

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

Doktori (Ph.D.) tézis

dr. Kovács László Ákos



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai Intézet

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola,
Neuroendokrinológia és Neurohisztológia program,
Programvezető: Prof. Reglódi Dóra Ph.D., D.Sc.,
Témavezető: dr. Gaszner Balázs, Ph.D.

Pécs, 2019.

Bevezetés

A stressz és szabályozása

A stressz az egyén fiziológiai és/vagy pszichológiai integritását veszélyeztető, valós vagy valósnak vélt fenyegetés, mely fiziológiai és/vagy viselkedésbeli válaszreakciókhoz vezet. A stresszválasz feladata a túléléshez nélkülözhetetlen adaptációs folyamatok megindítása és fenntartása, melynek elsődleges célja a szervezetünk belső egyensúlyának (homeostasis) megtartása.

Környezeti stresszhatások, mint ingerek aktiválják a hypothalamus-hypophysis-adrenocorticalis (HPA-) tengelyt, mely során a hypothalamus paraventricularis magjának (PVN) parvocellularis neuronjai (PVNp) corticotropin-releasing factor-t (CRF) juttatnak axonális transzport útján az eminentia mediana kapillárisaiba neuroszekréció révén. A CRF az agyalapi mirigy portalis vénáiba kerülve a hypophysis elülső lebenyének corticotroph sejtjeihez jut, ahol a CRF1 receptorhoz kötődve megindítja a proopiomelanocortin (POMC) szintézisét. A POMC-ból hasítás révén adrenocorticotrop hormon (ACTH) keletkezik, melyet az adenohypophysis sejtjei a véráramba szekretálnak és az a mellékvese *zona fasciculata*-jában megindítja a glukokortikoidok szintézisét, szekrécióját. A mellékvesekéregből felszabaduló cortisol (emberben), illetve corticosterone (CORT /patkányban/) képessé teszi a szervezetet az alkalmazkodásra. A glukokortikoidok fokozzák a metabolizmust, csökkentik az étvágyat és a gyulladásos folyamatok aktivitását, továbbá hozzájárulnak a cardiovascularis rendszer megfelelő működéséhez. A glukokortikoidok emellett hatással vannak a figyelemre és hosszútávon emelkedett szintjük gyakran társul hangulatzavarokhoz is, mint például a major depresszió. Végezetül, a glukokortikoidok a mineralokortikoidokkal együttesen negatív feedback útján szabályozzák önmaguk szintézisét és szekrécióját a limbikus rendszeren valamint PVN CRF neuronjain keresztül.

A stressz tengely magasabb szintű szabályozása

A HPA-tengely szabályozásában számos corticalis és subcorticalis agyterület vesz részt. A hippocampus és a prefrontalis cortex (PFC) gamma-amino-butirát (GABA) tartalmú neuronjai a PVN CRF termelését tónusosan gátolják, blokkolva ezzel a HPA-tengely aktivitását. A hippocampus és PFC a stressz megszűnését követően segíti a stressz előtti állapot és egyensúly visszaállítását.

A tágabban értelmezett amygdala magrendszer komplex módon befolyásolja a szervezet stresszre adott válaszát. Az amygdala magok, így a nucleus centralis et medialis amygdalae (CeA, MeA) serkentik a stressz tengely működését; csakúgy, mint a nucleus basolateralis amygdalae (BLA). A tágabb értelemben vett amygdalához sorolt nucleus interstitialis striae terminalis (BNST) anterior magcsoportja serkenti a stressz választ, míg a hátsó magcsoport gátolja azt. Kiemelendő továbbá, hogy a BNST egyes magjai olyan CRF tartalmú neuronokat is tartalmaznak, melyek kihatnak a PVN CRF rendszerének működésére, módosítva a stresszválaszt.

A diencephalicus és telencephalicus struktúrák mellett jelentős szerep jut az agytörzsi központoknak is. A nucleus raphe dorsalis (DR) is fokozza a stresszválasz kialakulását szerotoninergerg neuronjai révén; míg a központi projekciójú Edinger-Westphal mag (cpEW) urocortin 1 (Ucn1) tartalmú sejtjei csökkentik a HPA-tengely aktivitását.

