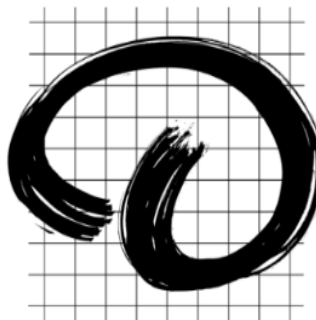


# Stressz iránti sérülékenység háttérében álló idegrendszeri mechanizmusok

**Maróthy Róbert Dániel**

Állatorvostudományi Egyetem

Biológia BSc. III. évfolyam



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

Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

Transzlációs Magatartás Idegtudomány kutatócsoport

**Belső konzulens:** Puska Gina

Budapest

2022

# Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke .....	3
2. Bevezetés .....	4
2.1. Stressz.....	4
2.1.1. Stressz fogalma .....	4
2.1.2. Stresszválasz .....	4
2.1.3. Stresszválasz idegrendszeri háttere .....	6
2.1.4 A stresszválasz és a pszichopatológia kapcsolata .....	6
2.2. Poszttraumás Stressz Zavar (PTSD) .....	7
2.2.1. PTSD diagnosztizálása .....	7
2.2.2. A PTSD előfordulási aránya.....	9
2.2.3. A PTSD neurobiológiai háttere .....	10
2.2.3.1. Az amigdala szerepe a PTSD-ben .....	10
2.2.3.2. A hippocampus szerepe a PTSD-ben.....	11
2.2.3.3. A mediális prefrontális kéreg szerepe a PTSD-ben.....	11
2.2.4. A PTSD modellezése.....	12
3. Célkitűzés .....	14
4. Anyag és módszer .....	15
4.1. Állatok .....	15
4.2. Kísérleti terv .....	15
4.3. Magatartástesztek .....	16
4.3.1. Félelmi kondicionálás: kontrollálhatatlan lábsokk .....	16
4.3.2. Félelmi válasz mérése – állatok kategorizálása.....	16
4.4. Perfúzió és metszés .....	16
4.5. Immunhisztokémia.....	17
4.6. Statisztika.....	18
5. Eredmények .....	19
5.1 Cr+ neuronok száma és aktivitása .....	19
5.2 VIP+ neuronok száma és aktivitása.....	23
6. Értékelés, következtetés .....	28
7. Összefoglaló .....	30
8. Summary.....	31
9. Köszönetnyilvánítás .....	32
10. Irodalom jegyzék.....	33
11. Nyilatkozatok.....	39

## 1. Rövidítések jegyzéke

<b>ACC</b>	anterior cinguláris kéreg ( <i>anterior cingular cortex</i> )
<b>ACTH</b>	mellékvesekéreg serkentő hormon ( <i>adrenocorticotropic hormone</i> )
<b>ANOVA</b>	variacionálízis
<b>BNO-11</b>	Betegségek Nemzetközi Osztályozása, tizenegyedik változat ( <i>International Classification of Diseases 11th Revision</i> )
<b>BLA</b>	bazolaterális amigdala ( <i>basolateral amygdala</i> )
<b>CeA</b>	központi amigdala ( <i>central amygdala</i> )
<b>CeM</b>	mediális központi amigdala ( <i>medial central amygdala</i> )
<b>CR</b>	kalretinin
<b>CRF</b>	kortikotropin felszabadító faktor ( <i>corticotropin releasing factor</i> )
<b>dIPFC</b>	dorzolaterális prefrontális kéreg ( <i>dorsolateral prefrontal cortex</i> )
<b>DSM-5</b>	Mentális Zavarok Diagnosztikai és Statisztikai kézikönyve ötödik kiadás ( <i>The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition</i> )
<b>GABA</b>	gamma-amino-vajsav ( <i>gamma-aminobutyric acid</i> )
<b>HPA tengely</b>	hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely ( <i>hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i> )
<b>IgG</b>	immunglobulin G
<b>IL</b>	infralimbikus
<b>mPFC</b>	mediális prefrontális kéreg ( <i>medial prefrontal cortex</i> )
<b>omPFC</b>	orbitomediális prefrontális kéreg ( <i>orbito medial prefrontal cortex</i> )
<b>PBS</b>	foszfátpufferelt fiziológiás sóoldat
<b>PFA</b>	parafomaldehid
<b>PFC</b>	prefrontális kéreg ( <i>prefrontal cortex</i> )
<b>PN</b>	projekciós neuron
<b>PrL</b>	prelimbikus
<b>PTSD</b>	poszttraumás stressz zavar ( <i>posttraumatic stress disorder</i> )
<b>VIP</b>	vazoaktív intesztinális polipeptid ( <i>vasoactive intestinal polipeptide</i> )
<b>vmPFC</b>	ventromediális prefrontális kéreg ( <i>ventromedial prefrontal cortex</i> )

## 2. Bevezetés

### 2.1. Stressz

#### 2.1.1. Stressz fogalma

A "stressz", mint kifejezés szinte a világ összes kultúrájában és nyelvében elterjedt és aktívan használják nem csak tudósok, de laikusok is. Számos meghatározást és jelentést is tulajdonítottak a kifejezésnek, valamint a neurobiológiában a terminológiát gyakran rejtett feltételezések és előítéletek befolyásolják. Ez viszont nemcsak a kutatási irányokra, hanem a kutatás eredményeire is hatással van, az eredményekből levont következtetésekkel együtt [1]. Szinte minden tudományterületen fontos az, hogy időnként átgondoljuk a jelenleg érvényes terminológiákat és egy esetleges új, alternatív megfogalmazásának lehetséges előnyeit. Ez a stresszkutatásban is rendkívül fontos, hiszen a rejtett, befolyásoló tényezőket mindenképpen figyelembe kell venni, mivel a stresszesemények nem vezetnek minden egyénél ugyanahhoz az értelmezéshez vagy következményhez [2].

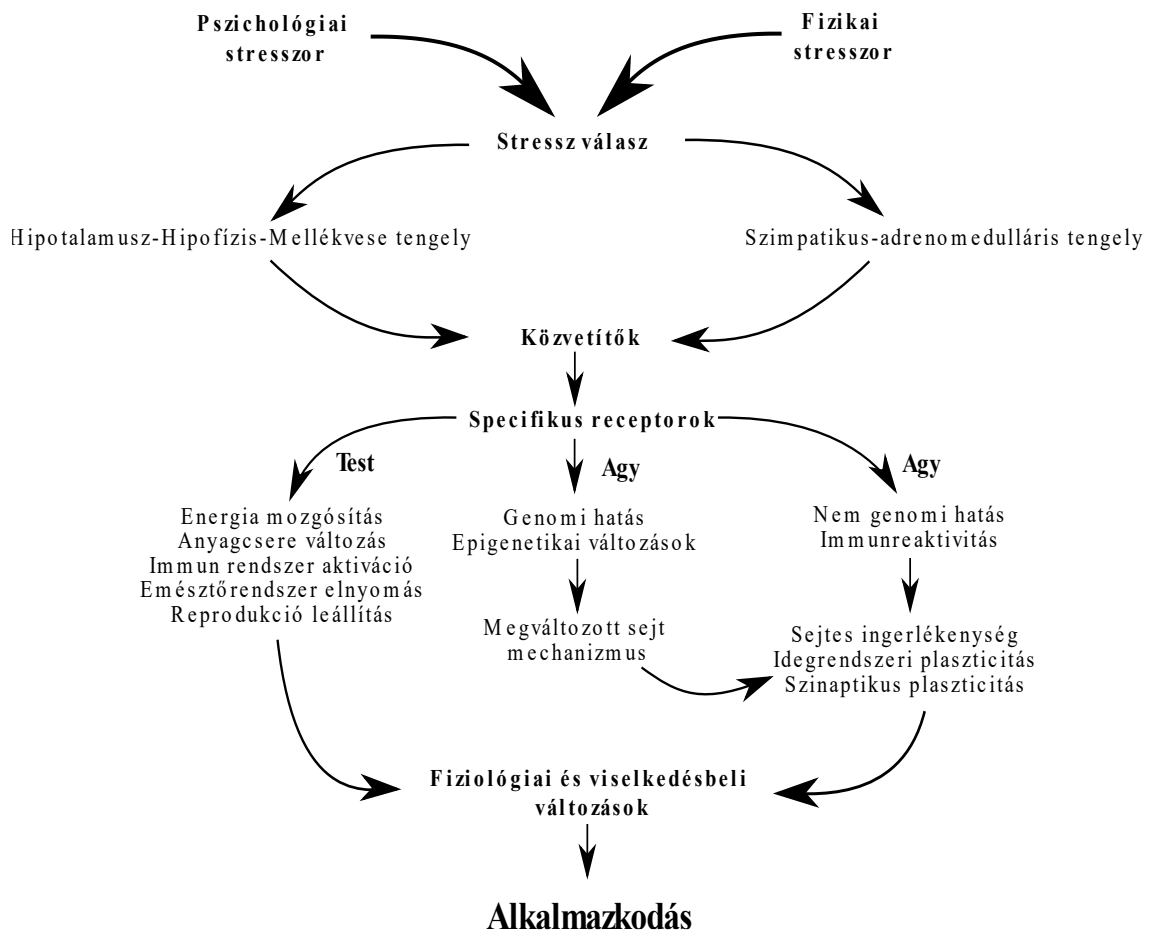
Amikor arról beszélünk, hogy 'stressz', rögtön negatív környezetbe helyezzük az értelmezést, leginkább azért, mert nem csak kiválthat, hanem súlyosbíthat is már meglévő kóros állapotokat [3]. Ennek ellenére nem csak állatokban, de emberekben is megfigyelhető a stresszel szembeni erős ellenállás [4], ami arra enged következtetni, hogy a stresszel szembeni megküzdés a normális, míg a stresszhez köthető elváltozások a kivételek, még evolúciós szemszögből nézve is [5]. Ezen kívül úgy tűnik, hogy azok a traumával kapcsolatos pszichopatológiát okozó idegrendszeri mechanizmusok különböznek az olyan idegrendszeri mechanizmusoktól, amik valamilyen stresszt váltanak ki, de nem okoznak traumával kapcsolatos mentális zavart [6].

#### 2.1.2. Stresszválasz

Selye János, a stresszkutatás apjaként is emlegetett kutatóorvos, még 1936-ban definiálta a stresszválaszt úgy, hogy „a szervezet nem specifikus válasza bármilyen változás iránti igényre” [7]. Ez a meghatározás ellenben túl általános, és korlátozza a stresszválasz fogalmát arra, hogy a szervezet egy stresszorra ad valamilyen választ. 80 év elteltével Selye definíciója után is még mindig nehezen határozható meg a stresszválasz. Egy fontos oka ennek az, hogy ha egy környezeti ingerre választ ad a szervezet, az magával vonz fiziológiás változásokat is (*I. ábra*). Ellenben a kialakult válasz mikor esik egy stresszorra adott válasz kategóriájába, már nem egyértelműen definiálható.

A definíciók, fogalmak közötti tisztázás érdekében vezették be az allostázis és az allostatisztikus túlsúly fogalmát [8]. Az allostázis olyan biológiai válasz, amely a folyamatosan változó szociális és fizikai környezethez való alkalmazkodást segíti elő olyan közvetítők segítségével, amelyek egy nem lineáris hálózat keretein belül képesek egymást szabályozni (szimpatikus, paraszimpatikus aktivitás, gyulladáskeltő vagy gátló citokinek, kortizol). Ez sok esetben adaptív plaszticitást is magában foglal, például olyan tartós neurobiológiai, endokrin vagy immunválasz változást, amely segíti a szervezetet az új környezethez való alkalmazkodásban. Abban az esetben, ha az allostázis által aktivált mechanizmusok hosszabb ideig is fennállnak, allostatisztikus túlsúlyról beszélünk [9]. Míg az allostázis miatt kialakult válaszok adaptívak lehetnek, ennek a tartós fennmaradása már krónikus állapothoz, ami később maradandó patológiás elváltozáshoz, ez pedig idegrendszeri, pszichiátriai, szív- és érrendszerbeli vagy anyagcserével kapcsolatos megbetegedésekhez vezethet [10].

### A stressz rendszer működése



**1. ábra** A stressz rendszer működést összefoglaló ábra Godoy és munkatársai munkájából átemelve [11]

### **2.1.3. Stresszválasz idegrendszeri háttere**

A stresszre adott választ gyakran kombinált neuroendokrin válaszként írják le, hangsúlyt adva az endokrinológiai ágának: a szimpatikus idegrendszernek és a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengelynek (HPA tengely) [12]. A folyamat két részből tevődik össze: először egy gyors válaszból, amely során a szimpatikus idegrendszer aktiválódik, ezzel perifériás akciót okozva, mind a szimpatikus idegeken, mind a mellékvese központjából felszabaduló adrenalinon keresztül. Másodsor, egy lassan végbemenő folyamatból valósul meg a stresszre adott válasz, ami a HPA tengely által valósul meg. Ekkor kortikotropin felszabadító faktor (CRF) szabadul fel a hipotalamusz paraventriculáris magjából. Ez a mellékvesekéreg serkentő hormon (ACTH) felszabadulását indukálja a hipofízis elülső lebenyéből, ami aztán a kortikoszteron (kortizol) felszabaduláshoz vezet a mellékvesekéregben.

A kortizolra gyakran 'stressz hormon'-ként hivatkoznak, jelezve rendkívül fontos szerepét a stresszválasz kialakulásában [13], noha kettős szereppel bír. Az erőforrások mobilizálása mellett, a veszély megszűnését követően, a stresszválasz befejezéséért felel a hipotalamuszra és hipofízisre kifejtett negatív visszacsatolásokon keresztül [13]. Ellenben, ha a veszély továbbra is fennáll, akkor elnyújtja a stresszválaszt, így egyensúlyozva a vészhelyzeti szükségletek és a hosszabbtávon fellépő energiaszükségletek között. A kortizol éppen ezért a stresszválasz energiakomponenseként betöltött funkciója miatt is figyelmet kap [14]. A vércukorszint emelése mellett képes a mitokondriumok működésére is közvetlenül hatni. Ezt azért is fontos megemlíteni, mivel a megfelelő stresszválasz kialakításához az anyagcserefolyamatok szorosan kötődnek, hiszen a megemelkedett glükokortikoid szint magasabb vércukorszintet és adiponektin szint modulációt okozhat [15]. Az adipokinek és adipocitokinek a zsírszövet által kiválasztott citokinek, amelyek a HPA tengely mindhárom részére hatnak [16]. Továbbá a traumával és stresszrel kapcsolatos pszichopatológiákhoz gyakran társul valamilyen anyagcserezavar vagy anyagcsere szindróma [14].

