

**Limbikus és közepagygi stressz-asszociált magok korfüggő aktivitásának
vizsgálata az akut és krónikus stressz patkánymodelljében**

Doktori (PhD.) tézis

dr. Kovács László Ákos

Témavezető: dr. Gaszner Balázs

Doktori Iskola: Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola D95

Doktori iskola vezetője: dr. Szekeres Júlia

Program: Neuroendokrinológia és neurohisztológia (B134)

Programvezető: dr. Reglődi Dóra



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Anatómiai Intézet

2019.

Tartalomjegyzék

1. ALKALMAZOTT RÖVIDÍTÉSEK ÉS IDEGEN SZAVAK GYŰJTEMÉNYE	5
2. BEVEZETÉS	8
2.1. A stressz fogalmának kialakulása	8
2.2. A stresszválasz szabályozása	9
2.2.1. A hypothalamus-hypophysis-adrenocorticalis tengely válasza és jelentősége	10
2.2.2. HPA-tengely felsőbb szintű szabályozása	11
2.3. A CRF peptidcsalád és receptoraik.....	22
2.3.1. A centrális CRF rendszer, stressz és hangulatzavarok kapcsolata.....	23
2.4. Neurális aktivációs markerek szerepe a stressz vizsgálatában	24
2.4.1. A FOS fehérje család	24
2.4.2. A FOS fehérjék és a stressz kapcsolata	25
2.5. Az életkor hatása a stresszválaszra.....	26
3. CÉLKITŰZÉSEK, FELTÉTELEZÉSEK.....	28
3.1. Az akut stresszben megjelenő FOS aktiváció mértéke változik az életkorral.....	28
3.2. A CRF tartalmú idegsejtek akut és krónikus stresszben a korral változó aktivációs dinamikát mutatnak.	28
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	29
4.1. Kísérleti állatok.....	29
4.1.1. A főbb stressz-adaptációs központok FOS aktivációjának térképezése az ARS modellben	30
4.1.2. ARS és CVMS modell a PVN, CeA és BNSTov CRF neuronjainak korfüggő aktivációjának vizsgálatára ..	32
4.2. Mintagyűjtés és szövettani előkészítés	34
4.3. Corticosterone radioimmunassay.....	35
4.4. FOS immunhisztokémia diamino-benzidin kromogénnel	36
4.5. CRF, FOS és FOSB hármas immunfluoreszcens jelölés	37
4.6. Mikroszkópia és digitális képanalízis	38
4.7. Statisztikai analízis	40

5. EREDMÉNYEK	41
5.1. A neuronális aktivitás mintázata az életkor függvényében az ARS modellben	41
5.1.1. Az ARS modell validitásvizsgálat corticosterone eredményei	41
5.1.2. A tágabb értelemben vett amygdala magjainak FOS immunreaktivitása	43
5.1.3. Nucleus paraventricularis hypothalami	55
5.1.4. A centrális projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp)	58
5.1.5. Nucleus raphe dorsalis (DR)	59
5.1.6. A somatosensoros barrel cortex (S1)	61
5.1.7. Az akut restraint stressz modell statisztikai összefoglaló táblázatai	63
5.2. A CRF tartalmú idegsejtek korfüggő neuronális aktivás mintázata ARS és CVMS modellekben	66
5.2.1. A CRF tartalmú idegsejtek korfüggő neuronális aktivitás mintázata ARS modellben	66
5.2.2. CRF tartalmú idegsejtek aktivitásának korfüggő dinamikája CVMS-modellben	74
A CRF sejtek ARS és CVMS modellben mutatott IEG immunreaktivitás eredményeit értékelő összefoglaló statisztikai táblázatok:	85
6. MEGBESZÉLÉS	87
6.1. A stresszmodellek megbízhatósága	87
6.2. Az akut stressz hatása a FOS kifejeződésre az életkor függvényében	91
6.3. Bazális FOS kifejeződés korfüggő dinamikája	94
6.4. A főbb hypothalamicus és előagyú CRF rendszerek korfüggő stresszreaktivitása az azonnali gének kifejeződésében	97
6.4.1. Az akut stressz hatékonysága: A CRF-FOS kolokalizáció	97
6.4.2. A PVN CRF sejtjei nem mutatnak korfüggő FOSB aktivitásbeli különbséget krónikus stressz során	100
6.4.3. A CeA és BNSTov CRF sejtjeinek aktivitása független a CVMS-től, de mértéke csökken a korrall	101
6.4.4. A FOS fehérjék aktivitásának korfüggő dinamikája a CRF sejtekben	101
6.5. A FOS jelölés, mint módszer hátrányai és korlátai	102
6.5.1. A FOS jelölés hátrányai	102
6.5.2. A kombinált CRF- FOSB (Δ FOSB)-FOS jelölés limitációi	104
7. KONKLÚZIÓ	105
8. ÚJ EREDMÉNYEINK	107
9. IRODALOMJEGYZÉK	108

10. A KÖZLEMÉNYEK, PUBLIKÁCIÓK ELŐADÁSOK ÉS PREZENTÁCIÓK JEGYZÉKE130

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS..... 137

1. Alkalmazott rövidítések és idegen szavak gyűjteménye

5-HT	szerotonin
ACTH	adrenocorticotrop hormon
ANOVA	analysis of variance
AP-1	aktivátor protein komplex 1
ARS	akut restraint stressz
BLA	basolateral nucleus of amygdala / nucleus basolateralis amygdalae
BNST	bed nucleus of the stria terminalis / nucleus interstitialis striae terminalis
BNSTad	BNST anterodorsalis almagja
BNSTdl	BNST dorsolateralis almagja
BNSTdm	BNST dorsomedialis almagja
BNSTfu	BNST fusiformis almagja
BNSTif	BNST intrafascicularis almagja
BNSTov	BNST ovalis almagja
BNSTtr	BNST transversalis almagja
BNSTv	BNST ventralis almagja
CART	cocaine- és amphetamine-regulated transcript
CeA	central amygdala / nucleus centralis amygdalae
CORT	corticosterone
cpm	count per minute
CRF	corticotropin-releasing factor
CRF1R	corticotropin-releasing factor receptor, 1. típus
CRF2R	corticotropin-releasing factor receptor. 2. típus
CRF3R	corticotropin-releasing factor receptor 3. típus
CVMS	chronic variable mild stress / krónikus variábilis enyhe stressz
DAB	diamino-benzidine
DMH	dorsomedialis hypothalamus
DR	dorsal raphe nucleus / nucleus raphe dorsalis
extended amygdala	tágabb értelemben vett amygdala
EW	Edinger-Westphal mag
EWcp	centrally projecting Edinger-Westphal nucleus / központi projekciójú Edinger-Westphal mag
EWpg	preganglionáris Edinger-Westphal mag

GABA	gamma aminobutyric acid / gamma amino vajsav
GR	glukokortikoid receptor
HPA	hypothalamo-pituitary-adrenocorticalis / hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg
IEG	immediate early gene / azonnali gén
ilPFC	infralimbikus prefrontalis cortex
KO	knock out
LC	locus coeruleus
MeA	medial nucleus of amygdala / nucleus medialis amygdalae
MDD	major depressive disorder
mPFC	medialis prefrontalis cortex
MR	mineralokortikoid receptor
NGS	normal goat serum
NPY	neuropeptid Y
NTS	nucleus tractus solitarii
PBS	phosphate buffered saline
periPVN	PVN körül található GABAerg neuronokból álló gyűrű
PFC	prefrontalis cortex
plPFC	prelimbikus prefrontalis cortex
PTSD	posttraumatic stress disorder
PVN	paraventricular nucleus of the hypothalamus / nucleus paraventricularis hypothalami
PVNdp	regio dorsalis parvocellularis nucleii paraventricularis
PVNm	magnocellular part of paraventricular nucleus / nucleus paraventricularis pars magnocellularis
PVNmpd	regio parvocellularis medialis nucleii paraventricularis
PVNmpv	regio parvocellularis ventromedialis nucleii paraventricularis
PVNp	parvocellular part of paraventricular nucleus / nucleus paraventricularis pars parvocellularis
PVNpm	regio magnocellularis posterior nucleii paraventricularis
RIA	radioimmunassay
rpm	revolutions per minute
S1	elsődleges somatosensoros kéreg, a bajuszszálak reprezentációs területe (barrel cortex)

SAM	sympatho-adrenomedullary/ rendszer	sympathicus	idegrendszer	mellékvesevelő
SEM	standard error of the mean			
SHRP	stress hyporesponsive period			
Ucn1	urocortin1			
Ucn2	urocortin2			
Ucn3	urocortin3			

2. Bevezetés

2.1. A stressz fogalmának kialakulása

Claude Bernard írta le először a szervezet belső környezetének – az ún. „milieu interne”-jének – állandóságát, amely független (autonóm) a külső környezettől (Bernard 1865, Cannon 1929). Később az amerikai Walter B. Cannon a belső állandóságot homeostasis-nak nevezte el. A homeostasis, vagyis „stabilitás állandóság által” fogalma összegzi azon fiziológiai változókat, melyek szűk határokon belül oszcillálnak és hozzájárulnak a szervezet egységének fenntartásához (Cannon 1929). Cannon az autonóm idegrendszert, és ezen belül a sympathicus idegrendszer kiemelt jelentőségét hangsúlyozza az állandóság megtartásában (Cannon 1929). A sympathico-adrenalis rendszer a szervezetet a catecholaminok által szabályozza, és aktivációja felel a Cannon-i „Fight, fright or flight!” (Harcoldj, vagy fuss!) reakciókért (Cannon 1929, Selye 1971). Bernard és Cannon felismerték a szervezet vészreakcióját, azonban a stressz fogalmát először Selye János vezette be 1936-ban. Selye szerint a stressz a szervezet nem specifikus válasza valamely potenciálisan fenyegető hatásra (Selye 1936). A stresszt egy külső hatás (inger), az úgynevezett stresszor idézi elő, mely kiválthatja a stresszválaszt. A stresszválasz célja a homeostasis védelme és helyreállítása (Selye 1971). Egy adott inger viszont eltérő választ válthat ki egyénenként, és ugyanazon inger az adott egyedben eltérő válaszreakciókat indukálhat (Levine 2005).

Selye, Cannon és Bernard klasszikus elméletei a szervezet belső állandóságát, annak megtartását helyezik középpontba, amely a túléléshez nélkülözhetetlen élettani változók (vér- és folyadékvolumen, pH-érték, oxigénszaturáció, vérnyomás, ionháztartás) normál tartományban tartására irányulnak (Cannon 1929, Selye 1971). A homeostasis a fiziológiai folyamatok dinamikus egyensúlyának fenntartásán alapszik. Mivel az élettani paraméterek időben folyamatosan változnak; az egy adott időpillanatban kialakult változás beszűkítheti a stresszválasz-készséget (McEwen 2002). A stresszválasz behatároltságának, azaz a megküzdési „coping” kapacitásnak pontosabb leírásához Sterling és Eyer vezette be allostasis fogalmát, amelyet később Bruce McEwen pontosított (Sterling és Eyer 1988, McEwen 2000). Az allostasis tulajdonképpen a homeostasis fogalmának azon kiterjesztése, amely magában foglalja azokat a szélesebb tartományokban változó faktorokat is, amelyek nem tartoznak a klasszikus Cannon-i a homeosztatikussal, de befolyásolják a homeostasis fenntartását (McEwen 2000). Például, a vér pH-ját és oxigénszaturációját szűk határok között tartja a szervezet (homeostasis), amit viszont befolyásol a cardiovascularis-, a metabolikus- és

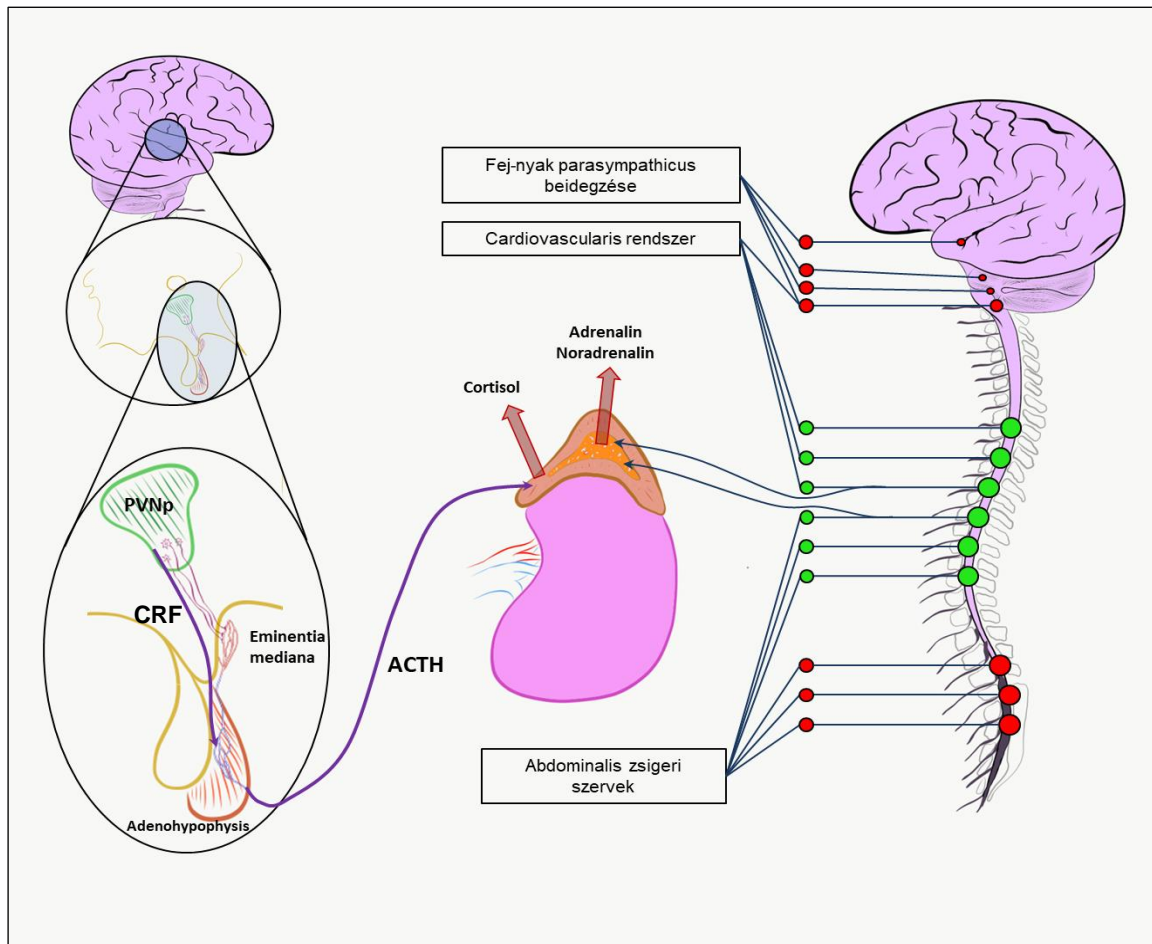
immunrendszer, valamint a központi idegrendszer is. Utóbbiak azonban igen széles tartományban változtatják aktivitásukat a külső és belső hatásoktól függően (allostasis). Sterling és Eyer az allostasist a vérnyomás diurnális ingadozásán szemlélte: reggeli ébredéskor a vérnyomás és a szívfrekvencia is emelkedik, ezért agyunk véráramlása is nő, segítve tudatunk megtartását (McEwen 1998). Mint látjuk, ez a kis változás nem elengedhetetlenül szükséges túlélésünkhöz, de nélkülözhetetlen szervezetünk ideális működéséhez, beleértve azt is, hogy a stresszre a lehető legideálisabb válasszal reagáljunk. Az allostasis fogalma kimondja, hogy szervezetünk képes változások által elérni a stabilitást, így biztosítva szervezetünk megfelelő felkészültségét az adott fenyegetésre (McEwen 2002, Levine 2005). Az allostasis beszűkült állapota és a szervezet allostaticus készülségi szintje beszűkítheti a stresszválaszt, ezzel jelentősen módosíthatja adott pillanatban a stressz adaptációs készséget (McEwen 2002).

Ma a stresszt általában úgy határozzuk meg, mint az egyén fiziológiai és/vagy pszichológiai integritását veszélyeztető, vélt vagy valós fenyegetés, mely fiziológiai és/vagy viselkedésbeli válaszreakcióhoz vezet (McEwen 2000).

2.2. A stresszválasz szabályozása

A stresszválasz feladata a túléléshez nélkülözhetetlen adaptáció megindítása és fenntartása. Az alkalmazkodáshoz és az új egyensúlyi állapot megtartásához az autonóm idegrendszer és a neuroendokrin rendszer összehangolt válasza szükséges (Carrasco és Van de Kar 2003, Ulrich Lai és Herman 2009).

Elsősorban fiziológiai stimulus következményeként először az autonóm idegrendszer – sympathico- adrenomedullaris (SAM) tengely – aktivációját figyelhetjük meg, amely azonnali (másodperceken belül) folyamatokat indít el (1. ábra). Ezzel párhuzamosan megfigyelhetjük a hypothalamus-hypophysis-adrenocorticalis (HPA) tengely aktivációját is, melynek feladata a szervezet gyors (percek alatti) és esetleges hosszabb távú (órák, napok, hetek alatti) adaptációjának szabályozása. A veszélyforrás megszűnésével, a szervezet csökkenti a SAM- és a HPA-tengely aktivitását, majd törekszik annak eredeti állapotának visszaállítására (Ulrich Lai és Herman 2009, Myers et al. 2016).



1. ábra: A hypothalamo-hypophysis-adrenocorticalis tengely és sympathico-adrenomedullaris tengely működése Ulrich Lai és Herman (2009) alapján. A kék vonalak az efferens idegi kapcsolatokat ábrázolják, a zöld körök a sympathicus központokat és ganglionokat, a piros körök a parasympathicus központokat és ganglionokat jelölik. A lila nyilak a paraventricularis mag parvocellularis (PVNp) CRF neuronjai által végzett neurosecretiot és a hormon véráram útján történő transzportjának irányát, illetve az adrenocorticotropin (ACTH) útját ábrázolja a véráramon keresztül.

2.2.1. A hypothalamus-hypophysis-adrenocorticalis tengely válasza és jelentősége

Az autonóm idegrendszer mellett a stressz okozta neuroendokrin rendszer válaszában kulcseleme a HPA-tengely aktivációja, amely a válasz létrehozásában, fenntartásában játszik szerepet (Pacak et al. 1995, Chrousos 2009). Több limbikus központ, a hypothalamus magok és az agytörzs egyes magjai aktiválják a hypothalamus nucleus paraventricularis (PVN) parvocellularis (PVNp) neuronjait (Ulrich Lai és Herman 2009, Herman et al. 2016). A PVNp-ből aktivációja során a corticotropin-releasing factor (CRF) axonális transzporttal az eminentia medianába jut és neuroszekréció révén a hypophysis portalis vénáiba kerülve eljut a hypophysis elülső lebenyének corticotroph sejtjeihez, ahol receptorához [corticotropin-releasing factor receptor 1 (CRF1R)] kötődik (Joels és Baram 2009, Herman et al. 2016,

Deussing és Chen 2018). A CRF1R-ligand kötődésének hatására megindul a proopiomelanocortin szintézise, amelyből hasítás során keletkezik az adrenocorticotrop hormon (ACTH). Az adenohypophysis sejtjei a véráramba szekretálják az ACTH-t, mely a mellékvesekéreg zona fasciculata rétegében megindítja a glukokortikoidok szintézisét és szekrécióját. Az itt felszabaduló cortisol (emberben) illetve corticosterone (CORT) (patkányban, egérben) képessé teszi a szervezetet a megváltozott környezethez való alkalmazkodásra, legyen az a homeostasis egyensúlyának megtartása vagy visszaállítása (1. ábra) (Jawahar et al. 2015, Myers et al. 2016, Herman et al. 2016). A glukokortikoidok fokozzák a metabolizmust, csökkentik az étvágyat és a gyulladásos folyamatok aktivitását, továbbá hozzájárulnak a cardiovascularis rendszer megfelelő működéséhez (Burford et al. 2017, Bereschenko et al. 2018, de Kloet és Herman 2018). A glukokortikoidok jelentős szereppel bírnak a központi idegrendszer szabályozásában is. Hatásukra a figyelem és emlékezőképesség fokozódik (Goldfarb 2018). A glukokortikoidok jelentősen befolyásolják a hangulati állapotot, és fokozott vérszintjük gyakran társul hangulatzavarokhoz is (Kino 2015, de Kloet et al. 2016, Albrecht 2017). Végezetül a glukokortikoidok a mineralokortikoidokkal együttesen negatív feedback útján szabályozzák önmaguk szintézisét és szekrécióját a limbikus rendszeren, valamint a PVNp-n CRF neuronjain keresztül (Coveñas et al 1993, Figueiredo et al. 2003a, de Kloet et al. 2018).

2.2.2. HPA-tengely felsőbb szintű szabályozása

A hippocampus és prefrontalis cortex szerepe

A hippocampus ventralis részében (subiculum) található neuronok rostokat küldenek a prefrontalis (PFC) kéreg infralimbikus (ilPFC) és prelimbikus (plPFC) részeibe, a nucleus interstitialis striae terminalis (BNST) magjaiba, a PVN körül elhelyezkedő gamma-aminobutirát (GABA)-erg neuronhálózathoz (periPVN) és a dorsomedialis hypothalamushoz (DMH) (Canteras és Swanson 1992, Choi et al. 2007, Herman et al. 2016). A hippocampus glutamáterg rostjai GABA-erg rostokat innerválva (BNST, DMH, periPVN) tónusos inhibíciót hoznak létre a PVN-ben, így gátolják a stressztengely aktivációját (Herman et al. 1989, Canteras és Swanson 1992, Choi et al. 2007, Ulrich Lai és Herman 2009). A hippocampus a PVN gátlása révén csökkenti a HPA-tengely aktivitását, de részt vesz a HPA-tengely nyugalmi tónusának visszaállításában is (Herman et al. 1995, Herman et al. 2003). Több tanulmány is kimutatta, hogy hippocampus lézió esetén egyes stressztípusok során

(restraint, acoustic stress, emelt keresztpalló teszt) az állatok elnyújtott CORT és ACTH válasszal reagáltak (Herman et al. 1995, 1998, Nettles et al. 2000). A funkció hátterében elsősorban glukokortikoid és kisebb részben a mineralokortikoid hormonok állnak, melyek receptorai [glukokortikoid receptor (GR) és mineralokortikoid receptor (MR)] a hippocampusban nagymértékben kifejeződnek (de Kloet et al. 2018).

A hippocampus mellett a medialis prefrontalis cortex (mPFC) is jelentékeny mennyiségű GR-t és MR-t tartalmaz (de Kloet et al. 2018) és részt vesz a glukokortikoidok által szabályozott negatív feedbackben is, így a hippocampushoz hasonlóan részt vesz a HPA-tengely gátlásában (Figueiredo et al. 2003a). A mPFC szerepe a stresszválasz kialakításában, szabályozásában összetett, mivel efferensei révén részt vesz a sympathicus és parasympathicus rendszerek szabályozásában, ezáltal a HPA-, valamint SAM-tengelyek regulációjában is (Ulrich-Lai és Herman 2009, McKlveen et al. 2015).

A PFC három részre osztható (plPFC, ilPFC és anterior cingularis cortex), melyek közül a plPFC és az ilPFC rendelkezik nagyobb jelentőséggel a stressz szabályozásában (Figueiredo et al. 2003a, McKlveen et al. 2015). A plPFC közvetlen kapcsolatban áll a nucleus raphe dorsalis (DR), nucleus basolateralis amygdalaeval (BLA) és a BNST elülső részével is. Glutamaterg neuronjai révén elsősorban az anterior BNST GABA-erg neuronjain keresztül gátolják a PVN működését és a CORT szekrécióját akut stressz során (Radley et al. 2009, McKlveen et al. 2015). A plPFC léziója esetén megnövekszik az ACTH és CORT válasz, továbbá a PVN (FOS) aktivitása is immobilizáció (restraint) során, azonban nem változik éter expozíció követően (Diorio et al. 1993, Figueiredo et al. 2003a).

Az ilPFC rostokat ad a nucleus tractus solitariihoz (NTS), a posterior hypothalamushoz és a nucleus centralis amygdalaehez (CeA), a nucleus medialis amygdalae-hez (MeA) továbbá közvetlen kapcsolatban áll a hippocampus-szal is (Vertes 2004, McKlveen et al. 2015). Az ilPFC egyrészt (ismeretlen úton) gátolja a PVN működését, másrészt a CeA-n és NTS-en keresztül aktiválja a HPA-tengelyt az akut stresszfolyamatok esetén (McKlveen et al. 2015).

A hippocampus és PFC neuronjainak működési zavarai összefüggésben állnak kognitív- és hangulatzavarok kialakulásával (Dellu et al. 1994, Kino 2015, Kim et al. 2015). Korábbi tanulmányok és metaanalízis vizsgálatok is kimutatták, hogy a mPFC és a hippocampus térfogatcsökkenése összefüggésbe hozható poszttraumatikus stressz (PTSD) és a depresszív zavarok (MDD) kialakulásával, valamint a HPA-tengely diszregulációjával (Kino 2015, Belleau et al. 2018).

Az amygdaloid komplex szerepe

Az amygdala és a tágabban értelmezett amygdala (extended amygdala) egy heterogén magcsoport, melynek számos almagja közvetlen kapcsolatban áll a stresszt szabályozó területekkel (lásd 2. ábra). Bár ismert az amygdala neuronjainak fejlődéstani eredete és citoarchitektúrája, a mai napig is önkényesen alkotott felosztásokat használunk (Petrovich et al. 2001; McDonald és Mott 2017). Az amygdala vagy amygdaloid komplex 13 főbb magot tartalmaz, melyek tovább oszthatók almagokra (Sah et al. 2003). McDonald (1998) szerint patkányban három főbb magcsoport [basolateralis-, corticalis- (vagy kéregszerű) és centromedialis] alkotja az amygdalát.

Míg a basolateralis egysége főleg a motoros válaszáért felelős, a kéregszerű csoportja pedig a szaglásból származó információt integrálja és továbbítja, addig a harmadik centromedialis magcsoportja, mely tartalmazza a CeA a MeA és a BNST amygdaloid részét, már az integrált válasz továbbításáért és a visceralis információk feldolgozásáért felelős (Sah et al. 2003, Wilson et al. 2015, Fox et al. 2015).

A basolateralis magcsoport a lateralis, a basalis (vagy basolateralis – BLA) és az accessorius basalis magvakra oszlik; melyek az amygdala frontotemporalis magcsoportját képviselik (Sah et al. 2003). A basolateralis magok egyrészt a hippocampusból, az agranularis insularis, ventralis temporalis, az orbitofrontalis kérgi területekből valamint visceralis afferenciájú területekről kapnak információt. A basolateralis magcsoport efferens rostjai a striatumhoz, a somatomotoros rendszerekhez futnak, de kiemelendő a CeA-ba vetülő nagyszámú rost is (Petrovich et al. 2001).

Az amygdala corticalis magcsoportja a felszínre töremkedik és az agykéreghez hasonló szöveti szerkezettel bír. Itt találhatjuk az amygdala kérgi magjait továbbá a nucleus lateralis tractus olfactoriit. A magcsoport fő feladata a bulbus olfactoriusból és a bulbus-asszociált területekből származó információ fogadása és feldolgozása (Petrovich et al. 2001). Efferenseinek elsődleges célját hypothalamus magjai alkotják, de jelentős mennyiségű rost jut a MeA-ba is (Petrovich et al. 2001, Fox et al. 2015).

A centromedialis magok közül a CeA elsődleges bemenetei között találjuk a mPFC-t, az agranularis insularis cortexet és a subiculumot, de jelentős számú rostot kap más amygdala magokból és visceralis afferenciával rendelkező központokból (pl.: NTS, LC) is. A CeA főbb kimenetei között agytörzsi vegetatív magok (NTS, LC, DR) és a kiterjesztett amygdala egyéb magjai (pl. BNST) szerepelnek (Sah et al. 2003). A MeA ezzel szemben elsősorban a járulékos olfactorius kéregből gyűjt információt, és kimenetét főleg hypothalamus magjai

alkotják, így funkcionálisan a járulékos szaglókéreg pályarendszeréhez sorolhatjuk (Petrovich et al. 2001, Fox et al. 2015).

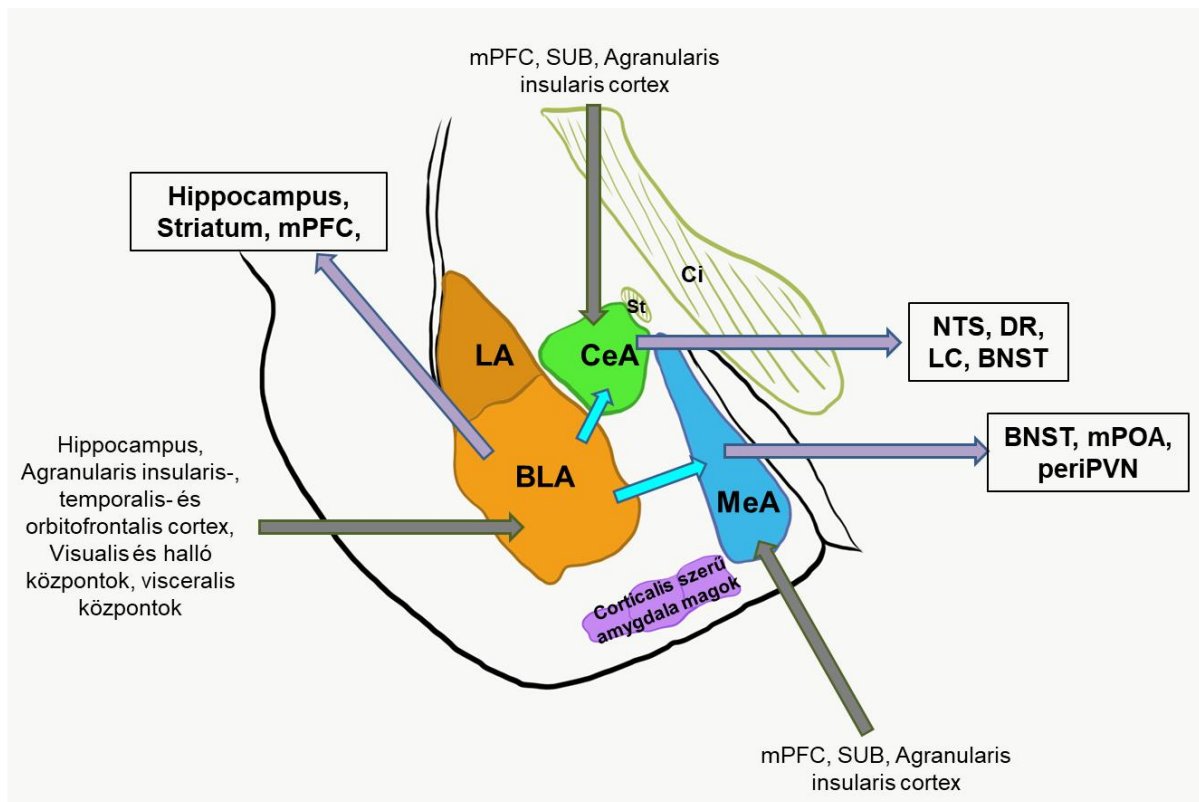
Az amygdala kapcsolatrendszerének köszönhetően integráló szereppel bír a stresszválasz kialakításában is, melyben kiemelt szerepet tulajdonítanak a CeA, a BLA és a MeA területeinek (2. ábra) (Herman et al. 2003, Herman et al. 2016).

A CeA nem rendelkezik közvetlen kapcsolattal a PVN-nel, de a NTS-en és a BNST fusiformis (BNSTfu) magján keresztül szabályozhatja a PVN-ben található CRF-tartalmú neuronok aktivitását (Herman et al. 2003). A CeA szelektív léziója csökkent szorongási szinthez, a depressziószerű viselkedésmintázat csökkenéséhez vezet (Kalin et al. 2004). A CeA kiirtása csökkent ACTH és CORT szekrécióval jár immobilizációs stressz (Beaulieu et al. 1986), félelem-kondicionálás (fear conditioning), valamint vizuális és akusztikus stimulusok esetén (Van de Kar et al. 1991, Feldman et al. 1994), továbbá csökken az interleukin-1 által a PVN CRF-tartalmú neuronjaiban kiváltott FOS válasz (Xu et al. 1999). Kétségtelen, hogy a CeA részt vesz a PVN neuronok CRF szintézisének és szekréciójának szabályozásában, azonban sok tanulmány mutatott rá, hogy a CeA aktivitása és reakciója stresszorszelektív és jelentősebb fiziológiai stressz (például citokin infúzió vagy vérzés) során, mint egy pszichogén stressz [légpuff, áramütés (footshock) és immobilizáció] alatt (Cullinan et al. 1995, Thiruvikraman et al. 1997, 2000, Herman et al. 2003, Callahan et al. 2013).

A MeA a CeA-hoz hasonlóan nagyon kevés direkt összeköttetéssel rendelkezik a PVN-nel, ugyanakkor sok más területtel (BNST, nucleus preopticus medialis, area preoptica medialis, periPVN) áll szoros kapcsolatban, melyek közvetlenül kihatnak a HPA-tengely működésére (Herman et al. 2003, Herman et al. 2016). A MeA rostjai, a CeA rostokhoz hasonlóan elsősorban GABA-ergiek és a HPA-tengely aktiválását feltehetően a PVN CRF sejtjeire ható gátlás gátlása révén érik el (Canteras et al. 1995, Herman et al. 2003). Utóbbi alátámasztja, hogy az area preoptica medialis vagy a BNST léziója, melyeken keresztül a MeA kapcsolatban áll a PVN-nel, csökkenti a MeA által kiváltott CORT választ (Feldman et al. 1990).

A BLA feladata feltehetően a hippocampus, mPFC és érző asszociációs területekről érkező információk integrálása és továbbítása más amygdala magvak (CeA, MeA) és vissza a hippocampus felé (LeDoux 2007). A CeA-val ellentétben a BLA-t olyan kiszámítható (várható) pszichogén stresszorok is jelentősen aktiválják (pl. immobilizáció, úsztatás, footshock), melyek elenyésző hatással bírnak a centromedialis magokban. Ugyanakkor a BLA válasza kisebb mértékű például erős fiziológiai stressz (citokin stimuláció) során (Cullinan et

al. 1995, Sawchenko et al. 2000). A BLA léziója esetén nem változik a CORT szekréciója vizuális, olfaktórius stimulus vagy restraint-, hideg- és éterexpozíció esetén (Feldman et al. 1994, Seggie et al. 1987). Ismert, hogy krónikus stressz (21 nap restraint) során a BLA piramis neuronjai dendritikus hipertrófiát mutatnak, mely szorongásszerű viselkedésmintázattal társult patkányokban (Vyas et al. 2006).



2. ábra: Az amygdala komplex és főbb, a stresszszabályozásban szerepet játszó kapcsolatai. Az ábra coronalis síkú (Bregma -2,8mm) patkány metszetet ábrázol (Paxinos és Watson 2007 alapján). A szürke nyilak az amygdala magok afferens kapcsolatait, a lila nyilak az amygdala magok efferens kapcsolatait, míg a türkizkék nyilak az amygdala magok egymás közötti összeköttetéseit mutatja. Alkalmazott rövidítések: mPFC- medialis prefrontalis cortex, mPOA- medialis preopticus area, BNST-nucleus interstitialis striae terminalis, SUB-subiculum, periPVN-GABAerg gátló gyűrű a nucleus paraventricularis körül, NTS- nucleus tractus solitarii, DR-dorsal raphe nucleus, LC-locus coeruleus.

A nucleus interstitialis striae terminalis szerepe

Az amygdala vagy amygdala komplex az előbb leírt három nagy magcsoportot foglalja magába, ugyanakkor Alheid és Heimer (1988) rámutattak, hogy az amygdala centromedialis magcsoportja kiterjed rostralisán és medialisán is és számos rostot küld a BNST magjai valamint a substantia innominata caudodorsalis területeihez és a pallidum ventralis része felé (Sah et al. 2003). Alheid szerint az amygdaloid komplexet kiegészítve az előbb leírt agyterületekkel helyesebb tágabban értelmezett, vagy „kiterjesztett” amygdalának nevezni (Alheid és Heimer 1988). Ugyanakkor Swanson és Petrovich (1998) rámutatott, hogy az amygdala felosztása önkényes az irodalomban és ebben a tekintetben ellentmondó adatok

szerepelnek forrásonként, ezért célszerűbb a funkcionális felosztást követni. Utóbbi funkcionális felosztás megközelítően egyezik az általunk is használt, és előzőleg bemutatott amygdaloid komplex felosztásával (Sah et al. 2003).

Mivel a CeA, a MeA és a BLA hatásukat almag-rendszereiken és a kiterjesztett amygdala magrendszerein keresztül is kifejtik a stressz során (Petrovich et al. 2001, LeDoux 2007), meg kell említenünk a BNST kapcsolatait és funkcióit a HPA-tengely szabályozásában.

A BNST az amygdala komplexhez hasonlóan bonyolult belső szerkezettel rendelkezik, melyeket két főbb csoportra oszthatunk: anterior és posterior BNST (Dong et al. 2001). A posterior divízióban találjuk többek között az intrafascicularis (BNSTif) és transversalis (BNSTtr) magokat. Az anterior BNST-t további lateralis és medialis magcsoportokra oszthatjuk. A lateralis magcsoportban, melyet anterolateralisnak is neveznek, találjuk az ovalis (BNSTov) és fusiform magokat (BNSTfu). A medialis csoport anteroventralis részében találjuk a dorsomedialis (BNSTdm), a dorsolateralis (BNSTdl), és a ventralis (BNSTv) magokat. A medialis csoport anterodorsalis része tartalmazza az anterodorsalis magokat (BNSTad) (Dong et al. 2001).

A BNST magjai főleg az amygdala komplexből kapják afferenciájukat: így a BNSTov és BNSTfu elsősorban a CeA-ból és a kéregszerű magok fő olfaktórius részéből; a BNSTv, BNSTdm, BNSTdl inkább a MeA-ból kapnak jelentősebb számú rostot (Dong et al. 2001).

A BNSTad, BNSTif, és BNSTtr sok GABA-erg rostot, míg a BNSTv és BNSTfu kisebb számú glutamaterg axont küld a PVN-hez, melyek így a HPA-tengely stresszválaszának modulálásában játszanak szerepet (Cullinan et al. 1993, Choi et al. 2007, 2008). Kiemelendő, hogy a BNSTov és a BNSTv (BNSTfu) neuronjai CRF peptidet is tartalmaznak (Ju et al. 1989, Choi et al. 2008, Ulrich Lai és Herman 2009, Kash et al. 2015). A BNST kettős szereppel bír a stressz szabályozásában. Posterior BNST léziója megnövekedett HPA-tengely aktivitással társul, míg az anterior BNST léziója a HPA-tengely aktivitásának csökkenésével párosul (Ulrich Lai és Herman 2009). A magrendszer dualitása egyrészt annak köszönhető, hogy különböző, ellentétes hatású neuromodulátorok [CRF, neuropeptide Y (NPY), enkephalin] és neurotranszmitterek (GABA, glutamát) által közvetíti az információt a PVN felé, másrészt efferenseinek direkt vagy indirekt kapcsolatával is magyarázható (Kozicz 2002, Herman et al. 2003, Kash és Winder 2006, Choi et al. 2007).

Agytörzsi stressz-asszociált központok

A limbikus rendszer és hypothalamus magok mellett több más agytörzsi struktúrák, mint a nucleus raphe dorsalis (DR), a központi projekciójú Edinger-Westphal (EWcp), a locus coeruleus (LC) és a NTS is aktívan részt vesz a HPA-tengely szabályozásában (Herman et al. 2003).

A DR afferenseit a CeA-ból, BNST magjaiból, area preoptica medialisból, EWcp-ből és hypothalamus magokból gyűjti össze (Peyron et al. 1998, Dos Santos Júnior et al. 2015). A kimenő elsődlegesen szerotonin (5-HT) tartalmú rostjainak főbb célpontjai a BLA, CeA, BNST, a mPFC valamint a periPVN (Herman et al. 2003, Fox és Lowry 2013, Paul és Lowry 2013). Az 5-HT rostok stimulálják a PVN működését és fokozzák a HPA-tengely aktivitását (Myers et al. 2017), továbbá az 5-HT neuronok léziója csökkenti a restraint stressz indukálta ACTH választ patkányban (Jorgensen et al. 1998).

A DR szerotoninerg neuronjai mellett fontos szereppel bír a nucleus Edinger-Westphal (EW) is. Az EW két fő részre osztható: egy cholinerg neuronokból álló preganglionáris EW (EWpg), és egy stressz asszociált peptiderg EWcp-ra (Kozicz et al. 2011). Míg cholinerg neuronjai a nervus oculomotorius parasympathicus preganglionáris rostjait alkotják, addig a peptiderg EWcp a központi (stressz) szabályozásban vesz részt (Gaszner et al. 2004, Kozicz et al. 2011). Az EWcp az extended amygdala magjaiból (CeA, BLA), a PVN-ből, a DR-ből és a LC is kap rostokat (da Silva et al. 2013). Efferens rostjai a DR szerotoninerg sejtjeihez, az extended amygdala magjaihoz (CeA, BNSTov) a PVN-hez és a NTS-hez és a septum lateralehoz húzódnak (Kozicz et al. 2011, Dos Santos Júnior et al. 2015). Az EWcp neuronjai elsősorban urocortin1 (Ucn1) valamint cocaine- és amphetamine-regulated transcriptet (CART) tartalmaznak (Vaughan et al. 1995, Koylu et al. 1998). Az urocortinerg neuronok FOS és Ucn1 tartalma fokozódik akut stressz során, ugyanakkor a neuronok fokozott aktivitását csak bizonyos stresszorok képesek kiváltani (restraint, lipopoliszacharid infúzió, éter expozíció, Gaszner et al. 2004). A génmódosított egerekben fokozott CRF expresszió az EWcp csökkent Ucn1 expressziójával társul (Weninger et al. 1999, Kozicz et al. 2004). Az Ucn1 feltehetően a HPA-tengely aktivitásának csökkentésében játszhat szerepet (Bale et al. 2000). Kísérletes adatok utalnak arra is, hogy az Ucn1 mellett a CART is részt vesz a stressz és a stressz indukált metabolikus folyamatok szabályozásában (Xu et al. 2014).

Az Ucn1 és 5-HT mellett a LC (A6 régió) és NTS adrenerg és noradrenerg sejtjei is hatással vannak a stresszválasz szabályozására (Myers et al. 2017). A LC számos afferentációval rendelkezik más stressz asszociált agyterületről, így a PFC-ből, CeA-ból, a laterális

hypothalamusból a BNST-ből és a DR-ból (McCall et al. 2015, Benarroch 2018). Efferensei behálózzák a somatosensoros és somatomotoros kérgi területeket, de rostjai húzódnak a hippocampushoz a mPFC-hez, amygdala magokhoz (BLA, CeA), az entorhinális cortexhez, thalamus magokhoz, hypothalamus magokhoz (PVNp, nucleus supraopticus) de neuronjai hálózzák be a bazális előagy cholinerg sejtjeit, a colliculus superiort és a cerebellumot is (Cunningham és Sawchenko 1988), Benarroch 2018). Továbbá, a LC efferensek futnak agytörzsi magokhoz (nucleus dorsalis nervi vagi, nucleus ambiguus) és gerincvelői parasympathicus (sacralis gerincvelő) és sympathicus (főleg gerincvelői preganglionaris neuronok) központokhoz (Benarroch 2018). Akut stresszhatás (pl. fájdalom, restraint) aktiválja az LC neuronjait (McCall et al. 2015, Myers et al. 2016). Léziója esetén csökken az akut restraint stressz okozta ACTH és CORT válasz (Ziegler et al. 1999). A LC szelektív (optogenetikai) stimulációja a CeA-CRF neuronokon keresztül szorongásos viselkedéssel társul, míg az LC neuronok gátlása megelőzi a stressz indukálta szorongásos viselkedés kialakulását (McCall et al. 2015).

Az NTS is tartalmaz olyan noradrenerg sejtpopulációt (A2 és C2 régiók), mely közvetlen kapcsolatban áll a HPA-tengelyt szabályozó PVNp-vel (Cunningham és Sawchenko 1988). Az NTS afferenseket kap a mPFC, hypothalamus magok (nucleus paraventricularis, nucleus arcuatus, posterolateralis magok), extended amygdala magok (BNST, CeA) területeiről (van der Kooy et al. 1984, Roozendaal et al. 1999). Efferens noradrenerg (adrenerg) rostjai közvetlenül a PVNp-hez, CeA-hoz, BLA-hoz, és a BNST ovalis és fusiform magjaihoz húzódnak (Riche et al. 1990, Ghosal et al. 2014, Rinaman 2011). Noradrenerg neuronjai (α_1 receptorokon keresztül) stimulálják a PVN CRF-tartalmú neuronjait és ezzel együtt a HPA-tengely működését (Liposits et al. 1986, Rinaman 2011). Az NTS neuronok aktivitása ugyanakkor stresszor függő: a noradrenerg pálya léziói csökkent HPA válasz kíséri éter expozíciót követően; viszont a lézió nem csökkentette a HPA választ restraint során (Herman et al. 2016). Az LC-vel ellentétben az NTS krónikus stressz szabályozásában is szerepet játszik (Ghosal et al. 2014): krónikus stressz során megnövekszik a CRF neuronokon végződő noradrenerg rostok száma (Flak et al. 2009, Myers et al. 2017).

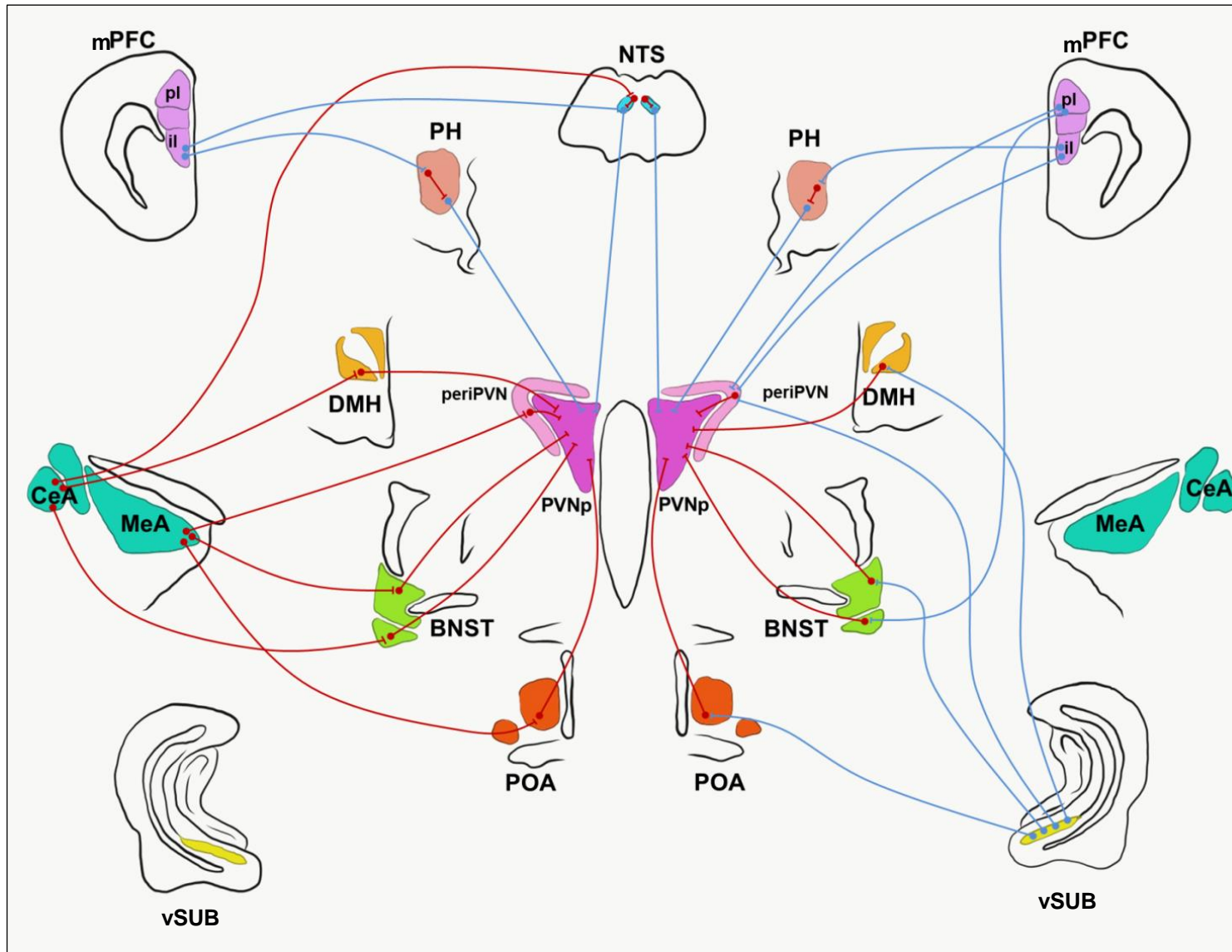
A nucleus paraventricularis hypothalami szerepe és kapcsolatai

A nucleus paraventricularis hypothalamit két fő rész, egy parvocellularis (PVNp) és egy magnocellularis (PVNm) divízió alkotja. Ugyanakkor a PVN felosztható funkcionálisan négy régióra (zónára): regio magnocellularis posterior (PVNpm), regio parvocellularis medialis

(PVNmpd), regio parvocellularis ventromedialis (PVNmpv) és regio dorsalis parvocellularis (PVNdp) (Kiss 1988, Herman et al. 2002). A PVNmpd hypophyseotrop neuronjai az eminentia medianához projiciálnak, ahol elsősorban CRF-t, vasopresszint és thyrotropin-releasing hormont szekretálnak (Kiss 1988, Whitnall 1993, Merchenthaler és Liposits 1994), ezen felül a parvocellularis neuronok számos egyéb hírvivő neuropeptidet (vasoactiv intestinalis peptid, cholecystokinin, substance-P, angiotensin II, enkephalin, somatostatin, neurotensin) is elválasztanak (Sawchenko et al. 1984, Kiss 1988). A PVNpm neuronok főleg oxitocint és vasopresszint szekretálnak közvetlenül a szisztémás keringésbe (Swanson és Sawchenko 1983), de a neuronokban kimutatható enkephalin, cholecystokinin, dynorphinok és galanin is (Kiss 1988). A PVNmpv, PVNdp és a PVNmpd ventralis területének oxitocinerg neuronjai főleg agytörzsi és gerincvelői vegetatív központokhoz projiciálnak (Swanson és Sawchenko 1983).