CRF peptidcsalád és a hangulatzavarok kapcsolata

A CRF egy 41 aminosavból álló neuropeptid, mely az emlősök négytagú CRF peptid családjának (CRF, Ucn1, Ucn2, Ucn3) a tagja. Jelenlétét a szervezet számos szövetében megfigyelték, de a peptidcsalád tagjai közül a CRF található meg a legnagyobb mennyiségben a központi idegrendszerben. A kérgi területek mellett jelentős CRF pozitív idegsejt populációval rendelkezik a PVNp, a CeA, és a BNST magrendszerében a fusiformis (BNSTfu), ventralis (BNSTv) és ovalis (BNSTov) divíziók is. CRF sejtek és rostok jelen vannak továbbá az agytörzsben és befolyásolják a kisagy működését is.

A CRF, elsősorban a PVNp-ben, kiemelt jelentőséggel bír a stresszválasz folyamatok szabályozásában. A CRF megemelkedett szintje a központi idegrendszerben depresszióval és egyéb hangulatzavarokkal társul emberben. Emellett ismert, hogy egerekben a CRF hiánya csökkent HPA-tengely működéssel és csökkent szorongásos viselkedéssel társul. Lentivírus által, izoláltan a CeA-ban fokozott CRF expresszió csökkenti a szorongást egerekben. Míg szelektíven a BNSTov-ban megnövekedett CRF expresszió depresszió-szerű viselkedéssel társul.

Neuronális aktivációs markerek vizsgálata stressz folyamatokban

A neuronok aktivitásának funkcionális-morfológiai tanulmányozására gyakran alkalmazott módszerek egyike az azonnali gének (IEG-k) expressziójának vizsgálata, mely lehetővé teszi a neuronális aktivitás fokozódásának követését. A *Jun/Fos* proto-onkogén család tagjainak

megjelenését vizsgálják a leggyakrabban. A FOS fehérjék heterodimert képeznek a *Jun* gének termékeivel kialakítva az aktivátor protein 1 (AP-1) transzkripció faktort, mely számos celluláris folyamatot (köztük a *Crf* expresszióját is) a génexpresszió szintjén befolyásol.

Az akut neuronális aktiváció során percekkel a stimulust követően már kimutatható a *Fos* megjelenése mRNA szinten. Fehérje szinten, a FOS válasz két órával a stimulust követően éri el a maximumát, mely 4-6 óra múlva tér vissza a nyugalmi szintre.

Krónikus stressz adaptáció neuronális aktivitásának követésére a FOSB fehérjének detektálását alkalmazzák. A FOSB a FOS-szal ellentétben lassúbb expressziós dinamikával rendelkezik, és féléletideje is hosszabb (9,5 óra). A FOSB egyik variánsa a Δ FOSB még elnyújtottabb dinamikát mutat, sőt, akkumulálódik a sejtben, így ismétlődő stimulusok után jelenléte napokkal az utolsó stimulust követően is kimutatható. A krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) modellt gyakran alkalmazzák a Δ FOSB válasz kiváltására.

Az életkor és stressz kapcsolata

Az életkorral számos szerv és szervrendszer működése változik, köztük a HPA-tengely stresszre adott válasza is. Újszülött rágcsálókra a stressz hyporesponsive periódus jellemző, mely alatt a HPA-tengely alacsony aktivitást és csökkent CORT választ mutat stressz során. A prepubertás korú patkányok elnyújtottabb CORT válasszal reagálnak akut stresszre, mint a felnőtt korú társaik. Idős egyedekben ugyancsak megfigyeltek fokozott stressz érzékenységet a fiatal felnőtt állatokhoz viszonyítva, ugyanakkor a CRF és a CORT választ leíró megfigyelések igen ellentmondásosak.

A HPA-tengely, és az agy stresszadaptációs központjainak működésében tehát tetten érhető bizonyos korfüggő változások, de nem találtunk az akut és krónikus stresszre adott válasz korfüggő dinamikáját leíró szisztematikus tanulmányt az irodalomban.