### **2.1.4 A stresszválasz és a pszichopatológia kapcsolata**

A dinamikus kortizol válasz elősegíti az adaptációt, valamint a stresszválasz kialakítása végett a környezetben történő szociális és fizikális változásokhoz való alkalmazkodásában van szerepe [13]. A kortizol reaktivitásában történő változás nemcsak növelheti a stressz negatív hatásaira való fogékonyságot, de a HPA tengely hosszútávú,

túlzott vagy alul működése olyan változásokat okozhat az agyban, amely később pszichiátriai zavarhoz vezet [17]. Társadalmunkban gyakoribbak, többször ismétlődnek és sokkal tartósabbak a pszichológiai stresszorok, mint a fizikaiak. Az ismétlődő stressz fő rizikófaktora egyes rendellenességeknek, mint például a skizofréniának, bipoláris zavarnak, súlyos depressziós zavarnak, és a poszttraumás stressz zavarnak (PTSD) [18]. Régebben, a stresszválaszhoz való hozzászokást a stimulus-válasz szituáció egy általánosabb helyzetének speciálisabb eseteként kezelték. Ez egy olyan nem asszociatív tanulás formájának minősül, ami aztán a válaszüdő csökkenésében nyilvánult meg [19]. Ellenben a patkányok stresszválaszhoz való habituációjának bizonyos jellemzői arra utalnak, hogy az adaptív folyamatok háttérében magasabb szintű kognitív folyamatok is részt vehetnek. Példa erre a stresszválasz adaptáció kifejeződésének erős stresszor-specifikussága, olyan habituáció kifejeződése mellett, ami az elsődleges szenzoros pályák csökkent neurális háttérében jelenik meg [20]. Ezen kívül a hozzászokás kifejeződése kontextusfüggő lehet és a tömeges helyett inkább a távoleső stresszor sorozatok azok, amik megerősíthetik ezt [21]. Ezek a kutatások arra engedtek következtetni, hogy a szabályozásnak és/vagy modulálásnak felülről lefelé irányuló neurális háttéré lehet. Ebben a mediális prefrontális kéregnek (mPFC) lehet szerepe, mivel az érzelmi folyamatok modulálása mellett (például félelmi kioltódás) közvetlenül gátolhatja is a HPA tengelyt [22]. Humán vizsgálatok alapján a prefrontális kéreg (PFC) megváltozott neurális aktivitása is fontos szerepet játszik a depresszió és a PTSD kialakulásában [23].

Összességében elmondható, hogy a stresszválasz egy rendkívül komplex és integratív folyamat, ami magában foglal idegrendszeri, neuroendokrin és immunrendszeri interakciókat, melyek megváltozott működése patológiás változásokat tud okozni, sok esetben pszichopatológiai elváltozásokhoz vezet. Transzlációs célú kutatásunkban a PTSD háttérében levő idegrendszeri mechanizmusainak megértése volt a célunk, különösen a mPFC hálózati változásaira.

## **2.2. Poszttraumás Stressz Zavar (PTSD)**

### **2.2.1. PTSD diagnosztizálása**

Jelenleg két fő diagnosztikai definíciója van a poszttraumás stressz zavarnak (PTSD). A Mentális Zavarok Diagnosztikai és Statisztikai kézikönyve jelenlegi kiadása [24], továbbiakban DSM-5, a korábbi verzióval (DSM-4) ellentétben már nem a szorongásos zavarok csoportjában tárgyalja a PTSD-t, hanem elkülönítve a traumával és stresszszorral összefüggő zavarok csoportjában. Kiindulási kritériuma, hogy a személy

súlyos traumatikus eseményt éljen át vagy szemtanúja legyen annak (tényleges vagy halálos veszélynek való kitettség, súlyos sérülés vagy szexuális erőszak, többszörös kitettség a traumatikus életesemények ismétlődésének, szemtanúságának) (A kritérium). Az olyan stresszes események, amelyek nem jelentenek közvetlen életveszélyt vagy fizikai sérülést, például pszicho-szociális stresszorok (válás vagy munkahely elvesztése), ebben a meghatározásban nem számítanak traumának [25]. Amennyiben átélt vagy szemtanúja volt egy ilyen súlyos eseménynek, akkor négy fő tünetcsoport van, amiknek meg kell nyilvánulnia. Először, az alábbiak közül legalább egynek meg kell jelennie: szorongató emlékek, álmok, disszociatív reakciók (pl.: visszaemlékezés), intenzív, vagy hosszan tartó pszichológiai szorongás, a traumatikus élmény újraélése. Másodszor, aktívan kerülnie kell a belső (gondolatok) és/vagy külső (szituációk, helyszínek, beszélgetések) emlékeztetőket a traumával kapcsolatban (C kritérium). Harmadszor, legalább két kogníciót érintő vagy hangulatbeli elváltozást kell mutatnia, ideértve a traumatikus esemény egy fontos aspektusára való emlékezés képtelenségét, a világról vagy önmagukról kiterjedt negatív hangulatot, jelentősen csökkent érdeklődést, vagy pozitív érzelmek átélésével kapcsolatos tartós képtelenséget (D Kritérium). Végül, az izgalmi tünetek közül legalább kettőnek kell teljesülnie: ingerlékeny viselkedés vagy dühkitörés, meggondolatlan vagy önpusztító magatartás, túlzott éberség, túlzott riadt reakció, alvászavar, vagy koncentrációs zavar (E kritérium).

A DSM-5 kiterjesztette a félelmi reakción alapuló összpontosítás hatókörét, a traumára adott egyéb érzelmi reakciókra, ami azért is fontos, mert sok PTSD-vel diagnosztizált beteg, különösen a katonaságból és az egészségügyben dolgozók csoportjából, nem félelmen alapuló érzelmi reakciókat mutatnak [26].

A világ számos területén a DSM-5 mellett az Egészségügyi Világszervezet Betegségek Nemzetközi Osztályozásának tizenegyedik változata (BNO-11) alapján történik a pszichiátriai diagnosztizálás [27]. A BNO-11 lényegesebben egyszerűbb megközelítést alkalmaz a diagnosztikához a DSM-5-nél, mivel gyakran a szegényes körülmények között dolgozó diagnosztizálók nem tudnak kellő hosszúságú vizsgálatokat tartani a betegekkel. A BNO-11 diagnosztikai iránymutatások szűken a félelmi tünetekre fókuszálnak, beleértve a trauma eseményének újraélését, az ezzel kapcsolatos emlékeztetők elkerülését és az aktuális fenyegetések fokozott észlelését (izgalom különböző formái tükrében). Ennek a definíciónak a központi eleme az a felvetés, hogy a PTSD egyik alapvető része a nemrég megtörtént trauma emlékeinek újraélése.



### 2.2.2. A PTSD előfordulási aránya

Maga a stressz számos különböző formában megjelenik az emberek életében, sőt kutatások alapján elmondható, hogy a társadalom 90%-a élete folyamán legalább egyszer átél egy traumát [28]. Az esetek 80-90%-ában jelentkeznek a trauma által okozott tünetek (rémálmok, negatív hangulat, szorongás), de a traumát átéltek közül csak 10-20% az, akikben tartósan fennmaradó, PTSD-ként diagnosztizált tünetek alakulnak ki. Ezen populáció tagjait nevezzük sérülékenynek, veszélyeztetettnek. Epidemiológiai kutatások kimutatták, hogy az élethosszig tartó PTSD prevalenciája nőkben 20,4%, míg a férfiakban 6,2%-8,2% [29]. A Világ Mentális Egészsége kutatás magasabb előfordulási arányt figyelt meg magasabb jövedelmű országokban (Észak-Írország: 3,8%; Amerikai Egyesült Államok: 2,5%; Új-Zéland: 2,1%), mint az alacsony vagy közepes jövedelmű országokban (Románia: 0,4%; Mexikó: 0,3%; Dél-Afrika: 0,4%) [30].

Vannak bizonyítékok arra is, hogy egyes traumatikus események jellemzői nagyobb eséllyel váltanak ki PTSD-t. Kimutatták, hogy a természeti katasztrófát átéltek emberekben kisebb mértékben alakul ki PTSD (körülbelül 5-10%), mint azokban, akik szexuális zaklatást éltek át (több mint 40%). A személyközi erőszak magasabb PTSD arányhoz vezet [31], valamint egy másik Világ Mentális Egészsége kutatás arra világított rá, hogy a fizikai vagy szexuális erőszak növelte a PTSD kialakulásának esélyét [32]. Ezen kívül a gyermekkorban átélt averzív tapasztalatok is befolyással lehetnek arra, hogy később PTSD-szerű tünetegyüttesek alakulnak ki. Widom kutatása alapján valamivel több mint egy harmada a szexuális zaklatás gyermekkori áldozatainak 37,5%-a, a fizikai bántalmazásnak kitett gyerekek 32,7%-a, míg gyerekkori elhanyagolás áldozatainak 30,6%-a felelt meg az akkori PTSD diagnosztizálás kritériumainak [33].

Egy-egy országra fókuszált tanulmányokban (ami módszertanilag megalapozottabb, mivel az előforduló kontextuális zavaró hatások nagyobb következetességét teszik lehetővé) alátámasztották, hogy egyes etnikai csoportok, mint például a hispánok és afro-amerikaiak, érzékenyebbek a PTSD kialakulására az Amerikai Egyesült Államokban [34]. Ezekhez a különbségekhez viszont az egészségügyi erőforrásokhoz való hozzáférés, etnikai diszkrimináció és akár a társadalmi-gazdasági tényezők is közre játszhatnak, így ezeknek az eredményeknek az értelmezése mindmáig bizonytalan maradt.

Epidemiológiai vizsgálatok arra is utalást tesznek, hogy a legtöbb PTSD-vel diagnosztizált személy esetén más társbetegségek is felléphetnek, különösen depresszió,

szorongásos és szerhasználati zavarok [35]. Az ilyen magas komorbiditási arány magyarázható azzal, hogy a már meglévő zavarok, rendellenességek hajlamot adnak a traumatikus események átélésére, de lehetséges, hogy maga a trauma vagy a PTSD az, ami kialakítja a többi pszichiátriai állapotot a betegekben. A depresszió valójában a hosszan tartó tehetetlenség, míg a szerhasználati zavar az öngyógyítás következményeképpen alakulhat ki [30].

### **2.2.3. A PTSD neurobiológiai háttere**

A PTSD specifikus tünetei jellemzően a betolakodó gondolatok, túlzott izgatottság, rémálmok, alvászavar, visszaemlékezés, a memória és koncentrációnak megváltozása, valamint a heves reakciók [27, 36]. Ezekből a tünetekből visszavezethető az agy stressz által bekövetkezett szerkezet- és funkcióbeli változása, amely a viselkedésben is megnyilvánul [37]. A stressz akut és krónikus változásokat képes okozni neurokémiai rendszerekben és specifikus agyi régiók morfológiájában, ami hosszútávú változásokat eredményezhet az agyi hálózatok működésében, különös tekintettel a stresszválaszt és a félelelmi reakciókat szabályozó régiókban, mint például az amigdala, a hippokampusz és az mPFC területein [38].

#### **2.2.3.1. Az amigdala szerepe a PTSD-ben**

Az amigdala egyike azoknak a struktúráknak, melyek az érzelmi feldolgozásért felelnek, valamint nagymértékben szerepet játszik a megfelelő megküzdési válasz kialakításában. [39]. Az amigdala több magból áll, amik különböző funkciókkal bírnak. A basolaterális és laterális magvak a talamuszból érkező szenzoros integrációt végzik, az agykéregből és a hippokampuszból származó jelekkel együttesen, míg centrális magja adja az amigdala fő kimenetét a viselkedésbeli, endokrin és autonóm válaszokat irányító végrehajtó régiók felé. Általánosságban, az amigdala laterális magjában (LA) történik a beérkező információk asszociációja, s így az asszociatív félelmi tanulás, míg a centrális amigdala (CeA; laterális (CeL) és mediális (CeM) alrégiók) ezen stimulusokról küld információkat a fent említett centrumokba, valamint a hippokampuszba és más agytörzsi struktúrákhoz. A két mag közti információ áramlást az interkalált sejttömeg (ITC) szabályozza gátlása révén. Az amigdala ezen kívül a szerotonerg raphe magvak és a katekolaminerg agytörzsi magvak is beidegzik, amelyek az amigdala működésének modulációjában vesznek részt [40]. Több tanulmány is kimutatott megnövekedett amigdala aktivitást PTSD-ben; például olyan szagok és hangok kapcsán, amik harkhoz kötődnek, fényképek láttán, amelyek traumatikus eseményekhez köthetőek, valamint

félelmi kondicionálás következtében [23]. Ezt a fajta túlzott amigdala aktivitást PTSD betegekben is megfigyelték pihenés, figyelem és memóriafeladatok közben [41].

### **2.2.3.2. A hippocampus szerepe a PTSD-ben**

A PTSD jelenlegi elméletei szerint a hippocampus diszfunkciója kulcsfontosságú szerepet játszik a PTSD jellemző tüneteinek kialakulásában, kiemelve közülük a traumával kapcsolatos tovakodó emlékek kódolását, a trauma részleteinek felidézésének nehézségeit, a félelem túlzott generalizációját, az epizódikus emlékek kódolásának nem megfelelő frissítését, illetve azok előhívását [36, 42]. Az anterior és posterior hippocampusz-alrégiók eltérő strukturális és funkcionális kapcsolatokkal rendelkeznek, és különböző érzelmi és kognitív folyamatokhoz járulnak hozzá. A hippocampusz posterior része kifejezetten fontos szerepet játszik az emlékezet előhívásában és a térbeli tanulásban, míg az anterior részét előszeretettel társítják az amigdalával, a HPA-tengellyel és a limbikus kéreg résztvevőivel. A hippocampusz anterior része és az amigdala közti kapcsolatok állhatnak a PTSD-ben a visszaemlékezések, tovakodó gondolatok, rémálmok, valamint a túlzott félelem generalizáció hátterében. Ezen kívül azoknál a személyeknél, akiknél PTSD-t diagnosztizáltak, a hippocampusz térfogatának csökkenése mellett (akár traumának kitett kontroll személyek, akár a traumának ki nem tett személyekhez képest), nehézségeket mutatnak a mindennapi memória, a munkamemória, valamint az epizódikus memória terén [42].

