

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Eliška Nováková

**Význam nikotinových acetylcholinových receptorů v prefrontální kůře pro řízení
úzkostného chování a potenciální léčbu úzkostných poruch**

The role of nicotinic acetylcholine receptors expressed by prefrontal cortex in the control of fear
behavior and their potential in therapy of anxiety disorders

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: MUDr. Mgr. Helena Janíčková, Ph.D.

Praha, 2024

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce MUDr. Mgr. Heleně Janíčkové, Ph.D. za laskavý přístup, trpělivost a odborné vedení po celou dobu psaní této práce. Dále děkuji své rodině a přátelům, kteří mi jsou oporou během celého studia.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 1. 8. 2024

Eliška Nováková

Abstrakt

Úzkostné chování a s ním spojené averzivní učení umožňuje organismům rozpoznávat nebezpečné podněty a situace a účinně na ně reagovat pomocí obranných mechanismů. Jakkoli je toto chování významné pro přežití organismů, jeho poruchy mohou mít za následek psychická onemocnění včetně úzkostných a posttraumatických stresových poruch. Jednou z oblastí mozku, které se zásadním způsobem podílejí na řízení averzivního učení a chování, je prefrontální kůra. Ta je modulována acetylcholinem a nikotinovými acetylcholinovými receptory, které se v prefrontální kůře hojně nacházejí a byly identifikovány jako potenciální terapeutický cíl pro léčbu úzkostných poruch. Cílem této práce je shrnout dostupné poznatky o úloze nikotinových receptorů exprimovaných v prefrontální kůře při řízení fyziologického úzkostného chování a zhodnotit jejich potenciální význam pro léčbu úzkostných a stresových poruch.

Klíčová slova: acetylcholin, nikotinové receptory, prefrontální kůra, úzkostné poruchy, averzivní chování

Abstract

Anxiety-like behaviour and the associated learning enable organism to recognize dangerous stimuli and situations responding effectively through defensive mechanism. While this behaviour is crucial for the survival of organism its disruptions can result in psychological disorders, including anxiety and post-traumatic stress disorders. One area of the brain that significantly contributes to the regulation of fear learning and behaviour is the prefrontal cortex. Modulated by acetylcholine, the nicotinic acetylcholine receptors abundant in the prefrontal cortex have been identified as a potential therapeutic target for the treatment of anxiety disorders. The aim of this work is to summarise the available knowledge about the role of nicotinic receptors expressed in the prefrontal cortex in governing physiological fear and anxiety-like behaviour and to assess their potential significance for the treatment of anxiety and stress disorders.

Key words: acetylcholine, nicotinic receptors, prefrontal cortex, anxiety disorders, fear behavior

Seznam použitých zkratk

5HT3aR	serotoninový receptor 3a
ACC	anteriorní cingulární kůra (z angl. anterior cingular cortex)
AD	Alzheimerova choroba (z angl. Alzheimer's disease)
ACh	acetylcholin
ARS	imobilizační stres (z angl. acute restraint stress)
AVV	adeno-asociovaný virový vektor
BLA	baselaterální amygdala
CT	kortikothalamické neurony
dmPFC	dorsomediální prefrontální kůra
EPM	vyvýšené bludiště ve tvaru kříže (z angl. elevated plus maze)
EZM	vyvýšené bludiště ve tvaru kruhu (z angl. elevated zero maze)
GABA	kyselina gama amino máselná (z angl. gamma Aminobutyric acid)
GAD	generalizovaná úzkostná porucha (z angl. generalized anxiety disorder)
IL	infralimbická kůra (z angl. infralimbic cortex)
IN	interneurony
IP3	inositol trifosfát
IPn	interpedunkulární jádro
IT	intratelencefalické neurony
KBT	kognitivně behaviorální terapie
KO	knockout
L1-L6	vrstva 1-6 (z angl. layer)
LHPA	limbicko-hypothalamohypofyzárně-adrenální osa
mAChR	muskarinový acetylcholinový receptor
MDT	mediodorsální thalamus
MHb	mediální habenula
MKT	meta-kognitivní terapie
nAChR	nikotinový acetylcholinový receptor
PFC	prefrontální kůra (z angl. prefrontal cortex)
PrL	prelimbická oblast (z angl. prelimbic cortex)
PRT	úkol s rizikem trestu (z angl. Punishment Risk Task)
PT	neurony pyramidové dráhy (z angl. pyramidal tract neurons)
PTSD	post-traumatická stresová porucha (z angl. Post-Traumatic Stress Disorder)
PV	parvalbumin
PV-IN	interneurony typu parvalbumin
SST	somatostatin

SST-IN	interneurony typu somatostatin
VIP	vasoaktivní intestinální peptid
VIP-IN	interneurony typu vasoaktivní intestinální peptid
VTA	ventrální tegmentální oblast (z angl. ventral tegmental area)

Obsah

1	Úvod	1
2	Nikotinové acetylcholinové receptory	2
2.1	Struktura nikotinového receptoru.....	2
2.2	Nikotinové podjednotky.....	3
2.3	Expres podjednotek nAChR.....	8
2.4	Význam nAChR v klinických onemocněních.....	8
3	Prefrontální kůra	10
3.1	Anatomická struktura a buněčné složení prefrontální kůry se zaměřením na hlodavce	10
3.2	Expres nAChR v PFC	12
4	Význam nAChR v PFC pro řízení úzkosti a úzkostného chování	13
4.1	Úzkost, úzkostné chování a jejich poruchy.....	14
4.2	Úzkostné chování u hlodavců	15
4.3	Role PFC v řízení úzkostného chování a podmiňování strachu.....	19
4.3.1	PFC a úzkostné chování	19
4.3.2	PFC a podmiňování strachu.....	22
4.4	Role nAChR v řízení úzkostného chování a podmiňování strachu.....	23
4.5	Role $\alpha 4\beta 2$ a $\alpha 7$ nAChR v PFC.....	24
5	Závěr.....	25
6	Seznam literatury	27

1 Úvod

Nikotinové acetylcholinové receptory, ligandem ovládané iontové kanály, se nacházejí jak v centrálním, tak v periferním nervovém systému a hrají klíčovou roli v regulaci neuronální aktivity a neurotransmise. Jejich modulace ovlivňuje širokou škálu fyziologických a behaviorálních procesů, včetně synaptické plasticity, motorických funkcí, pozornosti, učení a paměti (Picciotto et al., 2001). Dysfunkce nikotinových acetylcholinových receptorů, ať už na úrovni mutací jednotlivých podjednotek, ze kterých se receptory skládají, nebo v regulaci jejich exprese, je spojována s patofyziologií řady neurologických onemocnění, jako jsou Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, epilepsie a další. Zároveň se nikotinové acetylcholinové receptory podílejí na rozvoji psychiatrických poruch, včetně schizofrenie, deprese a úzkostných poruch (Terry et al., 2023).

Oblast prefrontální kůry mozku představuje komplexní oblast, která integruje různé dálkové excitační vstupy a vysílá rozmanité výstupy do mnoha dalších mozkových oblastí. Tyto vstupní a výstupní dráhy tvoří složitou síť propojenou okruhem, ve kterém dochází ke vzájemné komunikaci excitačních a inhibičních neuronů řídicí se specifickými pravidly (Anastasiades et al., 2021). Oblasti prefrontální kůry hrají klíčovou roli v regulaci emocí a chování, a proto jsou ideální pro studium úzkostného a averzivního chování, včetně jejich buněčných a nervových mechanismů. Úzkostné poruchy, které patří mezi nejčastější psychické poruchy, se úzce propojují s averzivním chováním a učením podmiňováním strachu. Pro studium těchto komplexních fenoménů se v experimentální praxi běžně používají různé zvířecí modely, jejichž úzkostné a averzivní chování se testuje v rozmanitých testech, například testu vyvýšeného bludiště a testu chování v otevřeném poli nebo, podmiňování strachu na základě elektrických impulzů.

V této bakalářské práci se zaměřím na nikotinové acetylcholinové receptory exprimované v prefrontální kůře a na jejich roli, jakou hrají v kontextu úzkostného a averzivního chování. Nejprve popíši strukturu a funkci nikotinových receptorů, expresi nikotinových receptorů v prefrontální kůře a následně popíši jejich funkci ve fyziologických procesech i v patologických stavech, které se týkají projevů averzivního a úzkostného chování u hlodavčích laboratorních modelů.

2 Nikotinové acetylcholinové receptory

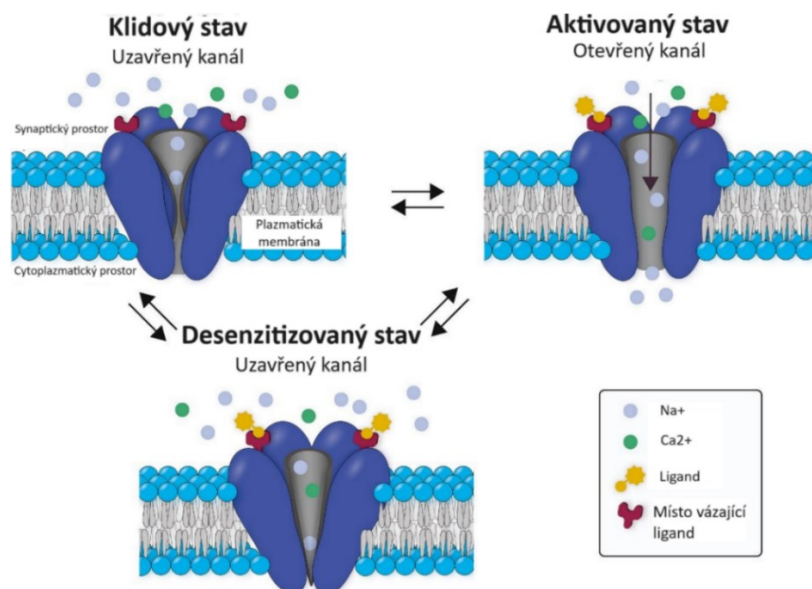
2.1 Struktura nikotinového receptoru

Molekulu acetylcholinu (ACh) řadíme mezi neurotransmitery. Působí jak na centrální nervový systém, tak i na periferní nervový systém prostřednictvím dvou odlišných typů receptorů: muskarinové (mAChR) a nikotinové (nAChR) acetylcholinové receptory (Gotti & Clementi, 2004). Rozlišujeme pět podtypů mAChR označovaných jako M1 – M5. Řadíme je do nadrodiny receptorů spřažených s G-proteiny (tzv. GPCR receptory) a jako takové se účastní pomalé metabolické odpovědi u neuronů a efektorových orgánů, jako jsou srdce, hladká svalovina či žlázy (Grando et al., 1995; Wessler & Kirkpatrick, 2008). Na druhou stranu nAChR jsou ligandem řízené iontové kanály, které zprostředkovávají rychlý synaptický přenos neurotransmiteru ACh (Jensen et al., 2005). Hlavní odlišností obou typů receptorů je jejich strukturní uspořádání.

V mozku savců se vyskytuje značná variabilita nAChR, která je dána kombinací různých nikotinových podjednotek. Existuje celkem 174 různých podjednotek: $\alpha 1 - \alpha 10$, $\beta 1 - \beta 4$, γ , δ a ϵ , avšak v neuronech se nacházejí pouze $\alpha 2 - \alpha 10$ a $\beta 2 - \beta 4$ (Dani & Bertrand, 2007; Millar & Gotti, 2009). Tyto podjednotky se sestavují kolem centrálního hydrofilního póru, čímž vytváří funkční receptorový komplex (Morales-Perez et al., 2016; Wittenberg et al., 2020). Podjednotky, které formují nAChR v nervovém systému, mohou vytvořit homopentamer (složený pouze z identických podjednotek) nebo heteropentamer (složený minimálně z jedné α a jedné β podjednotky). Tyto receptorové podtypy vznikají kombinací omezeného počtu podjednotek a mohou tak vytvářet rozsáhlý, ale stále omezený počet odlišných variant pentamerických receptorových podtypů (Albuquerque et al., 2009). Každý z nich se vyznačuje unikátními farmakologickými, fyziologickými, klinickými a distribučními vlastnostmi v závislosti na konkrétní oblasti mozku a nervových ganglií (Gotti & Clementi, 2004). Konkrétní podjednotky nAChR budou probírány v následující kapitole.

nAChR řadíme do nadrodiny ligandem řízených iontových kanálů, známých jako Cys-loop receptory (Kao & Karlin, 1986). Každá podjednotka nAChR je dlouhá 500 - 600 aminokyselinových zbytků a může být rozdělena do třech oblastí: extracelulární N-terminální doména, která nese vazebná místa pro agonisty, 4 transmembránové α šroubovice (M1–M4), které tvoří hydrofilní pór pro transport iontů, a intracelulární domény, která přispívá k vodivosti iontů (Gotti & Clementi, 2004; Sargent, 1993). Intracelulární doména se také může podílet na aktivaci metabotropních signalizačních drah (Graur et al., 2023). Vazebné místo agonisty na receptor je tvořeno hydrofilní „kapsou“, která je formovaná na rozhraní extracelulárních domén mezi sousedními podjednotkami (Albuquerque et al., 2009), a je tvořeno šesti vzájemně nepropojenými oblastmi (smyčkami A–F) (Brejc et al., 2001). Každé vazebné místo se skládá z hlavní nebo též „pozitivní“ strany tvořené smyčkami A–C a podjednotkou a komplementární nebo též negativní strany složené ze zbývajících smyček D–F sousední podjednotky, kterou poskytuje α nebo β podjednotka (Brejc et al., 2001).

Nikotinové receptory, stejně jako většina ligandem řízených iontových kanálů, mohou existovat ve více konformačních stavech (Obrázek 1): uzavřené (resting state) a schopné být aktivovány ligandem, otevřené (activated) a propustné pro malé kationty, nebo desenzitizované, znecitlivěné a uzavřené (desensitization), neschopné být tak aktivovány ligandem. Jakmile se molekula ACh nebo jiného agonisty naváže na receptor, iontový kanál se otevře a je krátce stabilizovaný v této konformaci. Tento stav umožňuje tok iontů (Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+}) do intracelulárního prostoru, dochází k posunu membránového potenciálu směrem k 0 mV a obvykle se depolarizuje membrána. Následně se kanál buď vrátí do klidového stavu (uzavřený a schopný být aktivován), nebo vstoupí do desenzitizovaného stavu, ve kterém nemůže být aktivován ACh ani jinými agonisty (Wittenberg et al., 2020). Vazba ligandů na receptory na orthosterickém vazebném místě nebo na kterémkoli z alosterických míst může ovlivnit rovnováhu mezi různými konformačními stavy receptorů (Gotti & Clementi, 2004).



Obrázek 1: Znárodnění tří hlavních funkčních stavů nAChR. V klidovém stavu nejsou ACh vazebná místa obsazena a kanál je uzavřený a nevodivý pro kationty. V otevřeném, aktivovaném stavu je iontový kanál otevřený a je propustný pro malé kationty. V desenzitizovaném stavu jsou ACh vazebná místa (obvykle) obsazena, ale kanál je uzavřený a nevodivý. Převzato a upraveno podle (Wittenberg et al., 2020).

2.2 Nikotinové podjednotky

Rozmanitost nAChR je jedna z klíčových vlastností, díky které je dána funkční specializace příslušných receptorů. Dnes u nervových nAChR rozlišujeme celkem 8 α podjednotek, (konkrétně $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ a $\alpha 10$) a 3 β podjednotky ($\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$) u savců (Albuquerque et al., 2009). Podjednotka $\alpha 8$ byla nalezena pouze v ptačí tkáni, v savčí nikoliv (Dani & Bertrand, 2007; Sargent, 1993). Mezi širokou škálou možných kombinací podtypů nAChR v mozku jsou nejčastěji přítomné

homomerní receptory typu $\alpha 7$ a heteromerní receptory obsahující podjednotky $\alpha 4$ a $\beta 2$, přestože se jejich exprese v jednotlivých oblastech mozku liší u různých druhů obratlovců (Gotti et al., 2006; Han et al., 2000). Oproti tomu jsou $\alpha 3$ a $\beta 4$ převládajícími podjednotkami na periférii (Paterson & Nordberg, 2000). Žádná podjednotka není zcela symetrická, proto umístění různých podjednotek v různých pozicích v rámci pentamerického komplexu může vést k široké škále podtypů nAChR, každý s potenciálně odlišnými rolemi jako je propustnost iontů a desenzitizace (Wittenberg et al., 2020).

Heteromerní receptory obsahující $\alpha 4$ a $\beta 2$ podjednotku

Nejhojnější nAChR v mozku jsou receptory, které obsahují kombinaci podjednotek $\alpha 4$ a $\beta 2$, nebo které jsou tvořeny podjednotkami $\alpha 7$ (Poorthuis et al., 2013). Zatímco oba typy $\alpha 4\beta 2^*$ (* označuje přítomnost potenciálně další podjednotky) a $\alpha 7$ nAChR jsou běžně rozšířeny po celém mozku (a vykazují překrývající se regionální expresi), nejvyšší hustota $\alpha 4\beta 2^*$ nAChR se nachází v oblasti thalamu a o něco nižší exprese také v hipokampu (Picciotto et al., 2001; Terry et al., 2023). Sestavení do finálního stechiometrického uspořádání bývá nejčastěji následovné; $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ nebo $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ (Zhou et al., 2003). Nikotinové receptory, včetně nAChR složeného z $\alpha 4$ a $\beta 2$ podjednotek, modulují uvolňování dalších neurotransmiterů, jako je noradrenalin, glutamát, GABA a dopamin (Nashmi & Lester, 2006).