Célkitűzések és feltételezések

Akut stresszhatás vizsgálata a FOS fehérje megjelenésére az életkor függvényében

Feltételeztük, hogy az akut restraint stressz expozíciót (ARS) követő FOS fehérje kifejeződés mértéke függ az életkortól. 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 immunreaktivásra 12, a stressz adaptációban közreműködő kiválasztott agyterületen [PVNp, PVN pars magnocellularis (PVNm), MeA, CeA, BLA, BNSTov, dorsolateralis BNST (BNSTdl), dorsomedialis BNST (BNSTdm), BNSTv, BNSTfu, EWcp, DR] patkányban. Emellett vizsgáltuk az állatok somatosensoros barrel cortex neuronjainak (S1) immunreaktivitását is. További célunk volt a HPA-tengely aktiválódásának mértékét tesztelni az életkor függvényében.

Akut és krónikus stresszhatás korfüggő dinamikájának vizsgálata CRF tartalmú idegsejtekben

Az első hipotézis vizsgálata során nyilvánvalóvá vált, hogy számos agyterületen a korrall változik a FOS aktiváció mértéke. A korfüggést mutató agyterületek közé tartoztak CRF-et expresszáló idegsejteket is tartalmazó régiók (PVN, BNSTov és CeA) is. 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. Mivel a CRF sejtek az akut, és a krónikus stressz adaptációban is fontos szerepet játszanak, a kísérleti elrendezést krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) modell bevonásával egészítettük ki 6 korcsoportban (2; 3; 6; 12; 18 és 24 hónapos). Feltételezésünk az volt, hogy a CRF neuronok krónikus aktivációja (Δ FosB) életkor függő dinamikát mutat a PVN, BNSTov és CeA területén.

Anyagok és módszerek

Kísérleti elrendezés

Első kísérletünkhöz összesen 73 állatot osztottunk 8 korcsoportba (1; 1,5; 2; 3; 6; 12; 18 és 24 hónapos állatok). Minden korcsoportban létrehoztunk egy kontroll és egy ARS csoportot. Az ARS csoportokat 60 perces akut restraint stressznek tettük ki, majd a stressz kezdete után 2 órával perfundáltuk állatainkat.

Második kísérletünkbe összesen 127 állatot vontunk be, melyeket 8 korcsoportba osztottunk a fent leírtak szerint. Emellett, a 2, 3, 6, 12, 18 és 24 hónapos állatok esetében CVMS csoportot is képeztünk. Az ARS állatokat a fent leírt módon kezeltünk, míg CVMS állatainkat két hét krónikus variábilis enyhe stressznek tettünk ki. A protokoll során az állatokat egy rövid nappali (laboratóriumi síkrázógép, restraint, döntött ketrec, sötét szoba), valamint egy hosszú éjszakai (nedves alom, szociális izoláció) stressz hatásnak tettünk ki naponta.

Kísérleteink során vizsgáltuk az állatok plazma CORT szintjét radioimmunassay (RIA) segítségével. A második kísérletben követtük az állatok testtömeg változását és meghatároztuk a mellékvese- és csecsemőmirigy tömegeiket.

Immunjelölések

Az ARS hatására fellépő neuronális aktivitás térképezésére FOS immunjelölést alkalmaztunk 13 agyterületen diamino-benzidine (DAB) kromogénnel. Második kísérletünkben hármass (CRF, FOS, FOSB) immunfluoreszcens jelölést alkalmaztunk.

Mikroszkópia és digitális képanalízis

A DAB-bal jelölt metszeteinket Nikon fénymikroszkóp és digitális kamera segítségével digitalizáltuk. Az immunfluoreszcensen jelölt minták esetében a digitalizálást Olympus Flouview 1000 konfokális mikroszkóp segítségével végeztük el. Mindkét tanulmányban állatonként minden vizsgált agyterületéből 5 reprezentatív fotót értékeltünk ki. A DAB jelölés esetében a FOS immunreaktív sejtek számát vizsgáltuk. A fluoreszcens jelölés során vizsgáltuk a CRF, FOS és FOSB immunreaktív sejtek számát, továbbá a kolokalizáció arányát és végül vizsgáltuk a CRF sejtek specifikus jel denzitását is (SSD).