### **2.2.3.3. A mediális prefrontális kéreg szerepe a PTSD-ben**

Az evolúció során az emberben a PFC az agy térfogatának közel egy harmadára nőtt [43]. Ez a terület biztosítja a viselkedés, a gondolkodás és az érzelmek felülről lefelé irányuló szabályozását, ezzel létrehozva a rugalmas, célorientált viselkedéshez szükséges mentális reprezentációkat, a nem megfelelő impulzusok gátlásának képességét, a figyelem szabályozását, a valóság tesztelését, az érzelmek szabályozását, ezen kívül saját és mások cselekedeteinek megértését, felfogását [44]. A dorzolaterális PFC (dlPFC) a munkamemória révén irányítja a gondolkodást, a figyelmet és a cselekedeteket [45], míg az orbito- (omPFC) és ventromediális PFC (vmPFC) szabályozza az érzelmeket [46]. Ezek a régiók egymással összeköttetésben állnak, ahol a dlPFC képes szabályozni a vmPFC-t [47]. A PFC kiterjedt kapcsolatokkal rendelkezik, amik fokozzák, vagy éppenséggel gátolják más agyterületek aktivitását [48], ideértve az amigdala félelmi válaszáinak gátlását [49]. A PTSD tüneteinek szempontjából különösen fontos, hogy a PFC sérülései, léziói képesek rontani a koncentráció és a figyelem összpontosításának

képességét [50, 51], gyengíteni az impulzuskontrollt, ami meggondolatlan viselkedést eredményez [52]. A vmPFC léziói károsítják az érzelmi reakciók modulációját, beleértve a fokozott ingerlékenységet, a döntéshozás zavarát, a belátás hiányát [53] és a kognitív interferencia gátlásának képességét (gátolni például nem megfelelő emlékeket) [54]. A dlPFC szükséges a tényleges esemény és az aktuális, visszatérő emlék megkülönböztetéséhez, például az olyan emlékek terén, mint amik a PTSD-ben megjelennek [55]. Ez a folyamat átfed olyan más hálózattal, amely részt vesz a félelem tanulásában és annak kifejezésében.

Az asszociatív tanulás vizsgálatához a pavlovi félelmi kondicionálást használják. Ez a paradigma a kontextus (környezet) és egy feltétlen inger (lábsokk) asszociálásán alapszik, ahol a környezeti stimulusok, mint fő komponensek, összekapcsolódnak és a kontextus konjuktív reprezentációját alkotják, amik társulnak magához az ingerhez [56]. Bár az averzív ingerrel társított pavlovi kondicionálást más agyterületeken is intenzíven kutattak (ilyen az amigdala vagy a hippokampusz), az mPFC-nek is szerepe van a félelmi tanulással kapcsolatosan a döntés hozásban, érzelmek szabályozásában, illetve a veszélyre adott válasz kialakításában a kontextus kódolása révén [57]. A kontextuális félelmi kondicionálással összefüggésben álló mPFC régiók közé tartozik a szomatomotoros kéreg, az anterior cinguláris kéreg (ACC), a prelimbikus (PrL) és infralimbikus (IL) régiók [58]. Míg előbbi kettő agyterület a motoros funkciók szabályozásában vesz részt, addig a PrL és IL régiók emocionális, emlékeztető, valamint kognitív funkciókért felelnek [59]. Pontosabban, a szerkezeti különbségek alapján, a PrL régió az érzelmek szabályozásáért, kognitív folyamatokért felel, míg az IL régió zsigeri és vegetatív funkciókban játszik szerepet [60].

#### **2.2.4. A PTSD modellezése**

A PTSD állati modelljei a diagnosztikus és elsősorban összetett emberi tünetekre vagy a jelenlegi kezelések (például: szelektív szerotonin visszavétel gátlók (SSRI)) prediktív érvényességére támaszkodnak. Mivel a PTSD kezelésére jelenleg nem állnak rendelkezésre hatékony profilaktikus és terápiás szerek [61], ezért az állatmodellek alkalmazása kritikus fontosságú a kórképek feltételezett mechanizmusainak ok-okozati összefüggéseinek megállapításához és a lehetséges kezelés hatékonyságának ellenőrzéséhez. A közelmúltban molekuláris és idegrendszeren alapuló klinikai kutatások PTSD-vel kapcsolatos fenotípusokat azonosítottak biológiai markerek (például hálózatbeli elváltozások) vagy pszichológiai válaszok (alvás, félelmi válasz) alapján.

Mivel a PTSD-t több különböző féle trauma is kiválthatja (fizikális és érzelmi), valamint az egyének sokféleségét és a különböző környezeti faktorokat figyelembe véve, egy mindent is lefedő rágcslómodellt nehéz lenne létrehozni. Ezért is az ilyen állatmodelleket a PTSD-vel kapcsolatos fenotípusokon belül kell értelmezni. Ez a fajta megközelítés ezért lehetőséget ad arra, hogy mechanizmus specifikusan történjen a gyógyszeres célzás. Éppen ezért fontos a modellezés szempontjából, hogy a modellek 1) olyan tünetekre fókuszáljanak, amelyek hosszú ideig fennmaradnak (például a trauma vagy stressz megszűnése után több héttel később is mérhető válasz); 2) a robosztusság és/vagy megbízhatóság érdekében több viselkedésbeli változót is mérjen; 3) a hatás ismételhető legyen más laboratóriumban is, azonos körülmények között; valamint 4) olyan előre nem jelezhető és elkerülhetetlen súlyos stresszorzal rendelkezzen, ami kerüli a habituációt és utánozza a PTSD-vel kapcsolatos trauma aspektusait [62]. Ezen paradigmák alapján a PTSD-szerű tünetek (tanult félelem és annak kioltódása, csökkent motiváció, kognitív hiányosságok, növekedett izgatottság) szempontjából az egyik olyan biológiai fenotípus, ami reprodukálható, az a fokozott glükokortikoid-receptor érzékenység és a HPA tengely fokozott negatív visszacsatolás. Ezen kívül az amigdala növekedett aktivitása mellett a PFC és hippokampusz csökkent funkciója és strukturális deformációja is megfigyelhető [63].

### 3. Célkitűzés

A kutatócsoportunkban végzett előzetes vizsgálatok során félelmi kondicionálás során mutatott félelmi generalizáció alapján jól elkülöníthetőek sérülékeny és ellenálló patkány populációk. Ezen csoportok agymintájából (teljes mPFC) kinyert RNS-ek polimeráz láncreakcióval (PCR) történő mérésével összehasonlító génexpressziós analízist végeztek, mely szerint több kandidáns gén expressziós szintje szignifikánsan változott. Ezek közé tartozik a c-Fos, egy olyan korai átíródású gén, amely részt vesz abban a jelátviteli kaszkádban, amely az extracelluláris ingereket az intracelluláris eseményekhez kapcsolja [64]; a vazóaktív intesztinális polipeptid (VIP), ami olyan interneuronokat gátló interneuronokban van jelen, melyeknek fontos szerepe van a kérgi neuronok gátlásában [65]; a kortikotropin felszabadító faktor (CRF), mely leginkább a VIP (és részben a kalretinin) interneuronokban mutat expressziót [66]. Ezen sejtek megváltozott működésére és ezáltal a teljes hálózati aktivitás megváltozására voltunk kíváncsiak.

Mindezek alapján vizsgálataink célja az volt, hogy 1) a kontextuális félelmi kondicionálást követően olyan neuronpopulációkat azonosítsunk a mediális prefrontális kéregben, amelyek aktivációja összefüggést mutat a PTSD tüneteivel (sérülékenységgel, melyet a félelmi generalizációval mértünk), 2) ha ilyen neuronpopulációt azonosítottunk, akkor a sérülékeny és ellenálló állatcsoportokban lévő eltérő aktivációt okozó neurontípusokat meghatározhatjuk. Kutatócsoportunk génexpressziós eredményei alapján az mPFC PrL és IL régióira fókuszáltunk, felszíni és mély rétegeit vizsgálva részleteiben, mind a teljes c-Fos aktivitást, mind specifikusan a Cr és VIP pozitív neuronok aktivitását.

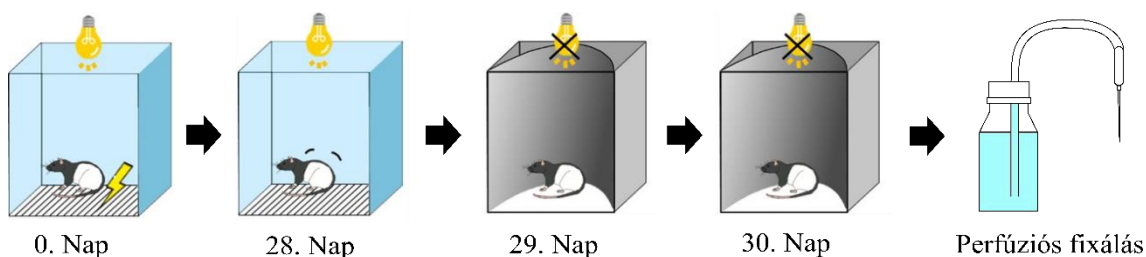
## 4. Anyag és módszer

### 4.1. Állatok

Az agyi analízisbe két kohortból összesen 27 felnőtt (100-150 napos, 7 kontroll, 10 ellenálló, 10 sérülékeny) hím Long Evans patkányt vettünk be. Az állatokat 4 egyedből álló csoportokban, fordított ciklusban tartottuk. A lámpák 19:00-kor kapcsolódtak fel és 07:00-kor le. A kísérleti és állattartó szobákban a hőmérséklet  $22 \pm 2$  °C, a relatív páratartalom  $60 \pm 10$  % volt. Az állatoknak *ad libitum* táplálék és csapvíz volt biztosítva. A kísérletek az európai irányelveknek megfelelően a Kísérleti Orvostudományi Intézet Állatjóléti bizottsága által jóváhagyva lettek kivitelezésre. Az állatkísérleti engedélyszám: PE/EA/874 5/2020.

### 4.2. Kísérleti terv

Az első kísérleti napon az állatokon félelmi kondicionálást végeztünk, amely a következőképpen történt: egy kontrollálhatatlan lábsokk sorozat érte az állatokat egy definiált kontextusban ['A' kontextus], ahol a félelmi válaszreakciót a ledermedés százalékos arányával mértük. 28 nappal később az állatokat ugyanebbe a kontextusba visszahelyeztük (lábsokk sorozat nélkül). Ezt követő egy és két nappal később egy minden dimenziójában megváltoztatott (szag, taktilis ingerek, doboz színe, alakja), ú.n. biztonságos kontextusba ('B' kontextus) helyeztük az állatokat, ahol a félelmi memória generalizációját és kioltódását mértük (szintén a dermedés százalékos arányával). A második félelmi tesztelés ('B' kontextusban) után 90 perccel az állatokat mélyaltatásban transzkardiálisan perfundáltunk, majd a szövetminták fixálása után immunhisztokémiai jelöléseket végeztünk el rajtuk (**2. ábra**).



**2. ábra** A kísérleti terv szemléltetése. Az állatokat a traumatizációt követő 28 nappal később a trauma kontextusába visszahelyezzük, majd következő két napon egy új környezetbe. 30. napon a tesztet követően transzkardiálisan perfundáljuk az állatokat.

### **4.3. Magatartásteszték**

#### **4.3.1. Félelmi kondicionálás: kontrollálhatatlan lábsokk**

A PTSD-szerű állapot modellezése során Yehuda és Antelman kritériumainak megfelelően választottuk modellünket: 1) rövid ideig tartó stresszinger is képes legyen PTSD-szerű biológiai vagy viselkedésbeli változást okozni; 2) a stresszor a fokozódó intenzitás függvényében erősebb, fokozottabb tüneteket tudjon generálni; 3) Az okozott változások hosszútávon fennmaradóak vagy az idő múlásával egyre kifejezettebbek; 4) az egyedek közötti válaszmintázat a korábbi tapasztalásaikban vagy az állatok genetikai állományában mutasson különbséget [67]

A fenti kritériumoknak állatmodellünk megfelelt. Ahogy fent már említettem, az állatokat egyszeri kontrollálhatatlan lábsokk sorozatnak tettük ki, ahol az A kontextusban két és fél perc habituációt követően 10 db erős (2,4 mA), 1 másodperc hosszú szaggatott lábsokk sorozatot kaptak, a sokkok között eltelt idő 30 másodperc volt. Az állatokat 50x50x50 cm műanyag dobozba helyeztük, amiben a sokkokat a dobozok fém aljzatrácsa közvetítette. Az egyes állatokkal végzett tesztek között a dobozokat 70% alkoholos oldattal tisztítottuk (A kontextus szaga).

#### **4.3.2. Félelmi válasz mérése – állatok kategorizálása**

28 nappal a traumatizációt/kondicionálást követően ismételtelen behelyeztük az állatokat a traumával társított A kontextusba, azonban ekkor áramütést nem kaptak. Ennek célja a félelmi memória meglétének tesztelése volt (kontextuális félelmi előhívás). A kísérletet követő két napon az állatok félelmi memória generalizációját és kioltódását mértük egy új, a traumatizáció kontextusától eltérő környezetben (kisebb doboz, eltérő jelű dobozfallal, szappanos vízzel történő tisztítás, műanyag aljzat). Az állatok által kiváltott félelmi válaszreakció, a dermedés, irodalmi adatok alapján megbízható jelző az állatok aktuális belső-félelmi állapotának vizsgálata szempontjából [68], ezért a félelem mértékét a dermedéssel töltött idő százalékos arányával jellemeztük. Ez alapján az arány alapján különítettük el az ellenálló és sérülékeny csoportokba tartozó állatokat, ahol a populációs értékek alsó 25%-ába tartozókat ellenállóként, míg a felső 25%-ába tartozókat sérülékenyként definiáltuk. A dermedés mértékét minden tesztben a Noldus EthoVision automatikus viselkedéskövető szoftver segítségével elemeztük.