A PVNp rostokat kap közvetlenül az NTS-ből a raphe magvakból (DR), az EWcp-ből, hypothalamus magokból (periPVN, nucleus dorsomedialis hypothalami, area preoptica medialis, nucleus arcuatus, és a nucleus mammillaris ventralis), a BNST és a thalamus magjaiból is (Herman et al. 2003, Kozicz et al. 2011, Romeo et al. 2016). Továbbá az amygdala, a mPFC és a hippocampus közvetetten, elsősorban a periPVN és BNST-n keresztül, szabályozzák a HPA-tengely aktivitását (3. ábra). A PVN számos összeköttetése reciprok kapcsolat, melynek révén a PVN önmaga is részt vesz a stresszadaptáció extrahypothalamicus központjainak szabályozásában (Hsu et al. 2014, Zhang et al. 2017).

A PVN afferensei között sok GABA-erg (periPVN, BNSTad, hypothalamus magok), és glutamáterg (BNSTov, BNSTfu, hypothalamicus magok, NTS) rost is van, de számos egyéb molekula, neurotranszmitter és neuropeptid is részt vesz a PVN neuronok szabályozásában. Az extended amygdala CRF, a nucleus arcuatus NPY és agouti-related peptid, az EWcp Ucn1, a NST adrenerg, noradrenerg, glukagon like peptid 1, a DR 5-HT neuronjai hozzájárulnak a CRF neuronok működésének szabályozásához (Hanson et al. 1995, Herman et al. 2003, Romeo 2010, Herman et al. 2016). De más peptidek, mint az adenylate cyclase-activating polypeptide (Grinevich et al. 1997, Kageyama és Suda 2009, Kormos et al. 2016) és neuropeptid S (Smith et al. 2006) is fokozzák a HPA-tengely aktivitását a PVN neuronokon keresztül.

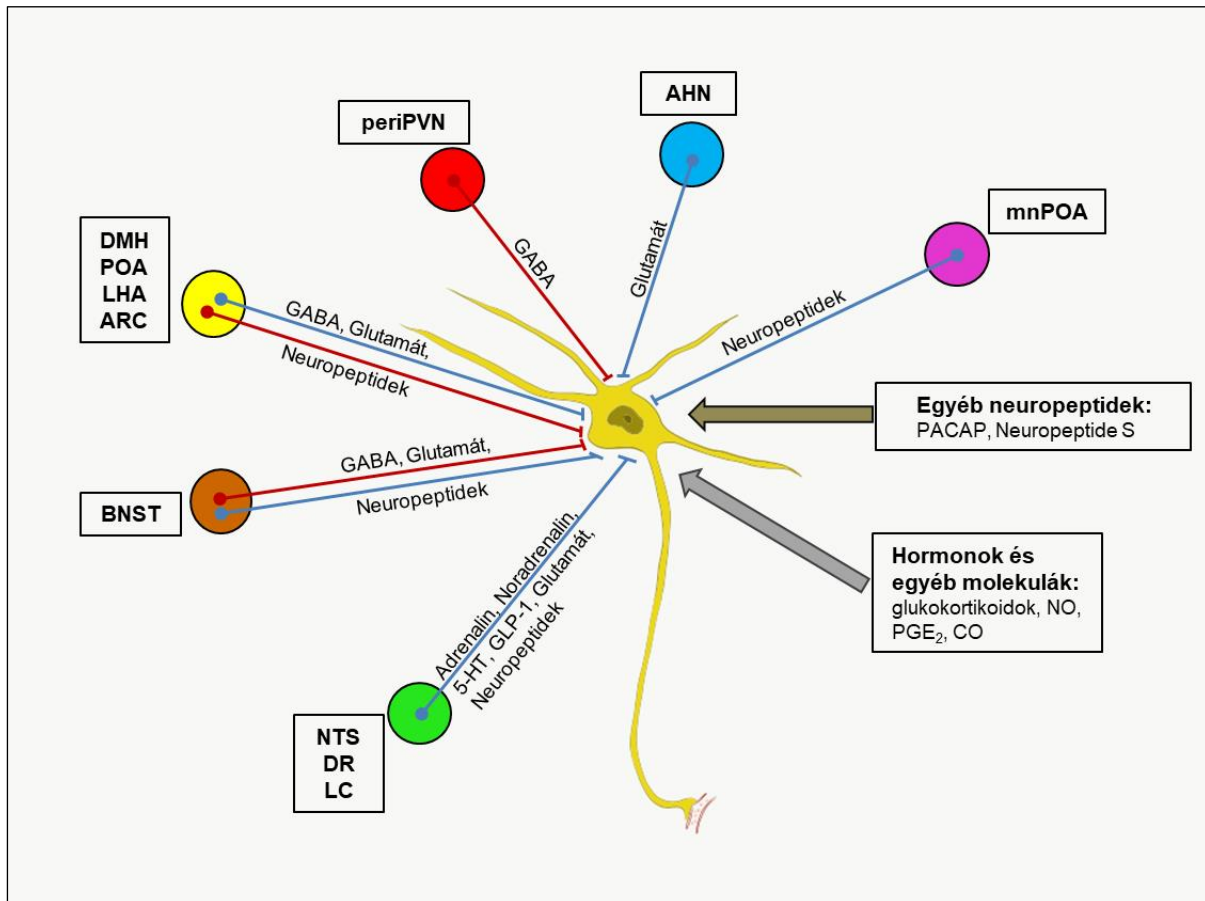


3. ábra: A PVNp főbb afferens kapcsolatai Herman és munkatársai (2016) nyomán. A kék neuronok a stimuláló (excitatoricus), míg a piros neuronok a gátló (inhibitoros) kapcsolatokat tüntetik fel.

Az ábra bal oldalán látható a PVNp aktivációjának szabályozása, melyet elsősorban a gátlósejtek (DMH, periPVN, BNST, POA, NTS) gátlásával érik el a magasabb rendű központok (CeA, MeA). Az ábra jobb oldalán a PVNp gátlása látható, mely az ide vetülő gátló (periPVN, DMH, BNST, POA) neuronok stimulációja révén következik be.

Alkalmazott rövidítések: mPFC-medialis prefrontalis cortex; pl-prelimbikus, il-infralimbikus; POA-preopticus area, BNST-nucleus interstitialis striae terminalis; DMH-dorsomedialis hypothalamus, PH-posterior hypothalamus, vSUB-ventralis subiculum, MeA-nucleus medialis amygdalae, CeA-nucleus centralis amygdalae, NTS-nucleus tractus solitarii.

A PVN CRF-tartalmú neuronjainak működését két további jelentős tényező is meghatározza. A CRF neuronok glukokortikoid receptorain a glukokortikoidok közvetlenül, a gyors feedback révén gátolják a CRF szekréciónak, és a HPA-tengely aktivitását (Herman et al. 2003, 2016, de Kloet et al. 2018). Emellett ismert, hogy számos más hírvivő molekula (nitrogén-monoxid, prosztaglandin E2, és szén-monoxid) parakrin módon is részt vesz a CRF neuronok működésének szabályozásában (lásd 4. ábra) (Herman et al. 2003). Végezetül, gliasejtek is módosítják a PVN CRF-tartalmú sejtjeinek működését (Herman et al. 2003).



4. ábra: A PVNp CRF expresszáló neuronjainak főbb szabályozó mechanizmusai (Herman és munkatársai alapján 2003). A kék szimbólum az aktiváló, a piros a gátló neuronokat ábrázolja. A zöld nyíl az egyéb neuropeptidek duális (serkentő és gátló) hatását, a szürke nyíl egyéb molekulák és hormonok hatását szemlélteti. Alkalmazott rövidítések: mnPOA-nucleus preopticus medianus, POA- area preoptica, BNST-nucleus interstitialis striae terminalis, AHN- nucleus hypothalamicus anterior, ARC- nucleus arcuatus, LHA- area hypothalamica lateralis, DMH- nucleus dorsomedialis hypothalami, periPVN- GABAerg gátló gyűrű a PVN körül, NTS- nucleus tractus solitarii, DR- nucleus raphe dorsalis, LC- locus coeruleus, GABA- gamma-amino vajsav, 5-HT-serotonin, GLP-1-glukagon like peptide-1, PACAP- pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, PGE₂-prostaglandin E2, NO-nitrogén-monoxid, CO-szén-monoxid.

A PVN számos efferenst küld a BLA, CeA, BNST, ilPFC, a septum laterale, a cortex entorhinalis, a nucleus accumbens, a DMH, és nucleus suprachiasmaticus felé (Hsu et al. 2014). Emellett további, elsősorban oxitocinerg efferensek húzódnak a vegetatív agytörzsi (NTS, DR, LC, nucleus parabrachialis, nucleus dorsalis nervi vagi) és gerincvelői központok

(nucleus intermediolateralis) felé (Swanson és Kuypers 1980, Sawchenko és Swanson 1982, Luiten et al. 1985, Kiss 1988). Míg előbbi a központi stresszválasz kialakításában játszik szerepet, utóbbi kapcsolatai révén a PVN közvetlenül szabályozza a SAM-tengelyt (Ulrich Lai és Herman 2009).

Összefoglalva, a PVN összetett kapcsolatrendszerévé, mint integrációs központ és a HPA-tengely kiindulópontjaként kritikus jelentőséggel bír a stresszfolyamatok szabályozásában.

2.3. A CRF peptidcsalád és receptoraik

A CRF 41 aminosavból álló neuropeptid, amely az emlősök négytagú CRF peptid családjába (CRF, Urocortin1, Urocortin2, Urocortin3) tartozik. Jelenlétüket a szervezet számos szövetében megfigyelték, de a peptidcsalád tagjai közül a CRF található meg legnagyobb mennyiségben a központi idegrendszerben (Deussing és Chen 2018). A CRF expressziót a bulbus olfactoriusban, a neocortexben, a nucleus accumbens shell régiójában, a hippocampus gátló interneuronjaiban, a CeA-ban, a BNST magokban (BNST_{fu}, BNST_v, BNST_{ov}); PVN-ben továbbá az agytörzsben a Barrington-magban, a nucleus dorsolateralis tegmentalisban, a nucleus parabrachialisban és a nucleus olivaris inferiorban (Merchenthaler et al. 1982, Swanson et al. 1983) írták le.

Ezzel szemben az Ucn1 kevésbé diffúz eloszlást mutat a központi idegrendszerben, jelenlétét megerősítették az EWcp-ben, a nucleus supraopticusban, nucleus olivaris superior pars lateralisban (Kozicz et al. 1998, Deussing és Chen 2018). Az Ucn2 jelenléte csak mRNS szinten bizonyított a PVN-ben, nucleus supraopticusban, nucleus arcuatus LC és néhány somatomotoros agytörzsi magban (V, VII, XII) valamint a gerincvelő ventralis szarvában (Reyes et al. 2001). Az Ucn3 megtalálható a nucleus preopticus medianusban, a MeA-ban, a hypothalamus (perifornikális terület) és a hallórendszer agytörzsi magjaiban. Ismert, hogy az Ucn3 rostok eloszlása nagymértékben hasonlít a CRF2R-t expresszáló sejtek elhelyezkedésére (Li et al. 2002, Deussing et al. 2010).

A CRF peptidcsalád tagjai a sejtekben a G-proteinekhez kapcsolt receptorokon (CRFR) fejtik ki hatásukat. Az élővilágban három típusú CRFR (CRF1R, CRF2R, CRF3R) ismert, azonban a CRF3R jelenléte csak halakban bizonyított (K. Van Pett et al. 2000, Deussing és Chen 2018).

A CRF1R számos területen megtalálható a központi idegrendszerben, így a szaglóagyban (bulbus olfactorius, tuberculum olfactorium, cortex piriformis), kérgi struktúrák IV-es laminájában, hippocampusban, BNST-ben, basalis ganglionokban, thalamusban, nucleus

ruberben, hypothalamus magokban, a periaqueductalis szürkeállomány területén, a nucleus pedunculopontinusban és számos más agytörzsi magban is (Van Pett et al. 2000, Kostich et al. 2004). A központi idegrendszeren kívül is megtalálható a CRF1R, itt kiemelendő az adenohypophysis, ahol a receptor az ACTH szekréciójáért felel (Deussing és Chen 2018). A CRF1R-hoz nagy affinitással kötődik a CRF és kisebb affinitással az Ucn1. Hatása a receptorhoz társuló G-protein (s,q,i) típusától függ, így számos celluláris jelátviteli folyamat megindításáért felel, de a CRF1R aktivációja összességében a HPA-tengely aktivitását fokozza (Deussing és Chen 2018).

A CRF2R jelenlétét a nucleus lateralis septiben, a ventromedialis hypothalamusban, nucleus mammillarisban, és a raphe magvakban írták le (K. Van Pett et al. 2000). A CRF2R receptorokhoz az Ucn1, Ucn2 és Ucn3 kötődik nagy affinitással, maga a CRF nagyságrendekkel kisebb affinitást mutat ezekhez receptorhoz (Deussing és Chen 2018). A CRF2R teljes hiánya egérben fokozott stresszválaszhoz, és megnövekedett szorongásos tünetekhez társul (Bale et al. 2000), amely arra utal, hogy a CRF2R fontos szereppel bír a stresszválaszban, elsősorban az annak leállítását eredményező folyamatok szabályozásában.

2.3.1. A centrális CRF rendszer, stressz és hangulatzavarok kapcsolata

A génmódosított egereken és patkányokon végzett vizsgálatok sok értékes eredményt szolgáltattak a CRF rendszer és HPA-tengely működéséről (Muglia et al. 1995, Smith et al. 1998, Regev et al. 2011, Zhang et al. 2017).

A CRF génkiütött (KO) egerek csökkent HPA-tengely aktivitást mutatnak (Muglia et al. 1995), mely látszólag nincs hatással az állatok viselkedésére (Weninger et al. 1999). Ezzel ellentétben, a CRF fokozott expressziója egerekben megemelkedett szorongási (Stenzel-Poore et al. 1994) és bazális CORT szinttel jár (Dirks et al. 2002, Groenink et al. 2002). A CRF fokozott expresszióját ugyanakkor az Ucn1 csökkent kifejeződése kíséri az EWcp területén (Kozicz et al. 2004).

A CRF1R teljes hiánya csökkent stressz indukálta szorongásos tünetekkel társul egérben (Smith et al. 1998, Timpl et al. 1998), míg a CRF2R kiütése az állatok fokozott szorongásával járt és megnövekedett HPA-tengely aktivitással társult (Bale et al. 2000).

Lentivírus által indukált fokozott CRF expresszió a CeA-ban csökkenti a stressz okozta szorongást egerekben (Regev et al. 2011). Ezzel szemben, a vírus indukált fokozott CRF expresszió a BNSTov-ban emelte az állatok depresszió szintjét (Regev et al. 2011). Ugyanakkor, patkányban a CeA-ban indukált fokozott CRF expresszió megnövekedett

szorongási szinttel és kifejezettebb depressziószerű viselkedés mintázattal társul (Flandreau et al. 2012, Li et al. 2014).

Zhang és munkatársai (2017) olyan genetikailag módosított egeret hoztak létre, melyben a *crf* gént a PVN neuronokban ütötték ki. Vizsgálataik során megállapították, hogy a hypothalamicus CRF hiánya csökkenti a HPA-tengely aktivitását és a stresszválaszt egerekben, amely csökkent stressz indukálta szorongásos állapottal társul, még CORT szubsztitúciós kezelés mellett is (Zhang et al. 2017). Utóbbi arra utal, hogy a PVN reciprok kapcsolatai révén (BNST, MeA, CeA, NTS, LC) is aktívan részt vesz a szorongásos állapotok létrehozásában és fenntartásában (Hsu et al. 2014, Zhang et al. 2017).

2.4. Neurális aktivációs markerek szerepe a stressz vizsgálatában

2.4.1. A FOS fehérje család

A neuronok aktivitásának funkcionális-morfológiai vizsgálatára gyakran alkalmazott módszer az azonnali gének (angolul *immediate early gene*; IEG) kifejeződésének mérése. Ez a semi-quantitatív vizsgálat lehetővé teszi, hogy vizualizáljuk a neurális aktivitás fokozódását (Kovács 1998, 2008). A Jun/Fos proto-onkogén család tagjainak expresszióját vizsgálják a leggyakrabban. Ezek a gének a FOS transzkripciós faktorokat kódolják, melyek fehérje termékei a FOS, FOSB, Fra1, Fra2 heterodimert képeznek a Jun fehérjecsalád (c-Jun, JunB vagy JunD) tagjaival és kialakítják az aktivátor protein1-komplex (AP-1) transzkripciós faktort. Az AP-1 kötőhelye számos gén promóter régiójában fellelhető, így az számos celluláris folyamatot a génexpresszió szintjén befolyásolhat (Senba and Ueyama 1997, Kovács 1998, 2008).

A talán leggyakrabban alkalmazott akut neuronális aktivációs marker a FOS. Csupán percekkel a stimulus alkalmazása után már megfigyelhető *c-fos* neuronális válasz mRNS szinten (Kovács 2008). Fehérje szinten a FOS válasz két órával a stimulus után éri el a maximumát, (Kovács 2008), majd 4-6 óra múlva visszatér a nyugalmi expressziós szintre (Sonnenberg et al. 1989).

A fehérjecsalád másik tagja a FOSB, melynek transzkripciója és translációja a stimulust követően szintén megnövekszik, hozzájárulva az idegsejtek génexpresszió szintű adaptációjához (Sonnenberg et al. 1989). A FOSB a FOS-szal összehasonlítva lassúbb expressziós dinamikával rendelkezik (Morgan és Curran 1989), féléletideje is hosszabb, mintegy 9,5 óra (Kovács 1998). A FOSB egyik splice variánsa, a Δ FOSB, még elnyújtottabb

dinamikát mutat, így az hosszabb idő (napok) múlva is kimutatható a sejtmagban (Nestler 2008). A FOSB és FOS fehérjék stimulus indukálta expressziója csökken ismételt ingerhatást követően, és szintjük végül normalizálódik (Nestler 2008). Ezzel ellentétben, a Δ FOSB izoformái napokkal a stimulus után is kimutathatóak, továbbá az ismétlődő stimulusok (pl. stressz expozíció) a Δ FOSB jelentős akkumulációjához is vezethet, ha a felhalmozódás mértéke gyorsabb, mint az eliminációé (Nestler 2008, 2015). Így a Δ FOSB kiváló indikátora a krónikus környezeti hatások (pl. stressz, ismételt gyógyszer adminisztráció) hosszútávú neurális aktivitásának követésére (Nestler et al. 1999, Perotti et al. 2004).

2.4.2. A FOS fehérjék és a stressz kapcsolata

A *fos*-gének transzkripciójának és translációjának követése széles körben használt módszer, melyet sikeresen alkalmaznak gyógyszerhatások, gyógyszerfüggőség, alkoholfogyasztás és dependencia által kiváltott neurális aktivitásának követésére (Nestler 2008, 2015, Fu et al. 2017), alkalmas továbbá funkcionális pályarendszerek aktivációjának vizsgálatára (Reisch et al. 2007). A FOS immunjel mértékét különböző stresszhatások vizsgálatára és a neurális aktivitás térképezésére is gyakran alkalmazzák (Kovács 1998, Kovács 2008, Nestler 2008).

Számos akut stresszor, így éterexpozíció, forced swim teszt, akut immobilizáció (restraint), emelt keresztpalló teszt, ragadozó állat szaganyagának történő expozíció vezethet a központi idegrendszerben FOS aktivációhoz (Cullinan et al. 1996, Figueiredo et al. 2003b, Gaszner et al. 2004, Sterrenburg et al. 2011, Grahn et al. 2018). Az egyik leggyakrabban alkalmazott akut stresszmodell az ún. akut restraint stressz (ARS), melynek során az állatot egy perforált műanyag csőbe zárják annak érdekében, hogy mozgásszabadságát jelentősen korlátozzák (Gaszner et al. 2004, Romeo et al. 2006, Sterrenburg et al. 2012).

A PVN, az extended amygdala magjai (CeA, MeA, BLA, BNST magok), és több agytörzsi struktúra (pl. EWcp, DR) is szignifikánsan emelkedett FOS aktivitást mutat akut stressz hatások, köztük ARS során is (Kellogg et al. 1998, Chowdhury et al. 2000, Gaszner et al. 2004, 2012, Ryabinin és Weitemier 2006, Bouwknecht et al. 2007, Rouwette et al. 2011, Keshavarzy et al. 2015).

Számos krónikus stresszhatás (krónikus restraint stressz, krónikus kiszámíthatatlan stressz, krónikus social defeat stressz, krónikus gyógyszerfüggőség) megnövelheti a neuronok FOSB/ Δ FOSB tartalmát (Nestler 2015, Vialou et al. 2015). Ismert, hogy a krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) során megemelkedett a Δ FOSB aktivitása az EWcp, PVN, és extended amygdala magjaiban (Sterrenburg et al. 2011, de Andrade et al. 2014). Kimutatták, hogy a

Δ FOSB aktivitásának emelkedése a CRF tartalmú agyterületeken, a PVNp-ben, BNSTov-ban és BNSTfu-ban (Sterrenburg et al. 2011) is megfigyelhető. A Δ FOSB kimutatható volt a CeA idegsejtjeiben is, de ezen sejtek Δ FOSB aktivitása nem változott a krónikus stressz expozíció során (Sterrenburg et al. 2011).

2.5. Az életkor hatása a stresszválaszra

Az életkor előrehaladtával számos szerv és szervrendszer működése megváltozik, beleértve a HPA-tengely stresszválaszát is (Romeo et al. 2010, Koenig et al. 2011). A HPA-tengely (ACTH és CORT) válasza, továbbá a PVN FOS és CRF reaktivitása stressz során nagymértékben függ az életkortól (Sapolsky 1992, Lupien et al. 2005, Romeo et al. 2006, Koenig et al. 2011, Wulsin et al. 2016).

A patkány életének első két hetét az úgynevezett stressz hyporesponsive periódus (SHRP) jellemzi. SHRP során a HPA-tengely alacsony aktivitást és stressz érzékenységet mutat, melyet csökkent CORT válasz jellemez (Walker et al. 1991, Levine 1994, Smith et al. 1997). SHRP alatt a stresszexpozíció megnöveli a CRF mRNS expresszióját a PVN-ben, de azt sem az ACTH sem a CORT szekréció növekedése nem kíséri. Ezzel ellentétben, a SHRP-t követően a 20. postnatalis nap után az állatok stresszválaszát már megnövekedett PVN FOS reaktivitás és erőteljes HPA-tengely aktiváció jellemzi (Smith et al. 1997, Dent et al. 2000).

Újabb változást a stresszrendszer működésében a pubertáskor hoz. A CRF aktivitása magasabb ARS expozíció hatására a prepubertás korú patkányokban, mint fiatal felnőtt patkányokban (Romeo et al. 2006). A prepubertás állatok akut stressz expozíciót követően elnyújtottabb CORT válasszal reagálnak a felnőtt állatokhoz képest (Romeo et al. 2006, McCormick et al. 2010). Prepubertás korú patkányokban akut restraint stressz után a PVN FOS válasza gyorsabban épül fel, mint azt fiatal felnőtt állatokban tapasztalták. A FOS immunreaktivitás mértéke a stressz expozíció kezdetét követő 30. percben magasabb a prepubertás állatokban (Romeo et al. 2006). Ugyanakkor a prepubertás és a fiatal felnőtt állatokban a FOS válasz dinamikájának összehasonlítása azt mutatta, hogy az akut restraint expozíciót követő 45. percben a sejtek FOS aktivitása már megegyezik a két korcsoportban (Romeo et al. 2006).

Az idős korban ismét változik a HPA-tengely működése. 21-23 hónapos hím Lewis patkányok megnövekedett stresszszenzitivitást és FOS expressziót mutatnak a fiatal felnőtt egyedekhez képest (Meyza et al. 2007). A bazális CORT szint emelkedését időskorban – a közép- és fiatal korú egyedekhez viszonyítva – több fajban is megerősítették (Lupien et al.

2005, Koenig et al. 2011). A CRF expresszió vizsgálatok eredményei már nem ennyire egybehangzóak: egyes tanulmányok leírták, hogy a CRF kifejeződése a korral csökken (Cizza et al. 1994), vagy nem változik jelentősen (Herman et al. 2001), de több adat is utal arra, hogy a CRF mennyisége a korral növekszik (Khlebnikov et al. 2015, Tenk et al. 2017).

Még kell jegyezni, hogy mindössze néhány tanulmány vizsgálta a FOS korfüggő dinamikáját. Az eredmények rendkívül ellentmondásosak, melyet a csak kevés, rendszerint mindössze kettő és többnyire kis elemszámú (n=6) korcsoport összehasonlítása magyarázhat (Kellogg et al. 1998, Romeo et al. 2006, Meyza et al. 2007).

Még kevesebb tanulmány vizsgálta a kor és krónikus stressz együttes, egymást erősítő kölcsönhatását állatokban, de az ismert, hogy a pubertás korú nőtény patkány krónikus variábilis stressz során megemelkedett CRF mRNS szinttel válaszol, mely nem, vagy alig mutatható ki felnőtt egyedek esetében (Wulsin et al. 2016). A vizsgálat továbbá megerősítette, hogy a krónikus variábilis stressz megemelte a pubertás korú nőtény állatok CORT szintjét, és kis mértékben csökkentette a felnőtt csoport CORT titerét.

3. Célkitűzések, feltételezések

3.1. Az akut stresszben megjelenő FOS aktiváció mértéke változik az életkorral

Néhány irodalmi forrás adatai alapján (Kellogg et al. 1998, Romeo et al. 2006, Meyza et al. 2007) azt feltételeztük, hogy a FOS kifejeződése akut (restraint) stressz expozíciót követően a stressz szabályozásában szerepet játszó agyterületeken függ az életkortól. Nem találtunk azonban az irodalomban átfogó, a teljes élettartamot felölelő tanulmányt az akut stresszre adott FOS válasz mértékéről patkányban. Ezért azt a célt tűztük magunk elé, hogy nyolc korcsoportban (1; 1,5; 2; 3; 6; 12; 18 és 24 hónapos) teszteljük az ARS hatását a FOS immunreaktivitás és a HPA-tengely aktiválódásának mértékére. Feltételezésünk az volt, hogy a HPA-tengely és 12, a stressz adaptációban közreműködő kiválasztott agyterület (PVNp, PVNm, MeA, CeA, BLA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, BNSTv, BNSTfu, EWcp, DR) FOS immunreaktivitása korfüggő dinamikát mutat. További célunk volt az elsődleges somatosensoros kéreg (barrel cortex- S1) FOS tartalmának vizsgálata. E terület kiválasztását két érv is indokolja. Egyrészt az általunk használt ARS modellben a terület aktivációja feltételezhető volt, mivel a patkány bajszának ingerlése a restraint során előidézi a FOS aktivációját. Másrészt a terület nem játszik a stressz adaptációban közvetlen, fontos szerepet. Azt feltételeztük, hogy az itt fellépő FOS válasz dinamikája eltérést mutat a stressz érzékeny régiókban tapasztaltakéhoz képest.

3.2. A CRF tartalmú idegsejtek akut és krónikus stresszben a korrall változó aktivációs dinamikát mutatnak

Az első hipotézis vizsgálata során nyilvánvalóvá vált, hogy számos agyterületen a korrall változik a FOS aktiváció mértéke. A korfüggést mutató agyterületek közé tartoztak azok a régiók is, amelyek CRF expresszáló idegsejteket is tartalmaznak (PVN, BNSTov és CeA). Ennek alapján, azt a célt tűztük ki, hogy bemutassuk a CRF tartalmú sejtek akut aktivációs mintázatát a fent részletezett nyolc korcsoport összehasonlítása révén a FOS és FOSB markerek segítségével. A CRF sejtek az akut, és a krónikus stresszadaptációban is fontos szerepet játszanak, így a kísérleti elrendezést a CVMS modellel hat korcsoport bevonásával egészítettük ki azzal a céllal, hogy felmérjük a CRF neuronok krónikus neuronális aktivációjának korrall változó dinamikáját. Feltételezésünk az volt, hogy a CRF neuronok krónikus aktivációja (Δ FOSB) életkor függő dinamikát mutat a PVN, BNSTov és CeA területén.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Kísérleti állatok

A teljes program során 190 hím Wistar-R Amsterdam patkányt használtunk fel, melyeket a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Anatómiai Intézetének állatházában tenyésztettünk. Az állatokat standard polikarbonát ketrecekben (40x25x20cm) 2-3 állat/ketrec csoportokban, állandó semleges környezeti hőmérsékleten (24°C) és páratartalomban tartottuk. Az állattartó helyiségek megvilágítása 12 órás éjjel/nappal ciklusban változott, melyben a fényviszonyok átkapcsolása 6, illetve 18 órakor történt. Patkányaink szabadon hozzáfértek standard rágcsálótáphoz és ivóvízhez. Az állatokat két külön kísérletben vizsgáltuk. Kísérleteinket a Pécsi Tudományegyetem Állatetikai Bizottsága engedélyezte (engedély száma: BA02/2000-25/2011) az állatok védelméről szóló 1998. évi XXVIII törvény alapján, figyelembe véve Európai Közösség Tanácsa 1986. november 24-én kelt irányelvét és a Helsinkii Deklarációt is. Mindezek mellett mindent megtettünk annak érdekében, hogy minimalizáljuk a felhasznált állatok számát, és hogy a lehető legkevesebb szenvedést okozzuk az állatoknak.

4.1.1. A főbb stressz-adaptációs központok FOS aktivációjának térképezése az ARS modellben

Ebben a kísérletben 73 állatot osztottunk 8 korcsoportba. Minden korcsoportban egy kontroll és egy ARS csoportot hoztunk létre az 1. táblázatban foglaltak szerint.

Csoportok		Testtömeg (g)	N (db)
Kor	Stressz kondíció		
1 hónap	Kontroll	77.4 ±4.49	5
	ARS	76.8 ±4.38	4
1,5 hónap	Kontroll	152.2 ±5.60	5
	ARS	153.6 ±2.89	5
2 hónap	Kontroll	262.6 ±7.78	5
	ARS	263.6 ±5.97	5
3 hónap	Kontroll	381.2 ±7.12	5
	ARS	389.5 ±10.08	5
6 hónap	Kontroll	407.2 ±15.88	5
	ARS	402.6 ±7.67	5
12 hónap	Kontroll	527.5 ±16.21	4
	ARS	523.75 ±11.04	4
18 hónap	Kontroll	547.0 ±10.90	4
	ARS	547.75 ±13.30	4
24 hónap	Kontroll	510.75 ±10.88	4
	ARS	508.5 ±8.92	4

1. táblázat: Az akut restraint stressz (ARS) által kiváltott FOS aktiváció korfüggésének vizsgálata. A táblázat a kísérleti állatok életkorát, testtömegét (g) és a csoportok elemszámát (N) (darab, db) foglalja össze. Az ARS csoportban az állatokat 60 perces restraint stressznek tettük ki. A kontroll állatokat zavartalanul hagytuk a ketreceikben a perfundálásig. A testtömeg adatok a csoportok átlagát és az átlagok standard hibáját mutatják, grammban.

Az ARS csoportokat 60 perces akut restraint stressznek tettük ki. Az állatokat reggel 8 és 9 óra között az általunk készített perforált, kónuszos, az állat orrának megfelelő végén nyílással rendelkező műanyag hengerbe helyeztük. A hengerek méretét úgy határoztuk meg az előkísérletek során, hogy azokban az állat ne legyen képes megfordulni, de szabadon tudjon lélegezni. Korcsoporttól függően az egy hónapos állatokat 30 mm, a másfél hónaposokat 35 mm, a 2 hónaposokat 40 mm a 3 hónaposokat és az ennél idősebbeket 45 mm-es átmérőjű hengerben stresszeltük. A patkány behelyezése után az állat mögötti teret a csőben vattával töltöttük ki, hogy se megfordulni, se hátrálni ne legyen képes. A 12, 18 és 24 hónapos állatok

esetében nem használtunk vattát, mert a hely kitöltésére az állatok mérete miatt nem volt szükség. A műanyag cső végét ragasztószalaggal rögzítve zártuk le. Egy óra elteltével az állatokat kivettük a restrainer-ből és visszahelyeztük saját ketrecükbe egy órára. Végül a stressz megkezdésétől számított két óra elteltével perfundáltuk a patkányokat.

A minták tárolásából adódó hibák megelőzése érdekében (figyelembe véve az állatház kapacitását) a patkányokat úgy tenyésztettük, hogy az állatok egy viszonylag rövid időintervallumban (egy hónap) érjék el a kívánt életkort. Így első körben a 2, 3, 6, és 24 hónapos állatokat öltük le, majd egy hónappal később perfundáltuk az 1, 5, 12 és 18 hónapos egyedeket.

4.1.2. ARS és CVMS modell a PVN, CeA és BNSTov CRF neuronjainak korfüggő aktivációjának vizsgálatára

A második kísérletünkbe összesen 127 állatot vontunk be a 2. táblázat szerint.

Csoportok		Testtömeg (g)	N (db)
Kor	Stressz kondíció		
1 hónap	Kontroll	60.03 ±3.54	6
	ARS	65.18 ±5.01	6
1.5 hónap	Kontroll	156.32±5.81	6
	ARS	156.98±9.16	6
2 hónap	Kontroll	320.83±25.19	6
	ARS	291.01±15.59	6
	CVMS	262.75±8.83	8
3 hónap	Kontroll	361.37±14.72	6
	ARS	346.79±22.64	7
	CVMS	330.50±15.31	6
6 hónap	Kontroll	437.29±31.70	6
	ARS	452.17±41.72	5
	CVMS	435.91±17.71	6
12 hónap	Kontroll	462.63±32.54	6
	ARS	456.95±11.40	6
	CVMS	448.60±25.21	6
18 hónap	Kontroll	428.52±17.92	6
	ARS	474.90±53.08	4
	CVMS	466.50±28.98	7
24 hónap	Kontroll	422.54±35.90	6
	ARS	407.21±72.98	6
	CVMS	463.37±70.34	6

2. táblázat: Az akut restraint stressz (ARS) és krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) hatása által előidézett neuronális aktiváció korfüggésének vizsgálata. A kísérleti modellt összefoglaló táblázat a korcsoportokat, a stressz kondíciót, a csoportok átlagos testtömegét és az átlagok standard hibáját grammban (g) kifejezve, valamint, a csoportok elemszámát (N) (darab, db) mutatja. Az ARS csoportban az állatokat 60 perces restraint stressznek tettük ki. A krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) során az állatokat random változó (egy nappali rövid, és egy éjszakai hosszú) stressznek tettük ki (ld. még 3. táblázat). A kontroll állatokat zavartalanul hagytuk a ketreceikben a perfundálásig.

Az egy hónapos valamint a másfél hónapos egyedeket az első kísérletben leírtaknak megfelelően kontroll és ARS alcsoportba osztottuk: A két hónapos és idősebb egyedeket minden korcsoportban három alcsoportra osztottuk: kontrol, ARS és CVMS csoportokba. A kontroll és az akut stressznek kitett állatokat az első kísérletben leírtaknak megfelelően (ld. előző alfejezet ARS modellje) kezeltük. A CVMS protokoll egy nappali rövidebb (1-3 órás) stresszort és egy éjszakai hosszú (12 órás) stresszort tartalmazott, amelyet két hétig alkalmaztunk a 3. táblázatban leírtak szerint.

A rövidebb időtartamú nappali stressz során random módon 10 és 14 óra között 60 perces restraint (ld. ARS előző alfejezet), 120 perc rázó gép (az állatokat ketrecel együtt egy orbitális laboratóriumi rázóasztalon folyamatos, 80 rpm beállítással rázattuk), 180 perces döntött ketrec (az állatok ketrecét 45 fokban megdöntve rögzítettük), 180 perces sötét szoba (az állatokat az állatházon belül egy teljesen sötét elkülönített szobába helyeztük el saját ketrecükben) stresszelést alkalmaztunk.

A hosszabb időtartamú éjszakai stressz során két stresszor váltakozott [szociális izoláció (az állatokat külön ketrecbe helyeztük el egyesével) és nedvesített alom (400 ml vizet öntöttünk az állatok almára, melyet másnap reggel friss, száraz forgácsra cseréltünk)] random módon olyan éjjelekkel, amikor állatainkat nem tettünk ki stresszhatásnak, hanem hagytuk őket eredeti ketrecükben („group holding”).

Annak érdekében, hogy meggyőződjünk a CVMS hatékonyságról, egy független 24 db-ból álló (12 kontroll, 12 CVMS) 6 hónapos hím patkány csoportot vizsgáltunk, melynek során az állatok forced swim teszten (FST) estek át Porsolt szerint (Porsolt et al. 1977). A teszt során a CVMS 14. napján az állatokat 15 perces FST-nek tettük ki (előtesztelés). A tesztek során 25 cm átmérőjű 40 cm magas 24°C-os csapvízzel telt üveghengereket alkalmaztunk, melyek 30 cm-es magasságig voltak vízzel töltve. A 15. napon a kontrol és CVMS állatokat is egy 5 perces FST tesztnek tettük ki, melyet videóval rögzítettünk és mértük az állatok immobilitási idejét a teszt során. A 24 állaton, melyeken viselkedési vizsgálatokat végeztünk, nem folytattunk további morfológiai vizsgálatokat.

Napok	Nappali stressz	Éjszakai stressz
1	Rázógép	Nedves alom
2	Döntött ketrec	Szociális izoláció
3	Sötét szoba	Group holding
4	Döntött ketrec	Nedves alom
5	Restraint	Szociális izoláció
6	Sötét szoba	Group holding
7	Rázógép	Szociális izoláció
8	Sötét szoba	Nedves alom
9	Restraint	Group holding
10	Döntött ketrec	Nedves alom
11	Sötét szoba	Szociális izoláció
12	Rázógép	Group holding
13	Döntött ketrec	Nedves alom
14	Restraint	Group holding

3. táblázat: A krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) kísérlet modellje: Az állatainkat 14 napon keresztül naponta egy nappali rövid (döntött ketrec, sötét szoba, rázó gép, restraint) és egy esti hosszú stressznek (nedves alom, szociális izoláció) tettünk ki. Random módon beiktattunk olyan napokat, amikor nem tettünk ki esti stressznek (group holding) az állatokat.

4.2. Mintagyűjtés és szövettani előkészítés

Minden állatot 10:00 és 11:30 között altattunk túl intraperitoneális urethán (2,4 mg/kg) injekció adásával. Az eutanázia ugyanabban az időintervallumban történt, hogy minimalizáljuk a CORT diurnális ritmusából adódó, a CORT szintekben megjelenő csoporton belüli szórást, vagy a csoportok közötti látszólagos eltéréseket. Az ARS csoport egyedeit a restraint megindítását követően 2 órával, szintén 10:00 és 11:30 között altattuk túl.

Az injekció beadása után az állatok 2 percen belül elaludtak. Ezután a mellkasfalat megnyitottuk és egy kis vágást ejtettünk a bal kamrán, melyen keresztül kb. 1,5 ml vérmintát gyűjtöttünk jéghideg, előzőleg 150 µl 7,5 m/m% etilén-diamin tetra-acetát oldattal töltött

csövekbe. Ezt követően az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk, először 50 ml 0,1 M foszfát pufferelt sóoldattal (PBS, pH=7,4), melyet 250 ml jéghideg 4%-os formaldehid (Millonig foszfát pufferben) oldat követett 20 percen keresztül. Végül állatainkat dekapitáltuk, agyukat kipreparáltuk, és utófixáltuk az előbb leírt 4% formaldehid oldatában 72 órán át. A mellékveséket és csecsemőmirigyeket eltávolítottuk, majd tömegüket precíziós laboratóriumi mérleg segítségével határoztuk meg. Feljegyeztük az állatok testtömegét, relatív mellékvese tömegét (össz-mellékvese tömeg/testtömeg), valamint relatív thymus tömegét (thymus tömeg/testtömeg).

Az agyakból 30 μ m vastagságú coronalis metszeteket készítettünk a chiasma opticum-tól a híd-nyúltvelő határáig Leica Vibratome-mal (Leica Biosystems, Wetzlar, Németország). Az agyakat legkésőbb két héttel a perfúziót követően lemetszettük. A metszés során három sorozatot válogattunk, így minden 90 μ m-re jutott egy reprezentatív metszet, melyeket anti-freeze oldatban (30% glycerol, 20% etilén-glikol, 0,1 M PBS) -20°C-on tároltuk a további vizsgálatokig.

4.3. Corticosterone radioimmunassay

A vérmintákat 4°C-on centrifugáltuk 3500/perc fordulatszámon öt percig. Az 50 μ l-es plazma mintákat -20°C tároltuk a radioimmunassay (RIA) vizsgálatig.

A RIA mérést korábbi közleményeinkben leírtaknak megfelelően (Gaszner et al. 2004, 2009 Józsa et al. 2005) végeztük. A mérés során 5 μ l szérum és 100 μ l assay puffer (0,5 M PBS, mely 1g/l zselatint és 1g/l nátrium-azid keverékét tartalmaz, pH=7,4) keverékét extraháltuk 1 ml dietil-éterrel. A száraz extraktumot rekonstituáltuk 1,25 ml assay pufferrel, melyből két párhuzamos mérést végeztünk a továbbiakban. A csövek 500 μ l extraktumot, trícíált CORT-t (12000 cpm; NEN, NET-399,90-120 Ci/mmol) és 15 nl/cső CS-RCS-57 antitestet (1:47000 végleges hígításban) tartalmaztak, összesen 700 μ l volumenben. Standard mintaként a Calbiochem cég által gyártott CORT-t használtunk 9 különböző hígításban, mely a 15 és 4000 fmol közötti tartományt fedte le. Az egy éjszakán át tartó inkubációt (4°C) követően a szabad szteroidokat dextránnal borított aktív szén segítségével szeparáltuk. A minták aktivitását kétfázisú folyadék szcintillációs rendszerrel állapítottuk meg. Az assay szenzitivitása 30 fmol/cső volt. Az antitest rendre 19%; 7,1%; 5,5%; 5,1%; és 3% keresztreakciót mutat a progesterone-nal, deoxycorticosterone-nal, testosterone-nal, dihydroprogesterone-nal és androstendione-nal. Egyéb más természetes szteroidokkal kisebb, mint 1%-os keresztreakciót mutat. Az inter- és intraassay variációs koefficiens 9,13% illetve 6,5% volt.

4.4. FOS immunhisztokémia diamino-benzidin kromogénnel

A FOS jelölést két lépésben végeztük, mivel a free floating technikával a 73 inkubáló cső egyidejű kezelése rendkívül nehézkes lett volna. Első lépésben a jelölendő mintákat random módon úgy választottuk ki, hogy minden egyes csoport egyedeinek felét feldolgoztuk, majd a második lépésben a fennmaradó mintáinkon végeztük a jelölést. Mindkét széria festését ugyanazon a héten végeztük. Minden minta jelöléséhez ugyanazokat a reagenseket, termékeket és kitéket használtuk egyazon kiszerezésből (lásd lent a részletes leírásnál). Mindent megtettünk annak érdekében, hogy a két festési lépés során minden körülmény a lehető legállandóbb legyen.

Annak érdekében, hogy kizárjuk a festések között fennálló esetleges különbségekből adódó, az eredményeket torzító hatásokat, két tesztet is végeztünk. Hat különböző korú stressznek kitett állat mintáit mindkét jelölés során bevontuk a festésbe, majd t-teszttel vizsgáltuk az így kapott eredményeket, hogy vizsgáljuk a két lépésben végzett festések között a hat állat eredményeiben van-e eltérés. A hat állat sejtszám értékei nem mutattak eltéréseket a két festés során. Másodszor, megvizsgáltuk a két festés hatását, mint faktort varianciaanalízissel is. Az ANOVA nem talált különbséget az első és a második jelölés sejtszám értékei között, így, a két lépésben végzett festés során kapott adatokat a csoportoknak megfelelően összeválogatva vizsgáltuk tovább.

A festési eljárás során metszeteinket 0,1M PBS oldatban mostuk 6x10 percig. Ezt követően mintáinkat 0,5%-os Triton X 100 (Sigma) oldattal permeabilizáltuk, majd 2%-os normál kecske szérum (NGS, Jackson Immunoresearch Europe Ltd., Suffolk, Egyesült Királyság) PBS oldatában inkubáltuk őket 30 percig. Az így előkészített metszeteket nyúlban termeltetett, poliklonális FOS antiszérum (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, sc-52) hígított oldatával (1:500) kezeltük 16 órán át, szobahőmérsékleten. Néhány újabb PBS mosást követően a mintákat biotinilált kecske anti-nyúl IgG (Vectastain ABC Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) oldatába (1:200, 2% NGS-t tartalmazó PBS-ben, 60 perc) helyeztük. PBS mosások után a metszeteket avidin-biotin komplex (Vector) oldatában inkubáltuk 60 percig. Végül, PBS mosások után az immunjelölést 100 ml Tris pufferben oldott 10 μ l 30%-os H₂O₂ és 10 mg diaminobenzidin (Sigma) segítségével tettük láthatóvá. A reakciót sztereomikroszkóp alatt kontrolláltuk és PBS mosással állítottuk le. A metszeteket zselatinos tárgylemezre húztuk fel, ezt követően xilollal derítettük, majd DePex-szel fedtük (Fluka, Heidelberg, Németország).

A FOS szérum (Sc-52, Santa Cruz) specificitását és szenzitivitását előző tanulmányainkban teszteltük patkányon (Gaszner et al 2004, 2009). Az elsődleges vagy másodlagos antiszérum elhagyása, vagy normál (nem immunizált állati) szérum használata esetén nem kaptunk detektálható jelet. Blokkoló peptiddel történő inkubáció megelőzte az immunjel megjelenését a mintáinkban, továbbá, Western-blot analízis is megerősítette a szérum specificitását, melynek eredményét a gyártó honlapján közzétette.

4.5. CRF, FOS és FOSB hármass immunfluoreszcens jelölés

A lemetezett sorozatokból első lépésben kiválogattuk azokat a metszeteket, amelyekben a PVN, a BNSTov és a CeA megtalálható. 4x10 perc PBS mosás után hő indukált epitóp felszabadítás céljából mintáinkat 90°C citrát pufferbe (pH=6,00) helyeztük 10 percre, majd az oldatot a mintákkal szobahőmérsékletre hagytuk hűlni 20 percig. Ezt követően a metszeteket 2x10 percig mostuk PBS oldatban, majd permeabilizáltuk 0,5%-os Triton X-100-ban (Sigma) 60 percig. Majd, 60 percig háttérblokkolást végeztünk 2% normál szamár szérumot (NDS, Jackson) tartalmazó PBS oldatban. A mintákat antiszérumok keverékével kezeltük (48 óra, 4°C), melyben poliklonális nyúl CRF antiszérum (1:16000, Prof. WW Vale ajándéka, The Salk Institute, La Jolla, CA, USA), poliklonális tengerimalac FOS antiszérum (1:1000, Synaptic System GmbH, Goettingen, Németország Kat. sz.: 226004) és monoklonális egér FOSB antiszérum (1:1500, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság; Kat. sz.: AB11959) volt 2%-os NDS oldatban. 2x15 perc PBS mosás után a metszeteket 24 órán keresztül inkubáltuk a másodlagos antitestek keverékében, melynek minden elemét a Jackson Immunoresearch cégtől szereztünk be. A keverék biotinilált szamár anti-nyúl IgG (1:500), Alexa 488 konjugált szamár anti-tengerimalac IgG (1:600) és Cy3 konjugált szamár anti-egér IgG (1:400) antitesteket tartalmazott PBS oldatában. Néhány ismételt PBS mosás után a mintákat Cy5 streptavidinnel (1:1000) kezeltünk 3 órán keresztül. Ezt követően Merck autofluoreszcencia eliminátor kit (Merck KGaA, Darmstadt, Németország, Kat. Sz.: 2160, Lot No.: 2016635) segítségével megszüntettük az idegsejtekben az életkor előrehaladtával felhalmozódó lipofuscin okozta autofluoreszcenciát. Az eliminátor kitet a gyártó ajánlása szerint alkalmaztuk, kisebb módosítással: a metszeteket 5 perces PBS mosást követően 30%, majd 70%-os ethanol oldatába helyeztük 5-5 percre, majd a mintákat 2 percre eliminátor reagens oldatába tettük, melyet 2x1 perces 70%-os ethanolos mosás követett. Végül mintáinkat 2x15 percig PBS oldatában mostuk, majd azokat zselatinos tárgylemezre húztuk fel. A

metszeteket hagytuk megszáradni szobahőmérsékleten és PBS-glicerín (1:1) oldatával fedtük le.

A c-Fos (FOS) antiszérum (Synaptic Systems GmbH, Göttingen, Németország, Kat. Sz.: 226004) specificitását, és szenzitivitását teszteltük állatainkon. A primer vagy szekunder antiszérum kihagyása, illetve cseréjük egy normál, nem immunizált állat szérumára ahhoz vezetett, hogy nem volt detektálható jel a mintáinkban. Az antiszérum blokkoló peptiddel (Synaptic Systems, Kat. sz.: 226-0P) történő előinkubációja szintén megakadályozta látható jel megjelenését mintáinkban. A FOSB szérumot is előteszteltük a gyártó ajánlása alapján. Korábbi tanulmányok is sikerrel alkalmazták ezt az antitestet egérben (Eagle et al. 2015) és patkányban (Tuplin et al. 2018) is, továbbá, Western-blot analízis is megerősíti a szérum specificitását, melyet a gyártó honlapján is megjelentetett. A CRF szérum, melyet nyúlban hoztak létre (bleed # 7/26/83 Prof. W.W. Vale laboratóriumának ajándéka), melyet igen széles körben teszteltek, magas specificitással, valamint szenzitivitással rendelkezik. Előzetes tesztheink is alátámasztották a CRF szérum hatékonyságát, melyet összevetettünk egy a kereskedelmi forgalomban kapható megbízható kecske CRF szérummal (Santa Cruz, részleteket lásd még Kormos et al. 2016). Mindkét szérum egyértelműen kolokalizáló citoplazmatikus jelet adott a BNSTov és CeA területén. Tekintettel arra, hogy a nyúlban előállított CRF antiszérum erősebb jelet adott a PVN területén, végül ezt alkalmaztuk a főkísérletben.