Statisztikai analízis

Eredményeink kiértékeléséhez a normalitási és variancia homogenitási feltételek tesztelése után két-utas variancia analízist (ANOVA), Tukey-féle post hoc tesztet, valamint Spearman-féle korreláció analízist alkalmaztunk.

Eredmények

A modellek validitásának vizsgálata

Annak érdekében, hogy a HPA-tengely aktivitását az ARS és CVMS modellekben az életkor függvényében értékeljük, meghatároztuk a plazma CORT szintjét. Akut modellünkben a CORT szintje megemelkedett ARS hatására, habár ez nem minden esetben érte el a szignifikancia mértékét. Az idősebb állatokénál kisebb mértékű, bár szignifikáns CORT emelkedést egy hónapos ARS állatokban detektáltunk. Habár a CORT válasz mértéke nem csökkent az életkorral, a stressz és az életkor interakciójának hatása volt a CORT szintre. A CVMS modellben csupán a 3 hónapos CVMS egyedek mutattak magasabb CORT szintet kontroll csoportjukhoz képest. A CVMS hatására csökkent az állatok testtömege és ezzel párhuzamosan növekedett a relatív mellékvese tömegük, habár ez csak a 2 hónapos CVMS állatokban volt szignifikáns mértékű. A CVMS csökkentette a relatív thymus tömegeket is minden korcsoportban, kivéve a legidősebb korcsoportot.

Neuronális aktiváció mintázat vizsgálata az akut stressz modellben

A tágabb értelemben vett amygdala magrendszerét vizsgálva minden magban (MeA, CeA, BLA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, BNSTv, BSNTfu) kimutatható volt a stressz és a kor hatása a FOS pozitív sejtek számára. Ugyanakkor az ANOVA a stressz és a kor interakciójának hatását a FOS tartalmú sejtekre csak a CeA-ban, BLA-ban és a BNSTfu-ban tudta megerősíteni. További négy agyterületen (PVNp, PVNm, DR, cpEW) a stressz, az életkor és azok interakciója is hatással volt a magok FOS immunreaktivására. Bár magonként és korcsoportonként eltérő FOS aktivitásemelkedést detektáltunk, minden magban a 2 hónapos korcsoportban találtuk a legmagasabb FOS tartalmú sejtszámot. A legnagyobb, 29-szeres aktivitásemelkedést pedig a PVNp területén detektáltuk. A Spearman-féle korrelációs vizsgálatok alátámasztották, hogy az EWcp és DR magok kivételével, minden vizsgált magban kimutatható volt a FOS sejtszám csökkenése a kor előrehaladtával, mind a kontroll, mind az ARS esetében.

A CRF sejtek neurális aktivációjának vizsgálata akut és krónikus stressz modellben

Az ARS állatokban megemelkedett a FOS és FOSB tartalom a PVN CRF sejtjeiben stressz hatására, melynek mértéke a korrallal fokozatosan csökkent (annak ellenére, hogy a legkisebb stressz- indukálta IEG emelkedést a 3 és a 6 hónapos ARS állatokban figyeltük meg). A Spearman korreláció is alátámasztotta IEG expresszió lineáris csökkenését az ARS csoportban. A hármas pozitivitást mutató (CRF-FOS-FOSB) sejtek CRF tartalma korrelált a sejtekben jelenlevő IEG termékek mennyiségével. A kor és a stressz is befolyásolta a CRF sejtek FOSB tartalmát a CeA és a BNSTov területén, azonban a faktorok interakciója nem volt kimutatható. A FOSB immunreaktivitás mértéke is csökkent az életkorral az ARS csoportokban a CeA és a BNSTov magjaiban.

CVMS hatására a PVN CRF sejtjeiben megnövekedett a FOSB immunreaktivitása, mely azonban nem változott a korrallal. Szignifikánsan fokozódott FOSB expressziót csak a 3 és a 18 hónapos CVMS állatokban detektáltunk, a kontroll társaikhoz viszonyítva. A kettősen jelölt (CRF-FOSB) neuronok CRF tartalma (SSD) fokozódott az IEG tartalmuk növekedésével párhuzamosan.

