż jednak nie jest jasne jak te procesy przebiegają na poziomie mózgowym. Wiele ostatnich doniesień na temat zachowań prospołecznych u gryzoni stanowi impuls do przypisywania zwierzętom wyższych motywacji (Ben-Ami Bartal i in., 2011; Panksepp i Panksepp, 2013; de Waal i Preston, 2017), jednakże dla pełnego zrozumienia opisywanych zjawisk nieodzowne jest poznanie neuronalnego mechanizmu zarażania emocjonalnego, stanowiącego podstawę rozwoju wyższych form empatii.



Rycina 2. Teoretyczny Model Empatii PAM (ang. *Perception-Action Mechanism*; za de Waal, 2008; de Waal i Preston, 2017)

5. Cele pracy

Głównym celem tej pracy było zbadanie funkcji obwodów neuronalnych jądra środkowego ciała migdałowatego (CeA) zaangażowanych w społeczny transfer strachu. Sformułowano następujące cele szczegółowe:

- 1. Zbadanie na ile subpopulacja neuronów c-Fos pozytywnych w CeA wzbudzana przez społeczny transfer strachu jest tożsama z populacją pobudzaną przez bezpośrednie warunkowanie strachu.
- 2. Zbadanie funkcji neuronów c-Fos pozytywnych w CeA, w znanych warunkach, w obecności partnera, jak też podczas eksploracji nowego środowiska.
- 3. Zbadanie czy i w jaki sposób uwalnianie oksytocyny (OXY) w CeA moduluje społeczny transfer strachu.
- 4. Scharakteryzowanie funkcjonalnych połączeń neuronów w CeA aktywowanych przez społeczny transfer strachu.

6. Materiały i metody

6.1. Opis wykorzystanych zwierząt

W eksperymentach wykorzystano samce szczura szczepu Wistar stada Cmdb:Wi z hodowli Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku w wieku od 4 do 6 miesięcy oraz szczury transgeniczne PSD-95:Venus w wieku od 4 do 6 miesięcy, których hodowla prowadzona była w zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej w Warszawie. U zwierząt PSD-95:Venus ekspresja konstruktu jest kontrolowana przez zmodyfikowany promotor genu *c-fos* i widoczna tylko w pobudzonych neuronach. Sekwencje 3'UTR Arc oraz PSD-95 powodują, że konstrukt jest obecny w ciele komórki i dendrytach w okolicy zakończeń synaptycznych, a białko reporterowe Venus umożliwia zlokalizowanie aktywowanych komórek (szczegóły opisano w Knapska i in., 2012).

Zwierzęta zostały losowo dobrane w pary, a następnie umieszczone w standardowych klatkach domowych (59,5 x 38 x 20 cm), gdzie były trzymane do końca eksperymentu w cyklu 12 godzin światła i 12 godzin ciemności, ze stałym dostępem do wody oraz pożywienia. Szczury były przyzwyczajane do obecności i dotyku eksperymentatora przez 14 dni. W każdej parze jeden ze szczurów został losowo oznaczony jako demonstrator, a drugi jako obserwator. Wszystkie doświadczenia z wykorzystaniem zwierząt zostały przeprowadzone zgodnie z regulacjami i za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie.

6.2. Testy behavioralne

6.2.1. Sprzęt wykorzystany do przeprowadzenia doświadczeń behawioralnych

Klatki do warunkowania strachu. Warunkowanie strachu szczurów - demonstratorów było przeprowadzane w klatkach do warunkowania strachu 51 cm (długość) \times 25 cm (szerokość) \times 24 cm (wysokość) firmy Panlab podzielonych na dwa przedziały odseparowane perforowaną metalową ścianą. Ściany boczne i tylne zostały wykonane

z nieprzezroczystego czarnego pleksiglasu, a drzwi umieszczone na froncie klatki zostały wykonane z półprzezroczystego pleksiglasu. Sufit wykonano z aluminium. Na górze, nad każdym z przedziałów znajdowały się dodatkowe zamykane drzwiczki wykonane również z pleksiglasu. W obydwu komorach znajdowała się podłoga wykonana z 18 metalowych prętów (3 mm średnicy). Podłoga była podłączona do generatora prądu (Panlab), który dostarczał bodziec bezwarunkowy (ang. *unconditioned stimulus*, US) w postaci szoku elektrycznego (0,9-1 mA) podczas warunkowania. Bodziec ten był kalibrowany przed procedurą doświadczalną. Wnętrze klatki oraz podłoga były czyszczone roztworem detergentu pomiędzy procedurami (tj. pomiędzy każdą parą zwierząt). Klatka do warunkowania strachu była kontrolowana przez oprogramowanie SHUTAVOID (Panlab).

Aparat do badania interakcji społecznej. Interakcja społeczna między szczurami była badana w pomieszczeniu sąsiadującym z tym, w którym warunkowano strach. Pomieszczenia były odizolowane od siebie tak aby oczekujący obserwator nie słyszał wokalizacji demonstratora w czasie warunkowania strachu. Klatki domowe były umieszczane w białej obudowie (42 x 62,5 x 44 cm) zbudowanej z drewna, zapobiegającej ucieczce zwierząt. Interakcja rejestrowana była za pomocą kamery umieszczonej około 120 cm nad klatką domową oraz programu WinTV (wersja v6, Hauppauge) zapisującym pliki o formacie *.mpg.

Aparat do badania eksploracji. Test eksploracji został przeprowadzony w klatce o wymiarach 100 cm (szerokość) x 100 cm (długość) x 40 cm (wysokość) wykonanym z szarej sklejki. W jednym rogu znajdował się sferycznie oświetlony obszar o średnicy około 50 cm nad którym zawieszono lampkę stanowiącą źródło światła. Światłomierz umieszczony w tak oświetlonym obszarze wskazywał średnio 635 lx. W drugim rogu znajdowała się kryjówka zbudowana z 3 szarych ścianek wykonanych ze sklejki, na planie prostokąta (10cm x 15 cm) przymocowanych do pomalowanej na szaro płytki. Światło w pomieszczeniu było przygaszone (ok. 40 lx). Schemat aparatu znajduj się na **Ryc. 3**.



Rycina 3. Schemat aparatu wykorzystywanego w teście eksploracji. W pomieszczeniu eksperymentalnym panował półmrok, w lewym górnym rogu aparatu umieszczono ścianki schronienia, stanowiącego punkt startowy testu. W prawym dolnym rogu umieszczono źródło światła (żółte koło), oświetlające sferyczny obszar, oznaczony na schemacie linią przerywaną.

6.2.2. Przygotowanie zwierząt do doświadczeń

Dorosłe samce były hodowane w parach od momentu dostarczenia do zwierzętarni IBD, a każde zwierzę z pary było losowo oznaczane jako "demonstrator" lub "obserwator" . Po kilku dniach aklimatyzacji zwierząt w nowym miejscu, rozpoczynano serię sesji przyzwyczajania (habituacji) do obecności i dotyku eksperymentatora, trwających ok. 5 min dla każdej pary, codziennie przez 14 dni. W kolejnych 3 dniach zwierzęta przyzwyczajano do transportu, przebywania w pokoju eksperymentalnym oraz do 10 minutowych separacji, które również odbywały się

w pokoju eksperymentalnym. W sesji 10 minutowej separacji demonstrator przenoszony był do czystej, pojedynczej klatki ze świeżą ściółką. W tym czasie obserwator przebywał w klatce domowej, z której usunięto pokrywę i którą umieszczono w obudowie zapobiegającej ucieczkom. Po 10 minutach demonstrator wracał do obserwatora, klatka była wysuwana z obudowy, przykrywana i transportowana z powrotem do pokoju hodowlanego.

6.2.3. Społeczny transfer strachu

W celu przeprowadzenia doświadczenia obserwator i demonstrator byli przenoszeni w klatce domowej z pokoju hodowlanego w zwierzętarni do pokoju doświadczalnego. Następnie demonstrator był wyjmowany z klatki domowej i w osobnym pomieszczeniu poddawany warunkowaniu strachu lub, w przypadku grupy kontrolnej, przenoszony do nowej, osobnej klatki, tak jak podczas habituacji do separacji. Natychmiast po zakończeniu treningu był on wkładany z powrotem do klatki domowej, gdzie dochodziło do społecznego transferu strachu, lub, w przypadku grupy kontrolnej, miała miejsce interakcja po separacji. Po 10-12 min. od powrotu demonstratora do klatki domowej, w zależności od doświadczenia, zwierzęta były transportowane do zwierzętarni lub jedno zwierzę z pary było poddawane kolejnym testom behawioralnym. Zachowania analizowane podczas interakcji społecznej wymieniono w **Tab. 1**.

6.2.4. Kontekstowe warunkowanie strachu u demonstratorów

W dniu eksperymentu demonstratorzy umieszczani byli w klatkach do klasycznego warunkowania strachu (Panlab), gdzie po 1 minucie ekspozycji na otoczenie klatki, następowało podanie 10 bodźców bezwarunkowych (US) w postaci szoku elektrycznego (1s, 0,9-1mA) w równych odstępach czasowych trwających 59 sekund. W minutę po podaniu ostatniego bodźca demonstrator wyjmowany był z klatki do warunkowania i natychmiast przekładany do klatki domowej. Ściany i podłoga klatki były dokładnie myte roztworem detergentu, osuszane bawełnianym, czystym ręcznikiem oraz regularnie wietrzone między testami.

6.2.5. Test eksploracji

Podczas eksperymentów optogenetycznych test eksploracji następował około 24 godz. po zainicjowaniu ekspresji i wbudowywania w błony komórkowe neuronów konstruktu c-fos-ChR2 (szczegóły w rozdz. 6.4.), którego ekspresja była wzbudzana poprzez społeczny transfer strachu lub, w przypadku grupy kontrolnej, interakcję po krótkiej separacji. Testy powyższe prowadzone były na szczurach - obserwatorach. W przypadku testów badających efektywność transferu strachu u szczurów demonstratorów (w doświadczeniu badającym wpływ OXY w CeA, szczegóły w rozdz. 6.6.) test następował natychmiast po 12 minutowej interakcji społecznej (transferze strachu lub kontrolnej interakcji). Test eksploracji polegał na umieszczeniu badanego szczura w opisanym wcześniej aparacie zaprojektowanym do badania zachowań o charakterze oceny ryzyka. W punkcie startowym szczur umieszczany był za ścianką schronienia, umieszczonego w zacienionym obszarze eksperymentalnym. W grupie obserwatorów stymulowanych optogenetycznie, zwierzę miało 12 minut (cztery 3minutowe okresy, zaczynające się u połowy zwierząt od okresu ON, a u połowy od okresu OFF) na eksplorację obszaru eksperymentalnego. W przypadku testowania demonstratorów szczur również zaczynał test od umieszczenia za ścianą schronienia i na eksplorację otoczenia miał 6 minut. W analizie behawioralnej testu brane były pod uwagę zachowania wymienione w Tab. 2. Aparat był dokładnie czyszczony pomiędzy kolejnymi testami za pomocą 70% roztworu alkoholu etylowego, a pomieszczenie było wietrzone.

Tabela 1. Lista zachowań analizowanych podczas interakcji społecznej.

Nazwa zachowania	Opis
Czyszczenie (ang. allogrooming)	Czyszczenie sierści drugiego osobnika
Eksploracja klatki (ang. cage exploration)	Eksplorowanie podłoża i ścian klatki
Przeczołgiwanie się (ang. crawling)	Przeczołgiwanie się pod drugim osobnikiem
Przekopywanie (ang. digging)	Przekopywanie ściółki
Podążanie (ang. <i>following</i>)	Podążanie za drugim osobnikiem
Mijanie (ang. <i>passing by</i>)	Przechodzenie obok drugiego osobnika nakierowane na kontakt (w okolicach brzusznych)
Zachowanie prospołeczne (ang. pro-social)	Pozytywny odbiór zachowań społecznych drugiego osobnika (np. pozwolenie na czyszczenie sierści przez innego szczura)
Stójki (ang. <i>rearing</i>)	Eksploracja otoczenia poprzez stawanie na tylnych łapach (tzw. stójki)
Czyszczenie się (ang. self-grooming)	Czyszczenie własnego ciała
Obwąchiwanie okolic odbytowo- genitalnych (ang. <i>anogenital sniffing</i>)	Obwąchiwanie okolic odbytowo- genitalnych drugiego osobnika
Obwąchiwanie okolic głowy (ang. head sniffing)	Obwąchiwanie okolic głowy drugiego osobnika.

Tabela 2. Lista zachowań analizowanych w teście eksploracji.

Nazwa zachowania	Opis
Eksploracja aparatu (ang. <i>field exploration</i>)	Przemieszczanie się po aparacie
Ucieczka (ang. run)	Ucieczka od światła w stronę kryjówki
Unikanie (ang. <i>evade</i>)	Czas spędzony w kryjówce
Stójki (ang. <i>rearing</i>)	Eksploracja otoczenia poprzez stawanie na tylnych łapach (tzw. stójki)
Bezruch (ang. quiescence)	Tkwienie w bezruchu poza obszarem kryjówki

6.2.6. Analiza komputerowa uzyskanych danych behawioralnych

Nagrania wideo ze wszystkich interakcji społecznych przeanalizowano w programie BehaView (wersja 0.0.16; Paweł Boguszewski, dostępny w Internecie: http://www.pmbogusz.net/?a=behaview) z identyfikacją wybranych zachowań badanych szczurów - obserwatorów (Tab. 1; Knapska i in., 2006; Mikosz i in., 2015). W programie tym analizowano również zachowania zwierząt podczas testu eksploracyjnego (Tab. 2). Program pozwolił uzyskać liczbę epizodów oraz czas trwania każdego zachowania. Osoba przeprowadzająca analizę nie znała przynależności zwierząt do grup doświadczalnych.

6.3. Analizy immunohistochemiczne

6.3.1. Przygotowanie tkanki mózgowej

W 90 minut do 2 godzin od zakończenia testu behawioralnego, szczurom podawano śmiertelną dawkę morbitalu (133,3 mg/ml pentobarbitalu sodu, 26,7 mg/ml pentobarbitalu) rozcieńczonego 10 razy roztworem soli fizjologicznej (0,95 % NaCl, Polpharma). W kolejnym kroku wykonywano perfuzję umieszczając w lewej komorze serca igłę (1,8×25,0 Mifam, ze stępionym
końcem) oraz rozcinano prawy przedsionek. Następnie wpompowywano 200-250 ml 0,1 M zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej (ang. *phosphate buffered saline*, PBS, Sigma), a następnie 200-250 ml 4% roztworu paraformaldehydu (PFA, POCH) o pH = 7,4. Otrzymane mózgi pozostawiano na noc w 4% roztworze PFA (4°C), a przez kolejne 4-7 dni przetrzymywano w 30% roztworze sacharozy (Sigma lub BioShop) w PBS (4°C). By uzyskać materiał do barwienia immunohistochemicznego mózgi były przytwierdzane bezpośrednio do stolika do krojenia przy użyciu medium do mrożenia tkanek (Leica) i zamrażane (30 min, - 20°C), a później cięte z użyciem kriostatu (kriostat żyletkowy Leica CM 1859, Leica) na skrawki w płaszczyźnie koronalnej, każdy o grubości 40 μm. Tkankę do analiz przechowywano w roztworze krioprotekcyjnym w -20°C, w plastikowej płytce 12-dołkowej (Orange Scientific) w taki sposób, by w każdym dołku znajdowało się po kilka skrawków.

6.3.2. Immunohistochemiczna detekcja ekspresji białka c-Fos

Wybrane skrawki płukano w roztworze PBS (ang. phosphate buffered saline). W kolejnym kroku inkubowano je w 0,3% roztworze nadtlenku wodoru (H₂O₂, Sigma; 10 min, w temperaturze pokojowej) w PBS (10 min, w temperaturze pokojowej). Następnie skrawki inkubowano w 10% NGS w PBS (1 h, w temperaturze pokojowej). Przez 2 dni, inkubowano skrawki z przeciwciałem pierwszorzędowym wykrywającym białko c-Fos (przeciwciało królicze, ABE-457, Millipore; rozcieńczenie 1:1000) w roztworze 1% NGS w PBST, w temperaturze 4°C. Trzeciego dnia skrawki płukano w roztworze PBST, po czym inkubowano je w roztworze przeciwciała wykrywającego białka królicze, skoniugowanego z biotyną (przeciwciało kozie, BA-1000, Vector Laboratories; rozcieńczenie 1:1000) w PBS. W następnej kolejności tkankę płukano 0,3% roztworem PBST i inkubowano w roztworze ABC (zestaw ABC-HRP, PK-4000, Vector Laboratories; 1 godz., w temperaturze pokojowej). Skrawki ponownie płukano w PBS (3 razy 10 min, w temperaturze pokojowej) oraz barwiono w roztworze diaminobenzydyny i mocznika z zestawu Sigmafast (ang. diaminobenzidine, DAB, D4293). Po dokładnym wypłukaniu w PBS, skrawki barwiono przy pomocy zestawu VIP Peroxidase (HRP) Substrate (Vector Laboratories, SK-4600).

6.3.3. Immunohistochemiczna detekcja ekspresji białek c-Fos i Venus

Wybrane skrawki płukano w roztworze PBS. Następnie inkubowano je w 0,3% roztworze nadtlenku wodoru (H₂O₂, Sigma; 10 min, w temperaturze pokojowej) w PBS (10 min, w temperaturze pokojowej). W kolejnym kroku skrawki inkubowano w 10% NGS w PBS (1 h, w temperaturze pokojowej). Następnie, przez 4 dni, inkubowano skrawki z przeciwciałem pierwszorzędowym wykrywającym białko c-Fos (przeciwciało królicze, ABE-457, Millipore; rozcieńczenie 1:1000) oraz z przeciwciałem pierwszorzędowym wykrywającym białko GFP (ang. green fluorescent protein, przeciwciało mysie, MAB3580, Millipore; rozcieńczenie 1:500) w roztworze 1% NGS w PBST, w temperaturze 4°C. Piątego dnia skrawki dokładnie płukano w roztworze PBST, po czym inkubowano je w roztworze przeciwciała wykrywającego białka królicze, skoniugowanego z biotyną (przeciwciało kozie, BA-1000, Vector Laboratories; rozcieńczenie 1:1000) w PBS. Następnie tkankę płukano 0,3% roztworem PBST i inkubowano w roztworze ABC (zestaw ABC-HRP, PK-4000, Vector Laboratories; 1 godz., w temperaturze pokojowej). Skrawki ponownie płukano w PBS (3 razy 10 min, w temperaturze pokojowej) oraz barwiono w roztworze diaminobenzydyny i mocznika z zestawu Sigmafast (ang. diaminobenzidine, DAB, D4293). Po dokładnym płukaniu w PBS, skrawki inkubowano w roztworze przeciwciała wykrywającego białka mysie, skoniugowanego z biotyną (przeciwciało mysie, BA-9020, Vector Laboratories; rozcieńczenie 1:500). Następnie skrawki płukano w PBST i inkubowano w roztworze ABC (zestaw ABC-HRP, PK-4000, Vector Laboratories; 1 godz., w temperaturze pokojowej). Po wypłukaniu w PBS, skrawki barwiono przy pomocy zestawu VIP Peroxidase (HRP) Substrate (Vector Laboratories, SK-4600).

6.3.4. Immunohistochemiczna detekcja ekspresji białek c-Fos i OXY

Wybrane skrawki płukano w roztworze PBS. Następnie inkubowano je w 0,3% roztworze nadtlenku wodoru (H₂O₂, Sigma) w PBS (10 min, w temperaturze pokojowej). W dalszej kolejności skrawki blokowano w 10% NGS w PBS (1 h, w temperaturze pokojowej). Następnie przez 4 kolejne dni inkubowano skrawki z przeciwciałem pierwszorzędowym wykrywającym białko c-Fos (przeciwciało królicze, sc-52, SantaCruz; rozcieńczenie 1:1000) oraz z przeciwciałem pierwszorzędowym wykrywającym OXY (przeciwciało mysie, MAB5296, Millipore; rozcieńczenie 1:1000) w PBS, inkubację prowadzono w 4°C. Piątego dnia skrawki dokładnie przepłukano w roztworze PBST, po czym w roztworze przeciwciała wykrywającego inkubowano białka królicze, skoniugowanego z biotyną (przeciwciało kozie, BA-1000, Vector Laboratories; rozcieńczenie 1:1000) w PBS. Następnie tkankę płukano w PBST i inkubowano w roztworze ABC (zestaw ABC-HRP, PK-4000, Vector Laboratories) przez 1 h, w temperaturze pokojowej. Skrawki ponownie płukano w PBS, po czym barwiono w roztworze diaminobenzydyny i mocznika z zestawu Sigmafast (ang. diaminobenzidine, DAB, D4293). Po dokładnym płukaniu w PBS, skrawki inkubowano w roztworze przeciwciała wykrywajacego białka kurze. skoniugowanego z biotyną (przeciwciało kozie, BA-9010, Vector Laboratories; rozcieńczenie 1:500). Następnie skrawki płukano w PBST i inkubowano w roztworze ABC (zastaw ABC-HRP, PK-4000, Vector Laboratories) przez 1 h, w temperaturze pokojowej. Po wypłukaniu w PBS, skrawki barwiono przy pomocy zestawu VIP Peroxidase (HRP) Substrate (Vector Laboratories, SK-4600).