4.6. Mikroszkópia és digitális képanalízis

Az ARS FOS immunjelre kifejtett hatását vizsgáló kísérletünkben a diamino-benzidine (DAB) kromogénnel vizualizált immunjelet értékeltük. A vizsgált agyterületeket Paxinos és Watson (2007) atlasza alapján azonosítottuk és az alábbi agyterületeket választottuk ki (a zárójelben szereplő számok a kiválasztott frontális síkok távolságát jelzik a Bregmától): CeA [(-2,40 mm)–(-2,92 mm)], BLA [(-2,16 mm)–(-2,92 mm)], MeA [(-2,52 mm)–(-3,24 mm)], parvo-(PVNp) és magnocelluláris (PVNm) PVN [(-1,56 mm)–(-1,92 mm)], EWcp [(-5,16 mm)–(-6,72 mm)], DR [(-6,84 mm)–(-7,68 mm)]. A BNST-t a Bregmától +0,12 mm-től a -0,24 mm-ig az alábbi területeket kiválasztva vizsgáltuk: BNSTov, BNSTdm, BNSTdl, BNSTv, BNSTfu. A BNST régiót Dong (2001) felosztása alapján tanulmányoztuk, tekintetbe véve Hammack és munkatársai (2010) közleményét is. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk vajon a megfigyelt korfüggő változások csupán a fent felsorolt stressz adaptációban résztvevő területekre korlátozódik-e, a primer somatoszenzoros agykéreg (barrel cortex) területét [-

3,12mm-(-3,48mm)] is vizsgáltuk. Itt egy 500x300 µm-es területen végeztünk sejtszámolást, melyet a IV lamina területén jelöltünk ki (Bisler et al 2002) munkája nyomán.

A digitalizálást egy nagy tapasztalattal rendelkező neurohisztológus kolléga végezte, aki nem ismerte minták jelölésének háttérében álló csoportbeosztást. A fotók egy RT digitális kamerával felszerelt Nikon Microphot FXA mikroszkóp segítségével (Nikon, Tokyo Japan) készültek.

A hármás jelölésű mintáinkat kollégánk egy Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkóppal digitalizálta. Ebben az esetben a konfokális mikroszkópot úgy állítottuk be, hogy az az egyes fluorofórok jeleit szekvenciálisan detektálja. Annak érdekében, hogy a képeken szemikvantifikációra alkalmas jel ábrázolódjon, photon count módban készítettük a felvételeket, fotoelektron sokszorozó általi jelamplifikáció nélkül. A fluorofórok excitációs és emissziós értékeit a Fluo-View szoftverbe (Fv10-ASW; Version 0102) épített ajánlott értékeket alkalmaztuk. 488 nm-es, 550 nm-es és 633 nm hullámhosszú lézernyalábokat használtunk a festékek gerjesztésre. Az Alexa 488 esetén 525 nm, a Cy3-nál 570 nm, a Cy5-nél 670 nm-nél mértük az fluoreszcens fényemissziót a detekció során. Mindhárom csatorna regisztrált jeleit külön, és a szoftver által illesztve is tároltuk, hogy értékelhessük a jelek kolokalizációit. Az ábrákon zöld (Alexa 488) vörös (Cy3) és fehér (Cy5) virtuális színeket használtunk. A digitális fotókat manuálisan értékeltük ki mindkét tanulmány esetén, melyhez az eredeti, utólag nem módosított képeket használtuk.

A kiértékelést végző munkatársak a sejtszámolást manuálisan végezték egy adott terület minden mintáján. Annak érdekében, hogy az emberi hiba mértékét minimalizáljuk, a sejtszámolást végző személyek nem ismerték a minták eredetét. Egy második személy ellenőrizte a számolást véletlenszerűen kiválasztott képek ismételt kiértékelésével. Csak a mindkét elemzést végző személy által egybehangzóan megerősített adatokat használtuk fel a statisztikai kiértékelés során. Annak érdekében, hogy a lehető legkisebb mértékre csökkentsük a metszési sík varianciájából adódó, a magok keresztmetszeti területeiben megjelenő különbségeket, egy mag esetén öt metszet sejtszám adatainak átlagával számoltunk. Az öt metszet átlagértéke reprezentálta az adott agyterület sejtszámát egy állatra nézve. Mivel minden csoport 4-7 állatot tartalmazott, így csoportonként is 4-7 sejtszám átlag szerepel, mely a csoportot reprezentálja a statisztikai kiértékelésben.

A fluoreszcens fotók esetében vizsgáltuk a CRF tartalmú sejtek specifikus jel denzitását (specific signal density-SSD) is (Kormos et al 2016). Az SSD mérés egy szemikvantitatív analízis, mely során a CRF sejtek valamint a szövetháttér denzitásának (jel intenzitásának) a különbségét mértük Image J Software segítségével (1.50i verzió; NIH). Vizsgálatunk során

mértük külön a csak CRF, a CRF-FOS, a CRF-FOSB, és a CRF-FOSB-FOS sejtek CRF SSD-jét. A denzitás-különbségek eredményeit összevetettük más, a kísérletek során regisztrált paraméterekkel is.

A DAB festett készítményekről készített reprezentatív digitális képeket szürkeárnyalatossá tettük. Amennyiben szükséges volt, a szürkeárnyalatos fotókat és a virtuális színeket ábrázoló konfokális képeket is Adobe Photoshop 7.0.1 szoftverrel kontrasztosítottuk, méretre vágtuk és összetett fotómontázsokba szerkesztettük.

4.7. Statisztikai analízis

Az egyes állatcsoportok adatainak átlagát tüntettük fel az átlagok standard hibájával (SEM). Az adatok normalitását Shapiro-Wilk teszttel (Shapiro és Wilk 1965), míg az adatok szóráshomogenitását Hartley-féle chi négyzet próbával vizsgáltuk (Snedecor és Cochran 1989). Néhány esetben matematikai transzformációt alkalmaztunk. A CORT mérések esetében az adatok négyzetgyökét a sejszámok esetében az adatok tízes alapú logaritmusát számoltuk annak érdekében, hogy normális adateloszlást kapjunk. Minden esetben két utas variancia analízist (ANOVA) futtatunk, majd a csoportok közötti különbségeket Tukey-féle *post hoc* teszttel erősítettük meg. Amennyiben a kétutas ANOVA nem talált szignifikáns interakciót a fő hatások (kor, stressz) között, hogy vizsgáljuk az eredmények korfüggését, az adatokat egyutas ANOVA futtatásával is vizsgáltuk a kontroll és stressz csoportokban külön-külön. A csoportpárok összehasonlításához is Tukey-féle *post hoc* tesztet alkalmaztunk. Mivel a kétutas ANOVA nem tudta megerősíteni minden esetben a két faktor (stressz, kor) interakcióját, a korcsoporton belüli különbséget (kontrol *vs.* stressz) Student-féle t teszttel vizsgáltuk.

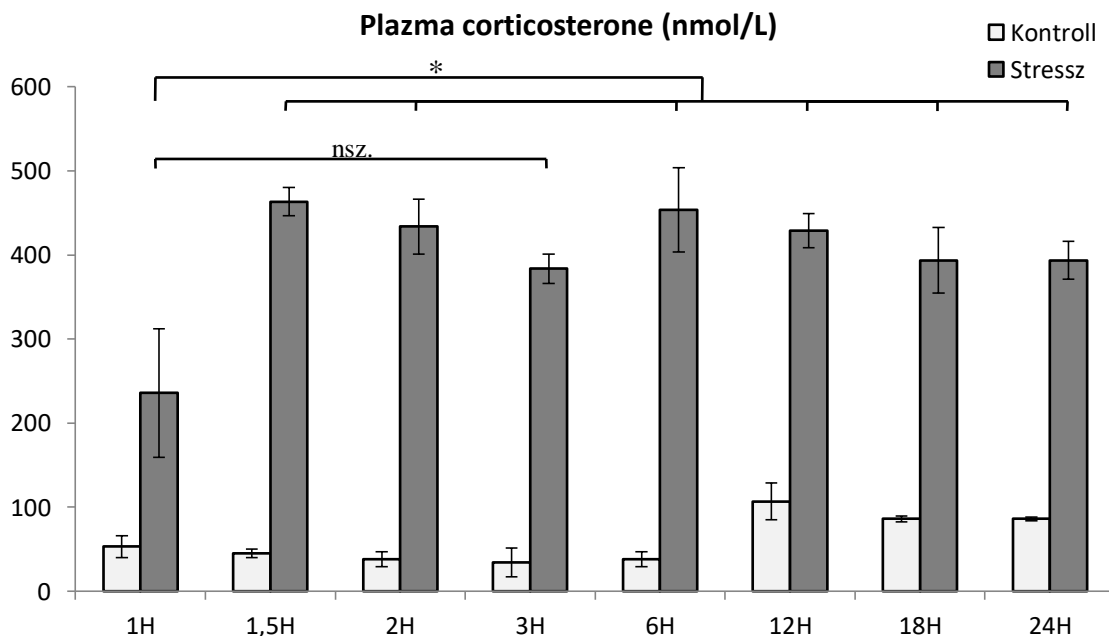
Annak érdekében, hogy megerősítsük a különböző változók között fennálló összefüggéseket, Spearman-féle korreláció analízist futtatunk adatainkon. A statisztikai különbséget szignifikánsnak tekintettük, ha α kisebb volt, mint 0,05. A statisztikai analízisekhez Statistica 8.0 szoftvert (StatSoft, Tulsa, OK, USA) használtunk.

5. Eredmények

5.1. A neuronális aktivitás mintázata az életkor függvényében az ARS modellben

Első kísérletünk célja az volt, hogy az agy stresszre érzékeny területeinek érzékenységét, továbbá a HPA-tengely reaktivitását kövessük az életkor függvényében patkányban. Az agyterületek aktivitásának vizsgálatára FOS térképezést alkalmaztunk ARS expozíció követően, mellyel párhuzamosan követtük az állatok CORT választát. Utóbbit az állatok szérummintáiból határoztuk meg. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az akut neuronális aktivitás életkor függését, nyolc különböző korú állatcsoportot tettünk ki ARS-nek és 13 agyterületet vizsgáltunk szemikvantitatív FOS immunhisztokémia segítségével. Az eredmények részletes, teljes összefoglaló táblázatait az 5.1.7. fejezetben a négyes, ötös és hatos táblázatokban részleteztük.

5.1.1. Az ARS modell validitásvizsgálat corticosterone eredményei

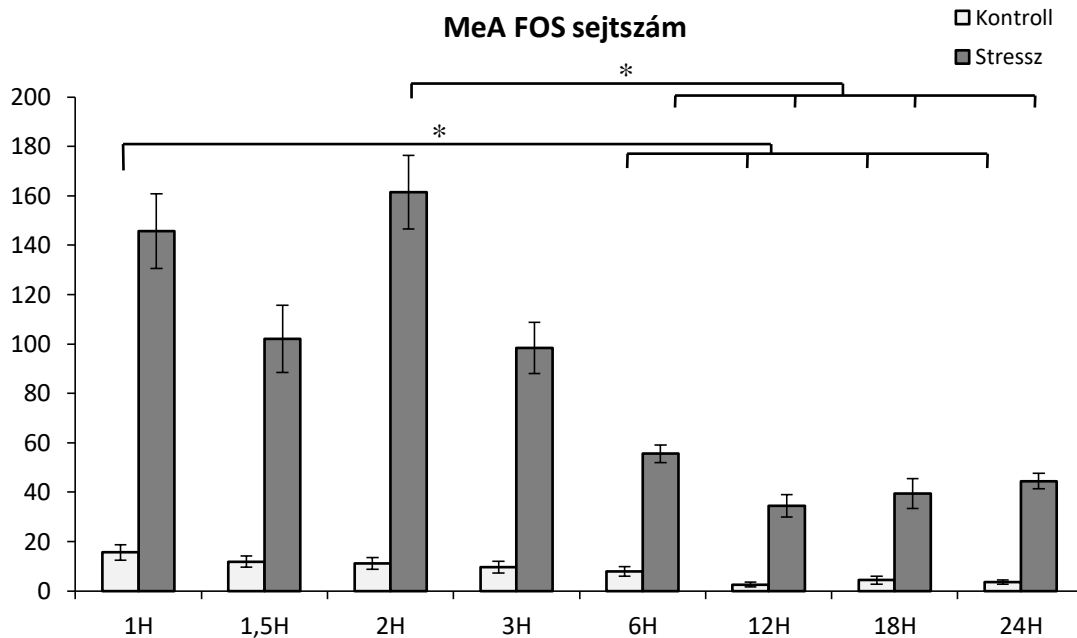


5. ábra: A plazma corticosterone (nmol/l) mérések eredményei (n=4-5 db/csoport). A stressz minden korcsoportban szignifikánsan megemelte a CORT szintjét (Tukey-féle *post hoc* teszt $p < 0,005$) (ezeket nem jelöltük az ábrán). A *post hoc* analízis alapján az 1 hónapos (H) állatok szignifikánsan alacsonyabb ARS (stressz) indukálta CORT szinttel rendelkeztek, mint a többi stressznek kitett csoport (kivéve a 3 hónapos) stresszelt csoport (Tukey *post hoc* * $p < 0,05$; nsz: nem szignifikáns $p > 0,05$).

A stressztengely aktivitásának vizsgálatához meghatároztuk az állatok vérmintáinak plazma CORT szintjét. A corticosterone szintet az akut restraint ($F_{1,57}=620,36$; $p<10^{-6}$), a kor ($F_{7,57}=3,85$; $p<0,005$), és a kettőjük interakciója ($F_{7,57}=3,57$; $p<0,005$) is befolyásolta (5.ábra). A Tukey-féle *post hoc* teszt megerősítette, hogy a CORT szintje minden egyes korcsoportban magasabb volt a stresszelt állatok esetében ($p<0,005$). A kontroll állatok hormonszintje alacsony maradt a 6 hónapos életkorig. A 12, 18 és 24 hónapos kontroll csoportok azonban kétszer akkora CORT szinttel rendelkeztek, mint a 3 hónapos kontroll állatok ($p<0,05$). A kor és a CORT adatok közepes erősségű korrelációját a Spearman analízis is megerősítette ($\rho=0,427$, $p=0,008$). Az ARS-nek kitett csoportok közül a legfiatalabb (1 hónapos) állatok mutatták a legalacsonyabb CORT szintet, mely érték szignifikánsan alacsonyabbnak ($p<0,05$) bizonyult más, stresszelt korcsoportokhoz viszonyítva. Kivételt ez alól a 3 hónapos ARS állatok jelentettek ($p=0,09$). A CORT szint a stressznek kitett állatok esetében állandó maradt 1,5 hónapos kortól kezdődően idős korig ($\rho=0,144$, $p=0,413$).

5.1.2. A tágabb értelemben vett amygdala magjainak FOS immunreaktivitása

Nucleus medialis amygdalae (MeA)

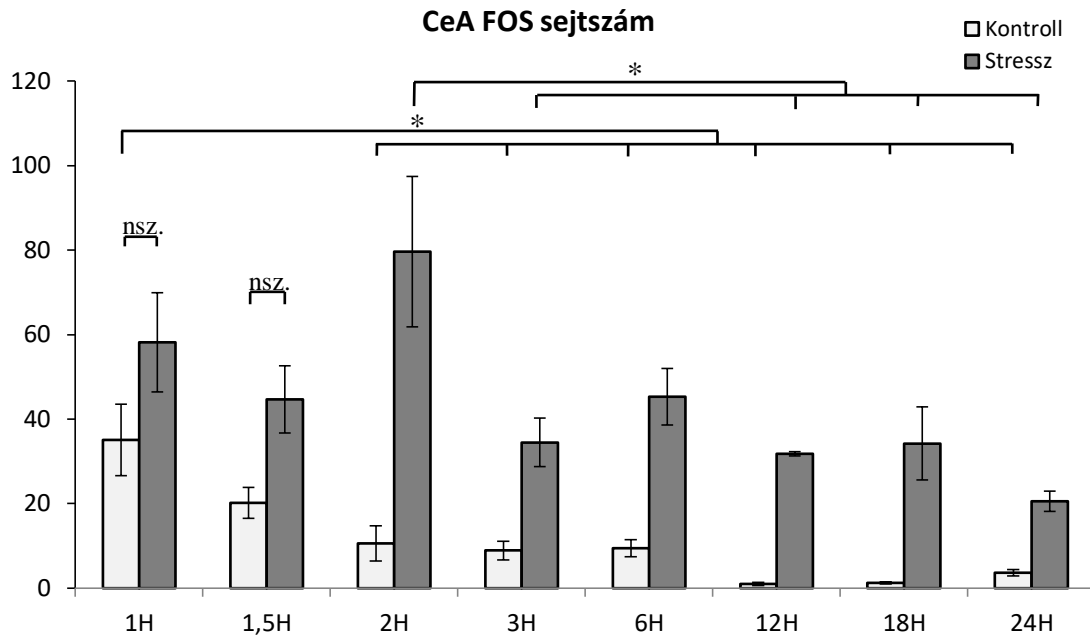


6. ábra: A FOS jelölés eredményei a MeA területén (n=4-5 db/csoport). Az ARS (stressz) szignifikánsan megemelte a sejtszámot (Student-féle t-teszt $p < 0,001$), melyeket nem tüntettünk fel. A kontroll csoportok között az 1 hónapos (H) állatok rendelkeztek a legmagasabb sejtszámmal, mely különbözött a 6, 12, 18 és 24 hónapos kontroll állatok értékeitől (Tukey-féle *post hoc* teszt, $*p < 0,05$). Az ARS (stresszelt) csoportok között a 2 hónapos állatok rendelkeztek a legmagasabb sejtszámmal, mely különbözött a 6, 12, 18 és 24 hónapos ARS (stresszelt) állatok értékeitől (Tukey-féle *post hoc* teszt, $*p < 0,05$).

A MeA FOS aktivitását a stressz ($F_{1,57}=517,11$; $p < 10^{-6}$) és az életkor ($F_{7,57}=16,05$ $p < 10^{-6}$) is befolyásolta, azok interakciója viszont nem volt hatással a sejtszámokra (6. ábra). Mivel nem találtunk szignifikáns interakciót a két faktor között, t-tesztekkel vizsgáltuk meg, minden egyes korcsoportban a stressz hatását. Utóbbiak minden korcsoportban megerősítették, hogy a stressz megemelte a FOS sejtszámot ($p < 0,001$). Az egyutas ANOVA kimutatta az életkor hatását a FOS sejtszámra kontroll állatokban ($F_{7,29}=6,54$, $p < 0,001$). Az adatok azt mutatják, hogy a bazális FOS immunjel csökken az életkor előrehaladtával kontroll állatokban: a legfiatalabb csoportban a FOS sejtszám $15,62 \pm 3,14$ volt, míg a legöregebben állatokban ez az érték $3,56 \pm 0,84$ -nek felelt meg. A két csoport közötti különbséget a *post hoc* teszt is megerősítette ($p < 0,01$). A kontroll állatok korfüggő sejtszámcsökkenését a Spearman analízis is kimutatta ($\rho = -0,747$; $p < 10^{-6}$). Az egyutas ANOVA is bizonyította a stressz főhatását a FOS sejtszámokra ($F_{7,28}=28,70$, $p < 10^{-6}$). A legmagasabb immunreaktív neuronszámot a két

hónapos ARS csoportban detektáltuk. Az ezt követő életszakaszban a FOS jel mértékének csökkenését láttuk, mely 6 hónapos kortól már elérte a szignifikáns mértéket (Tukey-féle *post hoc* teszt $p < 0,04$). A korral járó expressziócsökkenést a Spearman korreláció is megerősítette a stressznek kitett állatcsoportokban ($\rho = -0,828$; $p < 10^{-6}$). A stressz indukálta FOS immunjel átlagosan 7-9-szer volt nagyobb, mint amit a reprezentatív kontroll állatokban láttunk. A legnagyobb sejtszám növekedést a 2 hónapos korcsoportban figyeltük meg, mely 14-szeres volt. Emellett, 13-szoros emelkedést tapasztaltunk az idős állatokban. Ez utóbbi markánsnak tűnő különbség azonban az igen alacsony bazális FOS sejtszámnak köszönhető, mivel a stresszelt csoport FOS sejtszáma csupán negyede volt a 2 hónapos stresszelt egyedek sejtszámának. Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 9-es ábrán láthatóak.

Nucleus centralis amygdalae (CeA)



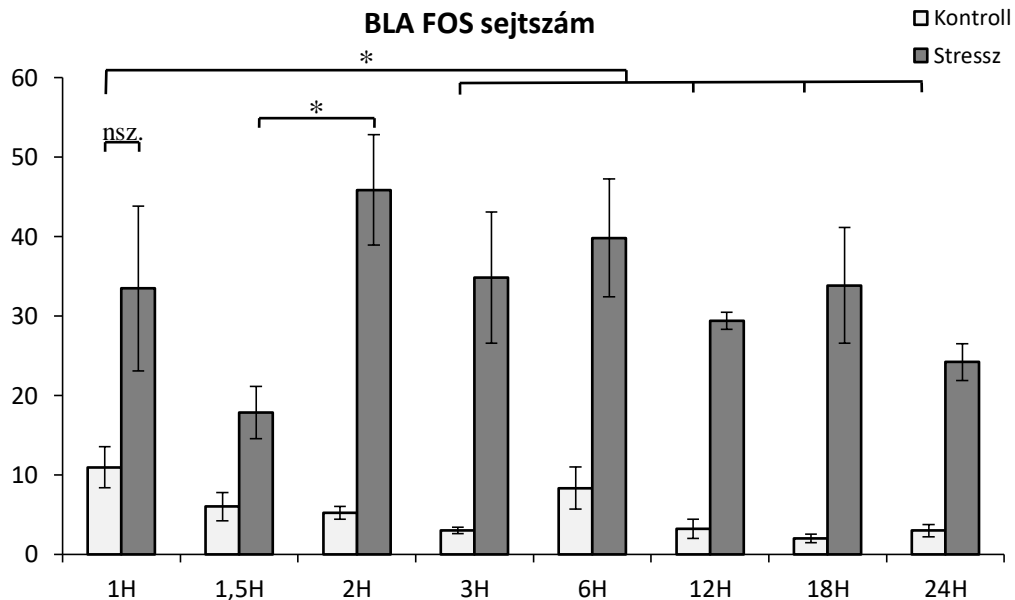
7. ábra: A FOS jelölés eredményei a CeA területén (n=4-5 db/csoport). Az ARS (stressz) szignifikánsan megemelte a FOS sejtszámot (ezeket a különbségeket nem emeltük ki), kivéve az 1 és 1,5 hónapos korcsoportokban (nsz. $p > 0,05$). A kontroll csoportok között az 1 hónapos állatok rendelkeztek a legmagasabb sejtszámmal, mely különbözött a 2, 3, 6, 12, 18 és 24 hónapos kontroll állatok értékeitől (Tukey-féle *post hoc* teszt, $*p < 0,05$). Az ARS (stresszelt) csoportok között a 2 hónapos állatok rendelkeztek a legmagasabb sejtszámmal, mely különbözött a 3, 12, 18 és 24 hónapos ARS (stresszelt) állatok értékeitől (Tukey-féle *post hoc* teszt, $*p < 0,05$).

Az CeA FOS tartalmú neuronjainak számát befolyásolta a stressz ($F_{1,57}=234,27$; $p < 10^{-6}$), és a kor ($F_{7,57}=17,75$; $p < 10^{-6}$). Emellett az ANOVA a két faktor erős interakcióját is kimutatta ($F_{7,57}=8,94$; $p < 10^{-6}$) (7. ábra).

A legfiatalabb kontroll csoport mutatta a legmagasabb bazális FOS szintet, mely 3,5-szer volt nagyobb, mint a 2 hónapos és idősebb állatokban tapasztalt bazális értékek ($p < 0,04$). Az életkorral a kontroll csoportok bazális FOS jele graduálisan csökken, majd szinte el is tűnik a 12 és 18 hónapos állatokban. A 2 hónapos korcsoportban az ARS 7,5-szeresére emelte a FOS immunreaktivitást ($p < 10^{-6}$). A 3, 6 és 24 hónapos állatokban az ARS szignifikáns mértékű, amely 3,5-5,6-szoros átlagos FOS immunjel emelkedésben nyilvánult meg ($p < 5 \times 10^{-4}$). A nagyon alacsony bazális jelnek köszönhetően a stressz okozta sejtszám emelkedés a 12 és 18 hónapos korcsoportokban 31-szeresnek ($p < 10^{-6}$) és 27-szeresnek ($p < 10^{-6}$) adódott. Kiemelendő, hogy az 1 és 1,5 hónapos csoportokban csupán 1,65-szörös és 2,21-szeres FOS emelkedést tapasztaltunk, mely emelkedések nem bizonyultak szignifikánsnak. A Spearman korrelációs analízis megerősítette a FOS immunjel korfüggő

csökkenést, mind a kontroll ($\rho=-0,838$; $p<10^{-6}$), mind a stresszelt állatokban ($\rho=-0,575$; $p<10^{-6}$). Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 9-es ábrán láthatóak.

Nucleus basolateralis amygdalae (BLA)

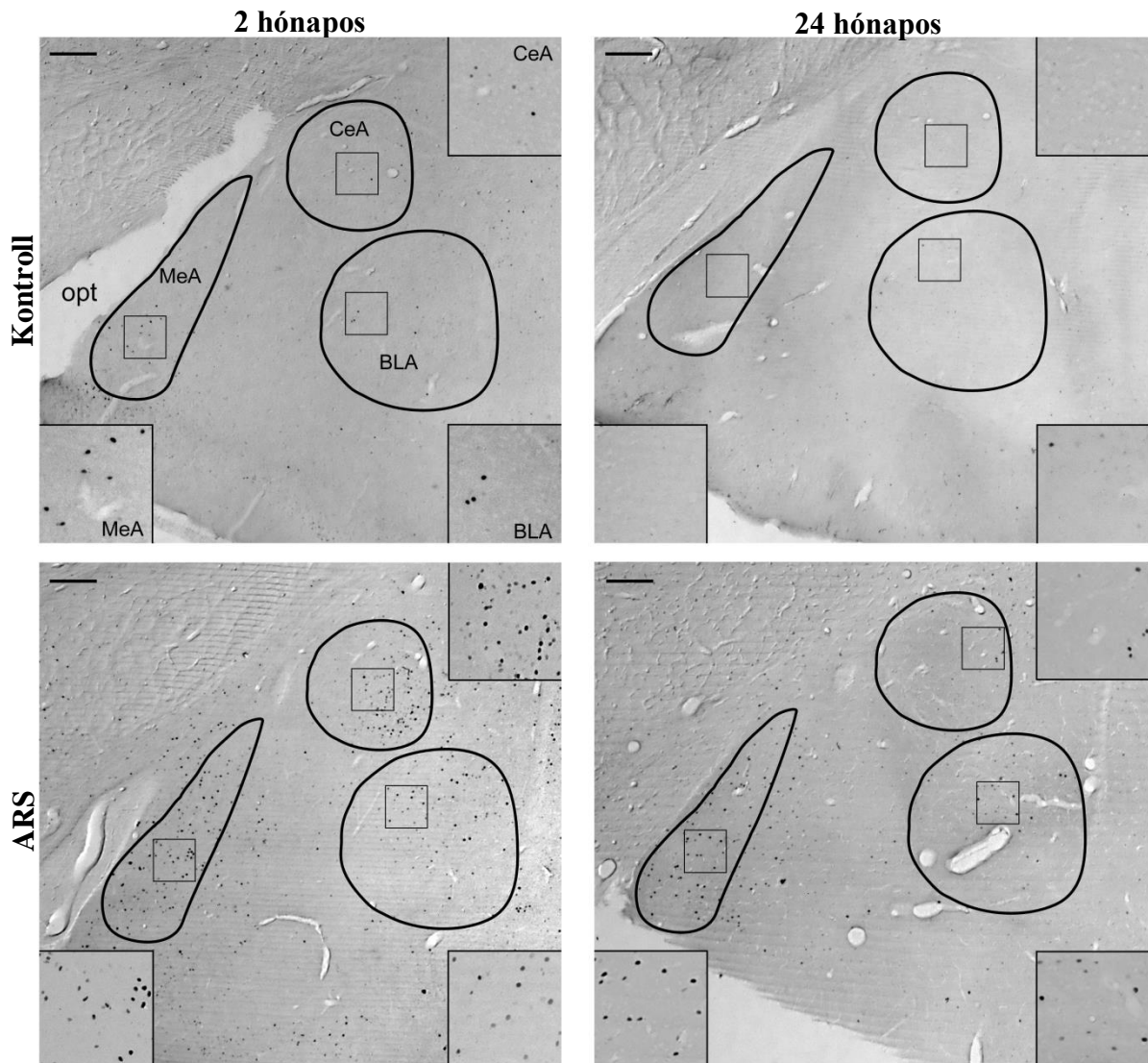


8. ábra: A FOS jelölés eredményei a BLA területén ($n=4-5$ db/csoport). Az 1 hónapos (H) korcsoportot kivéve (nsz. $p>0,05$), az ARS (stressz) szignifikánsan megemelte a FOS sejtszámot (ezeket a különbségeket nem emeltük ki). A kontroll csoportok között az 1 hónapos állatok rendelkeztek a legmagasabb FOS sejtszámmal, mely különbözött a 3, 12, 18 és 24 hónapos kontroll állatok értékeitől (Tukey-féle *post hoc* teszt, $*p<0,05$). Az ARS (stresszelt) csoportok között a 2 hónapos állatok mutatták a legmagasabb FOS sejtszámot, mely különbözött az 1,5 hónapos ARS (stresszelt) állatok értékeitől (Tukey-féle *post hoc* teszt, $*p<0,05$).

A kétutas ANOVA kimutatta, hogy a stressz ($F_{1,57}=252,76$; $p<10^{-6}$) és az életkor ($F_{7,57}=3,45$; $p<0,005$) is mint fő hatás meghatározta a FOS tartalmú neuronok számát. Továbbá a két főhatás interakciója ($F_{7,57}=3,02$; $p<0,01$) is bizonyítható volt (8. ábra).

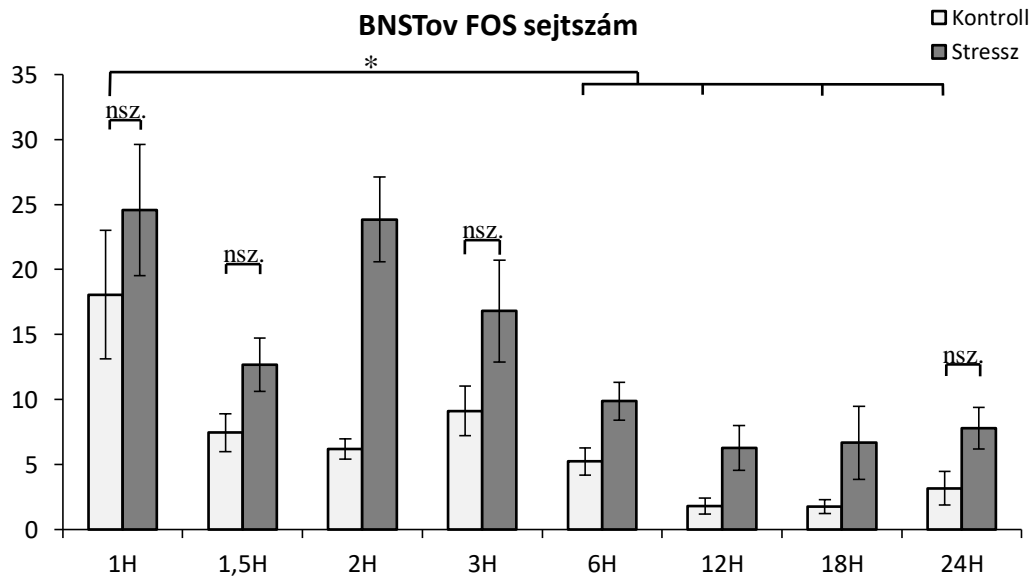
A BLA területén alacsony bazális sejtszámot ($10,93\pm 2,57$) találtunk az 1 hónapos kontroll csoportban. A bazális FOS immunjel korfüggő csökkenést mutatott ($\rho=-0,537$; $p=0,001$). Az 1,5 hónapos és idősebb állatokban a 6 hónapos kontroll egyedeket leszámítva igen alacsony FOS immunreaktivitást észleltünk, a 18 hónapos patkányokban átlagosan mindössze $1,98\pm 0,36$ sejtet. Az igen alacsony bazális FOS sejtszámnak köszönhetően az ARS indukálta FOS válasz a 12 és 18 hónapos állatok esetében 9,17-szeres ($p<10^{-6}$) illetve 17,05-szoros ($p<10^{-6}$) volt. A többi stressz csoportban átlagosan 3-8-szoros emelkedést láttunk a koruk megfelelő kontroll csoportokhoz viszonyítva ($p<0,01$). A stresszelt állatok összehasonlításakor a *post hoc* teszt megerősítette, hogy a 2 hónapos állatok FOS sejtszáma magasabb volt, mint az 1,5 hónapos egyedeké. Ezzel párhuzamosan, a Spearman analízis nem

talált lineáris összefüggést az életkor és FOS immunreaktivitás mértéke között a stresszes állatokban ($p=0,075$; $p=0,662$). Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 9-es ábrán láthatóak.



9. ábra: Életkorfüggő FOS immunreaktivitás az amygdala magokban. A képek a 2 és 24 hónapos kontroll, valamint ARS (stressz)-nek kitett állatok mintáit reprezentálja. A fekete színnel körülhatárolt területek az általunk vizsgált amygdala magok határait jelölik (MeA-nucleus medialis amygdalae, CeA-nucleus centralis amygdalae, BLA-nucleus basolateralis amygdalae). A négyzetek, magonként mutatják nagyobb nagyítással a FOS-szal jelölt sejteket: a bal alsó a MeA-t a jobb alsó a BLA-t míg a jobb felső a CeA-t mutatja nagyobb nagyítással. opt.: tractus opticus. A lépték 100 μ m-t jelöl.

Nucleus interstitialis striae terminalis, ovális divízió (BNSTov)



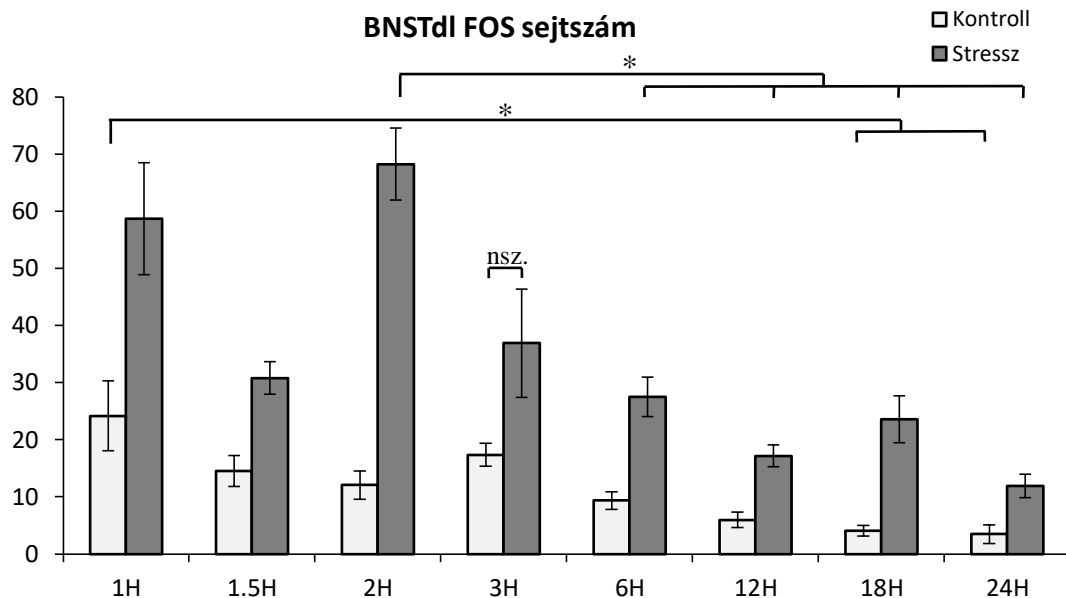
10. ábra: A FOS jelölés eredményei a BNSTov területén (n=4-5 db/csoport). Az ARS (stressz) szignifikánsan megemelte a sejtszámot a 2, 6, 12, és 18 hónapos (H) korcsoportokban (ezeket a különbségeket nem emeltük ki *-gal). Ezzel szemben az ARS (stressz) nem emelte meg szignifikánsan a sejtszámot az 1, 1,5, 3, és 24 hónapos korcsoportokban (nsz. $p > 0,05$). Az 1 hónapos kontroll állatokban jelentős bazális FOS sejtszámot láttunk, mely a kor előrehaladtával csökkenni kezdett (Tukey-féle *post hoc* teszt, $*p < 0,05$).

A BNSTov-ban a kétutas ANOVA alátámasztotta a stressz ($F_{1,57}=51,24$; $p < 10^{-6}$) és az életkor ($F_{1,57}=13,61$; $p < 10^{-6}$) hatását a FOS aktivitásra, azok interakciója nélkül (10. ábra).

Az egyutas ANOVA is megerősítette a kor hatását a FOS immunjelre ($F_{7,29}=9,62$; $p < 10^{-6}$) a kontroll csoportokban. Számottevő FOS tartalmú sejtszámot figyeltünk meg az 1 hónapos kontroll állatokban ($18,08 \pm 4,93$ sejt), mely aktivitás a kor előrehaladtával csökkent, és a 6 hónapos illetve idősebb korcsoportokban már statisztikailag szignifikánssá vált. A kontroll állatok FOS aktivitása csökken az életkorral a korreláció analízis szerint is ($\rho = -0,752$; $p < 10^{-6}$).

A legnagyobb ARS indukálta FOS emelkedéseket az 1 és 2 hónapos állatokban tapasztaltuk. Ugyanakkor, csak a 2 hónapos állatokban regisztrált, 3,85-szörös sejtszám emelkedés érte el a szignifikáns mértéket a kontroll csoporthoz viszonyítva ($p < 0,02$). A többi korcsoportban talált (átlagosan 1,35- 3,8-szeres) emelkedés nem bizonyult szignifikánssá. Az egyutas ANOVA megerősítette az életkor hatását a FOS immunjel mértékére ($F_{7,28}=7,46$; $p < 10^{-4}$) a stressznek kitett állatok esetében. Ezzel összhangban, negatív korrelációt találtunk a FOS sejtszámok és az életkor között ($\rho = -0,696$; $p < 10^{-6}$). Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 15-ös ábrán láthatóak.

Nucleus interstitialis striae terminalis, dorsolateralis divízió (BNSTdl)



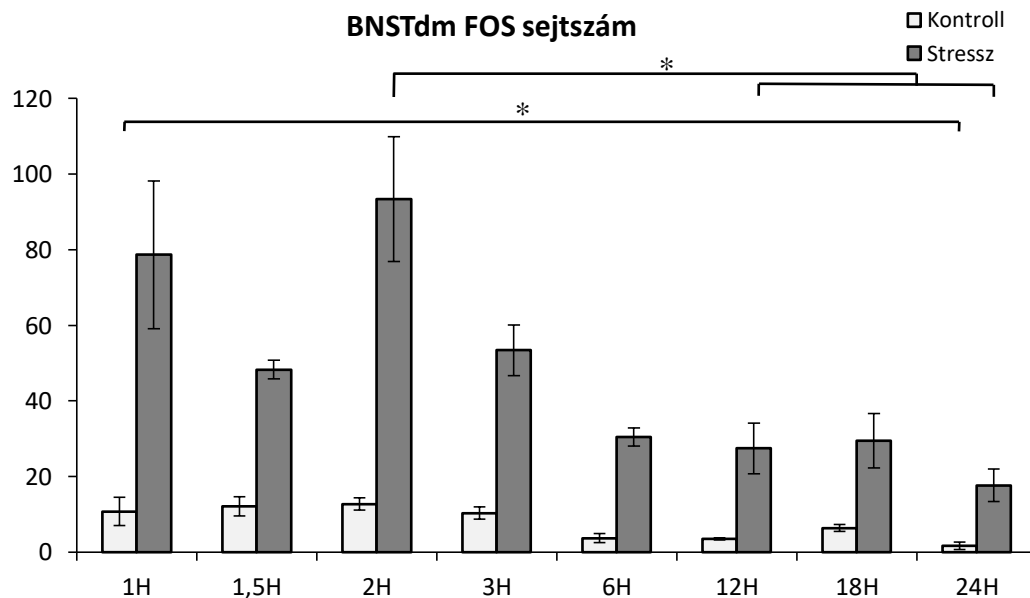
11. ábra: A FOS jelölés eredményei a BNSTdl területén (n=4-5 db/csoport). Az ARS (stressz) szignifikánsan megemelte a sejtszámot minden korcsoportban (ezeket az adatokat nem emeltük ki *-gal), kivéve a 3 hónapos (H) korcsoportban (nsz. $p > 0,05$). A kontroll csoportok között a legmagasabb sejtszámot az 1 hónapos korcsoportban detektáltuk, amely érték szignifikánsan magasabb volt a 18 és 24 hónapos kontroll egyedek értékeihez viszonyítva (Tukey-féle *post hoc* teszt, $*p < 0,05$). A legmagasabb sejtszámot a 2 hónapos ARS (stressz) csoport mutatta, és ez a sejtszám szignifikánsan magasabbnak mutatkozott, mint a 6, 12, 18 és a 24 hónapos állatok ARS (stressz) indukálta sejtszámjai (Tukey-féle *post hoc* teszt, $*p < 0,05$).

Az ANOVA megerősítette, hogy a stressz ($F_{1,57}=111,81$; $p < 10^{-6}$) és az életkor ($F_{7,57}=15,10$; $p < 10^{-6}$) befolyásolja a FOS sejtszámot, a két faktor szignifikáns interakciója nélkül (11. ábra). Kontroll állatokban az ANOVA kimutatta, hogy az életkor főhatása szignifikáns volt ($F_{7,29}=7,69$; $p < 10^{-5}$). Az egy hónapos kontroll egyedek csoportjában átlagosan $24,16 \pm 6,11$ FOS tartalmú sejtet detektáltunk. A 18 hónapos ($4,08 \pm 0,94$) és a 24 hónapos ($3,45 \pm 1,67$) állatok alacsonyabb FOS immunreaktív sejtszámot mutattak, mint az 1, 1,5 és 3 hónapos kontroll egyedek ($p < 0,05$). A FOS immunjel korfüggő csökkenését a Spearman korreláció analízis is megerősítette ($\rho = -0,788$; $p < 10^{-6}$).

Az ARS indukálta FOS aktivitás növekedése minden korcsoportban szignifikánsnak mutatkozott ($p < 0,05$), kivéve a 3 hónapos állatokat. A legmagasabb FOS sejtszámokat a két hónapos állatoknál figyeltük meg. Az egyutas ANOVA is alátámasztotta a stressznek kitett állatokban az életkornak a FOS immunjelre gyakorolt hatását ($F_{7,28}=11,10$; $p < 10^{-6}$). A Tukey-féle *post hoc* teszt kimutatta, hogy a 6 hónapos ARS állatok alacsonyabb FOS sejtszámmal rendelkeznek, mint a 2 hónapos egyedek ($p < 0,01$). A Spearman analízis megerősítette, hogy a

FOS immunjel csökken az életkorral, az ARS-nek kitett állatokban is ($\rho=-0,707$; $p<10^{-6}$). Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 15-ös ábrán láthatóak.

Nucleus interstitialis striae terminalis, dorsomedialis divízió (BNSTdm)

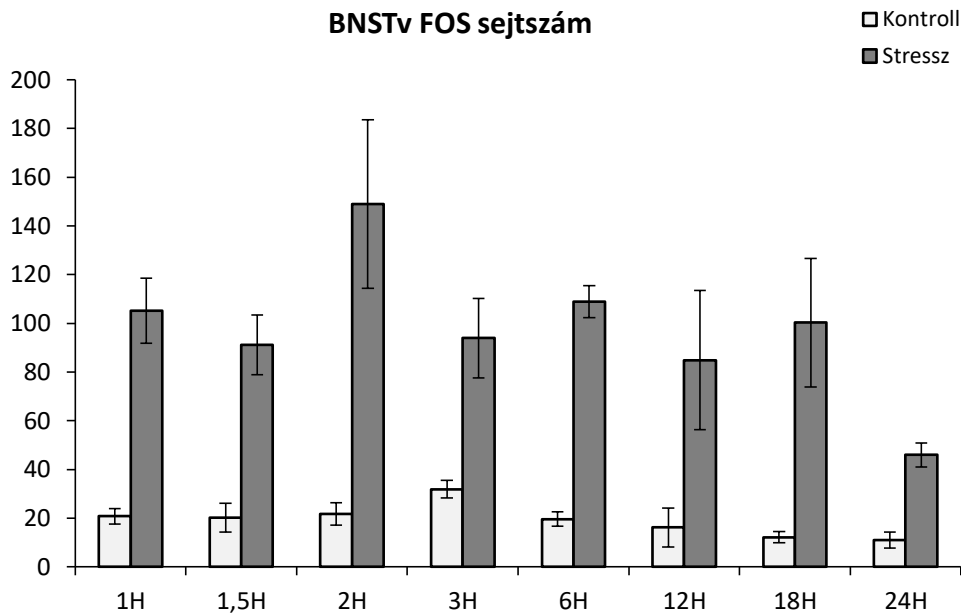


12. ábra: A FOS jelölés eredményei a BNSTdm területén (n=4-5 db/csoport). Az ARS (stressz) szignifikánsan megemelte a sejtszámot minden korcsoportban (ezeket a különbségeket nem emeltük ki). Az egy hónapos (H) kontroll állatok sejtszáma szignifikánsan különbözött a 24 hónapos kontroll állatokhoz viszonyítva (Tukey-féle *post hoc* teszt, * $p < 0,01$). A legmagasabb sejtszámot a 2 hónapos ARS (stressz) csoportban detektáltuk, mely érték különbözött a 12 és 24 hónapos ARS (stressz) indukálta állatok értékeihez képest (Tukey-féle *post hoc* teszt, * $p < 0,05$).

A kétutas ANOVA megerősítette a stressz ($F_{1,57}=254,452$; $p < 10^{-6}$) és életkor ($F_{1,57}=16,70$; $p < 10^{-6}$) főhatását, azok interakciója nélkül (12. ábra). Utóbbi hiányában megvizsgáltuk egyutas ANOVA-val is eredményeinket, amely megerősítette, hogy az életkor a kontroll ($F_{7,29}=7,93$; $p < 10^{-4}$) és a stresszelt ($F_{7,28}=11,17$; $p < 10^{-5}$) állatokban is befolyásolta a FOS jelet. A korreláció analízis kimutatta a korfüggő FOS aktivitás csökkenését a kontroll ($\rho = -0,675$; $p < 10^{-6}$) és stresszelt ($\rho = -0,777$; $p < 10^{-6}$) csoportokban is.

A legkisebb sejtszámot a 24 hónapos kontroll állatcsoportban detektáltuk ($p < 0,01$ vs. 1 hónapos kontroll). Stressz hatására minden egyes korcsoportban szignifikánsan megnövekedett a FOS-t tartalmazó sejtek száma ($p < 0,001$). Az ARS indukálta FOS értékek 4-6-szoros emelkedéseket mutattak a reprezentatív kontrolljukhoz képest. Kivételt a legidősebb korcsoport jelentett, ahol 10-szeres volt a stressz indukálta FOS aktivitásnövekedés, melyet a nagyon alacsony bazális értékek magyarázhatnak. A 12 és 24 hónapos állatok szignifikánsan alacsonyabb FOS válasszal reagáltak, mint a 2 hónapos egyedek ($p < 0,001$). A 6 ($p = 0,098$) és 18 hónapos ($p = 0,094$) ARS állatokban ez a különbség nem érte el a szignifikáns mértéket. Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 15-ös ábrán láthatóak.

Nucleus interstitialis striae terminalis, ventralis divízió (BNSTv)

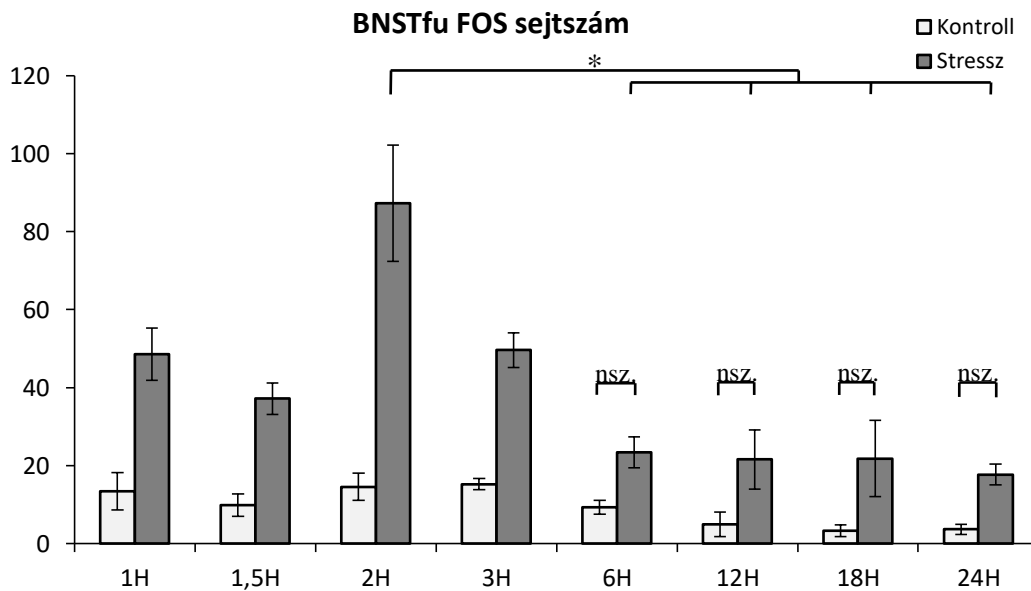


13. ábra: A FOS jelölés eredményei a BNSTv területén (n=4-5 db/csoport). Az ARS (stressz) szignifikánsan megemelte a sejtszámot minden korcsoportban (ezeket a különbségeket nem emeltük ki). Ugyanakkor nem találtunk jelentős eltéréseket sem a kontroll csoportok, sem pedig az ARS (stresszes) csoportok között. (H: hónapos)

A stressz ($F_{1,57}=177,10$; $p<10^{-6}$) és az életkor ($F_{7,57}=3,38$; $p<0,005$) fő hatását a FOS-ra az ANOVA ebben a magban is kimutatta, a két faktor interakciója azonban nem igazolódott (13. ábra).

