A prefrontális kéreg szerepe az abnormális agresszió szabályozásában

Doktori értekezés

Biró László

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Haller József, D.Sc., tudományos tanácsadó
Dr. Mikics Éva, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Gyertyán István, Ph.D., egyetemi kutató
Dr. Pintér Ottó, Ph.D., kutató

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Rihmer Zoltán, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Zachar Gergely, Ph.D., tudományos munkatárs
Dr. Tarnawa István, Ph.D., kutató

Budapest
2019

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke **6**

1. Bevezetés **9**

2. Irodalmi háttér **10**

2.1. Az agresszív magatartás jellemzése, típusai és laboratóriumi modellezése 10

2.1.1. Az agresszív magatartás meghatározása 10

2.1.2. A normális és az abnormális agresszió fogalma 10

2.1.3. A proaktív és a reaktív agresszió 11

2.1.4. Az agresszió laboratóriumi modellezése: normális és abnormális agresszió modellek 11

2.2. A korai szociális környezet zavarainak hatása az agresszív viselkedésre 15

2.3. Az agresszió idegrendszeri szabályozása 18

2.3.1. Az agresszió idegrendszeri hátterének megértéséhez használt neurobiológiai vizsgálómódszerek 18

2.3.2. A különböző agresszió típusok idegrendszeri szabályozó útvonalai 20

2.3.3. A hipotalamusz 24

2.3.4. A prefrontális kéreg (PFC) 28

3. Célkitűzések **34**

3.1. Az mPFC és a hipotalamikus támadási központok közötti projekciók anatómiai és viselkedési karakterizálása 34

3.1.1. Az MBH-ba és az LH-ba vetülő prefrontális kérgi neuronpopulációk átfedésének vizsgálata 34

3.1.2. Az mPFC-MBH és az mPFC-LH projekciók neurokémiai karakterizálása .. 34

3.1.3. Az mPFC-MBH és az mPFC-LH projekciók agresszív és szociális viselkedésformákra gyakorolt hatásának vizsgálata 34

3.2. A korai szociális izoláció következtében kialakuló abnormális agresszió hátterében álló prefrontális kérgi strukturális és funkcionális változások 35

3.2.1. A korai szociális izoláció mPFC struktúrájára és az agresszív magatartásra gyakorolt hatásainak feltárása 35

3.2.2.A korai szociális izoláció okozta abnormális agresszióhoz társuló neuronális aktivitásbeli változások feltárása az mPFC-ben 36
3.2.3. A korai szociális izoláció következtében kialakuló abnormális agresszív viselkedés során aktiválódó neuronok neurokémiai jellemzése 36
4. Módszerek 37
4.1. Az állatok tartási körülményei 37
4.2. Kísérleti elrendezések 37
4.2.1. Kísérlet 1: Az MBH és az LH prefrontális afferentációjának feltérképezése 37
4.2.2. Kísérlet 2: Az MBH és az LH prefrontális afferentációjának neurokémiai karakterizálása 38
4.2.3. Kísérlet 3: A prefrontális kérgi efferensek neurofiziológiai hatásának verifikálása az MBH és LHszintjén 38
4.2.4. Kísérlet 4 és 5: Az mPFC-LH és az mPFC-MBH projekciók direkt hatásának vizsgálata az agresszív magatartásformákra 39
4.2.5. Kísérlet 6: Kontroll vizsgálatok a ChR2-t nem tartalmazó vírus konstrukciókkal az mPFC-MBH projekció fotostimulálásakor 40
4.2.6.Kísérlet 7: Az mPFC-MBH projekciók fotostimulálásának specificitása: lokomotoros és szociabilitásbeli hatások tesztelése 40
4.2.7. Kísérlet 8: A hipotalamikus fotostimuláció hatása az mPFC neuronális aktivációjára 41
4.2.8. Kísérlet 9: A korai szociális izoláció hatása az agresszív magatartásra, valamint a prefrontális kéreg strukturális és funkcionális változásaira 41
4.2.9. Kísérlet 10: Agresszív interakció során aktiválódott idegsejtek neurokémiai azonosítása 42
4.3. Viselkedés vizsgálatok 43
4.3.1. Rezidens-betolakodó teszt 43
4.3.2. Rezidens-betolakodó teszt optogenetikai ingerléssel 44
4.3.3. Szociabilitás teszt optogenetikai ingerléssel 45
4.4. Műtéti beavatkozások 45
4.4.1. Sztereotaxikus műtétek 45
4.4.2. Kettős retrográd pályajelölők beadása 46
4.4.3. Vírus beadások 46