6.3.5. Immunohistochemiczna detekcja ekspresji białek c-Fos i CRF

Wybrane skrawki płukano w roztworze PBS i inkubowano w 0,3% roztworze nadtlenku wodoru (H₂O₂, Sigma) w PBS (10 min, w temperaturze pokojowej). Następnie skrawki inkubowano w 10% NGS w PBS (1 h, w temperaturze pokojowej). W kolejnym kroku skrawki inkubowano przez 4 dni z przeciwciałem pierwszorzędowym wykrywającym białko c-Fos (przeciwciało królicze, sc-52, SantaCruz; rozcieńczenie 1:1000) oraz z przeciwciałem pierwszorzędowym wykrywającego białko CRF (ang. *Corticotropin Releasing Factor*, przeciwciało kurze, AB80360, ABCAM; rozcieńczenie 1:500), prowadzoną w 4°C. Piątego dnia skrawki dokładnie przepłukiwano w roztworze PBST, po czym inkubowano je w roztworze przeciwciała wykrywającego białka

królicze, skoniugowanego z biotyną (przeciwciało kozie, BA-1000, Vector Laboratories; rozcieńczenie 1:1000) w PBS. Następnie tkankę płukano w PBST i inkubowano w roztworze ABC (zestaw ABC-HRP, PK-4000, Vector Laboratories) przez 1 h, w temperaturze pokojowej. Po wypłukaniu w PBS, skrawki barwiono w roztworze diaminobenzydyny i mocznika z zestawu Sigmafast (ang. *diaminobenzidine*, DAB, D4293). Następnie, po dokładnym płukaniu w PBS, skrawki inkubowano w roztworze przeciwciała wykrywającego białka kurze, skoniugowanego z biotyną (przeciwciało kozie, BA-9010, Vector Laboratories; rozcieńczenie 1:500). Następnie skrawki płukano w PBST i inkubowano w roztworze ABC (zastaw ABC-HRP, PK-4000, Vector Laboratories) przez 1 h w temperaturze pokojowej. Po wypłukaniu w PBS, skrawki barwiono przy pomocy zestawu VIP Peroxidase (HRP) Substrate (Vector Laboratories, SK-4600).

6.3.6. Analiza komputerowa obrazów mikroskopowych

Obrazy mikroskopowe zostały zebrane za pomocą mikroskopu Nikon Eclipse Ni-U z kamerą QImaging QICAM Fast 1394 oraz programu Image-Pro Plus (wersja 7.0.1.658; Media Cybernetics) w formie 16-bitowych zdjęć, po 2 próby z każdej półkuli, zapisanych w formacie *.tif. Analizy uzyskanych obrazów dokonano w programie ImageJ (wersja 1.51j8; Wayne Rasband). Na podstawie atlasu mózgu szczura (Paxinos i Watson, 2013) zdefiniowano w programie ImageJ obszary CeA oraz obszary struktur wysyłających do niego projekcje lub unerwianych przez to jądro. Następnie, przy pomocy opcji "Merge channels", analizowano współwystępowanie sygnałów pochodzących od białka c-Fos lub białka Venus i znaczników typów neuronów lub znaczników transportu wstępującego/zstępującego. Na koniec porównywano stosunek liczby komórek, w których wykryto określony znacznik lub projekcje do całkowitej liczby aktywowanych neuronów (c-Fos-pozytywnych lub Venus-pozytywnych).

6.3.7. Analiza poziomu białka c-Fos w jądrze środkowym szczurów po treningu

Na podstawie atlasu mózgu szczurów (Paxinos i Watson, 2013) zaznaczano w programie ImageJ (wersja 1.51j8; Wayne Rasband) obszary CeA znajdujące się na zdjęciach skrawków z widocznym sygnałem pochodzącym od białka c-Fos. W zdefiniowanym obszarze automatycznie zliczano neurony c-Fospozytywne przy użyciu opcji "Analyse particles". W analizie wyznaczano parametry granicy detekcji (ang. threshold 10 - 145), powierzchni (ang. area 0,003 - 0,01) oraz kolistości (ang. circularity 0,50 - 1,0) zliczanych obiektów. Dane zbierano z obszaru jądra środkowego z 2 kolejnych skrawków dobieranych z obszaru od -1,8 do -2,6 mm od bregmy dla każdego analizowanego szczura.

6.4. Doświadczenia optogenetyczne

6.4.1. Wektor AAV-c-fos-ChR2(H134R)-EYFP

Wektory wirusowe związane z adenowirusami (ang. adeno-associated AAV) AAV-c-fos-ChR2(H134R)-EYFP zostały virus. wyprodukowane i oczyszczone w Centrum Neurobiologii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, kierowanym przez dr. Witolda Konopkę. Wektory te umożliwiają stabilne wyrażanie niesionego konstruktu. Niosły one sekwencję kodującą channelorodopsyne (ang. channelrhodopsin, ChR2, światłoczułe białko pozwalające na wzbudzanie aktywności neuronów) oraz sekwencję eYFP (białko reporterowe). Promotor *c-fos* wykorzystany w tym konstrukcie posiada tę samą sekwencję co promotor, który wykorzystano w transgenicznych szczurach PSD-95:Venus (Knapska i in., 2012). Miano wektorów AAV wynosiło około 10^7 (liczba cząstek wirusowych zdolnych do transdukcji na 1 μ l).

6.4.2. Wektor rAAV-ot-ChR2-mCherry

Wektory rAAV (ang. *recombinant adeno-associated virus*, rAAV) wyrażające białko reporterowe mCherry, pod kontrolą promotora OXY mysiej zostały zaprojektowane i wyprodukowane przez Neuropeptide Research in Psychiatry Department (Central Institute for Mental Health) kierowany przez prof. Valerego Grinevicha. Wektory te umożliwiają badanie projekcji neuronów OXY i ich funkcji, poprzez manipulacje optogenetyczne możliwe dzięki obecnej w konstrukcie sekwencji rodopsyny ChR2, której aktywacja powoduje endogenne uwolnienie OXY przez aksony transdukowanych neuronów (Knobloch i in., 2012).

6.4.3. Przygotowanie kaniul optycznych

Światłowody (FT200UMT, Thorlabs) cięto przy pomocy obcinarki włókna (F16000, Data Optics) na kawałki o długości ok. 2 cm i ściągano ok 80% powłoki zewnętrznej światłowodu. Na płaski koniec ceramicznej feruli (średnia wewnętrzna 200µm, Prizmatix) nakładano kroplę kleju epoksydowego (Żywica epoksydowa Hysol 0151, Data Optics) i wprowadzano przez niego pozbawiony powłoki zewnętrznej koniec światłowodu tak, żeby światłowód wystawał minimalnie przez zaokraglony koniec. Przygotowane w ten sposób ferule ze światłowodami pozostawiano na 24 h do wyschnięcia kleju. Następnie polerowano zaokrąglony koniec feruli na papierze szlifierskim wykonując ruchy w kształcie ósemek, co gwarantuje równe wyszlifowanie feruli i światłowodu. Szlifowano ferulę przy pomocy metalowego krażka polerskiego do złączy LC (Data Optics), wykorzystując kolejno papier szlifierski o coraz mniejszej ziarnistości (wielkość ziarna wynosiła kolejno: 5, 3, 1 i 0,3 µm, AO A4, Data Optics) na gumowej podkładce polerskiej (Data Optics). Pomiędzy szlifowaniem każdym kolejnym papierem szlifierskim ferulę czyszczono chusteczkami bezpyłowymi (Kimwipes, Kimberly-Clark Worldwide). Po wyszlifowaniu każdej feruli oczyszczano papier szlifierski chusteczkami bezpyłowymi nasączonymi alkoholem izopropylowym (IPA, Chempol). Następnie przy pomocy noża diamentowego (S90R, Thorlabs) cięto światłowód tak, żeby jego długość od płaskiej części feruli do dłuższego końca wynosiło ok. 7 mm. Powyższe czynności powtarzano do osiągnięcia wystarczającej liczby zestawów ferulaświatłowód koniecznych do przeprowadzenia eksperymentu. Następnie mierzono przy pomocy miernika mocy optycznej (PM100D, Thorlabs) stopień światła przez światłowód porównując moc światła przepuszczalności przechodzącego przez światłowód przed i po przyłączeniu do niego wyszlifowanej feruli ze światłowodem. Zestawy w których światłowód przepuszczał mniej niż 70% światła polerowano ponownie do uzyskania satysfakcjonującego rezultatu. Na koniec pokrywano ferule małą ilością kleju (Żywica epoksydowa Hysol 0151, Data Optics), umieszczano w mosiężnym gwincie o średnicy dobranej do używanego w eksperymentach światłowodu i czekano 24 h na wyschnięcie kleju.

37

6.4.4. Operacje stereotaktyczne

W czasie operacji stereotaktycznych szczurom podano wektor AAV-c-fos-ChR2(H134R)-EYFP i zaimplantowano kaniule optyczne. Zwierzęta usypiano za pomocą anestezji wziewnej z wykorzystaniem izofluranu (4-5 jednostek przy przepływie tlenu 2 L/min, Aerrane, Baxter), następnie unieruchamiano na przystawce dla szczurów (Gas Anesthesia Rat Mask, Stoelting) zamontowanej w aparacie stereotaktycznym (Model 940, KOPF). Po wejściu w stan anestezji podawano zwierzętom podskórnie winian butorfanolu (1 mg/kg, Butomidor, Richter Pharma), a w celu uniknięcia wysychania oczu nakładano na nie żel do oczu (Vidisic, Bausch&Lomb/Dr Mann Pharma). W trakcie operacji szczury utrzymywano w stałym stanie uśpienia podając wziewnie izofluran (1-2 jednostki przy przepływie tlenu 0,3 L/min; Kröber 02, Kröber). Usuwano owłosienie ze skóry głowy, odkażano obszar cięcia (Octenisept, Schulke & Mayr GmbH) i wykonywano nożyczkami cięcie o długości około 1,5 cm wzdłuż centralnego szwu czaszki. Na powierzchnię rozciętej skóry nakładano warstwę żelu z chloroworkiem lignokainy (Lignocainum Jelfa, 20mg/g), czaszkę oczyszczano przy pomocy dłuta chirurgicznego i patyczków kosmetycznych. Wyznaczano punkty bregma (przecięcie szwu strzałkowego ze szwem wieńcowym) i lambda (przecięcie szwu strzałkowego z katem szwu wegłowego) i poziomowano ustawienie głowy na podstawie wysokości obu punktów (dopuszczalna różnica poziomu wynosiła 0,2 mm). Posiłkując się tymi punktami i ustawiając na nich igłę weryfikowano poprawne ustawienie czaszki, po czym wyznaczano miejsca nawierceń o koordynatach: przód-tył (AP), -1,8 mm; przyśrodkowo-bocznie (ML), ± 3.8 mm; oraz grzbietowo-brzusznie (DV), -7.5 mm – mierzone od opony twardej (Paxinos, 2008). W wyznaczonych punktach wykonywano otwory w czaszce (wiertarka Microtorque II, tech2000, wiertło 0,6 µm, Ram Products), wprowadzano przez nie igłę (NF35BV-2, World Precision Instruments) zamontowana na strzykawce Nanofil (10 µl, World Precision Instruments) i podawano wektory AAV (250 nl) do CeA. Prędkość infuzji wynosiła 100 nl/min (pompa UMP3, sterownik micro 4; World Precision Instruments USA). Po zakończeniu infuzji czekano 5 min, aby umożliwić dyfuzję podanego płynu w tkance i powoli wysuwano igłę z mózgu. Następnie wykonywano identyczna iniekcję w drugiej półkuli. Po obu iniekcjach opuszczano obustronnie sterylne

kaniule optyczne umiejscawiając je 0,01 cm powyżej, w stosunku do koordynatów używanych dla iniekcji wektora wirusowego (Ryc. 4). Na oczyszczoną i suchą powierzchnię czaszki wylewano cement dentystyczny (Duracryl Plus, SpofaDental), tak, żeby pokrył śruby i miedziane gwinty do połowy ich wysokości formując przytwierdzony do czaszki szczura stabilizator implantu. Na brzegi rozciętej skóry nakładano krem Triderm (Schering-Plough), podawano podskórnie kwas tolfenamowy jako środek przeciwbólowy i przeciwzapalny (4 mg/kg; Tolfedine, Vetoquinol) oraz antybiotyk enrofloksacynę (5mg/kg; Baytril, Bayer). Żeby uniknąć odwodnienia zwierzętom podawano podskórnie 1 ml roztworu soli fizjologicznej (0.95% NaCl, Polpharma). Po zakończeniu operacji zwierzęta trzymano w czystej klatce z podłożem podgrzewanym na macie grzewczej do momentu wybudzenia. Podanie leków Tolfedine i Baytril powtarzano przez kolejne 3 dni po operacji. Zwierzętom umożliwiono całkowita rekonwalescencję, a doświadczenia behawioralne wykonywano 3-6 tygodni po operacjach chirurgicznych. W czasie operacji korzystano ze szczypczyków chirurgicznych, retraktora oraz pesety chirurgicznej. Wszystkie materiały i powierzchnie około operacyjne sterylizowano poprzez zastosowanie roztworu silnie utleniającego (Domestos, Unilever) lub przy pomocy płynu do dezynfekcji (Aerodesin 2000, Lysoform), a materiały dodatkowo autoklawowano.

Według tego samego protokołu prowadzono operacje stereotaktyczne na szczurach, którym podano 100 nl wektora rAAV-ot-ChR2-mCherry obustronnie do jądra przykomorowego (ang. *paraventricular nucleus*, PVN) o koordynatach: przód-tył (AP), -1,9 mm; przyśrodkowo-bocznie (ML), $\pm 0,25$ mm; oraz grzbietowo-brzusznie (DV), -7,1 mm – mierzone od opony twardej (Paxinos i Watson, 2013). W celu zobrazowania zakończeń aksonów OXY pochodzących z PVN na zaktywowanych przez społeczny transfer strachu komórkach w CeA, zoperowano również 5 szczurów szczepu Venus prowadząc infuzje według powyższych wytycznych, ale bez montowania kaniul optogenetycznych.

6.4.5. Emisja światła w doświadczeniach optogenetycznych

Do stymulacji optogenetycznej użyto lasera o długości fali światła 473 nm i maksymalnej mocy na wyjściu 100mW (Omicron-Laserage). Typowa moc lasera wynosiła 10 mW na końcu kaniuli. Emisja światła z lasera była inicjowana przez wyjście układu TTL z klatki służącej do warunkowania strachu (Med Associates). Pulsacja lasera (czas trwania impulsu 5 ms, 30 Hz) była kontrolowana albo przez komercyjny mikrokontroler (Rapp OptoElectronic, model UGA-42-Firefly), albo przez płytkę Arduino. Moc wyjściową lasera zmierzono za pomocą komercyjnego miernika mocy (model Thorlabs PM200 z czujnikiem S121C). Emisja światła odbywała się przez dwa światłowody (Thorlabs; rdzeń 200 µm, NA 0,37, dł. 2m) przeprowadzone przez złącze obrotowe (Doric Lenses) i przyłączone końcami kaniul do gwintów kaniul optogenetycznych wystających z głowy testowanego szczura.



Rycina 4. Zastosowanie techniki optogenetycznej u szczurów. A. Ocena miejsc infuzji wektorów wirusowych AAV-c-fos-ChR2(H134R)-EYFP i położenia kaniuli optogentycznej, zdjęcie preparatu wykonane z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego, poniżej powiększony fragment zdjęcia. **B.** Schematyczne przedstawienie rozmieszczenia kaniul optogenetycznych w mózgu szczura. Poprzez kaniule podawano 5 ms, 30 Hz impulsy światła o długości fali 473.

6.5. Obrazowanie aksonalych zakończeń OXY na neuronach aktywowanych przez społeczny transfer strachu w CeA

W celu zobrazowania zakończeń aksonów OXY pochodzących z PVN na zaktywowanych przez społeczny transfer strachu komórkach w CeA, zanalizowano materiał pochodzący od obserwatorów (5 szczurów szczepu Venus poddanych infuzji wektora rAAV-ot-ChR2-mCherry do PVN) i poddanych społecznemu transferowi strachu.

6.5.1. Przygotowanie tkanki mózgowej

Około 2 godzin od zakończenia testu behawioralnego, szczurom podawano śmiertelną dawkę morbitalu (133,3 mg/ml pentobarbitalu sodu, 26,7 mg/ml pentobarbitalu) rozcieńczonego 10 razy roztworem soli fizjologicznej (0,95 % NaCl, Polpharma). W kolejnym kroku wykonywano perfuzję umieszczając w lewej komorze serca igłę (1,8×25,0 Mifam, ze stępionym końcem) oraz rozcinano prawy przedsionek. Następnie wpompowywano 200-250 ml 0,1 M zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej (ang. phosphate buffered saline, PBS, Sigma), a następnie 200-250 ml 4% roztworu paraformaldehydu (PFA, POCH) o pH = 7,4. Otrzymane mózgi pozostawiano na noc w 4% roztworze PFA (4°C), a przez kolejne 4-7 dni przetrzymywano w 30% roztworze sacharozy (Sigma lub BioShop) w PBS (4°C). By uzyskać materiał do barwienia immunohistochemicznego mózgi były przytwierdzane bezpośrednio do stolika do krojenia przy użyciu medium do mrożenia tkanek (Leica) i zamrażane (30 min, -20°C), a później cięte z użyciem kriostatu (kriostat żyletkowy Leica CM 1859, Leica) na skrawki w płaszczyźnie koronalnej, każdy o grubości 40 µm. Tkankę do analiz przechowywano w roztworze krioprotekcyjnym w -20°C, w plastikowej płytce 12-dołkowej (Orange Scientific) w taki sposób, by w każdym dołku znajdowało się po kilka skrawków. Ewaluacja trafień następowała przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego.

6.5.2. Immunohistochemiczna detekcja białek Venus i CRF

Podanie konstruktu rAAV-ot-ChR2-mCherry do PVN pozwoliło zobrazować OXY zakończenia aksonalne w CeA bez konieczności dodatkowego wzmacniania sygnału. Ekspresja konstruktu PSD-95:Venus jest kontrolowana przez zmodyfikowany promotor genu *c-fos* i widoczna tylko w pobudzonych neuronach, w ciele komórki i dendrytach aktywowanych komórek (szczegóły metody opisano w Knapska i in., 2012). Skrawki mózgowe umieszczano w plastikowej płytce 12-dołkowej (Orange Scientific) tak, by w każdym dołku znajdowały się dwa skrawki pochodzące od każdego analizowanego osobnika. Przepłukiwano je trzy razy w PBST, a następnie blokowano w 10% roztworze surowicy koziej (ang. normal goat serum - NGS; Vector Laboratories) w PBST przez 1 h w temperaturze pokojowej. Następnie inkubowano tkankę z króliczym przeciwciałem anty-GFP (w stosunku 1:500, Invitrogen) oraz z przeciwciałem pierwszorzędowym wykrywającego białko CRF (ang. Corticotropin Releasing Factor, przeciwciało kurze, AB80360, ABCAM; rozcieńczenie 1:500) w 1% roztworze NGS w PBST w 4°C przez 24 h. Następnego dnia skrawki wypłukiwano w PBST i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej w roztworze przeciwciał drugorzędowych Alexa 488 skierowanych przeciwko białkom króliczym (Invitrogen), w stosunku 1:500 oraz Alexa 647 skierowanych przeciwko białkom kurzym (Invitrogen), w roztworze PBST. Po uprzednim wypłukaniu, w celu uzyskania preparatów mikroskopowych, skrawki były rozkładane na szkiełkach podstawowych (Thermo Scientific) i zamykane szkiełkami nakrywkowymi (Bionovo) przy użyciu medium Fluoromount G Medium. Analizy komputerowej obrazów dokonano zgodnie z procedurami opisanymi w podrozdz. Analizy immunohistochemiczne.

6.6. Farmakologiczne blokowanie receptora OXY w CeA

6.6.1. Operacje stereotaktyczne

Zwierzęta w wieku ok. 4-6 miesięcy poddawano zabiegowi wszczepiania kaniul prowadzących. Zwierzęta usypiano za pomocą anestezji wziewnej z wykorzystaniem izofluranu (4-5 jednostek przy przepływie tlenu 2 L/min, Aerrane, Baxter), następnie unieruchamiano na przystawce dla szczurów (Gas Anesthesia Rat Mask, Stoelting) zamontowanej w aparacie stereotaktycznym (Model 940, KOPF). Po wejściu w stan anestezji podawano zwierzętom podskórnie winian butorfanolu (1 mg/kg, Butomidor, Richter Pharma), a w celu uniknięcia wysychania oczu nakładano na nie żel do oczu (Vidisic, Bausch&Lomb/Dr Mann Pharma). W trakcie operacji szczury utrzymywano

w stałym stanie uśpienia podając wziewnie izofluran (1-2 jednostki przy przepływie tlenu 0,3 L/min; Kröber 02, Kröber). Usuwano owłosienie ze skóry głowy, odkażano obszar cięcia (Octenisept, Schulke & Mayr GmbH) i wykonywano nożyczkami cięcie o długości około 1,5 cm wzdłuż centralnego szwu czaszki. Na powierzchnię rozciętej skóry nakładano warstwę żelu z chloroworkiem lignokainy (Lignocainum Jelfa, 20mg/g), czaszkę oczyszczano przy pomocy dłuta chirurgicznego i patyczków kosmetycznych. Wyznaczano punkty bregma i lambda i poziomowano ustawienie głowy na podstawie wysokości obu punktów (dopuszczalna różnica poziomu wynosiła 0,2 mm). Następnie wyznaczono punkty nawierceń i wiercono 4 otwory (wiertarka Microtorque II, tech2000, wiertło 0,6 µm, Ram Products). Z przodu i z tyłu czaszki osadzano dwie śruby stabilizujące, wykonane ze stali nierdzewnej. Następnie implantowano kaniule prowadzące wykonane ze stali nierdzewnej (Plastics One). Kaniule umieszczano obustronnie w CeA: przód-tył (AP), -1,8 mm; przyśrodkowo-bocznie (ML), ±3,8 mm; oraz grzbietowo-brzusznie (DV), -7,2 mm – mierzone od opony twardej (Paxinos, 2008). Umieszczone tak kaniule i śruby stabilizacyjne zalewano masą dentystyczną (Duracryl, Spofa Dental). Po zastygnięciu cementu dentystycznego, jeśli była taka potrzeba, skórę głowy zaszywano. Na brzegi rozciętej skóry nakładano krem Triderm (Schering-Plough), podawano podskórnie kwas tolfenamowy jako środek przeciwbólowy i przeciwzapalny (4 mg/kg; Tolfedine, Vetoquinol) oraz antybiotyk enrofloksacynę (5mg/kg; Baytril, Bayer). Żeby uniknąć odwodnienia zwierzętom podawano podskórnie 1 ml roztworu soli fizjologicznej (0.95% NaCl, Polpharma). Po zakończeniu operacji zwierzęta trzymano w czystej klatce z podłożem podgrzewanym na macie grzewczej, do momentu wybudzenia. Podanie leków Tolfedine i Baytril powtarzano przez kolejne 3 dni po operacji. umożliwiano całkowitą rekonwalescencję, Zwierzętom a doświadczenia behawioralne wykonywano 3-6 tygodni po operacjach chirurgicznych. Wszystkie materiały i powierzchnie około operacyjne sterylizowano poprzez zastosowanie roztworu silnie utleniającego (Domestos, Unilever) lub przy pomocy płynu do dezynfekcji (Aerodesin 2000, Lysoform), a materiały dodatkowo autoklawowano. W czasie operacji korzystano ze szczypczyków chirurgicznych, retraktora oraz

pęsety chirurgicznej. Aby zabezpieczyć kaniule przed zabrudzeniem, umieszczano w nich zatyczki wykonane ze stali nierdzewnej.