Az egyutas ANOVA nem támasztotta alá az életkor főhatását a FOS sejtszámra ($F_{7,29}=1,91$; $p=0,10$) a kontroll csoportokban, ugyanakkor, a Spearman analízis talált egy viszonylag gyenge negatív korrelációt a kontroll állatok kora és FOS sejtszáma között ($\rho=-0,401$; $p=0,019$). A stressz minden korcsoportban szignifikánsan megemelte a FOS immunreaktivitást ($p<0,001$). A kontroll csoportoknál megfigyeltekkel ellentétben a stresszelt állatok csoportjaiban az egyutas ANOVA megerősítette a kor hatását a FOS megjelenésére ($F_{7,29}=3,06$; $p<0,016$). A legmagasabb sejtszámot a 2 hónapos ARS állatokban láttuk, míg a legalacsonyabbat a 24 hónapos csoportban. A Tukey-féle *post hoc* teszt a látszólag jelentős különbségek ellenére nem talált szignifikáns eltérést a stressznek kitett csoportok egymással történő összehasonlítása során. A *post hoc* eredményekkel összhangban a Spearman analízis sem talált korrelációt a kor és az ARS állatok FOS sejtszáma között a BNSTv területén ($\rho=-0,314$; $p=0,066$). Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 15-ös ábrán láthatóak.

Nucleus interstitialis striae terminalis, fusiformis divízió (BNSTfu)

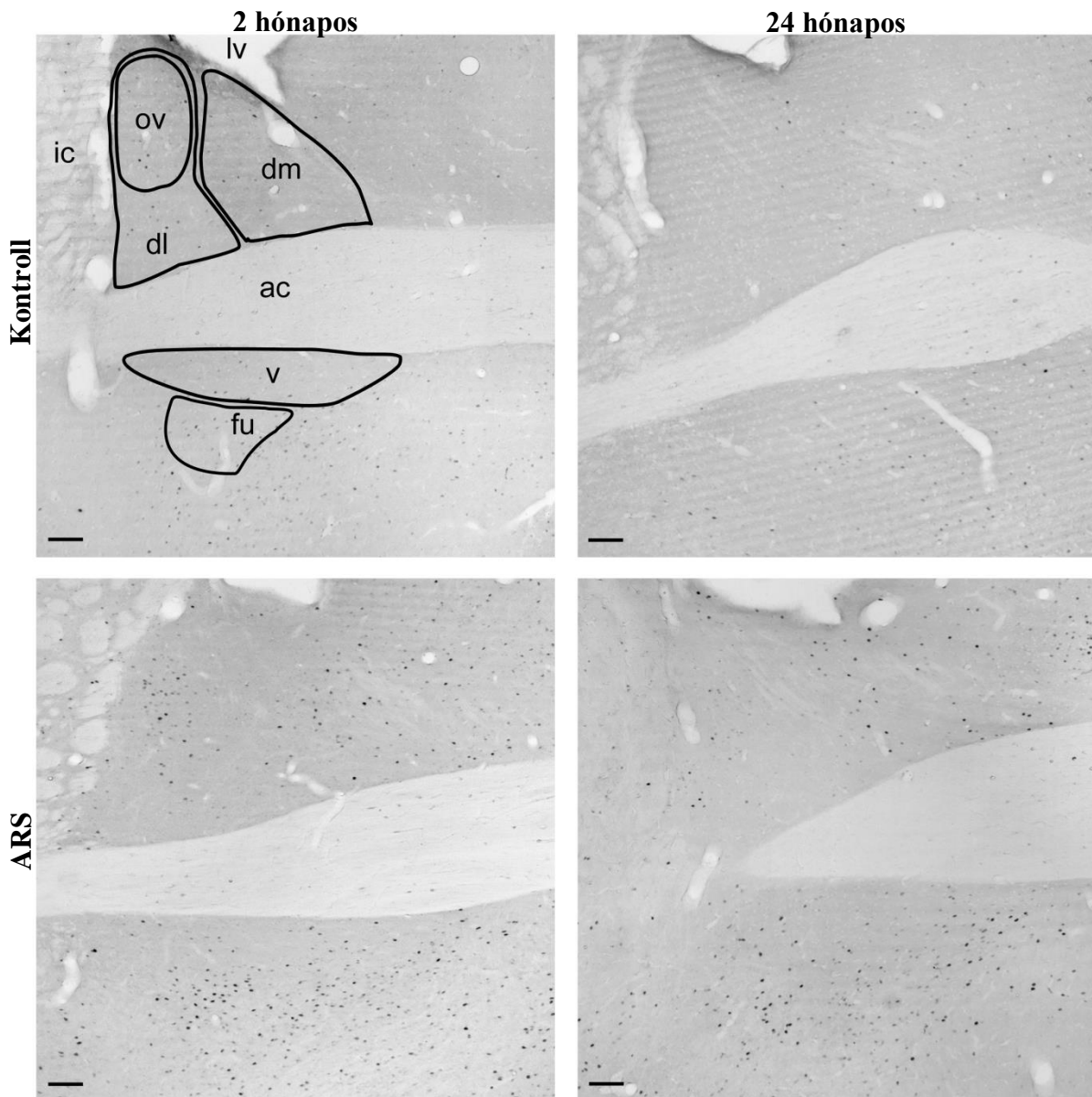


14. ábra: A FOS jelölés eredményei a BNSTfu területén (n=4-5 db/csoport). Az ARS (stressz) szignifikánsan megemelte a sejtszámot az 1, 1,5, 2, és 3 hónapos (H) korcsoportokban (ezeket a különbségeket nem emeltük ki). Ezzel szemben az ARS (stressz)-nek nem volt szignifikáns hatása a 6, 12, 18 és 24 hónapos korcsoportok sejtszámaira (nsz. $p > 0,05$). A legmagasabb sejtszámot a 2 hónapos ARS (stressz) csoportban detektáltuk, mely érték különbözött a 6, 12, 18 és 24 hónapos ARS (stressz) indukálta állatok értékeihez képest (Tukey-féle *post hoc* teszt, $*p < 0,05$).

A fusiform magban a stressz ($F_{1,57}=128,95$; $p < 10^{-6}$) és az életkor ($F_{7,53}=11,69$; $p < 10^{-6}$) fő hatását, mint a FOS immunreaktivitást befolyásoló tényezőket megerősítette a kétutas varianciaanalízis. Más általunk vizsgált BNST magoktól eltérően a fő hatások interakciója is szignifikánsnak mutatkozott ($F_{7,57}=2,44$; $p < 0,05$) (14. ábra).

A FOS sejtszám alacsonynak bizonyult minden korcsoportban, a kontroll állatokban. A 18 hónapos egyedek mutatták a legalacsonyabb értéket, de nem találtunk statisztikai különbségeket a csoportok bazális FOS tartalma között. Az ARS átlagosan 3-4-szeresére emelte a FOS immunjelet a kontrollokhoz képest az 1, 1,5 és 3 hónapos korcsoportokban ($p < 0,05$). A legnagyobb FOS immunreaktív sejtszámot a 2 hónapos patkányok mutatták, mely érték hatszoros növekedésnek felel meg a 2 hónapos kontrollhoz képest. Az ARS indukálta FOS immunreaktivitási korfüggő csökkenése a 6 hónapos életkortól bizonyult szignifikánsnak a fiatalabb stressznek kitett állatok FOS sejtszámaához viszonyítva. A kor előrehaladtával megjelenő FOS sejtszám csökkenés olyan mértékű volt ezen az agyterületen, hogy a 3-6 szoros ARS indukálta sejtszám növekedés nem bizonyult szignifikáns mértékűnek a 6, 12, 18 és 24 hónapos csoportokban a Tukey-féle teszt szerint. A Spearman korreláció analízis a kontroll ($\rho = -0,609$; $p < 10^{-6}$) és ARS ($\rho = -0,695$; $p < 10^{-6}$) csoportokban is megerősítette a FOS

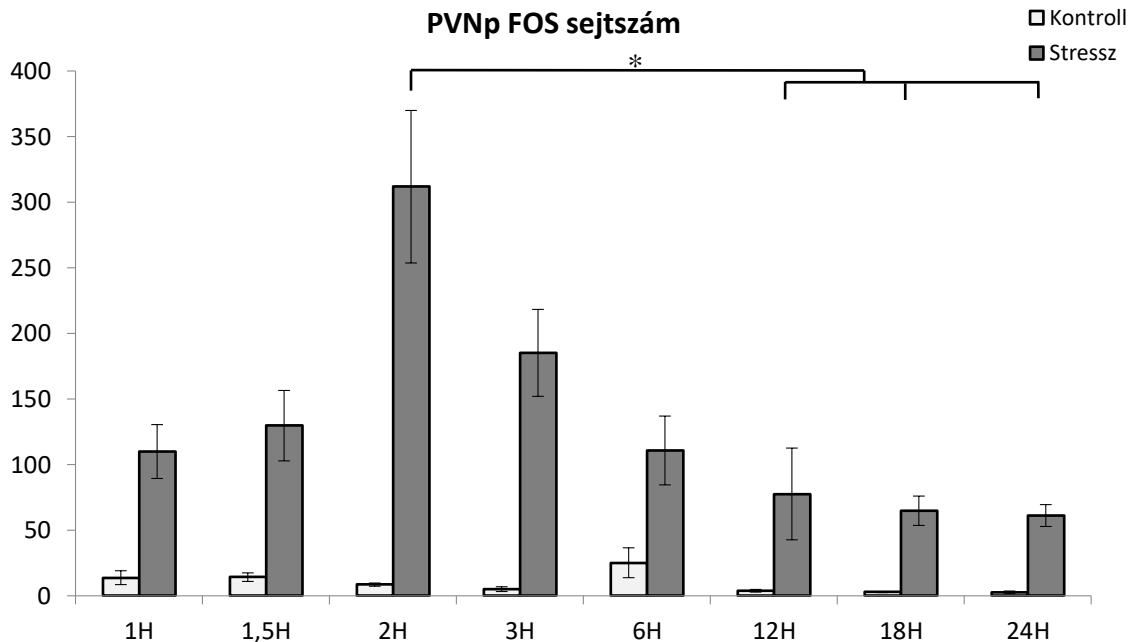
jel korfüggő csökkenését. Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 15-ös ábrán láthatóak.



15. ábra: Életkorfüggő FOS immunreaktivitás a BNST magokban. A képek a 2 és 24 hónapos kontroll, valamint ARS (stressz)-nek kitett állatok mintáit reprezentálja. A bal felső panelen megjelöltük az általunk vizsgált BNST almagok határait. (BNSTov-nucleus interstitialis striae terminalis ovalis almagja, BNSTdm-nucleus interstitialis striae terminalis dorsomedialis almagja, BNSTdl- nucleus interstitialis striae terminalis dorsolateralis almagja, BNSTv- nucleus interstitialis striae terminalis ventralis almagja, BNSTfu- nucleus interstitialis striae terminalis fusiformis almagja). Alkalmazott egyéb rövidítések: ic: capsula interna, ac: commissura anterior, lv: ventriculus lateralis. A lépték 100 μ m-t jelöl.

5.1.3. Nucleus paraventricularis hypothalami

Nucleus paraventricularis pars parvocellularis (PVNp)



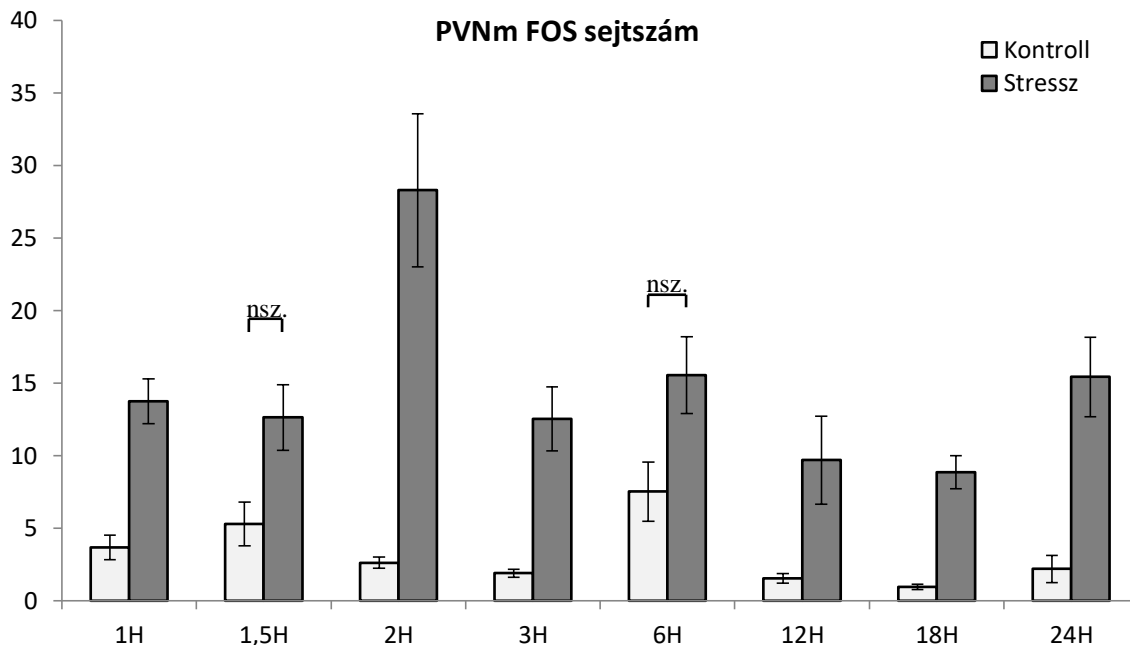
16. ábra: A FOS jelölés eredményei a PVNp területén (n=4-5db/csoport). Az ARS (stressz) szignifikánsan megemelte a sejtszámot minden korcsoportokban (ezeket a különbségeket nem emeltük ki). A legmagasabb sejtszámot a 2 hónapos ARS (stressz) csoportban detektáltuk, mely érték különbözött a 12, 18 és 24 hónapos ARS (stressz) állatok értékeihez képest (Tukey-féle *post hoc* teszt, *p<0,05).

A kétutas ANOVA megerősítette a stressz ($F_{1,57}=298,44$; $p<10^{-6}$), az életkor ($F_{7,57}=6,18$; $p<0,0001$) valamint a két faktor interakciójának ($F_{7,57}=2,67$; $p<0,02$) hatását a FOS sejtek számára (16. ábra).

A *post hoc* analízis nem talált szignifikáns különbséget a csoportok között a bazális FOS immunjel mértéke tekintetében. A FOS sejtszám csoportonkénti átlagértéke $2,72 \pm 1,00$ (24 hónapos) és $25 \pm 11,36$ (6 hónapos) között volt. Az ARS minden korcsoportban 4-36-szorosára emelte a FOS aktivitást a bazális csoport értékeihez képest, amely minden esetben szignifikáns növekedésnek bizonyult ($p<0,05$). A legnagyobb mértékű, 36-szoros ARS indukálta sejtszám növekedést a 2 hónapos állatokban detektáltuk az azonos korú kontroll állatokhoz képest ($p<10^{-6}$). A kor előrehaladtával az ARS indukálta FOS immunjel mértéke a 2 hónapos ARS állatokhoz viszonyítva jelentősen csökken 12- ($p<0,03$), 18 ($p<0,05$) és 24 hónapos ($p<0,05$) csoportokban.

A korfüggő FOS immunreaktivitás csökkenést a Spearman teszt is megerősítette, mind a kontroll ($\rho=-0,562$; $p<10^{-6}$), mind a stressznek kitett állatok esetében ($\rho=-0,508$; $p<10^{-6}$). Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 18-as ábrán láthatóak.

Nucleus paraventricularis pars magnocellularis (PVNm)

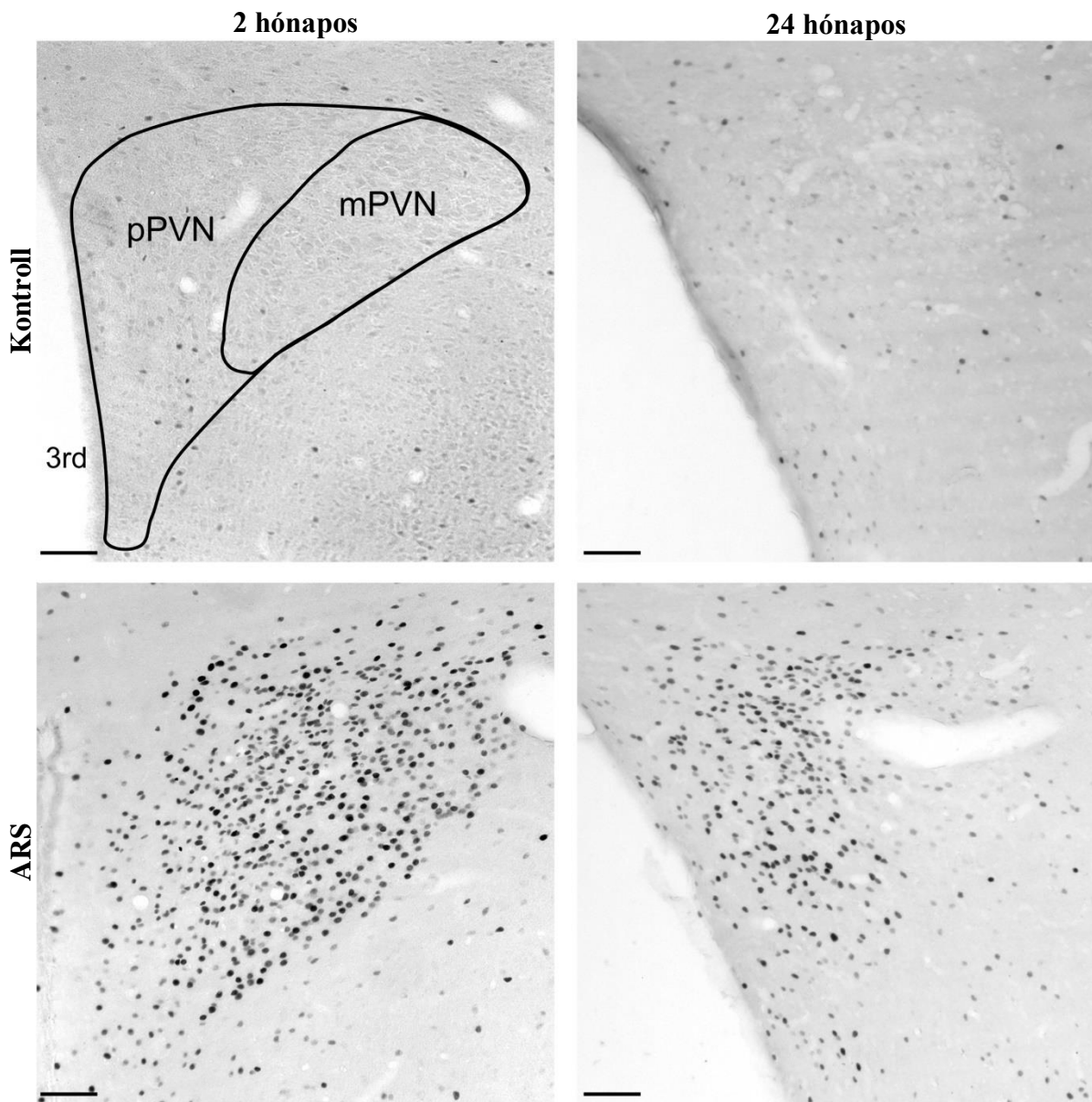


17. ábra: A FOS jelölés eredményei a PVNp területén ($n=4-5$ db/csoport). Az ARS (stressz) szignifikánsan megemelte a FOS sejtszámot a legtöbb korcsoportban (ezeket az adatokat nem emeltük ki), kivéve az 1,5 és 6 hónapos (H) állatokat (nsz. $p>0,05$). A legmagasabb sejtszámot a 2 hónapos ARS (stressz) csoportban detektáltuk, mely érték nem különbözött a többi (stressz) indukálta állatok értékeihez képest ($p>0,05$).

A FOS immunreaktív sejtek számát a stressz ($F_{1,57}=173,59$; $p<10^{-6}$), a kor ($F_{7,57}=5,61$ $p<10^{-4}$), és interakciójuk ($F_{7,57}=2,48$; $p<0,03$) is befolyásolta (17. ábra). Továbbá a Spearman analízis megerősítette, hogy FOS immunpozitív sejtszám csökken a kor előrehaladtával a kontroll ($\rho=-0,480$; $p=0,003$) állatokban. Ugyanezt a stresszelt ($\rho=-0,208$; $p=0,224$) csoportoknál nem tudtuk megerősíteni.

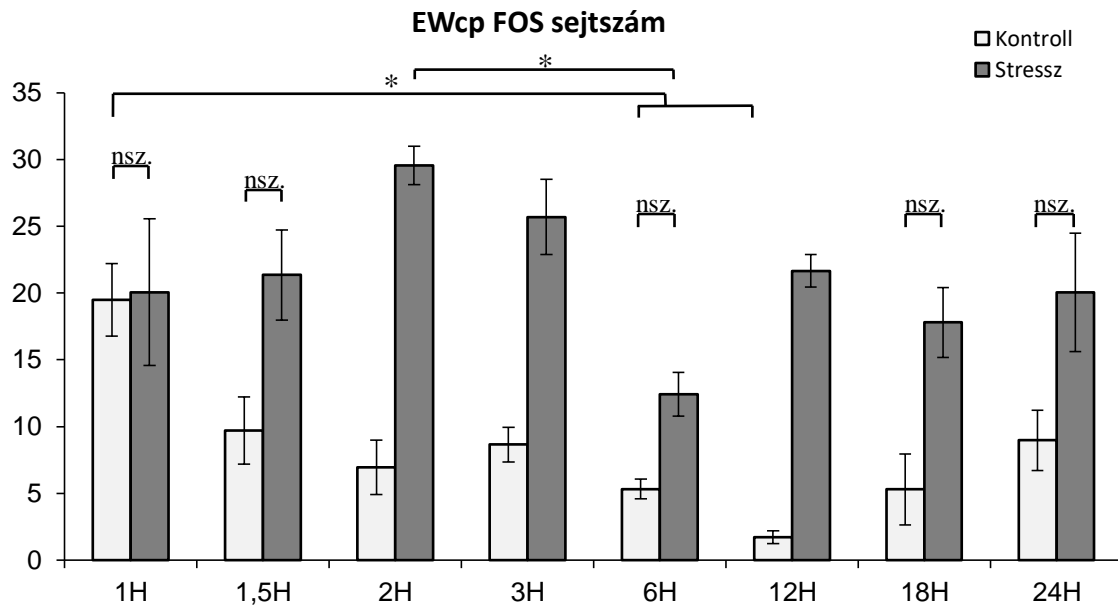
A kontroll egyedeknél a FOS tartalmú sejtek száma $0,96\pm 0,18$ (18 hónapos) és $6,28\pm 1,79$ (6 hónapos) között váltakozott. Az ARS indukálta FOS aktivitás átlagosan 6-10-szerese volt a bazális immunreaktív sejtszámnak. Az 1,5 ($p=0,28$) valamint 6 ($p=0,27$) hónapos korcsoportok kivételével, ez a különbség szignifikánsak bizonyult. Az 1,5 és 6 hónapos állatok esetében az ARS által okozott FOS immunjel növekedés csupán kétszerese volt a korban megfelelő kontroll csoportjukhoz képest, mely az ebben a csoportokban megfigyelt némileg magasabb bazális FOS tartalommal is magyarázható. A FOS sejtek száma a 2

hónapos ARS állatokban volt a legmagasabb, de egyik stressznek kitett korcsoport sem tért el ettől szignifikáns mértékben ($p > 0,05$). Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 18-as ábrán láthatóak.



18. ábra: Életkorfüggő FOS immunreaktivitás a PVN-ben. A képek a 2 és 24 hónapos kontroll, valamint ARS (stressz)-nek kitett állatok mintáit reprezentálják. A bal felső panelen jelöltük a PVN vizsgált almagjainak határait (pPVN-nucleus paraventricularis pars parvocellularis, mPVN-nucleus paraventricularis pars magnocellularis). Alkalmazott egyéb rövidítések: 3rd: ventriculus tertius. A lépték 100 μ m-t jelöl.

5.1.4. A centrális projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp)

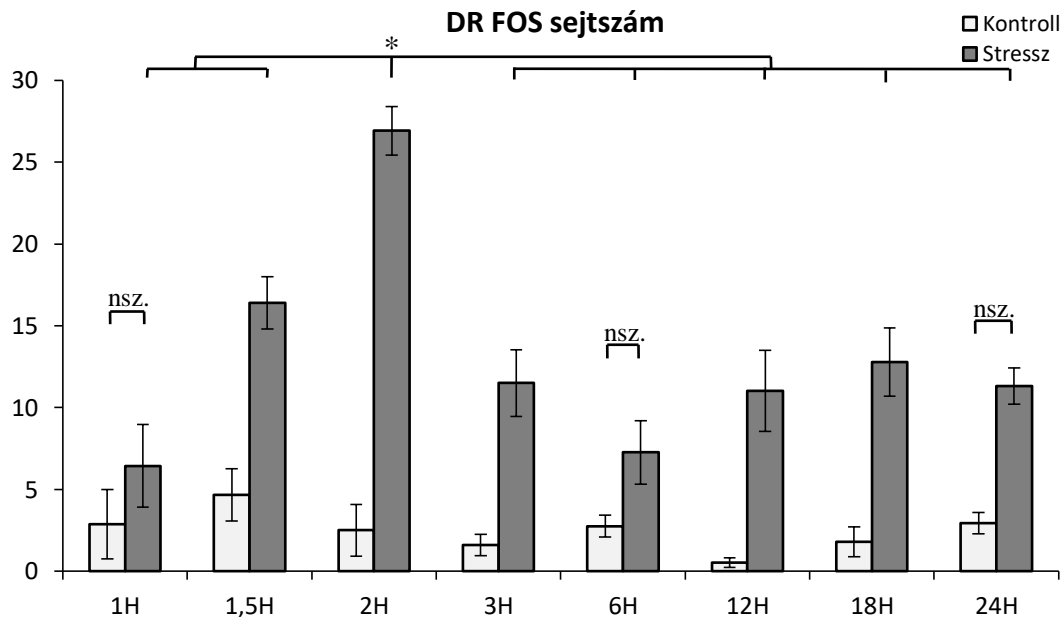


19. ábra: A FOS jelölés eredményei a EWcp területén (n=4-5db/csoport). Az ARS (stressz) szignifikánsan megemelte a FOS sejtszámot a 2, 3 és 12 hónapos (H) korcsoportokban (ezeket a különbségeket nem emeltük ki). Ezzel szemben az ARS nem okozott sejtszám emelkedést a többi korcsoportban (nsz. $p > 0,05$). A kontroll állatok között a legmagasabb sejtszámot az 1 hónapos csoportban detektáltuk, mely szignifikánsan különbözött a 6, és 12 hónapos kontroll egyedek értékeitől (Tukey-féle *post hoc* teszt, $*p < 0,05$). A legmagasabb sejtszámmal a 2 hónapos ARS (stressz) csoport rendelkezett, mely azonban csupán a 6 hónapos ARS (stressz) csoport értékénél bizonyult szignifikánsan magasabbnak (Tukey-féle *post hoc* teszt, $*p < 0,05$).

Az EWcp-ben a FOS tartalmú sejtek számát a stressz ($F_{1,57}=85,12$; $p < 10^{-6}$), a kor ($F_{7,57}=3,89$; $p < 0,005$) és azok interakciója ($F_{7,57}=3,36$; $p < 0,01$) is befolyásolta (19. ábra).

Igen magas bazális FOS jelet mutatott az egy hónapos kontroll csoport ($19,50 \pm 2,71$), mely szinte megegyezett az egykorú stressz csoport ($20,02 \pm 5,49$) átlagértékével ($p=0,88$). A legalacsonyabb FOS sejtszámot a 12 hónapos kontroll állatokban találtuk ($1,73 \pm 0,48$), mely kisebb ($p < 0,02$) volt, mint az egy hónapos kontroll egyedek értéke. A stressz expozíció szignifikáns mértékben 3-12-szeresére megnövelte a 2, 3, és 12 hónapos állatokban FOS tartalmú sejtek számát az EWcp-ben. A FOS aktivitás korfüggő csökkenése kevésbé volt kifejezett az EWcp területén, mivel csupán a 6 hónapos ARS állatok stressz indukálta FOS válasza volt szignifikánsan alacsonyabb a fiatal állatokhoz viszonyítva. Ezt tükrözi a Spearman korreláció analízis eredménye is, mely a FOS és az életkor összefüggését nem tudta megerősíteni a kontroll ($\rho = -0,199$; $p = 0,244$) csoportokban, ezzel ellentétben, a FOS jel mértéke az életkorral csökkent a stressznek kitett állatokban ($\rho = -0,430$; $p < 0,05$). Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 21-es ábrán láthatóak.

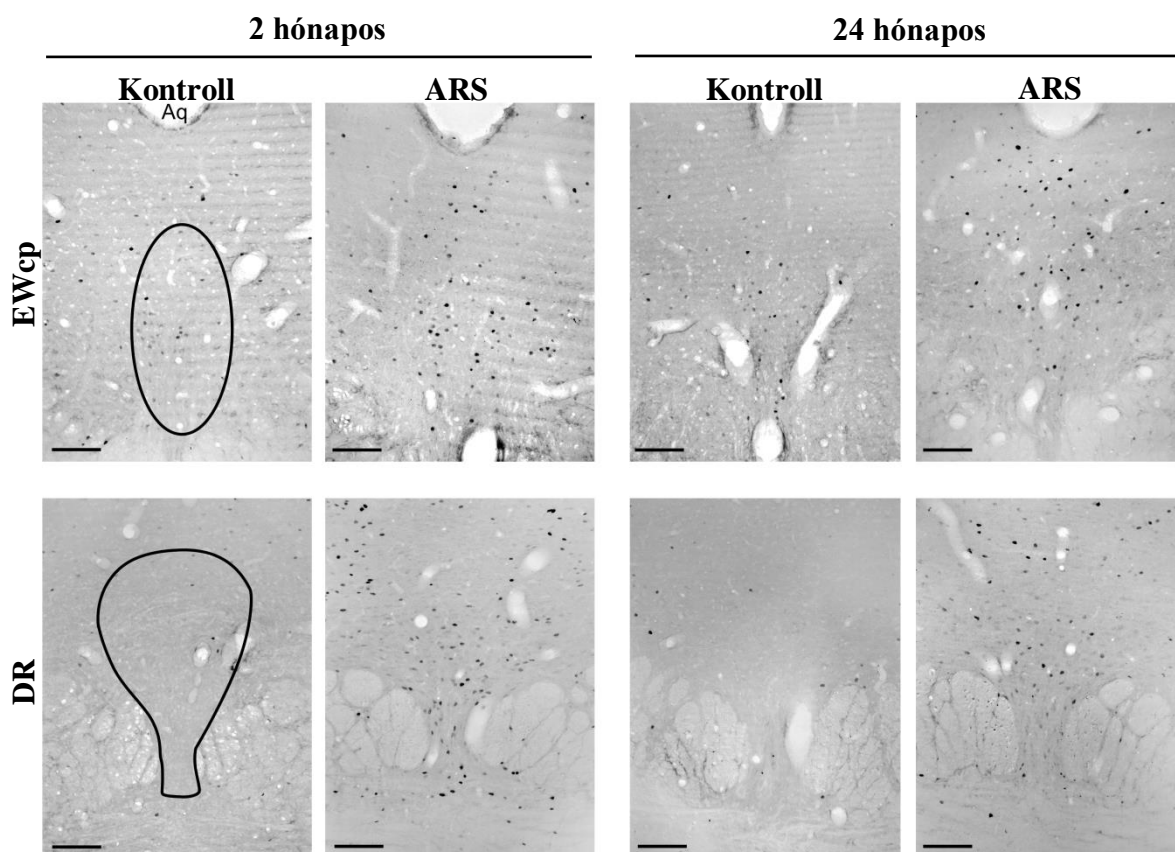
5.1.5. Nucleus raphe dorsalis (DR)



20. ábra: A FOS jelölés eredményei a DR területén (n=4-5db/csoport). Az ARS (stressz) szignifikánsan megemelte a sejtszámot az 1,5, 2, 3, 12 és 18 hónapos (H) korcsoportokban (ezeket a különbségeket nem emeltük ki). Ezzel szemben az ARS (stressz) indukálta sejtszám emelkedés nem érte el a szignifikancia szintjét az 1, 6 és 24 hónapos korcsoportokban (nsz. $p > 0,05$). A legmagasabb sejtszámmal a 2 hónapos ARS (stressz) csoport rendelkezett, mely minden más ARS (stressz) csoport értékénél nagyobbak bizonyult (Tukey-féle *post hoc* teszt, $*p < 0,05$).

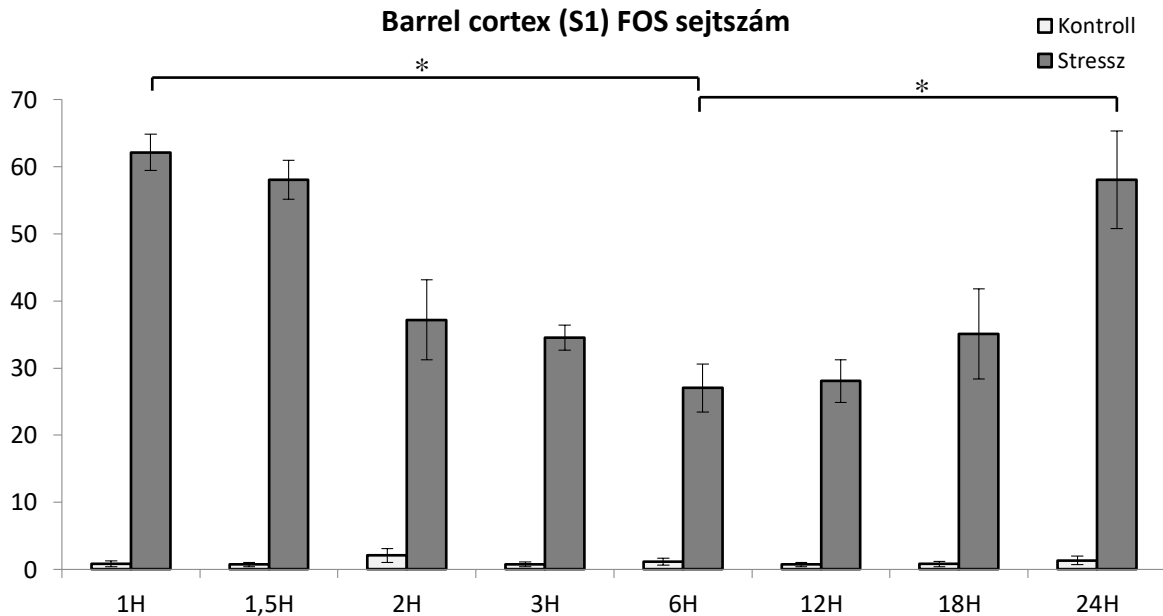
Az akut stressz expozíció ($F_{1,57}=157,87$; $p < 10^{-6}$), az életkor ($F_{7,57}=8,93$; $p < 10^{-6}$) és a két faktor interakciója is ($F_{7,57}=7,69$; $p < 10^{-5}$) befolyásolta a FOS tartalmú sejtek számát a DR területén (20. ábra). A Spearman-féle korreláció analízis nem talált lineáris összefüggést a FOS immunjel és az állatok kora között, sem a kontroll ($\rho = -0,067$; $p = 0,702$) sem a stressz ($\rho = -0,177$; $p = 0,303$) csoportban.

A kontroll csoportokat alacsony bazális FOS sejtszám jellemezte, melynek minimumát a 12 hónapos ($0,53 \pm 0,21$), a legmagasabb értéket az 1,5 hónapos ($4,66 \pm 1,59$) egyedekben detektáltuk. Az 1, 6 és 24 hónapos csoportok kivételével, az ARS szignifikáns mértékben megemelte a FOS tartalmú sejtek számát ($p < 0,05$). Az ARS indukálta FOS immunjel átlagosan 4-20-szorosa volt a kontroll egyedek bazális immunreaktivitásának. A legmagasabb FOS aktivitást a két hónapos állatoknál találtuk, mely minden más csoport értékétől különbözött. Egyéb különbségeket a stressznek kitett csoportok között nem találtunk. Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 21-es ábrán láthatóak.



21. ábra: Életkorfüggő FOS immunjel az EWcp-ben és a DR-ban. A képek a 2 és 24 hónapos kontroll, valamint ARS (stressz)-nek kitett állatok mintáit reprezentálja magonként. A kijelölt területek az általunk vizsgált régiókat jelölik (EWcp-központi projekciójú nucleus Edinger-Westphal, DR-nucleus raphe dorsalis). Egyéb alkalmazott rövidítés: Aq-aqueductus cerebri. A lépték 100 μ m-t jelöl.

5.1.6. A somatosensoros barrel cortex (S1)

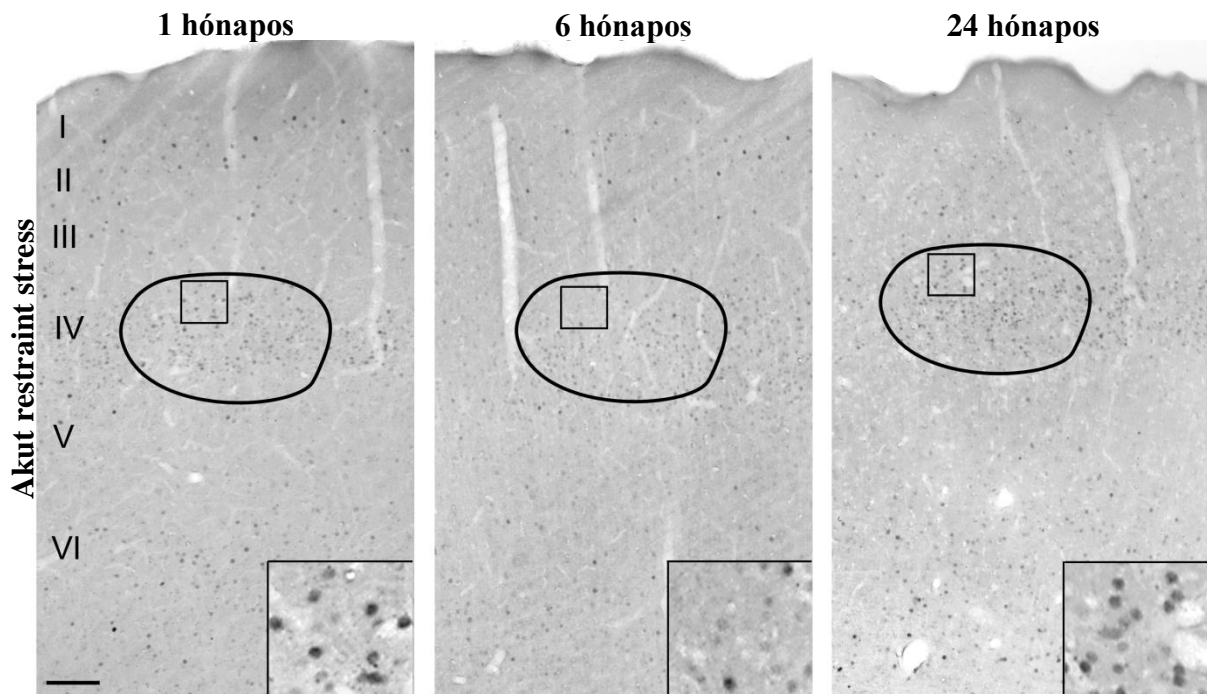


22. ábra: A FOS jelölés eredményei a barrel cortex (S1) területén (n=4-5db/csoport). Az ARS (stressz) szignifikánsan megemelte a sejtszámot minden korcsoportokban (ezeket a különbségeket nem emeltük ki). A legmagasabb sejtszámokat az 1, 2 és 24 hónapos állatoknál detektáltuk. A legkisebb értékkel a 6 hónapos állatok rendelkeztek, mely szignifikánsan alacsonyabb volt az 1 és 24 hónapos állatok sejtszámához képest (Tukey-féle *post hoc* teszt $* < 0,05$). Kiemelendő, hogy a korfüggő változás egy U alakú görbét ír le, szemben a stressz-asszociált területeken megfigyeltekkel.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy a korral változó dinamikát mutató FOS válasz olyan agyterületre is jellemző-e, mely nem játszik fontos szerepet a stressz-adaptáció szabályozásában, kiválasztottuk az S1 (barrel cortex) régióban a IV réteget. Azért esett a választásunk erre a régióra, mert az állatok bajuszszálait a restrainer cső kúposan kiképzett vége meghajlította, ingerelve azokat a stressz időtartama alatt.

Az eredmények azt mutatták, hogy a kontroll állatokban gyakorlatilag detektálhatatlan volt a FOS immunjel a IV rétegben. Az ARS okozta stimulus ugyanakkor erőteljes a FOS választ eredményezett, és az ANOVA megerősítette, hogy a stressz ($F_{1,57}=956,36$; $p < 10^{-6}$), és a kor is ($F_{7,57}=2,43$; $p < 0,03$) hatással volt a barrel cortex IV lamina sejtjeinek FOS aktivitására, a faktorok interakciója nélkül (22. ábra). Az ARS-en átesett állatok sejtszámait egyutas ANOVA segítségével értékelve azt láttuk, hogy a FOS immunreaktivitás változik a korral ($F_{7,28}=9,56$, $p < 4 \times 10^{-5}$). A legfiatalabb állatok ($62,16 \pm 2,71$) kétszer nagyobb FOS választ mutattak, mint a 6 ($27,05 \pm 3,57$) és a 12 hónapos ($28,08 \pm 3,17$) egyedek átlagértékei. Más agyterületekkel ellentétben, a 18 hónapos ARS állatok az S1 területén kissé magasabb FOS sejtszámmal rendelkeztek ($35,08 \pm 6,71$), mint a 6 és 12 hónapos patkányok, habár nem állt fenn közöttük szignifikáns statisztikai különbség. A 24 hónapos ARS állatok viszont már

szignifikánsan, mintegy kétszer magasabb ($58,04 \pm 7,26$) FOS sejtszámot mutattak, mint a 6 és 12 hónapos ARS egyedek ($p < 0,001$). Továbbá, a 24 hónapos ARS állatok a legfiatalabbakhoz hasonló magas FOS választ adták. Az ARS állatok FOS immunjelének változásában egy U alakú görbét adó korfüggő dinamika fedezhető fel. Ennek megfelelően, a Spearman-féle korreláció analízis nem talált lineáris összefüggést a FOS megjelenése és életkor között ($\rho = 0,281$, $p = 0,102$). Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 23-as ábrán láthatóak.



23. ábra: Életkorfüggő FOS immunjel a barrel cortex-ben (S1). A képek az 1, 6 és 24 hónapos ARS-nek kitett állatokból származnak. A római számok a cortex laminákat jelölik. A IV rétegben kijelölt területet vizsgáltuk. A fekete négyszögben kiemeltünk egy területet, amelynek nagyítását megnöveltük a jobb láthatóság érdekében. A fekete vonal (lépték) 100 μm -t jelöl.

5.1.7. Az akut restraint stressz modell statisztikai összefoglaló táblázatai

Agyterület	Két utas ANOVA					
	Fő hatások				Stressz és Kor interakció	
	Stressz		Kor			
	F _{1,57}	p	F _{7,57}	p	F _{7,57}	p
MeA	517,11	<10 ⁻⁶	16,05	<10 ⁻⁶	0,73	0,65
CeA	234,27	<10 ⁻⁶	17,75	<10 ⁻⁶	8,94	<10 ⁻⁶
BLA	252,76	<10 ⁻⁶	3,45	<0,005	3,02	<0,01
BNSTov	51,24	<10 ⁻⁶	13,61	<10 ⁻⁶	1,24	0,29
BNSTdl	47,43	<10 ⁻⁶	15,110	<10 ⁻⁶	2,00	0,07
BNSTdm	254,45	<10 ⁻⁶	16,703	<10 ⁻⁶	1,41	0,22
BNSTv	177,10	<10 ⁻⁶	3,38	<0,005	0,79	0,59
BNSTfu	128,96	<10 ⁻⁶	11,68	<10 ⁻⁶	2,44	<0,05
PVNp	298,44	<10 ⁻⁶	6,18	<10 ⁻⁴	2,67	<0,02
PVNm	173,59	<10 ⁻⁶	5,61	<10 ⁻⁴	2,48	0,03
EWcp	85,11	<10 ⁻⁶	3,89	<0,005	3,36	<0,01
DR	157,87	<10 ⁻⁶	8,93	<10 ⁻⁶	8,03	<10 ⁻⁵
S1	956,36	<10 ⁻⁶	2,43	<0,04	1,95	0,07

4. táblázat: Összefoglaló táblázat az ARS modellben megfigyelt FOS sejtszámok kétutas varianciaanalízissel (ANOVA) történt értékelésének eredményeiről. A szignifikáns eltéréseket félkövér betűtípussal emeltük ki. Alkalmazott rövidítések: amygdala komplex magjai: nucleus medialis amygdalae (MeA), nucleus centralis amygdalae (CeA), nucleus basolateralis amygdalae (BLA). A nucleus interstitialis striae terminalis (BNST) magjai: ovális mag (BNSTov), dorsolateralis mag (BNSTdl), dorsomedialis (BNSTdm), ventralis (BNSTv), fusiformis (BNSTfu). Hypothalamus: nucleus paraventricularis pars parvocellularis (PVNp), nucleus paraventricularis pars magnocellularis (PVNm). Egyéb területek: központi projekciójú Edinger-Westphal nucleus (EWcp), nucleus raphe dorsalis (DR), somatosensoros barrel cortex (S1). A magokban, ahol nem detektáltunk szignifikáns interakciót külön vizsgáltuk a kontroll és stresszes állatokat korfüggő FOS aktivitását egyutas ANOVA segítségével (lásd 5. táblázat).

Mag neve	Kondíció	Egyutas ANOVA	
		Az életkor fő hatása	
		F*	p
MeA	Kontroll	$F_{7,29}=6.54$	$p<0.001$
	ARS	$F_{7,28}=28.70$	$p<10^{-6}$
BNSTov	Kontroll	$F_{7,29}=9.62$	$p<10^{-5}$
	ARS	$F_{7,28}=7.46$	$p<10^{-4}$
BNSTdl	Kontroll	$F_{7,29}=7.69$	$p<10^{-4}$
	ARS	$F_{7,28}=11.10$	$p<10^{-4}$
BNSTdm	Kontroll	$F_{7,29}=7.93$	$p<0.001$
	ARS	$F_{7,28}=11.17$	$p<10^{-4}$
BNSTv	Kontroll	$F_{7,29}=1.91$	$p=0.10$
	ARS	$F_{7,28}=3.06$	$p<0.02$
S1	Kontroll	$F_{7,29}=1.58$	$p=0.18$
	ARS	$F_{7,28}=9.56$	$p<10^{-5}$

5. táblázat: Összefoglaló táblázat az ARS modellben megfigyelt FOS sejtszámok egyutas varianciaanalízissel (ANOVA) történt értékelésének eredményeiről. A szignifikáns különbségeket félkövéren emeltük ki. Alkalmazott rövidítések: nucleus medialis amygdalae (MeA), nucleus interstitialis striae terminalis (BNST) ovális (BNSTov), dorsolateralis (BNSTdl), dorsomedialis (BNSTdm) és ventralis (BNSTv) divíziói, somatosensoros barrel cortex (S1). *: az F értékeket jellemző szabadsági fokok száma kondícióként eltértek a különböző elemszámok következtében: Kontroll esetében: $F_{7,29}$, ARS esetében $F_{7,28}$.

Agyterület neve	Kondíció	Spearman korreláció	
		ρ	p
MeA	Kontrol	-0,747	<0,001
	ARS	-0,828	<0,001
CeA	Kontrol	-0,838	<0,001
	ARS	-0,575	<0,001
BLA	Kontrol	-0,573	<0,002
	ARS	0,075	0,662
BNSTov	Kontrol	-0,752	<0,001
	ARS	-0,696	<0,001
BNSTdl	Kontrol	-0,788	<0,001
	ARS	-0,707	<0,001
BNSTdm	Kontrol	-0,675	<0,001
	ARS	-0,777	<0,001
BNSTv	Kontrol	-0,410	<0,05
	ARS	-0,314	0,066
BNSTfu	Kontrol	-0,609	<0,001
	ARS	-0,695	<0,001
PVNp	Kontrol	-0,562	<0,001
	ARS	-0,508	<0,003
PVNm	Kontrol	-0,480	<0,004
	ARS	-0,208	0,224
EWcp	Kontrol	-0,430	<0,02
	ARS	-0,199	0,244
DR	Kontrol	-0,067	0,702
	ARS	-0,177	0,303
S1	Kontrol	0,104	0,552
	ARS	-0,281	0,102

6. táblázat: Az életkor és a FOS sejtszám közötti összefüggés vizsgálata. A Spearman-féle korreláció analízis eredményei az akut restraint stressz (ARS) modellben és kontroll állatokban. A szignifikáns eredményeket félkövéren emeltük ki. Alkalmazott rövidítések: nucleus medialis (MeA), centralis (CeA) et basolateralis amygdalae (BLA). A nucleus interstitialis striae terminalis (BNST) ovális (BNSTov), dorsolateralis (BNSTdl), dorsomedialis (BNSTdm), ventralis (BNSTv), fusiformis (BNSTfu) divíziói. Nucleus paraventricularis pars parvocellularis (PVNp), nucleus paraventricularis pars magnocellularis (PVNm), centrális projekciójú Edinger-Westphal nucleus (EWcp), nucleus raphe dorsalis (DR), somatosensoros barrel cortex (S1).

5.2. A CRF tartalmú idegsejtek korfüggő neuronális aktivás mintázata ARS és CVMS modellekben

Az első kísérletsorozatban láttuk a stressz-asszociált területeken a FOS korfüggő dinamikáját a CRF tartalmú területeken is (CeA, BNSTov, PVNp). Továbbá tapasztaltuk, hogy a CORT válasz is életkorfüggő. Így feltételezhető a CRF neuronok korfüggő (re)aktivitása is, ezért a kísérletet megismételtük kiegészítve hat korcsoportban CVMS stresszel. A továbbiakban utóbbi tanulmányunk eredményeiről írunk részletesen. A teljes összefoglaló statisztikai táblázatok a fejezet végén találhatóak (7-10. táblázatok).