A PVN-nel ellentétben, a CeA és a BNSTov CRF sejtjeinek FOSB immunreaktivitása nem változott CVMS hatására, viszont annak mértéke erősen csökkent a korrallal, mind a kontroll mind pedig a CVMS állatokban. A CeA- és BNSTov-CRF sejtek FOSB tartalmának az életkorral együtt járó csökkenését a Spearman- féle korreláció vizsgálatok is megerősítették.

Diszkusszió

A modellek validitása

Mindkét kísérletben hatásosnak bizonyult az ARS modellünk, melyet a HPA-tengely aktivitásának (plazma CORT szintek) és a stressz szenzitív agyterületek aktivitás növekedése (FOS immunreaktivitás) is alátámaszt. A CORT vizsgálataink továbbá alátámasztják a CVMS hatékonyságát is. Emellett a testtömegcsökkenés és szervtömeg változások (mellékvese és thymus) is a CVMS hatásosságára utalnak. Azonban meg kell jegyeznünk, hogy nem minden korcsoportban volt szignifikáns a test- és szervtömegek változása. A legszembetűnőbb különbségeket mindkét vizsgálat során a fiatal állatok (1,5, 2, 3, 6 hónapos) mutatták. Idősebb (12, 18, 24 hónapos) korcsoportokban sem a test- és szervtömeg változások, sem a CORT szint változása nem volt szignifikáns mértékű. Más tanulmányok is megfigyelték, hogy egyes patkánytörzsek (Sprague dawley, Brattleboro, Wistar) másként reagálnak idősebb korban (csökkent CORT válasz). Az is ismert, hogy a stressz szervekre gyakorolt hatása (pl.: thymus) sem kifejezett koros állatokban.

Mindent összegezve, a szerv és testtömeg változások, a CORT válaszok, továbbá a CRF-tartalmú területek, és közülük elsősorban a PVN FOS és FOSB tartalmának növekedése együttesen megerősíti a modelljeink hatékonyságát.

Az akut stressz hatása a FOS immunjelre életkor függvényében

A fiatalabb ARS állatokban (1, 1,5, 2 hónapos) nem volt minden általunk vizsgált agyterületen kimutatható szignifikáns mértékű FOS immunreaktivitás-növekedés a kontroll állatokhoz viszonyítva. Ezzel szemben, a fiatal 2 hónapos ARS-nek kitett egyedekben mértük a legnagyobb FOS aktivitást, mely összhangban áll a korábbi eredményekkel. A 2 hónapos ARS állatok ilyen magas FOS aktivitásának egyik lehetséges magyarázata a késői adolescens és a postpubertás korra jellemző megnövekedett agyi stressz érzékenység is lehet. A magok életkorfüggő érzékenysége (mely magonként különböző és az adott területre jellemző lehet) utalhat arra, hogy miért rendelkeznek az állatok sérülékeny életkorbeli szakaszokkal (pl.: korai pubertás kor, idősebb kor).

A magok stressz reaktivitása fokozatosan csökken az életkorral, azonban ennek mértéke agyterületenként különböző. A DR és CeA esetében már a harmadik hónaptól, a MeA, BNSTov, BNSTdm, BNSTfu, PVN esetében a hatodik hónaptól, míg a BNSTdl esetében csak a tizenkettedik hónaptól csökkent le a FOS tartalom szignifikáns mértékben a 2 hónapos

maximum értékekhez viszonyítva. Hét magban (MeA, CeA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, BNSTfu, PVNp) a korrelációanalízis is bizonyította a FOS sejtek számának életkorral járó csökkenését az ARS csoportokban. Emellett, az EWcp, PVNm, BNSTv és BLA esetében ez az aktivitáscsökkenés a kontroll egyedekben is kimutatható volt.