4.4.4. Optikai szálak beültetése 47
4.5. Szövettani eljárások 47
4.5.1. Perfúzió és agymetszés 47
4.5.2. Az mPFC strukturális változásainak felmérése 47
4.5.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok 48
4.6. *In vitro* elektrofiziológia 53
4.7. Statisztikai analízis 54
5. Eredmények 55
5.1. A prefrontális kéreg és a hipotalamikus támadási központok közötti projekció anatómiai és viselkedési karakterizálása 55
5.1.1. Az MBH-t és az LH-t beidegző mPFC idegsejtek réteg-specifikus eloszlása 55
5.1.2. Az mPFC projekciók neurokémiai karakterizálása az MBH és LH szintjén 55
5.1.3. Az mPFC bemenetek fotostimulálásának hatása az MBH neuronjainak posztszinaptikus aktivitására 58
5.1.4. Az mPFC-LH projekció fotostimulálásának hatása az agresszív viselkedésre és más szociális viselkedésformákra 58
5.1.5. Az mPFC-MBH projekció fotostimulálásának hatása az agresszív viselkedésre és a nem agresszív szociális viselkedésformákra 59
5.1.6. Kontroll kísérlet ChR2-t nem tartalmazó kontroll vírus konstrukcióval: az mPFC-MBH projekció fotostimulálásának hatása az agresszív viselkedésre és a nem-agresszív szociális viselkedésformákra 63
5.1.7. Az mPFC-MBH projekció fotostimulálásának hatása a kísérleti állatok lokomóciójára és szociális motivációjára 64
5.1.8. A hipotalamikus fotostimuláció hatása az mPFC neuronális aktivitására 65
5.2. A korai szociális izoláció okozta abnormális agresszióhoz kapcsolódó prefrontális kérgi strukturális és funkcionális változások 66
5.2.1 A korai szociális izoláció kiváltotta abnormális agresszió 66
5.2.2. A korai szociális izolációhoz társuló prefrontális kérgi strukturális változások 67
5.2.3. A korai szociális izolációt kísérő abnormális agresszióhoz társult mPFC neuronális aktiváció 69

5.2.4. Az agresszív interakció hatására aktiválódott idegsejtek neurokémiai azonosítása ... 71
6. Megbeszélés ... 73
6.1. Az mPFC-MBH és az mPFC-LH projekciók anatómiai és viselkedési karakterizálása ... 73
6.1.1. Az mPFC-MBH és az mPFC-LH projekciók jellemzése ... 73
6.1.2. A prefronto-hipotalamikus kapcsolatok szerepe a különböző agresszív viselkedésformák szabályozásában ... 76
6.2. A korai szociális izoláció következtében kialakuló abnormális agresszió hátterében álló prefrontális kérgi strukturális és funkcionális változások ... 79
6.2.1. A korai szociális izoláció kiváltotta prefrontális kérgi strukturális deficitek 80
6.2.2. A korai szociális izoláció okozta abnormális agresszióhoz kapcsolódó mPFC aktivációs mintázatok ... 82
6.3. Az mPFC szerepe az abnormális agresszió szabályozásában - kitekintés ... 83
7. Következtetések ... 85
8. Összefoglalás ... 86
9. Summary ... 87
10. Irodalomjegyzék ... 88
11. Saját publikációk jegyzéke ... 116
12. Köszönetnyilvánítás ... 118

Rövidítések jegyzéke

AAV: adeno-asszociált vírus

ABC: avidin-biotin-komplex

ACC: anterior cinguláris kéreg

AHN: anterior hipotalamikus mag

AI: agranuláris inzuláris kéreg

AP: anteroposzterior irány

BLA: bazolaterális amigdala

BNST: bed nucleus of stria terminalis (ágymag)