5.2.1. A CRF tartalmú idegsejtek korfüggő neuronális aktivitás mintázata ARS modellben

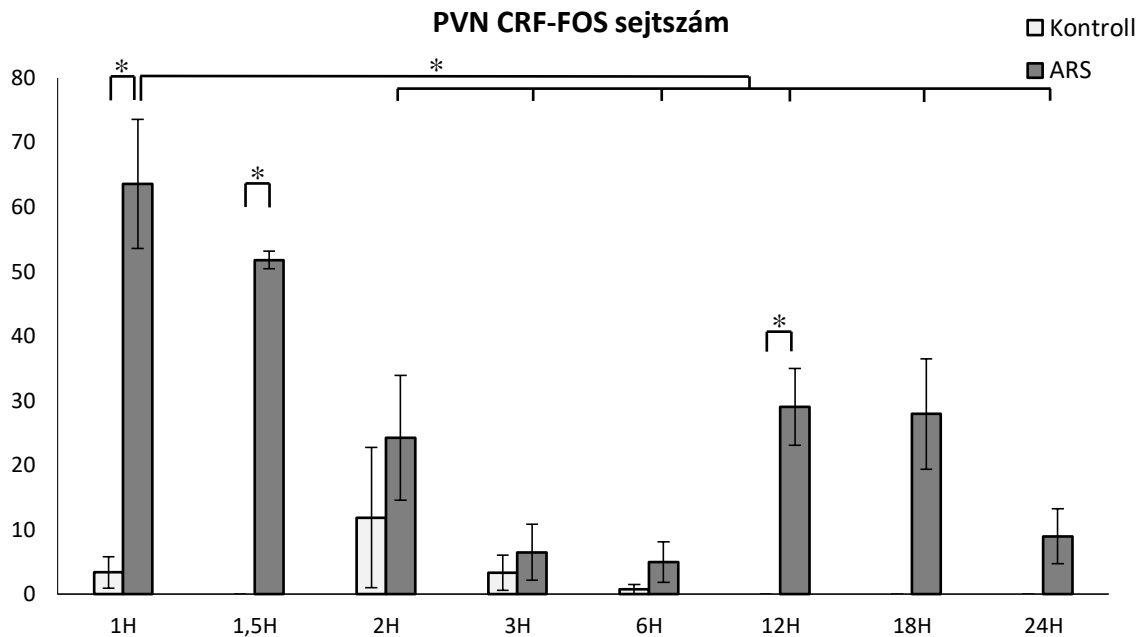
5.2.1.1. ARS protokoll hatékonysága

Plazma corticosterone eredmények

Megvizsgáltuk az állatok ARS során létrejött HPA-tengely aktivitását, hogy megbizonyosodtunk az akut stressz hatásosságáról. A vizsgálatban mértük az állatok plazma CORT szintjét. Mind az ARS ($F_{1,78}=3,54$; $p<0,01$), mind a kor ($F_{7,78}=30,73$; $P<10^{-5}$), mind azok interakciója ($F_{7,78}=4,55$; $P<0,001$) szignifikánsan hatott az állatok corticosterone szintjére. Bár az 1-, 1,5-, 18- és 24 hónapos korcsoportokban az ARS állatok nem mutattak jelentős eltérést a kontroll csoportjukhoz képest, a 3- valamint 6 hónapos korcsoportban az ARS állatok magasabb CORT értékekkel bírtak ($p<10^{-4}$), mint kontroll társaik. A 2- és 12 hónapos ARS egyedek bár magasabb CORT szinttel rendelkeztek, mint kontroll társaik, a különbség nem volt statisztikailag kimutatható (Tukey-féle *post hoc* teszt).

5.2.1.2. CRF tartalmú idegsejtek aktivitásának korfüggő dinamikája ARS-ben

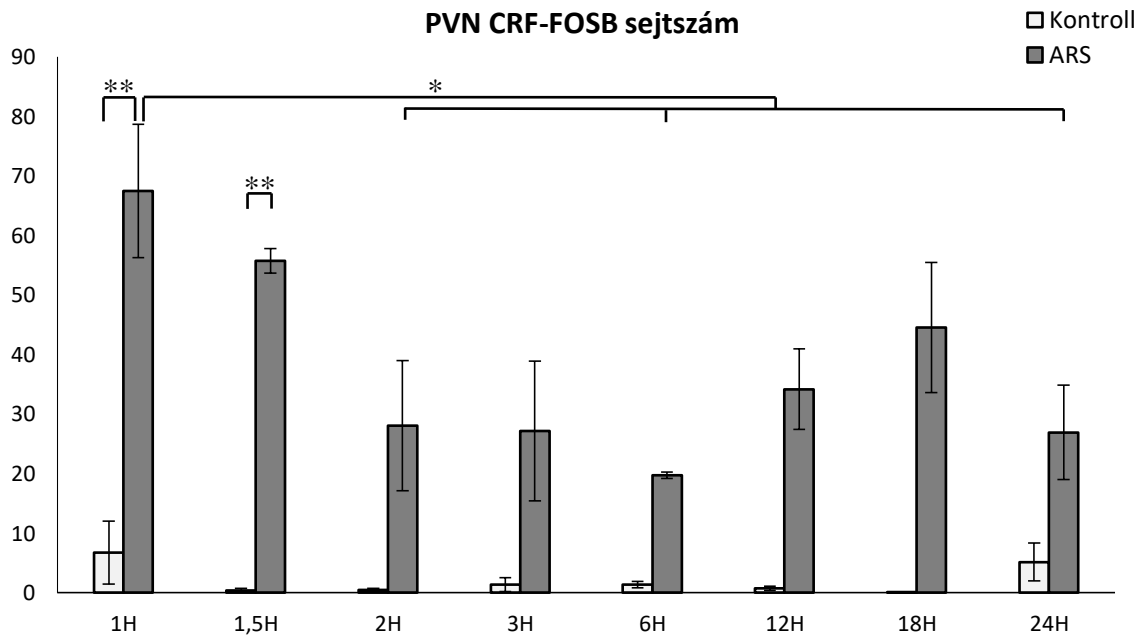
A nucleus paraventricularis CRF sejtjeinek FOS tartalma



24. ábra: A PVN CRF sejtjeinek FOS tartalma (n=4-8 db/csoport). Az ARS (stressz) szignifikánsan megemelte a CRF-FOS sejttségét az 1, 1,5 és 12 hónapos (H) korcsoportokban (Tukey-féle *post hoc* teszt, $*p < 5 \times 10^{-4}$). A legmagasabb sejttség az 1 hónapos ARS csoportban detektáltuk, mely szignifikánsan különbözött a 2, 3, 6, 12, 18 és 24 hónapos ARS csoportokban mért eredményekhez képest (Tukey-féle *post hoc* teszt, $*p < 5 \times 10^{-4}$).

A kétutas varianciaanalízis megerősítette a stressz ($F_{1,78}=7,72$; $p < 10^{-5}$) és az életkor ($F_{7,78}=74,39$; $p < 10^{-6}$) hatását is a CRF-et és FOS-t is tartalmazó sejtek számára, továbbá, kimutatta a két faktor interakcióját is ($F_{7,78}=7,68$; $p < 10^{-5}$) (24. ábra). A *post hoc* teszt alátámasztotta az 1, 1,5 és 12 hónapos állatok CRF-FOS kettősen jelölt sejttségének emelkedését a korban megegyező kontroll csoportjaikhoz képest ($p < 5 \times 10^{-4}$). Az 1 hónapos állatok mutatták a legnagyobb ARS indukálta kettősen jelölt sejttség emelkedést, mely érték a többi csoportéhoz képest nagyobbak ($p < 5 \times 10^{-4}$) bizonyult, a 1,5 hónapos állatok kivételével. A Spearman korreláció analízis bizonyította a kettősen jelölt sejtek számának csökkenését az életkorról ($\rho = -0,61$; $p < 10^{-4}$) az ARS-nek kitett egyedekben. Végül, az ARS állatok PVN CRF-FOS sejttsége erős pozitív korrelációt mutatott a PVN CRF-FOS sejttségekkel ($\rho = 0,76$; $p < 10^{-6}$). Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 27-es ábrán láthatóak.

A nucleus paraventricularis CRF sejtjeinek FOSB tartalma

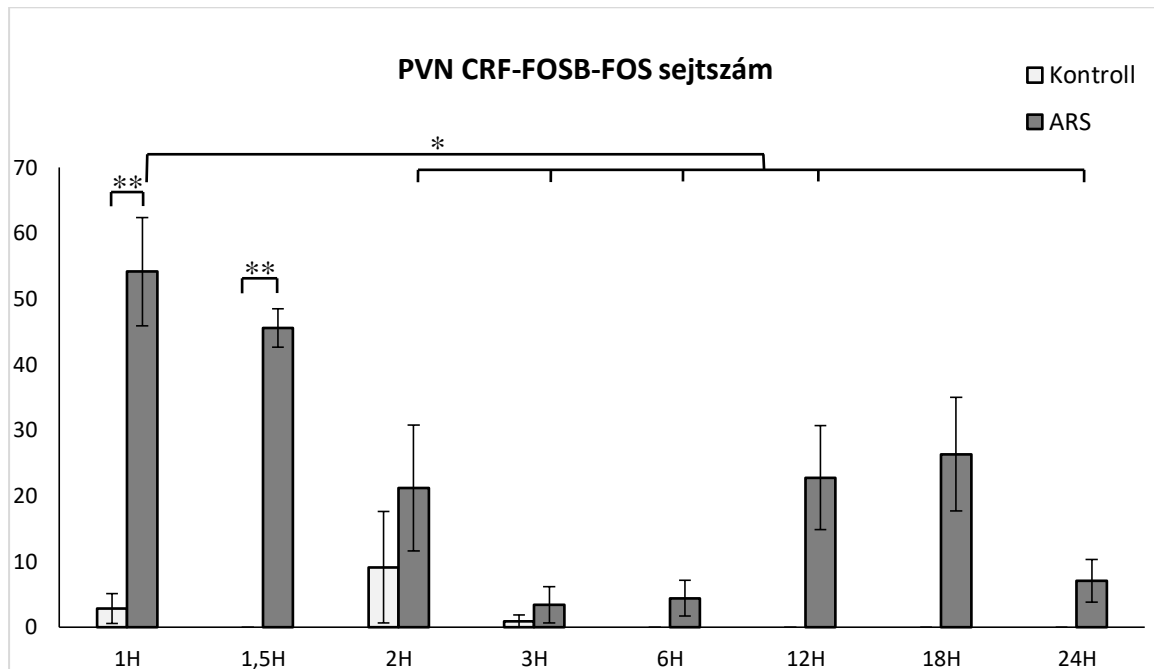


25. ábra: A PVN CRF sejtjeinek FOSB tartalma (n=4-8 db/csoport). Az ARS (stressz) szignifikánsan megemelte a CRF-FOSB sejtszámot az 1, és 1,5 hónapos (H) korcsoportokban (Tukey-féle *post hoc* teszt, $^{***}p < 5 \times 10^{-4}$). A legmagasabb sejtszámot az 1 hónapos ARS csoportban detektáltuk, mely szignifikánsan különbözött a 2, 6, és 24 hónapos ARS csoportokban mért eredményekhez képest (Tukey-féle *post hoc* teszt, $^{*}p < 0,05$).

Az ANOVA igazolta a stressz ($F_{1,78}=89,17$; $p < 10^{-6}$), az életkor ($F_{7,78}=2,67$; $p < 0,05$), valamint ezek interakciójának ($F_{7,78}=3,03$; $p < 0,01$) hatását (25. ábra). A Tukey-féle *post hoc* teszt alapján az 1, illetve az 1,5 hónapos állatok CRF-FOSB tartalmú sejtjeinek száma szignifikáns mértékben megemelkedett ARS során ($p < 5 \times 10^{-4}$). A legtöbb kettősen jelölődött sejtet a legfiatalabb akut restraint csoportban találtuk, mely szignifikánsan különbözött a 2 hónapos ($p < 0,005$), a 6 hónapos ($p < 5 \times 10^{-4}$) és a 24 hónapos ($p < 0,05$) ARS egyedek értékeitől is.

Az ARS-nek kitett állatokban a kettősen jelölt sejtek száma csökkent az életkorral ($\rho = -0,48$; $p < 5 \times 10^{-4}$), továbbá, pozitív korrelációt mutatott a PVN CRF-FOSB immunreaktív sejtjeinek száma a CRF-FOS tartalmú sejtek számával ($\rho = 0,76$; $p < 5 \times 10^{-4}$). Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 27-es ábrán láthatóak.

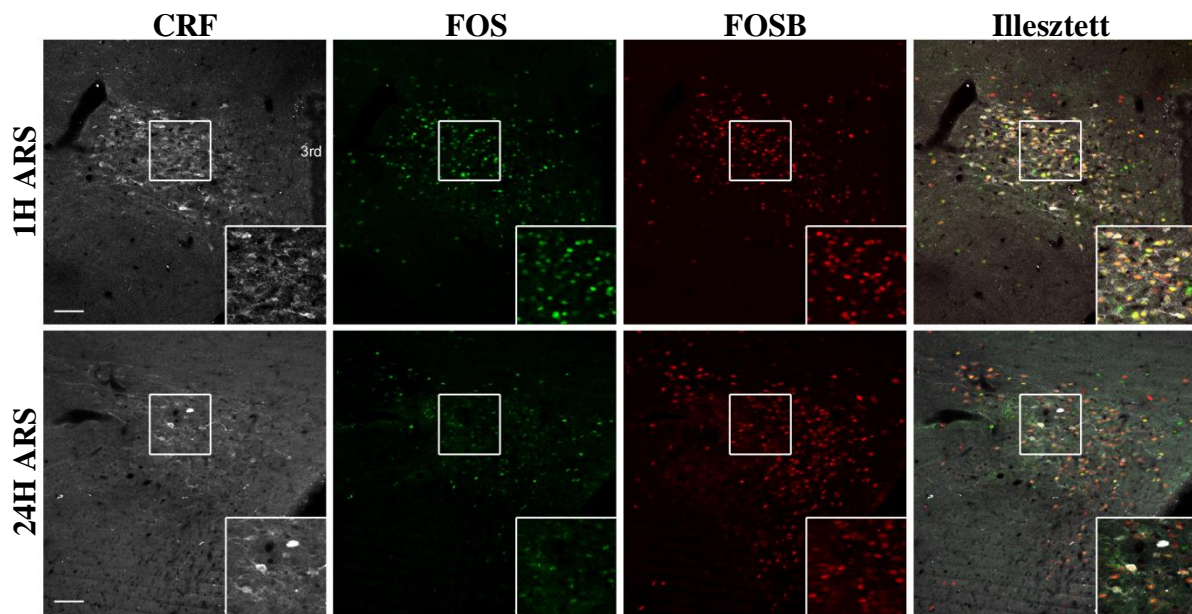
A nucleus paraventricularis FOSB-t és FOS-t tartalmazó CRF sejtei



26. ábra: A PVN CRF sejteinek FOSB és FOS tartalma (n=4-8 db/csoport). Az ARS (stressz) szignifikánsan megemelte a CRF-FOSB-FOS sejtszámot az 1, és 2 hónapos korcsoportokban (Tukey-féle *post hoc* teszt, $**p < 5 \times 10^{-4}$). A legmagasabb sejtszámot az 1 hónapos ARS csoportban detektáltuk, mely szignifikánsan különbözött a 2, 3, 6, 12 és 24 hónapos ARS csoportokban mért eredményekhez képest (Tukey-féle *post hoc* teszt, $*p < 0,005$).

A stressz ($F_{1,78}=7,35$; $p < 10^{-5}$), az életkor ($F_{7,78}=66,81$; $p < 10^{-6}$) és interakciójuk ($F_{7,78}=6,78$; $p < 10^{-5}$) is meghatározta a CRF-FOSB-FOS triplán jelölt sejtek számát a kétutas ANOVA szerint (26. ábra). A *post hoc* analízis igazolta, hogy az ARS szignifikánsan emelte a hármas pozitivitást mutató sejtek számát az 1 és 1,5 hónaposok állatokban ($p < 5 \times 10^{-4}$). A legmagasabb sejtszámot az 1 hónapos állatokban detektáltuk, amely magasabbnak bizonyult a többi stressznek kitett állat értékéhez képest ($p < 0,005$), kivéve a 2 és 18 hónapos ARS állatokat. A Spearman korreláció analízis megerősítette CRF-FOSB-FOS hármasan jelölt sejtszám életkorról járó csökkenését ($\rho = -0,38$; $p < 0,001$).

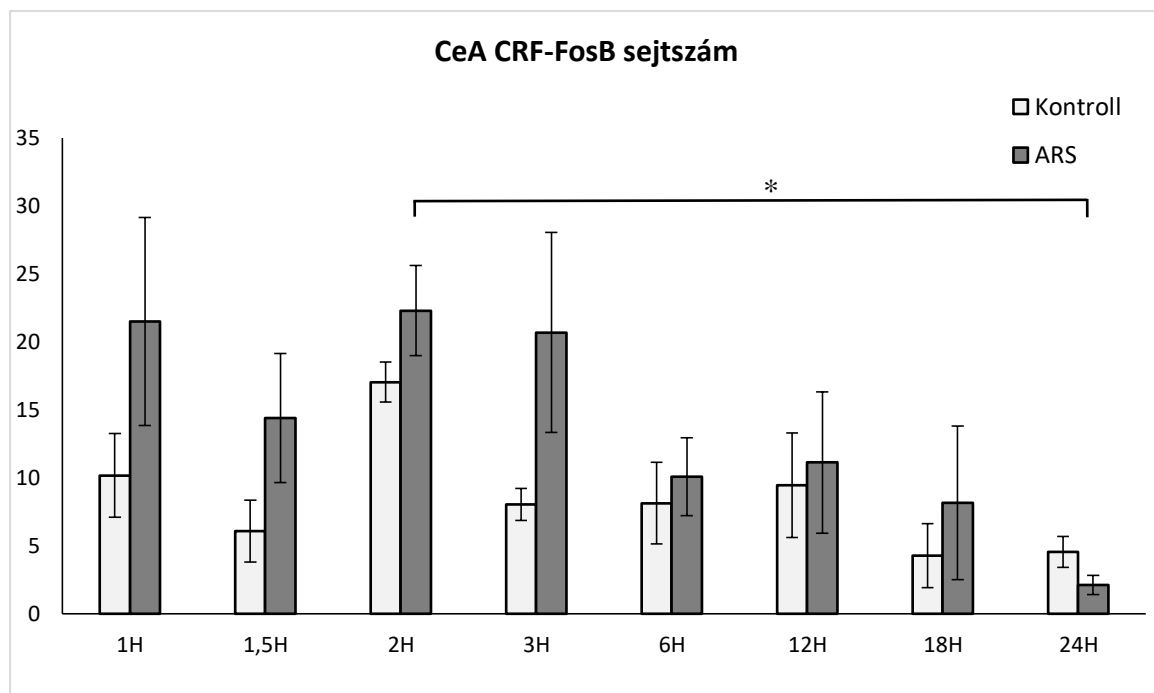
A denzitásvizsgálatok megerősítették, hogy a tripla pozitív sejtek száma korrelál az életkorról ($\rho = 0,43$; $p < 0,03$) és a sejtek CRF SSD-jével ($\rho = 0,73$; $p < 10^{-4}$). Ugyanakkor a FOS negatív sejtek CRF denzitása nem mutatott összefüggést a CRF-FOS kettősen jelölt sejtek számával ($\rho = 0,35$; $p = 0,08$). Meg kell jegyeznünk továbbá, hogy az aktivitási markerek (FOS és FOSB tartalma) jelentős átfedést mutatnak, így a hármasan jelölt sejtek száma pozitívan korrelál a kettősen festődő CRF-FOSB ($\rho = 0,86$; $p < 10^{-6}$) és CRF-FOS ($\rho = 0,92$; $p < 10^{-6}$) sejtek számával. Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 28-as ábrán láthatóak.



27. ábra: A PVN CRF sejtjeinek (fehér) életkorfüggő FOS (zöld) és FOSB (vörös) aktivitása. A fotók az 1 és 24 hónapos (H) ARS csoportok reprezentatív eredményeit mutatják be a PVN területén. A fehér négyzet nagyítva mutatja be a jelölt sejteket minden egyes jel esetében külön és a kolokalizált jelet együttesen az illesztett képeken (4. oszlop). Alkalmazott rövidítések: ARS- akut restraint stressz, 3rd-ventriculus tertius. A lépték 100 μm -t jelöl.

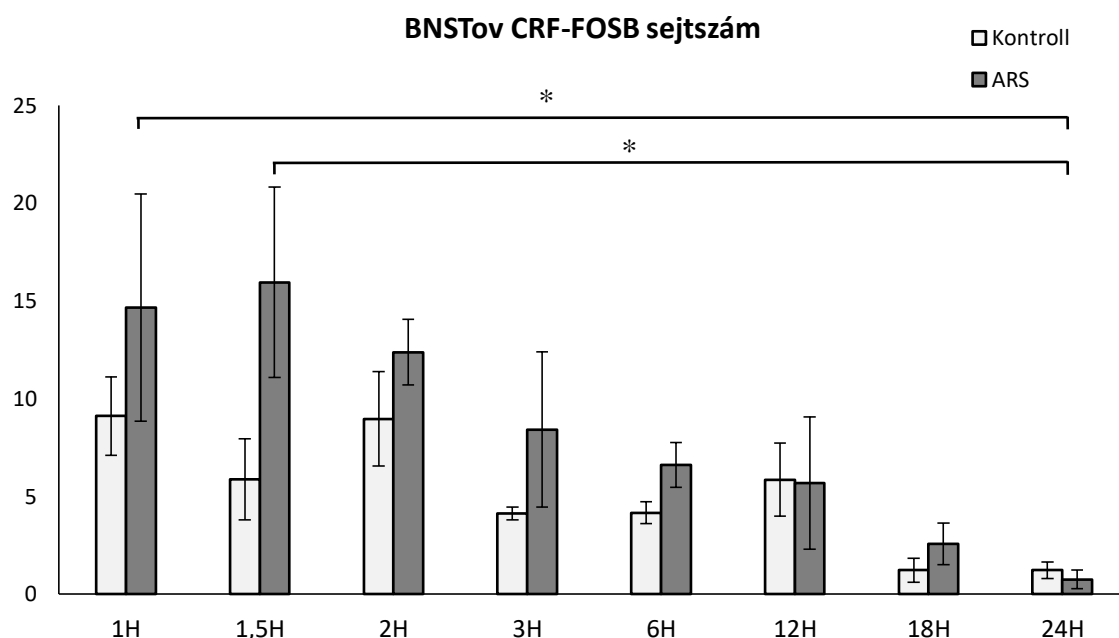
CRF neuronok a tágabban értelemben vett amygdala magjaiban

Az ARS hatását a CeA és BNSTov CRF-et tartalmazó neuronjainak aktivitását hármass immunfluoreszcens (CRF, FOS, FOSB) jelöléssel vizsgáltuk. A CeA és BNSTov CRF-FOS kettős pozitivitást mutató sejtek száma igen alacsonynak mutatkozott ARS hatására. Mivel a metszetenként 1-3 CRF-FOS kettősen jelölt sejt szám biológiai jelentősége igen alacsony lehet, nem mutatjuk be a CRF-FOS eredményeinket a CeA és BNSTov esetében. Azonban az alacsony FOS aktivitással ellentétben a CRF sejtek jelentősebb mennyiségű FOSB immunreaktivitással rendelkeztek ARS expozíció követően, így ezeket az adatokat alább részletezzük.



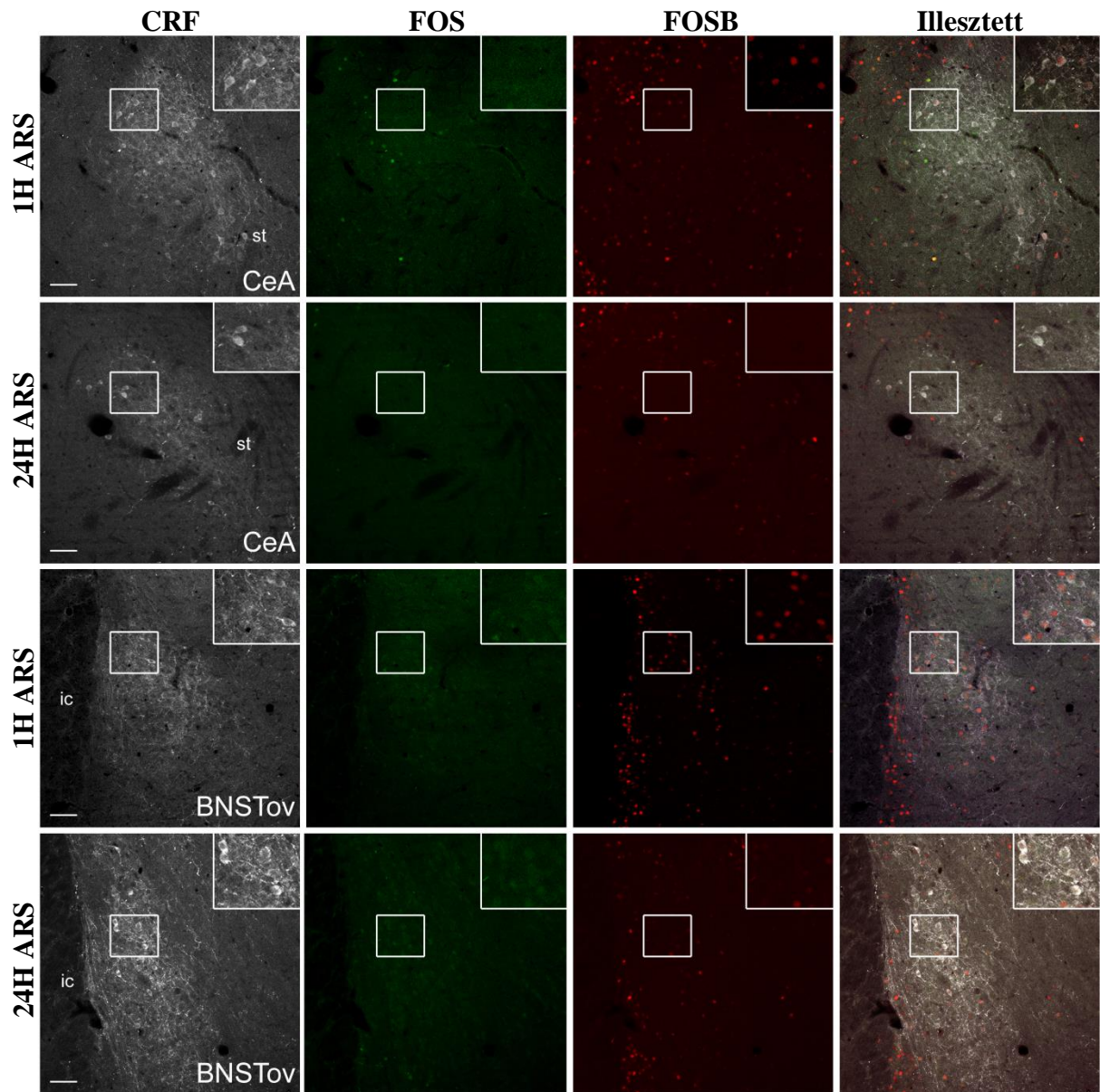
24. ábra: A CeA CRF neuronjainak FOSB tartalma (n=4-8 db/csoport). A Tukey-féle *post hoc* teszt nem talált szignifikáns különbséget a kontroll és ARS állatok között korcsoportokon belül. A 2 hónapos (H) ARS állatok rendelkeztek a legmagasabb sejtszámmal, amely szignifikánsan magasabb volt, mint a 24 hónapos állatokban detektált sejtszám értékek (Tukey-féle *post hoc* teszt, * $p < 0,05$).

A CeA CRF-FOSB kettősen jelölt sejtjeinek számát a stressz ($F_{1,78}=6,04$; $p < 0,05$) és az életkor ($F_{7,78}=3,45$; $p < 0,01$) is befolyásolta (28. ábra). A faktorok szignifikáns interakciója azonban nem volt kimutatható. A legmagasabb CRF-FOSB sejtszámot a 2 hónapos ARS csoportban detektáltuk, mely megközelítően tízszer nagyobb érték volt, mint a 24 hónapos ARS állatoké (*post hoc* teszt: $p < 0,05$). A Spearman analízis is megerősítette az aktivitás korfüggő csökkenését ($\rho = -0,42$; $p < 0,05$). Meg kell jegyezni azonban, hogy a Tukey-féle teszt nem talált szignifikáns eltérést a kontroll és az azonos korú ARS-nek kitett csoportok között. A CRF-FOSB sejtszám erős pozitív korrelációt a BNSTov CRF-FOSB sejtszámával ($\rho = 0,86$; $p < 10^{-6}$). Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 30-as ábrán láthatóak.



29. ábra: A BNSTov CRF sejteinek FOSB tartalma (n=4-8 db/csoport). A Tukey-féle *post hoc* teszt nem talált szignifikáns különbséget a kontroll és ARS állatok között korcsoportokon belül. Az 1 és 1,5 hónapos (H) ARS állatok rendelkeztek a legmagasabb sejtszámmal, mely szignifikánsan magasabb volt mindkét esetben, mint a 24 hónapos állatokban detektált sejtszám értékek (Tukey-féle *post hoc* teszt * $p < 0,05$).

A BNSTov CRF-FOSB kettősen jelölt sejtszámát az akut stressz ($F_{1,78}=4,13$; $p < 0,05$) és az életkor ($F_{7,78}=5,32$; $p < 10^{-4}$) is befolyásolta (29. ábra). A faktorok interakciója azonban itt sem volt kimutatható. A 24 hónapos, akut restraint-nek kitett állatok CRF-FOSB sejtszáma alacsonyabb volt az 1 hónapos ($p < 0,05$), és 1,5 hónapos ARS-nek kitett ($p < 0,01$) állatok sejtszámához viszonyítva. Habár a stressz fő hatása szignifikáns volt, a *post hoc* teszt nem tudta alátámasztani az ARS indukálta FOSB immunjel növekedést. A Spearman analízis negatív korrelációt talált az ARS állatok CRF-FOSB sejtszáma és életkora között ($\rho = -0,64$; $p < 10^{-5}$). Ezzel párhuzamosan az ARS állatok BNSTov CRF-FOSB sejtszáma erős pozitív korrelációt mutatott a CeA CRF-FOSB sejtszámokkal ($\rho = 0,86$; $p < 10^{-6}$). Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 30-as ábrán láthatóak.



30. ábra: A CeA és BNSTov CRF sejtjeinek (fehér) életkorfüggő FOS (zöld) és FOSB (vörös) immunreaktivitása. A reprezentatív fotók a nucleus centralis amygdalae (CeA) és a nucleus interstitialis striae terminalis ovalis almagját (BNSTov) mutatják az 1 és 24 hónapos (H) ARS (akut restraint stressz) csoportokból. A fehér négyszög által jelölt területet az adott panel jobb felső sarkában nagyobb nagyítással is bemutatjuk. Alkalmazott egyéb jelölések: st-stria terminalis, ic-capsula interna. A lépték 100 µm-t jelöl.

5.2.2. CRF tartalmú idegsejtek aktivitásának korfüggő dinamikája CVMS-modellben

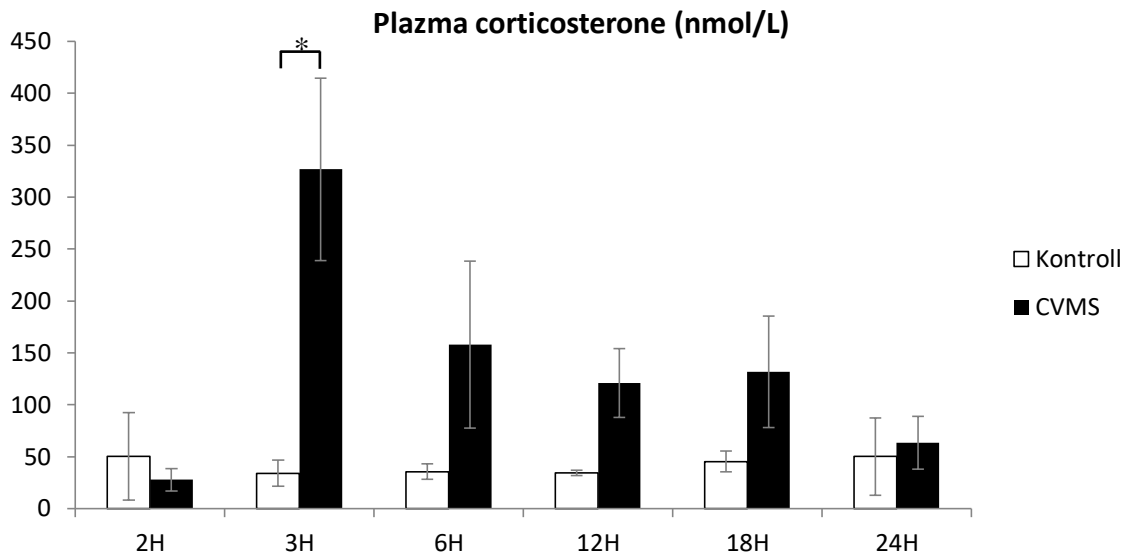
Az ARS expozíció mellett vizsgáltuk a PVN, CeA és BNSTov területeken a CRF neuronok korfüggő FOS aktivitását CVMS stressz során összesen 6 korcsoportban (2, 3, 6, 12, 18 és 24 hónapos). Az ARS modellel szemben ebben a kísérletben nem vizsgáltuk az 1 és 1,5 hónapos egyedeket, mivel a CVMS protokoll nem alkalmazható megfelelően a fiatal állatok elválasztása előtt.

5.2.2.1. A krónikus variábilis enyhe stressz protokoll hatékonysága

A krónikus stressz hatásosságának megítélésére állataink plazma corticosterone szintjét valamint, test, thymus és mellékvese tömegeit határoztuk meg. Mivel az állatok tömege eltérő még egy adott korcsoportban is, a thymus és mellékvese tömegeket az állatok saját testtömegével korigáltuk, így a relatív mellékvese tömegeket és relatív thymus tömegeket vizsgáltuk, az abszolút mellékvese és thymus tömegek helyett. Vizsgálatainkat kiegészítettük egy független kísérlettel is, melyben a CVMS viselkedésre gyakorolt hatását elemeztük FST teszt segítségével 6 hónapos állatokban.

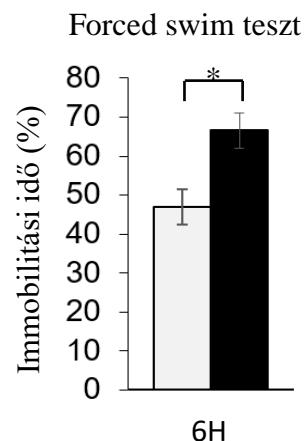
Plazma corticosterone szint eredményei a CVMS modellben

A plazma CORT szintjére hatással volt a CVMS ($F_{1,63}=30,2$ $p<0,02$) és az életkor is ($F_{5,63}=13,96$ $p<0,001$). A fő hatások interakciójának szignifikáns hatását az ANOVA nem igazolta ($F_{5,63}=1,74$; $p=0,14$) (31. ábra). A Tukey-féle *post hoc* teszt csak a 3 hónapos állatokban talált statisztikailag is kimutatható különbséget a kontroll és CVMS állatok corticosterone értékei között ($p<0,05$).



31. ábra A plazma corticosterone (nmol/l) mérések eredményei. A CVMS szignifikánsan megemelte a CORT szintjét (Tukey-féle *post hoc* teszt, $*p<0,05$) a 3 (H) hónapos állatokban.

Forced swim teszt eredmények

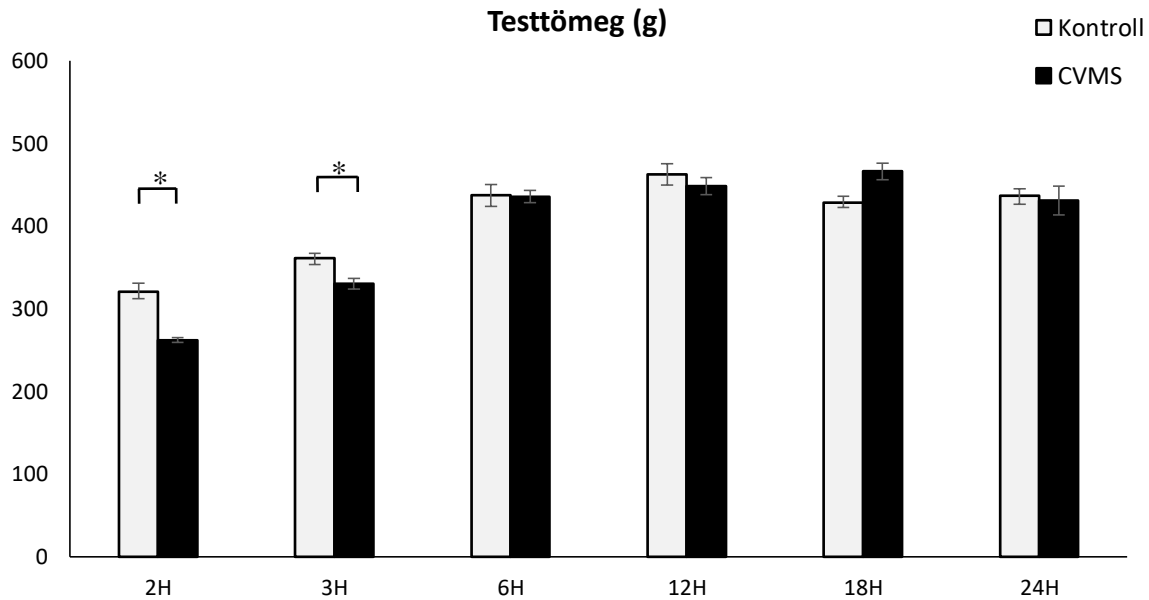


32. ábra: 6 hónapos (H) állatokon végzett független vizsgálatunk Forced swim tesztjének eredménye (Student-féle t teszt). $*p<0,01$

A CVMS hatására 6 hónapos állataink szignifikánsan több időt töltöttek mozdulatlanul az FST teszt során, mint a kontroll állatok (Student-féle t teszt $*p<0,01$) (32. ábra).

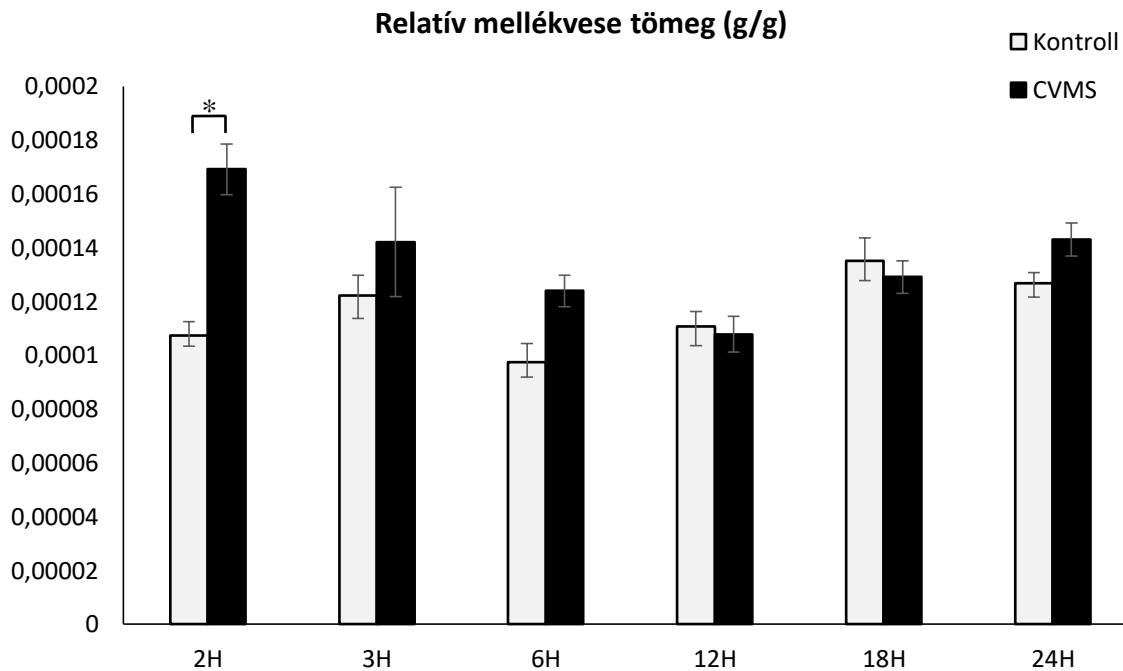
Testtömeg eredményeink

Az ANOVA megerősítette, hogy a CVMS ($F_{1,63}=5,86$; $p<0,05$), az életkor ($F_{5,63}=60,54$ $p<10^{-6}$) és ezek erős interakciója ($F_{5,63}=10,96$ $p<10^{-6}$) is jelentősen befolyásolta az állatok testtömegét (33. ábra). A CVMS szignifikáns testtömeg veszttel (csökkent növekedéssel) járt a 2 és 3 hónapos patkányok esetében (Tukey-féle *post hoc* teszt, $p<0,05$).



33. ábra: Az állatok testtömegének összesített eredményei a kontroll és CVMS-nek kitett állatok esetében (n=4-8 db/csoport). A 2 és a 3 hónapos (H) korcsoportokban az állatok szignifikánsan kisebb tömeggel rendelkeztek a CVMS (krónikus variábilis enyhe stressz) fennállása esetén (Tukey-féle *post hoc* teszt, $*p<0,05$). A 6 hónapos és idősebb korcsoportokban nem találtunk eltéréseket a kontroll és CVMS állatok testtömege között (Tukey-féle *post hoc* teszt, $p>0,05$).

Relatív mellékvese tömeg

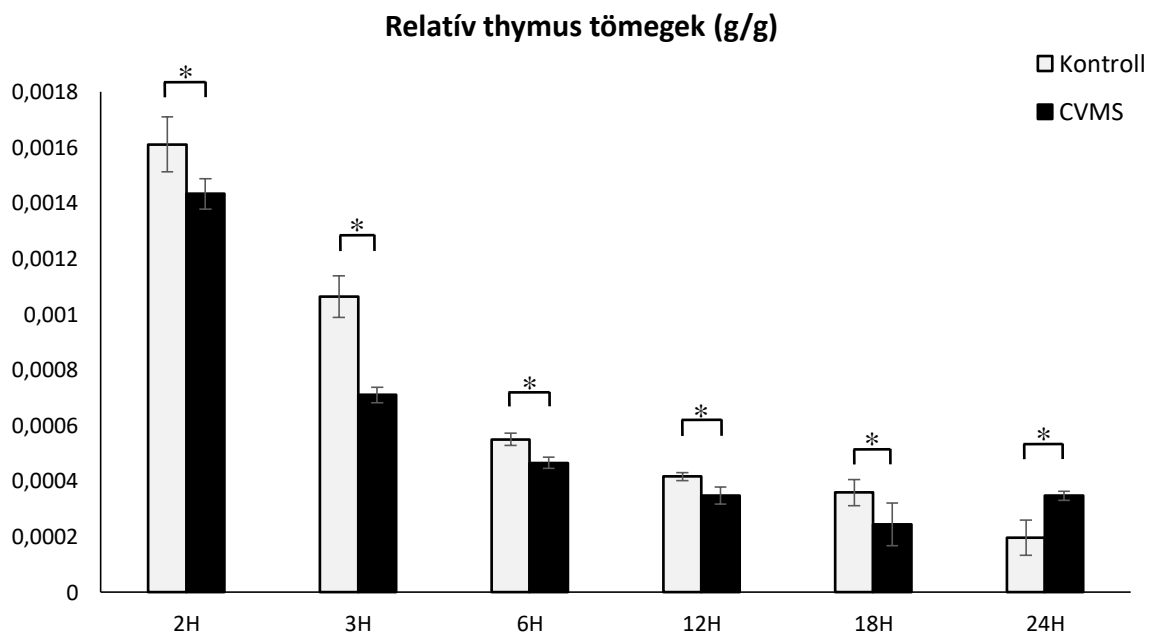


34. ábra: Az állatok relatív mellékvese tömege a kontroll és CVMS-nek kitett állatokban (n=4-8 db/csoport). A 2 hónapos (H) korcsoportban szignifikánsan nagyobb relatív mellékvese tömegekkel rendelkeztek a CVMS (krónikus variábilis enyhe stressz)-nek kitett állatok (Tukey-féle *post hoc* * $p < 0,05$). A 3 hónapos és idősebb korcsoportokban nem találtunk szignifikáns eltéréseket a kontroll és CVMS állatok között (Tukey-féle *post hoc* $p > 0,05$).

A CVMS ($F_{1,63}=19,66$; $p < 10^{-4}$) és az életkor ($F_{5,63}=5,86$; $p < 5 \times 10^{-4}$) is hatással volt a relatív mellékvese tömeg indexekre, viszont a faktorok interakciója nem volt kimutatható (34. ábra). A *post hoc* teszt megerősítette, hogy a 2 hónapos állatokban a relatív mellékvese testtömeg CVMS hatására szignifikáns mértékben megemelkedett ($p < 0,05$). A két hónapos CVMS állatok rendelkeztek a legnagyobb relatív mellékvese tömeggel, mely a 3 és 24 hónapos CVMS állatokat leszámítva, szignifikánsan nagyobbak bizonyult, mint a többi csoport értékei ($p < 0,05$).

Relatív csecsemőmirigy tömeg

Az ANOVA kimutatta, hogy a thymus testtömeg index értékét befolyásolta az életkor ($F_{5,63}=175,73$; $p<10^{-6}$). A CVMS önmagában nem volt hatással a thymus testtömeg indexre, ellentétben a CVMS és életkor erős interakciójával ($F_{5,63}=4,00$; $p<0,005$) (35. ábra). A legmagasabb értéket a 2 hónapos kontroll állatokban detektáltuk, mely a 3 hónapos patkányokat leszámítva, minden más csoport értékénél szignifikánsan nagyobbak bizonyult ($p<5\times 10^{-4}$).



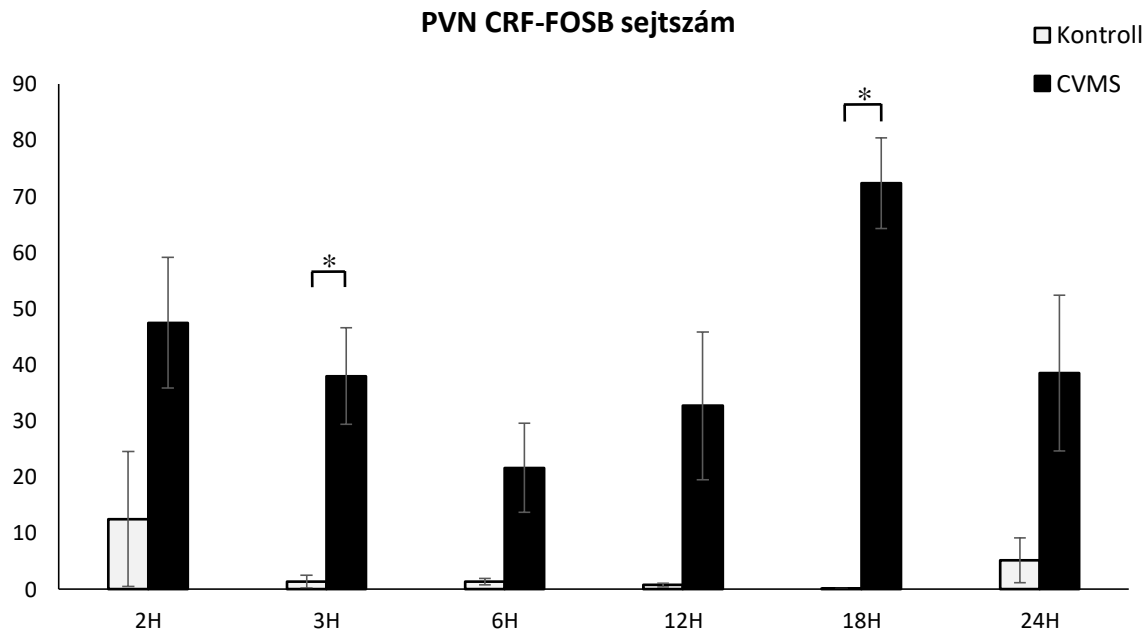
35. ábra: Az állatok relatív thymus tömege (thymus tömeg/testtömeg aránya) a kontroll és CVMS állatokban ($n=4-8$ db/csoport). Minden korcsoportban szignifikánsan csökkent a thymus relatív tömege (Tukey-féle *post hoc* teszt, $*p<0,05$) CVMS (krónikus variábilis enyhe stressz) során, kivéve a 24 hónapos korcsoportban ahol a CVMS állatok szignifikánsan nagyobb relatív thymus tömegekkel rendelkeztek (Tukey-féle *post hoc* $*p<0,05$).

5.2.2.2. CRF-FOSB neuronok számának változása CVMS hatására

Hat különböző korú patkánycsoportot tettünk ki CVMS-nek, és korban nekik megfelelő kontroll állatokkal hasonlítottuk össze őket, annak érdekében, hogy a CRF neuronok korfüggő stresszérzékenység-változását vizsgáljuk. Az összehasonlítást ugyanabban a hármas (CRF, FOS, FOSB) jelölésben végeztük el, amelyet az akut stressz modellben is használtunk (ld. fent). A CVMS expozíció nem okozott számottevő mértékű FOS immunreaktivitás növekedést a CRF tartalmú neuronokban, sem a tágabb értelemben vett amygdala, sem pedig a PVN területén. Mivel a FOS válasz elhanyagolható mértékű volt, az eredmények részletes leírásáról itt eltekintünk. Ezzel ellentétben, azt találtuk, hogy a CVMS jelentős hatással bírt a CRF sejtek FOSB kifejeződésére. Mivel állatainkat 24 órával az utolsó stresszexpozíciót

követően perfundáltuk, a FOSB festés során detektált jel, ellentétben a fent tárgyalt akut modellben megfigyelttel, itt a FOSB fehérje Δ FOSB variánsát mutatta, mely a sejtekben zajló hosszú távú transzkripciós szintű adaptációs folyamatokat tükrözi (Kovács et al. 1998, Nestler 2008).