6.6.2. Blokowanie receptora OXY za pomocą antagonisty

L-371,257 podczas społecznego transferu strachu Po przetransportowaniu zwierząt do pomieszczenia doświadczalnego

wyjmowano z klatki domowej szczura - obserwatora w celu wykonania infuzji. Zwierzę było delikatnie unieruchamiane, wyjmowano z kaniul zatyczki ochronne, a następnie do każdej z nich wprowadzano igłę iniekcyjną (Plastics One) podłaczona do strzykawki Hamiltona zainstalowanej w mikropompie (Harvard Apparatus). Infuzję prowadzono równocześnie obiema kaniulami. W grupie eksperymentalnej (OTA) podawano 0,5 mM L-371,257 (Tocris) rozpuszczonego w dimetylosulfotlenku, DMSO (Sigma). W grupie kontrolnej podawano tylko DMSO. Po około 60 sekundach po umieszczeniu igły w kaniuli prowadzącej włączano mikropompę. Roztwór L-371,257 lub DMSO podawano obustronnie do CeA, 1 mm poniżej kaniuli prowadzącej przez 120 sekund (prędkość infuzji 0,5 µl/min). Żeby umożliwić pełną dyfuzję podanej substancji, igły iniekcyjne zostawiano w miejscu podania przez kilka minut po zakończeniu infuzji. Po wyjęciu igieł iniekcyjnych, umieszczano zatyczki ochronne w kaniulach, a zwierze wkładano do klatki domowej bez pokrywy, w obudowie uniemożliwiającej ucieczkę, gdzie oczekiwało na demonstratora przez około 15 minut. Po 20 minutach od infuzji przeprowadzano opisany powyżej test społecznego transferu strachu.

6.7. Mapowanie aktywnych połączeń wstępujących i zstępujących CeA

6.7.1. Operacje stereotaktyczne

Operacje stereotaktyczne zostały przeprowadzone na 10 szczurach: 5 szczurach szczepu Wistar (ostatecznie zanalizowano połączenia u 2 zwierząt, pozostałe nie były analizowane ze względu na złą lokalizację znaczników połączeń) i 5 szczurach szczepu PSD95:Venus (ostatecznie wykonano analizę dla 3 zwierząt, pozostałe nie były analizowane ze względu na złą lokalizację znaczników połączeń). Zwierzęta usypiano za pomocą anestezji wziewnej z wykorzystaniem izofluranu (4-5 jednostki przy przepływie tlenu 2 L/min, Aerrane, Baxter), z wykorzystaniem przystawki dla szczurów (Gas Anesthesia Rat Mask, Stoelting) zamontowanej w aparacie stereotaktycznym (Model 940, KOPF). Po wejściu w stan anestezji podawano zwierzętom podskórnie winian butorfanolu (1 mg/kg, Butomidor, Richter Pharma), a w celu uniknięcia wysychania oczu nakładano na nie żel do oczu (Vidisic, Bausch&Lomb/Dr Mann Pharma). W trakcie operacji szczury utrzymywano w ciągłym stanie uśpienia podając wziewnie (2-2,5 jednostki przy przepływie tlenu 0,4 L/min; Kröber 02, Kröber). Usuwano owłosienie ze skóry głowy, odkażano obszar cięcia (Octenisept, Schulke & Mayr GmbH) i wykonywano cięcie za pomocą skalpela (Swann Morton, rozmiar 21) o długości około 1,5 cm wzdłuż centralnego szwu czaszki. Na powierzchnię rozciętej skóry nakładano warstwe żelu z chlorowodorkiem lignokainy (Lignocainum Jelfa, 20 mg/g), czaszkę oczyszczano przy pomocy dłuta chirurgicznego i patyczków kosmetycznych, a następnie wyznaczano punkty: bregmy (przecięcie szwu strzałkowego ze szwem wieńcowym) i lambdy (przecięcie szwu strzałkowego z kątem szwu wegłowego) i weryfikowano poprawne ustawienie czaszki na podstawie wysokości obu punktów (dopuszczalna różnica poziomów wynosiła 0,2 mm). Wyznaczano miejsca nawierceń o koordynatach - przód-tył (AP): -1,8 mm; przyśrodkowobocznie (ML): ±3,8 mm; oraz grzbietowo-brzusznie (DV): -7,5 mm, mierzone od opony twardej (Paxinos, 2008). w wyznaczonych punktach wykonywano otwory w czaszce (wiertarka Microtorque II, tech2000, wiertło 0,6 µm, Ram Products), wprowadzano przez nie igłę (NF35BV-2, World Precision Instruments) zamontowana na strzykawce Nanofil (10 µl, World Precision Instruments). Po wprowadzeniu igły do CeA podawano 200 nl znacznika aksonalnego transportu wstecznego (retrogradnego): toksyny cholery, podjednostka B skoniugowana z Alexa Fluor 488 (CTB, Life Technologies, C34775) szczurom Wistar lub 500 nl transportu znacznika postępującego (anterogradnego): lektyny PHA-L skoniugowanej z Alexa Fluor 594 (Invitrogen; Molecular Probes) szczurom PSD-95: Venus. Prędkość infuzji wynosiła w obu przypadkach 100 nl/min (pompa UMP3, sterownik micro 4; World Precision Instruments USA). Po zakończeniu infuzji czekano 5 min, aby umożliwić dyfuzję podanego płynu w tkance, a potem

powoli wysuwano igłę z mózgu. Następnie wykonywano identyczną iniekcję w drugiej półkuli. Po wykonaniu obu infuzji czaszkę szczura osuszano za pomocą patyczka kosmetycznego, a strzykawkę Nanofil dokładnie płukano w 70% roztworze etanolu (POCH). Skóre głowy zaszywano (nić chirurgiczna 3/8 z igła 4/0; Dafilon), nakładano na nia krem Triderm (Schering-Plough), podawano podskórnie kwas tolfenamowy jako środek przeciwbólowy i przeciwzapalny (4 mg/kg; Tolfedine, Vetoquinol) oraz antybiotyk enrofloksacynę (5mg/kg; Baytril, Bayer). Żeby uniknąć odwodnienia zwierzętom podawano podskórnie 1 ml roztworu soli fizjologicznej (0,95% NaCl, Polpharma). Po zakończeniu operacji zwierzęta trzymano w czystej klatce z podłożem podgrzewanym na macie grzewczej aż do momentu wybudzenia. Podanie leków Tolfedine i Baytril powtarzano przez kolejne 3 dni po operacji. Zwierzętom umożliwiono całkowitą rekonwalescencję, a stymulacje behawioralne wykonywano 3-6 tygodni po operacjach chirurgicznych. Wszystkie materiały i powierzchnie okołooperacyjne sterylizowano poprzez zastosowanie roztworu silnie utleniającego (Domestos, Unilever) lub przy pomocy płynu do dezynfekcji (Aerodesin 2000, Lysoform), a materiały dodatkowo sterylizowano w autoklawie. W czasie operacji korzystano ze szczypczyków chirurgicznych, retraktora oraz pęsety chirurgicznej.

6.7.2. Znakowanie połączeń wstępujących CeA

W celu wyznakowania połączeń wstępujących wykorzystano uprzednio opracowaną technikę obrazującą połączenia aktywowane przez określoną stymulację behawioralną. Technika ta łączy podawanie znaczników aksonalnego transportu wstecznego z immunohistochemicznym znakowaniem aktywnych neuronów (Orsini i in., 2011). Do barwień uwidaczniających białko c-Fos w jądrach komórkowych użyto skrawków mózgu pobranych od zwierząt, którym uprzednio podano do CeA znacznik aksonalnego transportu wstecznego (retrogradnego). Fluorescencja tego znacznika jest widoczna pod mikroskopem bez konieczności dodatkowej detekcji. Skrawki umieszczono w plastikowej płytce 12-dołkowej (Orange Scientific) tak, by w każdym dołku znajdowały się dwa skrawki pochodzące od każdego analizowanego osobnika. Przepłukano je trzykrotnie roztworem PBS (pH 7,4; Sigma), następnie blokowano w 5% roztworze surowicy koziej (ang. *normal goat serum* – NGS; Vector Laboratories) w PBST (roztwór 0,3% Tritonu X-100, Poch; w PBS) przez 1,5 h w temperaturze pokojowej. Następnie inkubowano tkankę z króliczym przeciwciałem anty-c-Fos (w stosunku 1:1000, *Millipore*) w 3% roztworze NGS w PBST w temperaturze pokojowej przez 24 h. Następnego dnia skrawki wypłukano w PBST i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej w roztworze przeciwciał drugorzędowych Alexa 555 skierowanych przeciwko białkom króliczym (Invitrogen), w stosunku 1:500, w roztworze PBST. Po uprzednim wypłukaniu, w celu uzyskania preparatów mikroskopowych, skrawki były rozkładane na szkiełkach podstawowych (Thermo Scientific) i zamykane szkiełkami nakrywkowymi (Bionovo) przy użyciu medium Fluoromount G Medium.

6.7.3. Znakowanie połączeń zstępujących CeA

Technika ta polegała na podaniu znacznika aksonalnego transportu postępującego (anterogradnego) do CeA szczurom transgenicznym PSD-95: Venus. Pozwoliło to na zlokalizowanie projekcji biegnących z CeA do neuronów aktywowanych przez strach przekazywany społecznie w analizowanych regionach mózgu. Ekspresja konstruktu PSD-95:Venus jest kontrolowana przez zmodyfikowany promotor genu *c-fos* i widoczna tylko w pobudzonych neuronach, w ciele komórki i dendrytach aktywowanych komórek (szczegóły metody opisano w Knapska i in., 2012). Do barwień uwidaczniających ekspresję białka reporterowego Venus użyto skrawków mózgowych pobranych od zwierząt, którym uprzednio podano do CeA znacznik aksonalnego transportu postępującego (anteroradnego). Fluorescencja tego znacznika jest widoczna pod mikroskopem bez konieczności dodatkowej detekcji. Skrawki umieszczano w plastikowej płytce 12-dołkowej (Orange Scientific) tak, by w każdym dołku znajdowały się dwa skrawki pochodzące od każdego analizowanego osobnika. Przepłukiwano je trzy razy w PBST, a następnie blokowano w 10% roztworze surowicy koziej (ang. normal goat serum - NGS; Vector Laboratories) w PBST przez 1 h w temperaturze pokojowej. Następnie inkubowano tkankę z króliczym przeciwciałem anty-GFP (w stosunku 1:500, Invitrogen) w 1% roztworze NGS w PBST w 4°C przez 24 h. Następnego dnia skrawki wypłukiwano w PBST i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze

pokojowej w roztworze przeciwciał drugorzędowych Alexa 488 skierowanych przeciwko białkom króliczym (Invitrogen), w stosunku 1:500, w roztworze PBST. Po uprzednim wypłukaniu, w celu uzyskania preparatów mikroskopowych, skrawki były rozkładane na szkiełkach podstawowych (Thermo Scientific) i zamykane szkiełkami nakrywkowymi (Bionovo) przy użyciu medium Fluoromount G Medium.

6.8. Analiza komunikacji ultradźwiękowej podczas społecznego transferu strachu

Komunikacja ultradźwiękowa była nagrywana z użyciem czterech mikrofonów UltraSoundGate Condenser CM16 (o zakresie rejestracji 15 – 180 kHz; Avisoft Bioacoustics) umieszczonych w obudowie ochronnej otaczającej klatkę domową podczas interakcji społecznej, po jednym w każdym rogu, przez program Avisoft-RECORDER (wersja 5.2.06, Avisoft Bioacoustics), który zapisywał dane w formacie plików *.wav. Następnie pliki, wyświetlone jako kolorowy spektrogram, analizowano w programie RatRec (Rat-Rec Pro 5.0) po uprzednim przetworzeniu przez transformatę Fouriera (1024 albo 512, Hamming / Hann window). Podczas analizy pod uwagę brano dwa rodzaje wokalizacji w paśmie częstotliwości około 50 kHz - takie których częstotliwość może być modulowana (ang. *frequency-modulated*; FM) oraz takie, których częstotliwość nie jest modulowana (ang. *non-frequency modulated*; non-FM), ich kształty na spektrogramie były wyszukiwane i zaznaczane ręcznie (Wöhr i in., 2008). W analizie wzięto również pod uwagę wokalizacje alarmowe o częstotliwości ok. 22-kHz (ang. *alarm calls*), jednak nie zarejestrowano ich występowania.

6.9. Analiza statystyczna

Do przeprowadzenia analiz statystycznych wykorzystano oprogramowanie GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) oraz Statistica 7.1. W pierwszym kroku zweryfikowano normalność rozkładów uzyskanych danych (test Shapiro-Wilka). W przypadku danych o rozkładzie normalnym dane porównywano między grupami z zastosowaniem jedno- lub dwu- czynnikowej analizy wariancji z powtarzanymi pomiarami, dwuczynnikowej analizy wariancji lub testu t-Studenta (w przypadku porównania dwóch grup). Do porównania z wartością teoretyczną używano testu t-Studenta dla jednej próby. Jeżeli hipoteza o zgodności rozkładu z rozkładem normalnym została odrzucona, dalsze analizy przeprowadzano przy użyciu testów nieparametrycznych (test U Manna Whitneya). Dane przedstawiano na wykresach jako wartość średnią \pm błąd standardowy, p < 0,05 uznawano za istotną różnicę.

7. Wyniki

7.1. Określenie na ile społeczny transfer strachu i bezpośrednie warunkowanie strachu współdzielą obwody neuronalne w CeA

Określenie w jakim stopniu neurony aktywowane podczas społecznego transferu strachu są zaangażowane w bezpośrednie warunkowanie strachu stało się możliwe dzięki rozwinięciu szczepu zmodyfikowanych genetycznie szczurów PSD-95:Venus. U zwierząt tych białko reporterowe Venus podlega ekspresji pod kontrolą promotora genu *c-fos* (Knapska i in., 2012). Dzięki różnicy w lokalizacji, a także czasie usuwania tych białek z komórki możliwe stało się wyznakowanie specyficznych subpopulacji komórek odpowiadających treningom przeprowadzonym w określonym oknie czasowym (szczegóły w rozdz. Materiały i Metody).

Zwierzęta poddane zostały społecznemu transferowi strachu i warunkowaniu strachu w odstępie 24 godzin (So, n=8) lub, w przypadku grupy kontrolnej, interakcji społecznej po krótkiej separacji, a po 24 h warunkowaniu strachu (NSo, n=8). W związku z inną dynamiką ekspresji konstruktu PSD-95:Venus i endogennego białka c-Fos możliwe było odróżnienie komórek aktywowanych przez interakcję społeczną, ale nie przez warunkowanie strachu (komórki wyznakowane wyłącznie przez konstrukt PSD-95:Venus) i aktywowanych zarówno przez interakcję społeczną, jak i warunkowanie strachu (komórki wyznakowane równocześnie przez PSD-95:Venus i endogenne białko c-Fos, Knapska i in., 2012). Na podstawie atlasu mózgu szczura (Paxinos i Watson, 2013) podzielono CeA na część boczną (ang. lateral, CeL) i przyśrodkową (ang. medial, CeM) i z uwzględnieniem tego podziału prowadzono analizę. Analiza ta pokazała, że neurony aktywne w czasie interakcji z pobudzonym partnerem są aktywowane również w czasie warunkowania strachu. Następnie porównano wyniki grupy mającej interakcję z pobudzonym emocjonalnie partnerem (So) z grupą kontrolną, w której interakcja następowała po krótkiej separacji (NSo). Analizie statystycznej poddawano dane w postaci średniego stosunku komórek wyznakowanych podwójnie (w kierunku białka c-Fos i przeciwciała GFP wykrywającego białko reporterowe Venus) do całkowitej liczby komórek (wyznakowanych podwójnie na c-Fos i GFP oraz pojedynczo na GFP). Testy prowadzono porównując grupy So i NSo, osobno dla obszarów CeL i CeM. Zaobserwowano różnicę pomiędzy grupą So i NSo w regionie CeL (test t Studenta: t=4,49, df=14, p<0,0005, **Ryc. 5**).

Α.



Β.

Neurony społecznego strachu aktywowane podczas warunkowania strachu



Rycina 5. Neurony "społecznego strachu" w CeA aktywowane podczas bezpośredniego warunkowania strachu. A. Zdjęcie preparatu wykonane z użyciem mikroskopu optycznego, widoczne jest podwójne znakowanie immunohistochemiczne: białko c-Fos (kolor czarny) i białko reporterowe Venus (kolor fioletowy). Czarną linią zaznaczono jądra podstawne (BA), boczne (LA) oraz część przyśrodkową (CeM) i boczną (CeL) CeA, po prawej powiększone fragmenty zdjęć. B. Udział neuronów aktywowanych w czasie interakcji z pobudzonym partnerem w warunkowaniu strachu, przedstawiony jako stosunek liczby komórek wyznakowanych równocześnie przez c-Fos⁺ oraz GFP⁺ do całkowitej liczby wyznakowanych komórek. Stwierdzono, że poziom współwystępowania jest niższy w CeL, w grupie eksperymentalnej w stosunku do grupy kontrolnej. Wynik ten sugeruje, że transfer strachu aktywuje również grupę komórek niezwiązaną z bezpośrednim warunkowaniem strachu. Wykres przedstawia dane jako wartość średnią \pm błąd standardowy, ***p<0,001.

7.2. Porównanie wzorów zachowania podczas interakcji z przestraszonym partnerem (DZIEŃ 1) z efektami stymulacji optogenetycznej neuronów "społecznego strachu" (DZIEŃ 2)

Wyniki eksperymentów przeprowadzonych uprzednio (Knapska i in., 2006) z użyciem c-Fos jako znacznika aktywacji neuronów pokazały, że istnieje wzór ekspresji charakterystyczny dla społecznego transferu strachu, w którym obserwuje się podwyższoną aktywację neuronów w CeA. Przeprowadzenie eksperymentu, który pozwoliłby na badanie funkcji neuronów aktywowanych przez społeczny transfer strachu stało się możliwe dzięki rozwojowi technik optogenetycznych. Narzędzie to umożliwia okresowe pobudzanie lub hamowanie aktywności wybranych komórek w czasie trwania testu behawioralnego.

W celu określenia funkcji neuronów "społecznego strachu" w CeA, wykorzystano konstrukt niosący sekwencję kodującą opsynę ChR2, którego ekspresja zachodzi pod kontrolą promotora *c-fos*. Zwierzęta podzielono na pary, losowo wyznaczonym obserwatorom podano do CeA wektor AAV i zaimplantowano kaniule optogenetyczne. Następnie pary demonstratorobserwator podzielono na dwie grupy: eksperymentalną "So" i kontrolną "NSo". Ze względu na charakterystykę działania promotora *c-fos*, zastosowany konstrukt genetyczny wymaga zaindukowania jego ekspresji poprzez stymulację behawioralną i ok. 24 h na uzyskanie jego ekspresji pozwalającej na efektywne manipulowanie aktywnością neuronów (Andraka i in., 2020; schemat eksperymentu przedstawia **Ryc. 6**, zob. też sekcję Materiały i Metody).

Pierwszego dnia eksperymentu ekspresja konstruktu zaindukowana została poprzez interakcję obserwatora z przestraszonym demonstratorem (grupa So, n=8) lub poprzez interakcję z demonstratorem nie poddanym żadnemu treningowi, ale eksponowanym na nowe środowisko (grupa NSo, n=8). Po 24 h specyficzne grupy neuronów były stymulowane pulsacyjnie niebieskim światłem (szczegóły w rozdziale Materiały i Metody), w trwających 3 minuty okresach ON i OFF podczas interakcji społecznej (z niepoddanym treningowi demonstratorem). Wykonano również kontrolny eksperyment behawioralny, w którym testowano obserwatorów poddanych społecznej drugiego dnia (So Ctrl), żeby sprawdzić, czy

społeczny transfer strachu ma wpływ na następującą drugiego dnia interakcję społeczną (szczegóły eksperymentu opisano w kolejnym podrozdziale).