Meg kell jegyeznünk, hogy a FOS aktivitás mértéke nem korrelált a plazma CORT szintjével, így a FOS aktivitás vizsgálata önmagában nem alkalmas a stressz tengely aktivitásának megítélésére. Ennek hátterében a FOS mérés módszerének korlátai is állhatnak: a jelöléssel nem azonosítható a neuronális funkcióváltozás mibenléte (gátlás, serkentés), mert az csupán a sejtaktivitás génextpressziót érintő változását mutatja ki. A FOS nem fejeződik ki minden sejtben (helyette egyes esetekben más IEG fejeződik ki, mint pl. Arc). Végül, vannak olyan sejtek melyek folyamatos tónusos gátló funkcióval rendelkeznek, és egyáltalán nem mutatnak aktivitásváltozás esetén fokozott IEG produkciót, és így FOS immunreaktivitást sem. Ezeken kívül további magyarázat lehet a FOS és CORT adatok diszkordanciájára, hogy a HPA-tengely aktivitását több, az általunk nem vizsgált agyterület is erősen befolyásolhatja, elsősorban pl. a glukokortikoid feedback hatás révén (pl.: PFC, hippocampus).

Az ANOVA hét magban támasztotta alá az életkor és stressz interakció hatását, de ezek közül a korreláció analízis csak három magban (CeA, BNSTfu, PVNp) bizonyította egyértelműen a korfüggő FOS sejtszám csökkenést. Mindez arra is utalhat, hogy a PVNp korfüggő változásainak hátterében a CeA és BNSTfu FOS expressziójának hanyatlása is állhat, mivel ismert a BNST és CeA nélkülözhetetlen szerepe a glukokortikoid válasz kialakításában. A többi mag (MeA, BNSTov, BNSTdl, BNSTdm, BNSTv) nem mutatott egyértelműen megerősíthető életkorfüggő FOS immunreaktivitás csökkenést, ahogyan a CORT válasz sem. Ez arra enged következtetni, hogy az utóbbi öt magnak az életkortól függetlenül a HPA-tengely stresszválaszának stabilitásában is lehet szerepe.

Végül, hogy kizárjuk, hogy a megfigyelt idegsejt-aktivitáscsökkenés nem csupán az öregedéssel járó csökkent szenzoros érzékenység következménye lenne, megvizsgáltuk a somatosensoros barrel cortex FOS expresszióját is. Azt találtuk, hogy ez a kérgi terület mutat ugyan korfüggő aktivitásváltozást, de annak dinamikája egy U alakú görbét ír le, és nem találtunk lineáris összefüggést a korrallal, szemben a stressz adaptációban résztvevő régiókkal.

Összefoglalva azt mondhatjuk, hogy az általunk megfigyelt életkorfüggő dinamika a FOS válasz mértékében jellemző a stressz érzékeny magokra, de nem az egész agyra. A magok reaktivitás csökkenése nem magyarázható az érző rendszerek korrallal járó csökkent szenzitivitásával.

Tanulmányunk egyik váratlan megfigyelése volt, hogy egyes területeken a fiatal kontroll egyedek is jelentős FOS aktivitással rendelkeztek. Az összes vizsgált terület közül a CeA, BNSTov, EWcp mutatott viszonylag magas bazális FOS aktivitást 4 hetes állatokban, mely később 6 hetes kortól már csökkenést mutatott. Ennek jelentősége nem ismert, de tekintettel arra, hogy az előbb leírt magok a stressz-adaptációban szerepet játszó neuropeptideket expresszálnak (CRF a BNSTov-ban és CeA-ban, illetve az Ucn1 az EWcp-ben), felvetődik, hogy az állatok negyedik héten történő elválasztását követően magasabb FOS aktivitás szükséges a megfelelő stressz adaptációhoz ebben az érzékeny juvenilis korban. Ennek vizsgálatára azonban további kolokalizációs kísérletek szükségesek.

Az akut és krónikus stressz hatása a CRF-FOS-FOSB immunreaktivásra az életkor függvényében

Jól ismert, hogy az ARS megemeli a FOS tartalmú CRF sejtek számát, és hogy az emelkedés mértéke alacsonyabb fiatal juvenilis állatokban, mint fiatal felnőtt állatokban. Mindezt a mi kísérletünk is alátámasztotta, de ezen túlmenően elsőként bizonyítottuk, hogy a CRF-FOS kolokalizáció mértéke csökken az életkorral egészen az állatok 24 hónapos koráig. Kísérletünkben megállapítottuk, hogy a FOS expressziója csökken a CRF sejtekben; ugyanakkor ott a CORT válasz nem változott a korrallal. Mindez arra enged következtetni, hogy a hypophyseotrop neuronok nem feltétlenül fejeznek ki FOS-t miközben növelik a stressz-tengely aktivitását, vagy az akut stressz által kiváltott fokozott CRF termelésük nem jár mérhető FOS immunreaktivitással a sejtmagban. Kísérleteink azt is alátámasztották, hogy a stimulust követő második órában már a FOSB immunreaktivitás is szignifikánsan megemelkedik, mely korrelál a FOS értékekkel, annak ellenére, hogy a FOSB immunjel maximuma irodalmi adatok alapján sokkal később figyelhető meg.