CaMKIIα: kálcium/kalmodulin dependens proteinkináz II α

CCK: kolecisztokinin

CTB: Cholera Toxin β alegység

CeA: centrális amygdala

ChR2: channelrhodopsin-2

dlPAG: periakveduktális szürkeállomány dorzolaterális része

dlPFC: dorzolaterális prefrontális kéreg

dmPFC: dorzomediális prefrontális kéreg

DOM: domináns pozitúra

DSM-V: Amerikai Pszichiátriai Társaság Diagnosztikai és Statisztikai Kézikönyve

DV: dorzoventrális irány

eYFP: sárga fluoreszcens fehérje (enhanced Yellow Fluorescent Protein)

EXP: exploráció

FENY: fenyegető viselkedés

Fx: fornix

FG: FluoroGold

Fmi: forceps minor

GABA: γ-amino-vajsav

GFAP: gliális fibrilláris savas protein

HAA: hipotalamikus támadási zóna

IL: infralimbikus kéreg

LH: laterális hipotalamusz

LO: laterális orbitofrontális kéreg

lPFC: laterális prefrontális kéreg

M1/M2: patkány primer/szekunder motoros kéreg

MBH: mediobazális hipotalamusz

MD: mediodorzális talamikus mag

MeA: mediális amigdala

ML: mediolaterális irány

mPFC: mediális prefrontális kéreg

NeuN: neuronális sejtmag fehérje

MOS: mosakodás

OFC: orbitofrontális kéreg

OT: optikus traktus

OSZ: optikai szál

PAG: periakveduktális szürkeállomány

PB: foszfát puffer

PBS: foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldat

PIHE: pihenés

PFC: prefrontális kéreg

PrC: precentrális kéreg

PrL: prelimbikus kéreg

PV: parvalbumin

PVN: paraventrikuláris mag

RB teszt: rezidens-betolakodó teszt

SMI-32: nem foszforilált neurofilament H

SZOC: szociális interakció

TRIS: Tris (hidroximetil)-aminometán

vGAT: vezikuláris GABA transzporter

vGLUT1: egyes típusú vezikuláris glutamát transzporter

vlPAG: periakveduktális szürkeállomány ventrolaterális része

vlPFC: ventrolaterális prefrontális kéreg

VMH: ventromediális hipotalamusz

VMHvl: ventromediális hipotalamusz ventrolaterális része

vmPFC: ventromediális prefrontális kéreg

vl: ventrolaterális prefrontális kéreg

VO: ventrális orbitofrontális kéreg

V3: harmadik agykamra

1. Bevezetés

Az abnormális módon megnyilvánuló agresszió több pszichiátriai kórkép, például az antiszociális személyiségzavar, a fiatalkori magatartászavarok, a borderline személyiségzavar és az időszakos explozív zavar központi eleme (1). A szakirodalomban újabban az abnormális agresszióval társuló pszichopatológiai jelenségeket egyfajta fejlődési zavarnak tekintik, melyeket környezeti és biológiai (genetikai, pszichológiai, neurobiológiai) faktorok együttes interakciója okozhat. Az averzív szociális környezetben felnövő gyermekek felnőttkorukban nagyobb eséllyel mutatnak pszichopatológiás vonásokat, melyek jellegzetes tünetei a szorongás, a megnövekedett stressz-reaktivitás, antiszociális viselkedés és a fokozott hajlam az agresszióra (2-4). Ezekre a kórképeke az agressziót szabályozó agykérgi és szubkortikális területek strukturális és funkcionális deficitje jellemző, a kettő közötti kapcsolat azonban nem tisztázott (5-7). Ismert, hogy a mediális prefrontális kéreg (mPFC) különösen hosszútávú fejlődésmenettel rendelkezik, amely így különösen érzékeny a fiatalkori averzív környezeti behatásokra (8-10). Ilyen jellegű behatásokra (pl. gyermekkori elhanyagolás) emberekben az mPFC strukturális deficiteket mutat (10-13).