Analiza zachowania szczurów wykazała, że stymulacja optogenetyczna neuronów "społecznego strachu" w CeA (DZIEŃ 2) wywołała efekty podobne do tych obserwowanych podczas właściwego transferu strachu (DZIEŃ 1). Obserwowano przede wszystkim wzrost czasu spędzonego na wykonywaniu stójek. Dwuczynnikowa analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami (sesja) potwierdziła istotność interakcji grupa x miara behawioralna x sesja: F(6,126)=4,02, p=0,001, a zaplanowane porównania pokazały istotność czynnika sesji (dzień 1, dzień 2 ON i dzień 2 OFF), zob. Ryc. 6. W dalszej kolejności, stosując dwuczynnikową analizę wariancji porównano zachowania obserwatorów stymulowanych optogenetycznie (So ON) z zachowaniem obserwatorów, którzy nie byli stymulowani optogenetycznie, ale zostali poddani transferowi strachu poprzedniego dnia (So Ctrl, DZIEŃ 2, n=5) wykazując, że wzrost czasu spedzanego na wykonywaniu stójek jest specyficzny dla stymulacji optogenetycznej (So ON vs. So Ctrl, interakcja grupa x miara behawioralna: F (2, 32)= 3,33, p=0,0484).





Rycina 6. Porównanie wzoru zachowań podczas interakcji z przestraszonym partnerem (DZIEŃ 1) z efektami stymulacji optogenetycznej neuronów "społecznego strachu" (DZIEŃ 2). A. Schemat społecznego transferu strachu. W dniu eksperymentu pary obserwator-demonstrator rozdzielano, demonstrator został poddany warunkowaniu strachu (a w grupie kontrolnej ekspozycji na klatkę treningową, bez podawania szoków elektrycznych). Niezwłocznie po treningu demonstrator wracał do klatki domowej, gdzie następował społeczny transfer strachu (w grupie kontrolnej interakcja społeczna po separacji). **B.** Schemat eksperymentu. Pierwszego dnia przeprowadzono stymulację behawioralną - społeczny transfer strachu (So Ctrl), a w grupie kontrolnej - interakcję po separacji (NSo Ctrl). Po 24 h obserwatorów poddano stymulacji optogenetycznej w 3-minutowych okresach ON/OFF w teście interakcji społecznej. C. Wykres przedstawia procent jaki stanowiło dane zachowanie (stójki, eksploracja pozioma, zachowania społeczne) podczas trwania testu. W pierwszym dniu zaobserwowano różnice w średnim czasie trwania stójek pomiędzy grupami NSo Ctrl i So Ctrl. W drugim dniu analiza wykazała różnicę między średnimi czasami trwania stójek podczas stymulacji optogenetycznej, w grupie So podczas okresu ON zanotowano znaczny wzrost czasu trwania stójek. Wykazano również wzrost czasu trwania stójek podczas stymulacji optogenetycznej w grupie So ON w porównaniu do grupy niestymulowanej optogenetycznie (So ns). Wyjaśnienie skrótowych oznaczeń na wykresie - DZIEŃ 1: So Ctrl – społeczny transfer strachu prowadzony pierwszego dnia, NSo Ctrl - kontrolna interakcja społeczna prowadzona pierwszego dnia, DZIEŃ 2: So ON – Stymulacja optogenetyczna (okres ON) podczas interakcji społecznej prowadzonej drugiego dnia w grupie So, NSo ON - Stymulacja optogenetyczna (okres ON) podczas interakcji społecznej prowadzonej drugiego dnia w grupie NSo, So OFF – brak stymulacji optogenetycznej (okres OFF) podczas interakcji społecznej prowadzonej drugiego dnia w grupie So, NSo OFF - brak stymulacji optogenetycznej (okres OFF) podczas interakcji społecznej prowadzonej drugiego dnia w grupie NSo, So ns kontrolna interakcja społeczna prowadzona drugiego dnia w grupie poddanej społecznemu transferowi strachu poprzedniego dnia. Wykres przedstawia dane jako wartość średnią \pm bład standardowy, *p < 0,05, **p<0,01.

7.2.1. Analiza zachowania obserwatorów podczas powtarzanych interakcji społecznych (eksperyment kontrolny)

Aby zbadać, czy test społecznego transferu strachu lub kontrolnej interakcji społecznej może wywierać wpływ na przebieg interakcji mającej miejsce następnego dnia oraz zbadać efekt wielokrotnego testowania przeprowadzono eksperyment kontrolny. Test był powtarzany w ciągu dwóch następujących po sobie dni, pary obserwator-demonstrator podzielono na dwie grupy: NSo (n=4, grupa poddana kontrolnej interakcji społecznej pierwszego i drugiego dnia testu) oraz So (n=5, grupa poddana społecznemu transferowi strachu pierwszego dnia oraz kontrolnej interakcji społecznej drugiego dnia). Nie stwierdzono wpływu powtórzenia testu na przebieg interakcji społecznej (**Ryc. 7**), co potwierdziła dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z powtarzanymi pomiarami (sesja), eksploracja pozioma, efekt sesji: F (1,7)=0,27, p=0,62, stójki, efekt sesji: F (1,7)=0,06, p=0,812, zachowania społeczne, efekt sesji: F (1,7)=0,02, p=0,906).



Rycina 7. Analiza zachowania obserwatorów podczas interakcji społecznych powtarzanych w dwóch kolejnych dniach. Porównanie średniego czasu trwania stójek, eksploracji poziomej i zachowań społecznych pierwszego i drugiego dnia testu, pomiędzy grupami NSo (grupa poddana kontrolnej interakcji społecznej pierwszego i drugiego dnia) i So (grupa poddana społecznemu transferowi strachu pierwszego dnia oraz interakcji kontrolnej drugiego dnia). Analiza nie wykazała istotnych różnic pomiędzy sesjami. Wykres przedstawia dane jako wartość średnią ± błąd standardowy.

7.2.2. Wpływ interakcji z obserwatorem poddanym stymulacji optogenetycznej na zachowanie demonstratora

Podczas stymulacji optogenetycznej obserwatorów z grupy eksperymentalnej, zaobserwowano zmiany w zachowaniu demonstratorów (wzrost średniego czasu trwania eksploracji poziomej i stójek, **Ryc. 8**). Obserwację tę potwierdziły wyniki dwuczynnikowej analizy wariancji, która wykazała istotność interakcji grupa x miara behawioralna: F(2,22)=3,58, p=0,0452. Test post-hoc najmniejszych istotnych różnic (NIR) Fishera wykazał różnicę między grupami NSd i Sd w średnim czasie trwania eksploracji poziomej oraz w średnim czasie trwania stójek.



Rycina 8. Wpływ interakcji z obserwatorem poddanym stymulacji optogenetycznej na zachowanie demonstratora. Zaobserwowano spadek czasu trwania eksploracji poziomej i wzrost czasu trwania stójek w grupie Sd w stosunku do grupy NSd. Wykres przedstawia dane jako wartość średnią \pm błąd standardowy, *p < 0,05. NSd (n=6) – demonstrator podczas interakcji społecznej z obserwatorem z grupy kontrolnej, Sd (n=7) – demonstrator podczas interakcji społecznej z obserwatorem z grupy eksperymentalnej.

7.3. Zmiany eksploracji u obserwatorów poddanych stymulacji optogenetycznej

Następnie badano funkcję neuronów "społecznego strachu" w kontekście niespołecznym. Uprzednio pokazano, że w wyniku społecznego transferu strachu rośnie poziom ekspresji białka c-Fos w CeA, a także, że interakcja społeczna po krótkiej separacji (w grupie kontrolnej) skutkuje relatywnie wysokim poziomem białka c-Fos w tym jadrze. Natomiast u demonstratorów poddanych bezpośredniemu warunkowaniu strachu poziom białka c-Fos w CeA jest niski (Knapska i in., 2006). Wynik ten sugeruje, że ekspresja c-Fos w grupie kontrolnej NSo może mieć określone znaczenie funkcjonalne. Dlatego w opisanym poniżej doświadczeniu zdecydowano się zbadać również grupę zwierząt przebywających w klatce domowej (grupa kontrolna HC, zwierzęta z podstawową ekspresją c-Fos, przyzwyczajone do eksperymentatorów, nie poddane żadnym treningom behawioralnym, a w dniu pobierania tkanek zabrane bezpośrednio z klatek domowych). W pierwszym kroku porównano poziom ekspresji c-Fos w CeA, we wszystkich badanych grupach (So. n=6; NSo. n=8; HC. n=6). Immunohistochemiczna detekcja białka c-Fos pokazała silną aktywację CeA w grupie So zarówno w stosunku do grupy HC (t=4,738, df=10, p=0,0008), jak też w stosunku do grupy NSo (t=2,58, df=12, p=0,0241), zob. **Ryc. 9.**



Rycina 9. Średnia gęstość komórek c-Fos pozytywnych w trzech grupach behawioralnych. Zwierzęta bez stymulacji behawioralnej (HC, n=6), z interakcją po separacji (NSo, n=8) oraz ze społecznym transferem strachu (So, n=6). Wykryto istotną różnicę między grupą So i grupami HC i NSo. Wykres przedstawia dane jako wartość średnia \pm błąd standardowy, *p<0,05, ***p<0,001.

Ponieważ uprzednio zaobserwowano, że podczas stymulacji neuronów CeA zaangażowanych w społeczny transfer strachu w teście interakcji społecznej szczury wykazywały wzmożenie zachowań takich jak stójki i eksploracja postanowiono zbadać ich zachowanie w teście eksploracji nowego środowiska i sprawdzić czy stymulacja specyficznej subpopulacji neuronów aktywowanej podczas społecznego transferu strachu może wywołać u zwierząt wzmożenie zachowań mających na celu szacowanie ryzyka. W tym celu opracowano test eksploracji. Aparat do testu eksploracji znajdował się w zacienionym pokoju. Szczury jako zwierzęta nocne, żyjące w norach, preferują zamknięte, ocienione miejsca względem otwartych i oświetlonych (Denenberg, 1969). Mając na względzie te preferencje, w jednym rogu aparatu umieszczono źródło światła, wyznaczające sferycznie oświetlony obszar na jego podłodze. Po przekątnej natomiast, ustawiony został otwarty domek, stanowiący schronienie dla zwierzęcia oraz punkt startowy testu, zob. **Ryc. 10**)



Rycina 10. Schemat badania wzorów eksploracji nowego środowiska u obserwatorów poddanych stymulacji optogenetycznej. A. Schemat testu eksploracji, oznaczono położenie domku stanowiącego schronienie i punkt startowy testu, oraz po przekątnej - źródło światła. **B.** Schemat eksperymentu, pierwszego dnia przeprowadzono stymulację behawioralną - społeczny transfer strachu (a w kontroli: interakcję po separacji), po 24 h poddano obserwatorów stymulacji optogenetycznej w 3-minutowych okresach ON/OFF w teście eksploracji.

W teście eksploracji ocenie podlegał czas spędzony w domku, na eksploracji aparatu oraz oświetlonego obszaru. Zwierzęta podzielono na pary, losowo wyznaczonym obserwatorom podano do CeA wektor AAV i zaimplantowano kaniule optogenetyczne. Następnie pary demonstratorobservator podzielono na dwie grupy: eksperymentalną So i kontrolną NSo. Ze względu na charakterystykę działania konstruktu genetycznego eksperyment był prowadzony przez dwa dni (schemat eksperymentu: Ryc. 10). Pierwszego dnia eksperymentu ekspresja konstruktu zaindukowana została poprzez interakcję observatora z przestraszonym demonstratorem (grupa So, n=7) lub poprzez interakcję z demonstratorem nie poddanym żadnemu treningowi (grupa NSo, n=6). Po 24 h specyficzne grupy neuronów były stymulowane pulsacyjnie niebieskim światłem (szczegóły w rozdziale Materiały i Metody), w trwających 3 minuty okresach ON i OFF w teście eksploracji. Analizowano czas spędzany na eksploracji obszaru aparatu oraz czas spędzony za ściankami schronienia (unikanie). Porównywano okres podczas stymuacji optogentycznej (ON) w grupach So i NSo w stosunku do okresu OFF. Nie zaobserwowano różnic w średnim czasie unikania. Podczas analizy statystycznej zastosowano test t Studenta dla jednej próby, porównanie do wartości teoretycznej 0, oznaczającej brak zmiany (NSo: t=1,280 df=8 p=0,2364; So: t=0,2986 df=6 p=0,7753, **Ryc.** 11). Zaobserwowano tendencję do zwiększonej eksploracji w grupie NSo (t=2,319, df=6, p=0,0595) i zwiększona eksplorację w grupie So (t=2,930, df=8, p=0,0190). Zaobserwowano również, że podczas okresu ON liczba epizodów eksploracji światła wzrastała w obu badanych grupach (NSo i So). Efekt ten został potwierdzony przez dwuczynnikową analizę wariancji z powtarzanymi pomiarami (okres ON/OFF), efekt okresu ON/OFF: F (1, 11)=7,82, p=0,0174. Zaobserwowano również, że w okresie ON średni czas trwania epizodu eksploracji światła wzrastal tylko w grupie NSo. W analizie statystycznej zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji z powtarzanymi pomiarami, która wykazała efekt grupy: F (1, 11)=5,86, p=0,0339. Następnie wykonano test posthoc Holm-Sidaka, który potwierdził różnicę w średnim czasie eksploracji światła w grupie NSo w stosunku do grupy So.



Α.







Rycina 11. Wzory eksploracji nowego środowiska u obserwatorów poddanych stymulacji optogenetycznej. A. Schemat wzorów eksploracji w teście eksploracji. Ryciny przedstawiają kolejno od góry: unikanie - spędzanie czasu za ściankami domku, ocena ryzyka – zbliżanie się do źródła światła i ustawianie ciała w charakterystycznej wyciągniętej pozie (ang. *stretch attended posture*, Blanchard i Meyza, 2019) zakończonej zazwyczaj ucieczką za ścianki domku, eksploracja światła - wchodzenie w oświetlony obszar. B. Wykresy przedstawiają wpływ stymulacji optogenetycznej na zachowanie zwierząt w teście eksploracji. Wykres po lewej – nie zaobserwowano zmian w czasie trwania unikania zarówno w grupie So, jak i NSo, po prawej – zaobserwowano wzrost czasu trwania eksploracji w grupie So i tendencję do zwiększonej eksploracji w grupie NSo. C. Na górnym wykresie: wzrost liczby epizodów eksploracji światła obserwowany w obydwu grupach w okresie ON. Na dolnym wykresie: czas trwania epizodu eksploracji światła wzrasta podczas stymulacji optogenetycznej (okres ON) tylko w grupie NSo. Wykresy przedstawiają dane jako wartość średnią \pm błąd standardowy, * p < 0,05.

7.4. Współwystępowanie znacznika aktywacji c-Fos z OXY i hormonem uwalniającym kortykotropinę w CeA

W celu scharakteryzowania c-Fos pozytywnej subpopulacji neuronów zaangażowanej w społeczny transfer strachu wykonano podwójne znakowanie tego białka z OXY i CRF w CeA. Wybrano OXY ze względu na jej właściwości wyostrzające uwagę w kierunku bodźców społecznych (Shamay-Tsoory i Abu-Akel, 2016; Ferretti i in., 2019; Steinman i in., 2019). Analizie poddano również CRF, ponieważ neurony CRF+ w CeA podlegają plastyczności podczas uczenia się reakcji strachu, mimo, że nie są zaangażowane w jego ekspresję w formie reakcji zamierania (Sanford i in., 2017). Pobudzenie neuronów CRF+ mogłoby zatem wyjaśniać czemu mimo braku reakcji zamierania podczas społecznego transferu strachu, zwierzęta łatwiej uczą się tej reakcji następnego dnia.

W eksperymencie scharakteryzowano subpopulację neuronów w CeA aktywowaną w wyniku społecznego transferu strachu. W tym celu szczury podzielono na dwie grupy. Obserwatorów z grupy So (poddanych społecznemu transferowi strachu) oraz NSo (poddanych kontrolnej interakcji społecznej) testowano wg schematu przedstawionego na Ryc. 6A. Następnie, na wybranych skrawkach mózgu przeprowadzono barwienie immunohistochemiczne pozwalające na wykrycie białka c-Fos oraz OXY lub CRF. Na podstawie atlasu mózgu szczura (Paxinos i Watson, 2013) podzielono CeA na część boczną (CeL) i przyśrodkową (CeM) i z uwzględnieniem tego podziału prowadzono analizę nie znając przynależności do grup eksperymentalnych poszczególnych obrazów. Analizie poddawano dane w postaci średniego stosunku komórek wyznakowanych podwójnie (w kierunku białka c-Fos i określonego znacznika) do całkowitej liczby komórek c-Fos dodatnich dla analizowanego obszaru. Testy prowadzono porównując grupy So i NSo, osobno dla obszarów CeL i CeM. Zauważono wzrost poziomu współwystępowania znacznika c-Fos z OXY i CRF w grupie eksperymentalnej. Dane uzyskane w analizie współwystępowania c-Fos i OXY poddano testowi t Studenta (So, n=5, NSo, n=4). Test wykazał różnicę między grupami So i NSo w części CeL (t=5,29, df=7, p=0,0011) oraz w obszarze CeM (t=3,68, df=7, p=0,0078). Dane uzyskane w analizie współwystępowania c-Fos i CRF w grupach So (n=5) i NSo (n=3) porównano przy pomocy testu t Studenta dla obszaru CeL (t=2,47, df=6, p=0,0487) i CeM (t=2,50, df=6, p=0,0464), zob. **Ryc. 12**.

Następnie, w CeA szczurów szczepu PSD-95:Venus, przeprowadzono potrójne znakowanie neuronów aktywowanych podczas społecznego transferu strachu. Wykorzystano przeciwciało anty-GFP wykrywające konstrukt PSD-95: Venus, konstukt optogenetyczny znakujący projekcje OXY z PVN (wyznakowe mCherry) oraz przeciwciało wykrywające CRF. Na podstawie atlasu mózgu szczura (Paxinos i Watson, 2013) podzielono CeA na część boczną (CeL) i przyśrodkową (CeM) i z uwzględnieniem tego podziału prowadzono analizę. Opisano stosunek badanych znaczników w obrębie aktywowanej subpopulacji neuronów GFP+. Eksperyment potwierdził wysoki poziom współwystępownia znaczników CRF i OXY ze znacznikiem GFP w obydwu regionach CeA. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic pomiędzy obszarem CeM i CeL w poziomie współwystępowania wszystkich trzech markerów GFP/OXY/CRF. Zaobserwowano natomiast zwiększoną liczebność neuronów GFP+, które nie współwystępowały z żadnym z badanych znaczników w obszarze CeL (test U Manna Whitneya, U=0, p=0,0286) w grupie So, zob. Ryc. 12.



Rycina 12. Współwystępowanie białka c-Fos z oksytocyną (OXY) i hormonem kortykotropinę (CRF) w CeA. uwalniającym A. Podniesiony poziom współwystępowania włokien OXY i c-Fos w grupie So w stosunku do NSo w obszarach CeL i CeM. B. Podniesiony poziom współwystępowania hormonu uwalniającego kortykotropinę (CRF) i c-Fos w grupie So w stosunku do NSo w obszarach CeL i CeM. C. Współwystępowanie znaczników OXY i CRF w aktywowanych komórkach. Przykładowe zdjęcie mikroskopowe przedstawiające obraz z trzech kanałów, kolejno: PSD95:Venus: Alexa Fluor 488 (aktywowane komórki), mCherry: Alexa Fluor 555 (projekcje OXY z jądra przykomorowego), CRF: Alexa Fluor 647 oraz zdjęcie łączone. Wykresy przedstawiają dane jako wartość średnia \pm błąd standardowy, *p < 0.05, **p < 0,01.

7.5. Zmiany zachowania obserwatorów podczas testu społecznego transferu strachu w wyniku manipulacji obwodem OXY w CeA

Wstępna charakterystyka neuronów aktywowanych przez społeczny transfer strachu w CeA wykazała, że są one unerwiane przez włókna OXY. Aby ocenić funkcję OXY w społecznym transferze strachu przeprowadzono testy mające na celu farmakologiczne zablokowanie receptora OXY oraz optogenetyczne uwolnienie OXY w CeA podczas społecznego transferu strachu. Podczas testów mierzono zachowanie obserwatorów. Pary szczurów demonstrator-observator podzielono na trzy grupy: OTA (n=8, observatorzy zostali poddani lokalnemu zablokowaniu receptorów OXY w CeA), OXY (n=7, obserwatorzy zostali poddani lokalnemu uwolnieniu OXY na zakończeniach z PVN aksonalnych biegnacych do CeA. przy pomocy stymulacji optogenetycznej), oraz CTRL (n=7, obserwatorzy zostali poddani infuzji DMSO do CeA przed społecznym transferem strachu). Wyniki w grupach OTA i OXY wyrażono jako procent zmiany w stosunku do średnich wyników obserwowanych w grupie CTRL. Zaobserwowano wpływ manipulacji obwodem oksytocynowym na czas trwania stójek i eksploracji poziomej. W analizie statystycznej wykorzystano dwuczynnikowa analizę wariancji, która wykazała istotność interakcji grupa x miara behavioralna: F(2, 26)=7,12, p=0,0034. Test post-hoc najmniejszych istotnych różnic (NIR) Fishera wykazał różnicę pomiędzy czasem trwania stójek w grupach OTA i OXY (p=0,0250), a także różnicę pomiędzy czasem trwania poziomej eksploracji w grupie OTA w stosunku do grupy OXY (p=0.0300). Wyniki porównano także do teoretycznej wartości oznaczającej brak zmiany (100%). Porównanie to wykazało wzrost czasu trwania stójek w grupie OTA (test t Studenta dla jednej próby, t=2,62, df=7, p=0.0345) oraz spadek czasu trwania stójek w grupie OXY (test t Studenta dla jednej próby, t=2,46, df=6, p=0.049), zob. **Ryc. 13**.