### **4.4. Perfúzió és metszés**

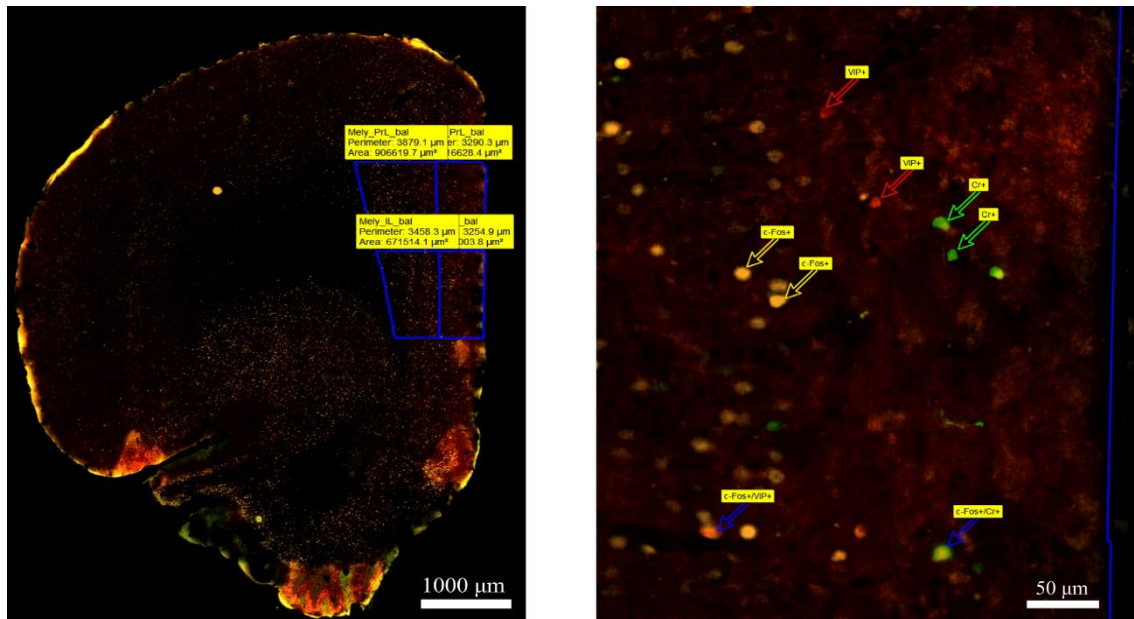
A második biztonságos kontextusú teszt után 90 perccel, az állatokat ketamin-xylozolin-pipolphenel mélyaltattuk. A mélyaltatást követően az állatok mellkasát feltártuk



és egy kanült helyeztünk az állatok bal szívkamrájába. Ezen keresztül hideg foszfátpufferelt fiziológiás sóoldatot (PBS) áramoltattunk 2-3 percen át, kimosva az erekből és szövetekből a vért, majd 4%-os paraformaldehid oldattal (PFA) fixáltuk a szöveteket. Ezután PFA-ban utólagosan fixáltuk az agymintákat 24 órán keresztül, majd a metszés idejéig nátrium-azidos PBS oldatban tároltuk azokat. Az agyakból készült 30 µm vastag koronális metszeteket szánka-mikrotommal készítettük, ezért metszés előtt a fagyási sérülések megelőzése miatt 30%-os szacharóz tartalmú krioprotektív PBS-ben inkubáltuk az agyakat 24 órára. A metszeteket nátrium-azidos PBS-ben tároltuk.

#### **4.5. Immunhisztokémia**

A kutatásunkat érintő célgéneket tartalmazó sejtek vizsgálatához szövetanalízist alkalmaztunk. A módszer során a célgének termékeit jelöltük az azok ellen termeltetett ellenanyagokkal (elsődleges, primer antitest), melyeket az elsődleges antitest ellen termeltetett konjugált fluorofórral ellátott másodlagos antitestekkel tettünk láthatóvá. A különböző antigénekre a következő ellenanyagokat használtuk: VIP antigénnél a primer antitest nyúlban termelt anti-VIP IgG (Immunostar:20077, 1:500), szekunder antitest számarban termelt anti-nyúl IgG (Jackson ImmunoResearch: 711-165-152, 1:500), amihez Cy3 konjugált fluorofór tartozott; Cr antigénnél a primer antitest egérben termelt anti-kalretinin IgG (Swant: 6B3, 1:2000), szekunder antitest számarban termelt anti-egér IgG (Jackson ImmunoResearch: 715-545-151, 1:500), amihez Alexa Fluor 488 konjugált fluorofór; míg c-Fos antigénnél a primer tengeri malacban termelt anti-c-Fos IgG (Synaptic systems: 226004,1:3000), szekunder antitest számarban termelt anti-tengeri malac IgG (Jackson ImmunoResearch: 706-605-148, 1:500) volt, amihez Alexa Fluor 647 tartozott. Ezen kívül még a sejtmagok jelöléséhez Hoechst 33258 reagenst használtunk. A fluoreszcens jelöléseket konfokális (Nikon, C2 típus) és digitális 'Slide Scanner' típusú (3DHISTECH) mikroszkópokkal vizsgáltuk (**3. ábra**).



**3. ábra** Reprezentatív mPFC felvétel. A PrL és IL régiók felszíni és mély rétegeiben a c-Fos+ sejtek sárga, VIP+ sejtek piros, Cr+ sejtek zöld, két gént kifejező sejtek pedig kék nyíllal vannak jelölve.

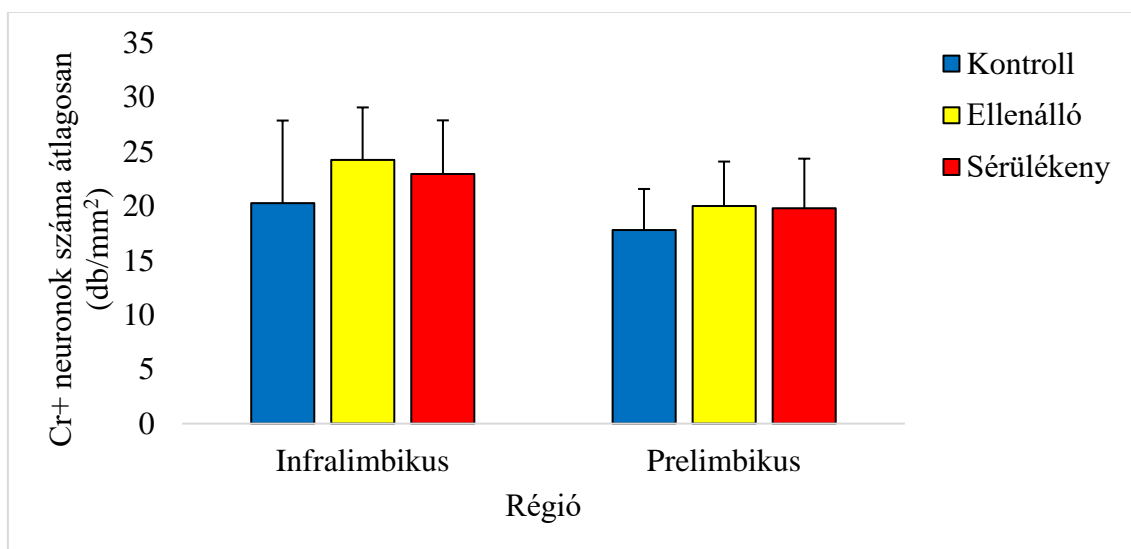
#### 4.6. Statisztika

Az elemzésekhez R Statisztikai környezetet használtunk tidyverse csomagot alkalmazva [69, 70]. A különböző sejtípusokat manuálisan számoltuk le, majd területegységekre korrigáltuk azokat. Az aktivitásbeli mintázatot az adott sejtípus c-Fos+ százalékos arányával jellemeztük. Azokban az esetekben, amikor a normalitás és a szórás homogenitása fennállt, egy-utas varianciaanalízist (egy-utas ANOVA) alkalmaztunk. A reziduumok normalitását, szórásuk egyenlőségét, valamint a torzítópontok jelenlétét a modellezés során megvizsgáltuk. Amennyiben a feltételek valamelyike nem teljesült, Kruskal-Wallis rank próbát alkalmaztunk. A szignifikancia szintet minden esetben 0,05 p-értéknél határoztuk meg. Az eredmények átlag  $\pm$  szórásként vannak feltüntetve.

## 5. Eredmények

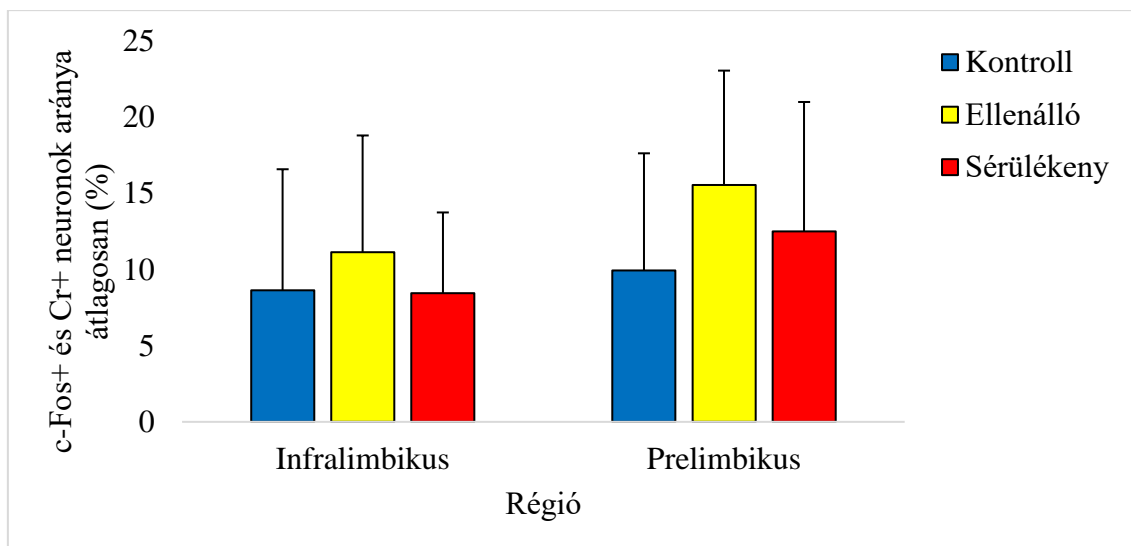
### 5.1 Cr<sup>+</sup> neuronok száma és aktivitása

A teljes PrL régióban számolt Cr<sup>+</sup> neuronok száma a következőknek adódott: a kontroll csoportnál átlagosan  $17,81 \pm 3,77$  db/mm<sup>2</sup>, ellenálló csoportnál  $20,02 \pm 4,07$  db/mm<sup>2</sup>, a sérülékeny csoportnál  $19,80 \pm 4,56$  db/mm<sup>2</sup>, míg a teljes IL régióban a kontroll csoportnál átlagosan  $20,27 \pm 7,60$  db/mm<sup>2</sup>, ellenálló csoportnál  $24,24 \pm 4,83$  db/mm<sup>2</sup>, a sérülékeny csoportnál  $22,94 \pm 4,94$  db/mm<sup>2</sup>. Egy-utas ANOVA alapján a csoportok között nem volt szignifikáns eltérés a Cr<sup>+</sup> sejtek számának tekintetében a csoportok között sem a teljes PrL régióban ( $F=1,255$ ,  $p=0,303$ ), sem a teljes IL régióban ( $F=1,199$ ,  $p=0,319$ ) (4. ábra).



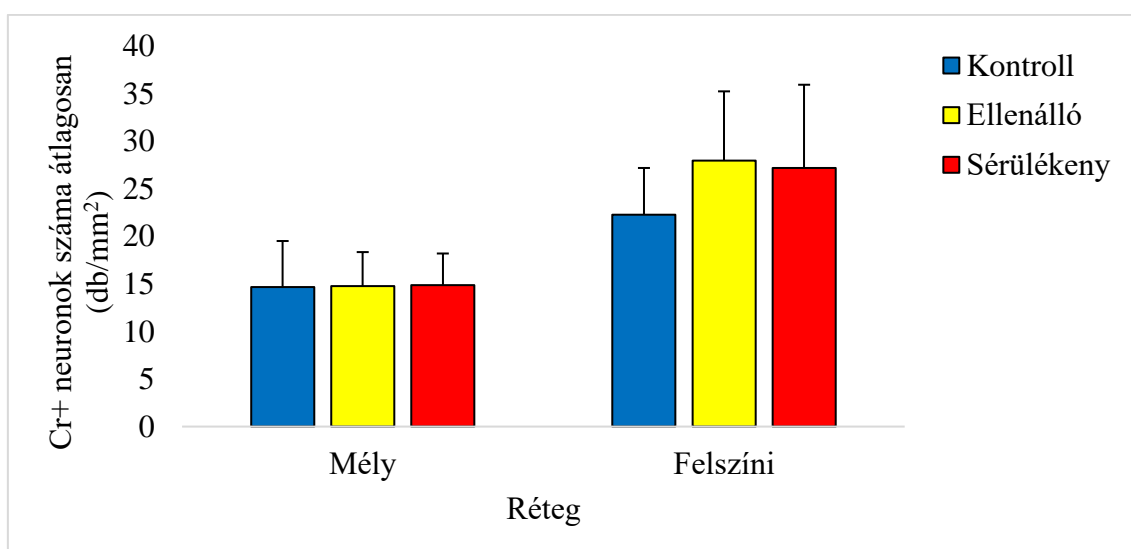
**4. ábra** Cr<sup>+</sup> neuronok száma régió specifikusan. Oszlopdiagram az átlagos Cr<sup>+</sup> neuronok számáról a három csoport egész PrL és IL régióiban db/mm<sup>2</sup>-ben kifejezve. Az adatok átlag  $\pm$  szórásként vannak ábrázolva.

A teljes PrL régióban mért kettős pozitív (c-Fos és Cr), azaz az aktiválódott Cr neuronok aránya a következőknek adódott: a kontroll csoportnál átlagosan  $9,95 \pm 7,69$  %-ban, ellenálló csoportnál  $15,55 \pm 7,52$  %-ban, a sérülékeny csoportnál  $12,50 \pm 8,51$  %-ban, míg a teljes IL régióban a kontroll csoportnál átlagosan  $8,63 \pm 7,96$  %-ban, az ellenálló csoportnál  $11,15 \pm 7,66$  %-ban, a sérülékeny csoportnál  $8,45 \pm 5,30$  %-ban. Egy-utas ANOVA alapján a csoportok között nem volt szignifikáns eltérés az aktiválódott Cr neuronok arányában sem a teljes PrL régióban ( $F=1,493$ ,  $p=0,245$ ), sem a teljes IL régióban ( $F=0,745$ ,  $p=0,486$ ) (5. ábra).



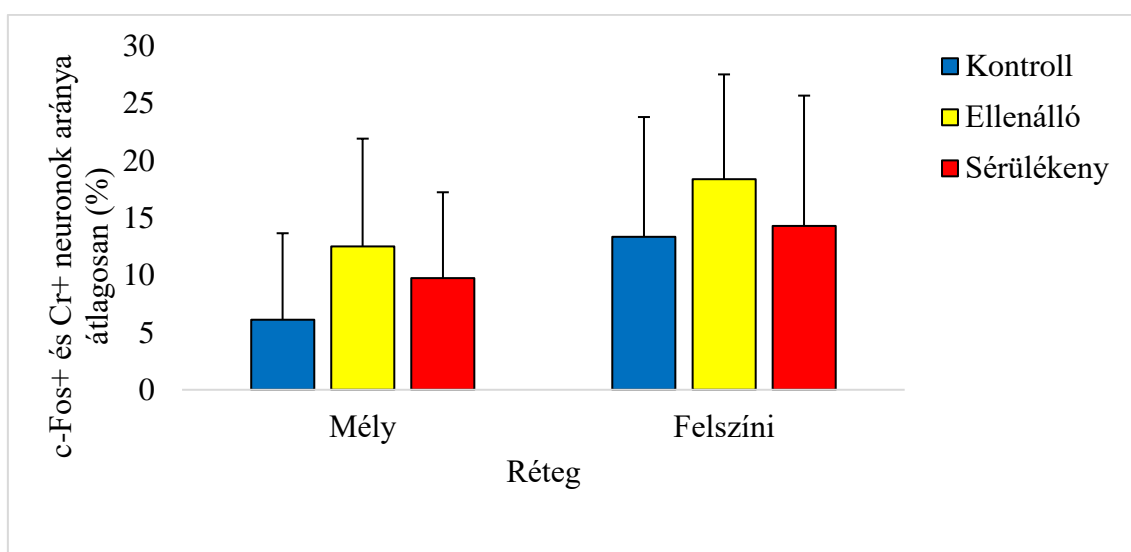
**5. ábra** c-Fos+ és Cr+ neuronok száma régió specifikusan. Oszlopdiagram az átlagos kettős pozitív neuronok arányáról a három csoport egész PrL és IL régióiban %-ban kifejezve. Az adatok átlag  $\pm$  szórásként vannak ábrázolva.