Az abnormális agresszió mögött álló neuronális mechanizmusok megértéséhez a természetes mértékű agresszivitást moduláló pályarendszerek és érintett agyterületek feltárása kiemelten fontos. Klinikai és laboratóriumi eredmények egyaránt azt mutatják, hogy az mPFC az agresszió modulálásában kulcsszerepet tölt be (14).

Munkánk első részében az mPFC hipotalamikus projekcióinak agresszióban betöltött szerepét vizsgáltuk, nevezetesen a mediobazális hipotalamusz (MBH) és a laterális hipotalamusz (LH) prefrontális kérgi bemenetét. Előbbi agyterület az intraspecifikus agresszió agyi központja (15), utóbbi pedig a ragadozói agresszióban játszik szerepet, de az intraspecifikus agresszióban betöltött szerepére is vannak irodalmi adatok (16, 17). Bár utóbbi két agyterület prefrontális kérgi bemenete felveti az agresszió közvetlen kérgi modulálásának lehetőségét, korábban ezt kísérletes bizonyítékokkal nem támasztották alá. Munkánk második részében, a fiatalkori szociális elhanyagolás laboratóriumi modelljét, a korai szociális izolációt alkalmaztuk a felnőttkori abnormális agresszió és az ehhez társuló prefrontális kérgi strukturális és funkcionális változások tanulmányozására (18, 19).

2. Irodalmi háttér

2.1. Az agresszív magatartás jellemzése, típusai és laboratóriumi modellezése

2.1.1. Az agresszív magatartás meghatározása

Az agresszív viselkedésforma meghatározását többféleképpen meglehet ragadni. Mivel a jelen dolgozat a humán agresszivitás hátterében álló mechanizmusokat laboratóriumi állatmodellek alkalmazásával igyekszik feltárni, fenomenológiai és funkcionális szempontból definiálja ezen viselkedésformát. A fenomenológiai meghatározás szerint agresszió az a viselkedésforma, amelynek célja fizikai sérülés okozása vagy azzal való fenyegetés (20, 21). A másik, funkcionális (etológiai-evolúciós) szempontokon alapuló definíció megfogalmazása szerint az agresszivitás az azonos fajú egyedek között, a korlátozott erőforrások (táplálék, reprodukciós partner, terület, búvóhely stb.) megszerzéséért mutatott magatartás, következésképp a túlélés szempontjából szükségszerű és adaptív, habár jelentős idő és energia ráfordítással, valamint kockázatvállalással (sérülések) járó módja a forrásfelosztásnak (22-24). Az agresszív interakció az evolúció során ritualizálódott, ezzel mérsékelve a sérülések kockázatát. Az agresszív magatartásnak sokféle megnyilvánulási formája van, ezért különféle jellegek alapján többféleképpen csoportosítható. Embereknél elkülöníthetünk direkt fizikai, verbális, és indirekt agressziót (25, 26). A direkt fizikai agresszió az ellenfél fizikai sérülését vonja maga után, míg a verbális agresszió a megfélemlítésre irányul. Az indirekt agresszió legtöbbször szociális manipuláció (pl. rosszindulatú intrikák), mely pszichológiai értelemben okoz kárt (pl. csökkent szociális státusz) (26).

2.1.2. A normális és az abnormális agresszió fogalma

Az agresszió adaptívnak tekinthető, ha a fajspecifikus szabályokon belül marad, ezáltal minimalizálható a veszteség és a sérülés. A fentebb említett indirekt és verbális agresszió versenyhelyzetekben normálisnak tekinthető, mivel előnyhöz juttathatja az agresszort. Ezzel szemben abnormális agresszióról beszélünk akkor, ha az agresszív magatartás a kontextusnak nem megfelelő módon és mértékben mutatkozik meg. Következésképp embereknél a direkt fizikai agresszió mindennapos élethelyzetekben (munkahely, iskola) abnormális, míg bizonyos társas és szociális helyzetekben elfogadott, szükségszerű (rendőrség, katonaság), sőt bizonyos sportágak esetén (küzdősportok) akár

megkövetelt is lehet. Összességében akkor mondhatjuk abnormálisnak az agressziót, ha figyelmen kívül hagyja a társadalmi szabályokat, azaz nem képes a kontextushoz illeszteni a megnyilvánulását, mértékét (27).