Rycina 13. Zmiana zachowania obserwatorów podczas testu społecznego transferu strachu w wyniku manipulacji obwodem oksytocynowym w CeA. Wykres przedstawia czas trwania stójek, eksploracji poziomej i zachowań społecznych w grupach OTA i OXY wyrażony jako procent zmiany w stosunku do średnich wyników obserwowanych w grupie CTRL. Zaobserwowano wzrost czasu trwania stójek w grupie OTA i jego spadek w grupie OXY. Ponadto w grupie OTA obserwowano mniej eksploracji poziomej niż w grupie OXY. Wykres przedstawia dane jako wartość średnia \pm błąd standardowy, *p < 0,05. OTA (n=8) – obserwatorzy, którzy zostali poddani infuzji antagonisty receptora dla OXY do CeA przed testem społecznego transferu strachu, OXY (n=7) – obserwatorzy, którzy zostali poddani stymulacji optogenetycznej uwalniającej endogenną OXY do CeA.

7.6. Wzory eksploracji nowego środowiska przez demonstratorów testowanych niezwłocznie po społecznym transferze strachu z manipulacją obwodem oksytocynowym w CeA obserwatorów

Ponieważ obecność i stan emocjonalny partnera tego samego gatunku ma wpływ na komfort i zachowanie zestresowanego osobnika (Kiyokawa i in., 2014; Mikami i in., 2016), zdecydowano się na przeprowadzenie drugiej części doświadczenia, w której oceniano wpływ kontaktu z obserwatorem poddanym manipulacji obwodem OXY w CeA na zachowanie demonstratora. Niezwłocznie
po teście społecznego transferu strachu demonstratorzy z grup OXY, OTA i CTRL zostali poddani testowi eksploracji nowego środowiska (opisanego w podrozdziale 7.3, zob. **Ryc. 10A**). Następnie analizowano średni czas trwania zachowań opisanych w **Tab. 2** w rozdziale Materiały i Metody. Zaobserwowano różnice w czasie trwania eksploracji poziomej i unikania, wyrażonych jako procent wszystkich zachowań w teście. Dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała istotność czynnika grupy: F(1,13)=4,90, p=0,0454. Test post hoc najmniejszych istotnych różnic (NIR) Fishera wykazał różnicę w poziomej eksploracji aparatu pomiędzy grupami OTA i OXY (p=0,0047) oraz w unikaniu (definiowanym jako pozostawanie za ścianką schronienia) pomiędzy grupami OTA i OXY (p=0,0005), zob. **Ryc. 14**.



Rycina 14. Wzory eksploracji nowego środowiska u demonstratorów poddanych interakcji z partnerami, u których manipulowano obwodem oksytocynowym w CeA. Wykres przedstawia czas trwania stójek, eksploracji poziomej, eksploracji światła oraz unikania wyrażonych jako procent wszystkich zachowań u demonstratorów z grup OTA, OXY i CTRL. Zaobserwowano różny wpływ manipulacji obwodem oksytocynowym w CeA u obserwatorów eksplorację i poziom unikania demonstratorów na eksponowanych na nowe środowisko. Wykres przedstawia dane jako wartość średnia ± bład standardowy, **p < 0,01, ***p<0,001, OTA d (n=8) – demonstratorzy poddani testowi eksploracji tuż po społecznym transferze strachu z udziałem obserwatorów z zablokowanymi receptorami oksytocny w CeA, CTRL d (n=7) demonstratorzy poddani testowi eksploracji tuż po społecznym transferze strachu z udziałem obserwatorów poddanych infuzji DMSO do CeA, OXY d (n=4) - demonstratorzy poddani testowi eksploracji tuż po społecznym transferze strachu z udziałem obserwatorów z optogenetycznie uwolnioną OXY w CeA.

7.7. Zidentyfikowanie funkcjonalnych projekcji do i z CeA w strukturach aktywowanych przez strach przekazywany społecznie

W doświadczeniu zbadano funkcjonalne połączenia neuronów CeA z innymi strukturami mózgu aktywowanymi przez strach przekazywany społecznie. W tym celu wykorzystano dwie uprzednio opracowane techniki obrazujące połączenia aktywowane przez określoną stymulację behawioralną. Pierwsza z nich łączy podawanie znaczników aksonalnego transportu wstecznego z immunohistochemicznym znakowaniem aktywnych neuronów (Orsini i in., 2011). Technika ta umożliwiła zlokalizowanie regionów mózgu, w których znajdują się neurony aktywowane przez strach przekazywany społecznie, wysyłających projekcje do CeA. Wykaz struktur wziętych pod uwagę w analizie oraz wyniki w postaci liczby aktywowanych komórek, liczby komórek z wyznakowanymi projekcjami wstecznymi oraz procenty aktywnych komórek wysyłających projekcje do CeA zostały przedstawione w **Tab. 3**.

Druga technika polegała na podaniu znacznika aksonalnego transportu postępujacego (anterogradnego) do CeA szczurom transgenicznym PSD-95:Venus. Pozwoliło to na zlokalizowanie projekcji biegnących z CeA do neuronów aktywowanych przez strach przekazywany społecznie w analizowanych regionach mózgu. Ekspresja konstruktu PSD-95:Venus jest kontrolowana przez promotor genu *c-fos* i widoczna tylko w pobudzonych neuronach. Sekwencje 3'UTR Arc oraz PSD-95 powodują, że konstrukt jest obecny w ciele komórki i dendrytach w okolicy zakończeń synaptycznych, a białko reporterowe Venus umożliwia zlokalizowanie aktywowanych komórek (szczegóły metody opisano w Knapska i in, 2012). Dzieki temu możliwe było określenie jaki procent komórek aktywowanych w badanych strukturach odbiera projekcje z CeA. Wykaz struktur wziętych pod uwagę w analizie oraz wyniki w postaci liczby aktywowanych komórek, liczby komórek z wyznakowanymi projekcjami zstępującymi oraz procenty aktywnych komórek otrzymujących projekcje z CeA zostały przedstawione w Tab. 4. Uzyskane dane podsumowano na Ryc. 15.

Struktura mózgu	Liczba komórek wyznakowanych retrogradnie ± SEM	Procent aktywowanych komórek wysyłających projekcje do CeA ± SEM
KORA:		
Część agranularna kory wyspy (ang. agranular insular cortex)	4,25±0,25	26±2
Część dysgranularna i granularna kory wyspy (ang. Granular/dysgranular insular cortex)	14,5±5	23±6
Brzuszna część kory przedczołowej (ang. <i>infralimbic cortex</i>)	11±4	22±8
Grzbietowa część kory przedczołowej (ang. <i>prelimbic cortex</i>)	14,5±5	28±5
Zakręt obręczy, obszar 1 (ang. <i>cingulate cortex, area</i> 1)	11,5±2,5	43±22
PRZODOMÓZGOWIE:		
Jądro podstawno-boczne ciała migdałowatego (ang. basolateral amygdala)	17±2	18±4,5
FORMACJA HIPOKAMPA:		
Obszar CA1 hipokampa (ang. <i>field CA1 of the</i> <i>hippocampus</i>)	13,5±2	34±3

 Tabela 3. Projekcje do CeA aktywowane przez społeczny transfer strachu.

-

Struktura mózgu	Liczba aktywowanych komórek ± SEM	Procent aktywowanych komórek odbierających projekcje z CeA ± SEM
PIEŃ MÓZGU:		
Grzbietowe jądro szwu. Część grzbietowa (ang. dorsal raphe nucleus, dorsal part)	74,5±1,8	100,0±0
Grzbietowe jądro szwu. Brzuszna część (ang. dorsal raphe nucleus. Ventral part)	124,3±2,6	100,0±0
Grzbietowe jądro szwu. Część brzuszno-boczna (ang. dorsal raphe nucleus. Ventrolateral part)	86,6±2,0	100,0±0
Grzbietowe jądro szwu. Część grzbietowo-boczna (ang. dorsal raphe nucleus. Dorsolateral part)	50,3±2,5	100,0±0
Grzbietowe jądro szwu. Część boczna. (ang. <i>Dorsal</i> <i>raphe nucleus. lateral part</i>)	50,3±0,9	100,0±0
Jądro nakrywkowe konarowo-mostowe (ang. Pedunculoponitine tegmental nucleus)	30,8±1,6	99,7±0,3
Jądro nakrywkowe boczno- grzbietowe (ang. <i>laterodorsal tegmental</i> <i>nucleus</i>)	39,6±7,4	94,1±5,9
Istota czarna (ang. substantia nigra)	135,1±2,5	92,1±4,5
Pole retrorubalne (ang. <i>retrorubral field</i>)	34,7±3,6	92,2±6,4
Brzuszny obszar nakrywki (ang. ventral tegmental area)	22,3±0,0	80,0±0,0
Jądra okołoramieniowe (ang. <i>parabrachial nucleus</i>)	34,3±8,5	88,0±12,0

 Tabela 4. Projekcje z CeA aktywowane przez społeczny transfer strachu.

Struktura mózgu	Liczba aktywowanych komórek ± SEM	Procent aktywowanych komórek odbierających projekcje z CeA ± SEM
PIEŃ MÓZGU:		
Jądro nerwu trójdzielnego (ang. nucleus of the trigeminal nerve)	7,2±0,2	100,0±0
PRZODOMÓZGOWIE:		
Jądro łożyskowe prążka krańcowego (ang. bed nucleus of stria terminalis)	73,1±21,4	79,1±10,6
Gałka blada (ang. globus pallidus)	30,4±4,3	78,7±0,6
Jądro ogoniaste (ang. <i>caudate putamen</i>)	92,2±8,5	78,7±0,5
Istota bezimienna (ang. substantia innominata)	45,0±16,6	71,7±10,5
PODWZGÓRZE		
Pole podwzgórzowe grzbietowe (ang. dorsal hypothalamic area)	27,8±10,4	90,1±6,8
Pole zaskrzyżowaniowe (ang. retrochiasmatic area)	56,5±3,6	74,7±13,8
Jądro brzuszno- przyśrodkowe (ang. <i>ventromedial hypothal nu</i>)	41,1±3,6	72,8±13,2
KORA:		
Kora śródwęchowa (ang. <i>perirhinal cortex</i>)	140,9±24,4	80,5±1,0

Tabela 4, cd. Projekcje z CeA aktywowane przez społeczny transfer strachu.



Rycina 15. Schematycznie przedstawienie projekcji wchodzących do i wychodzących z CeA aktywowanych przez społeczny transfer strachu. A. Projekcje wchodzące do CeA – wielkość kół jest proporcjonalna do liczby komórek wyznakowanych retrogradnie. **B.** Projekcje wychodzące z CeA - wielkość kół jest proporcjonalna do procenta aktywowanych komórek odbierających projekcje z CeA. Wyjaśnienie skrótów oznaczeń na wykresie: AID (ang. *agranular insular cortex, dorsal*) – agranularna kora wyspy, część grzbietowa, AIV (ang. *agranular insular cortex, vental*) – agranularna kora wyspy, część brzuszna, BLA (ang. *basolateral amygdala*) – jądro podstawno-boczne ciała migdałowatego, Cg1 (ang. *cingulate cortex, area 1*) – zakręt obręczy, obszar 1, DI (ang. *dysgranular insular cortex*) – dysgranularna kora wispy, DRN (ang. *raphe nuclei, dorsal*) – jądra szwu, część grzbietowa, GI (ang. *granular insular cortex*) – granularna kora wispy, IL (ang. *infralimbic cortex*) – brzuszna część przyśrodkowej kory przedczołowej, PAG (ang. *periaqueductal gray*) – substancja szara okołowodociągowa, PRH (ang. *perirhinal cortex*) – kora śródwęchowa, STM (ang. *stria terminalis*) – prążek krańcowy.

7.8. Komunikacja ultradźwiękowa podczas społecznego transferu strachu.

Występowanie wokalizacji ultradźwiękowych jest szeroko badane u szczurów laboratoryjnych (Schwarting, 2018). Tryle (ang. *trills*) to ok. 50-kHz wokalizacje, których częstotliwości są modulowane, a ich wystąpienie wiązane jest z emocjami o pozytywnej walencji (Mulvihill i Brudzynski, 2018). Płaskie, niemodulowane wokalizacje o częstotliwości ok. 20-kHz wiązane są natomiast z emocjami o negatywnej walencji, są one zazwyczaj obserwowane podczas warunkowania strachu (Brudzynski, 2001). Postanowiono więc zbadać, czy komunikacja ultradźwiękowa ma miejsce podczas społecznego transferu strachu oraz, jeśli tak, jaki jest profil występujących wówczas wokalizacji. W tym celu nagrywano i analizowano komunikację ultradźwiękową w parach obserwator demonstrator podczas społecznego transferu strachu (So: n=5) i interakcji społecznej kontrolnej (NSo: n=4), doświadczenie było prowadzone wg schematu z **Ryc. 6A**.

Uzyskane wyniki wskazują na różnice w liczbie wokalizacji ultradźwiękowych pomiędzy grupami, nie zaobserwowano natomiast różnic w ich częstotliwości. W grupie poddanej społecznemu transferowi strachu zaobserwowano więcej wokalizacji niż w grupie kontrolnej (test t Studenta z korektą Welcha: t=2.406, df=7, p=0.0470). W obu grupach obserwowano wokalizacje o podobnej częstotliwości (test t Studenta z korektą Welcha: t=0,02, df=4,36, p=0,2586), zob. Ryc. 16. Bardziej szczegółowa analiza wokalizacji wykazała, że zdecydowana większość pojawiających się ultradźwięków to ultradźwięki wysokoczęstotliwościowe (50 kHz i powyżej), wokalizacje 20 kHz pojawiały się bardzo rzadko.

A. Komunikacja ultradźwiękowa - społeczny transfer strachu



B. Komunikacja ultradźwiękowa - społeczny transfer strachu



Rycina 16. Komunikacja ultradźwiękowa podczas społecznego transferu strachu. A. Średnia liczba epizodów wokalizacji, porównanie pomiędzy grupami NSo i So. W grupie So zaobserwowano wzrost średniej liczby epizodów wokalizacji. **B.** Porównanie średniej częstotliwości [kHz] pomiędzy grupami NSo i So, nie wykryto istotnych różnic pomiędzy grupami. Dane przedstawiono na wykresach jako wartość średnią \pm błąd standardowy, *p < 0,05.

8. Dyskusja

8.1. Obwody aktywowane w CeA przez społeczne i niespołeczne bodźce świadczące o zagrożeniu

Podczas społecznego transferu strachu w CeA obserwuje się wzrost poziomu białka c-Fos. W przypadku braku występowania bodźców o charakterze zagrażającym pochodzących od demonstratorów, (i.e. w grupie kontrolnej, podczas interakcji społecznej po krótkiej separacji), w CeA również obserwuje się relatywnie wysoki poziom białka c-Fos, choć jest on niższy niż podczas transferu strachu. Natomiast u demonstratorów poddanych warunkowaniu strachu poziom białka c-Fos w CeA jest niski (Knapska i in., 2006).

Wcześniejsze badania pokazały, że społeczny transfer strachu powoduje przyspieszenie nabywania reakcji strachu u obserwatorów, co można stwierdzić podczas testu przeprowadzanego następnego dnia (Knapska i in., 2010). Efekt ten mógłby być wyjaśniony poprzez obniżenie progu potrzebnego do aktywowania komórek nerwowych zaangażowanych w bezpośrednie warunkowanie strachu. Obniżony próg aktywacji powoduje, że neurony łatwiej podlegają procesom plastyczności neuronalnej (Li i in., 2013; Penzo i in., 2014; Sanford i in., 2017). Podwójne znakowanie immunohistochemiczne (konstrukt PSD-95:Venus i endogenne białko c-Fos) wykazało, że populacja neuronów CeA zaangażowanych w społeczny transfer strachu w istotnej części pokrywa się z populacją aktywowaną podczas bezpośredniego nabywania strachu, co jest zgodne z przytoczoną wyżej hipotezą. Jednakże pozostaje duża grupa neuronów niezaangażowanych w bezpośrednie warunkowanie strachu (około 35%). Aktywacja dodatkowego podzbioru neuronów może być związana z blokowaniem reakcji zamierania w odpowiedzi na informację o odległym zagrożeniu. Hipoteza potwierdzenie w danych literaturowych. ta znajduje Podanie środka przeciwlękowego (diazepamu) powoduje redukcję zamierania i wzrost aktywnego unikania u szczurów eksponowanych na klatkę, w której uprzednio warunkowano u nich strach (Beck i Fibiger, 1995). U zwierząt tych zaobserwowano również wzrost ekspresji białka c-Fos w CeA (Beck i Fibiger, 1995). Podobnie, diazepam indukował ekspresję genu wczesnej odpowiedzi zif-268 w CeA (a dokładniej jego części bocznej), a efekt ten został zablokowany przez ekspozycję na bodziec

bezwarunkowy (Malkani i Rosen, 2000). Obserwacje te sugerują, że wzrost poziomu białka c-Fos w CeA jest powiązany z obniżeniem lęku i podejmowaniem aktywnych strategii działania w odpowiedzi na zagrażający bodziec. Obserwacje te pozwoliły postawić hipotezę, że podwyższony poziom białka c-Fos w CeA podczas społecznego transferu strachu wpływa na wystąpienie u obserwatorów zachowań mających na celu szacowanie ryzyka (ang. *risk assessment*, McNaughton i Corr, 2004; Blanchard i in., 2011).

Podsumowując, stwierdzono, że podczas społecznego transferu strachu w CeA zostaje aktywowana specyficzna populacja c-Fos pozytywnych neuronów, zawierająca podgrupę neuronów aktywowanych również podczas bezpośredniego nabywania strachu. Ponadto najprawdopodobniej, część z aktywowanych komórek odpowiada za szacowanie ryzyka.

8.2. Neurony "społecznego strachu" a zachowania mające na celu oszacowanie ryzyka

W niniejszej pracy postanowiono określić funkcję neuronów "społecznego strachu", a w szczególności zbadać czy ich aktywacja ma wpływ na wystąpienie zachowań eksploracyjnych mających na celu szacowanie ryzyka. Wiele testów behawioralnych prowadzonych na pojedynczych osobnikach pokazało, że bliskość zagrożenia ma decydujący wpływ na wybór strategii obronnej podejmowanej przez zwierzę. Bliskość zagrożenia w danej sytuacji może zmieniać się w czasie - ryzyko jest niskie w fazie poprzedzającej kontakt z drapieżnikiem, wzrasta po jego wykryciu i osiąga swój szczyt kiedy drapieżnik jest wystarczająco blisko by zaatakować (Blanchard i in., 1993; Fanselow, 1994; Gray i McNaughton, 2003). Według teorii hamowania behawioralnego J. Graya zachowania mające na celu szacowanie ryzyka są generowane przez konflikt celów (zbliżyć się czy unikać). Konflikt ten skutkuje przypisywaniem przez mózg bodźcowi większego poziomu zagrożenia niż miałoby to miejsce w innym kontekście. specyficznych obwodów Istnienie neuronalnych w CeA odpowiedzialnych za przejście od pasywnych strategii obronnych do zachowań mających na celu szacowanie ryzyka zostało potwierdzone w wielu badaniach, w których zwierzęta testowane były pojedyńczo (Gozzi i in., 2010; Haubensak i in., 2010; Fadok i in., 2017). Wyniki te są spójne z postawioną w tej pracy

77

hipotezą, że specyficzna subpopulacja neuronów aktywowana podczas społecznego transferu strachu może wywołać u zwierząt wzmożenie zachowań mających na celu szacowanie ryzyka.

Przeprowadzone eksperymenty pokazały, że podczas stymulacji neuronów zaangażowanych w społeczny transfer strachu w teście wydłużały stójki. Ponadto, stymulacja neuronów zaangażowanych w społeczny transfer strachu w teście eksploracji nowego środowiska zwiększyła występowanie "postawy wyciągniętej, skierowanej w stronę bodźca" (ang. stretched attend posture) charakterystycznej dla szacowania ryzyka (Blanchard i Meyza, 2019). Zachowanie to obserwowano wielokrotnie podczas krótkich epizodów eksploracji oświetlonego obszaru pola, które najczęściej kończyły się ucieczkami. Wszystkie obserwowane zachowania są charakterystyczne dla fazy, w której obecne są bodźce informujące o potencjalnym, ale nie bezpośrednim zagrożeniu. Co ważne, w grupie kontrolnej, w której zwierzęta wchodziły w interakcję z partnerem eksponowanym wcześniej na nowe środowisko, ale niepoddanym warunkowaniu strachu, stymulacja obwodu neuronalnego aktywowanego podczas interakcji prowadziła do wzmożonej eksploracji o charakterze nielękowym. Świadczy o tym wzrost długości epizodu eksploracji oświetlonej, awersyjnej części pola. Uzyskane wyniki wskazują zatem, że przypisywanie przez obserwatorów wartości bodźcom może zależeć od specyficznych obwodów aktywowanych w CeA.