A PrL régió felszíni rétegében számolt Cr+ neuronok száma a következőknek adódott: a kontroll csoportnál átlagosan  $22,27 \pm 4,91$  db/mm<sup>2</sup>, ellenálló csoportnál  $27,96 \pm 7,26$  db/mm<sup>2</sup>, a sérülékeny csoportnál  $27,16 \pm 8,76$  db/mm<sup>2</sup>, míg a PrL régió mély rétegében a kontroll csoportnál átlagosan  $14,67 \pm 4,83$  db/mm<sup>2</sup>, ellenálló csoportnál  $14,76 \pm 3,58$  db/mm<sup>2</sup>, a sérülékeny csoportnál  $14,87 \pm 3,32$  db/mm<sup>2</sup>. Egy-utas ANOVA alapján nem volt szignifikáns eltérés a Cr+ neuronok számában a csoportok között sem a PrL felszíni rétegében ( $F=2,673$ ,  $p=0,09$ ), sem a mély rétegében ( $F=0,005$ ,  $p=0,995$ ) (**6. ábra**).



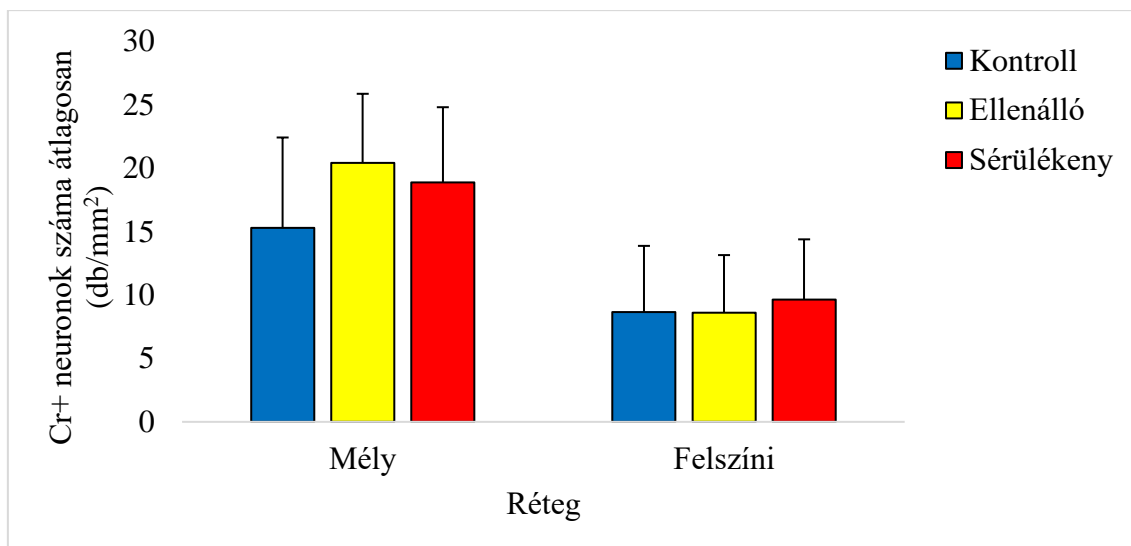
**6. ábra** Cr+ neuronok száma PrL régió rétegeiben. Oszlopdiagram az átlagos Cr+ neuronok számáról a három csoport a PrL régió felszíni és mély rétegeiben db/mm<sup>2</sup>-ben kifejezve. Az adatok átlag  $\pm$  szórásként vannak ábrázolva.

A PrL régió felszíni rétegében mért kettős pozitív (c-Fos és Cr), azaz az aktiválódott Cr neuronok aránya a következőknek adódott: a kontroll csoportnál átlagosan  $13,34 \pm 10,46$  %-ban, ellenálló csoportnál  $18,38 \pm 9,14$  %-ban, a sérülékeny csoportnál  $14,28 \pm 11,38$  %-ban, míg a PrL régió mély rétegében a kontroll csoportnál átlagosan  $6,11 \pm 7,55$  %-ban, az ellenálló csoportnál  $12,51 \pm 9,40$  %-ban, a sérülékeny csoportnál  $9,75 \pm 7,49$  %-ban. Egy-utas ANOVA alapján nem volt szignifikáns különbség az aktiválódott Cr neuronok arányának tekintetében a csoportok között sem a PrL felszíni rétegében ( $F=1,021$ ,  $p=0,375$ ), sem a PrL mély rétegében ( $F=2,468$ ,  $p=0,106$ ) (7. *ábra*).



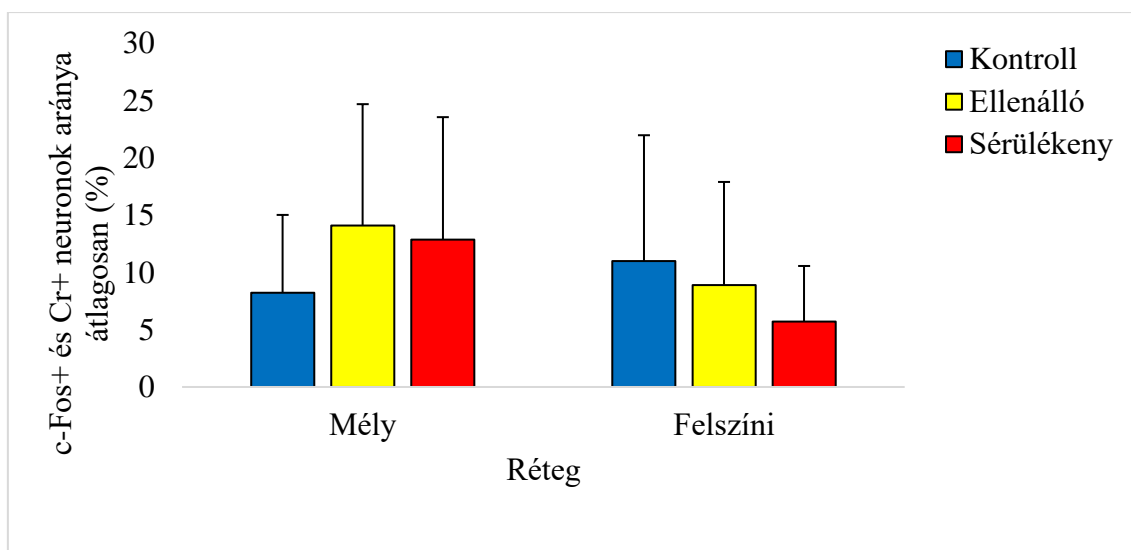
**7. ábra** c-Fos+ és Cr+ neuronok száma PrL régió rétegeiben. Oszlopdiagram az átlagos kettős pozitív neuronok arányáról a három csoport PrL régió mély és felszíni rétegében %-ban kifejezve. Az adatok átlag  $\pm$  szórásként vannak ábrázolva.

Az IL régió felszíni rétegében számolt Cr+ neuronok száma a következőknek adódott: a kontroll csoportnál átlagosan  $8,65 \pm 5,22$  db/mm<sup>2</sup>, ellenálló csoportnál  $8,60 \pm 4,54$  db/mm<sup>2</sup>, a sérülékeny csoportnál  $9,64 \pm 4,75$  db/mm<sup>2</sup>, míg a IL régió mély rétegében a kontroll csoportnál átlagosan  $15,28 \pm 7,13$  db/mm<sup>2</sup>, ellenálló csoportnál  $20,41 \pm 5,45$  db/mm<sup>2</sup>, a sérülékeny csoportnál  $18,86 \pm 5,93$  db/mm<sup>2</sup>. Egy-utas ANOVA alapján nem volt szignifikáns különbség az átlagos Cr+ neuronok számában a csoportok között sem a IL régió felszíni rétegében ( $F=0,537$ ,  $p=0,591$ ), sem az IL régió mély rétegében ( $F=1,768$ ,  $p=0,192$ ) (8. *ábra*).



**8. ábra** Cr+ neuronok száma IL régió rétegeiben. Oszlopdiagram az átlagos Cr+ neuronok számáról a három csoport a IL régió mély és felszíni rétegében db/mm<sup>2</sup>-ben kifejezve. Az adatok átlag ± szórásként vannak ábrázolva.

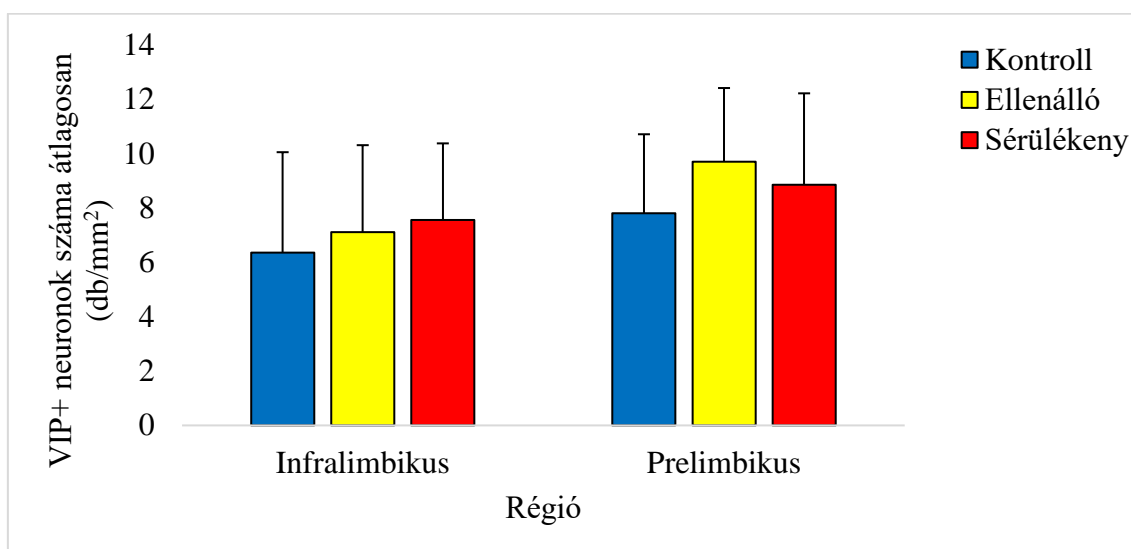
A IL régió felszíni rétegében mért kettős pozitív (c-Fos és Cr), azaz az aktiválódott Cr neuronok aránya a következőknek adódott: a kontroll csoportnál átlagosan  $8,48 \pm 10,46$  %-ban, ellenálló csoportnál  $8,88 \pm 9,01$  %-ban, a sérülékeny csoportnál  $5,72 \pm 4,84$  %-ban, míg a IL régióban a kontroll csoportnál átlagosan  $8,23 \pm 6,78$  %-ban, az ellenálló csoportnál  $14,09 \pm 10,59$  %-ban, a sérülékeny csoportnál  $12,86 \pm 10,68$  %-ban. Egy-utas ANOVA alapján nem volt szignifikáns különbség az aktiválódott Cr neuronok arányát tekintve a csoportok között sem az IL régió felszíni rétegében ( $F=0,409$ ,  $p=0,669$ ), sem az IL régió mély rétegében ( $F=1,471$ ,  $p=0,25$ ) (**9. ábra**).



**9. ábra** c-Fos+ és Cr+ neuronok száma régió specifikusan. Oszlopdiagram az átlagos kettős pozitív neuronok arányáról a három csoport IL régió mély és felszíni rétegében %-ban kifejezve. Az adatok átlag ± szórásként vannak ábrázolva.

## 5.2 VIP+ neuronok száma és aktivitása

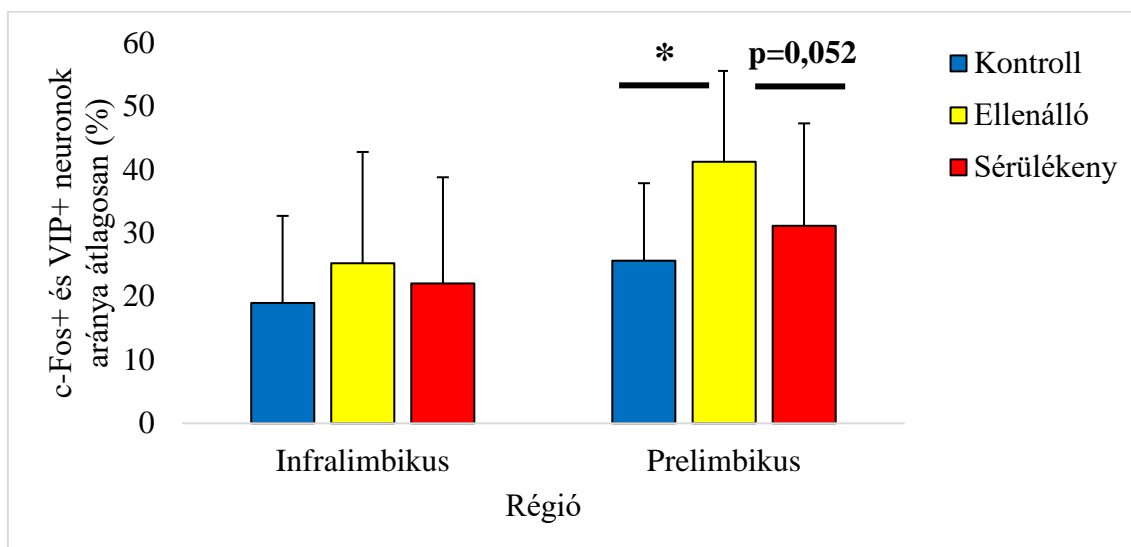
A teljes PrL régióban számolt VIP+ neuronok száma a következőknek adódott: a kontroll csoportnál átlagosan  $7,80 \pm 2,90$  db/mm<sup>2</sup>, ellenálló csoportnál  $9,70 \pm 2,70$  db/mm<sup>2</sup>, a sérülékeny csoportnál  $8,85 \pm 3,37$  db/mm<sup>2</sup>, míg a teljes IL régióban a kontroll csoportnál átlagosan  $6,35 \pm 3,70$  db/mm<sup>2</sup>, ellenálló csoportnál  $7,11 \pm 3,19$  db/mm<sup>2</sup>, a sérülékeny csoportnál  $7,56 \pm 2,81$  db/mm<sup>2</sup>. Egy-utas ANOVA alapján a csoportok között nem volt szignifikáns eltérés a VIP+ sejtek számában a csoportok között sem a teljes PrL régióban ( $F=0,903$ ,  $p=0,419$ ), sem a teljes IL régióban ( $F=0,26$ ,  $p=0,774$ ) (10. ábra).