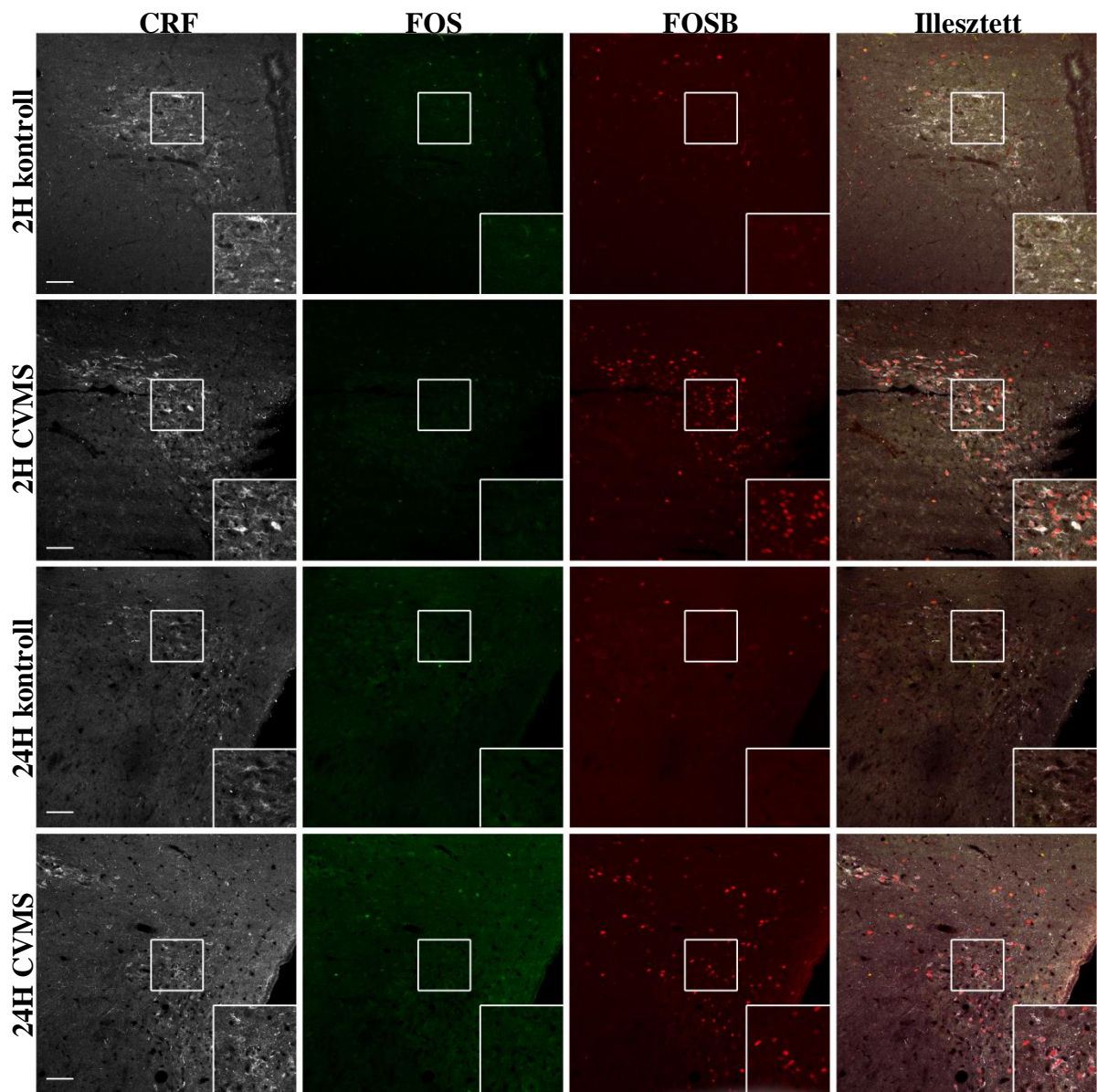
A CRF és FOSB kifejeződése a nucleus paraventricularis területén



36. ábra: A PVN CRF sejtjeinek FOSB tartalma kontroll és CVMS állatokban (n=4-8 db/csoport). A 3 és 18 hónapos korcsoportban a krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) szignifikánsan megemelte a sejtszámot (Tukey-féle *post hoc* teszt, $*p < 5 \times 10^{-4}$). A 2, 6, 12 és 24 hónapos korcsoportokban ez az emelkedés nem érte el a szignifikancia szintjét (Tukey-féle *post hoc* teszt, $p > 0,05$).

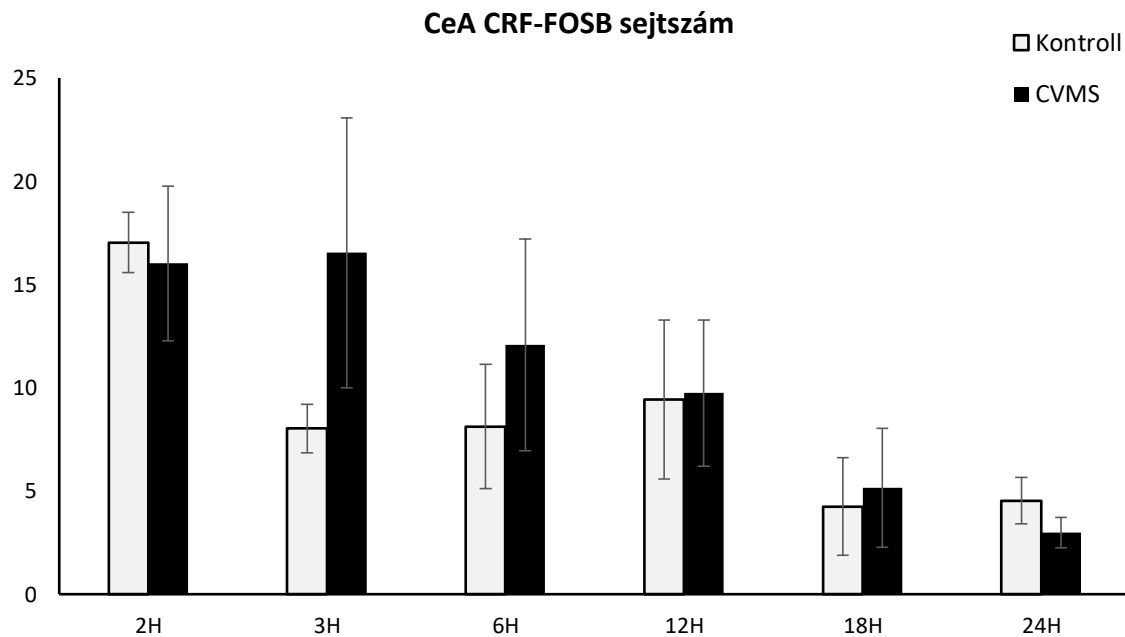
A CRF-t és FOSB-t egyaránt kifejező sejtek számát jelentősen befolyásolta a CVMS ($F_{1,63}=64,19$ $p < 10^{-6}$). Ezzel ellentétben, az életkor nem volt hatással a CRF-FOSB sejtszámra, és a faktorok interakciója sem volt igazolható (36. ábra). A Tukey-féle *post hoc* teszt szignifikáns sejtszám emelkedést erősített meg CVMS hatására a 3 és 18 hónapos állatokban ($p < 5 \times 10^{-4}$).

A CRF denzitometriai vizsgálata kimutatta, hogy a FOSB tartalmú CRF sejtek száma pozitívan korrelál azok CRF tartalmával/denzitásával ($\rho=0,61$; $p < 0,01$). Ezzel szemben a FOSB negatív CRF sejtek denzitása nem mutatott összefüggést a FOSB pozitív CRF tartalmú sejtek számának változásával ($\rho=0,24$; $p=0,28$). Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 37-as ábrán láthatóak.



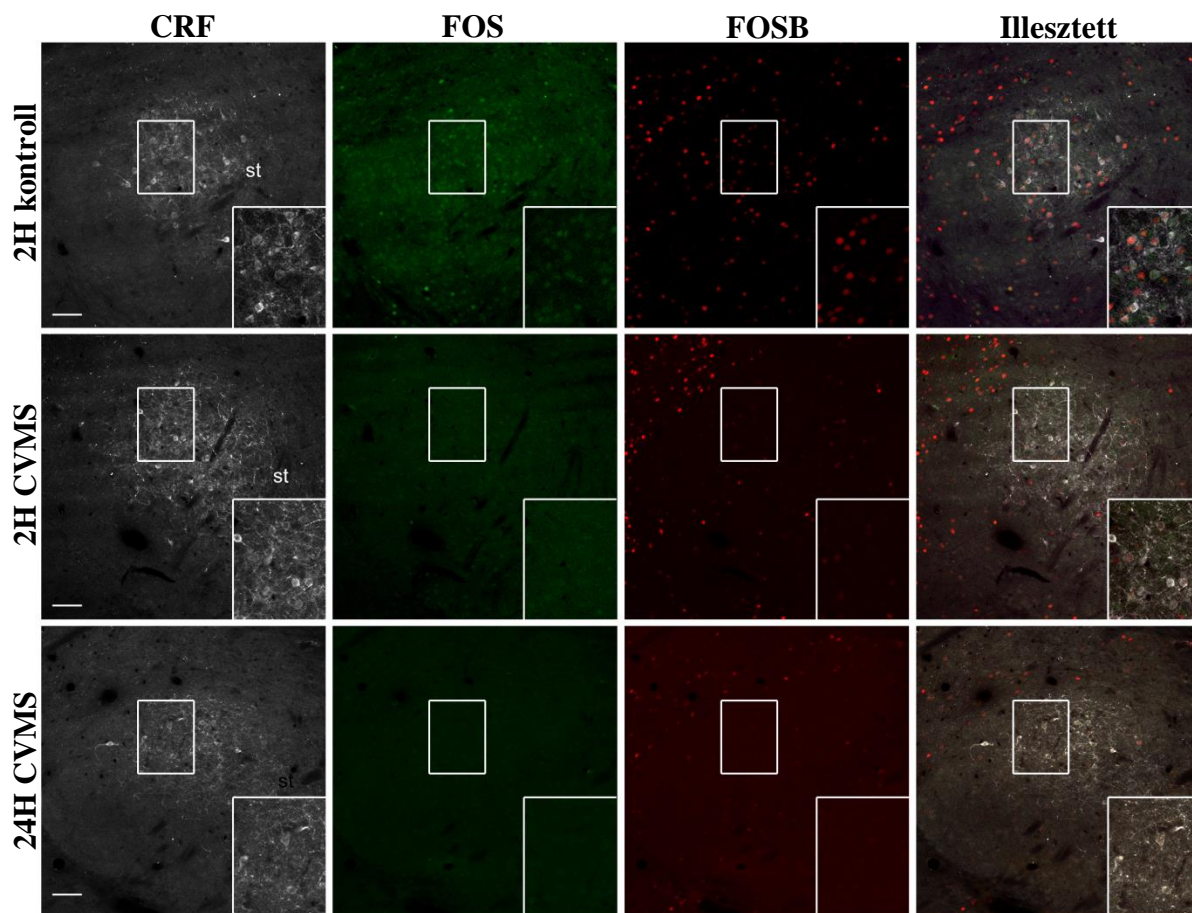
37. ábra: A PVN CRF sejtjeinek (fehér) életkorfüggő FOS (zöld) és FOSB (vörös) immunreaktivitása. A reprezentatív fotók a 2 és 24 hónapos (H) kontroll és CVMS csoportok eredményeit mutatják be a PVN területén. A fehér négyzet által jelölt területet az adott panel jobb alsó sarkában nagyobb nagyítással is bemutatjuk. Alkalmazott rövidítések: CVMS- krónikus variábilis enyhe stressz. A lépték 100 μm -t jelöl.

A CRF és FOSB kifejeződése a nucleus centralis amygdalae területén



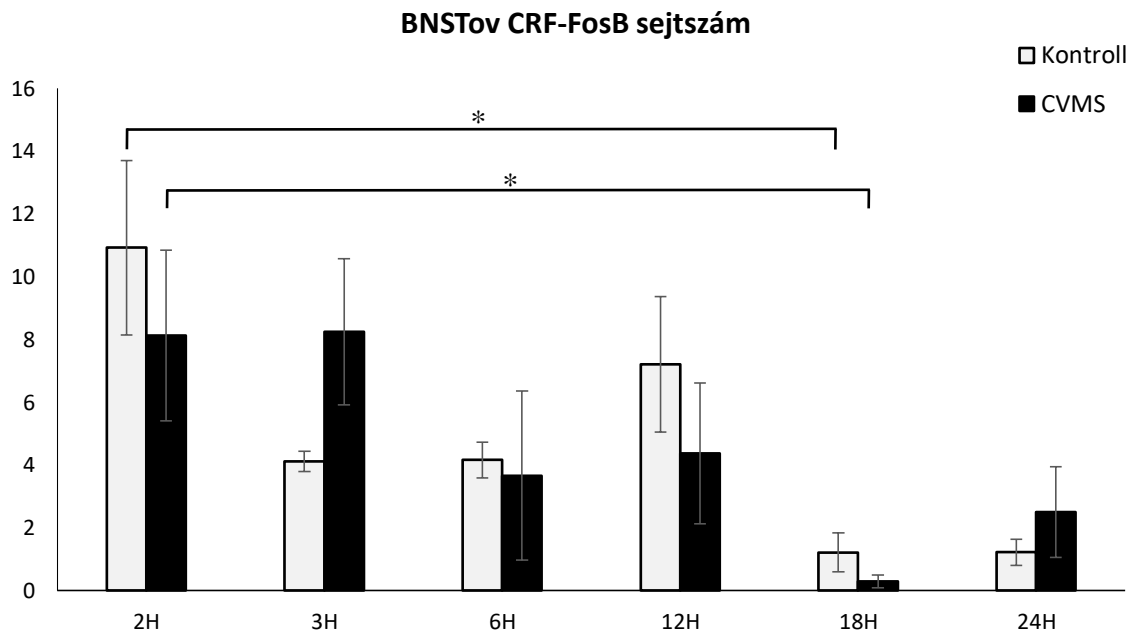
38. ábra: A CeA CRF sejteinek FOSB tartalma a kontroll és CVMS állatokban (n=4-8 db/csoport). A Tukey-féle *post hoc* teszt nem talált különbségeket a korcsoportokon belül sem pedig azok között ($p > 0,05$).

A CeA CRF-FOSB sejtszámát csak az életkor ($F_{5,63}=3,93$ $p < 0,005$) befolyásolta. Sem a CVMS, sem a faktorok interakciója nem volt hatással a sejtszámra (38. ábra). Ezzel összhangban, a Tukey-féle *post hoc* teszt sem talált szignifikáns eltérést a csoportok értékei között. A CRF tartalmú sejtek FOSB tartalmának korfüggő csökkenését a Spearman-féle korreláció teszt is alátámasztotta ($\rho = -0,55$ $p < 0,005$). Továbbá, a CRF-FOSB sejtszám pozitív korrelációt mutatott a relatív thymus tömegekkel ($\rho = 0,59$ $p < 0,005$), és a BNSTov CRF-FOSB sejtszámokkal ($\rho = 0,81$ $p < 5 \times 10^{-5}$). Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 39-es ábrán láthatóak.



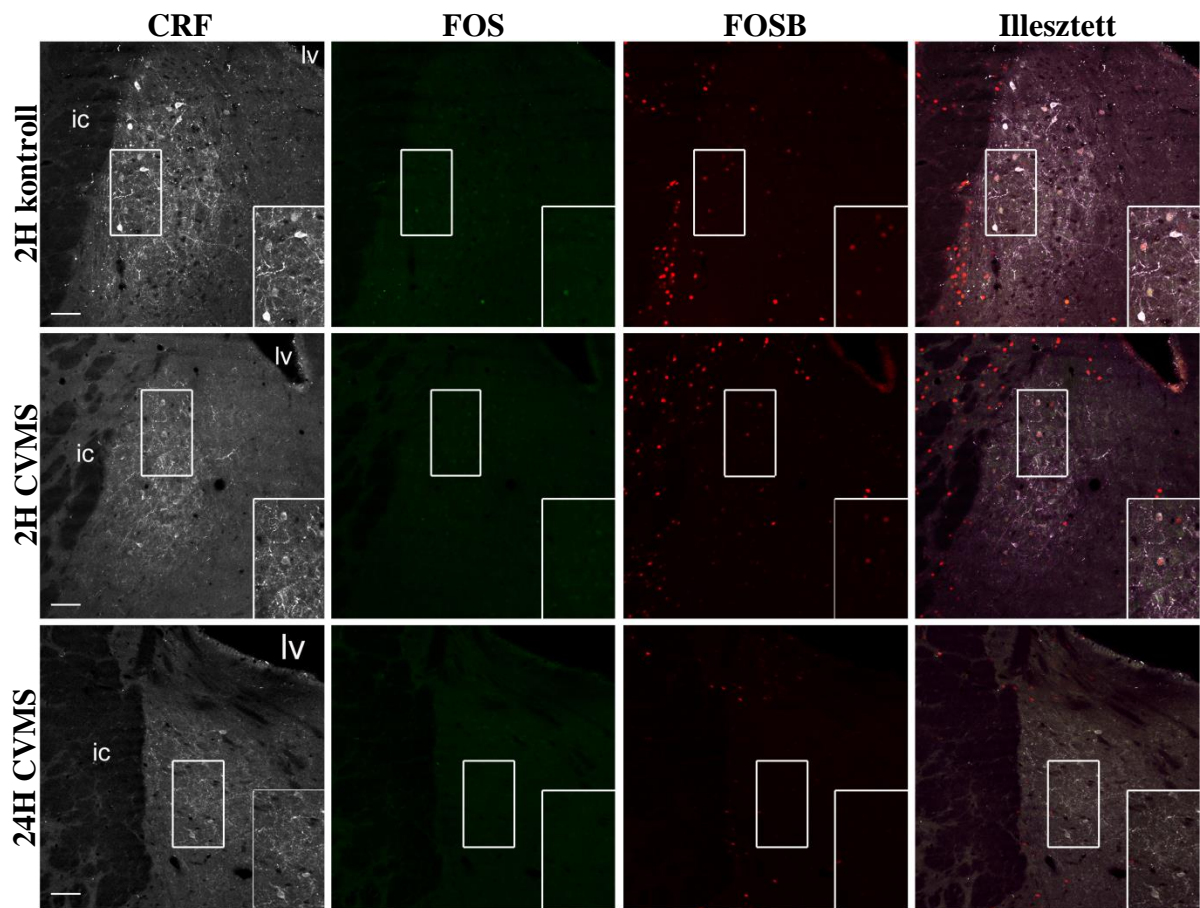
39. ábra: A CeA CRF sejteinek (fehér) életkorfüggő FOS (zöld) és FOSB (vörös) immunreaktivitása. A reprezentatív fotók a 2 és 24 hónapos (H) kontroll és CVMS csoportok eredményeit mutatják be a CeA területén. A fehér négyszög által jelölt területet az adott panel jobb alsó sarkában nagyobb nagyítással is bemutatjuk. Alkalmazott rövidítések: CVMS- krónikus variábilis enyhe stressz, st- stria terminalis. A lépték 100 µm-t jelöl.

A CRF és FOSB kifejeződése a nucleus ovalis nuclei interstitialis striae terminalis területén



40. ábra: A BNSTov CRF sejteinek FOSB immunreaktivitása kontroll és CVMS-nek kitett állatokban (n=4-8 db/csoport). A CVMS egyik korcsoportban sem volt hatással a BNSTov CRF-FOSB sejtszámokra. A legmagasabb sejtszámot a kontroll állatok között a 2 hónapos korcsoportban detektáltuk, mely szignifikánsan magasabb volt, mint a 18 hónapos állatok értéke (Tukey-féle *post hoc* teszt, * $p < 0,05$). A legmagasabb sejtszámot a CVMS állatok között a 2 hónapos csoportban detektáltuk, mely érték magasabb volt, mint a 18 hónapos CVMS állatok sejtszám értékei (Tukey-féle *post hoc* teszt, * $p < 0,05$)

Hasonlóan a CeA-hoz a BNSTov-ban is csak az életkor ($F_{5,63}=5,37$ $p < 0,001$) volt hatással a CRF-FOSB jelölt sejtek számára (40. ábra). Sem a CVMS, sem a faktorok interakciója nem volt hatással a CRF-FOSB sejtszámokra. A Tukey-féle *post hoc* teszt szignifikáns csökkenést mutatott a 2 hónapos kontroll és 18 hónapos kontroll állatok között ($p < 0,05$). A CRF-FOSB sejtszám csökkenését az életkor előrehaladtával a Spearman analízis is megerősítette ($\rho = -0,57$ $p < 0,005$). A BNSTov CRF-FOSB sejtszáma pozitív korrelációt mutatott a CeA CRF-FOSB sejtszámokkal ($\rho = 0,81$ $p < 5 \times 10^{-5}$), valamint a relatív thymus tömeg értékekkel ($\rho = 0,59$ $p < 0,005$). Az agyterületről készült reprezentatív, digitális fotók a 41-es ábrán láthatóak.



41. ábra: A BNSTov CRF sejteinek (fehér) életkorfüggő FOS (zöld) és FOSB (vörös) immunreaktivitása. A reprezentatív fotók a 2 és 24 hónapos (H) kontroll és CVMS csoportok eredményeit mutatják be a BNSTov területén. A fehér négyszög által jelölt területet az adott panel jobb alsó sarkában nagyobb nagyítással is bemutatjuk. Alkalmazott rövidítések: CVMS- krónikus variábilis enyhe stressz, ic- capsula interna, lv- ventriculus lateralis. A lépték 100 μ m-t jelöl.

A CRF sejtek ARS és CVMS modellben mutatott IEG immunreaktivitás eredményeit értékelő összefoglaló statisztikai táblázatok:

Vizsgált test vagy szerv tömege	Csoportok	Kétutas ANOVA					
		Fő hatás				Interakció	
		Kor		Stressz		Kor × Stressz	
		F*	p	F*	p	F*	p
Testtömeg	Kontroll vs. ARS	165,86	<10 ⁻⁶	1,14	0,29	3,07	<0,01
	Kontroll vs. CVMS	60,54	<10 ⁻⁶	5,86	<0,05	10,96	<10 ⁻⁶
Relatív mellékvese tömeg	Kontroll vs. ARS	57,77	<10 ⁻⁶	0,77	0,38	4,73	<0,001
	Kontroll vs. CVMS	5,85	<5×10 ⁻⁴	19,66	<5×10 ⁻⁴	1,41	0,23
Relatív thymus tömeg	Kontroll vs. ARS	154,56	<10 ⁻⁶	0,23	0,63	2,04	0,06
	Kontroll vs. CVMS	175,73	<10 ⁻⁶	0,28	0,60	4,00	<0,005

7. táblázat: A test- és szervtömeg index adatok kétutas varianciaanalízissel (ANOVA) történt elemzésből származó eredmények összefoglaló táblázata. A szignifikáns hatásokat félkövéren emeltük ki. Alkalmazott rövidítések: ARS- akut restraint stressz; CVMS- krónikus variábilis enyhe stressz. *az F értéket jellemző szabadsági fok számának stressz kondícióként eltértek a különböző elemszámok következtében: Kontroll vs. ARS esetében: F_{(1)7,78}; Kontroll vs. CVMS esetében F_{(1)5,63}.

Csoportok	Jelölt sejtek	Mag	Kétutas ANOVA					
			Fő hatás				Interakció	
			Kor		Stressz		Kor x Stressz	
			F*	p	F*	p	F*	p
Kontroll vs. ARS	CRF- FOS	PVN	7,71	<10 ⁻⁵	74,39	<10 ⁻⁶	7,68	<10 ⁻⁵
		BNSTov	1,64	0,14	0,21	0,66	1,42	0,21
		CeA	1,26	0,28	0,22	0,64	1,60	0,15
	CRF-FOSB	PVN	2,61	<0,05	89,17	<10 ⁻⁶	3,03	<0,01
		BNSTov	5,32	<10 ⁻⁴	4,13	<0,05	1,18	0,32
		CeA	3,45	<0,005	6,04	<0,05	0,74	0,64
CRF-FOSB- FOS	PVN	7,35	<10 ⁻⁵	66,81	<10 ⁻⁶	6,78	<10 ⁻⁵	
Kontroll vs. CVMS	CRF- FOSB	PVN	2,19	0,07	64,19	<10 ⁻⁶	1,93	0,11
		BNSTov	5,37	<0,001	0,06	0,81	0,97	0,44
		CeA	3,93	<0,005	0,91	0,34	0,65	0,66

8. táblázat: A sejt számértékek kétutas varianciaanalízissel (ANOVA) végzett vizsgálatokból származó eredmények összefoglaló táblázata. A szignifikáns hatásokat félkövéren emeltük ki. Alkalmazott rövidítések: CRF: corticotropin-releasing factor, PVN: nucleus paraventricularis, BNSTov: nucleus interstitialis striae terminalis ovalis magja, CeA: nucleus centralis amygdalae. ARS: akut restraint stressz; CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz. *: az F értéket jellemző szabadsági fokok száma stressz kondícióként eltértek a különböző elemszámok következtében: Kontroll vs. ARS esetében: F_{(1)7,78}, Kontroll vs. CVMS esetében F_{(1)5,63}.

Mag neve	Jelölés típusa	Kor	Testtömeg	Mellékvese tömeg	Relatív mellékvese tömeg	Relatív thymus tömeg	PVN CRF-FOS	PVN CRF-FOSB	CeA CRF-FOSB	BNSTov CRF-FOSB	PVN CRF-FOSB	
PVN	CRF-FOS	ρ	-0,61	-0,51	-0,57	0,37	0,61		0,76	0,41	0,32	0,92
		p	<10 ⁻⁴	<0,005	<5×10 ⁻⁴	<0,05	<10 ⁻⁴		<10 ⁻⁶	<0,05	0,06	<10 ⁻⁶
	CRF-FOSB	ρ	-0,48	-0,43	-0,37	0,45	0,56	0,76		0,21	0,16	0,86
		p	<0,005	<0,01	<0,05	<0,01	<5×10 ⁻⁴	<10 ⁻⁶		0,24	0,36	<10 ⁻⁶
	CRF-FOSB-FOS	ρ	-0,38	-0,28	-0,26	0,26	0,36	0,92	0,86	0,28	0,23	
		p	<0,001	<0,01	<0,05	<0,05	<0,005	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<0,05	0,06	
BNSTov	CRF-FOSB	ρ	-0,64	-0,45	-0,6	0,11	0,54	0,32	0,16	0,86		0,23
		p	<5×10 ⁻⁵	<0,005	<5×10 ⁻⁴	0,5	<0,001	0,06	0,36	<10 ⁻⁶		0,06
CeA	CRF-FOSB	ρ	-0,42	-0,25	-0,4	0,13	0,38	0,42	0,21		0,86	0,28
		p	<0,05	0,16	<0,05	0,45	<0,05	<0,05	0,24		<10 ⁻⁶	<0,05

9. táblázat: A sejtszámértékek és az életkor Spearman korreláció analízis vizsgálataiból származó eredmények összefoglaló táblázata. A számítások az ARS állatok kettősen és hármasan jelölt sejtszám értékeit és a szerv/testtömeg adatait hasonlítja össze egymással. A szignifikáns eltéréseket félkövéren emeltük ki. Alkalmazott rövidítések: PVN: nucleus paraventricularis, BNSTov: nucleus interstitialis striae terminalis ovalis magja, CeA: nucleus centralis amygdalae, CRF: corticotropin-releasing factor.

Mag neve	Jelölés típusa	Kor	Testtömeg	Mellékvese tömeg	Relatív mellékvese tömeg	Relatív thymus tömeg	PVN CRF-FOSB	CeA CRF-FOSB	BNSTov CRF-FOSB	
PVN	CRF-FOSB	ρ	0,03	-0,02	-0,16	-0,02	-0,04		0,04	0,06
		p	0,87	0,92	0,43	0,92	0,83		0,82	0,76
BNSTov	CRF-FOSB	ρ	-0,57	-0,62	-0,35	0,32	0,6	0,06	0,82	
		p	<0,005	<0,001	0,09	0,11	<0,005	0,76	<5×10 ⁻⁵	
CeA	CRF-FOSB	ρ	-0,58	-0,4	-0,17	0,27	0,56	0,04		0,82
		p	<0,005	<0,05	0,4	0,18	<0,005	0,82		<5×10 ⁻⁵

10. táblázat: A sejtszámértékek és az életkor Spearman korreláció analízis vizsgálatokból származó eredmények összefoglaló táblázata. A számítások a CVMS-nek kitett állatok kettősen jelölt sejtszám értékeit és a szerv/testtömeg adatait hasonlítja össze egymással. A szignifikáns eltéréseket félkövéren emeltük ki. Alkalmazott rövidítések: PVN: nucleus paraventricularis, BNSTov: nucleus interstitialis striae terminalis ovalis magja, CeA: nucleus centralis amygdalae, CRF: corticotropin-releasing factor.

6. Megbeszélés

Tanulmányunk során vizsgáltuk a stressz indukálta FOS választ az életkor függvényében 13 stressz-reaktív agyterületen. További célunk volt, hogy megvizsgáljuk az extended amygdala és PVN CRF tartalmú neuronjainak FOS aktivitását az életkor függvényében akut és krónikus stressz során. Feltételezésünk az volt, hogy a sejtek aktivitása korfüggő és valószínűleg a CRF rendszer is érintett lehet a korfüggő változásban. A FOS térképezés során tapasztaltuk, hogy a FOS aktivitása nem csak életkor, de agyterület függő is. A CRF rendszerek FOS aktivitásának korfüggése mellett azt is megfigyeltük, hogy a sejtek aktivációjának mértéke függ az alkalmazott stresszor típusától (akut vagy krónikus), és egyben attól is, hogy melyik CRF tartalmú régiót vizsgáljuk. Eredményeinket, melyek a két főbb hipotézisünket alátámasztják, az alábbiakban diszkutáljuk.

6.1. A stresszmodellek megbízhatósága

A FOS kifejeződés vizsgálata igen széles körben alkalmazott technika, mely lehetővé teszi az akut stressz által indukált neuronális aktiváció követését (Kovács és Sawchenko 1996, Kovács 1998, Kovács 2008). Az akut restraint expozíció megbízható eszköz az akut stressz által kiváltott hatások tanulmányozására patkányokon, amelyet más munkacsoportok tanulmányai (Kellogg et al. 1998, Viau 2005, Romeo et al. 2006) és saját korábbi (Gaszner et al 2004, 2009, Sterrenburg et al. 2012), fiatal felnőtt állatokon végzett tanulmányaink is alátámasztanak. Az általunk alkalmazott ARS kísérleti protokoll jelen kísérleteinkben is megbízhatónak bizonyult, mivel mind a 13 vizsgált agyterület jelentős FOS aktivitás növekedésével reagált, melynek mértékét a 11. táblázatban foglaltuk össze. A plazma CORT szint minden korszakban emelkedett ARS expozíciót követően, mely a HPA-tengely aktivitásának növekedésére utal, és egyben a stresszor hatásosságának egyik markere (Bali és Jaggi 2015).

A második, a CRF rendszerre fókuszáló kísérleteinkben is tapasztaltak ugyancsak alátámasztják az ARS hatékonyságát. Ugyanakkor a FOS adatokkal ellentétben a CORT eredményeink részben ellentmondásosak, mivel a fiatal korszakok (1- és 1,5 hónapos) nem mutattak emelkedett HPA-tengely aktivitást ARS expozíciót követően. Koenig és munkatársai (2018) is hasonló jelenséget tapasztaltak novel environment stressz során fiatal Wistar patkányokon. Az a jelenség, miszerint az idősebb egyedek nem mutatnak jelentős CORT választ akut stresszt követően ugyancsak ismert (Heine et al. 2004 Bowman et al 2006).

Patkányok esetében megfigyelték, hogy a HPA-tengely érzékenységének korfüggő változásai fajtánként különböznek: így például idős Sprague-Dawley patkányok emelkedett CORT válasszal bírnak (Montaron et al 2005), míg az öreg F344/Brown-Norway hibrid patkányok esetében megtartott mértékű CORT reakciót írtak le (Kasckow et al 2005).

A CVMS expozíció hatékonyságát alátámasztandó, állataink testtömeg változását és relatív mellékvese illetve thymus tömegét is vizsgáltuk, melyet kiegészítettünk plazma CORT szintek mérésével is. Korábbi vizsgálatok is alátámasztják a CVMS testtömegre és testtömeg növekedésére gyakorolt hatását egerben (Bali és Jaggi 2015, Kormos et al. 2016, Farkas et al. 2017) és patkányban is (Romeo et al 2006, Sterrenburg et al. 2011), sőt egyes esetekben megfigyelték azok korfüggő különbözőségét is patkányban (Romeo et al. 2006, Wulsin et al. 2016). Adataink alapján csak a 2 és 3 hónapos állatok esetében láttunk a *post hoc* tesztek által megerősített testtömeg csökkenést, illetve kisebb mértékű testtömeg gyarapodást. Ennek egyik lehetséges magyarázata az, hogy ebben az életkorban jellemző a gyors testtömeggyarapodás, és a stressz által kiváltott krónikusan megnövekedett HPA-tengely működés a glukokortikoidok katabolikus hatása révén, nagyobb mértékű testtömegváltozásban nyilvánul meg. Bár idősebb korcsoportokban nem volt tapasztalható számottevő testtömegcsökkenés CVMS hatására, a relatív mellékvese, és thymus tömegek megbízhatóbban mutatták a CVMS effektivitását a legidősebb csoport kivételével. A relatív thymus tömegek és az extrahypothalamikus CRF neuronok FOSB tartalmának korrelációi arra utalhatnak, hogy a csökkent FOSB aktivitás a BNSTov és CeA CRF sejteiben magasabb HPA-tengely működésével társul. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy a *post hoc* tesztek nem tudták minden egyes korcsoportban megerősíteni a CVMS okozta változásokat a relatív thymus- és relatív mellékvese tömegek tekintetében. Ennek lehetséges okai faj, vagy törzsspecifikus tulajdonságokban, az állat korában esetleg a restrainer vagy a stresszor típusában is keresendő, de felmerül a korrallal járó fiziológiás testsúlynövekedés, majd csökkenés szerepe is. Továbbá, a CVMS thymusra gyakorolt hatása más hasonló tanulmányokban is ellentmondásos eredményekre vezetett (Romeo et al. 2006, Eduardo et al. 2011, Wulsin et al. 2016, Füredi et al. 2018, Nacka-Aleksic et al. 2019).

A CRF-FOSB értékek is megerősítették a CVMS hatékonyságát, hiszen a PVN neuronális aktivitása minden korcsoportban megnövekedett, amely összhangban van más kutatócsoportok korábbi eredményeivel (Imaki et al. 1991, Herman et al. 1995, Wulsin et al. 2016) és saját megfigyeléseinkkel is (Sterrenburg et al. 2011, Kormos et al. 2016). Kiemelendő, hogy a FOSB pozitív CRF korrelációja a sejtek SSD-jével. Ez nem meglepő, mivel a *Crf* gén promotere több API kötőhellyel rendelkezik (Malkoski és Dorin 1999).

Megfigyelésünk, miszerint a FOSB negatív CRF sejtek CRF SSD-je nem változott a PVN-ben a FOSB változásával, arra enged következtetni, hogy a FOSB szükséges a sejtek CRF tartalmának növekedéséhez a PVN-ben, CVMS során. Ezt alátámasztják a CORT adataink is, melyek a HPA-tengely megnövekedett aktivitására utalnak a fiatal CVMS állatainkban.

Korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan (Bowman et al. 2006), mi sem találtunk az idős állatokban szignifikánsan nagyobb CORT emelkedést a CVMS hatására, ahogyan az ARS kísérletünkben (ld. első kísérlet) sem találtunk egyértelmű összefüggéseket az agyterületek neuronális aktivitásának mértéke és a CORT válasz nagysága között. Ennek háttérében az állhat, hogy a sejtek IEG tartalma nem áll közvetlen összefüggésben az általunk vizsgált agyterületek sejtjeinek CRF tartalmával. Ugyanakkor meg kell jegyeznünk, hogy az általunk felállított kísérleti modellben nem zárhatjuk ki teljes mértékben a külső zavaró tényezők hatását (pl.: elhúzódó anaesztezia akut stressz hatása), melyek erősen torzíthatják a CORT válasz nagyságát és annak a neuronok aktivitásával való korrelációját.

Emellett egy külön kísérletben vizsgáltuk állataink viselkedését is FST-tel. Bár az FST megerősítette, hogy a CVMS állatok depresszió-szerű viselkedést mutatnak, az eredményeket nem általánosíthatjuk teljes tanulmányunkra, mivel ebben a programban az állatházi kapacitás limitációi miatt azt csak a középkorú, 6 hónapos populációban volt lehetőségünk vizsgálni.

Összességében a CORT, a test- és relatív szervtömeg adatok a viselkedési teszt valamint a neuronális aktivitás markerek együttesen alátámasztják a CVMS expozíció hatékonyságát, de fontos kiemelni, hogy az általunk regisztrált fizikai paraméterek, mint a stressz hatékonyságának indikátorai érzékenységük szempontjából jelentős életkortól függő korlátokkal bírtak.

Mag neve	FOS aktivitás	Az állatok kora (hónap)							
		1 H	1,5 H	2 H	3 H	6 H	12 H	18 H	24 H
MeA	Emelkedés mértéke	9,33	8,65	14,36	10,3	7,06	13,27	9,05	12,47
	p	$6,7 \cdot 10^{-5}$	$1,8 \cdot 10^{-5}$	$3,6 \cdot 10^{-5}$	$3,1 \cdot 10^{-5}$	$3,4 \cdot 10^{-5}$	$2,2 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$3,4 \cdot 10^{-5}$
CeA	Emelkedés mértéke	1,66	2,21	7,51	3,87	4,81	31,81	27,4	5,61
	p	0,921	0,248	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-3}$	$2,1 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^{-4}$
BLA	Emelkedés mértéke	3,06	2,97	8,8	11,61	4,79	9,18	17,06	8,18
	p	0,193	0,031	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$4,3 \cdot 10^{-4}$	$1,7 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$
BNSTov	Emelkedés mértéke	1,36	1,7	3,58	1,85	1,89	3,48	3,81	2,45
	p	0,31	0,057	$3,5 \cdot 10^{-4}$	0,076	0,03	0,008	0,012	0,084
BNSTdl	Emelkedés mértéke	2,43	2,12	5,66	2,13	2,93	2,87	5,78	3,45
	p	0,025	0,003	$2 \cdot 10^{-4}$	0,077	0,001	0,008	$6,1 \cdot 10^{-4}$	0,038
BNSTdm	Emelkedés mértéke	7,32	4	7,32	5,16	8,2	7,85	4,6	10,35
	p	0,003	$9,5 \cdot 10^{-4}$	$7,0 \cdot 10^{-5}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$5,7 \cdot 10^{-5}$	$8,7 \cdot 10^{-5}$	$4,6 \cdot 10^{-4}$	0,001
BNSTv	Emelkedés mértéke	5,05	4,5	6,85	2,94	5,54	5,25	8,25	4,18
	p	$4 \cdot 10^{-4}$	0,005	$4,3 \cdot 10^{-4}$	$5,6 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-5}$	0,011	$1,4 \cdot 10^{-4}$	0,003
BNSTfu	Emelkedés mértéke	3,62	3,77	5,99	3,25	2,51	4,4	6,61	4,88
	p	0,011	$2,7 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$2,3 \cdot 10^{-3}$	0,422	0,266	0,189	0,153
PVNp	Emelkedés mértéke	8,02	9,11	36,31	36,66	4,41	20,03	22	22,46
	p	0,001	$6,2 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	0,015	$2,6 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$
PVNm	Emelkedés mértéke	3,73	2,38	10,78	6,61	2,07	6,32	9,17	7,05
	p	0,041	0,285	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$2,6 \cdot 10^{-4}$	0,271	$5,9 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^{-4}$
EWcp	Emelkedés mértéke	1,028	2,2	4,26	2,97	2,33	12,5	3,36	2,23
	p	1	0,1	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$2,8 \cdot 10^{-3}$	0,79	$4,9 \cdot 10^{-3}$	0,32	0,286
DR	Emelkedés mértéke	2,43	3,51	10,77	7,19	2,64	20,67	7,1	3,85
	p	0,977	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^{-3}$	0,737	0,027	0,016	0,059
S1	Emelkedés mértéke	74,6	79,18	17,85	45,04	23,87	39,64	43,18	43,53
	p	$5,1 \cdot 10^{-7}$	$4,8 \cdot 10^{-8}$	0,001	$8,9 \cdot 10^{-8}$	$8,3 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^{-4}$	$2,3 \cdot 10^{-4}$

11. táblázat: Az ARS hatására bekövetkező FOS sejtszám többszörződésének mértéke és a különbséghez tartozó szignifikancia szint (p) a korcsoportokon belül (stressz vs. kontroll). A szignifikáns eltéréseket félkövérrel emeltük ki. Alkalmazott rövidítések: amygdala komplex magjai: nucleus medialis amygdalae (MeA), nucleus centralis amygdalae (CeA), nucleus basolateralis amygdalae (BLA). A nucleus interstitialis striae terminalis (BNST) magjai: ovális mag (BNSTov), dorsolateralis mag (BNSTdl), dorsomedialis (BNSTdm), ventralis (BNSTv), fusiformis (BNSTfu). Hypothalamus: nucleus paraventricularis pars parvocellularis (PVNp), nucleus paraventricularis pars magnocellularis (PVNm). Agytörzsi magok: központi projekciójú Edinger-Westphal nucleus (EWcp), nucleus raphe dorsalis (DR). Somatosensoros barrel cortex (S1).

6.2. Az akut stressz hatása a FOS kifejeződésre az életkor függvényében

Minden általunk vizsgált stressz-asszociált agyterület szignifikáns FOS immunjel növekedést mutatott a 2 hónapos állatokban ARS hatására, mely összhangban van korábbi tanulmányok eredményeivel (Briski és Gillen 2001, Dayas et al. 2001, Crane et al. 2005, Sterrenburg et al. 2012).

Habár a FOS kifejeződés nagysága (a DR kivételével) egyik agyterület esetében sem különbözött szignifikáns mértékben ARS expozíció esetén amennyiben az állat fiatal (1, 1,5, 2, 3 hónapos) volt, a legnagyobb FOS sejtszám emelkedést a 2 hónapos állatokban láttuk. A stresszmagok nagyobb mértékű aktivitásának egyik magyarázata a késői adolescens és a korai postpubertás korra jellemző, jól ismert, megnövekedett agyi stresszérzékenység lehet (Kellogg et al. 1998, Romeo et al. 2006, McCormick et al. 2010). Az egyes magok életkorfüggő érzékenységének különbsége az adott területre jellemző sérülékeny időszakokra engedhet következtetni. A stressz-asszociált központok korfüggő érzékenységének feltérképezése segíthet megérteni, hogy az erős stresszhatások bizonyos életszakaszokban miért vezethetnek gyakrabban pszichiátriai kórképek kialakulásához (McCormick et al. 2010). A restraint által kiváltott FOS válasz fokozatosan csökkent az állatok életkorának előrehaladtával. A 2 hónapos fiatal, stressznek kitett állatokban található képest, kilenc magban (MeA, CeA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, BNSTfu, PVNp, EWcp és DR) mutatott csökkenést a FOS sejtszám a *post hoc* tesztek szerint a kor változásával. Ezzel ellentétben, a BLA és a BNSTv területén nem érte el a csökkenés a szignifikáns mértéket. A *post hoc* tesztek további eredményei rámutattak, hogy a FOS reaktivitás csökkenés koral a stressznek kitett állatokban magonként különbözik: míg a csökkenés a DR és CeA esetében a 3. hónaptól érte el szignifikancia mértékét, addig a MeA, BNSTov, BNSTdm, BNSTfu, PVN esetében a 6. hónaptól, a BNSTdl-nél pedig a 12. hónaptól volt csökkenés mértéke statisztikailag is kimutatható. Az adatok linearitását is vizsgálva, a Spearman-féle korreláció analízis – külön értékelve a kontroll és stressznek kitett csoportokat – hét magban (MeA, CeA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, BNSTfu, PVNp) mutatta ki egyértelműen a csökkenő FOS aktivitást az életkor növekedésével. Az EWcp, PVNm, BNSTv és BLA esetében ez az aktivitáscsökkenést csak a kontroll egyedek FOS sejtszáma mutatta, a stressznek kitett állatoké nem. Felmerülhet, hogy a viszonylag magas FOS aktivitás, melyet a 2 hónapos korcsoportban figyeltünk meg, már önmagában is korfüggő dinamikát eredményezhet statisztikai szempontból. Ezt a

lehetőséget úgy vizsgáltuk meg, hogy a 2 hónapos korcsoportok nélkül is elvégeztük a statisztikai analíziseket. Az ANOVA ebben a hipotetikus kísérleti elrendezésben is megerősítette a kor szignifikáns mértékű hatását a FOS megjelenésére, továbbá, a korreláció analízis ebben az esetben is kimutatta a már alátámasztott negatív korrelációt az előbb említett hét magban.

Ha a két hónapos ARS állatok FOS kifejeződésének mértékét vizsgáltuk a különböző magokkal összehasonlítva, akkor a PVNp-ben találtuk a legnagyobb mértékű sejtszám emelkedést. Ebben az esetben az azonos korú kontrollhoz hasonlítva az aktivitásnak mintegy 36-szoros növekedését detektáltuk. Ez nem meglepő, hiszen a PVNp a HPA-tengely legfőbb szabályozó központja, ahol számos, részben itt is vizsgált limbikus és non-limbikus magból eredő afferens rost végződik (Petrov et al. 1994, Pacak et al. 1995, Carrasco és Van de Kar 2003, Romeo et al. 2006). Eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy a PVNp területén talált kiugróan magas sejtszámért a többi mag aktivitása együttesen felelhet a két hónapos patkányban.

Korrelációs vizsgálataink során nem találtunk összefüggéseket a CORT szint és egyik mag FOS reaktivitása között sem. A CORT válasz szinte minden életkorban magas volt, és nem változott jelentékenyen, ezzel szemben a magok reaktivitása igen erőteljes csökkenést mutatott. Az adatok arra utalnak, hogy bár a FOS és a CORT külön-külön megbízható indikátorai a stresszfolyamatoknak, azonban egymást nem helyettesíthetik, és a FOS önmagában nem informatív a HPA-tengely aktivitásának mértékét illetően.

Mint azt alább részletesen tárgyalni fogjuk, az egyszerű FOS immunfestésnek van néhány olyan hátrányos tulajdonsága (pl. gátló hatásra érzéketlen, nem nyújt információt a sejten bekövetkező funkcionális következményekről), melyek magyarázatot adhatnak az adatok diszkordanciájára. Másrészt, a HPA-tengely működését számos, általunk nem vizsgált faktor is befolyásolja. Így például a glukokortikoid válasz, a glukokortikoid, valamint mineralokortikoid receptorok sűrűsége (de Kloet et al. 2018), és egyéb agyi régiók, mint a hippocampus, thalamus magok, PFC, LC, NTS (Herman et al. 2003) is befolyásolhatták a HPA-tengely aktivitását. A fenti, ebben a munkában nem vizsgált rendszerek így végső soron hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a 2 hónapos kortól az idős életkorig állataink ARS hatására egy állandó mértékű CORT szint emelkedését mutatták. Ezek alapján úgy véljük, hogy a FOS válasz korral és agyterület függő módon változó dinamikája szükséges a fiziológias stressz-adaptáció folyamatához. A stresszválasz életkorfüggő változásai hozzájárulhatnak a HPA-tengely szabályozási zavarához, mely végül hangulatzavarokhoz vezethet.

A FOS immunjel növekedésének ANOVA elemzése hét területen is (BLA, CeA, BNSTfu, PVNp, PVNm, EWcp, DR) igazolta a stressz és életkor interakciójának hatását. A FOS stressz hatására beövetkező immunraktivitásnövekedésének korcsoportok közti összehasonlításakor azt láttuk, hogy a legkisebb ötszörös, a legnagyobb pedig 19-szeres emelkedés volt a saját kontrollcsoportjához viszonyítva a különböző magokban. Ezek közül három magban (CeA, BNSTfu, és PVNp) a korreláció analízis is bizonyította a korfüggő sejtszámcsökkenést, amely azt sugallja, hogy a PVNp korfüggő aktivitásváltozását a CeA és BNSTfu FOS tartalmának hanyatlása is magyarázhatja. Ismert, hogy a BNST és CeA szerepe nélkülözhetetlen a glukokortikoid válasz kialakításában (Choi et al. 2007, 2008) és mindkét magnak erős kapcsolata van a PVN-nel (Dong et al. 2001).

Ezzel ellentétben, további hat régióban (S1, MeA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, BNSTv) nem volt kimutatható a kor és stressz interakció együttes hatása. Az FOS kifejeződésének vizsgálatai kimutatták, hogy e magokban a FOS aktivitás csupán 2-3 szoros emelkedést mutatott a kontroll csoportjukhoz képest minden életkorban. Habár az egyutas ANOVA megerősítette, hogy a kor itt is hatással van a FOS válaszra stressz expozíciót követően, az mégis stabilabb volt, és a korreláció analízis a stressz csoportoknál az S1 és a BNSTv esetében nem mutatott életkorfüggő jelcsökkenést. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a MeA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, BNSTv kisebb mértékben járulnak hozzá korral bekövetkező változásokhoz, így szerepük fontosabb lehet a HPA-tengely válaszában stabilizálásában, az idősebb állatokban.

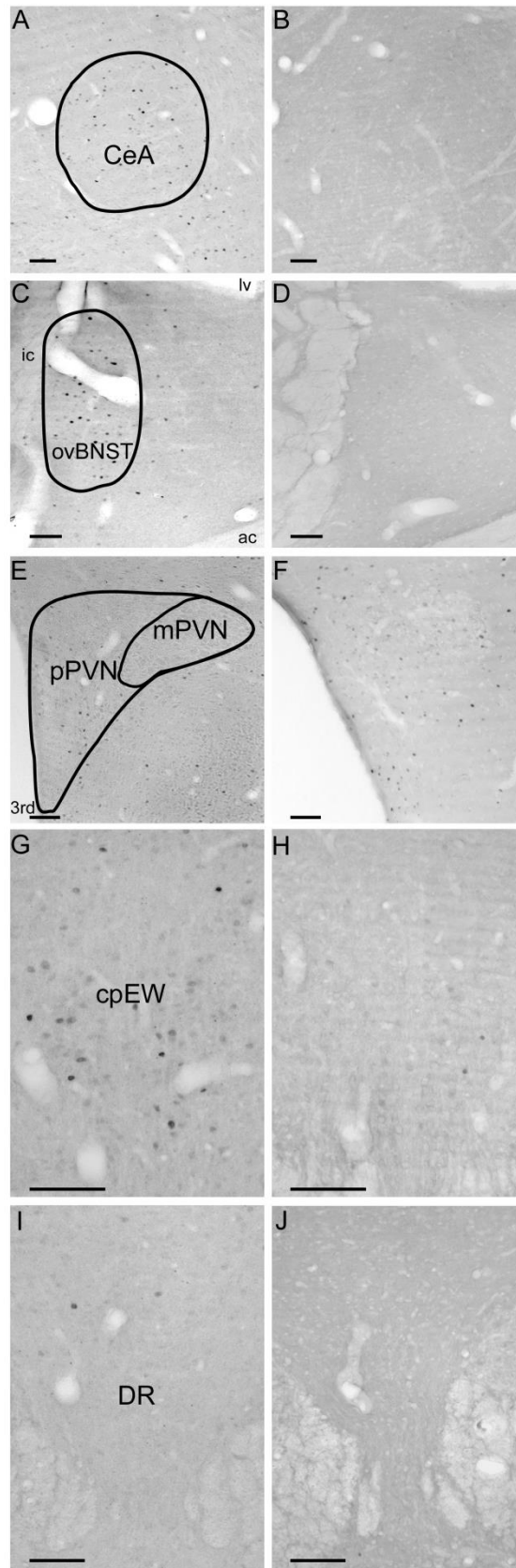
Felvetődött, hogy az állatok öregedéséből adódó érzékszervi hanyatlása állhat a stressz központok csökkent FOS válaszában háttérben. Hogy ezt a kérdést megvizsgáljuk, az elsődleges somatosensoros barrel cortex (S1) régiót választottuk ki, mert nem ismert, hogy jelentős szerepe lenne a stresszadaptáció kialakításában. Ennek ellenére, a restraint stressz paradigmában leírták a régió FOS expresszió emelkedését mRNS szinten (Girotti et al. 2006), amely összhangban áll a jelen dolgozatban taglalt saját eredményeinkkel. Minden bizonnyal a FOS növekedése a területen az állatok bajszának stimulációja is hozzájárul, ahogy azt korábbi vizsgálatok is alátámasztják pl. az S1 kéreg IV-es rétegében (Bisler et al. 2002). Eredményeink megerősítették, hogy az S1 régió FOS válaszkészségére az életkor hatással van, ugyanakkor annak mértéke nem lineárisan csökkenő dinamikát, hanem egy U alakú görbét ír le az életkor függvényében. Hangsúlyozni kell azonban, hogy a jelen kísérleti elrendezésben pontosan nem határozható meg, hogy az S1 FOS tartalmának növekedéséhez milyen mértékben járult hozzá a stressz pszichológiai és emocionális hatása, és milyen mértékben okozta azt a bajuszszálak közvetlen mechanikai ingerlése a restraint során.