Podsumowując, stymulacja c-Fos pozytywnej subpopulacji neuronów aktywowanej przez społeczny transfer strachu w CeA wywołuje zachowania mające na celu oszacowanie ryzyka, a stymulacja c-Fos pozytywnej subpopulacji neuronów aktywowanej przez społeczną interakcję po separacji (w grupie kontrolnej) wzmaga eksplorację charakterystyczną dla niskiego poziomu lęku.

8.3. Modulująca rola OXY oraz neuronów CRF pozytywnych w CeA w zachowaniach mających na celu oszacowanie ryzyka

W pracy scharakteryzowano subpopulację neuronów aktywowaną w CeA podczas społecznego transferu strachu pod względem obecności OXY i hormonu uwalniającego kortykotropinę (CRF). Uzyskane dane wskazują na podniesione współwystępowanie OXY i CRF podczas społecznego transferu strachu w porównaniu do kontroli. Następnie wykonano potrójne znakowanie neuronów CeA aktywowanych podczas społecznego transferu strachu u szczurów szczepu PSD-95:Venus wykrywając: konstrukt PSD-95:Venus, projekcje OXY z jądra przykomorowego (konstrukt znakujący zakończenia aksonalne komórek OXY) oraz białko CRF. Potwierdzono wysoki poziom współwystępownia znacznika CRF i zakończeń OXY na neuronach aktywowanych podczas społecznego transferu strachu. Następnie, w celu zbadania roli OXY w CeA w społecznym transferze strachu zablokowano receptor dla OXY używając antagonisty L-371,257 i zbadano zmiany w zachowaniu zwierząt spowodowane taką manipulacją farmakologiczną. Podanie antagonisty OXY spowodowało wzmożenie zachowań mających na celu ocenę ryzyka (stójki i eksploracja) u obserwatorów. Następnie zbadano wpływ uwalniania OXY w CeA na społeczny transfer strachu stymulując optogenetycznie neurony oksytocynowe obwodu jądro przykomorowe - jądro środkowe ciała migdałowatego (PVN-CeA). OXY uwolniona w ten sposób w CeA wpłynęła na zredukowanie zachowań związanych z oceną ryzyka u obserwatorów.

OXY odgrywa ważną, modulującą rolę w przetwarzaniu bodźców społecznych oraz ma wpływ na związaną z nimi plastyczność neuronalną (Kirsch i in., 2005; Marlin i in., 2015; Mitre i in., 2016). Jako neuromodulator może wpływać na skierowanie uwagi na bodziec społeczny i jego ocenę (Marlin i in., 2015). W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca obwód PVN-CeA modulujący ekspresję reakcji strachu i jego wygaszania (Knobloch i in., 2012; Ferretti i in., 2019; Hasan i in., 2019). Jak pokazała przeprowadzona analiza immunohistochemiczna społeczny transfer strachu podnosi poziom współwystępowania OXY z białkiem c-Fos w CeA w stosunku do kontrolnej interakcji społecznej. Postawiono więc hipotezę, że OXY odgrywa modulującą rolę w transferze strachu poprzez (1.) obniżenie poziomu lęku u obserwatora i umożliwienie zachowań eksploracyjnych oraz (2.) wzmożenie uwagi obserwatora wobec społecznych bodźców negatywnych (takich jak: pobudzenie motoryczne demonstratora, feromony alarmowe).

Analiza zachowania obserwatorów, u których optogenetycznie aktywowano obwód PVN-CeA w celu uwolnienia OXY w CeA wykazały znaczne obniżenie zachowań społecznych i eksploracji. Wyniki badań na pojedynczo testowanych szczurach pokazują, że uwalnianie OXY w CeA redukuje reakcję zamierania, poprzez aktywowanie lokalnego GABA-ergicznego obwodu w bocznej części CeA (CeL). Obwód ten hamuje neurony wyjściowe znajdujące się w przyśrodkowej części CeA i odgrywa kluczową rolę w redukowaniu lęku podczas wygaszania reakcji strachu (Knobloch i in., 2012; Hasan i in., 2019). Uzyskane w przeprowadzonych doświadczeniach dane wskazują na to, że uwolnienie OXY w CeA podczas społecznego transferu strachu miało silne działanie przeciwlękowe, zmniejszając motywację obserwatorów do eksploracji bodźców dostarczanych przez demonstratorów i blokując tym samym przepływ informacji pomiędzy partnerami. Jest również prawdopodobne, że obserwowany efekt działania OXY w dużej mierze był zależny od kontekstu, w którym testowane były szczury. Można przypuszczać, że poziom lęku w klatce domowej był niższy niż w klatce do warunkowania strachu. W eksperymentach Knobloch i in. (2012) po optogenetycznym uwolnieniu OXY w CeA szczury zmniejszyly zamieranie w odpowiedzi na bodziec warunkowy, autorzy nie raportują jednak jaki charakter miała wzmożona ruchliwość zwierząt, czy była to swobodna eksploracja czy szacowanie ryzyka, co pomogłoby określić jak właściwości kontekstu wpływają na modulację lęku przez oksytocynę.

Jeśli dla wydajnego transferu strachu muszą zostać pobudzone komórki odpowiedzialne zarówno za wzmożoną eksplorację, jak i zamieranie (zob. pierwszy podrozdział Dyskusji), to można postawić hipotezę, że działanie OXY obniża aktywność neuronów odpowiedzialnych za ekspresję strachu w modelu społecznego transferu strachu. Hipoteza ta znalazła potwierdzenie w kolejnym eksperymencie, w którym farmakologicznie zablokowano receptor OXY w CeA u obserwatorów podczas społecznego transferu strachu. W wyniku tego eksperymentu obserwatorzy wykonywali dokonywali częstszej oceny ryzyka. Zintensyfikowanie zachowań mających na celu ocenę ryzyka najprawdopodobniej świadczy o podniesieniu poziomu lęku u obserwatorów. Obecność osobnika pobudziła będącego źródłem informacji o zagrożeniu obwód strachu u obserwatora, a w połączeniu z zablokowaniem receptora OXY reakcja została wzmocniona poprzez mobilizację zwierzęcia do monitorowania środowiska w celu aktywnego poszukiwania potencjalnie zagrażającego bodźca.

Zważywszy na powyższe wyniki, postawiono pytanie - jaki czynnik, poza blokowaniem przekaźnictwa oksytocynowego, może mieć wpływ na intensyfikację zachowań oceniających ryzyko u obserwatorów? Ponieważ aktywacja neuronów CRF w CeA jest wiązana z aktywna ekspresją (np. ucieczką) oraz uczeniem się strachu (Fadok i in., 2017) postanowiono przyjrzeć się obecności CRF w CeA podczas społecznego transferu strachu. W związku z tym wykonano analizę immunohistochemiczną, która wskazała na równie wysokie jak w przypadku OXY współwystępowanie białka c-Fos w CeA ze białkiem CRF. Dane literaturowe wskazują, że aktywacja neuronów CRF+ w CeA redukuje warunkowe zamieranie, wskazując na antagonistyczną rolę tej grupy neuronów do subpopulacji somatostatynowej (SOM+), która jest zaangażowana w ekspresję reakcji zamierania (Li i in., 2013; Fadok i in., 2017; Hartley i in., 2019). Hipoteze tę potwierdzają w swojej pracy Sanford i in. (2017), pokazując, że neurony CRF+ ułatwiają nabywanie reakcji strachu, ale nie jego ekspresję, a receptor CRFR1 jest krytyczny dla uczenia się o potencjalnie zagrażających bodźcach (zahamowanie neuronów przed sesją warunkowania strachu zredukowało zamieranie u myszy zarówno podczas warunkowania, jak i testu pamięci strachu, efektu tego nie obserwowano natomiast kiedy zahamowanie neuronów CRF+ następowało przed testem pamięci strachu). Zatem populacja neuronów CRF+ w CeA promuje reakcje aktywne. Wykazano również, że neurony wrażliwe na oksytocynę w CeL (odbierające projekcje z jądra podstawno-bocznego) podlegają wzmocnieniu synaptycznemu podczas warunkowania strachu (w paradygmacie aktywnego unikania (Terburg i in., 2018). Z drugiej strony autorzy tej pracy zaobserwowali równolegle wzmocnienie występujące na neuronach niewrażliwych na oksytocynę (w eksperymencie obserwowano również zamieranie u testowanych zwierząt) i zasugerowali, że ekspresja strachu w tym paradygmacie angażuje zarówno neurony SOM+, jak i antagonistyczne do nich CRF+. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy sugerują, że aktywacja obu tych subpopulacji (CRF+ i prawdopodobnie SOM+), odpowiedzialnych zarówno za ekspresję, jak i uczenie się reakcji strachu, ma miejsce podczas społecznego transferu strachu, mimo iż obserwatorzy nie przejawiają reakcji zamierania. Wydaje się, że przesunięcie równowagi badanych subpopulacji w stronę neuronów CRF+ umożliwia aktywną eksplorację środowiska w celu oceny ryzyka. Wyjaśniałoby to dlaczego

uwolnienie OXY w CeA zablokowało transfer strachu (poprzez działanie antagonistyczne do SOM+), a zablokowanie jej receptora wzmogło transfer strachu obserwowany jako wzrost zachowań mających na celu szacowanie ryzyka. W dalszych badaniach warta uwagi wydaje się zatem interakcja pomiędzy neuronami CRF+, SOM+ i OXY w CeA w kontroli społecznie przekazywanego strachu. W niniejszym projekcie próbowano badać kolokalizację aktywowanych neuronów z SOM, niestety przeciwciało wykrywające SOM okazało się niespecyficzne.

Podsumowując, uwolnienie OXY w CeA ze względu na silne działanie przeciwlękowe zmniejszyło motywację obserwatorów do eksploracji bodźców wysyłanych przez demonstratorów i zablokowało przepływ informacji pomiędzy partnerami. Natomiast zablokowanie receptora OXY wzmogło społeczny transfer strachu. Natomiast działanie neuronów CRF+ najprawdopodobniej umożliwia aktywne zachowania mające na celu szacowanie ryzyka podczas społecznego transferu strachu.

8.4. Rola OXY w CeA a buforowanie społeczne podczas społecznego transferu strachu

W celu zbadania jak manipulacja obwodem oksytocynowym CeA u obserwatorów wpływa na zachowanie demonstratorów, po teście społecznego transferu strachu opisanego w powyższym podrozdziale, wykonano drugą część eksperymentu. Polegała ona na bezzwłocznym poddaniu demonstratorów testowi eksploracji. Zaobserwowano, że w sytuacji, w której u obserwatorów blokowano receptor OXY w CeA podczas społecznego transferu strachu, demonstratorzy wzmagali eksplorację, prawdopodobnie dzięki obniżonemu poziomowi lęku. Odwrotnie, kiedy u obserwatorów uwolniono oksytocynę w CeA, demonstratorzy wykazywali wyższy czas unikania, utrzymując wysoki poziom lęku. Sugeruje to, że stan obserwatora wywołany uwolnieniem lub blokowaniem działania OXY w CeA, wpływa na jakość społecznego wsparcia, którego źródłem dla demonstratora podczas społecznego transferu strachu jest obserwator.

Wpływ wsparcia społecznego na polepszenie komfortu osób znajdujących się w stresie jest szeroko obserwowany i badany wśród ludzi (Kirschbaum i in., 1995; Thorsteinsson i in., 1998). Efekt zredukowania stresu w obecności innych osobników jest obserwowany również u przedstawicieli innych gatunków, także gryzoni, zjawisko to nosi nazwę "buforowania społecznego" (ang. social buffering, Hennessy i in., 2009; Kiyokawa i Hennessy, 2018). Na przykład, w modelu zaprezentowanym w pracy Kiyokawa i in. (2007) eksponowano pary szczurów na warunkowy bodziec wywołujący strach, uwarunkowany tylko u jednego ze zwierzat. Obecność drugiego szczura blokowała reakcję zamierania i aktywację osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (oś HPA, ang. hypothalamicpituitary-adrenal axis) u warunkowanego uprzednio zwierzęcia. Dodatkowo wykazano, że buforowanie społeczne ułatwia wygaszanie strachu (Mikami i in., 2016). Społeczna izolacja u szczurów (hodowla w indywidualnych klatkach) wpływała natomiast na wzrost zachowań lękowych (mierzonych w teście otwartego pola), a hodowanie w grupie redukowało zachowania lekowe, łagodziło odpowiedzi ze strony układu neuroendokrynnego i układu krążenia na stres (Nair i in., 2005; Kikusui i in., 2006) oraz obniżało siłę odruchu wzdrygnięcia (ang. acoustic startle reflex, ASR), który jest miarą pobudzenia emocjonalnego (Nair i in., 2005). Izolacja społeczna wpływała też na zmianę ekspresji receptorów OXY i CRF w mózgu (Nair i in., 2005). Nasze obserwacje sugerują również, że do zajścia buforowania społecznego potrzebny jest aktywny udział pozostałych osobników (Górkiewicz i in., w przygotowaniu). Opisane powyżej wyniki literaturowe są zgodne z wynikami eksperymentu, w którym sztucznie uwolniono endogenną oksytocynę w CeA poprzez stymulację optogenetyczną. Działanie przeciwlękowe OXY w CeA u obserwatora skutkowało spadkiem zachowań charakterystycznych dla społecznego transferu strachu oraz zachowań społecznych, a w konsekwencji zaburzało buforowanie społeczne strachu demonstratora, na co wskazuje przezentowany przez niego podniesiony poziom unikania w teście eksploracji. Natomiast podczas farmakologicznego blokowania receptora OXY w CeA obserwatora obserwowano wzmożenie zachowań mających na celu szacowanie ryzyka oraz społecznych zachowań eksploracyjnych, co polepszyło efekt buforowania społecznego (mierzony u demonstratorów w teście eksploracji). Można zatem wyciągnąć wniosek, że współdzielenie emocji strachu i związana z tym aktywność CeA jest istotne zarówno dla aktywnego przepływu emocji strachu, jak i - pośrednio - dla zjawiska buforowania społecznego u szczura. Ponadto, wyniki analizy komunikacji

ultradźwiękowej wskazują na pozytywne aspekty interakcji społecznej podczas społecznego transferu strachu, wpierając przedstawiononą powyżej interpretację. Zaobserwowano bowiem wzmożenie wokalizacji ultradźwiękowych w paśmie pozytywno-afiliacyjnym (50 kHz, Hamed i Kursa, 2020), nie zarejestrowano natomiast wokalizacji alarmowych (22 KHz), charakterystycznych głównie dla zdarzeń o negatywnej walencji.

Podsumowując, dla zajścia efektu buforowania społecznego u demonstratorów podczas społecznego transferu strachu potrzebny jest aktywny udział obserwatorów wyrażony wzmożeniem zachowań mających na celu oszacowanie ryzyka oraz społecznych zachowań eksploracyjnych. Interakcja społeczna podczas społecznego transferu strachu zawiera elementy o pozytywnej walencji, co pośrednio potwierdza wystąpienie ultrawokalizacji wiązanych u szczurów ze zdarzeniami pozytywnymi.

8.5. Aktywacja projekcji wchodzących do CeA przez społeczny transfer strachu

W niniejszej pracy analizowano aktywację funkcjonalnych projekcji wchodzących do CeA z części brzusznej i grzbietowej kory przedczołowej, części agranularnej i granularnej kory wyspowej, obszaru CA1 i zakrętu zębatego hipokampa oraz jądra podstawno-bocznego ciała migdałowatego. Poniżej przedyskutowano potencjalne znaczenie projekcji, których aktywacja była najsilniejsza.

8.5.1. Projekcje z kory wyspowej do CeA

Analiza funkcjonalnych projekcji z AI do CeA wykazała, że znaczna część (około 27%) neuronów AI wysyłających projekcje do CeA jest aktywnych podczas społecznego transferu strachu. Do analizy wybrano przednią część kory wyspy ze względu na jej zaangażowanie w procesy empatyczne (Lamm i Singer, 2010) oraz istnienie obwodów pobudzanych zarówno przez bodźce społeczne, jak i niespołeczne (Keysers i Gazzola, 2009).

Neuroobrazowanie ludzkiego mózgu sugeruje, że w AI oceniane jest znaczenie bodźca społecznego (Uddin, 2015). Również u gryzoni wykazano, że AI odgrywa rolę w ocenie walencji oraz znaczenia bodźców społecznych (Menon i Uddin, 2010; Rogers-Carter i in., 2018). Prawdopodobne jest więc, że AI bramkuje bodźce społeczne, wysyłając informacje do innych struktur tylko o bodźcach o istotnym znaczeniu.

Niewiele wiadomo na temat funkcji projekcji AI-CeA. Natomiast, w kontekście zachowań społecznych zbadano projekcje z AI do jądra półleżącego (NAcc). U szczurów projekcje te są selektywnie aktywowane podczas interakcji z zestresowanym młodym osobnikiem i są kluczowe, do tego aby obserwator zbliżył się do demonstratora (Rogers-Carter i in., 2018). Aktywność AI pod nieobecność bodźców społecznych nie wpływała natomiast na zbliżanie się bądź unikanie obiektów nieożywionych (Rogers-Carter i in., 2018). AI wydaje się więc w tym przypadku działać specyficznie w stosunku do bodźców społecznych, choć nie jest potrzebna do zajścia typowej społecznej interakcji pomiędzy naiwnymi szczurami (Christianson i in., 2011). Zbliżanie się do młodszych i unikanie starszych osobników może mieć swoje źródło w konieczności sprawowania opieki nad młodymi u szczurów, zachowania takie są wzmacniane poprzez aktywację układu nagrody (O'Connell i Hofmann, 2011). Natomiast starszy, zestresowany osobnik traktowany jest raczej jako nadawca sygnałów o potencjalnym zagrożeniu (w czym pośredniczą projekcje wysyłane do BLA, Rogers-Carter i in., 2018). Podobnie, wśród dorosłych ludzi, obserwuje się większe skłonności do pomagania dzieciom i okazywania mniej współczucia dorosłym (Batson i Powell, 2003). Wyniki te pokazują, że projekcje z AI mogą modulować zachowania społeczne, w szczególności motywację do wchodzenia w interakcję.

W modelu społecznego transferu strachu obserwuje się wzrost eksploracyjnych zachowań społecznych u obserwatora. Choć w literaturze raportowane jest zazwyczaj unikanie dorosłych zestresowanych osobników, w modelu społecznego transferu strachu przeciwna tendencja jest prawdopodobnie spowodowana więzią nawiązaną pomiędzy obserwatorem a demonstratorem (są to zwierzęta pochodzące z tej samej hodowli, hodowane w parach co najmniej 3 tygodnie przed dniem eksperymentu). Wyniki zawarte w tej pracy pokazują, że aktywacja subpopulacji specyficznej dla społecznego transferu strachu oraz zablokowanie transmisji oksytocynowej w CeA wpływają na ocenę znaczenia bodźca społecznego świadczącego o zagrożeniu, jednak zależność tego procesu od AI wymaga dalszej weryfikacji.

Niewiele wiadomo na temat roli kory wyspowej w kontekście eksploracji. Porównanie średniej gęstości c-Fos pomiędzy modelami społecznego transferu strachu (w którym zwierzęta mają swobodę eksploracji środowiska) z bezpośrednim obserwacyjnym uczeniem się strachu (w którym zwierzęta zamierają) nie wykazało znacznych różnic (Andraka i in., 2020). Z drugiej strony zaobserwowano więcej aktywnych komórek w AI wysyłających projekcje do CeA w modelu społecznego transferu strachu w porównaniu z sytuacją, w której szczur obserwuje warunkowanie strachu u partnera (Andraka i in., 2020). Wyniki te mogą stanowić wskazanie do systematycznego porównania roli projekcji AI-CeA w eksploracji społecznej i niespołecznej.

8.5.2. Społeczny transfer strachu a obwody strachu w korze przedczołowej

Interakcje ciała migdałowatego z korą mózgową modulują zachowanie zwierzęcia w odpowiedzi na bodźce zagrażające (Knapska i Maren, 2009; Gozzi i in., 2010; Moscarello i LeDoux, 2013; Martínez-Rivera i in., 2019). Obserwuje się różne wzorce ekspresji białka c-Fos podczas nabywania, ekspresji i wygaszania strachu: grzbietowa część przyśrodkowej kory przedczołowej (PL, ang. prelimbic cortex) i przednia kora zakrętu obręczy (ACC, ang. anterior cingulate cortex) są uznawane za zaangażowane w ekspresję warunkowego strachu, a brzuszna część przyśrodkowej kory przedczołowej (IL, ang. infralimbic cortex) za jego wygaszanie, sugeruje się zatem ich przeciwstawną rolę w tych procesach. Zaobserwowano na przykład, że PL wykazuje podniesioną ekspresję białka c-Fos, kiedy szczury są eksponowane na zapach kota w małej, ograniczonej przestrzeni (McGregor i in., 2004). Podanie midazolamu znosi natomiast efekt aktywacji kory prelimbicznej podczas tego testu. Ponadto kora prelimbiczna nie aktywuje się, kiedy szczury maja możliwość ucieczki w czasie testu, co sugeruje, że jest ona zaangażowana w zachowania związane z pasywnymi strategiami unikania zagrożenia (McGregor i in., 2004). Wskazuje się też na udział kory przedczołowej w procesach buforowania społecznego, wykazując równoczesną

aktywację IL i PL u szczurów poddawanych treningom awersyjnym, hodowanych w grupach (Kiyokawa i in., 2013), jak i podczas społecznego buforowania w paradygmacie wygaszania reakcji strachu (Górkiewicz i in., w przygotowaniu). Również udział ACC został dobrze zbadany w ludzkich i zwierzęcych modelach zarażania emocjonalnego (Wicker i in., 2003; Singer i in., 2004; Han i in., 2019), co szczegółowo opisano we Wstępie. Opisana w niniejszej pracy analiza aktywacji projekcji przez społeczny transfer strachu również sugeruje istnienie obwodów neuronalnych w PL i ACC, które aktywują się u obserwatorów w wyniku oddziaływania alarmowych bodźców społecznych wysyłanych przez partnera. Obwody te wydają się być zbliżone do tych aktywowanych przez bezpośrednie zagrożenie.