**10. ábra** VIP+ neuronok száma régió specifikusan. Oszlopdiaagram az átlagos VIP+ neuronok számáról a három csoport a IL régió mély és felszíni rétegében db/mm<sup>2</sup>-ben kifejezve. Az adatok átlag ± szórásként vannak ábrázolva.

A teljes PrL régióban mért kettős pozitív (c-Fos és VIP), azaz az aktiválódott VIP neuronok aránya a következőknek adódott: a kontroll csoportnál átlagosan  $25,64 \pm 12,21$  %-ban, ellenálló csoportnál  $41,24 \pm 14,31$  %-ban, a sérülékeny csoportnál  $31,11 \pm 16,16$  %-ban, míg a teljes IL régióban a kontroll csoportnál átlagosan  $18,96 \pm 13,73$  %-ban, az ellenálló csoportnál  $25,20 \pm 17,57$  %-ban, a sérülékeny csoportnál  $22,02 \pm 16,76$  %-ban. Egy-utas ANOVA alapján a csoportok között szignifikáns eltérés mutatkozott az aktiválódott VIP neuronok arányában az egész PrL régió összehasonlítása során ( $F=6,728$ ,  $p=0,005$ ). Tukey-féle post-hoc tesztet alkalmazva a szignifikáns különbség a kontroll és az ellenálló csoportok között volt ( $p=0,005$ ). A kontroll és sérülékeny csoportok között nem találtunk szignifikáns különbséget ( $p=0,416$ ), míg az ellenálló és sérülékeny csoportok között marginális különbséget fedeztünk fel ( $p=0,052$ ). Egy-utas

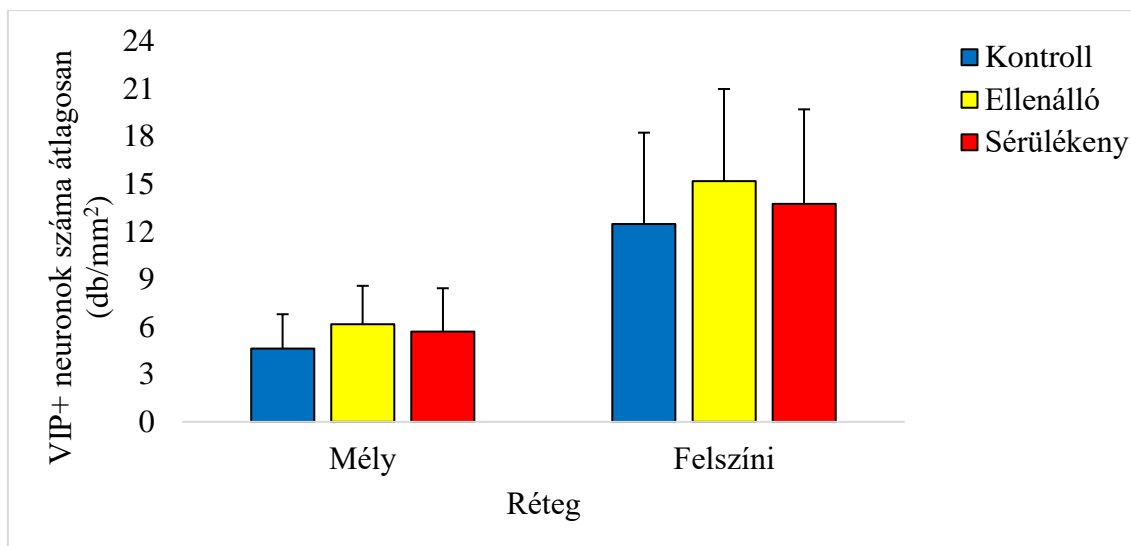
ANOVA alapján a csoportok között nem volt szignifikáns különbség a teljes IL régió összehasonlításakor ( $F=0,617$ ,  $p=0,548$ ). (**11. ábra**).



**11. ábra** c-Fos+ és VIP+ neuronok száma régió specifikusan. Oszlopdiagram az átlagos kettős pozitív neuronok arányáról a három csoport IL és PrL régióiban %-ban kifejezve. Az adatok átlag  $\pm$  szórásként vannak ábrázolva, (\*:  $p<0,05$ ).

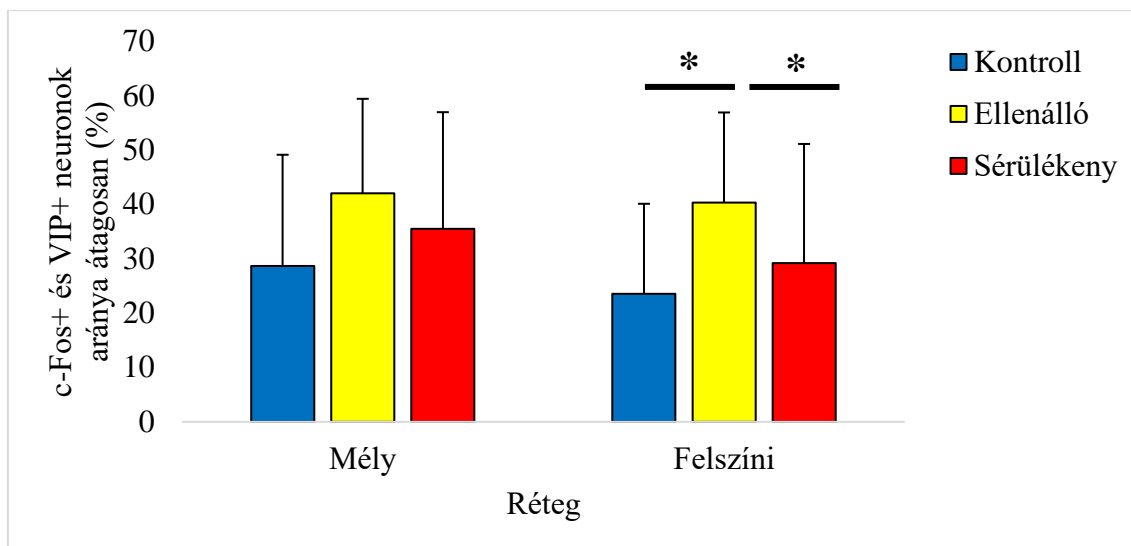
A PrL régió felszíni rétegében számolt VIP+ neuronok száma a következőknek adódott: kontroll csoportnál átlagosan  $12,47 \pm 5,76$  db/mm<sup>2</sup>, ellenálló csoportnál  $15,18 \pm 5,81$  db/mm<sup>2</sup>, a sérülékeny csoportnál  $13,74 \pm 5,96$  db/mm<sup>2</sup>, míg a PrL régió mély rétegében a kontroll csoportnál átlagosan  $4,62 \pm 2,17$  db/mm<sup>2</sup>, ellenálló csoportnál  $6,16 \pm 2,41$  db/mm<sup>2</sup>, a sérülékeny csoportnál  $5,69 \pm 2,73$  db/mm<sup>2</sup>. Egy-utas ANOVA alapján nem volt szignifikáns eltérés a VIP+ neuronok számában a csoportok között sem a PrL felszíni rétegben ( $F=0,503$ ,  $p=0,611$ ), sem a mély rétegben ( $F=1,379$ ,  $p=0,271$ ) (**12. ábra**).





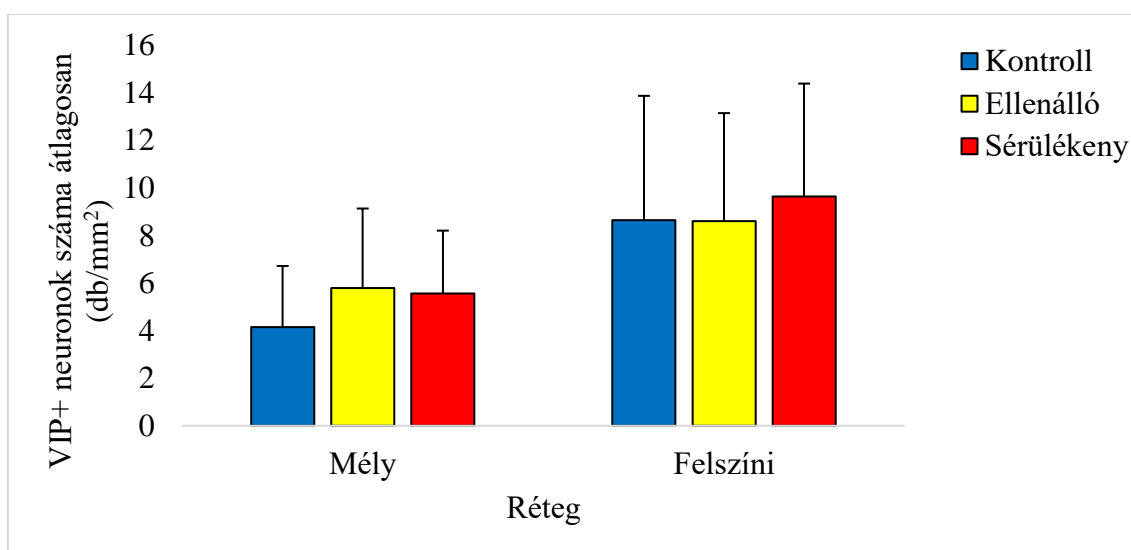
**12. ábra** VIP+ neuronok száma a PrL régió rétegeiben. Oszlopdiaagram az átlagos VIP+ neuronok számáról a három csoport a PrL régió mély és felszíni rétegében db/mm<sup>2</sup>-ben kifejezve. Az adatok átlag ± szórásaként vannak ábrázolva.

A PrL régió felszíni rétegében mért kettős pozitív (c-Fos és VIP), azaz az aktiválódott VIP neuronok aránya a következőképpen adódott: a kontroll csoportnál átlagosan  $23,57 \pm 16,54$  %-ban, ellenálló csoportnál  $40,33 \pm 16,56$  %-ban, a sérülékeny csoportnál  $29,18 \pm 21,93$  %-ban, míg a PrL régió mély rétegében a kontroll csoportnál átlagosan  $28,67 \pm 20,45$  %-ban, az ellenálló csoportnál  $42,03 \pm 17,37$  %-ban, a sérülékeny csoportnál  $35,49 \pm 21,46$  %-ban. Egy-utas ANOVA alapján a csoportok között szignifikáns eltérés mutatkozott az aktiválódott VIP neuronok arányában a PrL régió felszíni rétegének összehasonlítása során ( $F=6,632$ ,  $p=0,005$ ). Tukey-féle post-hoc tesztet alkalmazva szignifikáns különbséget a kontroll és ellenálló csoportok között ( $p=0,005$ ), valamint az ellenálló és sérülékeny csoportok között találtunk ( $p=0,045$ ). A kontroll és a sérülékeny csoportok között nem volt szignifikáns különbség ( $p=0,487$ ). A PrL régió mély rétegében nem volt szignifikáns eltérés ( $F=2,38$ ,  $p=0,114$ ) (**13. ábra**).



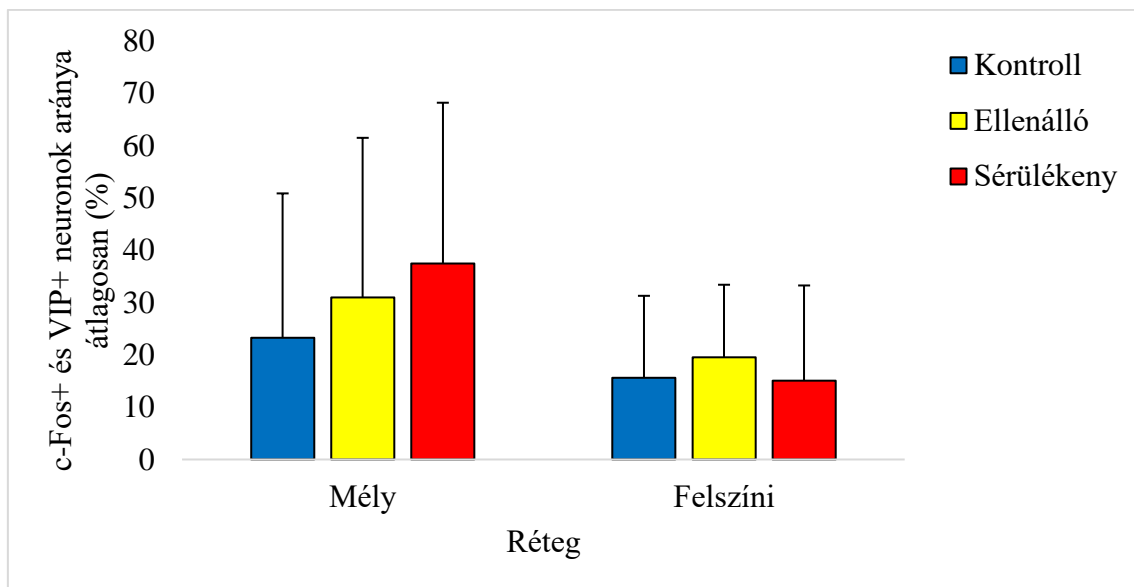
**13. ábra** c-Fos+ és VIP+ neuronok aránya a PrL régió rétegeiben. Oszlopdiaagram az átlagos kettős pozitív neuronok arányáról a három csoport a PrL régió mély és felszíni rétegében %-ban kifejezve. Az adatok átlag  $\pm$  szórásként vannak ábrázolva, (\*:  $p < 0.05$ ).

Az IL régió felszíni rétegében számolt VIP+ neuronok száma a következőképpen adódott: a kontroll csoportnál átlagosan  $8,65 \pm 5,22$  db/mm<sup>2</sup>, ellenálló csoportnál  $8,60 \pm 4,54$  db/mm<sup>2</sup>, a sérülékeny csoportnál  $9,64 \pm 4,75$  db/mm<sup>2</sup>, míg a IL régió mély rétegében a kontroll csoportnál átlagosan  $4,16 \pm 2,56$  db/mm<sup>2</sup>, ellenálló csoportnál  $5,79 \pm 3,35$  db/mm<sup>2</sup>, a sérülékeny csoportnál  $5,56 \pm 2,64$  db/mm<sup>2</sup>. Egy-utas ANOVA alapján nem volt szignifikáns eltérés a VIP+ neuronok számában a csoportok között sem az IL régió felszíni rétegben ( $F=0,239$ ,  $p=0,789$ ), sem Kruskal-Wallis próba alapján az IL régió mély rétegében ( $\chi^2=3.292$ ,  $p=0.193$ ) (**14. ábra**).