Mindazonáltal megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált stressz magok FOS válaszában életkor függő csökkenése nem magyarázható pusztán a szenzoros rendszerek érzékenységének időskori hanyatlásával. Egy további érv ennek alátámasztására az a megfigyelésünk, hogy a FOS válasz legnagyobb mértékű csökkenése a középkorú egyedekben figyelhető meg (6 és 12 hónapos kor között), ekkor azonban még nem jellemző a szenzoros rendszerek nagymértékű öregedése. Idős állatokban (18 és 24 hónapos korcsoportokban), amikor az érzékszervek már valóban a korrall járó nagyobb mértékű funkcióromlást mutatják, már csak viszonylag kisebb mértékű további csökkenés volt látható. Összefoglalva azt mondhatjuk, hogy az általunk megfigyelt életkorfüggő dinamika a FOS válasz mértékében jellemző a stresszérzékeny magokra, de nem az egész agyra. A magok reaktivitáscsökkenése nem áll összefüggésben az érzőrendszerek korrall járó csökkent szenzitivitásával.

6.3. Bazális FOS kifejeződés korfüggő dinamikája

Tanulmányunk egy váratlan megfigyelése az a jelenség volt, hogy egyes területeken a kontroll állatokban is jelentős FOS immunjelet láttunk, amely szintén korfüggést mutatott. A FOS folyamatos alacsony szintű kifejeződése a központi idegrendszerben (Fevurly és Spencer 2004) ismert jelenség. Leírták néhány agyterület (PVN, hippocampus, amygdala, nucleus suprachiasmaticus és preopticus terület) jól detektálható bazális FOS expresszióját is (Kellogg et al. 1998, Meyza et al. 2007, Kovács 2008). A 13 általunk vizsgált terület 10 magja (BNSTdl, BNSTdm, BNSTv, BNSTfu, MeA, BLA, PVNp, PVNm, DR, S1) igen alacsony bazális FOS jelet mutatott a stresszelt csoportokhoz viszonyítva a különböző korcsoportokban. Azonban három mag (CeA, BNSTov, EWcp) jelentősebb alap FOS immunreaktivitást mutatott a 4 hetes korcsoportban, mely 6 hetes kortól már csökkent és hasonló mintázatot mutatott, mint az előbb említett magok FOS tartalma (42. ábra). A viszonylag magas bazális FOS aktivitás jelentősége nem ismert pontosan. Tekintettel arra, hogy az előbb említett három mag a stressz-adaptációban szerepet játszó neuropeptideket tartalmaz (CRF az BNSTov-ban és CeA-ban, illetve az Ucn1 az EWcp-ben) felvetődik, hogy az állatok elválasztását követően (mely a negyedik hétre esik) a magasabb FOS aktivitás szükséges a megfelelő stresszadaptációhoz az érzékeny juvenilis korban (Horovitz et al 2012). Annak bizonyítására, hogy valóban a CRF és az Ucn1 neuronokban jelenik-e meg a viszonylag magas bazális FOS, további kolokalizációs vizsgálatok szükségesek.

A számottevő bazális FOS immunjelet illetően felvetődhet, hogy kontroll állataink nem kívánt stresszhatásnak voltak kitéve, amely magyarázhatja a magas FOS sejtszámot. Két megfigyelésünk azonban ellentmond ennek. Egyrészt az igen stressz érzékeny PVNp nem mutatott magas bazális FOS jelet ugyanazon kontroll állatban. Másrészt, a kontroll egyedek alacsony CORT értékei is tükrözik az alacsony HPA aktivitást.



42. ábra: Bazális FOS immunjel egy (A, C, E, G, I) és 12 hónapos (B, D, F, H, J) állatokban a CeA, BNSTov, PVN, EWcp és DR területein. Alkalmazott rövidítések: CeA-nucleus centralis amygdalae, ovBNST-nucleus interstitialis striae terminalis ovalis almagja, pPVN-nucleus paraventricularis pars parvocellularis, mPVN-nucleus paraventricularis pars magnocellularis, cpEW-központi projekciójú Edinger-Westphal mag, DR-nucleus raphe dorsalis; ic-capsula interna; 3rd-ventriculus tertius. A lépték 100 μ m-t jelöl.

6.4. A főbb hypothalamicus és előagyi CRF rendszerek korfüggő stresszreaktivitása az azonnali gének kifejeződésében

Második kísérletsorozatunkban akut és krónikus stressznek kitett állatokban a CRF tartalmú idegsejtek FOS és FOSB/ Δ FOSB ko-lokalizációját vizsgáltuk a PVN, CeA és BNSTov magokban, patkányban. Feltételeztük, hogy az azonnali géneket expresszáló CRF sejtek számát mind a kor, mind a stresszor típusa befolyásolja.

6.4.1. Az akut stressz hatékonysága: A CRF-FOS kolokalizáció

Neuronális aktiváció vizsgálata a PVN CRF sejteiben akut restraint hatására

A HPA-tengelyt a PVNp CRF neuronjai szabályozzák, működésük pedig a korral változik (Romeo et al 2006, Bao and Swaab 2007, Aguilera 2011). Jól ismert, hogy akut stressz hatására a PVN területén nő azon CRF immunreaktív sejtek száma, melyek FOS is kifejeznek (Crane et al. 2005, Romeo et al. 2006, Rotllant et al. 2007). A PVN CRF tartalmú sejteinek FOS tartalma ARS során kisebb a fiatal felnőtt (77 napos) patkányokban, mint a 28 napos prepubertás korú állatokban (Romeo et al. 2006). Jelen tanulmányunk is megerősíti, hogy az akut restraint stressz által kiváltott CRF-FOS sejtszámnövekedés mértéke az életkor előrehaladtával csökken. Legjobb tudomásunk szerint ez az első olyan tanulmány, melyben ezt a csökkenést egészen az állatok 24 hónapos koráig vizsgálták. A PVN glutamaterg tartalmú CRF neuronokat tartalmaz (Hrabovszky et al. 2005, Sunstrum és Inoue 2018), melyek a HPA-tengelyt szabályozzák. Az első, ARS hatására bekövetkező FOS aktivációt vizsgáló kísérletünk eredményeivel egybehangzóan a CRF-FOS kettősen jelölt sejtek száma is csökken a korral. Ugyanakkor az első kísérletben azt láttuk, hogy ez a csökkenés nem volt párhuzamba állítható a HPA-tengely aktivitásának változásával, melyet a CORT szintek értékelése útján vizsgáltunk. Más laboratóriumok (Lupien et al. 2005, Koenig et al. 2011) is hasonló megfigyeléseket tettek. A jelenséget magyarázhatja az, hogy a hypophyseotrop CRF neuronok, nem feltétlenül fejeznek ki FOS-t miközben növelik a HPA-tengely aktivitását, vagy az akut stressz válasz során kiváltott CRF szekréciójuk (Aguilera és Liu 2012) nem jár mérhető szintű FOS immunreaktivitás növekedéssel a sejtmagban. Végezetül, a CRF-FOSB-FOS jelölés eredményei azt mutatják, hogy 2 órával az akut restraint stressz megindítását követően mind a CRF-FOS, mind a CRF-FOSB sejtszámok megemelkednek. Habár az expressziós csúcs a FOS esetében korábban jelenik meg, mint azt a FOSB-nél tapasztalták

(Kovács 1998, Kovács 2008, Nestler 2008), nem találtunk jelentős különbséget a két azonnali gént kifejező sejtek számában a korfüggő ARS indukálta expressziós mintázatuk összehasonlításakor.

Neuronális aktiváció a CeA CRF sejtjeiben az ARS modellben

Saját fent leírt első ARS kísérletünk és mások kísérletei (Buttler et al. 2016) is megmutatták, hogy a CeA megemelkedett FOS tartalommal válaszol akut restraint stressz hatását követően. Bár vannak arra vonatkozó adatok, miszerint a CeA CRF neuronjai FOS-t is tartalmaznak (Criado és Morales 2000, Butler et al. 2016), más tanulmányok nem találtak a CRF sejtekben FOS aktivációt akut immobilizáció (Rotllant et al. 2007) és audiogén stressz (Helfferich és Palkovits 2003) expozíció után. Az utóbbi irodalmi adatokkal vágnak egybe saját eredményeink is: megfigyelhető volt ugyan néhány CRF-FOS kolokalizáció a CeA-ban, de ez metszetenként csupán 2-3 sejtet tett ki és ez az összes CRF sejt mindössze 2-4%-át jelentette. Mivel ennek a viszonylag kis arányú aktív sejtnak a jelenléte és biológiai jelentősége valószínűleg elhanyagolható, ezen eredmények részletes bemutatásáról és azok megbeszéléséről itt eltekintünk. Tekintettel arra, hogy a CRF-FOS kolokalizációt mutató neuronok száma elhanyagolható volt, viszont a CeA a CRF változásával reagál számos stresszmodellben (Rouvette et al. 2011, Sterrenburg et al. 2012), úgy határoztunk, hogy a CeA sejtjeinek CRF-FOSB kolokalizációt is megvizsgáljuk. A CRF neuronok FOSB tartalmának analízise rámutatott, hogy számottevő bazális FOSB jellemző a sejtekre, amelyet befolyásol az ARS. Mégsem sikerült a poszt hoc tesztekkel megerősíteni a kontroll és stressz csoport közti különbséget egyik korcsoportban sem. Figyelemre méltó, hogy mind a bazális mind a restraint stressz által kiváltott FOSB aktivitás csökken a kórral a CRF sejtekben, amely öreg állatokban majdnem detektálhatatlanná vált. A tágabban értelemben vett amygdala magok (CeA, BNSTov) CRF sejtjeinek aktivitás változása hasonló dinamikát mutat, amelyet magyarázhat az a tény, hogy e magok direkt összeköttetésben állnak egymással (Dong et al. 2001), és hasonló GABAerg neurokémiai karakterrel rendelkeznek (Sparta et al. 2013, Partridge et al. 2016). Ezzel ellentétben, habár az amygdala és BNSTov-CRF neuronok hatással vannak a PVN működésére (Aguilera and Liu 2012), a CRF sejtek aktivitás mintázata a PVN-ben az előbbi magokétól eltérő dinamikát mutatott. Mindez talán azzal magyarázható, hogy a PVN CRF sejtjei glutamatergek és hogy további, itt nem vizsgált a PVN-be vetülő egyéb központok (septum laterale, DMH, LC, NTS, DR) ellensúlyozzák az előagyi CRF rendszerek a kor előrehaladtával csökkenő aktivitásának hatását (Herman et al.

2003, Herman et al. 2016). Azt is tekintetbe kell venni, hogy a CeA CRF és GABA tartalmú efferenseket küld a LC-hez (Kravets et al. 2015, Paretkar és Dimitrov 2018) és a DR-hez (Weissbourd et al. 2014). Mindkét magról tudjuk, hogy szerepet játszanak a stressz szabályozásában, és diszfunkciójuk szorongásos és depresszív zavarok kialakulásához is vezethet (Zhu et al 1999, 2015, McCall et al. 2015). Fontos megemlíteni, hogy a LC (Borsody és Weiss 1996) és DR (lásd fent) is életkorfüggő reaktivitással bír, így felvetődik, hogy a CeA korral járó, erősen csökkenő aktivitása ok-okozati összefüggésben állhat a LC és DR időskori aktivitás változásával.

A BNSTov CRF neuronjainak aktivitása akut stressz modellben

A CeA eredményeihez hasonlóan a BNSTov CRF sejtjei sem mutattak jelentős FOS aktivitást ARS-t követően, amelyet más laboratóriumok eredményei is megerősítenek (Helfferich és Palkovits 2003, Rotllant et al. 2007). Ennek némileg ellentmond, hogy egy előző tanulmány, miszerint a BNSTov területén az akut restraint megnövelte a FOS és CRF mRNS expressziót (Sterrenburg et al. 2012). Mivel ebben a kutatásban nem végeztek kolokalizációs vizsgálatokat, és a BNSTov FOS expresszáló neuronjai között számottevő met-enkephalin tartalmú sejt is lehet (Kozicz 2002), felvetődik, hogy az általunk látott FOS tartalmú neuronok met-enkephalin immunoreaktív sejtek lehetnek. Mivel a CRF neuronok FOS tartalma nem számottevő, hasonlóan a CeA esetében látottakhoz, itt is vizsgáltuk a CRF neuronok FOSB megjelenését. Azt láttuk, hogy ellentétben a FOS-szal, a CRF-FOSB sejtszámra hatással volt az ARS, viszont a korcsoportokon belül (kontroll vs. akut stressz) nem találtunk szignifikáns eltéréseket. Azt azonban elmondhatjuk, hogy a FOSB immunreaktivitása a CRF sejtekben láthatóan csökkent és végül eltűnt az öregedés során. A BNSTov CRF tartalmú sejtjei többnyire GABAerg gátló neuronok, melyek a PVN-be is projiciálnak (Sparta et al. 2013, Dabrowska et al. 2016, Romanov et al 2017, Sunstrum és Inoue 2018). A PVN mellett a BNSTov CRF neuronjai is összeköttetésben állnak a DR (Weissbourd et al 2014, Dabrowska et al. 2016) és LC (Van Bockstaele et al. 1999) sejtjeivel is. Mint ahogy az a CeA esetében felmerült, úgy itt is felvetődik, hogy a BNSTov korfüggő aktivitáscsökkenése jelentősebb hatással bír ezen agytörzsi területeken, mint a PVN neuronjain. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy ezen GABAerg rostok főleg a PVN-t körbeölelő úgynevezett GABA-erg gyűrűn végződnek (periPVN), továbbá a PVN több, más területről is direkt beidegzéssel rendelkezik (pl.: BNSTfu), így az általunk a BNSTov területén megfigyelt korfüggő aktivitás

változás nem szükségszerűen illeszthető a PVN működésének dinamikájával (Herman et al. 2003, Herman et al. 2016).

6.4.2. A PVN CRF sejtei nem mutatnak korfüggő FOSB aktivitásbeli különbséget krónikus stressz során

Jelen kísérletünk eredményeivel összhangban, korábbi tanulmányaink is bizonyították mind egerben (Kormos et al. 2016) és patkányban (Sterrenburg et al. 2011), hogy a CVMS fokozza a FOSB immunreaktivitást a PVN területén (de Andrade et al. 2014). 2011-ben Sterrenburg és munkatársai, továbbá 2015-ben Radley és Sawchenko is kimutatták, hogy a CVMS megemeli a CRF és a FOSB (Δ FOSB) kifejeződését a PVN területén. Kiss és Majercikova (2017) pedig bizonyította a CRF és FOSB kolokalizációját is a PVN neuronokban. Szemben a FOS kifejeződésével, a CRF sejtek CVMS hatására bekövetkező FOSB válasza független az életkortól, hiszen a kettősen jelölt sejtek száma nem csökkent az idős, CVMS-nek kitett állatainkban sem. A CVMS indukálta CRF-FOSB válasz nem változott az életkorral szignifikáns mértékben; de ha a 3, 12, 18 és 24 hónapos CVMS állatok CRF-FOSB sejtszámát vizsgáljuk, a változások dinamikája feltűnő hasonlóságot mutat a Tenk és munkatársai (2017) által megfigyelt CRF-mRNS korfüggő ingadozásával. Egy további érdekes megfigyelésünk volt, hogy míg a PVN-ben alig találtunk CRF-FOSB kolokalizációt mutató sejteket a kontroll csoportokban, addig a CeA és BNSTov CRF sejtei számottevő bazális FOSB jelet mutattak kontroll állatokban.

6.4.3. A CeA és BNSTov CRF sejtjeinek aktivitása független a CVMS-től, de mértéke csökken a korrall

Jelen kísérletünkben nem találtunk CVMS indukálta FOSB (Δ FOSB) immunjelet a CRF sejtekben sem a CeA, sem a BNSTov területén, amely összhangban áll korábbi (Sterrenburg et al. 2011, Majercikova és Kiss 2015) fiatal felnőtt patkányokon végzett kísérleteinek eredményeivel. A FOSB jel mértékéből látható, hogy a néhány CRF neuron mind kontroll állatokban, mind CVMS után is aktív volt a BNSTov és CeA területén. Ugyanakkor, a PVN-ben tapasztaltaktól eltérően, mind a kontroll, mind a CVMS-nek kitett állatok FOSB immunreaktivitása jelentősen csökkent az életkor előrehaladtával a CRF tartalmú sejtekben. E lényeges különbség feltehetően a CRF neuronok különböző neurokémiai karakterének köszönhető, hiszen míg a PVN CRF sejtjei elsősorban glutamátot termelnek, addig a BNSTov és CeA CRF sejtjei főleg GABA-erg neuronokból állnak (Sparta et al. 2013, Partridge et al. 2016, Deussing és Chen 2018). Valóban ismertek olyan tónusosan aktív gátló neuronok, amelyek külső környezeti ingerek hatására sem mutatnak FOS génexpresszió-növekedést (Reisch et al. 2007). A CeA és BNSTov korfüggő aktivitás változásának jelentősége egyelőre ismeretlen. További vizsgálatok szükségesek ezért, hogy az itt található CRF sejtek által beidegzett stressz szabályozásában is szerepet játszó területeken, mint pl. a LC és DR, milyen korfüggő változások lépnek fel, és hogy ezek magyarázhatóak-e a CRF sejtek aktivitásának korfüggő csökkenésével.

6.4.4. A FOS fehérjék aktivitásának korfüggő dinamikája a CRF sejtekben

Az IEG-k, mint pl. a *c-fos* expressziójának növekedése mRNS szinten már közvetlenül a környezeti inger hatását követően kimutatható. Fehérjeszinten, a FOS kifejeződés maximumát az ingert követően két órával éri el (Kovács 1998, Nestler 2008), amely aztán csökken és visszatér alapértékére 4-6 órán belül (Sonnenberg et al. 1989, Nestler 2008). Mindkét kísérletünkben sikerrel detektáltuk 2 órával a stressz expozíciót követően a FOS jelentős mértékű emelkedését, amely összhangban áll korábbi tanulmányok eredményeivel (Romeo 2006, Meyza et al. 2007, Sterrenburg et al. 2012). Kutatásunk egyik legfontosabb megfigyelése az volt, hogy a PVN CRF tartalmú neuronjaiban akut restraint stressz hatására bekövetkező FOS immunreaktivitás növekedésének mértéke jelentősen csökkent a kor előrehaladtával. A FOSB esetén, hasonlóan a FOS fehérjéhez, a stimulust követően megindul a szintézise, mely viszont lassabban éri el expressziós maximum szintjét és féléletideje (9,5

óra) is jelentősen hosszabb (Kovács 1998). Ennek megfelelően, sikerrel detektáltunk FOSB immunjelet, amely nagyarányú kolokalizációt mutatott a CRF-FOS sejtekkel a PVN-ben. Azt is megfigyeltük, hogy az ARS indukálta FOSB és FOS sejtszámnövekedés mértéke is csökken a korrallal. Bár ez esetben a CRF sejtek FOSB reaktivitása kevésbé csökkent, mint a FOS, a két IEG reaktivitásának mértéke az adott állatcsoportban erősen korrelál a sejtszám különbségek ellenére is.

A Δ FOSB, a FOSB egy splice variánsa, melyet gyakran használnak, mint az idegsejt aktiváció krónikus markerét. Annak érdekében, hogy elkerüljük az akut stressz hatását, a krónikus stressznek kitett állatainkat az utolsó stresszor alkalmazását követő 24. órában perfundáltuk. Ezzel a technikai megoldással azért éltünk, mert az általunk alkalmazott FOSB antiszérum a fehérje mindkét izoformájához kötődik, és így kivédte az akut stresszben megjelenő (full length) FOSB megjelenését és így szérumunk a CVMS-nek kitett állatokban már csak a Δ FOSB variánst detektálhatta. A Δ FOSB vizsgálata kimutatta, hogy annak immunreaktivitása nem függ az életkortól CVMS-t követően a PVN CRF neuronjaiban, ellentétben az akut aktivitási markerek (FOS, FOSB) ARS esetében tapasztalt korfüggő aktivitás csökkenéssel.

Az extended amygdala megvizsgált két magjának CRF neuronjai nem mutattak számottevő FOS kolokalizációt ARS-t követően, mely megfelel a korábbi tanulmányok eredményeinek. Érdekes, hogy a kontroll állatokban is számottevő FOSB jelet detektáltunk a CRF termelő sejtekben az amygdalában, melyre a CVMS expozíciónak csak gyenge hatása volt. Mind a kontroll, mind a CVMS csoportban megfigyeltük a CRF sejtek korrallal csökkenő FOSB immunreaktivitását. További vizsgálatok szükségesek annak felderítésére, hogy milyen funkcionális jelentősége van a CeA és BNSTov CRF neuronjaiban megfigyelt korfüggő aktivitás csökkenésnek a sejtek által beidegzett területeken.

6.5. A FOS jelölés, mint módszer hátrányai és korlátai

A FOS jelöléseket széles körben alkalmazzák a neuronok aktivitásának mennyiségi megítélésére és anatómiai feltérképezésére. Ugyanakkor ismert, hogy mint minden módszernek, ennek is vannak limitációi, ezért eredményeinket az alábbi szempontrendszer szerinti kritikával kell értelmezni.

6.5.1. A FOS jelölés hátrányai

Jól ismert, hogy az IEG-k expressziója egy bizonyos küszöbérték feletti stimulus esetén jelenik meg (Worley et al. 1993), mely új gének kifejeződésével (pl. prodynorphin, tirozin hidroxiláz, glutaminsav dekarboxiláz, vasopressin; Hughes és Dragunow 1995, Kovács et al. 1998) és olyan, neuroplaszticitást feltételező folyamatok megindulásával jár, melyek nélkülözhetetlenek a memória és tanulás (Fleischmann et al. 2003, Yasoshima et al. 2003, Kovács 2008) folyamatában.

Az IEG-k által kódolt fehérjék megjelenése a sejtben, nem mutat közvetlen összefüggést a neuron elektromos aktivitásának mértékével (Fenelon et al. 1993, Kaczmarek és Chaudhuri 1997). Ebben az esetben ugyanis minden egyes mintában, így a kontroll állatokból származó agyak esetében is milliónyi FOS immunreaktív sejtet látnánk metszeteinkben (Kovács et al. 2008). Megfigyelték például, hogy sem a sejtek élénkebb elektromos tevékenysége (Reisch et al. 2007), sem a neuronok megváltozott metabolikus aktivitása (Duncan et al. 1993) nem képeződik le feltétlenül a sejt FOS immunreaktivitásában. Másrészt, ismertek olyan folyamatok, tónusos aktivitást mutató neuronok is, mint pl. a hallópálya glicinerg neuronjai (Reisch et al. 2007), amelyek nem fejeznek ki FOS-t. Eredményeink interpretálása szempontjából fontos limitációt jelent az is, hogy egyes IEG-k kis mennyiségben, vagy egyáltalán nem expresszálódnak bizonyos agyterületeken immobilizáció során, mint pl. a FOS a nucleus tractus olfactorii lateralis-ban (Ons et al. 2004) vagy az Arc a BNST-ben, a LC-ben vagy a PVN-ben (Ons et al. 2004). Azt is tekintetbe kell venni, hogy egyes területek, idegsejtjei csak igen erőteljes inger esetén mutatnak detektálható mértékű IEG kifejeződést, mint például a corticalis gátló neuronok (Kawashima et al. 2014).

Másik elvi szempontból fontos hátránya a módszernek, hogy az AP-1, mint transzkripció faktor, a sejt által adott választ nagyon sokrétűen befolyásolhatja, beleszólva így a legkülönbözőbb élettani és kórélettani folyamatokba is (pl.: növekedés, mozgás, proliferáció, infekció, stressz szignálok). Az AP-1 aktivációját számos további, általunk nem vizsgált más faktor is befolyásolja (pl.: c-Jun, JunD, Atf4/5) (Alberini 2009, Durchdewald et al. 2009, Vesely et al. 2009). A módszer által felismert aktiváció pontos funkcionális jelentőségét ezért nem tudjuk vizsgálni FOS kvantifikálása révén (Kovács 1998). A módszer nem ad lehetőséget a stressz szabályozásban igen fontos szerepet játszó gátló változások felismerésére sem.

A fenti limitációkat tekintetbe véve is megállapíthatjuk, hogy a restraint által kiváltott FOS válasz kapcsán tett megfigyeléseink összhangban állnak más korábbi tanulmányokkal (Dayas et al. 2001, Crane et al. 2005, Sterrenburg et al. 2012) és a módszer alkalmas a stressz érzékeny agyterületek aktivitásának követésére beleértve annak életkor függő változásait is.

6.5.2. A kombinált CRF- FOSB (Δ FOSB)-FOS jelölés limitációi

A FOS-hoz hasonlóan, a FOSB és Δ FOSB számos gén expressziójára hatással lehet, ezért nem tudhatjuk, hogy a CRF-t expresszáló sejtekben milyen további, általunk nem vizsgált – a stressz szabályozásban is kiemelkedő szereppel bíró AP-1 által regulált – gének kifejeződése indul meg aktivációjuk során.

A *FosB* expressziója már percekkel a stimulust követően megindul, azonban maximuma fehérje szinten később detektálható, mint a FOS fehérjéé (Nestler 2008, 2015). A FOSB előbbi előnyét kihasználva értékelhető FOSB jelet detektáltunk a CeA és BNSTov CRF neuronokban a FOS jelöléssel szemben. Azonban a FOSB eltérő dinamikájú expressziós profilja (később detektálható maximuma) következtében feltehető, hogy állataink későbbi terminálása esetén (pl.: négy órával a stressz expozíció megindítását követően) eltérő eredményeket kaptunk volna az ARS állatokban. Ezzel egy időben viszont már csökkenő FOS jelet detektáltunk volna a PVN neuronokban, ami a hármas (CRF-FOSB-FOS) jelölés szempontjából nem lett volna optimális.

A Δ FOSB, a FOSB egy splice variánsa, amelyet gyakran alkalmaznak krónikus neurális aktiváció követésére. A Δ FOSB azonban jelentősen később és kisebb mennyiségben jelenik meg az idegsejtekben, mint a FOS vagy a többi FOSB splice variáns, de igen hosszú féléletideje és ismételt expozíciók során bekövetkező akkumulációja kiváló indikátorrá teszi a krónikus neurális aktivitás vizsgálatára (szemben a FOSB és FOS fehérjékkel) (Kovács 2008, Nestler 2015).

Összességében elmondhatjuk, hogy bár a hármas jelölés sem teszi lehetővé, hogy felfedjük a sejtek aktivitásának következményeit, mivel nem enged bepillantást abba, hogy pontosan mely neuronális funkciók megváltozásához szükséges gének expressziója változott meg. A technika mégis alkalmasnak bizonyult a CRF neuronok akut és krónikus aktivitásának követésére, a CeA, BNSTov és PVN területén, és ez az első vizsgálat, amely kimutatta különböző életkorfüggő aktivitásukat.

7. Konklúzió

Kísérleteink során elsőként hasonlítottuk össze a bazális és akut restraint által kiváltott FOS választ 13 stresszreaktív agyterületen Wistar patkányban, az állatok egész élettartamát felölelő nyolc korcsoportban. Azt találtuk, hogy a FOS immunreaktivitás nagymértékben függ az életkortól, mind a kontroll, mind az akut stressznek kitett állatokban, ezért az egyik legfontosabb módszertani eredményünk az, hogy hasonló kísérleti elrendezések alkalmazása esetén körültekintően kell megválasztani a kísérleti állatok életkorát, mivel az agyterületek bazális neuronális aktivitása és stresszre adott azonnali gén válasza is jelentős mértékben kor- és agyterület függő. Fiatal kísérleti állatok bevonása esetén a FOS vizsgálatok egyes magok (pl. a CeA, BNSTov és EWcp) esetében magas bazális sejtszámokra kell számítani.

Eredményeink szerint az akut stressz indukálta FOS aktivitás 7 agyi régióban (MeA, CeA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, BNSTfu, PVNp) negatívan korrelál az életkorral. Ez arra utal, hogy e hét terület, és talán több, ebben a munkában nem vizsgált egyéb régió befolyása is változik a HPA-tengely reaktivitására a korrallal. További szisztematikus vizsgálatokra van szükség annak megértéséhez, hogy e területek aktivitáscsökkenése miként járul hozzá a stresszadaptáció korfüggő változásaihoz.

A CRF tartalmú agyterületeken végzett karakterizációs vizsgálat megerősítette, hogy a PVN esetében a FOS főleg a CRF tartalmú sejtekben detektálható, és a sejtek ARS-re adott FOS és FOSB válasza hasonlóan az első kísérletben tapasztalt FOS eredményeihez az életkor előrehaladtával csökken. Ezzel szemben, a CVMS indukálta CRF-FOSB/ Δ FOSB válasz mértéke nem változik a korrallal.

Korábbi tanulmányok eredményeihez hasonlóan a patkány CeA és BNSTov CRF neuronjainak FOS és FOSB tartalma nem mutat jelentős változást akut vagy krónikus stressz hatására. Kontroll állatokban, stressz expozíció nélkül is detektálható mértékű FOSB immunreaktivitás jellemzi a CeA és BNSTov CRF neuronjait, mely csökken az életkorral.

Legjobb tudomásunk szerint ez az első olyan tanulmány, mely szisztematikus, majdnem a teljes élettartamot felölelően vizsgálta a neuronális aktivitást a PVN és a főbb előagyi CRF rendszerekben ARS és CVMS hatására patkányban. A CRF sejtek neuronális FOSB és FOS aktivitását erősen befolyásolja az állat életkora, így további FOS alapú vizsgálatoknál, figyelembe kell venni ezt a kor, és agyterület függő reaktivitást. További vizsgálatok elvégzése van folyamatban más, a stressz szabályozásában részt vevő területek (pl.: EWcp, LC, NTS, DR) aktivitásának feltérképezésére az életkor függvényében, és az esetleges korrallal változó stressz-reaktivitást mutató neuronok neurokémiai karakterizálása céljából.

Eredményeink más krónikus stressz vizsgálatokkal együtt hozzájárulhatnak ahhoz, hogy megértsük a stresszel kapcsolatos hangulatzavarok életkorfüggő jellegzetességeit. Ismereteink elmélyítése e területen segíthet abban, hogy új, személyre szabott, az egyén életkorához illeszthető terápiás stratégiákat dolgozzunk ki a stressz-asszociált hangulatzavarok gondozásához és prevenciójához.

8. Új eredményeink

1. Ez az első olyan tanulmány mely kimutatta 13 vizsgált agyterület közül hét esetében (MeA, CeA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, BNSTfu, PVNp), hogy a FOS immunreaktivitás mértéke lineárisan csökken a korrall.
2. Kimutattuk, hogy nem csak stressznek kitett, hanem kontroll állatok is jelentékeny FOS immunreaktivitást mutatnak bizonyos (CeA, BNSTov EWcp) stressz-asszociált magokban fiatal állatokon.
3. Kimutattuk, hogy a PVN CRF sejtjeinek ARS indukálta FOS és FOSB aktivitása csökken egészen az idős korig.
4. A PVN CRF sejtjeinek FOSB (Δ FOSB) aktivitása CVMS hatására nem változik az életkorrall.
5. A CeA és BNSTov CRF sejtjei FOSB-t tartalmaznak naív fiatal állatokban, mely CVMS hatására nem változik.
6. A CeA és BNSTov CRF sejtjeinek FOSB aktivitása erősen csökken az életkorrall kontroll, ARS és CVMS esetén is.
7. CVMS során a FOSB aktivitásának megjelenésével növekszik a sejtek CRF tartalma is.

9. Irodalomjegyzék

1. Aguilera G. (2011) HPA axis responsiveness to stress: Implications for healthy aging *Experimental Gerontology* 46: 90–95.
2. Aguilera G, Liu Y. (2012) The molecular physiology of CRH neurons *Frontiers in Neuroendocrinology* 33: 67–84.
3. Alberini CM. (2009) Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev* 89: 121-145.
4. Albrecht U. (2017) Molecular Mechanisms in Mood Regulation Involving the Circadian Clock *Front Neurol* 8: 30.
5. Alheid GF, Heimer L. (1988) New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* 27: 1-39.
6. Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, Koob GF, Vale WW, Lee KF. (2000) Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet* 24: 410–414.
7. Bali A, Jaggi AS. (2015) Preclinical experimental stress studies: Protocols, assessment and comparison *Eur J Pharmacol* 746: 282–292.
8. Bao AM, Swaab DF. (2007) Gender difference in age-related number of corticotropin-releasing hormone-expressing neurons in the human hypothalamic paraventricular nucleus and the role of sex hormones *Neuroendocrinology* 85: 27–36.
9. Beaulieu S, Di Paolo T, Barden N. (1986) Control of ACTH secretion by the central nucleus of the amygdala: implication of the serotonergic system and its relevance to the glucocorticoid delayed negative feedback mechanism. *Neuroendocrinology* 44: 247-254.
10. Belleau EL, Treadway MT, Pizzagalli DA. (2018) The Impact of Stress and Major Depressive Disorder on Hippocampal and Medial Prefrontal Cortex Morphology. *Biol Psychiatry*. 10. pii: S0006-3223(18)31930-9.
11. Bereshchenko O, Bruscoli S, Riccardi C. (2018) Glucocorticoids, sex hormones, and immunity. *Front Immunol* 9: 1332.
12. Benarroch EE. (2018) Locus coeruleus. *Cell Tissue Res* 373: 221-232.
13. Bernard C. (1865) Introduction a` la médecine expérimentale. *Endocrinology* 150: 5626–5632.
14. Bisler S, Schleicher A, Gass P, Stehle JH, Zilles K, Staiger JF. (2002) Expression of c-Fos, ICER, Krox-24 and JunB in the whisker-to-barrel pathway of rats: time course of

- induction upon whisker stimulation by tactile exploration of an enriched environment. *J Chem Neuroanat* 23: 187-198.
15. Borsody MK, Weiss JM. (1996) Influence of corticotropin-releasing hormone on electrophysiological activity of locus coeruleus neurons *Brain Res* 724: 149-168.
 16. Bouwknecht JA, Spiga F, Staub DR, Hale MW, Shekhar A, Lowry CA. (2007) Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: Relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Res Bull* 72: 32–43.
 17. Bowers G, Cullinan WE, Herman JP. (1998) Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuits. *J Neurosci* 18: 5938-5947.
 18. Bowman RE, Maclusky NJ, Diaz SE, Zrull MC, Luine VN (2006). Aged rats: sex differences and responses to chronic stress. *Brain Res.* 18;1126(1):156-66.
 19. Briski K, Gillen E. (2001) Differential distribution of Fos expression within the male rat preoptic area and hypothalamus in response to physical vs. psychological stress. *Brain Res Bull* 55: 401–408.
 20. Burford NG, Webster NA, Cruz-Topete D. (2017) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis modulation of glucocorticoids in the cardiovascular system. *Int J Mol Sci* Oct 16;18(10). pii: E2150. doi: 10.3390/ijms18102150.
 21. Butler RK, Oliver EM, Sharko AC, Parilla-Carrero J, Kaigler KF, Fadel JR, Wilson MA. (2016) Activation of corticotropin releasing factor-containing neurons in the rat central amygdala and bed nucleus of the stria terminalis following exposure to two different anxiogenic stressors *Behavioural Brain Research* 304: 92–101.
 22. Callahan LB, Tschetter KE, Ronan PJ. (2013) Inhibition of corticotropin releasing factor expression in the central nucleus of the amygdala attenuates stress-induced behavioral and endocrine responses. *Front Neurosci* 7: 195.
 23. Cannon WB. (1929) Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev* 9: 399–431.
 24. Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. (1995) Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat, *J Comp Neurol* 360: 213–245.
 25. Canteras NS, Swanson LW. (1992) Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 324: 180-194.

26. Carrasco GA, Van de Kar LD. (2003) Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 463: 235–272.
27. Chen J, Kelz MB, Hope BT, Nakabeppu Y, Nestler EJ. (1997) Chronic Fos-related antigens: stable variants of deltaFosB induced in brain by chronic treatments. *J Neurosci* 17: 4933-4941.
28. Choi DC, Furay AR, Evanson NK, Ulrich-Lai YM, Nguyen MM, Ostrander MM, Herman JP. (2008) The role of the posterior medial bed nucleus of the stria terminalis in modulating hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responsiveness to acute and chronic stress. *Psychoneuroendocrinology* 33: 659–669.
29. Choi DC, Furay AR, Evanson NK, Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Herman JP. (2007) Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. *J Neurosci* 27: 2025–2034.
30. Chowdhury GM, Fujioka T, Nakamura S. (2000) Induction and adaptation of Fos expression in the rat brain by two types of acute restraint stress. *Brain Res Bull* 52:171–182.
31. Chrousos GP. (2009) Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol.* 5: 374-381.
32. Cizza G, Calogero AE, Brady LS, Bagdy G, Bergamini E, Blackman MR, Chrousos GP, Gold PW. (1994) Male Fischer 344/N rats show a progressive central impairment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis with advancing age. *Endocrinology* 134: 1611-1620.
33. Coveñas R, de Leon M, Cintra A, Bjelke B, Gustafsson JA, Fuxe K. (1993) Coexistence of c-Fos and glucocorticoid receptor immunoreactivities in the CRF immunoreactive neurons of the paraventricular hypothalamic nucleus of the rat after acute immobilization stress. *Neurosci Lett* 149: 149-152.
34. Crane JW, French KR, Buller KM. (2005) Patterns of neuronal activation in the rat brain and spinal cord in response to increasing durations of restraint stress. *Stress* 8: 199-211.
35. Criado JR, Morales M. (2000) Acute ethanol induction of c-Fos immunoreactivity in pre-pro-enkephalin expressing neurons of the central nucleus of the amygdala. *Brain Research* 861: 173–177.
36. Cullinan WE, Helmreich DL, Watson SJ. (1996) Fos expression in forebrain afferents to the hypothalamic paraventricular nucleus following swim stress. *J Comp Neurol* 368: 88-99.

37. Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ. (1995) Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64: 477-505.
38. Cullinan WE, Herman JP, Watson SJ. (1993) Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol* 332: 1–20.
39. Cunningham ET Jr, Sawchenko PE. (1988) Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 274: 60-76.
40. da Silva AV, Torres KR, Haemmerle CA, Céspedes IC, Bittencourt JC. (2013) The Edinger–Westphal nucleus II: Hypothalamic afferents in the rat. *J Chem Neuroanat* 54: 5–19.
41. Dabrowska J, Hazra R, Guo JD, DeWitt S, Rainnie DG. (2013) Central CRF neurons are not created equal: phenotypic differences in CRF-containing neurons of the rat paraventricular hypothalamus and the bed nucleus of the stria terminalis. *Front Neurosci* 7: 156.
42. Dabrowska J, Martinon D, Moaddab M, Rainnie DG. (2016) Targeting corticotropin-releasing factor projections from the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis using cell-type specific neuronal tracing studies in mouse and rat brain. *J Neuroendocrinol* [https://doi: 10.1111/jne.12442](https://doi.org/10.1111/jne.12442).
43. Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day TA. (2001) Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci* 14: 1143–1152.
44. de Andrade JS, Viana MB, Renata O, Abrão RO, Bittencourt JC, Céspedes IC. (2014) CRF family peptides are differently altered by acute restraint stress and chronic unpredictable stress *Behavioural Brain Research* 271: 302–308.
45. de Kloet AD, Herman JP. (2018) Fat-brain connections: Adipocyte glucocorticoid control of stress and metabolism. *Front Neuroendocrinol.* 48: 50-57.
46. de Kloet ER, de Kloet SF, de Kloet CS, de Kloet AD. (2018) Top-down and bottom-up control of stress-coping. *J Neuroendocrinol* Dec 22:e12675. doi: 10.1111/jne.12675.
47. de Kloet ER, Otte C, Kumsta R, Kok L, Hillegers MH, Hasselmann H, Kliegel D, Joëls M. (2016) Stress and Depression: a Crucial Role of the Mineralocorticoid Receptor. *J Neuroendocrinol* 28(8). doi: 10.1111/jne.12379.

48. Dellu F, Mayo W, Vallée M, Le Moal M, Simon H. (1994) Reactivity to novelty during youth as a predictive factor of cognitive impairment in the elderly: a longitudinal study in rats. *Brain Res* 8; 653: 51-56.
49. Dent GW, Okimoto DK, Smith MA, Levine S. (2000) Stress-induced alterations in corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the paraventricular nucleus during ontogeny *Neuroendocrinology* 71: 333–42.
50. Deussing JM, Breu J, Kühne C, Kallnik M, Bunck M, Glasl L, Yen YC, Schmidt MV, Zurmühlen R, Vogl AM, Gailus-Durner V, Fuchs H, Hölter SM, Wotjak CT, Landgraf R, de Angelis MH, Holsboer F, Wurst W. (2010) Urocortin 3 modulates social discrimination abilities via corticotropin-releasing hormone receptor type 2. *J Neurosci.* 30: 9103-9116.
51. Deussing JM, Chen A. (2018) The corticotropin-releasing factor family: physiology of the stress response *Physiol Rev* 98: 2225–2286.
52. Diorio D, Viau V, Meaney MJ. (1993) The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci.* 13(9): 3839-3847.
53. Dirks A, Groenink L, Bouwknecht JA, Hijzen TH, Van Der Gugten J, Ronken E, Verbeek JS, Veening JG, Dederen PJ, Korosi A, Schoolderman LF, Roubos EW, Olivier B. (2002) Overexpression of corticotropin-releasing hormone in transgenic mice and chronic stress-like autonomic and physiological alterations. *Eur J Neurosci* 9: 1751-1760.
54. Dong HW, Petrovich GD, Swanson LW. (2001) Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Research Reviews* 38: 192–246.
55. Dos Santos Júnior ED, Da Silva AV, Da Silva KR, Haemmerle CA, Batagello DS, Da Silva JM, Lima LB, Da Silva RJ, Diniz GB, Sita LV, Elias CF, Bittencourt JC. (2015) The centrally projecting Edinger-Westphal nucleus--I: Efferents in the rat brain. *J Chem Neuroanat* 68: 22-38.
56. Dragunow M, Faull R. (1989) The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods* 29: 261-265.
57. Duncan GE, Johnson KB, Breese GR. (1993) Topographic patterns of brain activity in response to swim stress: assessment by 2-deoxyglucose uptake and expression of Fos-like immunoreactivity. *J Neurosci* 13: 3932-3943.
58. Durchdewald M, Angel P, Hess J. (2009). The transcription factor Fos: a Janus-type regulator in health and disease. *Histol Histopathol* 24: 1451-1461.

59. Eagle AL, Gajewski PA, Yang M, Kechner ME, Al Masraf BS, Kennedy PJ, Wang H, Mazei-Robison MS, Robison AJ. (2015) Experience-dependent induction of hippocampal Δ FosB controls learning. *J Neurosci* 35: 13773-13783.
60. Carvalho-Netto EF, Myers B, Jones K, Solomon MB, Herman JP. (2011) Sex differences in synaptic plasticity in stress-responsive brain regions following chronic variable stress. *Physiol Behav* 104: 242-247.
61. Farkas J, Kovács LÁ, Gáspár L, Nafz A, Gaszner T, Ujvári B, Kormos V, Csernus V, Hashimoto H, Reglódi D, Gaszner B. (2017) Construct and face validity of a new model for the three-hit theory of depression using PACAP mutant mice on CD1 background. *Neuroscience* 354: 11-29.
62. Feldman S, Conforti N, Itzik A, Weidenfeld J. (1994) Differential effect of amygdaloid lesions on CRF-41, ACTH and corticosterone responses following neural stimuli. *Brain Res* 658(1-2): 21-26.
63. Feldman S, Conforti N, Melamed E. (1987) Paraventricular nucleus serotonin mediates neurally stimulated adrenocortical secretion. *Brain Res Bull* 18: 165–168.
64. Feldman S, Conforti N, Saphier D. (1990) The preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis are involved in the effects of the amygdala on adrenocortical secretion. *Neuroscience* 37(3): 775-779.
65. Fenelon VS, Poulain DA, Theodosia DT. (1993) Oxytocin neuron activation and Fos expression: a quantitative immunocytochemical analysis of the effect of lactation, parturition, osmotic and cardiovascular stimulation. *Neuroscience* 53:77-89.
66. Fevurly RD, Spencer RL. (2004). Fos expression is selectively and differentially regulated by endogenous glucocorticoids in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the dentate gyrus. *J Neuroendocrinol* 16: 970–979.
67. Figueiredo HF, Bodie BL, Tauchi M, Dolgas CM, Herman JP. (2003) Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology* 144: 5249-5258.
68. Figueiredo HF, Bruestle A, Bodie B, Dolgas CM, Herman JP. (2003a) The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor. *Eur J Neurosci* 18: 2357-2364.
69. Flak JN, Ostrander MM, Tasker JG, Herman JP. (2009) Chronic stress-induced neurotransmitter plasticity in the PVN. *J Comp Neurol* 517: 156-165.

70. Flandreau EI, Ressler K.J, Owens MJ, Nemeroff CB. (2012) Chronic overexpression of corticotropin-releasing factor from the central amygdala produces HPA axis hyperactivity and behavioral anxiety associated with gene expression changes in the hippocampus and paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Psychoneuroendocrinology* 37: 27–38.
71. Fleischmann A, Hvalby O, Jensen V, Strekalova T, Zacher C, Layer LE, Kvello A, Reschke M, Spanagel R, Sprengel R, Wagner EF, Gass P. (2003) Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. *J Neurosci* 23: 9116-9122.
72. Fox JH, Lowry CA. (2013) Corticotropin-releasing factor-related peptides, serotonergic systems, and emotional behavior. *Front Neurosci* 7: 169.
73. Fox AS, Oler JA, Tromp do PM, Fudge JL, Kalin NH. (2015) Extending the amygdala in theories of threat processing. *Trends Neurosci* 38: 319-329.
74. Fu R, Mei Q, Zuo W, Li J, Gregor D, Bekker A, Ye J. (2017) Low-dose ethanol excites lateral habenula neurons projecting to VTA, RMTg, and raphe. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 9: 217-230.
75. Füredi N, Mikó A, Gaszner B, Feller D, Rostás I, Tenk J, Solymár M, Balaskó M, Pétervári E. (2018) Activity of the hypothalamic melanocortin system decreases in middle-aged and increases in old rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 73:438-445.
76. Gaszner B, Csernus V, Kozicz T. (2004) Urocortinergic neurons respond in a differentiated manner to various acute stressors in the Edinger-Westphal nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 480: 170-179.
77. Gaszner B, Jensen KO, Farkas J, Reglodi D, Csernus V, Roubos EW, Kozicz T. (2009) Effects of maternal separation on dynamics of urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor in the rat non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus. *Int J Dev Neurosci* 5: 439-451.
78. Ghosal S, Bundzikova-Osacka J, Dolgas CM, Myers B, Herman JP. (2014) Glucocorticoid receptors in the nucleus of the solitary tract (NTS) decrease endocrine and behavioral stress responses. *Psychoneuroendocrinology* 45: 142-153.
79. Girotti, M, Pace TW, Gaylord RI, Rubin BA, Herman JP, Spencer RL. (2006) Habituation to repeated restraint stress is associated with lack of stress-induced c-fos expression in primary sensory processing areas of the rat brain. *Neuroscience* 138: 1067-1081.
80. Goldfarb EV. (2018) Enhancing memory with stress: Progress, challenges, and opportunities. *Brain Cogn Dec* 12. pii: S0278-2626(18)30189-1.