8.5.3. Projekcje z jądra podstawno-bocznego do CeA

Projekcje z jądra podstawno-bocznego (BLA) do CeA odgrywają ważną rolę nie tylko w aktywowaniu obwodów strachu (Tye i in., 2011), ale także w modulacji motywacji apetytywnej (Douglass i in., 2017). W kontekście niniejszych badań nad subpopulacją neuronów w CeA zaangażowanych w społeczny transfer strachu najbardziej interesujący wydaje się aspekt wpływu BLA na przełączanie pomiędzy pasywnymi i aktywnymi strategiami obronnymi.

Zespół Tye i in. (2011) zidentyfikował subpopulację neuronów w CeL, która zaktywowana przez BLA zmniejsza aktywność neuronalną CeM, co skutkuje redukcją zachowań lękowych u myszy. Jak wspomniano wcześniej, również oksytocynowe neurony w CeL biorą udział w obniżaniu poziomu lęku i przejściu od pasywnych do aktywnych strategii unikania zagrożenia. W ostatnich latach zidentyfikowano również neurony CRF w CeA, których aktywacja optogenetyczna wywołuje reakcję ucieczki, natomiast subpopulacja neuronów SOM+ powoduje rozhamowanie CeM i reakcję zamierania poprzez aktywację projekcji z CeM do brzuszno-bocznego PAG (Huber i in., 2005; Viviani i in., 2011; Tovote i in., 2016; Fadok i in., 2017). Według Terburg i in. (2018) projekcje wysyłane z BLA do neuronów wrażliwych na oksytocynę w CeL podlegają wzmocnieniu synaptycznemu podczas warunkowania strachu (w paradygmacie aktywnego unikania). Neurony te miałyby odgrywać centralną rolę w regulowaniu reakcji zamierania i ucieczki, a funkcja tego obwodu jest podobna u gryzoni i u ludzi. Autorzy tej pracy zaproponowali hipotezę, że wzmocnienie występujące na neuronach niewrażliwych na oksytocynę pojawiające się po ucieczce przed bezpośrednim zagrożeniem angażuje oba rodzaje neuronów: SOM+ i CRF+ i jest zależne od BLA. Autorzy sugerują również, że w przypadku oddalonego zagrożenia ucieczka może być wyrażona niezależnie od ciała migdałowatego, ale kiedy zagrożenie jest bezpośrednie ucieczka zależy od hamowania pasywnej strategii przez interakcje BLA-CeL, lub farmakologiczną aktywację CeL (poprzez infuzję agonisty receptora OXY). Hipoteza ta odnosi się to badań nad osobnikami testowanymi pojedynczo w warunkach niespołecznych. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy sugerują, że w przypadku strachu przekazywanego społecznie, w momencie kiedy zagrożenie jest oddalone, pobudzony zostaje cały obwód odpowiedzialny za aktywne i pasywne strategie obronne, oraz że równowaga obydwu tych obwodów wpływa na zachowanie przejawiane przez zwierzęta zarówno w społecznych, jak i niespołecznych warunkach.

8.6. Aktywacja projekcji wychodzących z CeA przez społeczny transfer strachu

W pracy analizowano funkcjonalne projekcje wychodzące z CeA do wybranych struktur mózgu. Zaobserwowano liczne aktywowane komórki w strukturach znajdujących się w śródmózgowiu i międzymózgowiu odbierających projekcje z CeA. W dalszej dyskusji skupiono się na strukturach, których aktywacja była najsilniejsza.

8.6.1. Projekcje z CeA do jąder szwu i istoty szarej okołowodociągowej

Zaobserwowano szczególnie silną aktywację projekcji wychodzących z CeA do jąder szwu (RN, ang. *raphe nuclei*) i substancji szarej okołowodociągowej (PAG, ang. *periaqueductal gray*). Obydwie struktury są zaangażowane w ekspresję zachowań związanych z zamieraniem i ucieczką od zagrażającego bodźca. CeA bierze udział w indukowaniu reakcji zamierania poprzez projekcje do brzusznej części PAG oraz w produkcji wokalizacji

wywołanych bólem poprzez projekcje do części grzbietowej PAG. Ekspresja reakcji zamierania i wokalizacje wywołane bólem są hamowane przez lezje CeA (Nagy i Paré, 2008)

Część grzbietowa jąder szwu (DRN, ang. *dorsal raphe nuclei*) stanowi źródło transmisji serotoninergicznej w mózgu powiązanej m.in. z poziomem lęku, ekspresją paniki, a także zachowaniami społecznymi takimi jak dążenie do walk dominacyjnych. Leki przeciwlękowe mogą redukować transmisję serotoninergiczną i w ten sposób blokować zachowania związane z wykryciem zagrożenia (Lucki, 1998).

Obydwie te struktury (PAG i DRN) współpracują podczas ekspresji zachowań lękowych. Neurony serotoninowe w częściach ogonowych DR są zaangażowane w przetwarzanie lęku, natomiast te znajdujące się w bocznych skrzydłach (lwDR, ang. *dorsal raphe lateral wing*) i części brzuszno-bocznej substancji szarej okołowodociągowej (vlPAG, ang. *ventrolateral periaqueductal gray*) odpowiadają na bodźce wywołujące panikę. Spiacci i in. (2012) ocenili koekspresję białka c-Fos i hydroksylazy tryptofanu w DR, części środkowej jądra szwu (MRN, ang. *median raphe nucleus*) i PAG po testach podniesionego labiryntu T. Pasywne unikanie wzmogło liczbę Fos-pozytywnych komórek serotoninowych w poszczególnych częściach DR i w MRN. Natomiast ucieczka powodowała wzrost koekspresji z neuronami nieserotoninowymi w lwDR, vlPAG oraz grzbietowo-bocznych i grzbietowo-przyśrodkowych kolumnach PAG.

Analiza funkcjonalnych projekcji z CeA do obydwu tych struktur w trakcie społecznego transferu strachu wykazała w nich silną ekspresję białka c-Fos w dużej subpopulacji neuronów. W kontekście modelu społecznego transferu strachu interesujący jest fakt, że mimo braku ekspresji reakcji zamierania u obserwatorów, obserwuje się u nich aktywację obwodów odpowiedzialnych za pasywne unikanie bodźca, co może wyjaśniać lepsze nabywanie reakcji strachu przez obserwatorów (poprzez otrzymanie informacji o charakterze zagrażającego bodźca od demonstratora). Jest to jednak hipoteza wymagająca dalszych, precyzyjnych weryfikacji.

Podsumowując, dane ze znakowania wstecznego i następczego zdają się potwierdzać hipotezę, że oddalone zagrożenie wzmaga aktywność obszarów korowych, w celu analizy i doboru najbardziej odpowiedniego zachowania w obliczu zagrożenia, a aktywacja bezpośrednich połączeń z jądra podstawnobocznego odgrywa ważną rolę w ocenie bliskości zagrożenia (Terburg i in., 2018). Natomiast projekcje do struktur między- i śródmózgowia, np. do PAG pozwalają na koordynowanie pasywnych i aktywnych reakcji obronnych (Mobbs i in., 2007). Mobbs i in. (2007) zaproponowali tę hipotezę w kontekście przetwarzania niespołecznych bodźców zagrażających. Jak pokazują uzyskane w niniejszej pracy wyniki aktywację podobnych obwodów można uzyskać również poprzez prezentację alarmowych bodźców społecznych w warunkach bezpiecznych. Wyjaśnienie szczegółowej roli projekcji aktywowanych przez strach przekazywany społecznie wymaga dalszych badań funkcjonalnych, w których projekcje te będą wyłączane lub aktywowane.

9. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów i analiz sformułowano następujące wnioski:

1. Aktywacja CeA podczas społecznego transferu strachu jest związana z przyjmowaniem aktywnych strategii obronnych, takich jak szacowanie ryzyka.

2. Społeczny transfer strachu pobudza u szczurów równocześnie obwody odpowiedzialne za szacowanie ryzyka i aktywne strategie obronne, jak i za pasywne strategie obronne związane z zamieraniem.

3. Oksytocyna w CeA odgrywa rolę modulującą w społecznym transferze strachu. Uwolnienie OXY w CeA powoduje zredukowanie zachowań mających na celu szacowanie ryzyka, a jej zablokowanie ich wzmożenie.

4. Zachowanie obserwatorów ma wpływ na przebieg buforowania społecznego u demonstratorów.

10. Bibliografia

1. Adolphs R (2001) The neurobiology of social cognition. Curr Opin Neurobiol 11:231–239.

2. Andraka K, Kondrakiewicz K, Rojek-Sito K, Ziegart-Sadowska K, Meyza K, Nikolaev T, Hamed A, Kursa M, Wójcik M, Danielewski K, Wiatrowska M, Kublik E, et al. (2020) More than a feeling: central amygdala mediates social transfer of information about proximity of danger. bioRxiv : 2020.02.28.969113.

3. Asok A, Draper A, Hoffman AF, Schulkin J, Lupica CR, Rosen JB (2018) Optogenetic silencing of a corticotropin-releasing factor pathway from the central amygdala to the bed nucleus of the stria terminalis disrupts sustained fear. Mol Psychiatry 23:914–922.

4. Bandura A (1971) Social Learning Theory. General Learning Press.

5. Bartal IB-A, Decety J, Mason P (2011) Helping a cagemate in need: empathy and pro-social behavior in rats. Science 334:1427–1430.

6. Batson CD, Powell AA (2003) Altruism and Prosocial Behavior. In: Handbook of Psychology, pp 463–484. American Cancer Society.

7. Beck CH, Fibiger HC (1995) Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: with and without diazepam pretreatment. J Neurosci Off J Soc Neurosci 15:709–720.

8. Ben-Ami Bartal I, Decety J, Mason P (2011) Empathy and pro-social behavior in rats. Science 334:1427–1430.

9. Bessières B, Nicole O, Bontempi B (2017) Assessing recent and remote associative olfactory memory in rats using the social transmission of food preference paradigm. Nat Protoc 12:1415–1436.

10. Blanchard DC, Griebel G, Pobbe R, Blanchard RJ (2011) Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process. Neurosci Biobehav Rev 35:991–998.

11. Blanchard DC, Meyza K (2019) Risk assessment and serotonin: Animal models and human psychopathologies. Behav Brain Res 357–358:9–17.

12. Blanchard RJ, Yudko EB, Rodgers RJ, Blanchard DC (1993) Defense system psychopharmacology: An ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. Behav Brain Res 58:155–165.

13. Bredy TW, Barad M (2009) Social modulation of associative fear learning by pheromone communication. Learn Mem Cold Spring Harb N 16:12–18.

14. Bruchey AK, Jones CE, Monfils M-H (2010) Fear conditioning by-proxy: social transmission of fear during memory retrieval. Behav Brain Res 214:80–84.

15. Brudzynski SM (2001) Pharmacological and behavioral characteristics of 22 kHz alarm calls in rats. Neurosci Biobehav Rev 25:611–617.

 Cannon WB (1915) Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear, and Rage: An Account of Recent Researches Into the Function of Emotional Excitement. D. Appleton.

17. Carrillo M, Han Y, Migliorati F, Liu M, Gazzola V, Keysers C (2019) Emotional Mirror Neurons in the Rat's Anterior Cingulate Cortex. Curr Biol CB 29:1301-1312.e6.

18. Cassell MD, Gray TS, Kiss JZ (1986) Neuronal architecture in the rat central nucleus of the amygdala: a cytological, hodological, and immunocytochemical study. J Comp Neurol 246:478–499.

19. Christianson J, Jennings JH, Ragole T, Flyer J, Benison AM, Barth D, Watkins LR, Maier SF (2011) Safety signals mitigate the consequences of

uncontrollable stress via a circuit involving the sensory insular cortex and bed nucleus of the stria terminalis. Biol Psychiatry 70:458–464.

20. Church RM (1959) Emotional reactions of rats to the pain of others. J Comp Physiol Psychol 52:132–134.

21. Ciocchi S, Herry C, Grenier F, Wolff SBE, Letzkus JJ, Vlachos I, Ehrlich I, Sprengel R, Deisseroth K, Stadler MB, Müller C, Lüthi A (2010) Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. Nature 468:277–282.

22. Colnaghi L, Clemenza K, Groleau SE, Weiss S, Snyder AM, Lopez-Rosas M, Levine AA (2016) Social Involvement Modulates the Response to Novel and Adverse Life Events in Mice. PLOS ONE 11:e0163077.

23. Colonnello V, Chen FS, Panksepp J, Heinrichs M (2013) Oxytocin sharpens self-other perceptual boundary. Psychoneuroendocrinology 38:2996–3002.

24. Cook M, Mineka S (1989) Observational conditioning of fear to fearrelevant versus fear-irrelevant stimuli in rhesus monkeys. J Abnorm Psychol 98:448–459.

25. Curran T, Franza BR (1988) Fos and Jun: the AP-1 connection. Cell 55:395–397.

26. Curran T, Miller AD, Zokas L, Verma IM (1984) Viral and cellular fos proteins: a comparative analysis. Cell 36:259–268.

27. de Hoz L, Gierej D, Lioudyno V, Jaworski J, Blazejczyk M, Cruces-Solís H, Beroun A, Lebitko T, Nikolaev T, Knapska E, Nelken I, Kaczmarek L (2018) Blocking c-Fos Expression Reveals the Role of Auditory Cortex Plasticity in Sound Frequency Discrimination Learning. Cereb Cortex N Y N 1991 28:1645–1655.

28. de Waal FBM, Preston SD (2017) Mammalian empathy: behavioural manifestations and neural basis. Nat Rev Neurosci 18:498–509.

29. Decety J, Bartal IB-A, Uzefovsky F, Knafo-Noam A (2016) Empathy as a driver of prosocial behaviour: highly conserved neurobehavioural mechanisms across species. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 371:20150077.

30. Denenberg VH (1969) Open-field bheavior in the rat: what does it mean? Ann N Y Acad Sci 159:852–859.

31. Do-Monte FH, Quiñones-Laracuente K, Quirk GJ (2015) A temporal shift in the circuits mediating retrieval of fear memory. Nature 519:460–463.

32. Douglass AM, Kucukdereli H, Ponserre M, Markovic M, Gründemann J, Strobel C, Alcala Morales PL, Conzelmann K-K, Lüthi A, Klein R (2017) Central amygdala circuits modulate food consumption through a positive-valence mechanism. Nat Neurosci 20:1384–1394.

33. Ehrlich I, Humeau Y, Grenier F, Ciocchi S, Herry C, Lüthi A (2009) Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. Neuron 62:757– 771.

34. Evans DA, Stempel AV, Vale R, Ruehle S, Lefler Y, Branco T (2018) A synaptic threshold mechanism for computing escape decisions. Nature 558:590–594.

35. Fadda R, Parisi M, Ferretti L, Saba G, Foscoliano M, Salvago A, Doneddu G (2016) Exploring the Role of Theory of Mind in Moral Judgment: The Case of Children with Autism Spectrum Disorder. Front Psychol 7 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4834434/.

36. Fadok JP, Krabbe S, Markovic M, Courtin J, Xu C, Massi L, Botta P, Bylund K, Müller C, Kovacevic A, Tovote P, Lüthi A (2017) A competitive

inhibitory circuit for selection of active and passive fear responses. Nature 542:96–100.

37. Fanselow MS (1994) Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. Psychon Bull Rev 1:429–438.

38. Farina Lipari E, Valentino B, Lipari D (1995) Immunohistochemical research on oxytocin in the hypothalamic accessory nuclei. Ital J Anat Embryol Arch Ital Anat Ed Embriologia 100:189–193.

39. Ferguson JN, Aldag JM, Insel TR, Young LJ (2001) Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. J Neurosci Off J Soc Neurosci 21:8278–8285.

40. Ferretti V, Maltese F, Contarini G, Nigro M, Bonavia A, Huang H, Gigliucci V, Morelli G, Scheggia D, Managò F, Castellani G, Lefevre A, Cancedda L, Chini B, Grinevich V, Papaleo F (2019) Oxytocin Signaling in the Central Amygdala Modulates Emotion Discrimination in Mice. Curr Biol 29:1938-1953.e6.

41. Fischer-Shofty M, Shamay-Tsoory SG, Harari H, Levkovitz Y (2010) The effect of intranasal administration of oxytocin on fear recognition. Neuropsychologia 48:179–184.

42. Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ (2004) The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. Science 304:881–883.

43. Gallagher M, Schoenbaum G (1999) Functions of the amygdala and related forebrain areas in attention and cognition. Ann N Y Acad Sci 877:397–411.

44. Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, Nugent TF, Herman DH, Clasen LS, Toga AW, Rapoport JL, Thompson PM

(2004) Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. Proc Natl Acad Sci 101:8174–8179.

45. Gonzalez-Liencres C, Juckel G, Tas C, Friebe A, Brüne M (2014) Emotional contagion in mice: the role of familiarity. Behav Brain Res 263:16–21.

46. Gozzi A, Jain A, Giovannelli A, Giovanelli A, Bertollini C, Crestan V, Schwarz AJ, Tsetsenis T, Ragozzino D, Gross CT, Bifone A (2010) A neural switch for active and passive fear. Neuron 67:656–666.

47. Gray JA, McNaughton N (2003) The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry Into the Function of the Septo-hippocampal System. OUP Oxford.

48. Greenberg ME, Ziff EB, Greene LA (1986) Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. Science 234:80–83.

49. Gunnar MR, Hostinar CE, Sanchez MM, Tottenham N, Sullivan RM (2015) Parental buffering of fear and stress neurobiology: Reviewing parallels across rodent, monkey, and human models. Soc Neurosci 10:474–478.

50. Guzmán YF, Tronson NC, Jovasevic V, Sato K, Guedea AL, Mizukami H, Nishimori K, Radulovic J (2013a) Fear-enhancing effects of septal oxytocin receptors. Nat Neurosci 16:1185–1187.

51. Guzmán YF, Tronson NC, Jovasevic V, Sato K, Guedea AL, Mizukami H, Nishimori K, Radulovic J (2013b) Fear-enhancing effects of septal oxytocin receptors. Nat Neurosci 16:1185–1187.

52. Guzmán YF, Tronson NC, Sato K, Mesic I, Guedea AL, Nishimori K, Radulovic J (2014) Role of oxytocin receptors in modulation of fear by social memory. Psychopharmacology (Berl) 231:2097–2105.

53. Han Y, Bruls R, Soyman E, Thomas RM, Pentaraki V, Jelinek N, Heinemans M, Bassez I, Verschooren S, Pruis I, Lierde TV, Carrillo N, Gazzola

V, Carrillo M, Keysers C (2019) Bidirectional cingulate-dependent danger information transfer across rats. PLOS Biol 17:e3000524.

54. Hartley ND, Gaulden AD, Báldi R, Winters ND, Salimando GJ, Rosas-Vidal LE, Jameson A, Winder DG, Patel S (2019) Dynamic remodeling of a basolateral-to-central amygdala glutamatergic circuit across fear states. Nat Neurosci 22:2000–2012.

55. Hasan MT et al. (2019) A Fear Memory Engram and Its Plasticity in the Hypothalamic Oxytocin System. Neuron 103:133-146.e8.

56. Haubensak W, Kunwar PS, Cai H, Ciocchi S, Wall NR, Ponnusamy R, Biag J, Dong H-W, Deisseroth K, Callaway EM, Fanselow MS, Lüthi A, Anderson DJ (2010) Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear. Nature 468:270–276.

57. Hennessy MB, Kaiser S, Sachser N (2009) Social buffering of the stress response: diversity, mechanisms, and functions. Front Neuroendocrinol 30:470–482.

58. Hess U, Fischer A (2013) Emotional mimicry as social regulation. Personal Soc Psychol Rev Off J Soc Personal Soc Psychol Inc 17:142–157.

59. Hess US, Lynch G, Gall CM (1995) Regional patterns of c-fos mRNA expression in rat hippocampus following exploration of a novel environment versus performance of a well-learned discrimination. J Neurosci Off J Soc Neurosci 15:7796–7809.

60. Hooker CI, Germine LT, Knight RT, D'Esposito M (2006) Amygdala Response to Facial Expressions Reflects Emotional Learning. J Neurosci 26:8915–8922.

61. Horner V, Proctor D, Bonnie KE, Whiten A, Waal FBM de (2010) Prestige Affects Cultural Learning in Chimpanzees. PLOS ONE 5:e10625. 62. Huber D, Veinante P, Stoop R (2005) Vasopressin and oxytocin excite distinct neuronal populations in the central amygdala. Science 308:245–248.

63. Hurlemann R, Patin A, Onur OA, Cohen MX, Baumgartner T, Metzler S, Dziobek I, Gallinat J, Wagner M, Maier W, Kendrick KM (2010) Oxytocin Enhances Amygdala-Dependent, Socially Reinforced Learning and Emotional Empathy in Humans. J Neurosci 30:4999–5007.

64. Inagaki H, Kiyokawa Y, Tamogami S, Watanabe H, Takeuchi Y, Mori Y (2014) Identification of a pheromone that increases anxiety in rats. Proc Natl Acad Sci U S A 111:18751–18756.

65. Insel TR, Shapiro LE (1992) Oxytocin receptor distribution reflects social organization in monogamous and polygamous voles. Proc Natl Acad Sci U S A 89:5981–5985.