A különböző pszichiátriai kórképek gyakori eleme a túlzott válaszreakció, agresszív magatartás, amely abnormálisnak tekinthető, ha a személy életvitelében vagy környezetének problémát okoz (1). Az abnormális agresszió több pszichiátriai rendellenesség központi eleme (pl. antiszociális személyiségzavar, időszakos explozív zavar), míg másoknál az elsődleges kórképhez társulva jelenhet meg (pl. skizofrénia, poszttraumatikus stressz zavar) (1).

2.1.3. A proaktív és a reaktív agresszió

Újabban a humán agresszív magatartás leginkább elfogadott és leggyakrabban használt osztályozása a kiváltó ok, illetve a hozzá társuló emocionális háttér alapján történik. Eszerint elkülöníthetőek proaktív (hidegvérű, instrumentális), valamint reaktív (érzelmi) agresszió típusok (28-30). A proaktív agresszió célorientált, tervszerű, kontrollált viselkedés, mely minimális érzelmi háttérrel, alacsony stressz-reaktivitással és vegetatív izgalommal jár (30, 31). A reaktív (érzelmi) agresszió ezzel szemben vélt vagy valós kihívásra (provokációra, fenyegetésre) adott reakció, melyet heves érzelmi töltet, valamint a stressz és a vegetatív működések jelentős fokozódása kísér (29). Fontos megemlíteni, hogy az emberi agresszivitást nem lehet kizárólagos módon a fenti két kategória valamelyikébe besorolni, azonban fiziológiai és neurobiológiai jellemzők mentén ez a legelfogadottabb csoportosítás (28, 32).

2.1.4. Az agresszió laboratóriumi modellezése: normális és abnormális agresszió modellek

Kezdetben az agresszió laboratóriumi/állatkísérletes kutatása a normális agresszív viselkedés mennyiségi jellegeinek (harapások száma) leírására fókuszált, mely során leginkább a territoriális agressziót tanulmányozták a rezidens-betolakodó (RB) paradigmában (15, 33). A rezidens-betolakodó (RB) teszt során egy hím egyedet egy különálló tartó dobozba helyeznek (rezidens), amit pár nappal később egy új, betolakodó állat behelyezése követ. A rezidens állat egyedüli tartása a territórium, s így a faj-specifikus agresszív viselkedésformák kialakítását szolgálja. Ennek faj-specifikus, ritualizált komponensei a következők: a teszt során mutatott direkt agresszív támadásokat (harapásokat) gyakran megelőzik szociális vizsgálódások, valamint fenyegető, védekező

és dominanciához kötött testhelyzetek megjelenítése. Megjegyzendő az is, hogy egy domináns helyzetben levő rezidens hím (saját területen, nagyobb tömegű) esetében a harapások szinte kizárólag az ellenfél hátára és oldalára irányulnak, azaz olyan testrészekre, amelyek nem borítanak létfontosságú szerveket és kevésbé fogékonyak a fertőzésekre. Ezek alapján az RB tesztben az állatok által kimutatott agresszivitás a fentiekben leírt szociális szabályokon belül marad. Az agresszivitás mérésére ezen paradigmában olyan mennyiségi jellegek használatosak, mint a harapások száma, azok gyorsasága (latencia) és az agresszív támadásokat jelző/megelőző fenyegető testhelyzetek kimutatásával töltött idő. Az RB tesztet széleskörűen, meglehetősen standardizált formában használják különböző kutatási kérdésekre az agresszió témakörében, így farmakológiai, neuroendokrinológiai és egyéb mechanizmusok feltárására. Habár az RB teszt nőstény állatokkal is működik, a megfigyelt agresszivitás mennyiségileg jóval kisebb ebben az ivarban (kivéve laktáló nőstények), feltehetően ez magyarázza az ivar ritka alkalmazását (34). Érdekes módon, pont a fent említett kivétel, az anyai agresszivitás paradigmája az, ahol heves védekező viselkedést és sérülékeny testrészekre irányuló, fenyegetéssel nem jelzett támadásokat figyelhetünk meg (35). Hím patkányban ezen viselkedési jellegek abnormálisnak tekintettek, ugyanakkor az utódait védelmező anyánál funkcionális szempontból elfogadottnak tekintettek, hiszen az egyed egy nála jelentősen nagyobb súlyú ellenféllel küzd utódai életéért. A fenti példa szemléletesen mutatja, hogy a normalitás fogalmát egyrészt a fajspecifikus mintázat alapján, másrészt a kontextus alapján szükséges definiálnunk.