Receptory, které obsahují podjednotku $\beta 2$, vykazují vysokou afinitu k nikotinu a desenzitizují již při nízkých koncentracích nikotinu (Lindstrom, 2000). V kontrastu s tím jsou homomerní receptory obsahující podjednotku $\alpha 7$, které vykazují rychlou aktivaci a desenzitizační kinetiku až při vyšších koncentracích nikotinu, jelikož mají nižší afinitu k nikotinu (Nelson et al., 2003). V některých oblastech mozku se na tvorbě nAChR s vysokou afinitou podílejí kromě $\alpha 4$ a $\beta 2$ také další podjednotky. V bazálních gangliích, včetně ventrální tegmentální oblasti (VTA) a substantia nigra, jsou $\alpha 6$ a případně $\beta 3$ nikotinové podjednotky zahrnuty do $\alpha 4\beta 2$ nAChR komplexů, což má za následek vytvoření vysoce afinitních receptorů (Albuquerque et al., 2009).

Také díky svému rozšíření v mnoha mozkových oblastech se $\alpha 4\beta 2$ nAChR podílejí na řízení celé řady funkcí a nervových procesů. Příkladem je ovlivnění dopaminergního systému, který je kritický při chování či učení závislém na odměně. Tento systém je také podstatou mechanismu, kdy podání nikotinu vede k příjemným pocitům, odměně a posléze závislosti (Di Chiara & Imperato, 1988; Wittenberg et al., 2020). Právě signalizace $\beta 2^*$ nAChR může u lidí stimulovat uvolňování dopaminu ve ventrálním striatu, kde se nacházejí výběžky VTA, oblasti klíčové pro uvolnění dopaminu a mechanismy odměny (Jensen et al., 2005). Význam $\beta 2$ podjednotky pro kognitivní funkce byl dále podpořen výzkumem na myších modelech. U stárnoucích myši postrádajících $\beta 2$ podjednotku nAChR byly pozorovány specifické změny například v kortikálních oblastech nebo ztráty pyramidových neuronů v hipokampálních oblastech. Ve srovnání s dospělými zvířaty zde došlo ke zhoršení prostorového učení, které poukazuje na význam nAChR obsahujících $\beta 2$ podjednotku v souvislosti

s kognitivními vlastnosti během stárnutí (Zoli et al., 1999). Velmi podrobně byla popsána souvislost mezi neurodegenerací u Alzheimerovy choroby a sníženou expresí nAChR obsahující podjednotky $\alpha 4\beta 2^*$ v mozku pacientů (Burghaus et al., 2000). Význam této podjednotky byl popsán i u mnoha dalších onemocnění, včetně Parkinsonovy choroby, schizofrenie, deprese nebo úzkosti (Terry et al., 2023). Téma schizofrenie a dalších neuropsychiatrických a neuropsychologických poruch bude přiblíženo v kapitole věnující se tématu klinických onemocnění v souvislosti s nAChR.

Receptory obsahující $\alpha 3$ a $\beta 4$ podjednotku

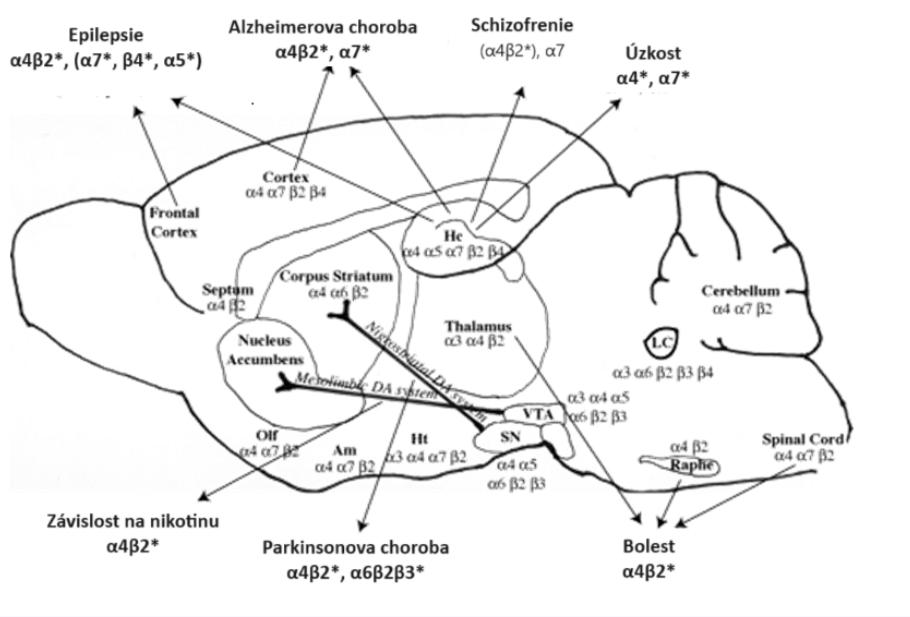
Podjednotky $\alpha 3$ nAChR jsou hustě exprimovány v neuronech mediální habenuly (MHb), které vysílají projekce téměř výhradně do interpedunkulárního jádra (IPn) (Yeh et al., 2001). Podjednotky $\alpha 3\beta 4^*$ nAChR, vyskytující se na periférii, se jeví jako heterogenní populace $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 3\beta 4\alpha 5$, $\alpha 3\beta 2\beta 4$ a $\alpha 3\beta 2\beta 4\alpha 5$ podtypů, kdy $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ je hlavním podtypem nAChR (Conroy & Berg, 1995; Gotti & Clementi, 2004). Podjednotky $\alpha 3$ a $\beta 4$ jsou nezbytné pro správnou funkci ganglií, na druhou stranu podjednotka $\beta 2$ může kompenzovat ztrátu podjednotky $\beta 4$ (Picciotto et al., 2001). Ve studii (Elayouby et al., 2021) za použití metody RNA interference (siRNA) bylo zjištěno, že knockdown $\alpha 3$ nAChR podjednotky exprimované v MHb nebo IPn, vede ke zvýšení příjmu nikotinu u potkanů. Podjednotky $\alpha 3\beta 4$ nAChR tak hrají významnou roli v regulaci stimulačních účinků nikotinu v okruhu MHb–IPn. V autonomních gangliích převažující podjednotky $\alpha 3$ a $\beta 4$ vykazují vysoký stupeň kolokalizace s podjednotkami $\alpha 5$ a $\beta 2$ (Sheffield et al., 2000). Alelická variace v genovém klastru *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* kódujícím podjednotky $\alpha 5$, $\alpha 3$ a $\beta 4$, který je u člověka lokalizován v oblasti chromozomu 15q25, zvyšuje riziko závislosti na tabáku a onemocnění souvisejících s kouřením (Berrettini et al., 2008). Proto může snížená neurotransmise zprostředkovaná změnami v $\alpha 3^*$ nAChR v okruhu MHb–IPn u jedinců, kteří jsou nositeli rizikových alel pro gen *CHRNA3*, přispívat ke zvýšené spotřebě tabáku a vyššímu výskytu nemocí souvisejících s kouřením. Gen *CHRNA3* je považován za jeden z důležitých kandidátních genů náchylnosti k rakovině plic (Amos et al., 2008).

Homomerní receptory obsahující $\alpha 7$ podjednotku

Jak již bylo řečeno výše, mezi nejvíce rozšířené typy nAChR v savčím mozku se řadí $\alpha 7$ nAChR, který je vysoce vodivý pro Ca^{2+} , a heteromerní $\alpha 4\beta 2$ nAChR, který se vyznačuje vazebným místem s vysokou afinitou pro nikotin (Sinclair & Kabbani, 2023; Wada et al., 1989). Podjednotka $\alpha 7$ je exprimovaná ve většině částí mozku, s obzvláště vysokými hladinami v hipokampu a kortexu a velmi nízkou nebo žádnou expresí v thalamických jádrech (Dominguez del Toro et al., 1994). V kontrastu s heteromerními receptory, které mají nanomolární afinitu k ACh, homopentamerní receptory mají afinitu k ACh na mikromolární úrovni (Gotti & Clementi, 2004). Receptory složené z $\alpha 7$ podjednotek mají vysokou propustnost pro Ca^{2+} (Suzuki et al., 2006). V důsledku toho může otevření $\alpha 7$ nAChR kanálů ovlivnit mnoho mechanismů závislých na Ca^{2+} , včetně aktivace drah druhých posílů, jako je cAMP nebo inositol trifosfát (IP3), který aktivuje uvolnění intracelulárního vápníku

z endoplazmatického retikula (King & Kabbani, 2016; Sinclair & Kabbani, 2023). V astrocytech hipokampální oblasti dochází díky stimulaci $\alpha 7$ nAChR k výraznému zvýšení hladiny vápníku, a tato odpověď je úspěšně blokována jedním α -bungarotoxinem (α Bgtx), který blokuje $\alpha 7$ nAChR (Sharma & Vijayaraghavan, 2001).

V programech vývoje léčiv pro neuropsychiatrické poruchy se heteromerní $\alpha 4\beta 2$ a homomerní $\alpha 7$ staly nejčastěji cílenými podtypy nAChR – důvodem je jejich dominantní zastoupení v mozku savců. nAChR obsahující podjednotku $\alpha 7$ (Obrázek 2) byly spojovány s kognitivním deficitem u pacientů trpících schizofrenií a Alzheimerovou chorobou (Terry et al., 2023). Druhým významným novým směrem pro rozvoj terapie na bázi podjednotky $\alpha 7$ je léčba zánětlivých onemocnění a bolesti (Wang et al., 2003).



Obrázek 2: Schematické znázornění myšího mozku se zaměřením na nAChR. Je zde popsána distribuce jednotlivých podjednotek a jejich souvislost s neurologickými a neuropsychiatrickými poruchami. Převzato a upraveno podle (Jensen et al., 2005).

Receptory obsahující $\alpha 6$ a $\beta 3$ podjednotku

nAChR obsahující podjednotku $\alpha 6$ nebo $\beta 3$ se nacházejí především v bazálních gangliích a podjednotka $\alpha 6$ se také exprimuje v mozečku. Obě podjednotky jsou velmi často kolokalizovány a presentovány v optické dráze, locus coeruleus a mesostriální dopaminové dráze (Gotti & Clementi, 2004). Distribuční restrikce se dotýkají $\alpha 6$ i $\beta 3$ podjednotky, které jsou z velké části přítomné na katecholaminergních neuronech (Zoli et al., 2002). Podjednotky $\alpha 6$ a $\beta 3$ se pravděpodobně spojují s podjednotkami $\alpha 4\beta 2$, aby vytvořily funkční nAChR (Kuryatov et al., 2000).

Receptory obsahující $\alpha 5$ a $\alpha 2$ podjednotku

Podjednotka $\alpha 5$ nAChR není v mozku rovnoměrně rozmístěna. Nejhušší exprese $\alpha 5$ se podobně jako u receptoru $\alpha 3\beta 4$ nachází ve specifické dráze nazvané MHb-IPn, spolu s hlubšími vrstvami kůry mozkové a v hipokampu (Fowler et al., 2011). Podjednotky $\alpha 5$ (a $\alpha 10$) nAChR nevážou agonisty navzdory jejich definici jako α podjednotky. Klíčová místa potřebná pro vazbu agonistů nejsou v těchto α podjednotkách konzervována (Albuquerque et al., 2009) a jsou proto označovány jako akcesorní podjednotky. V autonomním nervovém systému se $\alpha 5$ podjednotka nAChR spojuje s podjednotkami $\alpha 3$ a $\beta 4$ (viz výše). V centrálním nervovém systému se tato podjednotka naopak spojuje téměř výhradně s podjednotkami $\alpha 4$ a $\beta 2$ (Ramirez-Latorre et al., 1996). Tato specifická spojení $\alpha 5$ podjednotky s jinými podjednotkami nAChR hrají nejen důležitou roli v regulaci funkce samotného receptoru, ale také v závislosti na nikotinu. Genetické studie poukazují na roli podjednotek $\alpha 3$, $\alpha 5$ a $\alpha 4$, které jsou kódovány v genovém klastru *CHRNA3-CHRNA5-CHRNA4* v regulaci různých aspektů užívání tabáku (Tobacco and Genetics Consortium 2010; Koukouli et al., 2017). Podobně jako u dalších podjednotek byla i u podjednotky $\alpha 5$ provedena genová manipulace. Jak trvalý knockout (KO) podjednotky $\alpha 5$ nAChR u myší, tak i snížená exprese (knockdown) genu $\alpha 5$ nAChR u potkanů, vedly při vyšších dávkách nikotinu ke zvýšení jeho spotřeby (self-administration) (Fowler et al., 2011). U KO myší byla re-exprese podjednotky $\alpha 5$ nAChR v MHb dostatečná k obnovení wild type behaviorálního fenotypu, kdy nebyl zjištěn žádný významný rozdíl v self-administraci nikotinu ve srovnání s kontrolami (Fowler et al., 2013).

Podjednotka $\alpha 2$ nAChR se nachází především v nervových buňkách, zejména v centrálním nervovém systému (Hilscher et al., 2023). Na rozdíl od předchozí podjednotky $\alpha 5$ se $\alpha 2$ nevyskytuje v MHb (Sheffield et al., 2000), ale exprese této podjednotky byla identifikována v IPn a v čichovém bulbu u myších modelů. Hlavním podtypem $\alpha 2^*$ nAChR v IPn byl $\alpha 2\beta 2$, ačkoliv některé receptory mohou obsahovat podjednotky $\beta 4$. V čichovém bulbu $\alpha 2$ nAChR podjednotky primárně tvořily $\alpha 2\beta 4$ (Whiteaker et al., 2009). Ve srovnání s ostatními podjednotkami nAChR byla právě tato dosavadním výzkumem relativně opomenuta. Důvodem je omezenější exprese této podjednotky a nedostatek specifických agonistů a antagonistů pro studium její funkce. Nicméně se předpokládá, že se nachází na postsynaptické membráně buněk společně s dalšími podjednotkami nAChR (Hilscher et al., 2023).

Podjednotky obsahující: $\alpha 9$ a $\alpha 10$

Jako poslední z nikotinových podjednotek byly identifikovány podjednotky $\alpha 9$ a $\alpha 10$ nAChR. Jejich funkce je primárně v buňkách vnitřního ucha, kde regulují sluchové a vestibulární smyslové zpracování v CNS. Na rozdíl od předešlých podjednotek, tyto podjednotky neodpovídají tradiční nervové nebo svalové klasifikaci nAChR a jsou považovány za samostatné členy v rámci rodiny nAChR vzhledem k jejich specifickým rolím a evoluční odlišnosti (Elgoyhen, 2023; Lykhmus et al., 2017).

2.3 Exprese podjednotek nAChR

Výskyt jednotlivých podjednotek nAChR byl podrobně popsán v předchozí kapitole, kde byla zmíněna také role jednotlivých typů receptorů v dané oblasti mozku. nAChR, jsou exprimovány ve velké části CNS, přestože jejich distribuce je nižší, než u mAChR (Paterson & Nordberg, 2000). V této části budou shrnuty oblasti s nejvyšší expresí nAChR, jako je oblast PFC, striata, thalamu, VTA a hipokampu. Nicméně je důležité také zmínit další účinky nikotinových receptorů a jejich expresi i v jiných místech než v mozku.

Mezi nejrozšířenější a nejvíce exprimované nAChR v mozku se řadí α podjednotky $\alpha 4$, $\alpha 7$ spolu také s $\beta 2$ (Wada et al., 1989), která je schopna utvořit podtyp $\alpha 4\beta 2$ nAChR. Podstatná exprese podjednotky $\alpha 4$ a $\beta 2$ je přítomna zejména v thalamu a také v hipokampu (Picciotto et al., 2001), kde jsou nAChR exprimovány na GABAergních interneuronech. Aktivace nAChRs prostřednictvím synaptického ACh může vyvolat dlouhotrvající excitaci interneuronů, což vede k utlumení aktivity pyramidových neuronů (Ji et al., 2001). Účinek aktivace nAChR závisí na subcelulární lokalizaci receptoru. Nikotinové receptory exprimované na dendritech a somatech neuronu mohou zprostředkovávat rychlý synaptický přenos a přispívat tak k neuronální excitabilitě prostřednictvím generování excitačních postsynaptických potenciálů (de la Garza et al., 1987). Kromě toho jsou nAChRs exprimovány na koncích axonů, kde jejich aktivace moduluje uvolňování neurotransmiterů prostřednictvím Ca^{2+} a/nebo terminální depolarizaci (Jones et al., 2001; Nashmi & Lester, 2006).