66. Insel TR, Young LJ (2001) The neurobiology of attachment. Nat Rev Neurosci 2:129–136.

67. Jabbi M, Swart M, Keysers C (2007) Empathy for positive and negative emotions in the gustatory cortex. NeuroImage 34:1744–1753.

68. Janak PH, Tye KM (2015) From circuits to behaviour in the amygdala. Nature 517:284–292.

69. Jeon D, Kim S, Chetana M, Jo D, Ruley HE, Lin S-Y, Rabah D, Kinet J-P, Shin H-S (2010) Observational fear learning involves affective pain system and Cav1.2 Ca2+ channels in ACC. Nat Neurosci 13:482–488.

70. Joiner J, Piva M, Turrin C, Chang SWC (2017) Social learning through prediction error in the brain. Npj Sci Learn 2:1–9.

71. Kaczmarek L, Siedlecki JA, Danysz W (1988) Proto-oncogene c-fos induction in rat hippocampus. Brain Res 427:183–186.

72. Kamińska B, Lukasiuk K, Kaczmarek L (1994) Seizures-evoked activation of transcription factors. Acta Neurobiol Exp (Warsz) 54:65–72.

73. Kanel D, Al-Wasity S, Stefanov K, Pollick FE (2019) Empathy to emotional voices and the use of real-time fMRI to enhance activation of the anterior insula. NeuroImage 198:53–62.

74. Keysers C, Gazzola V (2009) Expanding the mirror: vicarious activity for actions, emotions, and sensations. Curr Opin Neurobiol 19:666–671.

75. Keysers C, Gazzola V (2010) Social neuroscience: mirror neurons recorded in humans. Curr Biol CB 20:R353-354.

76. Keysers C, Paracampo R, Gazzola V (2018) What neuromodulation and lesion studies tell us about the function of the mirror neuron system and embodied cognition. Curr Opin Psychol 24:35–40.

77. Kikusui T, Winslow JT, Mori Y (2006) Social buffering: relief from stress and anxiety. Philos Trans R Soc B Biol Sci 361:2215–2228.

78. Kim J, Zhang X, Muralidhar S, LeBlanc SA, Tonegawa S (2017) Basolateral to Central Amygdala Neural Circuits for Appetitive Behaviors. Neuron 93:1464-1479.e5.

79. Kirsch P, Esslinger C, Chen Q, Mier D, Lis S, Siddhanti S, Gruppe H, Mattay VS, Gallhofer B, Meyer-Lindenberg A (2005) Oxytocin modulates neural circuitry for social cognition and fear in humans. J Neurosci Off J Soc Neurosci 25:11489–11493.

80. Kirschbaum C, Klauer T, Filipp SH, Hellhammer DH (1995) Sex-specific effects of social support on cortisol and subjective responses to acute psychological stress. Psychosom Med 57:23–31.

81. Kiyokawa Y, Hennessy MB (2018) Comparative studies of social buffering: A consideration of approaches, terminology, and pitfalls. Neurosci Biobehav Rev 86:131–141.

82. Kiyokawa Y, Hiroshima S, Takeuchi Y, Mori Y (2014) Social buffering reduces male rats' behavioral and corticosterone responses to a conditioned stimulus. Horm Behav 65:114–118.

83. Kiyokawa Y, Kodama Y, Takeuchi Y, Mori Y (2013) Physical interaction is not necessary for the induction of housing-type social buffering of conditioned hyperthermia in male rats. Behav Brain Res 256:414–419.

84. Kiyokawa Y, Takeuchi Y, Mori Y (2007) Two types of social buffering differentially mitigate conditioned fear responses. Eur J Neurosci 26:3606–3613.

85. Knapska E, Lioudyno V, Kiryk A, Mikosz M, Górkiewicz T, Michaluk P, Gawlak M, Chaturvedi M, Mochol G, Balcerzyk M, Wojcik DK, Wilczynski GM, Kaczmarek L (2013) Reward learning requires activity of matrix metalloproteinase-9 in the central amygdala. J Neurosci Off J Soc Neurosci 33:14591–14600.

86. Knapska E, Macias M, Mikosz M, Nowak A, Owczarek D, Wawrzyniak M, Pieprzyk M, Cymerman IA, Werka T, Sheng M, Maren S, Jaworski J, Kaczmarek L (2012) Functional anatomy of neural circuits regulating fear and extinction. Proc Natl Acad Sci U S A 109:17093–17098.

87. Knapska E, Maren S (2009) Reciprocal patterns of c-Fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala after extinction and renewal of conditioned fear. Learn Mem Cold Spring Harb N 16:486–493.

88. Knapska E, Mikosz M, Werka T, Maren S (2010) Social modulation of learning in rats. Learn Mem Cold Spring Harb N 17:35–42.

89. Knapska E, Nikolaev E, Boguszewski P, Walasek G, Blaszczyk J, Kaczmarek L, Werka T (2006) Between-subject transfer of emotional information evokes specific pattern of amygdala activation. Proc Natl Acad Sci U S A 103:3858–3862.

90. Knapska E, Radwanska K, Werka T, Kaczmarek L (2007) Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. Physiol Rev 87:1113–1173.

91. Knobloch HS, Charlet A, Hoffmann LC, Eliava M, Khrulev S, Cetin AH, Osten P, Schwarz MK, Seeburg PH, Stoop R, Grinevich V (2012) Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. Neuron 73:553– 566.

92. Lahoud N, Maroun M (2013) Oxytocinergic manipulations in corticolimbic circuit differentially affect fear acquisition and extinction. Psychoneuroendocrinology 38:2184–2195.

93. Laird JD (1974) Self-attribution of emotion: the effects of expressive behavior on the quality of emotional experience. J Pers Soc Psychol 29:475–486.

94. Lakin JL, Chartrand TL (2003) Using Nonconscious Behavioral Mimicry to Create Affiliation and Rapport. Psychol Sci 14:334–339.

95. Laland KN (2004) Social learning strategies. Anim Learn Behav 32:4–14.

96. Lamm C, Singer T (2010) The role of anterior insular cortex in social emotions. Brain Struct Funct 214:579–591.

97. Lane JD, Wellman HM, Olson SL, LaBounty J, Kerr DCR (2010) Theory of Mind and Emotion Understanding Predict Moral Development in Early Childhood. Br J Dev Psychol 28:871–889.

98. Lavin C, Melis C, Mikulan E, Gelormini C, Huepe D, Ibañez A (2013) The anterior cingulate cortex: an integrative hub for human socially-driven interactions. Front Neurosci 7 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3647221/.

99. Lebitko T, Dzik J, Jędrzejewska-Szmek J, Chaturvedi M, Jaworski T, Nikolaev T, Meyza K, Kaczmarek L, Knapska E (2020) c-Fos-MMP-9 pathway in central amygdala mediates approach motivation but not reward consumption. bioRxiv:2020.04.17.044792.

100. Lebowitz ER, Shic F, Campbell D, MacLeod J, Silverman WK (2015) Avoidance moderates the association between mothers' and children's fears: findings from a novel motion-tracking behavioral assessment. Depress Anxiety 32:91–98.

101. LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. Annu Rev Neurosci 23:155–184.

102. Li H, Penzo MA, Taniguchi H, Kopec CD, Huang ZJ, Li B (2013) Experience-dependent modification of a central amygdala fear circuit. Nat Neurosci 16:332–339.

103. Li Y, Zhang T, Li W, Zhang J, Jin Z, Li L (2020) Linking brain structure and activation in anterior insula cortex to explain the trait empathy for pain. Hum Brain Mapp 41:1030–1042.

104. Lindström B, Haaker J, Olsson A (2018) A common neural network differentially mediates direct and social fear learning. NeuroImage 167:121–129.

105. Lipari EF, Lipari D, Gerbino A, Di Liberto D, Bellafiore M, Catalano M, Valentino B (2001) The hypothalamic magnocellular neurosecretory system in developing rats. Eur J Histochem EJH 45:163–168.
106. Lockwood PL (2016) The anatomy of empathy: Vicarious experience and disorders of social cognition. Behav Brain Res 311:255–266.

107. Lockwood PL, Apps MAJ, Valton V, Viding E, Roiser JP (2016) Neurocomputational mechanisms of prosocial learning and links to empathy. Proc Natl Acad Sci 113:9763–9768.

108. Lucki I (1998) The spectrum of behaviors influenced by serotonin. Biol Psychiatry 44:151–162.

109. Malkani S, Rosen JB (2000) Differential expression of EGR-1 mRNA in the amygdala following diazepam in contextual fear conditioning. Brain Res 860:53–63.

110. Marlin BJ, Mitre M, D'amour JA, Chao MV, Froemke RC (2015) Oxytocin enables maternal behaviour by balancing cortical inhibition. Nature 520:499–504.

111. Martinez RCR, Gupta N, Lázaro-Muñoz G, Sears RM, Kim S, Moscarello JM, LeDoux JE, Cain CK (2013) Active vs. reactive threat responding is associated with differential c-Fos expression in specific regions of amygdala and prefrontal cortex. Learn Mem 20:446–452.

112. Martínez-Rivera FJ, Bravo-Rivera C, Velázquez-Díaz CD, Montesinos-Cartagena M, Quirk GJ (2019) Prefrontal circuits signaling active avoidance retrieval and extinction. Psychopharmacology (Berl) 236:399–406.

113. McCall JG, Al-Hasani R, Siuda ER, Hong DY, Norris AJ, Ford CP, Bruchas MR (2015) CRH Engagement of the Locus Coeruleus Noradrenergic System Mediates Stress-Induced Anxiety. Neuron 87:605–620.

114. McGregor IS, Hargreaves GA, Apfelbach R, Hunt GE (2004) Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. J Neurosci Off J Soc Neurosci 24:4134–4144.

115. McNaughton N, Corr PJ (2004) A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. Neurosci Biobehav Rev 28:285–305.

116. Menon V, Uddin LQ (2010) Saliency, switching, attention and control: a network model of insula function. Brain Struct Funct 214:655–667.

117. Meyza K, Nikolaev T, Kondrakiewicz K, Blanchard DC, Blanchard RJ, Knapska E (2015) Neuronal correlates of asocial behavior in a BTBR T (+) Itpr3(tf)/J mouse model of autism. Front Behav Neurosci 9:199.

118. Meyza KZ, Bartal IB-A, Monfils MH, Panksepp JB, Knapska E (2017) The roots of empathy: Through the lens of rodent models. Neurosci Biobehav Rev 76:216–234.

119. Michaluk P, Wawrzyniak M, Alot P, Szczot M, Wyrembek P, Mercik K, Medvedev N, Wilczek E, De Roo M, Zuschratter W, Muller D, Wilczynski GM, Mozrzymas JW, Stewart MG, Kaczmarek L, Wlodarczyk J (2011) Influence of matrix metalloproteinase MMP-9 on dendritic spine morphology. J Cell Sci 124:3369–3380.

120. Mikami K, Kiyokawa Y, Takeuchi Y, Mori Y (2016) Social buffering enhances extinction of conditioned fear responses in male rats. Physiol Behav 163:123–128.

121. Milanovic S, Radulovic J, Laban O, Stiedl O, Henn F, Spiess J (1998) Production of the Fos protein after contextual fear conditioning of C57BL/6N mice. Brain Res 784:37–47.

122. Mitre M, Marlin BJ, Schiavo JK, Morina E, Norden SE, Hackett TA, Aoki CJ, Chao MV, Froemke RC (2016) A Distributed Network for Social Cognition Enriched for Oxytocin Receptors. J Neurosci Off J Soc Neurosci 36:2517–2535.

123. Mitre M, Minder J, Morina EX, Chao MV, Froemke RC (2018) Oxytocin Modulation of Neural Circuits. Curr Top Behav Neurosci 35:31–53. 124. Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, Dolan RJ, Frith CD (2007) When fear is near: threat imminence elicits prefrontalperiaqueductal gray shifts in humans. Science 317:1079–1083.

125. Moga MM, Gray TS (1985) Evidence for corticotropin-releasing factor, neurotensin, and somatostatin in the neural pathway from the central nucleus of the amygdala to the parabrachial nucleus. J Comp Neurol 241:275–284.

126. Monfils MH, Agee LA (2019) Insights from social transmission of information in rodents. Genes Brain Behav 18:e12534.

127. Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T (1987) Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. Science 237:192–197.

128. Moscarello JM, LeDoux JE (2013) Active avoidance learning requires prefrontal suppression of amygdala-mediated defensive reactions. J Neurosci Off J Soc Neurosci 33:3815–3823.

129. Mulvihill KG, Brudzynski SM (2018) Non-pharmacological induction of rat 50 kHz ultrasonic vocalization: Social and non-social contexts differentially induce 50 kHz call subtypes. Physiol Behav 196:200–207.

130. Nagy FZ, Paré D (2008) Timing of Impulses From the Central Amygdala and Bed Nucleus of the Stria Terminalis to the Brain Stem. J Neurophysiol 100:3429–3436.

131. Nair HP, Gutman AR, Davis M, Young LJ (2005) Central Oxytocin, Vasopressin, and Corticotropin-Releasing Factor Receptor Densities in the Basal Forebrain Predict Isolation Potentiated Startle in Rats. J Neurosci 25:11479– 11488.

132. Namburi P, Beyeler A, Yorozu S, Calhoon GG, Halbert SA, Wichmann R, Holden SS, Mertens KL, Anahtar M, Felix-Ortiz AC, Wickersham IR, Gray JM,

Tye KM (2015a) A circuit mechanism for differentiating positive and negative associations. Nature 520:675–678.

133. Namburi P, Beyeler A, Yorozu S, Calhoon GG, Halbert SA, Wichmann R, Holden SS, Mertens KL, Anahtar M, Felix-Ortiz AC, Wickersham IR, Gray JM, Tye KM (2015b) A circuit mechanism for differentiating positive and negative associations. Nature 520:675–678.

134. Nishimori K, Young LJ, Guo Q, Wang Z, Insel TR, Matzuk MM (1996) Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. Proc Natl Acad Sci U S A 93:11699–11704.

135. O'Connell LA, Hofmann HA (2011) The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: a comparative synthesis. J Comp Neurol 519:3599–3639.

136. Olsson A, Knapska E, Lindström B (2020) The neural and computational systems of social learning. Nat Rev Neurosci 21:197–212.

137. Olsson A, Phelps EA (2007) Social learning of fear. Nat Neurosci 10:1095–1102.

138. Orsini CA, Kim JH, Knapska E, Maren S (2011) Hippocampal and prefrontal projections to the basal amygdala mediate contextual regulation of fear after extinction. J Neurosci Off J Soc Neurosci 31:17269–17277.

139. Oumi T, Ukena K, Matsushima O, Ikeda T, Fujita T, Minakata H, Nomoto K (1996) Annetocin, an annelid oxytocin-related peptide, induces egg-laying behavior in the earthworm, Eisenia foetida. J Exp Zool 276:151–156.

140. Panksepp J, Panksepp JB (2013) Toward a cross-species understanding of empathy. Trends Neurosci 36:489–496.

141. Paxinos G, Watson C (2013) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition. Academic Press.

142. Penzo MA, Robert V, Li B (2014) Fear Conditioning Potentiates Synaptic Transmission onto Long-Range Projection Neurons in the Lateral Subdivision of Central Amygdala. J Neurosci 34:2432–2437.

143. Plutchik R (1980) Emotion, a Psychoevolutionary Synthesis. Harper & Row.

144. Preston SD, de Waal FBM (2002) Empathy: Its ultimate and proximate bases. Behav Brain Sci 25:1–20; discussion 20-71.

145. Radwanska K, Nikolaev E, Knapska E, Kaczmarek L (2002) Differential response of two subdivisions of lateral amygdala to aversive conditioning as revealed by c-Fos and P-ERK mapping. Neuroreport 13:2241–2246.

146. Ramos L, Hicks C, Kevin R, Caminer A, Narlawar R, Kassiou M, McGregor IS (2013) Acute prosocial effects of oxytocin and vasopressin when given alone or in combination with 3,4-methylenedioxymethamphetamine in rats: involvement of the V1A receptor. Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol 38:2249–2259.

147. Rilling JK, Young LJ (2014) The biology of mammalian parenting and its effect on offspring social development. Science 345:771–776.

148. Rogers-Carter MM, Christianson JP (2019) An Insular View of the Social Decision-Making Network. Neurosci Biobehav Rev 103:119–132.

149. Rogers-Carter MM, Varela JA, Gribbons KB, Pierce AF, McGoey MT, Ritchey M, Christianson JP (2018) Insular Cortex Mediates Approach and Avoidance Responses to Social Affective Stimuli. Nat Neurosci 21:404–414.

150. Sanchez-Andrade G, Kendrick KM (2009) The main olfactory system and social learning in mammals. Behav Brain Res 200:323–335.

151. Sanford CA, Soden ME, Baird MA, Miller SM, Schulkin J, Palmiter RD, Clark M, Zweifel LS (2017) A Central Amygdala CRF Circuit Facilitates Learning about Weak Threats. Neuron 93:164–178.

152. Savonenko A, Filipkowski RK, Werka T, Zielinski K, Kaczmarek L (1999) Defensive conditioning-related functional heterogeneity among nuclei of the rat amygdala revealed by c-Fos mapping. Neuroscience 94:723–733.

153. Schwarting RKW (2018) Ultrasonic vocalization in juvenile and adult male rats: A comparison among stocks. Physiol Behav 191:1–11.

154. Shamay-Tsoory SG, Abu-Akel A (2016) The Social Salience Hypothesis of Oxytocin. Biol Psychiatry 79:194–202.

155. Singer T, Seymour B, O'Doherty J, Kaube H, Dolan RJ, Frith CD (2004) Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain. Science 303:1157–1162.

156. Spiacci A, Coimbra NC, Zangrossi H (2012) Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors. Neuroscience 227:350–360.

157. Steinman MQ, Duque-Wilckens N, Trainor BC (2019) Complementary Neural Circuits for Divergent Effects of Oxytocin: Social Approach Versus Social Anxiety. Biol Psychiatry 85:792–801.

158. Szklarczyk A, Lapinska J, Rylski M, McKay RDG, Kaczmarek L (2002) Matrix Metalloproteinase-9 Undergoes Expression and Activation during Dendritic Remodeling in Adult Hippocampus. J Neurosci 22:920–930. 159. Terburg D, Scheggia D, Triana Del Rio R, Klumpers F, Ciobanu AC, Morgan B, Montoya ER, Bos PA, Giobellina G, van den Burg EH, de Gelder B, Stein DJ, Stoop R, van Honk J (2018) The Basolateral Amygdala Is Essential for Rapid Escape: A Human and Rodent Study. Cell 175:723-735.e16.

160. Theodoridou A, Penton-Voak IS, Rowe AC (2013) A Direct Examination of the Effect of Intranasal Administration of Oxytocin on Approach-Avoidance Motor Responses to Emotional Stimuli. PLOS ONE 8:e58113.

161. Thorsteinsson EB, James JE, Gregg ME (1998) Effects of video-relayed social support on hemodynamic reactivity and salivary cortisol during laboratory-based behavioral challenge. Health Psychol Off J Div Health Psychol Am Psychol Assoc 17:436–444.

162. Tovote P, Esposito MS, Botta P, Chaudun F, Fadok JP, Markovic M, Wolff SBE, Ramakrishnan C, Fenno L, Deisseroth K, Herry C, Arber S, Lüthi A (2016) Midbrain circuits for defensive behaviour. Nature 534:206–212.

163. Twining RC, Vantrease JE, Love S, Padival M, Rosenkranz JA (2017) An intra-amygdala circuit specifically regulates social fear learning. Nat Neurosci 20:459–469.

164. Tye KM, Prakash R, Kim S-Y, Fenno LE, Grosenick L, Zarabi H, Thompson KR, Gradinaru V, Ramakrishnan C, Deisseroth K (2011) Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. Nature 471:358–362.

165. Uddin LQ (2015) Salience processing and insular cortical function and dysfunction. Nat Rev Neurosci 16:55–61.

166. Veinante P, Freund-Mercier MJ (1997) Distribution of oxytocin- and vasopressin-binding sites in the rat extended amygdala: a histoautoradiographic study. J Comp Neurol 383:305–325.

167. Viviani D, Charlet A, van den Burg E, Robinet C, Hurni N, Abatis M, Magara F, Stoop R (2011) Oxytocin selectively gates fear responses through distinct outputs from the central amygdala. Science 333:104–107.

168. Wechkin S, Masserman JH, Terris W (1964) Shock to a conspecific as an aversive stimulus. Psychon Sci 1:47–48.

169. Wicker B, Keysers C, Plailly J, Royet JP, Gallese V, Rizzolatti G (2003) Both of us disgusted in My insula: the common neural basis of seeing and feeling disgust. Neuron 40:655–664.

170. Wöhr M, Houx B, Schwarting RKW, Spruijt B (2008) Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. Physiol Behav 93:766–776.

171. Yang GA, Koistinaho J, Iadarola M, Shenhua-Zhu null, Hervonen A (1990) Administration of adrenocorticotropic hormone (ACTH) enhances Fos expression in the rat adrenal cortex. Regul Pept 30:21–31.

172. Yoshida M, Takayanagi Y, Inoue K, Kimura T, Young LJ, Onaka T, Nishimori K (2009) Evidence that oxytocin exerts anxiolytic effects via oxytocin receptor expressed in serotonergic neurons in mice. J Neurosci Off J Soc Neurosci 29:2259–2271.

173. Zirlinger M, Kreiman G, Anderson DJ (2001) Amygdala-enriched genes identified by microarray technology are restricted to specific amygdaloid subnuclei. Proc Natl Acad Sci U S A 98:5270–5275.