A fent ábrázolt RB teszt adja az agresszió neurobiológiájával foglalkozó szakirodalom jelentős részét, ahol az agyi elektromos stimulációkat alkalmazó tanulmányok az agresszió természetes formáinak idegrendszeri mechanizmusait kívánták feltárni. Ezen macskákon és patkányokon végzett kísérletek (lokális léziókkal és farmakológiai kezelésekkel kiegészítve) kirajzolták azon főbb agyi régiókat és pályarendszereket, amelyek részt vesznek az agresszió szabályozásában (15, 36). Az RB tesztben vizsgált territoriális agresszió mellett fontos megjegyezni, hogy a normális agresszió további laboratóriumi tanulmányozása során vizsgálták a félelem, az elektromos sokk okozta agressziót és a szociális agressziót is, melyekre jelen tanulmányunkban nem térünk ki (37-41).

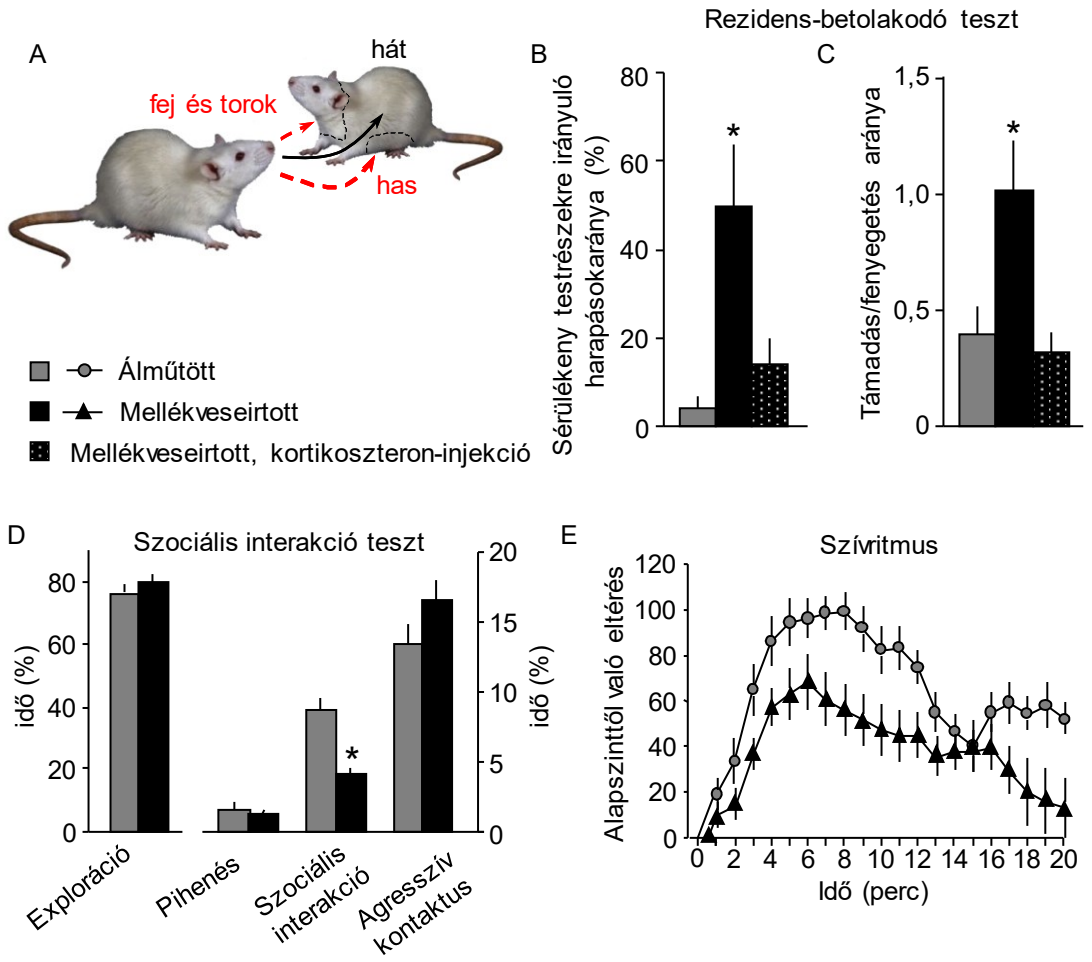
Mára elfogadottá vált az a tudományos nézet, miszerint a pszichopatológiai jelenségek nem a normális szabályozó mechanizmusok fokozott működéseinek tulajdoníthatók, hanem idegrendszeri abnormalitásokkal, minőségi eltérésekkel járó állapotok, így nem érthetőek meg a fenti jellemzők egyszerű kvantitatív méréseivel. Az új kezelési stratégiák kidolgozásában nagy szerepet kaptak azok a preklinikai modellek, amelyek az abnormális agresszív viselkedést, annak minőségi eltéréseit vették célpontba (27, 42). Ezen új állatmodellek már konstrukciós és prediktív validitási szempontokból is jobban megfeleltethetők a pszichiátriai kórképeknek. Ezen rágcsálómodellek közös jellemzői, hogy (1) mintázzák azokat az etiológiai faktorokat, amelyek a humán agresszióval társuló zavarokra jellemzőek; (2) az agresszivitás tanulmányozása során fokozott figyelmet fordítanak az agresszió jellegére, minőségére és kontextusára, illetve (3) az agresszióhoz társuló autonóm válaszra, szorongásra és szociális viselkedés elemekre, amelyek meghatározó velejárói a humán agresszióval társuló pszichopatológiai jelenségeknek (27, 42, 43). Ezen kutatások azt támasztják alá, hogy jelentős számú etiológiai faktor, amelyek a humán agresszióval társuló pszichopatológiai jelenségekben érintettek, rágcsálókban is abnormálisan agresszív viselkedést váltanak ki (**1.táblázat**). Ezidáig, a következő etiológiai faktorok hatását tanulmányozták az állatok agresszivitására: alkohol, peripubertás stressz, ismételt anyai szeparáció, korai szociális izoláció, glükokortikoid deficiencia, jutalom hiánya kiváltotta frusztráció, ismételt kokain, amfetamin vagy anabolikus szteroid adagolása serdülőkorban, valamint extrém agresszióra vagy szorongásra történő genetikai szelekció (18, 45-61). A felsorolt etiológiai faktorok közös jellemzője, hogy rágcsálókban abormális agresszív viselkedésformák megjelenését indukálják, ezért úgy tekinthetőek, mint az agresszióval társuló pszichopatológiai jelenségek szimptómáinak modelljei (**1. táblázat**).