O nAChR je známo, že regulují synaptickou plasticitu v oblastech, které hrají rozhodující roli v odměňování a závislosti. Zvláštní význam v tomto ohledu mají dopaminergní neurony VTA (Charpentier et al., 1998). Signál z neuronů VTA spojených s odměnou je odesílán do mnoha dalších oblastí mozku, včetně PFC, amygdaly nebo striata, které jsou základem emocí a rozhodování (Pidoplichko et al., 2004). V neuronech VTA jsou exprimovány různé podtypy nAChR, mezi něž patří například $\alpha 4\alpha 5(\beta 2)_2$, $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ a $\alpha 7$ (Klink et al., 2001). Je zajímavé, že podjednotky $\alpha 6$ i $\beta 3$ nAChR jsou omezeny převážně na tuto oblast mozku (Azam et al., 2002). Oblast hipokampu je poměrně zásadní svojí funkcí pro formování paměti, nebo při řízení pozornosti, pro které jsou relevantní podjednotky $\alpha 5$ a $\alpha 7$ (Johnstone et al., 2011). Exprese některých nikotinových podjednotek je známá také v místech, které nejsou nervové povahy. Mezi tato místa se řadí například: svaly, lymfatická tkáň, kůže, plicní a cévní systém a další (Gotti & Clementi, 2004).

2.4 Význam nAChR v klinických onemocněních

Abnormality v expresi nebo funkci nAChR se objevují v rámci patofyziologie několika neurologických onemocnění, včetně Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby, poruchy pozornosti a psychiatrických poruch, jako je schizofrenie, deprese a úzkost (Terry et al., 2023). Kromě těchto se jedná ještě o mnohem více neuropsychiatrických poruch spojených s dysfunkcí cholinergního systému (Bloem et al., 2014). Zabývat se detaily veškerých onemocnění souvisejících s nAChR by bylo

nad rámec této práce, proto zde budou jen krátce shrnuty role těchto receptorů a jejich podtypů u vybraných klinických onemocnění.

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní onemocnění charakterizované postupnou ztrátou kognitivních funkcí a zhoršením paměti. Jedním z klíčových faktorů, které se zdají hrát významnou roli v patogenezi této nemoci, jsou nAChR v mozku (Terry et al., 2023). Řada studií naznačuje, že dochází ke změnám v expresi a funkci nAChR v mozku pacientů s AD. Starší studie ukázala, že amyloidní peptid A β 42 se váže selektivně a s extrémně vysokou afinitou na receptor α 7 nAChR na úrovni pikomolární koncentrace (Wang et al., 2000). U AD byla zaznamenána souvislost mezi interakcí α 7 nAChR a A β s poruchami v přenosu signálu a synaptické plasticity, jakož i toxickým účinkem na cholinergní neurony. Na druhou stranu dochází ke snížení exprese α 4 β 2 nAChR v různých oblastech mozku, jako je například hipokampus (Burghaus et al., 2000). Právě zde je α 4 β 2 nAChR důležitý v udržování paměťových stop. Snížení exprese tohoto receptoru v hipokampu může mít za následek poruchy v učení a paměti, což je jedna z klíčových charakteristik AD (Hoskin et al., 2019; Wu et al., 2004).

Parkinsonova choroba je charakterizována tím, že u pacientů dochází k selektivnímu poškození dopaminergních nigrostriálních neuronů a klinicky se projevuje motorickými deficity, včetně třesu, zpomaleného pohybu a celkové ztuhlosti (Bordia et al., 2007). Kromě motorických symptomů se u Parkinsonovy choroby mohou vyskytovat i neurologické a další projevy, jako jsou: poruchy řeči, demence, deprese a úzkost, nebo také poruchy spánku. Přesná příčina tohoto onemocnění není dosud přesně objasněna, předpokládá se kombinace genetických a enviromentálních vlivů (Schapira & Jenner, 2011). Studie vedené na hlodavcích i primátech s výjimkou lidských testů naznačují roli podjednotky α 6* nAChR u Parkinsonovy choroby (Bordia et al., 2007). Konkrétně α 6 α 4 β 2 β 3 nAChR jsou jedny z nejzranitelnějších nAChRs s vysokou afinitou v reakci na poškození nigrostriální oblasti (Quik et al., 2013).

Schizofrenie je spojována s deficitem ve funkci nervového systému v PFC také v souvislosti s nAChR (Brooks et al., 2012). Další oblastí mozku, kde byl zaznamenán deficit nAChR, byl hipokampus (Freedman et al., 1995) a thalamus (Court et al., 1999). Pacienti s deficitem v oblasti PFC trpí kognitivními poruchami, jako je nepřizpůsobivost chování v závislosti na měnících se podmínkách vnějšího prostředí a také například poruchou paměti (Leeson et al., 2009). Nikotin a kouření cigaret vykazují potenciální terapeutický efekt u pacientů se schizofrenií (Griffith et al., 1998; Winterer, 2010). Polymorfismy v genu kódujícím podjednotku α 7 nAChR jsou asociovány s deficitem v pozornosti u schizofreniků (Terry et al., 2023). Tito pacienti vykazují nižší expresi podjednotky α 7. Vysoká touha po nikotinu u pacientů se schizofrenií může být způsobena kompenzací nízké exprese α 7 nAChR. Nikotin působí jako selektivní agonista α 7 receptoru a má potenciál zlepšit kognitivní funkce u pacientů s tímto onemocněním (Bloem et al., 2014; Olincy et al., 2006).

Vývoj účinných léčiv pro širokou škálu neuropsychiatrických a neurodegenerativních onemocnění představuje komplexní a náročný úkol, který vyžaduje značné úsilí a investice. I přes pokrok v oblasti výzkumu a vývoje se stále čelí řadě výzev, včetně hledání a identifikace cílových struktur, vývojem sloučenin s požadovanými vlastnosti, případně vedlejší účinky potenciálních léků (Sinclair & Kabbani, 2023). Například agonista $\alpha 7$ nAChR – enceniclin (EVP-6124) zpočátku vykazoval slibné účinky u pacientů se schizofrenií a Alzheimerovou chorobou. Enceniclin byl obecně bezpečný a snášen dobře, bohužel neuspěl v klinických studiích kvůli jeho nežádoucímu gastrointestinálnímu účinku (Brannan, 2019). TC-5619 je $\alpha 7$ nAChR agonista, kdy potenciál této látky je zlepšit kognitivní funkce, nicméně v klinických studiích neprokázal výrazný pozitivní účinek (Walling et al., 2016).

3 Prefrontální kůra

3.1 Anatomická struktura a buněčné složení prefrontální kůry se zaměřením na hlodavce

Prefrontální kůra (PFC) je důležitá oblast mozku zajišťující vyšší kognitivní funkce. Tato oblast mozku je zapojena do emocionálních, sociálních, motivačních, percepčních a dalších procesů (Carlén, 2017). Napříč různými živočišnými druhy, je běžné rozdělit PFC na dorsální a ventrální část. U hlodavců se však používá k popisu oblastí PFC jiných označení, která jsou pro ně typická a zřídka se tato označení používají k popisu PFC například u primátů (Schaeffer et al., 2020).

Šířeji pojatou PFC u hlodavců můžeme podrobněji rozdělit do jednotlivých částí, mezi které řadíme: anteriorní cingulární kůru (ACC), prelimbicku kůrou (PrL) a infralimbicku kůrou (IL). Na základě anatomických kritérií bylo naznačeno, že existuje dělení PFC, které zahrnuje také orbitální kortex, který je podobně rozčleněn na mediální (MO), ventrální (VO) a laterální (LO) oblast (Heidbreder & Groenewegen, 2003). Přestože je struktura PFC u lidí a u hlodavců značně odlišná, nalzáme zde určité podobnosti. U primátů je rozdělena oblast ACC na tři hlavní zóny: subgenní oblast (sACC), pregenuální oblast (pACC) a „mid-anterior“ cingulární kůru (MCC) (Laubach et al., 2018). U hlodavců se zdá, že IL funkčně odpovídá oblasti sACC (Öngür et al., 2003).

Mozková kůra je rozdělena do několika vrstev, ve kterých neurony přijímají signály a interagují je prostřednictvím lokálních spojení (Bloem et al., 2014). Vrstva 1 (L1) obsahuje apikální dendrity pyramidových neuronů a různé interneurony uvolňující inhibiční neurotransmitter GABA (Schuman et al., 2019). Tyto interneurony pomáhají regulovat aktivitu ostatních neuronů (Anastasiades et al., 2021). Vrstvy 2 (L2) a 3 (L3) se často sdružují do vrstvy 2/3 (L2/L3) a obsahují intratelencefalické (IT) buňky, které propojují jiné korové oblasti, což usnadňuje komunikaci uvnitř kortexu (Ueta et al., 2019). Vrstva 4 (L4) je klíčová vstupní vrstva, jelikož obsahuje pyramidové neurony, které jsou schopny vytvářet lokální propojení uvnitř kortexu a pravděpodobně integrují informace z různých zdrojů (Harris

& Shepherd, 2015). U hlodavců, na rozdíl od primátů, není však L4 v PFC rozlišena a její roli tedy přebírá vrstva L2/3 (Barbas & Pandya, 1989; Uylings et al., 2003). Naopak vrstva 5 (L5) je hlavní výstupní vrstva, která obsahuje 2 typy buněk: IT neurony a neurony pyramidové dráhy, které vysílají informace do podkorových oblastí, zde předávají zpracované senzorycké informace do dalších oblastí mozku (Baker et al., 2018). Poslední vrstva 6 (L6) je zároveň také výstupní vrstva. Obsahuje mimo jiné kortikothalamické (CT) neurony, které jsou propojeny s thalamem (Guo et al., 2018). Tyto CT buňky nejspíše vysílají zpracované senzorycké informace zpět do thalamu, což může ovlivnit další zpracování smyslů nebo směřování pozornosti (Anastasiades & Carter, 2021).

Pochopení mozkových nervových obvodů začíná pochopením jejich komponentních částí, buněk, které je tvoří. V rámci PFC se vyskytují v převaze projekční neurony IT, CT a neurony pyramidové dráhy (PT). Tyto buněčné typy mají jasně danou morfologii a fyziologickou stavbu. IT buňky jsou prezentovány napříč vrstvami L2 - L6, přijímají vstupy z amygdaly, thalamu a hippocampu předtím, než je informace předána do dalších projekčních neuronů (Collins et al., 2018). PT jsou převážně omezeny na vrstvu L5 a L6 (Baker et al., 2018; Reiner et al., 2003). Povrchově lokalizované pyramidové neurony primárně projikují do oblasti amygdaly, v mezivrstvách do hypothalamu a striata a PT v hlubokých vrstvách do části mediodorsálního thalamu (Gabbott et al., 2005). Různorodé výstupy jsou důležitým rysem PFC, který umožňuje pyramidovým neuronům ovlivňovat více aspektů chování vyššího řádu. Aktivita dráhy pyramidových neuronů v PFC může být koordinována prostřednictvím obohaceného vstupu z thalamu na jejich apikální dendrity, což je významný rozdíl oproti primárnímu senzoryckého kortexu, kde pravděpodobně vstupují informace spíše přes proximální dendrity (Anastasiades & Carter, 2021; Bittner et al., 2015). CT buňky nacházející se v L6 jsou výrazné svou odlišnou morfologií. Odlišují se od L6 IT neuronů, se kterými se prolínají, a také od PT neuronů, které vysílají proximální dendrity do thalamu (Harris & Shepherd, 2015). Apikální dendrity CT buněk v PFC zasahují do L1, což naznačuje, že apikální dendrity CT buněk prostupují od hlubokých vrstev PFC až na povrch, procházejí všemi šesti vrstvami kůry (Collins et al., 2018).

Mimo pyramidové neurony, které představují hlavní excitační populaci PFC hlodavců, se v této oblasti mozku nachází i rozsáhlá síť inhibičních interneuronů. Tato inhibiční síť hraje klíčovou roli v modulaci aktivity právě pyramidových neuronů a je kritická při kontrole inhibice (Cummings et al., 2022; Kupferschmidt et al., 2022). Interneurony (IN) jsou rozděleny napříč L1 až L6 do tří převážně nepřekrývajících se populací s expresí parvalbuminu (PV), somatostatinu (SST) nebo serotoninového receptoru 3a (5HT3aR) (Tremblay et al., 2016). Všechny tyto IN mají charakteristické fyziologické a morfologické vlastnosti, které určují, jak reagují na vstupy a inhibují pyramidové buňky (Anastasiades & Carter, 2021). Nejrozšířenější z těchto podtypů jsou PV-IN, které inhibují pyramidové neurony uvolněním neurotransmiteru GABA (Tremblay et al., 2016). PV-IN obsahují dva hlavní podtypy: „PV basket cells“ nacházející se mezi vrstvami L2 až L6 a „PV chandelier cells“, které jsou převážně v L1 (Anastasiades & Carter, 2021). IN typu SST (SST-IN), které tvoří menší podíl IN v L1, se na ni

nicméně také promítají. Vrstva L1 je ostatně bohatá na různé typy inhibičních interneuronů. Napříč mozkovou kůrou se předpokládá, že SST-IN zprostředkovávají inhibici zpětného toku na dendritech pyramidových buněk (Tremblay et al., 2016) a přijímají vstupy z thalamu, amygdaly nebo hipokampu (Sun et al., 2019). Skupina 5HT3aR může být dále rozdělena na dvě skupiny založené na expresi vasoaktivního intestinálního peptidu (VIP) či jeho nepřítomnosti. Všechny neurony v L1 jsou GABAergní IN a většinu z nich tvoří právě skupina 5HT3aR bez exprese VIP. IN, které exprimují VIP, představují největší skupinu 5HT3aR-IN (40%) a jsou lokalizovány převážně do vrstvy L2/3 (Tremblay et al., 2016). Jsou považovány za tzv. „disinhibiční“ v PFC a také v neokortexu. Na rozdíl od většiny inhibičních interneuronů, které přímo inhibují pyramidové neurony, VIP inhibují jiné inhibiční populace. Konkrétně inhibují zejména SST-IN a do menší míry i PV-IN. Prostřednictvím inhibice SST-IN a PV-IN snižují VIP-IN celkové inhibiční ovlivnění pyramidových neuronů. Aktivace pyramidových neuronů se zvyšuje, což má za následek i změnu ve zpracování informací v dané oblasti mozku. (Pi et al., 2013).

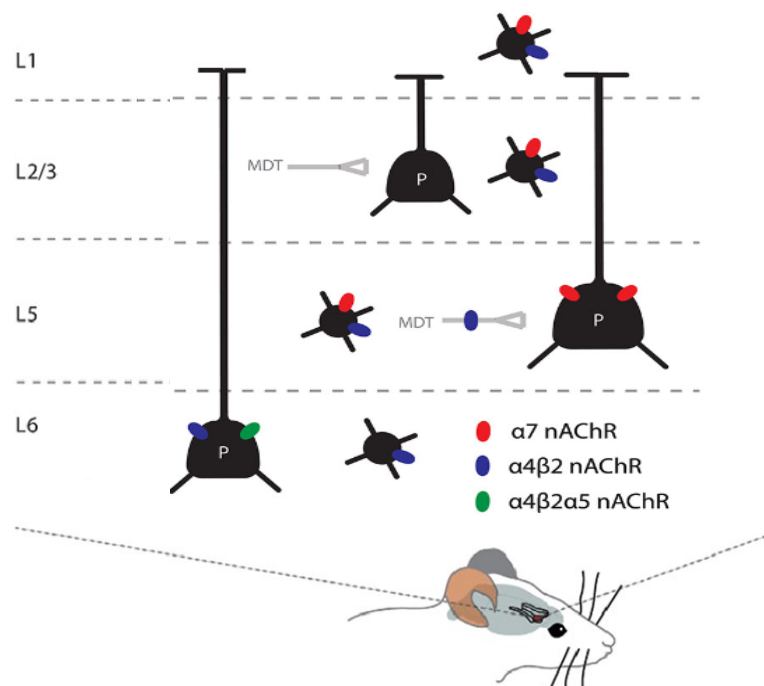
Mezi další buněčné typy nacházející se také v PFC se řadí 3 typy gliových buněk: astrocyty, které moduluji aktivitu pyramidových neuronů; oligodendrocyty, které se podílejí na izolaci axonů neuronů za tvorby myelinové pochvy, díky které je umožněn rychlý přenos nervových vzruchů a také mikroglie, imunitní buňky mozku, které zajišťují ochranu před infekcí a poškozením (Dolotov et al., 2022).