A CeA és BNSTov CRF sejtjei nem tartalmaztak számottevő mértékben FOS-t. Ez arra utal, hogy az ARS során megjelenő FOS jel egyéb (pl.: metenkephalin tartalmú) neuronokhoz köthető. Ugyanakkor, a CRF sejtekben jelentékeny FOSB immunreaktivitást detektáltunk. A FOSB jel erőssége a CRF sejtekben nem változott ARS hatására, viszont erősen csökkent a korrallal mind a kontroll, mind pedig az ARS csoportokban. A CeA-ban és a BNSTov-ban is jelentősebb mértékű volt a CRF sejtek FOSB tartalmának csökkenése, mint a PVN neuronjaiban. Ugyanakkor mindkét mag inkább közvetetten hat a PVN neuronok CRF aktivitására, így nem feltétlenül illeszthető az amygdala magok funkciója a PVN működésének dinamikájával.

Krónikus stressz hatása a CRF-FOS-FOSB immunjelre az életkor függvényében

Jelen kísérletünk is alátámasztotta, hogy a CVMS fokozza a FOSB megjelenését a PVN területén a CRF neuronokban. Szemben az akut kísérletben megfigyeltekkel, a CRF sejtek CVMS indukálta FOSB tartalma független az életkortól. További érdekes megfigyelésünk volt, hogy míg a kontroll állatokban a PVN CRF immunreaktív neuronjaiban alig volt kimutatható a FOSB tartalmú CRF sejtek jelenléte, addig a CeA és a BNSTov CRF tartalmú sejtjei számottevő FOSB jelet mutattak kontroll állatokban is.

A kísérletünkben nem találtunk a CeA és a BNSTov területén CVMS indukálta fokozott FOSB immunreaktivitást, mely összhangban áll a korábbi megfigyelésekkel. A FOSB jelölés kimutatta, hogy néhány CRF neuron mind kontroll állatokban, mind CVMS után is aktív volt a BNSTov és CeA területén. Ugyanakkor, a PVN- től eltérően, mind a kontroll, mind a CVMS-nek kitett állatok az életkor előrehaladtával jelentősen csökkent FOSB immunjelet mutattak a CRF tartalmú sejtekben. Az eltérő dinamika hátterében esetleg a neuronok eltérő neurokémiai karaktere is állhat, mivel az amygdala magok inkább GABAerg neuronokból épülnek fel, addig a PVN neuronjai inkább glutamátergek. Ismert továbbá, hogy léteznek olyan GABA-erg neuronok, melyek nem mutatnak *Fos* génexpressziót külső ingerek hatására. A CeA és BNSTov korfüggő aktivitás változásának jelentősége egyelőre ismeretlen. További vizsgálatok szükségesek ezért annak felderítésére, hogy az itt található CRF sejtek által beidegzett, stressz szabályozásában is szerepet játszó területeken, mint pl. a locus coeruleus és DR, milyen korfüggő változások lépnek fel, és hogy ezek magyarázhatók-e a CRF sejtek aktivitásának korfüggő csökkenésével.

A FOS fehérjék aktivitásának korfüggő dinamikája a CRF sejtekben

Kísérletünk megerősítette a korábbi vizsgálatok tapasztalatait, melyek szerint a FOS kiváló aktivitási markere az akut, míg a FOSB (Δ FOSB) alkalmas eszköze a krónikus neuronális aktivitás változások követésére. Kutatásunk egyik legfontosabb megfigyelése az volt, hogy a PVN CRF tartalmú neuronjaiban az akut restraint stressz hatására bekövetkező FOS immunreaktivitás növekedésének mértéke jelentősen csökkent a kor előrehaladtával, továbbá az, hogy ezt igen szoros korrelációban állt a FOSB megjelenésével (2 órával az akut stressz expozíciót követően).