81. Grahn RE, Kalman BA, Vlasaty JA, Perna JA, Nevins-Herbert C, Patton SM, Barison LK. (2018) Effects of plus-maze experience and chlordiazepoxide on anxiety-like behavior and serotonin neural activity in the dorsal raphe nucleus in rats. *Behav Pharmacol.* doi: 10.1097/FBP.0000000000000423.
82. Grinevich V, Fournier A, Pelletier G. (1997) Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on corticotropin-releasing hormone (CRH) gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 773: 190-196.
83. Groenink L, Dirks A, Verdouw PM, Schipholt ML, Veening JG, van der Gugten J, Olivier B. (2002) HPA axis dysregulation in mice overexpressing corticotropin releasing hormone. *Biol Psychiatry* 51: 875-881.
84. Hammack SE, Roman CW, Lezak KR, Kocho-Shellenberg M, Grimmig B, Falls WA, Braas K, May V. (2010) Roles for pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) expression and signaling in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) in mediating the behavioral consequences of chronic Stress. *J Mol Neurosci* 42: 327–340.
85. Hanson ES, Dallman MF. (1995) Neuropeptide Y (NPY) may integrate responses of hypothalamic feeding systems and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol* 7: 273-279.
86. Heine VM, Maslam S, Joëls M, Lucassen PJ (2004). Prominent decline of newborn cell proliferation, differentiation, and apoptosis in the aging dentate gyrus, in absence of an age-related hypothalamus-pituitary-adrenal axis activation. *Neurobiol Aging*.25(3):361-75.
87. Helfferich F, Palkovits M. (2003) Acute audiogenic stress-induced activation of CRH neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and catecholaminergic neurons in the medulla oblongata. *Brain Research* 975: 1-9.
88. Herman JP, Cullinan WE, Ziegler DR, Tasker JG. (2002) Role of the paraventricular nucleus microenvironment in stress integration. *Eur J Neurosci* 16: 381-385.
89. Herman JP, David A, Chantal P. (1995) Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology* 61: 180-190.
90. Herman JP, Dolgas CM, Carlson SL. (1998) Ventral subiculum regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical and behavioural responses to cognitive stressors. *Neuroscience* 86: 449-459.
91. Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE. (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling

- hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24: 151-180.
92. Herman JP, Larson BR, Speert DB, Seasholtz AF. (2001). Hypothalamo-pituitary-adrenocortical dysregulation in aging F344/Brown-Norway F1 hybrid rats. *Neurobiol Aging* 22: 323-332.
 93. Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, Scheimann J, Myers B. (2016) Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response *Compr Physiol* 6: 603-621.
 94. Herman JP, Schäfer MK, Young EA, Thompson R, Douglass J, Akil H, Watson SJ. (1989) Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J Neurosci* 9: 3072-3082.
 95. Horovitz O, Tsoory MM, Hall J, Jacobson-Pick S, Richter-Levin G. (2012). Post-weaning to pre-pubertal ('juvenile') stress: a model of induced predisposition to stress-related disorders. *Neuroendocrinology* 95: 56–64.
 96. Hughes P, Dragunow M. (1995) Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev* 47: 133-178.
 97. Hrabovszky E, Wittmann G, Turi GF, Liposits Zs, Fekete Cs. (2005) Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone and corticotropin-releasing hormone neurons of the rat contain vesicular glutamate transporter-2. *Endocrinology* 146: 341–347.
 98. Imaki T, Nahan JL, Rivier C, Sawchenko PE, Vale W. (1991) Differential regulation of corticotropin-releasing factor mRNA in rat brain regions by glucocorticoids and stress. *J Neurosci* 11: 585-599.
 99. Jawahar MC, Murgatroyd C, Harrison EL, Baune BT. (2015) Epigenetic alterations following early postnatal stress: a review on novel aetiological mechanisms of common psychiatric disorders. *Clin Epigenetics* 14;7: 122.
 100. Joëls M, Baram ZT. (2009) The neuro-symphony of stress *Nature Reviews, Neurosci* V 10: 459-466
 101. Jørgensen H, Knigge U, Kjaer A, Vadsholt T, Warberg J. (1998) Serotonergic involvement in stress-induced ACTH release. *Brain Res* 811: 10-20.
 102. Jozsa R, Olah A, Cornélissen G, Csernus V, Otsuka K, Zeman M, Nagy, G. Kaszaki J, Stebelova K, Csokas N, Pan W, Herold M, Bakken EE, Halberg F. (2005). Circadian and extracircadian exploration during daytime hours of circulating corticosterone and other endocrine chronomes. *Biomed Pharmacother* 59 Suppl 1: S109–116.

103. Ju G, Swanson LW, Simerly R B. (1989) Studies on the cellular architecture of the bed nucleus of the stria terminalis: II. Chemoarchitecture, *J Comp Neurol* 280: 603–621.
104. Kaczmarek L, Chaudhuri A. (1997) Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Res Brain Res Rev* 3: 237-256.
105. Kageyama K, Suda T. (2009) Regulatory mechanisms underlying corticotropin-releasing factor gene expression in the hypothalamus. *Endocr J* 56: 335-44.
106. Kalin NH, Shelton SE, Davidson RJ. (2004) The role of the central nucleus of the amygdala in mediating fear and anxiety in the primate. *J Neurosci* 24: 5506–5515.
107. Kasckow JW, Segar TM, Xiao C, Furay AR, Evanson NK, Ostrander MM, Herman JP. (2005) Stability of neuroendocrine and behavioral responsiveness in aging Fischer 344/Brown-Norway hybrid rats. *Endocrinology*.146(7):3105-12. <https://doi:10.1210/en.2004-1648>
108. Kash TL, Pleil KE, Marcinkiewicz CA, Lowery-Gionta EG, Crowley N, Mazzone C, Sugam J, Hardaway JA, McElligott ZA. (2015) Neuropeptide regulation of signaling and behavior in the BNST. *Mol Cells* 38(1): 1-13.
109. Kash TL, Winder DG. (2006) Neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor bidirectionally modulate inhibitory synaptic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuropharmacology* 51(5): 1013-1022.
110. Kawashima T, Okuno H, Bito H. (2014) A new era for functional labeling of neurons activity-dependent promoters have come of age. *Front Neural Circuits* 8: 37.
111. Kellogg CK, Awatramani GB, Piekut DT. (1998) Adolescent development alters stressor-induced Fos immunoreactivity in rat brain. *Neuroscience* 83: 681–689.
112. Keshavarzy F, Bonnet C, Bezhadi G, Cespuoglio R. (2015) Expression patterns of c-Fos early gene and phosphorylated ERK in the rat brain following 1-h immobilization stress: concomitant changes induced in association with stress-related sleep rebound. *Brain Struct Funct* 220: 1793–1804.
113. Khlebnikov VV, Kuznetsov SL, Chernov DA, Agrytskov AM, Ahmad A, Nor-Ashikin MN, Ullah M, Kapitonova MY. (2015) Age-related peculiarities of the hypothalamo-hypophyseal-adrenal system in chronic heterotypic stress. *Morfologiya* 147(1): 15-20.
114. Kim EJ, Pellman B, Kim JJ. (2015) Stress effects on the hippocampus: a critical review. *Learn Mem* 22(9): 411-416.
115. Kino T. (2015) Stress glucocorticoid hormones and hippocampal neural progenitor cells: implications to mood disorders. *Front Physio.* 19; 6: 230.

116. Kiss A, Majercikova Z. (2017) Repeated asenapine treatment does not participate in the mild stress induced FosB/ Δ FosB expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus neurons. *Neuropeptides* 61: 57–65.
117. Kiss JZ. (1988) Dynamism of chemoarchitecture in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res Bull* 20(6): 699-708.
118. Koenig S, Bredehöft J, Perniss A, Fuchs F, Roth J, Rummel C (2018). Age Dependent Hypothalamic and Pituitary Responses to Novel Environment Stress or Lipopolysaccharide in Rats. *Front Behav Neurosci.* 19;12:55.
119. Koenig JI, Walker CD, Romeo RD, Lupien SJ. (2011). Effects of stress across the lifespan. *Stress* 14: 475–480.
120. Kormos V, Gáspár L, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, Balogh A, Hashimoto H, Reglódi D, Helyes Z, Gaszner B. (2016) Reduced response to chronic mild stress in PACAP mutant mice is associated with blunted FosB expression in limbic forebrain and brainstem centers. *Neuroscience* 330: 335-358.
121. Kostich WA, Grzanna R, Lu NZ, Largent BL. (2004) Immunohistochemical visualization of corticotropin-releasing factor type 1 (CRF1) receptors in monkey brain. *J Comp Neurol* 478: 111-125.
122. Kovács KJ. (1998) c-Fos as a transcription factor a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int* 33: 287-397.
123. Kovács KJ. (2008) Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J. Neuroendocrinol* 20: 665–672.
124. Kovács KJ, Arias C, Sawchenko PE. (1998) Protein synthesis blockade differentially affects the stress-induced transcriptional activation of neuropeptide genes in parvocellular neurosecretory neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 54: 85-91.
125. Kovács KJ, Sawchenko PE. (1996) Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons *J Neurosci* 16: 262-227.
126. Koylu EO, Couceyro PR, Lambert PD, Kuhar MJ. (1998) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *J Comp Neurol* 391: 115–132.
127. Kozicz T, Bittencourt JC, May PJ, Reiner A, Gamlin PD, Palkovits M. Horn AK, Toledo CA, Ryabinin AE. (2011) The Edinger-Westphal nucleus: a historical, structural and functional perspective on a dichotomous terminology. *J Comp Neurol* 519: 1413–1434.

128. Kozicz T. (2002) Met-enkephalin immunoreactive neurons recruited by acute stress are innervated by axon terminals immunopositive for tyrosine hydroxylase and dopamine- α -hydroxylase in the anterolateral division of bed nuclei of the stria terminalis in the rat. *Eur J Neurosci* 16: 823-835.
129. Kozicz T, Yanaihara H, Arimura A. (1998) Distribution of urocortin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 391: 1-10.
130. Kozicz T, Korosi A, Korsman C, Tilburg-Ouwens D, Groenink L, Veening J, van Der Gugten J, Roubos E, Olivier B. (2004) Urocortin expression in the Edinger-Westphal nucleus is down-regulated in transgenic mice over-expressing neuronal corticotropin-releasing factor. *Neuroscience* 123: 589-594.
131. Kravets JL, Reyes BAS, Unterwald EM, Van Bockstaele EJ. (2015) Direct targeting of peptidergic amygdalar neurons by noradrenergic afferents: linking stress-integrative circuitry. *Brain Struct Funct* 220: 541–558.
132. LeDoux J. (2007) The amygdala. *Curr Biol* 17(20): R868-784.
133. Levine S. (1994) The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis The influence of maternal factors. *Ann N Y Acad Sci* 746: 275-288.
134. Levine S. (2005) Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress *Psychoneuroendocrinology* 30: 939–946
135. Li XF, Hu MH, Li SY, Geach C, Hikima A, Rose S, Greenwood MP, Greenwood M, Murphy D, Poston L, Lightman SL, O’Byrne KT. (2014) Overexpression of corticotropin releasing factor in the central nucleus of the amygdala advances puberty and disrupts reproductive cycles in female rats. *Endocrinology* 155: 3934–3944.
136. Li C, Vaughan J, Sawchenko PE, Vale WW. (2002) Urocortin III-immunoreactive projections in rat brain: partial overlap with sites of type 2 corticotrophin-releasing factor receptor expression. *J Neurosci* 22: 991–1001.
137. Liposits Zs, Sherman D, Phelix C, Paull WK. (1986) A combined light and electron microscopic immunocytochemical method for the simultaneous localization of multiple tissue antigens *Histochem* 85: 95–106.
138. Lupien SJ, Fiocco A, Wan N, Maheu F, Lord C, Schramek T, Tu MT. (2005) Stress hormones and human memory function across the lifespan. *Psychoneuroendocrinology* 30: 225–242.
139. Luiten PG, ter Horst GJ, Karst H, Steffens AB. (1985) The course of paraventricular hypothalamic efferents to autonomic structures in medulla and spinal cord. *Brain Res* 329: 374-378.

140. Majercikova Z, Kiss A. (2015) Impact of repeated asenapine treatment on FosB/ Δ FosB expression in neurons of the rat central nucleus of the amygdala: colocalization with corticoliberine (CRH) and effect of an unpredictable mild stress preconditioning. *Endocr Regul* 49: 58-67.
141. Malkoski SP, Dorin RI. Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene. *Mol Endocrinol*. 1999 Oct;13(10):1629-44.
142. McCall JG, Al-Hasani R, Siuda ER, Hong DY, Norris AJ, Ford CP, Bruchas MR. (2015) CRH engagement of the locus coeruleus noradrenergic system mediates stress-induced anxiety. *Neuron* 87: 605–620.
143. McCormick CM, Mathews IZ, Thomas C, Waters P. (2010) Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. *Brain Cogn* 72: 73–85.
144. McDonald AJ, Mascagni F. (1998) Projections of the lateral entorhinal cortex to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience*. 77: 445-459.
145. McDonald AJ, Mott DD. (2017) Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory. *J Neurosci Res*. 95(3):797-820.
146. McEwen BS. (1998) Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci*. 840: 33-44.
147. McEwen BS. (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Rec* 886: 172-189.
148. McEwen BS. (2002) Sex, stress and the hippocampus: allostasis. allostatic load and the aging process. *Neurobiol Aging* 23: 921-939.
149. McEwen BS, Gianaros PJ. (2010) Central role of the brain in stress and adaptation: Links to socioeconomic status, health, and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1186: 190–222.
150. McKlveen JM, Myers B, Herman JP. (2015) The medial prefrontal cortex: coordinator of autonomic, neuroendocrine and behavioural responses to stress. *J Neuroendocrinol*. 27: 446-456.
151. Merchenthaler I, Liposits Z. (1994) Mapping of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neuronal systems of rat forebrain projecting to the median eminence and the OVLT. Immunocytochemistry combined with retrograde labeling at the light and electron microscopic levels. *Acta Biol Hung* 45: 361–374.

152. Merchenthaler I, Vigh S, Petrusz P, Schally AV. (1982) Immunocytochemical localization of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat brain. *Am J Anat.* 165: 385-396.
153. Merchenthaler I. (1984) Corticotropin releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the rat central nervous system. Extrahypothalamic distribution. *Peptides* 5 Suppl 1: 53-69.
154. Meyza KZ, Boguszewski P M, Nikolaev E, Zagrodzka J. (2007) The effect of age on the dynamics and the level of c-Fos activation in response to acute restraint in Lewis rats. *Behav Brain Res* 180: 183–189.
155. Montaron MF, Drapeau E, Dupret D, Kitchener P, Arousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. (2006) Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory. *Neurobiol Aging.* 27(4):645-54.
156. Morgan JI, Curran T (1989) Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci* 12:459-462.
157. Muglia L, Jacobson L, Dikkes P, Majzoub JA. (1995) Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need. *Nature* 373: 427-432.
158. Myers B, Scheimann JR, Franco-Villanueva A, Herman JP. (2016) Ascending mechanisms of stress integration: implications for brainstem regulation of neuroendocrine and behavioral stress responses. *Neurosci Biobehav Rev* 74: 366-375.
159. Myers B, Scheimann JR, Franco-Villanueva A, Herman JP. (2017) Ascending mechanisms of stress integration: Implications for brainstem regulation of neuroendocrine and behavioral stress responses. *Neurosci Biobehav Rev.* 74: 366-375.
160. Nacka-Aleksić M, Pilipović I, Kotur-Stevuljević J, Petrović R, Sopta J, Laposavić G (2019) Sexual dimorphism in rat thymic involution: a correlation with thymic oxidative status and inflammation. *Biogerontology.* 20:545-569.
161. Nestler EJ. (2008) Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. 363: 3245-3255.
162. Nestler EJ, Kelz MB, Chen J. (1999) DeltaFosB: a molecular mediator of long term neural and behavioral plasticity. *Brain Res* 835: 10–17.
163. Nestler EJ. (2015) Δ FosB: a transcriptional regulator of stress and antidepressant responses. *Eur J Pharmacol* 753: 66-72.
164. Nettles KW, Pesold C, Goldman MB. (2000) Influence of the ventral hippocampal formation on plasma vasopressin, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and behavioral responses to novel acoustic stress. *Brain Res* 858: 181-190.

165. Nguyen AQ, Dela Cruz JA, Sun Y, Holmes TC, Xu X. (2016) Genetic cell targeting uncovers specific neuronal types and distinct subregions in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol* 524: 2379–99.
166. Okere B, Xu L, Roubos EW, Sonetti D, Kozicz T. (2010) Restraint stress alters the secretory activity of neurons co-expressing urocortin-1, cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and nesfatin-1 in the mouse Edinger–Westphal nucleus. *Brain Res* 1317: 92–99.
167. Ons S, Martí O, Armario A. (2004) Stress-induced activation of the immediate early gene Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) is restricted to telencephalic areas in the rat brain: relationship to c-fos mRNA. *J Neurochem* 89: 1111-1118.
168. Pacak K, Palkovits M, Kopin IJ, Goldstein DS. (1995) Stress-Induced Norepinephrine Release in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus and Pituitary-Adrenocortical and Sympathoadrenal Activity: In Vivo Microdialysis Studies. *Front Neuroendocrinol* 16: 89-150.
169. Paretkar T, Dimitrov E. (2016) The central amygdala corticotropin-releasing hormone (CRH) neurons modulation of anxiety-like behavior and hippocampus-dependent memory in mice. *Neuroscience* 390: 187-197.
170. Partridge JG, Forcelli PA, Luo R, Cashdan JM, Schulkin J, Valentino RJ, Vicini S. (2016) Stress increases GABAergic neurotransmission in CRF neurons of the central amygdala and bed nucleus stria terminalis. *Neuropharmacology* 107: 239-250.
171. Paul ED, Lowry CA. (2013) Functional topography of serotonergic systems supports the Deakin/Graeff hypothesis of anxiety and affective disorders. *J Psychopharmacol* 27: 1090–1106.
172. Paxinos G, Watson C. (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th ed. Academic Press.
173. Perrotti LI, Hadeishi Y, Ulery PG, Barrot M, Monteggia L, Duman RS, Nestler EJ. (2004) Induction of deltaFosB in reward-related brain structures after chronic stress. *J Neurosci* 24: 10594–10602.
174. 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 Res.* 277: 289-295.
175. Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW. (2001) Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Brain Res Rev* 38: 247-289.

176. Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvet M, Luppi PH. (1998) Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience* 82: 443-468.
177. Porsolt R.D., Bertin A., and Jalfre M. (1977): Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*; 229: pp. 327-336
178. Radley JJ, Gosselink KL, Sawchenko PE. (2009) A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. *J Neurosci* 29: 7330-7340.
179. Radley JJ, Sawchenko PE. (2015) Evidence for involvement of a limbic-paraventricular hypothalamic inhibitory network in HPA axis adaptations to repeated stress. *J Comp Neurol* 523: 2769–2787.
180. Regev L, Tsoory M, Gil S, Chen A. (2012) Site-specific genetic manipulation of amygdala corticotropin-releasing factor reveals its imperative role in mediating behavioral response to challenge. *Biol Psychiatry* 71: 317-326.
181. Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias CA, Hogenesch JB, Gulyas J, Rivier J, Vale WW, Sawchenko PE. (2001) Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2843-2848.
182. Reisch A, Illing RB, Laszig R. (2007) Immediate early gene expression invoked by electrical intracochlear stimulation in some but not all types of neurons in the rat auditory brainstem. *Exp Neurol* 208: 193-206.
183. Riche D, De Pommery J, Menetrey D. (1990) Neuropeptides and catecholamines in efferent projections of the nuclei of the solitary tract in the rat. *J Comp Neurol* 293: 399-424.
184. Rinaman L. (2011) Hindbrain noradrenergic A2 neurons: diverse roles in autonomic, endocrine, cognitive, and behavioral functions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: R222-235.
185. Romanov RA, Alpár A, Hökfelt T, Harkány T. (2017) Molecular diversity of corticotropin-releasing hormone mRNA containing neurons in the hypothalamus. *J Endocrinol* 232: R161-R172.
186. Romeo RD. (2010) Pubertal maturation and programming of hypothalamic–pituitary–adrenal reactivity. *Front Neuroendocrinol* 31: 232-240.

187. Romeo RD, Bellani R, Karatsoreos IN, Chhua N, Vernov M, Conrad CD, McEwan BS. (2006) Stress history and pubertal development interact to shape hypothalamic-pituitary-adrenal axis plasticity. *Endocrinology* 147: 1664–1674.
188. Romeo RD, Patel R, Pham L, So VM. (2016) Adolescence and the ontogeny of the hormonal stress response in male and female rats and mice. *Neurosci Biobehav Rev* 70: 206–216.
189. Roozendaal B, Williams CL, McGaugh JL. (1999) Glucocorticoid receptor activation in the rat nucleus of the solitary tract facilitates memory consolidation: involvement of the basolateral amygdala. *Eur J Neurosci* 11: 1317-1323.
190. Ryabinin AE, Weitemier AZ. (2006) The urocortin 1 neurocircuit: Ethanol-sensitivity and potential involvement in alcohol consumption. *Brain Res Rev* 52: 368–380.
191. Rotllant D, Nadal R, Armario A. (2007) Differential effects of stress and amphetamine administration on Fos-like protein expression in corticotropin releasing factor-neurons of the rat brain. *Dev Neurobiol* 67: 702-714.
192. Rouwette T, Klemann K, Gaszner B, Scheffer GJ, Roubos EW, Scheenen WJ, Vissers K, Kozicz T. (2011) Differential responses of corticotropin-releasing factor and urocortin 1 to acute pain stress in the rat brain. *Neuroscience* 183: 15-24.
193. Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J. (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 83: 803-834.
194. Sapolsky RM. (1992) Do glucocorticoid concentrations rise with age in the rat? *Neurobiol Aging* 13: 171-174.
195. Sawchenko PE, Li HY, Ericsson A. (2000) Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. *Prog Brain Res* 122: 61–78.
196. Sawchenko PE, Swanson LW. (1982) Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 205: 260-272.
197. Sawchenko PE, Swanson LW, Vale WW. (1984) Corticotropin-releasing factor: co-expression within distinct subsets of oxytocin-, vasopressin-, and neurotensin-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the male rat. *J Neurosci* 4: 1118-1129.
198. Seggie J. (1987) Differential responsivity of corticosterone and prolactin to stress following lesions of the septum or amygdala: implications for psychoneuroendocrinology *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr* 11: 315–324.
199. Selye H. (1936) A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138: 3479.
200. Selye H. (1971) Hormones and resistance. *J Pharm Sci* 60: 1-28.

201. Senba E, Ueyama T. (1997) Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. *Neurosci Res* 29: 183-207.
202. Seymour L. (2005) Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress *Psychoneuroendocrinology* 30: 939–946.
203. Shapiro SS, Wilk MB (1965) An analysis of variance test for normality (Complete Samples). *Biometrika* 52: 591-561.
204. Smith GW, Aubry JM, Dellu F, Contarino A, Bilezikjian LM, Gold LH, Chen R, Marchuk Y, Hauser C, Bentley CA, Sawchenko PE, Koob GF, Vale W, Lee KF. (1998) Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron* 6: 1093-1102.
205. Smith KL, Patterson M, Dhillon WS, Patel SR, Semjonous NM, Gardiner JV, Ghatei MA, Bloom SR. (2006) Neuropeptide S stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and inhibits food intake. *Endocrinology*. 147: 3510-3518.
206. Smith MA, Kim SY, van Oers HJ, Levine S. (1997) Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain. *Endocrinology* 138: 4622-4628.
207. Snedecor GW, Cochran WG. (1989) *Statistical Methods*. Iowa State University Press
208. Sonnenberg JL, Macgregor-Leon PF, Curran T, Morgan JI. (1989) Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizure. *Neuron* 3: 359-365.
209. Sparta DR, Jennings JH, Ung RL, Stuber GD. (2013) Optogenetic strategies to investigate neural circuitry engaged by stress. *Behav Brain Res* 255: 19-25.
210. Staub DR, Evans AK, Lowry CA. (2006) Evidence supporting a role for corticotropin-releasing factor type 2 (CRF2) receptors in the regulation of subpopulations of serotonergic neurons. *Brain Res* 1070: 77-89.
211. Stenzel-Poore MP, Heinrichs SC, Rivest S, Koob GF, Vale WW. (1994) Overproduction of corticotropin-releasing factor in transgenic mice: a genetic model of anxiogenic behavior. *J Neurosci* 14: 2579-2584.
212. Sterling P, Eyer J. (1988) Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology S. Fisher, J. Reason (Eds.), *Handbook of Life Stress, Cognition and Health*, John Wiley & Sons, New York, pp. 629-649.
213. Sterrenburg L, Gaszner B, Boerrigter J, Santbergen L, Bramini M, Elliott E, Chen A, Peeters BW, Roubos EW, Kozicz T. (2011) Chronic stress induces sex-specific

- alterations in methylation and expression of corticotropin-releasing factor gene in the rat. *PLoS One*. 6: e28128.
214. Sterrenburg L, Gaszner B, Boerrigter J, Santbergen L, Bramini M, Roubos EW, Peeters BW, Kozicz T. (2012) Sex-dependent and differential responses to acute restraint stress of corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat paraventricular nucleus, central amygdala, and bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci Res* 90: 179-192.
215. Sunstrum JK, Inoue W. (2018) Heterosynaptic modulation in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuropharmacology pii: S0028-3908(18)30841-4*.
216. Swanson LW, Kuypers HGJM. (1980) The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods *J Comp Neurol* 194: 555-570.
217. Swanson LW, Petrovich GD. (1998) What is the amygdala? *Trends Neurosci*. 21: 323-331.
218. Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW. (1983) Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36: 165-186.
219. Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Plotsky PM. (2000) Sensitivity to glucocorticoid-mediated fast-feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is dependent upon stressor specific neurocircuitry. *Brain Res* 870: 87-101.
220. Thrivikraman KV, Su Y, Plotsky PM. (1997) Patterns of Fos-Immunoreactivity in the CNS Induced by Repeated Hemorrhage in Conscious Rats: Correlations with Pituitary-Adrenal Axis Activity. *Stress* 2:145-158.
221. Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, Blanquet V, Steckler T, Holsboer F, Wurst W. (1998) Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat Genet* 19: 162-166.
222. Tsigos C, Chrousos GP. (2002) Hypothalamic–pituitary–adrenal axis. Neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 53: 865-871.
223. Tenk J, Rostás I, Füredi N, Mikó A, Solymár M, Soós Sz, Gaszner B, Feller D, Székely M, Pétervári E, Balaskó M. (2017) Age-related changes in central effects of corticotropin-releasing factor (CRF) suggest a role for this mediator in aging anorexia and cachexia. *GeroScience* 39: 61–72.

224. Tuplin EWN, Lightfoot SHM, Holahan MR. (2018) Comparison of the time-dependent changes in immediate early gene labeling and spine density following abstinence from contingent or non-contingent chocolate pellet delivery *Front Behav Neurosci* 12: 144.
225. Ulrich-Lai YM, Herman JP. (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses: *Nat Rev Neurosci* 10: 397-409.
226. Van Bockstaele EJ, Peoples J, Valentino RJ, (1999) A.E. Bennett Research Award. Anatomic basis for differential regulation of the rostral-lateral peri-locus coeruleus region by limbic afferents. *Biol Psychiatry* 46: 1352-1363.
227. van de Kar LD, Blair ML. (1999). Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* 20: 1–48.
228. van de Kar LD, Piechowski RA, Rittenhouse PA, Gray TS. (1991) Amygdaloid lesions: differential effect on conditioned stress and immobilization-induced increases in corticosterone and renin secretion. *Neuroendocrinology* 54: 89-95.
229. van der Kooy D, Koda LY, McGinty JF, Gerfen CR, Bloom FE. (1984) The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *J Comp Neurol* 224: 1-24.
230. Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W, Sawchenko PE. (2000) Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol* 428: 191-212.
231. Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C, Rivier J, Sawchenko PE, Vale W. (1995) Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 378: 287-292.
232. Vertes RP. (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51: 32-58.
233. Vesely PW, Staber PB, Hoefler G, Kenner L. (2009) Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutat Res* 682: 7–12.
234. Viau V, Bingham B, Davis J, Lee P, Wong M. (2005) Gender and puberty interact on the stress-induced activation of parvocellular neurosecretory neurons and corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology* 146: 137–146.
235. Vialou V, Thibault M, Kaska S, Cooper S, Gajewski P, Eagle A, Mazei-Robison M, Nestler EJ, Robison AJ. (2015) Differential induction of FosB isoforms throughout the brain by fluoxetine and chronic stress. *Neuropharmacology* 99: 28-37.

236. Vyas A, Jadhav S, Chattarji S. (2006) Prolonged behavioral stress enhances synaptic connectivity in the basolateral amygdala. *Neuroscience* 143: 387-393.
237. Walker CD, Scribner KA, Cascio CS, Dallman MF. (1991) The pituitary-adrenocortical system of neonatal rats is responsive to stress throughout development in a time-dependent and stressor-specific fashion *Endocrinology* 128: 1385-1395.
238. Whitnall MH. (1993) Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol* 40: 573-629.
239. Wilson MA, Grillo CA, Fadel JR, Reagan LP. (2015) Stress as a one-armed bandit: Differential effects of stress paradigms on the morphology, neurochemistry and behavior in the rodent amygdala. *Neurobiol Stress* 1: 195-208.
240. Weissbourd B, Ren J, DeLoach KE, Guenther CJ, Miyamichi K, Luo L. (2014) Presynaptic partners of dorsal raphe serotonergic and GABAergic neurons. *Neuron* 83: 645-662.
241. Weninger SC, Dunn AJ, Muglia LJ, Dikkes P, Miczek KA, Swiergiel AH, Berridge CW, Majzoub JA. (1999) Stress-induced behaviors require the corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor, but not CRH. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8283-8288.
242. Worley PF, Bhat RV, Baraban JM, Erickson CA, McNaughton BL, Barnes CA. (1993) Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement *J. Neurosci* 13: 4776-4786.
243. Wulsin AC, Wick-Carlson D, Packard BA, Morano R, Herman JP. (2016) Adolescent chronic stress causes hypothalamo-pituitary-adrenocortical hypo-responsiveness and depression-like behavior in adult female rats. *Psychoneuroendocrinology* 65: 109-117.
244. Xu L, Janssen D, van der Knaap N, Roubos EW, Leshan RL, Myers MG Jr, Gaszner B, Kozicz T. (2014) Integration of stress and leptin signaling by CART producing neurons in the rodent midbrain centrally projecting Edinger-Westphal nucleus. *Front Neuroanat* 8: 8.
245. Xu Y, Day TA, Buller KM. (1999) The central amygdala modulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to systemic interleukin-1beta administration, *Neuroscience* 94: 175-183.
246. Yasoshima Y, Sako N, Senba E, Yamamoto T. (2006) Acute suppression, but not chronic genetic deficiency, of c-fos gene expression impairs long-term memory in aversive taste learning. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 7106-7111.

247. Ziegler DR, Cass WA, Herman JP. (1999) Excitatory influence of the locus coeruleus in hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to stress. *J Neuroendocrinol* 11: 361-369.
248. Zhang R, Asai M, Mahoney CE, Joachim M, Shen Y, Gunner G, Majzoub JA. (2017) Loss of hypothalamic corticotropin-releasing hormone markedly reduces anxiety behaviors in mice. *Mol Psychiatry* 22: 733–744.
249. Zhu MY, Klimek V, Dilley GE, Haycock JW, Stockmeier C, Overholser JC, Meltzer HY, Ordway GA. (1999) Elevated levels of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus in major depression. *Biol Psychiatry* 46: 1275-1286.
250. Zhu W, Umegaki H, Yoshimura J, Tamaya N, Suzuki Y, Miura H, Iguchi A. (2001) The elevation of plasma adrenocorticotrophic hormone and expression of c-Fos in hypothalamic paraventricular nucleus by microinjection of neostigmine into the hippocampus in rats: comparison with acute stress responses. *Brain Res* 892: 391–395.

10. A közlemények, publikációk előadások és prezentációk jegyzéke

A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények

1. Kovács LÁ, Schiessl JA, Nafz AE, Csernus V, Gaszner B. (2018) Both basal and acute restraint stress-induced c-Fos expression is influenced by age in the extended amygdala and brainstem stress centers in male rats. *Front Aging Neurosci* 10: 248. **IF: 3,633**
2. Kovács LÁ, Berta G, Csernus V, Ujvári B, Füredi N, Gaszner B. Corticotropin-releasing factor-producing cells in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and extended amygdala show age-dependent FOS and FOSB/deltaFOSB immunoreactivity in acute and chronic stress models in the rat. *Front Aging Neurosci.* 11:274. **IF (2018): 3,633**

Összesített impakt factor: 7,266

A disszertáció témájához nem kapcsolódó közlemények

1. Kormos V, Gáspár L, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, Balogh A, Hashimoto H, Reglődi D, Helyes Z, Gaszner B. (2016) Reduced response to chronic mild stress in PACAP mutant mice is associated with blunted FosB expression in limbic forebrain and brainstem centers. *Neuroscience* 330: 335-358. **IF: 3.277**
2. Farkas J, Kovács LÁ, Gáspár L, Nafz A, Gaszner T, Ujvári B, Kormos V, Csernus V, Hashimoto H, Reglődi D, Gaszner B. (2017) Construct and face validity of a new model for the three-hit theory of depression using PACAP mutant mice on CD1 background. *Neuroscience* 354: 11-29. **IF: 3.382**
3. Werling D, Banks WA, Salameh TS, Kvarik T, Kovacs LA, Vaczy A, Szabo E, Mayer F, Varga R, Tamas A, Toth G, Biro Zs, Atlasz A, Reglodi D. (2017) Passage through the Ocular Barriers and Beneficial Effects in Retinal Ischemia of Topical Application of PACAP1-38 in Rodents. *Int J Mol Sci* 18(3): pii: E675. **IF: 3.687**
4. Werling D, Reglodi D, Banks WA, Salameh TS, Kovacs K, Kvarik T, Vaczy A. Kovacs L, Mayer F, Danyadi B, Lokos E, Tamas A, Toth G, Biro Zs, Atlasz T: Ocular Delivery of PACAP1-27 Protects the Retina From Ischemic Damage in Rodents. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2016) 57(15): 6683-6691. **IF: xxxx**

Összesített impakt faktora: 13,649

Eredeti közlemények összesített impakt faktora: 20,915

A disszertáció témájához kapcsolódó előadások és poszter prezentációk

1. László Ákos Kovács, Josef Andreas Schiessl, Anna Elisabeth Nafz, Valér Csernus, Balázs Gaszner: Age dependency of c-Fos expression in male rat's brainstem stress centres and extended amygdala. AMSE congress Pécs, 2018. október 4-6.
2. Kovács LÁ, Schiessl JA, Nafz AE, Csernus V, Gaszner B. Age dependent neuronal activation of stress centers in acute and chronic stress models in the rat. 15th International Medical Postgraduate Conference Hradec Kralové 2018. November 22-23.
3. Kovács LÁ, Schiessl JA, Nafz AE, Csernus V, Gaszner B. Age dependent neuronal activation of stress center sin acute and chronic stress models in the rat. 16th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society Debrecen, 2019. Január 17-18.
4. Kovács LÁ, Berta G, Ujvári B, Füredi N, Csernus Vr, Gaszner B. Az nucleus paraventricularis hypothalami és extended amygdala CRF sejtjeinek korfüggő c-Fos és FosB/ Δ FosB expressziója akut és krónikus patkány stressz modellben FAMÉ Kongresszus 2018, Budapest, 2018 június 5-8.
5. Kovács LÁ, Schiessl JA, Nafz AE, Csernus V, Gaszner B. Age dependency of c-Fos expression in male rat's brainstem stress centres and extended amygdala FENS regional Meeting 2019. Belgrade, Serbia, 2019 július 10-13.

A disszertáció témájához nem kapcsolódó publikált könyvfejezetek

1. Farkas J, Kovács L, Gaszner T, Gaszner B. (2016) Using PACAP heterozygous mice as models of the three hit theory of depression. In: Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP DOI 10.1007/978-3-319-35135-3_42.

A disszertáció témájához nem kapcsolódó publikált absztraktok

1. Gaszner T, Kovács LÁ, Bodnár G. (2013) Anyai stressz és krónikus stressz hatása a nucleus centralis amygdalae corticotropin factor tartalmára egérben. XXI OTDK Orvos-és Egészségtudományi Szekció: Előadás kivonatok ISBN: 978-963-306-203-6.
2. Bodnár G, Gaszner T, Kovács LÁ. (2013) A centrális projekciójú Edinger-Westphal (cpEW) mag idegsejtjei csökkent urocortin 1 és FosB kifejeződést mutatnak krónikus stressznek kitett PACAP heterozigóta egerekben. XXI OTDK Orvos-és Egészségtudományi Szekció: Előadás kivonatok ISBN: 978-963-306-203-6.

3. Kovács LÁ, Gaszner T, Bodnár G. (2013) Investigations on the three hit theory of depression on the bed nucleus of stria terminalis. Arch Hung Med Assoc Am 21:21.
4. Kovács LÁ, Gaszner T, Bodnár G. (2014) Application of the three hit theory in PACAP heterozygote mice: maternal separation and chronic stress influence CRF and FosB in the BNST. Arch Hung Med Assoc Am. 22: 21.
5. Kovács LÁ, Bodnár G, Gaszner T: A nucleus interstitialis striae terminalis corticotropin releasing factor tartalmának vizsgálata a depresszió három találat elméletén alapuló egérmódelben Orvosképzés, 2015; 2: 346.

A disszertáció témájához nem kapcsoló előadások, poszter prezentációk

1. Kovács LÁ, Gaszner T, Bodnár G. Anyai megvonás és chronicus stressz hatása a nucleus interstitialis striae terminalis (BNST) corticotropin releasing factor tartalmára egérben. Tudományos Diákköri Konferencia PTE-ÁOK 2013. február 7-8.
2. Gaszner T, Kovács LÁ, Bodnár G. Anyai stressz és krónikus stressz hatása a nucleus centralis amygdalae corticotropin factor tartalmára egérben. Tudományos Diákköri Konferencia PTE-ÁOK 2013. február 7-8.
3. Bodnár G, Gaszner T, Kovács LÁ. A centrális projekciójú Edinger-Westphal (cpEW) mag idegsejtjei csökkent urocortin 1 és FosB kifejeződést mutatnak krónikus stressznek kitett PACAP heterozigóta egerekben. Tudományos Diákköri Konferencia PTE-ÁOK 2013. február 7-8.
4. Gaszner T, Kovács LÁ, Bodnár G. Anyai stressz és krónikus stressz hatása a nucleus centralis amygdalae corticotropin factor tartalmára egérben. XXI OTDK Orvos és egészségtudományi szekció, Szeged 2013. április 2-5.
5. Bodnár G, Gaszner T, Kovács LÁ. A centrális projekciójú Edinger-Westphal (cpEW) mag idegsejtjei csökkent urocortin 1 és FosB kifejeződést mutatnak krónikus stressznek kitett PACAP heterozigóta egerekben. XXI OTDK Orvos és egészségtudományi szekció, Szeged 2013. április 2-5.
6. Kovács LÁ, Gaszner T. A bed nucleus of stria terminalis corticotropin releasing factor expressziójának vizsgálata depresszió-egér modellben. Korányi Frigyes Tudományos Fórum 2013. április 18-19.
7. Kovacs LA, Bodnar G, Gaszner T, Gaszner B: Investigation on corticotropin releasing factor expression of bed nucleus of stria terminalis in pituitary adenilate cyclase-

- activating polypeptide heterozygous mice. 11th International symposium on VIP, PACAP and related peptides. Pécs 2013. augusztus 27-31.
8. Gaszner T, Bodnar G, Kovacs LA, Gaszner B: Effects of maternal deprivation and chronic stress on the corticotropin releasing factor content of the central nucleus of amygdala in mice. 11th International symposium on VIP, PACAP and related peptides. Pécs 2013. augusztus 27-31.
 9. Gaszner B, Farkas J, Bodnar G, Kovacs LA, Gaszner T, Gaspar L, Balogh A, Szalontai B, Hashimoto H, Reglődi D, Kormos V: Application of the three hit theory in PACAP heterozygous mice: maternal separation and chronic stress influence BNST CRF and cpEW Ucn1 in an inverse manner. 11th International symposium on VIP, PACAP and related peptides. Pécs 2013. augusztus 27-31.
 10. Gaszner B, Farkas J, Bodnar G, Kovacs LA, Gaszner T, Gaspar L, Balogh A, Szalontai B, Kormos V: Application of the three hit theory in PACAP heterozygote mice: Maternal separation and chronic stress influence BNST CRF and cpEW Ucn1 in an inverse manner. Neuroscience Congress, San Diego, USA, 2013 November 10-13.
 11. Kovács LÁ, Farkas J, Bodnár G, Gaszner T, Gáspár L, Balogh A, Szalontai B, Kormos V, Gaszner B. Application of the three hit theory in PACAP heterozygote mice: Maternal separation and chronic stress influence BNST CRF and cpEW Ucn1 in an inverse manner. IBRO Workshop 2014. január 16-17.
 12. Lőrincz KN, Kovács LÁ, Gáspár L, Gaszner T. A depresszió három találat elmélete rágszálóban: viselkedési vizsgálatok Kari TDK Konferencia, Pécs, 2014. április 3-4.
 13. Kovács LÁ, Gaszner T, Bodnár G. A nucleus interstitialis striae terminalis corticotropin releasing factor tartalmának funkcionális és morfológiai vizsgálata a depresszió három találat elméletén alapuló egérmodellben. Kari TDK Konferencia, Pécs, 2014. április 3-4..
 14. Kovács LA, Farkas J, Bodnár G, Gaszner T. Gáspár L, Balogh A, Szalontai B, Kormos V, Gaszner B. Application of the three hit theory in PACAP heterozygote mice: Maternal separation and chronic stress influence forebrain-CRF and cpEW-Ucn1 in an inverse manner. The 6th international symposium of clinical and applied anatomy, Malinska Horvátország 2014. Június 26-29.
 15. Kovács LÁ. Extra hypothalamikus CRF neuronok működése a depresszió három találat elméletén alapuló egérmodellben. Pécsi Tudományegyetem Idegtudományi Centrum és Szentágothai János Kutatóközpont PhD és TDK konferencia 2014. november 13-14

16. Gaszner B, Kovács LÁ, Gaszner T, Gáspár L, Reglődi D, Lőrincz K, Farkas J, Hashimoto H, Kormos V. PACAP transgenic mice in the three hit model of depression: The involvement of BNST - CRF, cpEW - Urocortin1 and DR – serotonin. Neuroscience Congress 2014, Washington DC, 2014 November 14-18.
17. Kovács LÁ, Bodnár G, Gaszner T. A nucleus interstitialis striae terminalis corticotropin releasing factor tartalmának vizsgálata a depresszió három találat elméletén alapuló egérmódelben XXXII. OTDK Orvos és egészségtudományi szekció, Budapest 2015, március 31-április 3.
18. Farkas J, Nafz A, Kovács LA, Reglődi D, Hashimoto H, Gaszner B. Urocortinergic neurons in the central projecting Edinger-Westphal nucleus contribute to maladaptation in the three hit model of depression in mice. A Magyar Anatómus Társaság XIX. Kongresszusa 2015 Szeged június 11-13.
19. Kovács LA, Farkas J, Gaszner T, Gáspár L, Bodnar G, Lőrincz K, Hashimoto H, Kormos V, Gaszner B. PACAP transgenic mice in the threehit model of depression: The involvement of BNST-CRF, cpEW-Urocortin1. A Magyar Anatómus Társaság XIX. Kongresszusa 2015 Szeged június 11-13.
20. Farkas J, Kovács LA, Gaszner T, Hashimoto H, Balogh A, Reglődi D, Gaszner: PACAP heterozygous mice in the three hit theory model of depression. 12th international symposium on VIP, PACAP and related peptides Cappadocia, Turkey 2015, September 21-26.
21. Kovács LA, Farkas J, Reglődi D, Hashimoto H, Kormos V, Gaszner B. Extra.hypothalamic corticotropin releasing factor systems in the three hit theory model of depression in mice. 12th international symposium on VIP, PACAP and related peptides Cappadocia, Turkey 2015, September 21-26.
22. Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Gáspár T, Reglődi D, Lőrincz K, Hashimoto H, Kormos V, Gaszner B. PACAP transgenic mice in the three hit model of depression: involvement of BNST- CRF, cpEW- Urocortin1 and DR- serotonin. 15th Meeting of The Hungarian Neuroscience Society. Budapest, 2015. január 22-23.
23. Gaszner T, Farkas J, Kovács LÁ, Gaszner B. Serotonergic neurons of dorsal raphe nucleus in three hit theory of depression. IBRO Workshop Budapest 2016. Január 21-22.
24. Kovács LÁ, Farkas J, Reglődi D, Hashimoto H, Kormos V, Gaszner B. Extra-hypothalamic corticotropin releasing factor systems in the three hit model of depression in mice. IBRO Workshop Budapest 2016. Január 21-22.

25. Farkas J, Gaszner T, Kovács L, Gaszner B. Fluoxetine treatment brain area specifically affects FosB neuronal activity in PACAP heterozygous mice in the three hit model for depression. IBRO Workshop Budapest 2016. Január 21-22.
26. Farkas J, Gaszner T, Kovacs LA, Gaszner B. A fluoxetin kezelés agyterület specifikus hatásai a PACAP heterozigótaegerek Fos-B neuronális aktivitására. FAMÉ Kongresszus, 2016. Pécs.
27. Gaszner T, Kovacs LA, Farkas J Gaszner B. Extrahypothalamikus corticotropin releasing factor tartalmú rendszerek működése a depresszió három találat elméletének egér modelljében. FAMÉ Kongresszus, 2016. Pécs.
28. Kovács LÁ. Extra-hypothalamic corticotropin releasing factor containing systems in the three hit theory model of depression in mice. Dutch Neuroscience Congress, Lunteren, Hollandia, 2016 június 9-10.
29. Gaszner B, Farkas J, Kovács LÁ, Gáspár L, Nafz A, Gaszner T, Kormos V, Csernus V, Hashimoto H, Reglődi D. The three hit concept of depression. What does maternal deprivation and superimposed chronic mild stress do in PACAP mutant mice? FENS Regional Meeting, Pécs, 2017. szeptember 20-23.
30. Farkas J, Kovács LÁ, Gáspár L, Nafz A, Gaszner T, Kormos V, Csernus V, Hashimoto H, Reglődi D, Gaszner B. A three hit theory based depression model in PACAP mutant mice. FENS Regional Meeting, Pécs, 2017. szeptember 20-23.
31. Kovács LÁ, Nafz A, Ujvary B, Farkas J, Gaszner T, Gaszner B: Corticotropin-releasing factor, Urocortin1 and serotonin systems in a three hit theory and match-mismatch hypothesis based depression model in the rat. FENS Regional Meeting, Pécs, 2017. szeptember 20-23.
32. Füredi N, Kecskés A, Kovács LÁ, Garami A, Gaszner B. MC3 and MC4 receptor expression in urocortin 1 neurons of the Edinger-Westphal nucleus. AMSE Congress 2018. Október 4-6.
33. Ujvari B, Farkas J, Kovács LÁ, Gaszner T, Reglődi D, Gaszner B. Functional and morphological changes in the VTA in the three hit model of depression. AMSE Congress 2018. Október 4-6.
34. Gaszner T, Kovács LÁ, Farkas J, Kun D, Ujvári B, Füredi N, Gaszner B. Limbikus agyterületek FosB aktivitásának vizsgálata az anyai megvonás epigenetikai hatásainak tükrében a depresszió három találat elmélet egérmódeljében. A Magyar Anatómus Társaság XXI. Kongresszusa 2018 Debrecen június 15-16.

35. Ujvári B, Gaszner T, Kovács LÁ, Kun D, Füredi N, Farkas J, Gaszner B. A centrális projekciójú Edinger-Westphal mag vizsgálata a Parkinson-kór rotenon modelljében patkányban A Magyar Anatómus Társaság XXI. Kongresszusa 2018 Debrecen június 15-16.
36. Gaszner T, Farkas J, Kun D, Füredi N, Kovács LÁ, Ujvári B, Gaszner B. Neuronal activity and epigenetic changes in limbic brain territories in three hit theory of depression. 16th Annual Conference of the Hungarian Neuroscience Society Hungarian Academy of Sciences January 17-18, 2019, Debrecen, Hungary
37. Füredi N, Kovács LÁ, Kecskés A, Ujvári B, Balaskó M, Pétervári E, Garami A, Gaszner B. The role of the M3 and MC4 receptors on urocortin1 neurons in the Edinger-Westphal nucleus. 16th Annual Conference of the Hungarian Neuroscience Society Hungarian Academy of Sciences January 17-18, 2019, Debrecen, Hungary
38. Ujvári B, Füredi N, Gaszner T, Farkas J, Kovács LÁ, Gaszner B. The centrally projecting Edinger Westphal nucleus in the rotenone model of Parkinson's disease 16th Annual Conference of the Hungarian Neuroscience Society Hungarian Academy of Sciences January 17-18, 2019, Debrecen, Hungary
39. Gaszner T, Farkas J, Kun D, Füredi N, Kovács LÁ, Ujvári B, Gaszner B. Neuronal activity and epigenetic changes in limbic brain territories in three hit theory of depression. FAMÉ Kongresszus 2018, Budapest, 2018 június 5-8.
40. Ujvári B, Gaszner T, Füredi N, Farkas J, Kovács LÁ, Gaszner B. The centrally projecting Edinger-Westphal nucleus in the rotenone model of Parkinson's disease. FAMÉ Kongresszus 2018, Budapest, 2018 június 5-8.
41. Füredi N, Kovács LÁ, Kecskés A, Ujvári B, Balaskó M, Pétervári E, Garami A, Gaszner B. The role of the MC3- and MC4 receptors on urocortin1 neurons in the Edinger-Westphal nucleus. FAMÉ Kongresszus 2018, Budapest, 2018 június 5-8

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Gaszner Baláznak** az útmutatásért és segítségért az egész munkám során TDK hallgató koromtól kezdve a doktorandusz éveken át. Külön köszönetet szeretnék mondani **Reglódi Dórának**, hogy lehetővé tette, hogy az Anatómia Intézetben végezhessem kutatómunkámat.

Szeretnék köszönetet mondani **Csernus Valérnak** a RIA mérések kivitelezésében nyújtott segítségéért.

Nagyon hálás vagyok a kutatótársaimnak és orvostanhallgatóinknak, **Füredi Nórának**, **Farkas Józsefnek**, **Ujvári Baláznak**, **Gaszner Tamásnak**, **Anna Nafz-nak** és **Josef Schiebl-nek** a munkám során kapott tanácsokért és vizsgálatok alatt nyújtott segítségért.

Köszönettel tartozom a PTE ÁOK Anatómiai Intézet minden dolgozójának is. Külön szeretném megköszönni **Orbán Izabellának** magas szintű immunhisztológiai munkáját, **Godáné Brumán Beatrixnak** a RIA mérésekben nyújtott közreműködéséért, továbbá Hilyovszky Klárának az állatok perfundálását követően nyújtott segítségéért. Köszönöm **Mercz Tündének** a mindennapos laboratóriumi munkák során nyújtott segítséget,

Külön köszönet illeti **Hollósy Tibort** és **Rékási Zoltánt** az évek alatt nyújtott szellemi támogatásért.

Szeretném megköszönni a lehetőséget **Kormos Viktóriának**, **Werling Dórának** és **Józsa Gergőnek**, hogy részt vehettem az ő munkáikban is, ezzel is tágítva ismereteimet.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani **feleségemnek** és az **egész családomnak** türelmükért és támogatásukért munkám során. Végül, szeretném kislányomnak, **Alinának** ajánlani munkámat.

A munka megvalósításához a következő támogók járultak hozzá: a PTE-ÁOK KA 2017-1, az Innovációs és Technológiai Minisztérium Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Programjának a Pécsi Tudományegyetem 5. tématerületi programja (FIKP II), NAP2017-1.2.1-NKP-2017-00002; GINOP-2.3.2-15-2016-00050 „PEPSYS”, – A peptiderg szignalizáció komplexitása és szerepe szisztémás betegségekben, MTA-TKI14016; EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009, TAMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001, EFOP-3.6.2-VEKOP-16-15 2017-00008, „The role of neuroinflammation in neurodegeneration: from molecules to clinics”, a Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program az Emberi Erőforrások Minisztériumának támogatásával - 20765-3/2018/FEKUTSTRAT valamint a EFOP-3.6.1.-16-2016-00004 Intelligens szakosodást szolgáló intézményi fejlesztések című projektek.