3.2 Exprese nAChR v PFC

V CNS je řízena cholinergní inervace prostřednictvím nAChR, které regulují procesy, jako je uvolňování neurotransmiterů, dráždivost buněk a nervová integrace signálu. Tyto procesy jsou klíčové pro správnou funkci nervových sítí a mají vliv na mnohé fyziologické funkce, jako je bdělost, únava, úzkost, centrální zpracování bolesti, příjem potravy a řadu dalších funkcí (Gotti & Clementi, 2004). Z nAChR podjednotek v PFC jsou u hlodavců přítomny pouze podjednotky $\alpha 7$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ a $\beta 2$ (Poorthuis et al., 2013), případně jejich kombinace.

nAChR jsou exprimovány glutamatergními pyramidovými neurony a také IN v L5 a dále pyramidovými neurony v L6 (Poorthuis et al., 2013). Pyramidové neurony v L4 a L6 jsou modulovány $\alpha 5$ a $\beta 2^*$ podjednotkou nAChR. $\alpha 5$ podjednotka, která je prezentována L6 pyramidovými neurony, je nezbytná pro normální funkci chování spojeného s pozorností a dále hraje klíčovou roli ve funkci dozrávání neuronů v L6 PFC (Bailey et al., 2012; Bloem et al., 2014). Vysoká exprese podjednotky $\alpha 5$ nAChR v L6 byla pozorována během prvních měsíců vývoje u hlodavců. Tento fakt se také týká PFC, kde jsou tyto $\alpha 5$ podjednotky exprimovány pyramidovými neurony projikujícími do mediodorsálního thalamu (Kassam et al., 2008). Jak již bylo zmíněno také v kapitole Anatomická struktura a buněčné složení prefrontální kůry se zaměřením na hlodavce, pyramidové neurony jsou přímo ovlivněny ACh, který se váže na nAChR, a jsou také hlavním představitelem projekčních neuronů z PFC do thalamu (Gabbott et al., 2005). Dále bylo zjištěno, že v L6 je silná přítomnost $\alpha 4\beta 2\alpha 5$ nAChR na pyramidových

buňkách a $\alpha 4\beta 2^*$ nAChRs na interneuronech ve všech vrstvách (Obrázek 3). Kromě těchto receptorů, $\beta 2^*$ nAChR dominují ve vrstvách L2/L3 a L5, kde vedou ke zvýšení nervové aktivity (Poorthuis et al., 2013). Homomerní receptory typu $\alpha 7$ nAChR byly také nalezeny v pyramidových neuronech PFC, konkrétně v L5. Jak podjednotka $\alpha 3$, tak i podjednotka $\alpha 4$ nAChR, je asociována s pyramidovými neurony. $\alpha 3$ podjednotka je exprimována mezi L3 - L6, podjednotka $\alpha 4$ je rozšířena ve všech vrstvách kromě L1 a L4 (Schröder et al., 1995; Paterson et al., 2000). Zajímavé je, že v L2/L3 u pyramidových neuronů nebyl potvrzen výskyt nAChR. Stimulace nAChR v PFC vede k inhibici pyramidových neuronů v L2 a L3, což naznačuje spíše nikotinovou aktivaci inhibičních IN. Naopak v L5 a L6 vede aktivace nAChR u inhibičních a excitačních neuronů k posílení výstupní neuronové aktivity (Poorthuis et al., 2013).



Obrázek 3: Distribuce hlavních podtypů nAChR v PFC. Černé buňky „P“ = pyramidové neurony, černé buňky = interneurony, MDT = mediodorsální thalamus

Pyramidové neurony, které jsou přítomny ve L5 a L6 jsou přímo modulovány prostřednictvím $\alpha 7$ a $\beta 2$ nAChR. Vstupy z oblasti thalamu (MDT) v L5 jsou modulovány $\beta 2^*$ nAChR. Interneurony, nacházející se ve všech vrstvách obsahují směs podjednotek nAChR, mimo L6. Distribuce jak homomerních tak heteromerních receptorů je různá podle různých typů interneuronů v různých vrstvách. Převzato a upraveno podle (Bloem et al., 2014; Poorthuis & Mansvelder, 2013).

4 Význam nAChR v PFC pro řízení úzkosti a úzkostného chování

Poslední kapitola přiblíží oblast PFC a v ní obsažených nAChR a postupně vysvětlí jejich význam v problematice úzkosti a úzkostných poruch. Náplní této kapitoly je zároveň představit význam

zvířecích modelů, které jsou běžně využívány pro výzkum úzkostného a averzivního chování. Modely a testy nám pomáhají k pochopení, jaké oblasti mozku a části PFC se podílejí na řízení takových pochodů. V neposlední řadě zde budou zmíněny relevantní studie, které se aktivně zabývaly problematikou úzkostného chování v souvislosti s nAChR v PFC.

4.1 Úzkost, úzkostné chování a jejich poruchy

Úzkostná porucha je jednou z nejrozšířenějších duševních poruch. Úzkost je negativní emoční stav charakterizovaný pocitem obav, způsobenými očekáváním potenciální hrozby nebo negativních výsledků (Kraeuter et al., 2019; Terry et al., 2023). Jedná se o přirozenou reakci organismu na stres nebo nebezpečí, které se projevuje zvýšenou vzrušivostí, očekáváním, fyziologickými změnami a specifickými vzorci chování, které nám pomáhají danou situaci překonat. Pokud je však tato reakce nepřiměřená nebo se projevuje bez zjevné příčiny, může se jednat o patologickou úzkost, která narušuje možnost vyrovnat se s různými stresujícími událostmi. Důležité je v této souvislosti odlišit strach jako reakci na bezprostřední, reálné nebezpečí od úzkosti, která je pouze reakcí na potenciální hrozbu (Steimer, 2011). Klinické rozlišení strachu (fobická porucha), úzkosti (generalizovaná úzkostná porucha (GAD)) nebo kombinace obojího (panická porucha, sociální úzkost) naznačují právě tuto skutečnost (Daniel-Watanabe & Fletcher, 2022; Grillon, 2008). Úzkostná porucha může být také často spojována s dalšími duševními problémy jako je například deprese, avšak jejich vzájemný vztah je komplikovaný. Stres, chronický i akutní, může ovlivnit funkci nejen PFC, ale také subkortikálních oblastí podílejících se na kontrole hrozby. U lidí nejsou experimentální studie chronického stresu kvůli etickým důvodům možné (Alexandra Kredlow et al., 2022).

Úzkostné poruchy jsou diagnostikovány, pokud jsou tyto problémy nadměrné, neúměrné situaci a zasahují do každodenního života jedince. Je však důležité si uvědomit, že úzkostné chování, které je v evoluci velmi konzervované, je do jisté míry normální reakcí na stres a nebezpečí (Kenwood et al., 2022). Post-traumatická stresová porucha (PTSD) je maladaptivní a vysilující psychiatrická porucha typicky doprovázená extrémním pocitem strachu v době výskytu traumatu, s charakteristickým opětvým prožíváním v měsících a letech následujících po traumatu (McLaughlin et al., 2015). PTSD se řadí mezi nejvíce objasněné, převládající a klinicky významné poruchy související se stresem. Poměrně velký soubor studií nyní podporuje jasnou roli změněné struktury a funkce PFC u PTSD a souvisejících poruch (Alexandra Kredlow et al., 2022).

Psychoterapeutická léčba úzkosti zaměřená na dysfunkci PFC zahrnuje: kognitivně behaviorální terapii (KBT), expozici a meta-kognitivní terapii (MKT). Často využívaná je metoda KBT, která se zaměřuje na změnu negativních myšlenek a chování spojeném s úzkostí (Goldin et al., 2014; Kenwood et al., 2022). MKT je léčba nebo též psychoterapeutický přístup, který se týká našich myšlenek o myšlení samotném – například přesvědčení o tom, jak bychom měli myslet nebo jak bychom měli zvládat své myšlenky a emoce. Cílem této metody je detekovat a modifikovat procesy, které udržují

kognitivní a emoční nerovnováhu napříč duševními poruchami včetně úzkosti (McEvoy, 2019). Bylo naznačeno, že MKT je vysoce účinná při zmírňování příznaků řady primárních cílených psychologických obtíží spolu s příznaky úzkosti a deprese a existují předběžné náznaky, že MKT může být dokonce účinnější než jiné terapeutické zásahy, včetně KBT. Je však zapotřebí více studií, aby byla prozkoumána přesnost těchto předběžných zjištění (Normann & Morina, 2018).

Tradiční přístup k vývoji léčiv pro PTSD se vyznačuje nízkou mírou úspěšnosti a dlouhou dobou potřebnou k uvedení léků na trh. Vysoká poptávka po léčbě PTSD mohla vést ke snížení regulačních omezení a umožnit vstup léků s nedostatečnými daty prokazující účinnost do klinických studií (Verbitsky et al., 2020). To vedlo k nízké míře úspěšnosti u léků působící na CNS, včetně léků na PTSD, která je v současnosti jedna z nejnižších mezi terapeutickými oblastmi (Gribkoff et al., 2017). Doba potřebná k uvedení léků na trh se proto prodloužila. Většina léků, které v preklinických testech ukazovaly slibné výsledky, selhala v pozdějších fázích klinického vývoje (fáze II a III) kvůli nedostatečné účinnosti u lidí (Harrison 2016; Verbitsky et al., 2020). Zlepšení preklinického testování a pečlivější hodnocení dat by mohlo vést k efektivnějšímu vývoji léčiv pro PTSD a zkrátit tak dobu potřebnou k uvedení účinných léků na trh. Jako slibný kandidát mezi potenciálními terapeutiky se jeví například BNC210, negativní alosterický modulátor $\alpha 7$ nAChR, který byl testován na modelech hlodavců, kde se neprokázaly žádné nežádoucí účinky včetně fyzické závislosti (O'Connor et al., 2024). Výsledky této studie naznačují, že alosterická inhibice funkce $\alpha 7$ nAChR by mohla představovat slibný přístup k léčbě úzkostných a stresových poruch.

4.2 Úzkostné chování u hlodavců

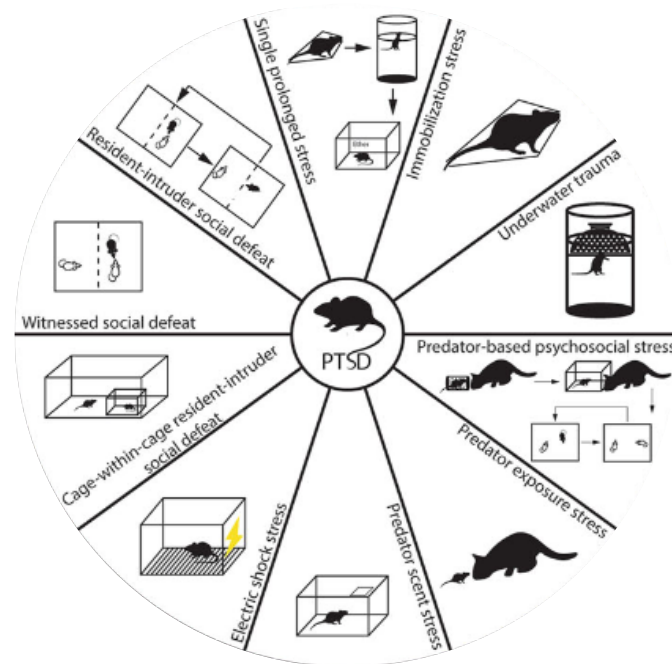
Ačkoliv úzkostné poruchy představují značnou zátěž pro systémy zdravotní péče, a to jak po stránce ekonomické, tak i lidského utrpení pacientů a jejich blízkých, teprve v posledních letech dochází k neustálému prohlubování znalostí o základních patofyziologických mechanismech těchto poruch (Kraeuter et al., 2019). Slibně se rozvíjí i oblast vývoje nových účinných léčebných postupů pro úzkostné poruchy a PTSD, a to i díky zvířecím modelům. Obecně behaviorální testy na zvířatech nacházejí své využití při testování motorických, kognitivních a smyslových funkcí, emočního chování nebo mechanismu drogové závislosti. Volba metod a postupů v experimentu je vedena s ohledem na specifika daného zvířecího modelu a studovaného onemocnění. Manipulací s typem stresu, intenzitou, trváním a frekvencí jsou modely schopny odrážet základní projevy PTSD nebo úzkostných stavů. Následující podkapitoly budou zaměřeny na nejvíce relevantní zvířecí testy a modely, které se využívají k testování stresových, úzkostných poruch a podmiňování strachu, jelikož pro hlodavce existuje více než 30 různých testů úzkostného chování a jejich variací (Steimer, 2011).

Variace různých stresorů vedoucí k PTSD

Důležitým aspektem nervových drah strachu a úzkosti je jejich prolínání a interakce s nervovými spoji řídicími reakci na stres. Je nutné zdůraznit, že pojem "stres" v tomto kontextu má

specifický význam a nezahrnuje obecné pocity "emoční zátěže" nebo "výkonnostní zátěže". Systém, který vede k aktivaci limbicko-hypothalamohypofyzárně-adrenální osy (LHPA) a sekreci stresových hormonů, jako je kortikotropin-uvolňující hormon (CTRH), adrenokortikotropní hormon (ATSH) a kortizol, je jasně definovaný a pravděpodobně úzce souvisí s projevy strachu a úzkosti. Intenzivní výzkum na hlodavcích je zaměřen také na mozkové struktury řídící aktivaci LHPA, jelikož byly opakovaně spojovány s neurobiologií poruch nálady (Shin & Liberzon, 2010).

Vzhledem k tomu, že PTSD je výsledkem traumatických zážitků, mohou modely hlodavců (Obrázek 4) simulovat vyvolání stresu a rozvoj této poruchy. Paradigmata stimulují vznik poruchy pomocí aplikace fyzických, sociálních a psychologických stresorů jednotlivě nebo v kombinaci (Verbitsky et al., 2020). Fyzické stresory využívané pro výzkum PTSD zahrnují elektrický šok, trauma z plavání (underwater trauma), které zahrnuje 1 minutu plavání a následně 30 sekund ponoření ve vodní nádrži (délka expozice může být krátkodobá: 2-10 min, nebo opakovaná po dobu několika dní po sobě). Dále imobilizační stres způsobený omezením pohybu (immobilization stress) nebo také trauma složené ze 3 stresorů (single prolonged stress), kdy je model složen tak, aby způsobil robustní stresovou reakci třemi různými cestami – psychologickou, fyziologickou a farmakologickou (Fulco et al., 2022).



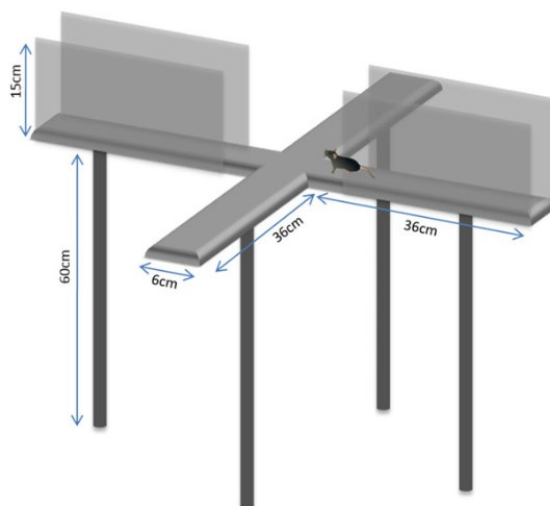
Obrázek 4: Ukázka provedení několika testů PTSD podle různých kritérií, které jsou zaměřeny na konkrétní typ stresu. Převzato a upraveno podle (Verbitsky et al., 2020).

Ačkoli jsou fyzické stresory široce využívány, nalzáme v nich omezení vyplývající z nadměrného poranění, nebo způsobené bolesti (Finnell et al., 2017). Sociální a psychologické stresory zahrnují sociální porážku (social defeat), která je výhodná pro svou relevanci pro trauma vznikající u mezilidských vztahů, a stres z predátora (predator stress) – pach, moč (Verbitsky et al., 2020).

Testy pro studium úzkostného chování

V neurobiologických studiích zaměřených na zvířecí modely se k označení úzkostných stavů obvykle nepoužívá termín "úzkost", nýbrž spíše pojmenování "úzkostné chování" (anxiety-like behavior). Důvodem je odlišná povaha úzkosti u lidí a zvířat, která znemožňuje přímé srovnání (Kutlu & Gould, 2015). Mezi nejvíce používané testy pro studium symptomů spojených s úzkostí se řadí: test otevřeného pole (open-field test), a různé formy vyvýšeného bludiště, ať už ve tvaru kříže (elevated plus maze, EPM), či ve tvaru kruhu (elevated zero maze, EZM), který je analogem EPM. Prvním zmíněným je test otevřeného pole, kde je testován konflikt dvou motivací; strach z nového prostředí a motivace k objevování, prozkoumávání nového prostředí. Jedná se o čtvercový, obdélníkový nebo kruhový výběh, který je holý nebo pokrytý tenkou vrstvou podestýlky. Klíčovým parametrem je čas strávený uprostřed pole a doba strávená po jeho obvodu. Variantou může být test přechodu světla a tmy (light-dark transition test), ve kterém probíhá testování explorativního a úzkostného chování. Test se skládá z dvoudílné schránky: jedna část je bílá a osvětlená, druhá černá a tmavá. Tyto části jsou spojeny malým otvorem. Zaznamenává se několik hodnot; čas strávený na světle, počet vstupů na světlo, počet přechodů a další (Verbitsky et al., 2020).

Model, který je považován za jeden z nejvíce používaných zvířecích modelů pro studium úzkosti a úzkostných poruch, je EPM (Kraeuter et al., 2019). Aparát se skládá ze čtyř ramen, která jsou postavena do tvaru kříže (znaménko plus) a celá platforma je vyvýšená nad zemí (např. 50-60 cm). Dvě protější ramena jsou tvořena bočními stěnami a zbylá dvě protější ramena by měla být otevřená, bez stěn (Obrázek 5).



Obrázek 5: Příklad uspořádání a rozměrů EPM bludiště pro studium chování myši. Převzato a upraveno podle (Kraeuter et al., 2019).