A krónikus stresszhatások fokozták a PVN CRF sejteinek FOSB tartalmát, mely azonban nem változott az életkorral. Ezzel szemben, megfigyeltünk a CeA és a BNSTov sejteiben jelentékeny mértékű FOSB immunreaktivitást, melyre nem volt jelentős hatással a CVMS.

Kísérletünk alátámasztotta, hogy bár a FOSB és FOS eltérő dinamikával rendelkezik akut stressz során a PVN-ben a FOSB helyettesítheti a FOS jelölést, a CRF sejtekben 2 órával az akut stimulust követően.

A hármas jelölés sem alkalmas arra, hogy felfedjük a sejtek aktivitásának funkcionális következményeit, mivel nem nyújt bepillantást abba, hogy mely neuronális funkciók megváltozásához szükséges gének expressziója változott meg. Ugyanakkor alkalmasnak bizonyult a módszer a CRF neuronok akut és krónikus aktivitásának követésére, a CeA, BNSTov és PVN területén, és ez az első szisztematikus vizsgálat, mely a teljes élettartamot felölelve vizsgálta a CRF sejtek IEG válaszát. A PVN CRF neuronjaitól eltérően, a CeA és a BNSTov CRF sejtei jelentősen csökkent FOSB tartalmat mutattak idős állatokban.

Konklúzió

Kísérleteink során elsőként hasonlítottuk össze a bazális és akut restraint által kiváltott FOS aktivációt 13 stressz reaktív agyterületen Wistar patkányban, az állatok egész élettartamát felölelő 8 korcsoportban. Azt találtuk, hogy a FOS immunreaktivitás nagymértékben függ az életkortól, mind a kontroll, mind az akut stressznek kitett állatokban. 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 stressz-adaptáció 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 immunreaktivitás 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 expresszió jellemzi a CeA és BNSTov CRF neuronjait, mely csökken az életkorral.

Legjobb tudásunk 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 FOS aktivitását erősen befolyásolja az állat életkora, így további FOS kimutatáson alapuló 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 kezeléséhez és prevenciójához.

Új eredmények

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 a fiatal kontroll állatok is jelentékeny FOS expressziót mutatnak bizonyos (CeA, BNSTov EWcp) stressz-asszociált magokban.
3. Kimutattuk, hogy a PVN CRF sejtjeiben az ARS-indukált FOS és FOSB immunreaktivitás csökken egészen az idős korig.
4. A PVN CRF sejtjeinek CVMS hatására megjelenő FOSB/ Δ FOSB tartalma nem változik az életkorral.
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 életkorral ARS és CVMS esetén is.
7. CVMS során a FOSB megjelenésével növekszik a sejtek CRF tartalma is.

A disszertáció alapját képező 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. (2019) 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 közvetlenül nem kapcsolódó, egyéb 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**
1. 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. **3.382**
2. 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**
3. 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 (2016) Ocular delivery of PACAP1-27 protects the retina from ischemic damage in rodents. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57: 6683-6691. **IF: 3.303**

Összesített impakt faktora: 13,649

Eredeti közlemények összesített impakt faktora 17,283

Független citációk száma összesen: 27

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 Dóra professzorasszonynak**, hogy lehetővé tette, hogy az Anatómiai Intézetben végezhessem kutatómunkámat.

Szeretnék köszönetet mondani **Csernus Valér professzor úrnak** 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, valamint **Godáné Brumán Beatrix** segítségét a RIA mérésekben. Köszönöm továbbá **Hilyovszky Klárának** a minták preparálásában nyújtott segítségét és **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 támogatások járultak hozzá: a dr. Gaszner Balázs által elnyert Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Kutatási Alap 2017-1 és a FIKP II pályázata, továbbá a NAP2017-1.2.1-NKP-2017-00002; a GINOP-2.3.2-15-2016-00050 „PEPSYS”, – A peptiderg szignalizáció komplexitása és szerepe szisztémás betegségekben, az MTA-TKI14016; az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009, a TAMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001, az 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.