**14. ábra** VIP+ neuronok aránya az IL régió rétegeiben. Oszlopdiaagram az átlagos VIP+ neuronok számáról a három csoport a IL régió mély és felszíni rétegében db/mm<sup>2</sup>-ben kifejezve. Az adatok átlag  $\pm$  szórásként vannak ábrázolva.

Az IL régió felszíni rétegében mért kettős pozitív (c-Fos és VIP), azaz az aktiválódott VIP neuronok aránya a következőképpen adódott: a kontroll csoportnál átlagosan  $15,59 \pm 15,70$  %-ban, ellenálló csoportnál  $19,54 \pm 13,86$  %-ban, a sérülékeny csoportnál  $15,09 \pm 18,17$  %-ban, míg az IL régió mély rétegében a kontroll csoportnál átlagosan  $23,26 \pm 27,60$  %-ban, az ellenálló csoportnál  $30,97 \pm 30,51$  %-ban, a sérülékeny csoportnál  $37,47 \pm 30,72$  %-ban. Egy-utas ANOVA alapján nem volt szignifikáns eltérés az aktiválódott VIP neuronok arányában a csoportok között sem az IL felszíni rétegében ( $F=0,749$ ,  $p=0,484$ ), sem az IL régió mély rétegében ( $F=0,933$ ,  $p=0,407$ ) (15. ábra).



**15. ábra** c-Fos+ és VIP+ neuronok aránya az IL régió rétegeiben. Oszlopdiaagram az átlagos kettős pozitív neuronok arányáról a három csoport a IL régió mély és felszíni rétegében %-ban kifejezve. Az adatok átlag  $\pm$  szórásaként vannak ábrázolva.

## 6. Értékelés, következtetés

Kutatásunk célja a PTSD-szerű tünetek túlzott félelmi generalizációja mögötti mechanizmusok jobb megértése volt, ezen belül is az mPFC hálózatbeli elváltozások azonosítása volt kérdéseink fókuszában. Vizsgálatunk során immunhisztokémiai módszerrel jelöltük a Cr+, VIP+ sejteket és ezek c-Fos koexpresszióját sérülékeny és ellenálló (magas és alacsony félelmi generalizációt mutató) hím Long Evans patkányok alpopulációiban, s ezen sérülékeny-ellenálló csoportok neuronális aktivitását hasonlítottuk össze. Eredményeink szerint a Cr+ sejtek sem számukban, sem aktivitásukban nem mutattak különbséget a csoportok között. A VIP+ sejtek számban nem különböztek a csoportok között (alrégiók tekintetében sem), azonban aktivációjukban szignifikáns különbség volt kimutatható. Az ellenálló csoportban a VIP+ sejtek jelentősen aktiválódtak a félelmi előhívás során a kontroll csoporthoz képest, míg a sérülékeny csoportban nem volt aktivitás növekedés megfigyelhető. Mindez leginkább a PrL régió felszíni rétegében jelentkezett.

A szakirodalomban már megmutatták, hogy a félelmi hálózat működésében a PrL régiónak fontos szabályozó szerepe van [57]. Összeköttetések tekintetében pályajelölő módszerekkel megállapították, hogy kétirányú kapcsolat van a talamusz mediodorzális magja és az mPFC között. Ennek a magnak a mediális része kapcsolatban áll a PrL és IL régiókkal, míg laterális része az ACC és a szomatomotoros kéreggel. Ezen a kapcsolaton kívül, egy masszív bemenete van a ventrális ACC-nek, a PrL és IL régióknak a bazolaterális amigdala (BLA) által. Az mPFC irányából a BLA és CeA felé történik összeköttetés. Az IL az ITC területére, valamint az LA-hoz, míg az ACC és a PrL kimenet pedig a BA-ban végződik. Tehát az mPFC a kapcsolatai révén feltehetően szabályozni tudja az amigdala által kialakult félelmi választ. Ezen kívül több kutatás is alátámasztotta a PrL és IL félelmi kondicionálással kapcsolatos felerősödött aktivitását c-Fos [71] vagy más korai átíródású gén által [72].

Az mPFC területén, akárcsak a hippokampusz és kérgi régiók esetén, glutamáterg serkentő projekciós neuronok (PN) és gamma-amino-vajsav (GABA) neurotranszmittert szintetizáló gátló interneuronok alkotják a hálózat fő elemeit. Bár a PN-ok jóval többen vannak, mint a GABAerg interneuronok, utóbbiak sokkal heterogénebbek tekintve morfológiájukat, gén kifejeződésüket, kapcsolataikat és elektrofiziológiájukat [73]. A GABAerg interneuronok az ingerekre jóval érzékenyebbek, mint azt korábban gondolták és akárcsak a PN-ok, sok olyan plaszticitást elősegítő mechanizmussal rendelkeznek,

amelyek pályakövető módszerrel feltérképezhetőek. Ellenben, hogy hogyan vesznek részt a memória kialakításában és a hálózat szabályozásában, máig nyitott kérdésként szerepel. Ahhoz, hogy az egész hálózatra befolyással legyenek, a GABAerg interneuronok a PN-ok jelzései alapján 'kooperálnak', időbeli szabályozást végeznek.

Az elmúlt évtizedekben az interneuronok célzása és manipulálása a különböző sejtcsoportok közti interakciók jobb megértéséhez vezetett [74]. Ilyen interakció közé tartozik az előreccsatolós, a visszacsatolós gátlás, valamint a gátlás gátlása (diszinhibíció). Erre példa a VIP interneuronok szomatosztatin vagy parvalbumin interneuronokon érvényesülő gátlása, mely egy erősebb hatás, mint a VIP gátlásának hatása PN-okra [75]. Például olyan viselkedésbeli ingerek, amelyek visszajelzést adnak a környezeti veszélyekre, jutalmakra, kiváltják a VIP interneuronok fázisos tüzelését a BLA-ban és a hallókéregben. Ez elősegíti a sejtek plaszticitási mechanizmusait, ami aztán a jelzések tanulásához járul hozzá. A komplex sűrű összeköttetéseknek és interakcióknak köszönhetően, az interneuronok a PN-aktivitás sebességének és időbeli mintázatának hatékony, koordinált befolyásolására képesek, ami elengedhetetlen a hálózati működéshez, így például az asszociált félelmi jelek feldolgozásához [74].

Az mPFC egyik fő funkciója más agyterületek koordinálása (például a félelmi feldolgozás BLA-ban). Az mPFC kimenetének erősségét, szinkronicitását, hatékonyságát pedig a GABA interneuronok koordinált működése határozza meg a fent leírt módon. Ennek tükrében kutatási eredményünk azt sugallja, hogy bár a Cr+ interneuron populáció nem, addig a VIP interneuron populáció fontos szerepet játszhat a félelem előhívás és generalizáció során történő prefrontális aktivitás szabályozásában, s így a kioltódás szabályozásában más agyterületeken keresztül. Míg az ellenálló csoportban a VIP sejtcsoport jelentős aktivitást mutat, a sérülékeny csoportban ez hiányzik, mely feltételezhetően hozzájárul a generalizáció és kioltódás zavarához. Továbbiakban érdemes lesz vizsgálni olyan interneuron populációkat (parvalbumin, szomatosztatin), melyek a VIP interneuronok által célzottak, ez által a VIP interneuronok szabályozása alatt állnak. Hasonlóan a PFC által beidegzett agyterületek aktivitásbeli változásait is érdemes lesz vizsgálni, amik feltehetően közvetítik az általunk feltárt hatásokat, s így szerepet játszhatnak a félelmi generalizáció és kioltódás zavaraiiban.

## 7. Összefoglaló

A stressz mindannyiunk életében megjelenik számos különböző formában, amire a szervezet minden esetben valamilyen választ ad. Egy valamilyen stresszorra adott választ nevezünk stresszválasznak, aminek következtében fiziológiai változások is történnek. A magatartási és endokrin válasz kialakításáért a limbikus rendszer, amigdala és a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg (HPA) tengely fontos elemek, melyek a prefrontális kéreg szabályozása alatt állnak. A stressz negatív hatására való fogékonyságát növelheti ezen régiók diszfunkciója, ami akár pszichiátriai zavarokhoz, például a poszttraumás stressz zavar (PTSD) kialakulásához is vezethet. Ezen zavar fő tünete a félelem generalizáció és kioltódás hiánya. Kutatásunkban egy PTSD állatmodellben (Long Evans patkányokon) vizsgáltuk a prefrontális kéregben történő idegrendszeri mechanizmusokat.

Az állatokkal félelmi kondicionálást végeztünk el, ahol a hosszútávú félelmi előhívás alapján sérülékeny és ellenálló csoportokat határoztunk meg magas-alacsony félelmi válaszuk (dermedési idő) alapján. Ezt követően immunhisztokémiai módszerrel jelöltük az állatok mediális prefrontális kéreg területén a kalretinin (Cr), a vazoaktív intesztinális polipeptid (VIP) interneuronokat és azok aktivitását c-Fos aktivitás markerrel.

A Cr interneuronok nem mutattak sem sejtszámban, sem aktivációs mintázatban különbséget az ellenálló és sérülékeny csoportok között. A VIP interneuron sejtszámban nem különbözött a vizsgált csoportjaink között, ellenben az aktivációs mintázatban jelentős eltérés adódott a csoportok között: míg az ellenálló csoport aktivitást mutatott a kontrollhoz képest, addig a sérülékeny csoportban ez nem volt megfigyelhető a prefrontális kéreg prelimbikus régiójában.

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a prefrontális VIP interneuronok aktivitása fontos szerepet játszhat a félelem generalizáció és kioltódás zavarában.

## 8. Summary

Stress comes in many different forms in all our lives, and the body responds in some way. A response to a stressor is called a stress response, and physiological changes occur as a result. The limbic system, amygdala and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis are important elements in the development of the behavioural and endocrine response, which are regulated by the prefrontal cortex. Dysfunction in these regions can increase susceptibility to the negative effects of stress, which can lead to psychopathologies such as post-traumatic stress disorder (PTSD). The main symptom of this disorder is the lack of fear generalisation and extinction. In our research, we investigated neural mechanisms in the prefrontal cortex using an animal model of PTSD (Long Evans rats).

We performed fear conditioning with the animals, where we defined vulnerable and resistant groups based on their high-low fear response (freezing time) to long-term fear evoked. Then we used immunohistochemistry to label calretinin (Cr), vasoactive intestinal polypeptide (VIP) interneurons and their activity in the medial prefrontal cortex of animals with the activity marker c-Fos.

Cr interneurons showed no difference in cell number or activation pattern between the resistant and vulnerable groups. VIP interneurons did not differ in cell number between the tested groups, however there was a significant difference in activation pattern between the groups: while the resistant group showed activity compared to the control, this was not observed in the prefrontal cortex prelimbic region of the vulnerable group.

Based on our results, it seems that the activity of prefrontal VIP interneurons may play an important role in the dysfunction of fear generalization and extinction.

## **9. Köszönetnyilvánítás**

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Tóth Máténak, hogy szakmai észrevételeivel és ösztönző szavaival segítette munkámat. Kérdéseimre készséggel válaszolt és mélyítette a meglévő a biológiai ismereteimet. Köszönöm a lehetőséget Dr. Mikics Évának, hogy a kutatócsoportnak szakdolgozójaként részese lehettem és betekintést kaptam a kutatói pályába. Köszönöm a közös munkát Sente László PhD hallgatónak, akihez szintén fordulhattam bármilyen kérdéssel és kitartó, precíz munkájával segítette fejlődésemet és bővítette ismereteimet. Ezen felül szeretném megköszönni a Transzlációs Magatartás Idegtudomány kutatócsoport minden tagjának, hogy segítették beilleszkedésemet, valamint támogatásukat. Továbbá köszönöm a belső konzulensemnek, Puska Gina segítségét és észrevételeit a konzultálásokkal, segítve fejlődésemet az Állatorvostudományi Egyetemen.



## 10. Irodalom jegyzék

1. Taylor C, Dewsbury BM (2018) On the Problem and Promise of Metaphor Use in Science and Science Communication. *Journal of Microbiology & Biology Education* 19:. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v19i1.1538>
2. Kagan J (2016) Why Stress Remains an Ambiguous Concept. *Perspectives on Psychological Science* 11:464–465. <https://doi.org/10.1177/1745691616649952>
3. VanItallie TB (2002) Stress: A risk factor for serious illness. *Metabolism* 51:40–45. <https://doi.org/10.1053/meta.2002.33191>
4. Franklin TB, Saab BJ, Mansuy IM (2012) Neural Mechanisms of Stress Resilience and Vulnerability. *Neuron* 75:747–761. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.016>
5. Arnoldini M, Mostowy R, Bonhoeffer S, Ackermann M (2012) Evolution of Stress Response in the Face of Unreliable Environmental Signals. *PLoS Computational Biology* 8:e1002627. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002627>
6. Richter-Levin G, Stork O, Schmidt M v. (2019) Animal models of PTSD: a challenge to be met. *Molecular Psychiatry* 24:1135–1156. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0272-5>
7. SELYE H (1936) A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* 138:32–32. <https://doi.org/10.1038/138032a0>
8. Karatsoreos IN, McEwen BS (2011) Psychobiological allostasis: resistance, resilience and vulnerability. *Trends in Cognitive Sciences* 15:576–584. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2011.10.005>
9. McEwen BS, Stellar E (1993) Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med* 153:2093–101
10. Bottaccioli AG, Bottaccioli F, Minelli A (2019) Stress and the psyche-brain-immune network in psychiatric diseases based on psychoneuroendocrineimmunology: a concise review. *Ann N Y Acad Sci* 1437:31–42. <https://doi.org/10.1111/nyas.13728>
11. Godoy LD, Rossignoli MT, Delfino-Pereira P, Garcia-Cairasco N, de Lima Umeoka EH (2018) A Comprehensive Overview on Stress Neurobiology: Basic Concepts and Clinical Implications. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 12:. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00127>
12. Richter-Levin G, Sandi C (2021) Title: “Labels Matter: Is it stress or is it Trauma?” *Translational Psychiatry* 11:385. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01514-4>
13. McEwen BS (2007) Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. *Physiological Reviews* 87:873–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2006>
14. Picard M, McEwen BS, Epel ES, Sandi C (2018) An energetic view of stress: Focus on mitochondria. *Frontiers in Neuroendocrinology* 49:72–85. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.01.001>
15. Papargyri P, Zapanti E, Salakos N, Papargyris L, Bargiota A, MASTORAKOS G (2018) Links between HPA axis and adipokines: clinical implications in paradigms of stress-related disorders. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* 13:317–332. <https://doi.org/10.1080/17446651.2018.1543585>
16. Kargi AY, Iacobellis G (2014) Adipose Tissue and Adrenal Glands: Novel Pathophysiological Mechanisms and Clinical Applications. *International Journal of Endocrinology* 2014:1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/614074>