Na začátku testu je do středu bludiště umístěn jeden hlodavec. Tomu je umožněn volný pohyb za průzkumem celého bludiště po předem stanovenou dobu. Velká výhodou této metody je její časová

nenáročnost, kdy průběh testu trvá obvykle 5–10 minut. Pozorovatel zaznamenává chování zvířete se zaměřením na dobu strávenou v každém rameni bludiště, případně v jeho středu. Hlodavci přirozeně z evolučního hlediska nemají rádi otevřené prostory a zvýšená místa, mají tedy tendenci se těmito místům co nejvíce vyhýbat. Metoda by měla poskytnout jasné rozdělení na základě míry úzkostného chování hlodavce, zda tráví více času v uzavřených nebo otevřených ramenech (Kraeuter et al., 2019). Běžně využívaný lék benzodiazepin byl po podání hlodavcům ukázán jako látka, která snížila čas strávený v uzavřených ramenech (Pellow & File, 1986). Test EPM je cenný nástroj pro výzkum studující úzkostné poruchy, přestože má značná omezení. Výsledky testu jsou ovlivněny mnohými faktory z vnějšího prostředí jako je teplota, hluchost, světlo v místnosti atd. Metoda se spoléhá na chování hlodavce, které je také ovlivněno mnoha faktory, které často nemůžeme ovlivnit, případně neznáme ani jejich přesnou příčinu. Je také důležité poznamenat, že výše popsané modely úzkosti měří vrozenou reakci úzkosti na nový kontext na rozdíl od „naučené úzkosti“ (Kutlu & Gould, 2015; Wolpe, 1981). Celkově můžeme říct, že využití zvířecích modelů pro výzkum úzkosti je efektivní metodou pro posouzení a pochopení mechanismů odpovědných za reakci úzkostného chování u hlodavců, která pomáhá výzkumu úzkosti a potenciálních způsobů léčby u psychických poruch.

Podmiňování strachu na základě elektrických šoků

V oblasti studia PTSD nacházejí své využití především testy zaměřené na úzkostné chování a dále testy, které se zaměřují na asociaci přirozeně stresujícího podnětu (nepodmíněný podnět) s původně neutrálním podnětem či prostředím (podmíněný podnět) a na vymizení (extinkce) této asociace. Testy tohoto typu se v angličtině označují jako „fear conditioning“ nebo „fear learning“ a v této práci pro ně bude používán český termín „podmiňování strachu“. U pokusných zvířat se jako model PTSD široce používá podmiňování strachu podle Pavlova modelu (Kida, 2019).

Dokonce neutrální stimul může vyvolat odpověď ve formě strachu jako výsledek podmíněného učení a paměti (associative learning). Podmíněná paměť strachu, model traumatických vzpomínek, je pozorována napříč druhy od nižších až po vyšší živočichy, včetně lidí (Kida, 2019). Nejrozšířenější paradigmatu podmiňování strachu jsou založena na kontextu nebo stimulu (signálu), díky kterému si hlodavec postupně vybuduje asociaci mezi původně neutrálním podmíněným stimulem, jako je prostředí (testovací komora) nebo zvukový signál, a nepodmíněným stimulem vyvolávajícím strach, jako jsou mírné elektrické šoky nejčastěji do nohou nebo ocásku (Phillips & LeDoux, 1992). Pokud se oba stimuly (podmíněný a nepodmíněný) vyskytnou současně nebo v krátkém časovém sledu, dojde k jejich asociaci a vytvoření podmíněného reflexu, kdy přirozená reakce na stresující podnět (například strnutí neboli freezing) je vyvolána původně neutrálním prostředím či stimulem. Při opětovném vystavení komoře nebo tónu tedy hlodavec vykazuje freezing reakce, které jsou známkou vzniku paměťové stopy propojující podmíněný a nepodmíněný podnět. Kromě chování spojeného se strachem dochází i k adaptivním autonomním reakcím, jako je zvýšené pocení a piloerекce (Bolles & Collier, 1976).

Obecně se paměť strachu hodnotí na základě délky trvání strnutí během opětovného vystavení podnětu či prostředí po určitou dobu (např. 3-5 min). Pokud je ale opakovaně použit zvukový signál, nebo jiný podmíněný podnět, a žádný elektrický šok poté nepřichází, je možné tímto způsobem naučit hlodavce, že zvukový tón neznámá bolest. Tento jev je definován jako extinkce této reakce a také příslušné paměťové stopy. Proces nového učení (new learning) znamená vytváření nových spojení a postupné ztracení, slábnutí starých spojení, vzpomínek. Toto ale neznámá zapomenutí na situaci spojenou s traumatem. Místo vymazání paměti strachu se zdá, že dochází k vytvoření nové inhibiční paměti. Tato inhibiční paměť je získávána procesem učení, kdy se organismus opakovaně vystavuje podmíněnému stimulu. Reakci strachu je možné obnovit, pokud je zvíře po dlouhé době (např. 1 měsíc) znovu podmíněnému stimulu vystaveno (Ishikawa et al., 2016; Kida, 2019). Paradigmata podmiňování strachem mohou být omezena projevy strachu u zvířete (zamrznutí a/nebo vyhýbání se), které narušují plnění úkolů. Dále se stav strachu, vyvolaný bezprostřední a konkrétní hrozbou, může lišit od stavu úzkosti. Ten je zaznamenán v delším časovém okně a často není spojen s konkrétní událostí (Sylvers et al., 2011).

4.3 Role PFC v řízení úzkostného chování a podmiňování strachu

Stále více studií ukazuje, že PFC, oblast zodpovědná za kognitivní kontrolu, může hrát důležitou roli v regulaci úzkosti a strachu jak u lidí, tak u hlodavců (Chen et al., 2021). V posledních letech se zájem o tuto problematiku značně prohloubil. Výzkumy často zahrnují stereotaktické operace virového vektoru, například za účelem řízené aktivace nebo inhibice PFC, a následné behaviorální testování myšího modelu. Tato kapitola se zaměří pouze na malý výběr výsledků studií týkajících se PFC a úzkostného či obranného chování, které byly publikovány převážně v posledních letech a mají tak aktuální význam.

4.3.1 PFC a úzkostné chování

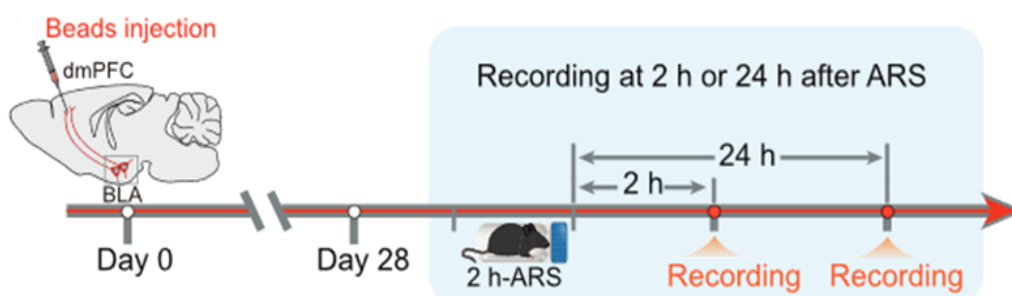
Zda hraje oblast PFC roli v úzkosti, a především jakým způsobem, bude nastíněno v této podkapitole. Tato otázka bude diskutována na základě studií rozdělených do jednotlivých sekcí pro lepší orientaci.

PFC projekce do dalších mozkových struktur a jejich role v úzkostném chování

Jednotlivé podoblasti PFC jsou zapojeny do zprostředkování různých, a dokonce i opačných rolí v chování souvisejícím s úzkostí. Tyto role do jisté míry závisí na dalších oblastech mozku, s kterými je oblast PFC propojena, jako je amygdala, hipokampus nebo VTA. Prostřednictvím nervových spojení je zajištěna regulace podmíněných reakcí strachu a explorativního chování v prostoru navozující úzkostné chování, jako je test v otevřeném poli a test ve zvýšeném bludišti (Adhikari et al., 2010).

V nedávné studii (Jacobs et al., 2022) byl ke studiu PFC a úzkosti využit "Punishment Risk Task" (PRT), v češtině úkol s rizikem trestu. Jedná se o behaviorální test používaný k hodnocení úzkostných stavů u myši a jiných hlodavců. Test se zaměřuje na to, jak pravděpodobnost trestu ovlivňuje snahu myši o dosažení odměny. Myš je umístěna do operantního boxu se dvěma pákami. Stisknutí jedné páky (páka A) vede k jisté odměně (například potravě). Stisknutí druhé páky (páka B) může vést k odměně s určitou pravděpodobností, ale také s určitou pravděpodobností k trestu (například k elektrickému šoku). Pravděpodobnost trestu se liší v závislosti na podmínkách testu. Myši, které vykazují úzkostné chování, jsou náchylnější k vyhýbání se páce B, i když pravděpodobnost trestu je nízká. Výzkum (Jacobs et al., 2022) se zabýval oblastmi dorsomediální PFC (dmPFC) a VTA, kdy vztah mezi podnětem, akcí a samotným trestem prezentuje právě dráha VTA-PFC. Bylo sledováno chování potkanů a také aktivita nervové populace (skrze Ca²⁺ imaging) v PrL části PFC a v laterální části VTA během učení. Krysy byly nejprve vycvičeny k reakci na zvukový tón, který vedl k odměně ve formě cukrové kostky. Následně byl testován PRT po 3 blocích. Blok 1 nepředstavoval žádný trest v podobě elektrického šoku (bezpečný blok), další s pravděpodobností 6 % a poslední s 10 %. Poté, co se krysy naučily pravděpodobnost příchodu trestu, se výzkum zabýval vlivem diazepamů na aktivitu PFC a VTA v korelaci s chováním. Pomocí této formy učení studie zjistila, že dmPFC a VTA selektivně přizpůsobují svou reakci na akci a odměnu během učení se úzkostnému podnětu, aniž by měnily svou reakci na trest. Zatímco diazepam měl zanedbatelné účinky v dmPFC, ovlivnil korelovanou aktivitu mezi touto oblastí a VTA v bezpečném a 6 % rizikovém bloku. Tento mechanismus ukazuje, jak diazepam může modulovat odpovědi na stresové podněty prostřednictvím změn v aktivitě PFC a VTA.

Další studie (Liu et al., 2023) se zabývala otázkou, zda úzkostné chování u myši může být vyvoláno akutním stresem a jaké je působení oblastí PFC a basolaterální amygdaly (BLA). Vliv akutního stresu na dynamické změny v nervové aktivitě BLA byl zaznamenán pomocí *in vivo* vláknové fotometrie (měření vápníkového signálu). K tomu byla použita injekce adeno-asociovaného viru (AAV) exprimujícího protein GCaMP6s do BLA. O 28 dní později byla měřena bazální hladina vápníkových signálů v rámci BLA. Poté byly myši vystaveny stresu, který jim byl způsoben vložením do zkumavky (tak, aby jim těsně přiléhala k velikosti jejich těla) na 2 hodiny k navození imobilizačního stresu (ARS). Vápníkové signály byly opakovaně měřeny po 2 a 24 hodinách po expozici ARS (Obrázek 7, str. 21). Úroveň úzkostného chování u myšního modelu byla poté zaznamenána v testu otevřeného pole a v EPM testu. Takové myši vykazovaly zvýšené úzkostné chování po 2 hodinách, ale ne už po 24 hodinách po uplynutí působení stresu. Zároveň proběhlo sledování aktivace nervových oblastí v PFC a BLA. Studie prokázala, že zvýšené úzkostné chování bylo zprostředkováno presynaptickým uvolněním glutamátu v synapsích z PFC do BLA, která tak vykazovala zvýšenou aktivitu. Společně tato zjištění naznačují, že akutní stres způsobuje krátkodobé zvýšení úzkostného chování tím, že usnadňuje synaptický přenos z PFC do amygdaly.



Obrázek 7. Schematické zobrazení metod použitých ve studii (Liu et al., 2023) na časové ose. V čase 0 (Day 0) proběhla injekce (beads injection) AVV. Po 28 dnech (Day 28) bylo provedeno měření hladiny vápníkových signálů. Po stimulaci hlodavce 2 hodiny v rámci ARS (2 h-ARS) bylo znovu provedeno měření vápníkové hladiny po 2 nebo 24 hodinách (Recording at 2 h or 24 h after ARS). Převzato a upraveno podle (Liu et al., 2023).

Jednotlivé části PFC a jejich aktivace/inhibice při úzkostném chování

Pomocí optogenetických metod byla studována role IL PFC při řízení úzkostného chování na základě optogenetické aktivace, případně inhibice. Ve studii (Chen et al., 2021) byla právě tato skutečnost pozorována. Adeno-asociovaný virový vektor sérotypu 2 (AAV2) byl použit pro specifickou expresi aktivačního kanálu ChR2 v excitačních glutamatergních neuronech v IL hlodavců. Toho bylo dosaženo fúzí genu pro ChR2 s genem pro žlutý fluorescenční protein (YFP) pod kontrolou promotoru CaMKII α . CaMKII α je protein, který se aktivuje vápníkem a v mozkové kůře se specificky vyskytuje v excitačních neuronech. Použití promotoru pro CaMKII α tak zajišťuje, že se ChR2 exprimuje pouze v excitačních neuronech. Excitační neurony exprimující ChR2-eYFP v IL byly poté aktivovány pulzy modrého světla (473 nm). K hypotéze, zda je IL nezbytná pro regulaci úzkosti, byl použit test EPM a test otevřeného pole. Bylo provedeno testování myši v jednom devítiminutovém bloku pro test EPM a test otevřeného pole ve 3 tříminutových blocích, počínaje prvním blokem vypnutí světla (OFF), následované zapnutím světla (ON) pomocí souvislého sledu pulzů modrého světla s dobou trvání pulzu 5 milisekund a poté zpět do bloku OFF. U myši exprimující ChR2 (při fázi ON) byla pozorována výrazně nižší pohyblivost v otevřených ramenech EPM a také vstup do nich. Tento fakt ukazuje, že aktivace glutamatergních neuronů v IL posiluje projevy úzkostného chování. Také byla provedena inhibice glutamatergních neuronů v části IL pomocí inhibičního proteinu eNpHR3.0eYFP (eNpHR-eYFP) u testovaných myši. Takové neurony byly hyperpolarizované, a myši vykazovaly větší explorativní chování (delší čas strávený v otevřených ramenech EPM). Testování proběhlo ve stejném časovém sledu jako u sledování aktivace IL PFC.

V poslední studii byl sledován vliv oxytocinu v PFC na úzkostné chování. Molekula oxytocinu reguluje behaviorální adaptace v období po porodu, včetně mateřské péče, agrese a také úzkosti.

Působení antagonisty oxytocinu v PFC má vliv na zvýšení úzkostného chování a zvýšení agresivity. Ve studii (Sabihi et al., 2014) byla pozorována asociace PrL oblasti PFC s oxytocinem u matek po porodu. Byl zde pozorován rozdíl v chování dvou druhů kryš (samic matek a samic, které se jimi ještě nestaly). Úzkostné chování bylo pozorováno v EPM testu a testu otevřeného pole. Působením oxytocinu u kryš matek došlo ke snížení úzkostného chování, které se projevilo jako častější výskyt v otevřených ramenech EPM v porovnání s druhou skupinou kryš. Po infuzi vysoce specifického antagonisty oxytocinového receptoru (OTR-A) do PrL oblasti PFC naopak došlo ke zvýšení úzkostného chování pouze u samic matek. Výsledky této studie naznačují, že oblast PFC je považována na část mozku, která se podílí na změně úzkostného chování v poporodním období v souvislosti s oxytocinem.

4.3.2 PFC a podmiňování strachu

Podobně jako v předchozí podkapitole i zde budou nastíněny studie, které se zabývaly výzkumem v oblasti PFC a obranného chování na myších modelech. Typy interneuronů PFC a jejich možnosti působení na chování se jeví jako nový směr pro výzkum právě podmiňování strachu a učení averzivnímu/vyhýbavému chování.

Typy interneuronů ovlivňující averzivní chování

Následující studie popisuje roli specifických nervových obvodů v dmPFC, zahrnující část PrL, při regulaci sociálního strachu (social fear). Studie se zaměřila na interakce mezi různými typy interneuronů (IN) a jejich vliv na projekční pyramidové neurony a následné chování myši (Xu et al., 2019). Somatostatin-pozitivní interneurony (SST-IN) jsou hlavními IN, které se podílejí na inhibici parvalbumin-pozitivních interneuronů PV-IN, disinhibují pyramidové buňky a následně zvyšují PFC výstup v reakci na averzivní podnět během exprese strachu. Na základě tří důkazů studie potvrdila, že právě SST-IN inhibují PV-IN. Během projevození sociálního strachu došlo ke zvýšení neuronální aktivity SST-IN. Po inaktivaci SST-IN pomocí farmakogenetických metod došlo následně ke zvýšené aktivitě PV-IN při vystavení sociálnímu strachu. Takové myši vykazovaly sníženou míru strachu v sociální komoře ve srovnání s kontrolními podmíněnými myši. Snížení aktivity PV-IN tedy hraje klíčovou roli při řízení projevů sociálního strachu. Výsledky studie odhalují málo známý disinhibiční mikroobvod v PFC prostřednictvím interakcí mezi podtypy IN a naznačují, že SST-IN zprostředkovaná disinhibice představuje důležitý mechanismus pro řízení obranného chování.

U myších samců studie (Cummings & Clem, 2020) ukazuje, že asociativní učení strachu je dáno specifickou aktivitou SST-IN v PrL PFC a také, že aktivace těchto buněk představuje důležitý mechanismus pro vznik podmíněného strachu. Bylo provedeno několik různých měření pomocí kombinace elektrofyzologie, měření vápníku (skrze Ca²⁺ imaging), optogenetické manipulace (injekce virového vektoru) a mapování aktivity PrL SST-IN a souvisejících obvodů, včetně BLA. Podmiňování strachu bylo provedeno pomocí testu otevřeného pole na základě podmíněného a nepodmíněného podnětu (elektrický šok a zvukový tón). U podmíněných myši v reakci na vybavování paměti a regulaci

exprese paměti strachu byla zaznamenána zvýšená aktivita vápníku v PrL části PFC SST-IN. U myší, u kterých proběhlo podmiňování strachu byla zvýšena inhibice od SST-IN k PV-IN, což vedlo k disinhibici projekčních pyramidových neuronů zodpovědných za kódování paměti v PFC. Studie i přesto připouští, že zůstává nejisté, jakým způsobem jsou SST-IN zodpovědné za disinhibici okruhů, které se podílí na kontrole změn chování. Navrhuje, že různé dráhy vycházející z PrL PFC se vzájemně liší v úrovni inhibice, kterou dostávají od interneuronů.

4.4 Role nAChR v řízení úzkostného chování a podmiňování strachu

Modulace neurotransmiterů v mozku, jako jsou dopamin, serotonin a GABA, výrazně ovlivňuje chování spojené s úzkostí a strachem. Nikotin například působí ve VTA tím, že přímo aktivuje dopaminové (DA) i GABAergní neurony, které oba exprimují nAChR (Tolu et al., 2013). Výzkum nAChR se také zaměřuje například na způsob, jakým tyto receptory aktivují nebo inhibují jednotlivé IN a projekční pyramidové neurony. Tyto studie jsou často prováděny v kontextu úzkostného a averzivního chování, na kterém se nAChR významně podílí. V posledních dvou kapitolách bude zmíněno několik studií, které se zabývaly jak samotnou rolí nAChR v oblastech mozku hlodavců, tak nAChR exprimovaných konkrétně v částech PFC, v souvislosti s úzkostným a obranným chováním.

V nedávné studii bylo provedeno několik různých testů, ve kterých se autoři zabývali otázkou, jakým způsobem je řízeno úzkostné chování prostřednictvím nAChR ve VTA (Nguyen et al., 2021). Mechanismus účinku nikotinu ve VTA zahrnuje přímou aktivaci DA i GABA neuronů, které oba exprimují nAChR, zejména podjednotku $\beta 2$ nAChR. Nikotin prostřednictvím $\beta 2^*$ nAChR aktivuje GABAergní interneurony VTA a DA neurony projikující do nukleus accumbens, zatímco inhibuje DA neurony projikující do amygdaly. Tedy po aktivaci nervové dráhy VTA skrz $\beta 2^*$ nAChR došlo k inhibici DA neuronů projikujících do amygdaly, což u myších modelů vedlo k úzkostnému chování. Tyto myši po injekci nikotinu do oblasti VTA se pohybovaly převážně v zakrytých místech vyvýšeného bludiště ve tvaru O (EOM). Studie naznačuje, že úzkostné chování vyvolané injekcí nikotinu závisí na signalizaci prostřednictvím $\beta 2^*$ nAChR ve VTA.

Také sluchová kůra (auditory cortex) je zapojená do procesu podmiňování strachu pomocí sluchových podmíněných podnětů. Elektrické šoky aktivují disinhibici mikrookruhů ve sluchové kůře prostřednictvím aktivace cholinergních neuronů v předním mozku, které ve sluchové kůře uvolňují ACh a aktivují místní nAChRs. Tento proces je klíčový pro podmiňování strachu (Letzkus et al., 2011). Před podmiňováním strachu byly do sluchové kůry aplikovány antagonisté nAChR; mecamylamin (MEC) a metylkakonitin (MLA). Tato manipulace vedla ke snížení míry strachu během testování o 24 hodin později, což naznačuje, že aktivace nAChR je nezbytná pro podmiňování strachu. Antagonisté nAChR blokovali excitaci IN v L1, což vedlo ke snížení inhibice PV-IN v L2/3. Inhibice PV-IN tedy není přímým důsledkem působení ACh na PV-IN, ale probíhá prostřednictvím IN v L1. Testováním optogenetickou stimulací, která vedla k inhibici PV-IN (během a 5 sekund po elektrickém šoku)

a následně disinhibici pyramidových projekčních neuronů v L2/3, vykazovaly myši sníženou odpověď na strach po 24 hodinách od proběhnutí podmiňování strachu. Výsledky studie potvrzují, že disinhibice projekčních pyramidových neuronů zprostředkovaná nAChR ve sluchové kůře je nezbytná pro asociativní učení strachu.

4.5 Role $\alpha 4\beta 2$ a $\alpha 7$ nAChR v PFC

Poslední kapitola se zaměří na roli nAChR, které obsahují podjednotky $\alpha 4\beta 2$ a $\alpha 7$ a jsou hojně zastoupeny v PFC. Mnoho studií si klade za cíl zhodnotit změny úzkostného chování vyvolané modulací jednotlivých podtypů nAChR v různých částech PFC. Aktivitu nAChRs je možné modulovat například farmakologicky, aplikací nikotinu nebo jiného nikotinového agonisty, nebo pomocí KO vybraných nikotinových podjednotek případně dalších proteinů podílejících se na nikotinové signalizaci. Výzkum v oblasti PFC se převážně zaměřuje na nAChR obsahující podjednotky $\alpha 4\beta 2$ a $\alpha 7$, které budou i v této kapitole popsány jak v souvislosti s úzkostným a averzivním chováním, tak i jako možný terapeutický cíl úzkostných poruch.

Studie provedená (Eppolito et al., 2010) se zaměřila na účinky prenatální a postnatální expozice nikotinu u hlodavců a její dlouhodobé dopady na chování a kognitivní funkce v dospělosti. Hlodavci byli vystaveni nikotinu během třetího trimestru (kritické období pro vývoj mozku) a po narození prostřednictvím mateřského mléka. Chování dospělých hlodavců bylo hodnoceno pomocí testu EPM. Hlodavci, kteří byli vystaveni nikotinu, vykazovali zvýšenou úzkost ve srovnání s kontrolní skupinou. V rámci paradigmatu podmiňování strachu byla sledována schopnost extinkce, tedy vymizení naučené reakce strachu. Hlodavci vystavení nikotinu měli problémy s extinkcí strachu, což naznačuje poruchy kognitivních funkcí spojených se strachem. Metodou analýzy mRNA byla zkoumána exprese podjednotek $\alpha 4$, $\alpha 7$ a $\beta 2$ nAChR v hipokampu (VTA) a v PFC (PrL a IL). Výsledky ukázaly sníženou expresi těchto podjednotek u hlodavců vystavených nikotinu, což může souviset s pozorovanými behaviorálními změnami. Tato studie naznačuje, že prenatální i postnatální expozice nikotinu u hlodavců vede k trvalým změnám v kognitivních funkcích souvisejících se strachem v dospělosti. Studie zdůrazňuje důležitost výzkumu vlivů prenatální a postnatální expozice škodlivým látkám, jako je nikotin, na dlouhodobé zdraví a chování. Zároveň upozorňuje na potenciální rizika, která taková expozice představuje pro vývoj mozku, čímž jej činí náchylným k trvalým neurobehaviorálním změnám.

Studie provedená (Tekinay et al., 2009) ukázala, že delece *Lynx2*, savčího prototoxinového genu, který je výrazně exprimován v oblastech mozku PFC, BLA a thalamu (MDT), vede ke zvýšenému úzkostnému chování. *Lynx2* se váže na nervové nAChR (především podjednotku $\alpha 4\beta 2$), moduluje tak jejich aktivitu a jeho absence mění účinek nikotinu na glutamatergní signalizaci v PFC. Modelové myši s KO *Lynx2* vykazovaly zvýšené úzkostné chování v testu light-dark transition test, EPM i při podmiňování strachu. *In vitro* byla pozorována vazba LYNX2 na nAChR, která vedla ke zvýšené

desenzitizaci receptoru a snížení afinity k ACh. V důsledku toho studie předpokládá, že ztráta LYNX2 způsobí naopak zvýšení aktivity nAChR v neuronech exprimujících *Lynx2*. Vstupy z oblasti MDT v L5 PFC jsou modulovány $\beta 2^*$ nAChR (Poorthuis & Mansvelder, 2013). Výsledky studie naznačují, vzhledem k vysoké úrovni exprese *Lynx2* v MDT, že zvýšená glutamátergní aktivita v pyramidových neuronech v L5 PFC u myši s KO může být důsledkem inhibice LYNX2 na nAChR. Lze tak očekávat zvýšenou aktivitu BLA, jakožto důsledek presynaptického uvolnění glutamátu z PFC do BLA, což přispívá ke zvýšenému strachu a úzkostnému chování u myši s KO. Studie připouští, že účinky LYNX2 mohou být zprostředkovány několika různými typy nAChR, pokud jsou exprimovány společně s LYNX2. V každém místě okruhu souvisejícího s úzkostí, kde je *Lynx2* exprimován, se tedy přesné mechanismy, kterými LYNX2 přispívá k regulaci úzkosti, mohou lišit.

Ischemie mozku, která může být způsobena mozkovou mrtvicí nebo nízkým průtokem krve do mozku, vede k různým neurologickým poruchám, včetně kognitivních a behaviorálních dysfunkcí. Vareniklin, lék používaný k odvykání kouření, vykazuje agonistickou aktivitu na podjednotku $\alpha 7$ a částečnou agonistickou aktivitu k podjednotce $\alpha 4\beta 2$ nAChR, které jsou významně exprimovány v PFC a hrají roli v úzkostném a obranném chování. Cílem poslední studie (Seyedaghamiri et al., 2022) bylo prozkoumat, zda vareniklin může zmírnit kognitivní a behaviorální poruchy, zánět, apoptózu a synaptickou dysfunkci u myši s ischemií PFC. Myši byly rozděleny do tří skupin: kontrolní, falešné ischemie PFC a trombotické ischemie PFC. Po 24 hodinách od indukce ischemie PFC myši ve skupině s vareniklinem dostávaly 3 mg/kg léku perorálně po dobu 7 dnů. Analýza mozkové tkáně pomocí Western blot a imunohistochemie ukázala, že podávání vareniklinu vedlo ke snížení zánětlivých markerů (TNF- α , IL-1 β) a apoptických markerů (caspase-3, Bax) a ke zvýšení exprese synaptických proteinů (PSD-95, synapsin-1). Navíc došlo ke snížení úzkostného chování v testech otevřeného pole i EPM u myši s ischemií PFC. Tyto výsledky naznačují, že vareniklin by mohl zmírnit úzkostné a obranné chování prostřednictvím své agonistické aktivity na $\alpha 7$ a $\alpha 4\beta 2$ nAChR, což podtrhuje jeho potenciál jako terapeutické strategie pro léčbu neurologických poruch souvisejících s úzkostí způsobených ischemií mozku.

5 Závěr

Ve své práci jsem se zabývala otázkou, zda a jakým způsobem nAChRs v PFC ovlivňují úzkostné a averzivní chování a podmiňování strachu. Mechanismy, které se na tomto typu chování podílejí, jsou důležité, neboť představují zásadní roli při vzniku poruch jako je GAD nebo PTSD. Porozumění těmto mechanismům je klíčové pro vývoj nových a účinnějších terapeutických prostředků těchto onemocnění. Současné poznatky ukazují, že nAChRs mohou sloužit jako potenciálně účinný terapeutický cíl v léčbě úzkostných poruch. Na druhou stranu, mechanismy podílející se na vzniku těchto poruch a role, jakou v nich nAChRs zaujímají, nejsou stále dostatečně objasněny a vyžadují další výzkum.

Úzkost a úzkostné poruchy představují jeden z nejzávažnějších současných psychických problémů, postihující značné procento populace. Pro studium těchto poruch a s nimi souvisejícího úzkostného a averzivního chování jsou nepostradatelné speciální zvířecí modely. Tyto modely lze geneticky upravit pro zkoumání fyziologických, behaviorálních a molekulárních mechanismů úzkostných a stresových poruch. Nejčastěji se používají hlodavci, zejména myši a potkani. Behaviorální testy, jako je test otevřeného pole, EPM, stres vyvolaný elektrickým šokem a další, jsou klíčové pro sledování mechanismů podílejících se na vzniku úzkostných a stresových poruch.

Jednou z hlavních oblastí mozku zapojených do regulace úzkostného chování je PFC. Porozumění fungování PFC vyžaduje detailní znalost typů buněk, jejich aktivaci prostřednictvím dálkových vstupů a zpracování informací lokálními obvody (Anastasiades et al., 2021). U hlodavců je PFC rozdělena do čtyř vrstev obsahujících projekční pyramidové neurony a inhibiční interneurony, které jsou klíčové pro chování spojené se strachem a úzkostí. Velký význam v tomto chování mají například SST-IN a jejich disinhibice pyramidových neuronů. Další studium těchto interneuronů a jejich obvodů může odhalit principy důležité pro ukládání, upevňování a vyhledávání informací, což je klíčové pro averzivní chování a podmiňování strachu (Cummings & Clem, 2020). Jednotlivé podoblasti PFC jsou zapojeny do řízení chování souvisejícím s úzkostí. Tyto role jsou dány nebo se dále propisují do dalších oblastí mozku, s kterými je oblast PFC propojena, jako je amygdala, hipokampus nebo VTA. Prostřednictvím nervových spojů je zajištěna regulace podmíněných reakcí strachu a explorativního chování v prostředích vyvolávajících úzkost (Adhikari et al., 2010). Výzkum mozkové aktivity v příslušných oblastech včetně PFC zahrnuje monitorování projekčních a inhibičních neuronů, stereotaktické operace virového vektoru nebo měření vápníkové signalizace. Zvýšeného úzkostného chování lze dosáhnout pomocí aktivace glutamatergických neuronů v IL, nebo skrz antagonisty oxytocinu, který působí v PrL části PFC (Chen et al., 2021; Sabihi et al., 2014).

nAChRs jsou v PFC hojně a zároveň specificky exprimovány v jednotlivých typech projekčních neuronů a interneuronů. Expres nAChRs v PFC zároveň vykazuje specifické odlišnosti v závislosti na konkrétní korové vrstvě. Neuroanatomické údaje spolu s nejnovějšími poznatky o expresi nAChR v mozku nám umožňují lépe porozumět vztahu mezi nikotinem a úzkostí (Terry et al., 2023). Problematika úzkosti a úzkostných poruch je úzce spojena s nAChR v PFC, zejména s podjednotkami $\alpha 4\beta 2$ a $\alpha 7$. Studie ukazují, že snížená exprese těchto podjednotek může vést k rozvoji úzkostného a obranného chování (Eppolito et al., 2010). Přesto není zcela jasné, jak přesně nAChR regulují aktivitu PFC v jednotlivých korových vrstvách (Poorthuis et al., 2013). Pro úplné pochopení významu nAChR v PFC je nutné studovat jejich lokalizaci a konkrétní efekty v mozkových strukturách (Bloem et al., 2014). Tento výzkum je zásadní pro porozumění fyziologickým mechanismům, které stojí za úzkostným chováním, a může přispět k vývoji nových terapeutických strategií pro léčbu úzkostných poruch.