17. MCEWEN BS (2004) Protection and Damage from Acute and Chronic Stress: Allostasis and Allostatic Overload and Relevance to the Pathophysiology of Psychiatric Disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1032:1–7. <https://doi.org/10.1196/annals.1314.001>
18. Zorn J v., Schür RR, Boks MP, Kahn RS, Joëls M, Vinkers CH (2017) Cortisol stress reactivity across psychiatric disorders: A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 77:25–36. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.11.036>
19. Grissom N, Bhatnagar S (2009) Habituation to repeated stress: Get used to it. *Neurobiology of Learning and Memory* 92:215–224. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.07.001>
20. Weinberg MS, Bhatt AP, Girotti M, Masini C v., Day HEW, Campeau S, Spencer RL (2009) Repeated Ferret Odor Exposure Induces Different Temporal Patterns of Same-Stressor Habituation and Novel-Stressor Sensitization in Both Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity and Forebrain c-fos Expression in the Rat. *Endocrinology* 150:749–761. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0958>
21. Masini C v., Day HEW, Campeau S (2008) Long-term habituation to repeated loud noise is impaired by relatively short interstressor intervals in rats. *Behavioral Neuroscience* 122:210–223. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.122.1.210>
22. Radley JJ, Gosselink KL, Sawchenko PE (2009) A Discrete GABAergic Relay Mediates Medial Prefrontal Cortical Inhibition of the Neuroendocrine Stress Response. *Journal of Neuroscience* 29:7330–7340. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5924-08.2009>
23. Shin LM, Liberzon I (2010) The Neurocircuitry of Fear, Stress, and Anxiety Disorders. *Neuropsychopharmacology* 35:169–191. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.83>
24. American Psychiatric Association (2013) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. American Psychiatric Association
25. North CS, Suris AM, Davis M, Smith RP (2009) Toward validation of the diagnosis of posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 166:34–41. <https://doi.org/10.1176/APPI.AJP.2008.08050644>
26. Friedman MJ, Resick PA, Bryant RA, Brewin CR (2011) Considering PTSD for DSM-5. *Depression and Anxiety* 28:750–769. <https://doi.org/10.1002/da.20767>
27. World Health Organization (2019) *International statistical classification of diseases and related health problems, 11th ed*
28. Breslau N, Kessler RC, Chilcoat HD, Schultz LR, Davis GC, Andreski P (1996) Trauma and Posttraumatic Stress Disorder in the Community Detroit Area Survey of Trauma
29. Breslau N (1991) Traumatic Events and Posttraumatic Stress Disorder in an Urban Population of Young Adults. *Archives of General Psychiatry* 48:216. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1991.01810270028003>
30. Karam EG, Friedman MJ, Hill ED, Kessler RC, McLaughlin KA, Petukhova M, Sampson L, Shahly V, Angermeyer MC, Bromet EJ, de Girolamo G, de Graaf R, Demyttenaere K, Ferry F, Florescu SE, Haro JM, He Y, Karam AN, Kawakami N, Kovess-Masfety V, Medina-Mora ME, Browne MAO, Posada-Villa JA, Shalev AY, Stein DJ, Viana MC, Zarkov Z, Koenen KC (2014) Cumulative traumas and risk thresholds: 12-month PTSD in the world mental health (WMH) surveys. *Depression and Anxiety* 31:130–142. <https://doi.org/10.1002/da.22169>
31. Forbes D, Lockwood E, Phelps A, Wade D, Creamer M, Bryant RA, McFarlane A, Silove D, Rees S, Chapman C, Slade T, Mills K, Teesson M, O'Donnell M (2014)

- Trauma at the Hands of Another. *The Journal of Clinical Psychiatry* 75:147–153.  
<https://doi.org/10.4088/JCP.13m08374>
32. Liu H, Petukhova M v., Sampson NA, Aguilar-Gaxiola S, Alonso J, Andrade LH, Bromet EJ, de Girolamo G, Haro JM, Hinkov H, Kawakami N, Koenen KC, Kovess-Masfety V, Lee S, Medina-Mora ME, Navarro-Mateu F, O'Neill S, Piazza M, Posada-Villa J, Scott KM, Shahly V, Stein DJ, ten Have M, Torres Y, Gureje O, Zaslavsky AM, Kessler RC (2017) Association of *DSM-IV* Posttraumatic Stress Disorder With Traumatic Experience Type and History in the World Health Organization World Mental Health Surveys. *JAMA Psychiatry* 74:270.  
<https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2016.3783>
  33. Cathy Spatz Widom (1999) Posttraumatic Stress Disorder in Abused and Neglected Children Grown Up. *American Journal of Psychiatry* 156:1223–1229.  
<https://doi.org/10.1176/ajp.156.8.1223>
  34. DiGrande L, Perrin MA, Thorpe LE, Thalji L, Murphy J, Wu D, Farfel M, Brackbill RM (2008) Posttraumatic stress symptoms, PTSD, and risk factors among lower Manhattan residents 2–3 years after the September 11, 2001 terrorist attacks. *Journal of Traumatic Stress* 21:264–273. <https://doi.org/10.1002/jts.20345>
  35. Breslau N (1997) Psychiatric Sequelae of Posttraumatic Stress Disorder in Women. *Archives of General Psychiatry* 54:81.  
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.1997.01830130087016>
  36. American Psychiatric Association (2013) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. American Psychiatric Association
  37. Vermetten E, Bremner JD (2002) Circuits and systems in stress. I. Preclinical studies. *Depression and Anxiety* 15:126–147. <https://doi.org/10.1002/da.10016>
  38. Ross DA, Arbuckle MR, Travis MJ, Dwyer JB, van Schalkwyk GI, Ressler KJ (2017) An Integrated Neuroscience Perspective on Formulation and Treatment Planning for Posttraumatic Stress Disorder. *JAMA Psychiatry* 74:407.  
<https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2016.3325>
  39. Janak PH, Tye KM (2015) From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature* 517:284–292. <https://doi.org/10.1038/nature14188>
  40. Petrov T, Krukoff TL, Jhamandas JH (1994) Chemically defined collateral projections from the pons to the central nucleus of the amygdala and hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Cell & Tissue Research* 277:289–295.  
<https://doi.org/10.1007/BF00327776>
  41. Shin LM, Orr SP, Carson MA, Rauch SL, Macklin ML, Lasko NB, Peters PM, Metzger LJ, Dougherty DD, Cannistraro PA, Alpert NM, Fischman AJ, Pitman RK (2004) Regional Cerebral Blood Flow in the Amygdala and Medial Prefrontal Cortex During Traumatic Imagery in Male and Female Vietnam Veterans With PTSD. *Archives of General Psychiatry* 61:168. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.61.2.168>
  42. Malivoire BL, Girard TA, Patel R, Monson CM (2018) Functional connectivity of hippocampal subregions in PTSD: relations with symptoms. *BMC Psychiatry* 18:129.  
<https://doi.org/10.1186/s12888-018-1716-9>
  43. Elston GN, Benavides-Piccione R, Elston A, Zietsch B, Defelipe J, Manger P, Casagrande V, Kaas JH (2006) Specializations of the granular prefrontal cortex of primates: Implications for cognitive processing. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 288A:26–35.  
<https://doi.org/10.1002/ar.a.20278>

44. Miller EK, Cohen JD (2001) An Integrative Theory of Prefrontal Cortex Function. *Annual Review of Neuroscience* 24:167–202. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.167>
45. Goldman-Rakic PS (1995) Cellular basis of working memory. *Neuron* 14:477–485. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90304-6](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90304-6)
46. Ongur D (2000) The Organization of Networks within the Orbital and Medial Prefrontal Cortex of Rats, Monkeys and Humans. *Cerebral Cortex* 10:206–219. <https://doi.org/10.1093/cercor/10.3.206>
47. Barbas H, Pandya DN (1989) Architecture and intrinsic connections of the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *The Journal of Comparative Neurology* 286:353–375. <https://doi.org/10.1002/cne.902860306>
48. Barbas H, Medalla M, Alade O, Suski J, Zikopoulos B, Lera P (2005) Relationship of Prefrontal Connections to Inhibitory Systems in Superior Temporal Areas in the Rhesus Monkey. *Cerebral Cortex* 15:1356–1370. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhi018>
49. Quirk GJ, Mueller D (2008) Neural Mechanisms of Extinction Learning and Retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33:56–72. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301555>
50. Wilkins AJ, Shallice T, McCarthy R (1987) Frontal lesions and sustained attention. *Neuropsychologia* 25:359–365. [https://doi.org/10.1016/0028-3932\(87\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0028-3932(87)90024-8)
51. Chao LL, Knight RT (1995) Human prefrontal lesions increase distractibility to irrelevant sensory inputs. *NeuroReport* 6:1605–1610. <https://doi.org/10.1097/00001756-199508000-00005>
52. Aron AR (2011) From Reactive to Proactive and Selective Control: Developing a Richer Model for Stopping Inappropriate Responses. *Biological Psychiatry* 69:e55–e68. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.07.024>
53. Barrash J, Tranel D, Anderson SW (2000) Acquired Personality Disturbances Associated With Bilateral Damage to the Ventromedial Prefrontal Region. *Developmental Neuropsychology* 18:355–381. <https://doi.org/10.1207/S1532694205Barrash>
54. THOMPSON-SCHILL SL, JONIDES J, MARSHUETZ C, SMITH EE, D'ESPOSITO M, KAN IP, KNIGHT RT, SWICK D (2002) Effects of frontal lobe damage on interference effects in working memory. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience* 2:109–120. <https://doi.org/10.3758/CABN.2.2.109>
55. Simons JS, Henson RNA, Gilbert SJ, Fletcher PC (2008) Separable forms of reality monitoring supported by anterior prefrontal cortex. *J Cogn Neurosci* 20:447–57. <https://doi.org/10.1162/jocn.2008.20036>
56. Rudy JW, O'Reilly RC (1999) Contextual fear conditioning, conjunctive representations, pattern completion, and the hippocampus. *Behavioral Neuroscience* 113:867–880. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.113.5.867>
57. Rozeske RR, Valerio S, Chaudun F, Herry C (2015) Prefrontal neuronal circuits of contextual fear conditioning. *Genes, Brain and Behavior* 14:22–36. <https://doi.org/10.1111/gbb.12181>
58. Mátyás F, Lee J, Shin H-S, Acsády L (2014) The fear circuit of the mouse forebrain: connections between the mediodorsal thalamus, frontal cortices and basolateral amygdala. *European Journal of Neuroscience* 39:1810–1823. <https://doi.org/10.1111/ejn.12610>

59. Heidbreder CA, Groenewegen HJ (2003) The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 27:555–579. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.09.003>
60. Vertes RP (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142:1–20. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.06.027>
61. Ipser JC, Stein DJ (2012) Evidence-based pharmacotherapy of post-traumatic stress disorder (PTSD). *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 15:825–840. <https://doi.org/10.1017/S1461145711001209>
62. Goswami S, Rodríguez-Sierra O, Cascardi M, Paré D (2013) Animal models of post-traumatic stress disorder: face validity. *Frontiers in Neuroscience* 7:. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00089>
63. Yehuda R, Hoge CW, McFarlane AC, Vermetten E, Lanius RA, Nievergelt CM, Hobfoll SE, Koenen KC, Neylan TC, Hyman SE (2015) Post-traumatic stress disorder. *Nature Reviews Disease Primers* 1:15057. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.57>
64. Sheng M, Greenberg ME (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4:477–485. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90106-P](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90106-P)
65. Nakajima M (2021) Seminars in Cell and Developmental Biology xxx (xxxx) xxx Neuronal identity and cognitive control dynamics in the PFC. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.08.014>
66. Kubota Y, Shigematsu N, Karube F, Sekigawa A, Kato S, Yamaguchi N, Hirai Y, Morishima M, Kawaguchi Y (2011) Selective coexpression of multiple chemical markers defines discrete populations of neocortical gabaergic neurons. *Cerebral Cortex* 21:1803–1817. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq252>
67. Yehuda R, Antelman SM (1993) Criteria for rationally evaluating animal models of posttraumatic stress disorder. *Biological Psychiatry* 33:479–486. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(93\)90001-T](https://doi.org/10.1016/0006-3223(93)90001-T)
68. Hagenaaars MA, Oitzl M, Roelofs K (2014) Updating freeze: Aligning animal and human research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 47:165–176. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.07.021>
69. Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan L, François R, Grolemond G, Hayes A, Henry L, Hester J, Kuhn M, Pedersen T, Miller E, Bache S, Müller K, Ooms J, Robinson D, Seidel D, Spinu V, Takahashi K, Vaughan D, Wilke C, Woo K, Yutani H (2019) Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software* 4:1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
70. RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
71. Lemos JI, Resstel LB, Guimarães FS (2010) Involvement of the prelimbic prefrontal cortex on cannabidiol-induced attenuation of contextual conditioned fear in rats. *Behavioural Brain Research* 207:105–111. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.09.045>
72. Stern CAJ, Gazarini L, Vanvossen AC, Hames MS, Bertoglio LJ (2014) Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time. *Learning & Memory* 21:14–20. <https://doi.org/10.1101/lm.032631.113>

73. Huang ZJ, Paul A (2019) The diversity of GABAergic neurons and neural communication elements. *Nature Reviews Neuroscience* 20:563–572.  
<https://doi.org/10.1038/s41583-019-0195-4>
74. Letzkus JJ, Wolff SBE, Lüthi A (2015) Disinhibition, a Circuit Mechanism for Associative Learning and Memory. *Neuron* 88:264–276.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.024>
75. Pi H-J, Hangya B, Kvitsiani D, Sanders JI, Huang ZJ, Kepecs A (2013) Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control. *Nature* 503:521–524.  
<https://doi.org/10.1038/nature12676>

## 11. Nyilatkozatok

### HuVetA ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT\*

Név: MARÓTHY ROBERT DANIEL  
Elérhetőség (e-mail cím): rob8207@gmail.com  
A feltöltendő mű címe: A. Strosser ináti sérülékenység halleneben álló  
idegrendszeri mechanizmusok  
A mű megjelenési adatai: Budapest, 2022. 04. 28  
Az átadott fájlok száma: 1

---

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról** is:



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörtő módon visszaélne.

Budapest, 2022. év aprilis.....hó 29.....nap

aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

---

*A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyont elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.*

*A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőségeit és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén*

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*



## Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott **Puska Gina** igazolom, hogy **Maróthy Róbert Dániel** (a hallgató neve) **A stressz iránti sérülékenység háttérében álló idegrendszeri mechanizmusok** című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2022. 04. 26.



.....  
Puska Gina  
a témavezető neve és aláírása

Ökológia Tanszék  
tanszék