6 Seznam literatury

Pomocí „*“ jsou vyznačeny přehledové články

- Adhikari, A., Topiwala, M. A., & Gordon, J. A. (2010). Synchronized Activity between the Ventral Hippocampus and the Medial Prefrontal Cortex during Anxiety. *Neuron*, *65*(2), 257–269. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.002>
- * Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., & Rogers, S. W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: From structure to function. *Physiological Reviews*, *89*(1), 73–120. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2008>
- * Alexandra Kredlow, M., Fenster, R. J., Laurent, E. S., Ressler, K. J., & Phelps, E. A. (2022). Prefrontal cortex, amygdala, and threat processing: Implications for PTSD. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *47*(1), 247–259. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01155-7>
- Amos, C. I., Wu, X., Broderick, P., Gorlov, I. P., Gu, J., Eisen, T., Dong, Q., Zhang, Q., Gu, X., Vijayakrishnan, J., Sullivan, K., Matakidou, A., Wang, Y., Mills, G., Doheny, K., Tsai, Y.-Y., Chen, W. V., Shete, S., Spitz, M. R., & Houlston, R. S. (2008). Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nature Genetics*, *40*(5), 616–622. <https://doi.org/10.1038/ng.109>
- * Anastasiades, P. G., & Carter, A. G. (2021). Circuit organization of the rodent medial prefrontal cortex. *Trends in Neurosciences*, *44*(7), 550–563. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.03.006>
- Anastasiades, P. G., Collins, D. P., & Carter, A. G. (2021). Mediodorsal and Ventromedial Thalamus Engage Distinct L1 Circuits in the Prefrontal Cortex. *Neuron*, *109*(2), 314–330.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.10.031>
- Azam, L., Winzer-Serhan, U. H., Chen, Y., & Leslie, F. M. (2002). Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within midbrain dopamine neurons. *Journal of Comparative Neurology*, *444*(3), 260–274. <https://doi.org/10.1002/cne.10138>
- Bailey, C. D. C., Alves, N. C., Nashmi, R., De Biasi, M., & Lambe, E. K. (2012). Nicotinic $\alpha 5$ subunits drive developmental changes in the activation and morphology of prefrontal cortex layer VI neurons. *Biological Psychiatry*, *71*(2), 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.09.011>
- * Baker, A., Kalmbach, B., Morishima, M., Kim, J., Juavinett, A., Li, N., & Dembrow, N. (2018). Specialized Subpopulations of Deep-Layer Pyramidal Neurons in the Neocortex: Bridging Cellular Properties to Functional Consequences. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *38*(24), 5441–5455. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0150-18.2018>
- Barbas, H., & Pandya, D. N. (1989). Architecture and intrinsic connections of the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *Journal of Comparative Neurology*, *286*(3), 353–375. <https://doi.org/10.1002/cne.902860306>
- Berrettini, W., Yuan, X., Tozzi, F., Song, K., Francks, C., Chilcoat, H., Waterworth, D., Muglia, P., & Mooser, V. (2008). Alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. *Molecular Psychiatry*, *13*(4), 368–373. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002154>

- Bittner, K. C., Grienberger, C., Vaidya, S. P., Milstein, A. D., Macklin, J. J., Suh, J., Tonegawa, S., & Magee, J. C. (2015). Conjunctive input processing drives feature selectivity in hippocampal CA1 neurons. *Nature Neuroscience*, *18*(8), 1133–1142. <https://doi.org/10.1038/nn.4062>
- * Bloem, B., Poorthuis, R. B., & Mansvelder, H. D. (2014). Cholinergic modulation of the medial prefrontal cortex: The role of nicotinic receptors in attention and regulation of neuronal activity. *Frontiers in Neural Circuits*, *8*, 17. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00017>
- Bolles, R. C., & Collier, A. C. (1976). The effect of predictive cues on freezing in rats. *Animal Learning & Behavior*, *4*(1), 6–8. <https://doi.org/10.3758/BF03211975>
- Bordia, T., Grady, S. R., McIntosh, J. M., & Quik, M. (2007). Nigrostriatal damage preferentially decreases a subpopulation of alpha6beta2* nAChRs in mouse, monkey, and Parkinson's disease striatum. *Molecular Pharmacology*, *72*(1), 52–61. <https://doi.org/10.1124/mol.107.035998>
- Brannan, S. (2019). 32.2 TWO GLOBAL PHASE III TRIALS OF ENCENICLINE FOR COGNITIVE IMPAIRMENT IN CHRONIC SCHIZOPHRENIA PATIENTS: RED FLAGS AND LESSONS LEARNED. *Schizophrenia Bulletin*, *45*(Supplement_2), S141–S142. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbz022.133>
- Brejč, K., Van Dijk, W. J., Klaassen, R. V., Schuurmans, M., Van Der Oost, J., Smit, A. B., & Sixma, T. K. (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*, *411*(6835), 269–276. <https://doi.org/10.1038/35077011>
- Brooks, J. M., Pershing, M. L., Thomsen, M. S., Mikkelsen, J. D., Sarter, M., & Bruno, J. P. (2012). Transient inactivation of the neonatal ventral hippocampus impairs attentional set-shifting behavior: Reversal with an $\alpha 7$ nicotinic agonist. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *37*(11), 2476–2486. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.106>
- Burghaus, L., Schütz, U., Krempel, U., De Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., Wevers, A., Lindstrom, J., & Schröder, H. (2000). Quantitative assessment of nicotinic acetylcholine receptor proteins in the cerebral cortex of Alzheimer patients. *Molecular Brain Research*, *76*(2), 385–388. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(00\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(00)00031-0)
- * Carlén, M. (2017). What constitutes the prefrontal cortex? *Science (New York, N.Y.)*, *358*(6362), 478–482. <https://doi.org/10.1126/science.aan8868>
- Collins, D. P., Anastasiades, P. G., Marlin, J. J., & Carter, A. G. (2018). Reciprocal Circuits Linking the Prefrontal Cortex with Dorsal and Ventral Thalamic Nuclei. *Neuron*, *98*(2), 366–379.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.024>
- Conroy, W. G., & Berg, D. K. (1995). Neurons can maintain multiple classes of nicotinic acetylcholine receptors distinguished by different subunit compositions. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(9), 4424–4431. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.9.4424>
- Court, J., Spurdén, D., Lloyd, S., McKeith, I., Ballard, C., Cairns, N., Kerwin, R., Perry, R., & Perry, E. (1999). Neuronal nicotinic receptors in dementia with Lewy bodies and schizophrenia: Alpha-bungarotoxin and nicotine binding in the thalamus. *Journal of Neurochemistry*, *73*(4), 1590–1597. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0731590.x>

- Cummings, K. A., Bayshtok, S., Dong, T. N., Kenny, P. J., & Clem, R. L. (2022). Control of fear by discrete prefrontal GABAergic populations encoding valence-specific information. *Neuron*, *110*(18), 3036-3052.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.07.004>
- Cummings, K. A., & Clem, R. L. (2020). Prefrontal somatostatin interneurons encode fear memory. *Nature Neuroscience*, *23*(1), 61–74. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0552-7>
- * Dani, J. A., & Bertrand, D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *47*, 699–729. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105214>
- * Daniel-Watanabe, L., & Fletcher, P. C. (2022). Are Fear and Anxiety Truly Distinct? *Biological Psychiatry Global Open Science*, *2*(4), 341–349. <https://doi.org/10.1016/j.bpsgos.2021.09.006>
- de la Garza, R., Bickford-Wimer, P. C., Hoffer, B. J., & Freedman, R. (1987). Heterogeneity of nicotine actions in the rat cerebellum: An in vivo electrophysiologic study. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *240*(2), 689–695.
- Di Chiara, G., & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(14), 5274–5278. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5274>
- * Dolotov, O. V., Inozemtseva, L. S., Myasoedov, N. F., & Grivennikov, I. A. (2022). Stress-Induced Depression and Alzheimer’s Disease: Focus on Astrocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(9), 4999. <https://doi.org/10.3390/ijms23094999>
- Dominguez del Toro, E., Juiz, J. M., Peng, X., Lindstrom, J., & Criado, M. (1994). Immunocytochemical localization of the alpha 7 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, *349*(3), 325–342. <https://doi.org/10.1002/cne.903490302>
- Elayouby, K. S., Ishikawa, M., Dukes, A. J., Smith, A. C. W., Lu, Q., Fowler, C. D., & Kenny, P. J. (2021). A3* Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Habenula-Interpeduncular Nucleus Circuit Regulate Nicotine Intake. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *41*(8), 1779–1787. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0127-19.2020>
- * Elgoyhen, A. B. (2023). The $\alpha 9\alpha 10$ acetylcholine receptor: A non-neuronal nicotinic receptor. *Pharmacological Research*, *190*, 106735. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106735>
- Eppolito, A. K., Bachus, S. E., McDonald, C. G., Meador-Woodruff, J. H., & Smith, R. F. (2010). Late emerging effects of prenatal and early postnatal nicotine exposure on the cholinergic system and anxiety-like behavior. *Neurotoxicology and Teratology*, *32*(3), 336–345. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2009.12.009>
- Finnell, J. E., Lombard, C. M., Padi, A. R., Moffitt, C. M., Wilson, L. B., Wood, C. S., & Wood, S. K. (2017). Physical versus psychological social stress in male rats reveals distinct cardiovascular, inflammatory and behavioral consequences. *PloS One*, *12*(2), e0172868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172868>

- Fowler, C. D., Lu, Q., Johnson, P. M., Marks, M. J., & Kenny, P. J. (2011). Habenular $\alpha 5$ nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. *Nature*, *471*(7340), 597–601. <https://doi.org/10.1038/nature09797>
- Fowler, C. D., Tuesta, L., & Kenny, P. J. (2013). Role of $\alpha 5^*$ nicotinic acetylcholine receptors in the effects of acute and chronic nicotine treatment on brain reward function in mice. *Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3235-1>
- Freedman, R., Hall, M., Adler, L. E., & Leonard, S. (1995). Evidence in postmortem brain tissue for decreased numbers of hippocampal nicotinic receptors in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, *38*(1), 22–33. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(94\)00252-X](https://doi.org/10.1016/0006-3223(94)00252-X)
- Fulco, B. C. W., Klann, I. P., Rodrigues, R. F., Marzari, B. N., & Nogueira, C. W. (2022). Social-single prolonged stress as an ether-free candidate animal model of post-traumatic stress disorder: Female and male outcomings. *Journal of Psychiatric Research*, *154*, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2022.07.053>
- Gabbott, P. L. A., Warner, T. A., Jays, P. R. L., Salway, P., & Busby, S. J. (2005). Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *The Journal of Comparative Neurology*, *492*(2), 145–177. <https://doi.org/10.1002/cne.20738>
- Goldin, P. R., Ziv, M., Jazaieri, H., Weeks, J., Heimberg, R. G., & Gross, J. J. (2014). Impact of cognitive-behavioral therapy for social anxiety disorder on the neural bases of emotional reactivity to and regulation of social evaluation. *Behaviour Research and Therapy*, *62*, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.brat.2014.08.005>
- * Gotti, C., & Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: From structure to pathology. *Progress in Neurobiology*, *74*(6), 363–396. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.09.006>
- * Gotti, C., Zoli, M., & Clementi, F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: Native subtypes and their relevance. *Trends in Pharmacological Sciences*, *27*(9), 482–491. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.07.004>
- Grando, S. A., Zelickson, B. D., Kist, D. A., Weinshenker, D., Bigliardi, P. L., Wendelschafer-Crabb, G., Kennedy, W. R., & Dahl, M. V. (1995). Keratinocyte Muscarinic Acetylcholine Receptors: Immunolocalization and Partial Characterization. *Journal of Investigative Dermatology*, *104*(1), 95–100. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12613582>
- Graur, A., Sinclair, P., Schneeweis, A. K., Pak, D. T., & Kabbani, N. (2023). The human acetylcholinesterase C-terminal T30 peptide activates neuronal growth through alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors and the mTOR pathway. *Scientific Reports*, *13*(1), 11434. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38637-1>
- * Gribkoff, V. K., & Kaczmarek, L. K. (2017). The need for new approaches in CNS drug discovery: Why drugs have failed, and what can be done to improve outcomes. *Neuropharmacology*, *120*, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.021>
- Griffith, J. M., O'Neill, J. E., Petty, F., Garver, D., Young, D., & Freedman, R. (1998). Nicotinic receptor desensitization and sensory gating deficits in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, *44*(2), 98–106. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(97\)00362-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(97)00362-4)

- Grillon, C. (2008). Models and mechanisms of anxiety: Evidence from startle studies. *Psychopharmacology*, *199*(3), 421–437. <https://doi.org/10.1007/s00213-007-1019-1>
- Guo, K., Yamawaki, N., Svoboda, K., & Shepherd, G. M. G. (2018). Anterolateral Motor Cortex Connects with a Medial Subdivision of Ventromedial Thalamus through Cell Type-Specific Circuits, Forming an Excitatory Thalamo-Cortico-Thalamic Loop via Layer 1 Apical Tuft Dendrites of Layer 5B Pyramidal Tract Type Neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *38*(41), 8787–8797. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1333-18.2018>
- Han, Z., Le Novère, N., Zoli, M., Hill, J. A., Champtiaux, N., & Changeux, J. (2000). Localization of nAChR subunit mRNAs in the brain of *Macaca mulatta*. *European Journal of Neuroscience*, *12*(10), 3664–3674. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00262.x>
- * Harris, K. D., & Shepherd, G. M. G. (2015). The neocortical circuit: Themes and variations. *Nature Neuroscience*, *18*(2), 170–181. <https://doi.org/10.1038/nn.3917>
- Harrison, R. K. (2016). Phase II and phase III failures: 2013-2015. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *15*(12), 817–818. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.184>
- * Heidbreder, C. A., & Groenewegen, H. J. (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: Evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *27*(6), 555–579. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.09.003>
- * Hilscher, M. M., Mikulovic, S., Perry, S., Lundberg, S., & Kullander, K. (2023). The alpha2 nicotinic acetylcholine receptor, a subunit with unique and selective expression in inhibitory interneurons associated with principal cells. *Pharmacological Research*, *196*, 106895. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106895>
- * Hoskin, J. L., Al-Hasan, Y., & Sabbagh, M. N. (2019). Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists for the Treatment of Alzheimer’s Dementia: An Update. *Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*, *21*(3), 370–376. <https://doi.org/10.1093/ntr/nty116>
- Charpantier, E., Barnéoud, P., Moser, P., Besnard, F., & Sgard, F. (1998). Nicotinic acetylcholine subunit mRNA expression in dopaminergic neurons of the rat substantia nigra and ventral tegmental area. *NeuroReport*, *9*(13), 3097–3101. <https://doi.org/10.1097/00001756-199809140-00033>
- Chen, Y.-H., Wu, J.-L., Hu, N.-Y., Zhuang, J.-P., Li, W.-P., Zhang, S.-R., Li, X.-W., Yang, J.-M., & Gao, T.-M. (2021). Distinct projections from the infralimbic cortex exert opposing effects in modulating anxiety and fear. *The Journal of Clinical Investigation*, *131*(14), e145692. <https://doi.org/10.1172/JCI145692>
- Ishikawa, R., Fukushima, H., Frankland, P. W., & Kida, S. (2016). Hippocampal neurogenesis enhancers promote forgetting of remote fear memory after hippocampal reactivation by retrieval. *eLife*, *5*, e17464. <https://doi.org/10.7554/eLife.17464>
- Jacobs, D. S., Allen, M. C., Park, J., & Moghaddam, B. (2022). Learning of probabilistic punishment as a model of anxiety produces changes in action but not punisher encoding in the dmPFC and VTA. *eLife*, *11*, e78912. <https://doi.org/10.7554/eLife.78912>

- * Jensen, A. A., Frølund, B., Liljefors, T., & Krogsgaard-Larsen, P. (2005). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *Journal of Medicinal Chemistry*, *48*(15), 4705–4745. <https://doi.org/10.1021/jm040219e>
- Ji, D., Lape, R., & Dani, J. A. (2001). Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, *31*(1), 131–141. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00332-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00332-4)
- Johnstone, T. B., Gu, Z., Yoshimura, R. F., Villegier, A.-S., Hogenkamp, D. J., Whitemore, E. R., Huang, J.-C., Tran, M. B., Belluzzi, J. D., Yakel, J. L., & Gee, K. W. (2011). Allosteric modulation of related ligand-gated ion channels synergistically induces long-term potentiation in the hippocampus and enhances cognition. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *336*(3), 908–915. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.176255>
- Jones, I. W., Bolam, J. Paul., & Wonnacott, S. (2001). Presynaptic localisation of the nicotinic acetylcholine receptor $\beta 2$ subunit immunoreactivity in rat nigrostriatal dopaminergic neurones. *Journal of Comparative Neurology*, *439*(2), 235–247. <https://doi.org/10.1002/cne.1345>
- Kao, P. N., & Karlin, A. (1986). Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-link between adjacent half-cystinyl residues. *The Journal of Biological Chemistry*, *261*(18), 8085–8088.
- Kassam, S. M., Herman, P. M., Goodfellow, N. M., Alves, N. C., & Lambe, E. K. (2008). Developmental excitation of corticothalamic neurons by nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(35), 8756–8764. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2645-08.2008>
- * Kenwood, M. M., Kalin, N. H., & Barbas, H. (2022). The prefrontal cortex, pathological anxiety, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *47*(1), 260–275. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01109-z>
- * Kida, S. (2019). Reconsolidation/destabilization, extinction and forgetting of fear memory as therapeutic targets for PTSD. *Psychopharmacology*, *236*(1), 49–57. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5086-2>
- King, J. R., & Kabbani, N. (2016). Alpha 7 nicotinic receptor coupling to heterotrimeric G proteins modulates RhoA activation, cytoskeletal motility, and structural growth. *Journal of Neurochemistry*, *138*(4), 532–545. <https://doi.org/10.1111/jnc.13660>
- Klink, R., de Kerchove d'Exaerde, A., Zoli, M., & Changeux, J. P. (2001). Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *21*(5), 1452–1463. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-05-01452.2001>
- Koukoulis, F., Rooy, M., Tziotis, D., Sailor, K. A., O'Neill, H. C., Levenga, J., Witte, M., Nilges, M., Changeux, J.-P., Hoeffler, C. A., Stitzel, J. A., Gutkin, B. S., DiGregorio, D. A., & Maskos, U. (2017). Nicotine reverses hypofrontality in animal models of addiction and schizophrenia. *Nature Medicine*, *23*(3), 347–354. <https://doi.org/10.1038/nm.4274>

- * Kraeuter, A.-K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1916, 69–74. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_4
- * Kupferschmidt, D. A., Cummings, K. A., Joffe, M. E., MacAskill, A., Malik, R., Sánchez-Bellot, C., Tejada, H. A., & Yarur Castillo, H. (2022). Prefrontal Interneurons: Populations, Pathways, and Plasticity Supporting Typical and Disordered Cognition in Rodent Models. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 42(45), 8468–8476. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1136-22.2022>
- Kuryatov, A., Olale, F., Cooper, J., Choi, C., & Lindstrom, J. (2000). Human alpha6 AChR subtypes: Subunit composition, assembly, and pharmacological responses. *Neuropharmacology*, 39(13), 2570–2590. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(00\)00144-1](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(00)00144-1)
- * Kutlu, M. G., & Gould, T. J. (2015). Nicotine modulation of fear memories and anxiety: Implications for learning and anxiety disorders. *Biochemical Pharmacology*, 97(4), 498–511. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.029>
- * Laubach, M., Amarante, L. M., Swanson, K., & White, S. R. (2018). What, If Anything, Is Rodent Prefrontal Cortex? *eNeuro*, 5(5), ENEURO.0315-18.2018. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0315-18.2018>
- Leeson, V. C., Robbins, T. W., Matheson, E., Hutton, S. B., Ron, M. A., Barnes, T. R. E., & Joyce, E. M. (2009). Discrimination learning, reversal, and set-shifting in first-episode schizophrenia: Stability over six years and specific associations with medication type and disorganization syndrome. *Biological Psychiatry*, 66(6), 586–593. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.05.016>
- Letzkus, J. J., Wolff, S. B. E., Meyer, E. M. M., Tovote, P., Courtin, J., Herry, C., & Lüthi, A. (2011). A disinhibitory microcircuit for associative fear learning in the auditory cortex. *Nature*, 480(7377), 331–335. <https://doi.org/10.1038/nature10674>
- Lindstrom, J. (2000). The Structures of Neuronal Nicotinic Receptors. In F. Clementi, D. Fornasari, & C. Gotti (Eds.), *Neuronal Nicotinic Receptors* (Roč. 144, s. 101–162). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-57079-7_6
- Liu, W.-Z., Huang, S.-H., Wang, Y., Wang, C.-Y., Pan, H.-Q., Zhao, K., Hu, P., Pan, B.-X., & Zhang, W.-H. (2023). Medial prefrontal cortex input to basolateral amygdala controls acute stress-induced short-term anxiety-like behavior in mice. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 48(5), 734–744. <https://doi.org/10.1038/s41386-022-01515-x>
- Lykhmus, O., Voytenko, L. P., Lips, K. S., Bergen, I., Krasteva-Christ, G., Vetter, D. E., Kummer, W., & Skok, M. (2017). Nicotinic Acetylcholine Receptor $\alpha 9$ and $\alpha 10$ Subunits Are Expressed in the Brain of Mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 282. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00282>
- * McEvoy, P. M. (2019). Metacognitive Therapy for Anxiety Disorders: A Review of Recent Advances and Future Research Directions. *Current Psychiatry Reports*, 21(5), 29. <https://doi.org/10.1007/s11920-019-1014-3>

- McLaughlin, K. A., Koenen, K. C., Friedman, M. J., Ruscio, A. M., Karam, E. G., Shahly, V., Stein, D. J., Hill, E. D., Petukhova, M., Alonso, J., Andrade, L. H., Angermeyer, M. C., Borges, G., de Girolamo, G., de Graaf, R., Demyttenaere, K., Florescu, S. E., Mladenova, M., Posada-Villa, J., ... Kessler, R. C. (2015). Subthreshold posttraumatic stress disorder in the world health organization world mental health surveys. *Biological Psychiatry*, *77*(4), 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.03.028>
- * Millar, N. S., & Gotti, C. (2009). Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, *56*(1), 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.041>
- Morales-Perez, C. L., Noviello, C. M., & Hibbs, R. E. (2016). X-ray structure of the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor. *Nature*, *538*(7625), 411–415. <https://doi.org/10.1038/nature19785>
- * Nashmi, R., & Lester, H. A. (2006). CNS localization of neuronal nicotinic receptors. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, *30*(1–2), 181–184. <https://doi.org/10.1385/JMN:30:1:181>
- Nelson, M. E., Kuryatov, A., Choi, C. H., Zhou, Y., & Lindstrom, J. (2003). Alternate stoichiometries of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *Molecular Pharmacology*, *63*(2), 332–341. <https://doi.org/10.1124/mol.63.2.332>
- Nguyen, C., Mondoloni, S., Le Borgne, T., Centeno, I., Come, M., Jehl, J., Solié, C., Reynolds, L. M., Durand-de Cuttoli, R., Tolu, S., Valverde, S., Didienne, S., Hanneke, B., Fiancette, J.-F., Pons, S., Maskos, U., Deroche-Gamonet, V., Dalkara, D., Hardelin, J.-P., ... Faure, P. (2021). Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway to promote anxiety. *Neuron*, *109*(16), 2604–2615.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.013>
- Normann, N., & Morina, N. (2018). The Efficacy of Metacognitive Therapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Psychology*, *9*, 2211. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.02211>
- O'Connor, S. M., Sleebs, B. E., Street, I. P., Flynn, B. L., Baell, J. B., Coles, C., Quazi, N., Paul, D., Poiraud, E., Huyard, B., Wagner, S., Andriambeloson, E., & de Souza, E. B. (2024). BNC210, a negative allosteric modulator of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor, demonstrates anxiolytic- and antidepressant-like effects in rodents. *Neuropharmacology*, *246*, 109836. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2024.109836>
- Olincy, A., Harris, J. G., Johnson, L. L., Pender, V., Kongs, S., Allensworth, D., Ellis, J., Zerbe, G. O., Leonard, S., Stevens, K. E., Stevens, J. O., Martin, L., Adler, L. E., Soti, F., Kem, W. R., & Freedman, R. (2006). Proof-of-concept trial of an alpha7 nicotinic agonist in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, *63*(6), 630–638. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.6.630>
- Öngür, D., Ferry, A. T., & Price, J. L. (2003). Architectonic subdivision of the human orbital and medial prefrontal cortex. *Journal of Comparative Neurology*, *460*(3), 425–449. <https://doi.org/10.1002/cne.10609>
- * Paterson, D., & Nordberg, A. (2000). Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Progress in Neurobiology*, *61*(1), 75–111. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(99\)00045-3](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(99)00045-3)
- Pellow, S., & File, S. E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *24*(3), 525–529. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90552-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90552-6)

- Phillips, R. G., & LeDoux, J. E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, *106*(2), 274–285. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.106.2.274>
- Pi, H.-J., Hangya, B., Kvitsiani, D., Sanders, J. I., Huang, Z. J., & Kepecs, A. (2013). Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control. *Nature*, *503*(7477), 521–524. <https://doi.org/10.1038/nature12676>
- * Picciotto, M. R., Caldarone, B. J., Brunzell, D. H., Zachariou, V., Stevens, T. R., & King, S. L. (2001). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice: Physiological and behavioral phenotypes and possible clinical implications. *Pharmacology & Therapeutics*, *92*(2–3), 89–108. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(01\)00161-9](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(01)00161-9)
- Pidoplichko, V. I., Noguchi, J., Areola, O. O., Liang, Y., Peterson, J., Zhang, T., & Dani, J. A. (2004). Nicotinic cholinergic synaptic mechanisms in the ventral tegmental area contribute to nicotine addiction. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *11*(1), 60–69. <https://doi.org/10.1101/lm.70004>
- Poorthuis, R. B., Bloem, B., Schak, B., Wester, J., de Kock, C. P. J., & Mansvelder, H. D. (2013). Layer-specific modulation of the prefrontal cortex by nicotinic acetylcholine receptors. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, *23*(1), 148–161. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhr390>
- * Poorthuis, R. B., & Mansvelder, H. D. (2013). Nicotinic acetylcholine receptors controlling attention: Behavior, circuits and sensitivity to disruption by nicotine. *Biochemical Pharmacology*, *86*(8), 1089–1098. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.07.003>
- Quik, M., Campos, C., & Grady, S. R. (2013). Multiple CNS nicotinic receptors mediate L-dopa-induced dyskinesias: Studies with parkinsonian nicotinic receptor knockout mice. *Biochemical Pharmacology*, *86*(8), 1153–1162. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.06.027>
- Ramirez-Latorre, J., Yu, C. R., Qu, X., Perin, F., Karlin, A., & Role, L. (1996). Functional contributions of $\alpha 5$ subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature*, *380*(6572), 347–351. <https://doi.org/10.1038/380347a0>
- Reiner, A., Jiao, Y., Del Mar, N., Laverghetta, A. V., & Lei, W. L. (2003). Differential morphology of pyramidal tract-type and intratelencephalically projecting-type corticostriatal neurons and their intrastriatal terminals in rats. *Journal of Comparative Neurology*, *457*(4), 420–440. <https://doi.org/10.1002/cne.10541>
- Sabihi, S., Dong, S. M., Durosko, N. E., & Leuner, B. (2014). Oxytocin in the medial prefrontal cortex regulates maternal care, maternal aggression and anxiety during the postpartum period. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *8*, 258. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00258>
- Sargent, P. B. (1993). The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annual Review of Neuroscience*, *16*, 403–443. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.16.030193.002155>
- Seyedaghamiri, F., Hosseini, L., Kazmi, S., Mahmoudi, J., Shanebandi, D., Ebrahimi-Kalan, A., Rahbarghazi, R., Sadigh-Eteghad, S., & Farhoudi, M. (2022). Varenicline improves cognitive impairment in a mouse model of mPFC ischemia: The possible roles of inflammation, apoptosis,

- and synaptic factors. *Brain Research Bulletin*, 181, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.01.010>
- Sharma, G., & Vijayaraghavan, S. (2001). Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), 4148–4153. <https://doi.org/10.1073/pnas.071540198>
- Sheffield, E. B., Quick, M. W., & Lester, R. A. (2000). Nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA expression and channel function in medial habenula neurons. *Neuropharmacology*, 39(13), 2591–2603. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(00\)00138-6](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(00)00138-6)
- * Shin, L. M., & Liberzon, I. (2010). The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(1), 169–191. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.83>
- Schaeffer, D. J., Hori, Y., Gilbert, K. M., Gati, J. S., Menon, R. S., & Everling, S. (2020). Divergence of rodent and primate medial frontal cortex functional connectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(35), 21681–21689. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003181117>
- Schapira, A. H., & Jenner, P. (2011). Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 26(6), 1049–1055. <https://doi.org/10.1002/mds.23732>
- Schröder, H., de Vos, R. A., Jansen, E. N., Birtsch, C., Wevers, A., Lobron, C., Nowacki, S., Schröder, R., & Maelicke, A. (1995). Gene expression of the nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit in the frontal cortex in Parkinson's disease patients. *Neuroscience Letters*, 187(3), 173–176. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11367-6](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11367-6)
- Schuman, B., Machold, R. P., Hashikawa, Y., Fuzik, J., Fishell, G. J., & Rudy, B. (2019). Four Unique Interneuron Populations Reside in Neocortical Layer 1. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 39(1), 125–139. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1613-18.2018>
- * Sinclair, P., & Kabbani, N. (2023). Ionotropic and metabotropic responses by alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors. *Pharmacological Research*, 197, 106975. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106975>
- * Steimer, T. (2011). Animal models of anxiety disorders in rats and mice: Some conceptual issues. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 13(4), 495–506. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2011.13.4/tsteimer>
- Sun, Q., Li, X., Ren, M., Zhao, M., Zhong, Q., Ren, Y., Luo, P., Ni, H., Zhang, X., Zhang, C., Yuan, J., Li, A., Luo, M., Gong, H., & Luo, Q. (2019). A whole-brain map of long-range inputs to GABAergic interneurons in the mouse medial prefrontal cortex. *Nature Neuroscience*, 22(8), 1357–1370. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0429-9>
- Suzuki, T., Hide, I., Matsubara, A., Hama, C., Harada, K., Miyano, K., Andrä, M., Matsubayashi, H., Sakai, N., Kohsaka, S., Inoue, K., & Nakata, Y. (2006). Microglial alpha7 nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation

- toward a neuroprotective role. *Journal of Neuroscience Research*, 83(8), 1461–1470. <https://doi.org/10.1002/jnr.20850>
- * Sylvers, P., Lilienfeld, S. O., & LaPrairie, J. L. (2011). Differences between trait fear and trait anxiety: Implications for psychopathology. *Clinical Psychology Review*, 31(1), 122–137. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2010.08.004>
- Tekinay, A. B., Nong, Y., Miwa, J. M., Lieberam, I., Ibanez-Tallon, I., Greengard, P., & Heintz, N. (2009). A role for LYNX2 in anxiety-related behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), 4477–4482. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813109106>
- * Terry, A. V., Jones, K., & Bertrand, D. (2023). Nicotinic acetylcholine receptors in neurological and psychiatric diseases. *Pharmacological Research*, 191, 106764. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106764>
- Tobacco and Genetics Consortium. (2010). Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nature Genetics*, 42(5), 441–447. <https://doi.org/10.1038/ng.571>
- Tolu, S., Eddine, R., Marti, F., David, V., Graupner, M., Pons, S., Baudonnat, M., Husson, M., Besson, M., Reperant, C., Zemdegs, J., Pagès, C., Hay, Y. A. H., Lambalez, B., Caboche, J., Gutkin, B., Gardier, A. M., Changeux, J.-P., Faure, P., & Maskos, U. (2013). Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement. *Molecular Psychiatry*, 18(3), 382–393. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.83>
- * Tremblay, R., Lee, S., & Rudy, B. (2016). GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron*, 91(2), 260–292. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.033>
- Ueta, Y., Sohn, J., Agahari, F. A., Im, S., Hirai, Y., Miyata, M., & Kawaguchi, Y. (2019). Ipsi- and contralateral corticocortical projection-dependent subcircuits in layer 2 of the rat frontal cortex. *Journal of Neurophysiology*, 122(4), 1461–1472. <https://doi.org/10.1152/jn.00333.2019>
- * Uylings, H. B. M., Groenewegen, H. J., & Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research*, 146(1–2), 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.09.028>
- * Verbitsky, A., Dopfel, D., & Zhang, N. (2020). Rodent models of post-traumatic stress disorder: Behavioral assessment. *Translational Psychiatry*, 10(1), 132. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0806-x>
- Wada, E., Wada, K., Boulter, J., Deneris, E., Heinemann, S., Patrick, J., & Swanson, L. W. (1989). Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: A hybridization histochemical study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 284(2), 314–335. <https://doi.org/10.1002/cne.902840212>
- Walling, D., Marder, S. R., Kane, J., Fleischhacker, W. W., Keefe, R. S. E., Hosford, D. A., Dvergsten, C., Segreti, A. C., Beaver, J. S., Toler, S. M., Jett, J. E., & Dunbar, G. C. (2016). Phase 2 Trial of an Alpha-7 Nicotinic Receptor Agonist (TC-5619) in Negative and Cognitive Symptoms of Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 42(2), 335–343. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbv072>

- Wang, H. Y., Lee, D. H., Davis, C. B., & Shank, R. P. (2000). Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Neurochemistry*, 75(3), 1155–1161. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0751155.x>
- * Wessler, I., & Kirkpatrick, C. J. (2008). Acetylcholine beyond neurons: The non-neuronal cholinergic system in humans. *British Journal of Pharmacology*, 154(8), 1558–1571. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.185>
- Whiteaker, P., Wilking, J. A., Brown, R. W. B., Brennan, R. J., Collins, A. C., Lindstrom, J. M., & Boulter, J. (2009). Pharmacological and immunochemical characterization of alpha2* nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in mouse brain. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(6), 795–804. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.68>
- * Winterer, G. (2010). Why do patients with schizophrenia smoke? *Current Opinion in Psychiatry*, 23(2), 112–119. <https://doi.org/10.1097/YCO.0b013e3283366643>
- * Wittenberg, R. E., Wolfman, S. L., De Biasi, M., & Dani, J. A. (2020). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotine addiction: A brief introduction. *Neuropharmacology*, 177, 108256. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108256>
- Wolpe, J. (1981). The dichotomy between classical conditioned and cognitively learned anxiety. *Journal of Behavior Therapy and Experimental Psychiatry*, 12(1), 35–42. [https://doi.org/10.1016/0005-7916\(81\)90027-6](https://doi.org/10.1016/0005-7916(81)90027-6)
- Wu, J., Kuo, Y.-P., George, A. A., Xu, L., Hu, J., & Lukas, R. J. (2004). β -Amyloid Directly Inhibits Human $\alpha 4\beta 2$ -Nicotinic Acetylcholine Receptors Heterologously Expressed in Human SH-EP1 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(36), 37842–37851. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400335200>
- Xu, H., Liu, L., Tian, Y., Wang, J., Li, J., Zheng, J., Zhao, H., He, M., Xu, T.-L., Duan, S., & Xu, H. (2019). A Disinhibitory Microcircuit Mediates Conditioned Social Fear in the Prefrontal Cortex. *Neuron*, 102(3), 668-682.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.026>
- Yeh, J. J., Yasuda, R. P., Dávila-García, M. I., Xiao, Y., Ebert, S., Gupta, T., Kellar, K. J., & Wolfe, B. B. (2001). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha3 subunit protein in rat brain and sympathetic ganglion measured using a subunit-specific antibody: Regional and ontogenic expression. *Journal of Neurochemistry*, 77(1), 336–346. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.t01-1-00259.x>
- Zhou, Y., Nelson, M. E., Kuryatov, A., Choi, C., Cooper, J., & Lindstrom, J. (2003). Human alpha4beta2 acetylcholine receptors formed from linked subunits. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(27), 9004–9015. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-27-09004.2003>
- Zoli, M., Moretti, M., Zanardi, A., McIntosh, J. M., Clementi, F., & Gotti, C. (2002). Identification of the Nicotinic Receptor Subtypes Expressed on Dopaminergic Terminals in the Rat Striatum. *The Journal of Neuroscience*, 22(20), 8785–8789. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-20-08785.2002>

Zoli, M., Picciotto, M. R., Ferrari, R., Cocchi, D., & Changeux, J. P. (1999). Increased neurodegeneration during ageing in mice lacking high-affinity nicotine receptors. *The EMBO Journal*, *18*(5), 1235–1244. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.5.1235>