Kutatócsoportunk a harapási célpontok azonosítása mellett komoly figyelmet fordított a harapásokat megelőző viselkedésformák részletes elemzésére is. Természetes körülmények között a harapásokat szociális jelzések, fenyegetések előzik meg. A glükokortikoid deficiens állatok harapásait szignifikánsan kevesebbszer előzték meg szociális jelzések (**1/C ábra**), valamint alacsony autonóm válaszreakciót (szívritmus emelkedés) mutattak a kontroll csoporthoz képest (**1/E ábra**). Emellett a szociális interakció tesztben is szociális deficitet mutattak (szaglászással töltött idejük csökkent; **1/D ábra**) (62). A fentiekben felsorolt sajátságok a humán proaktív (instrumentális,

„hidegvérű”) antiszociális agresszivitás fontos aspektusait tükrözik (27, 30, 31, 42). Kutatócsoportunk 2008-ban írta le a korai szociális izoláció által kiváltott abnormális agresszió rágcsálómodelljét is, amely a humán reaktív agresszió jellemzőit hordozza leginkább. Mivel jelen dolgozat jelentős része ezen modell köré szerveződik, az alábbiakban részleteiben is ismertetjük ezen modell fenomenológiai, fiziológiás és neurobiológiai jellemzőit.

1. táblázat. Az abnormális agresszió laboratóriumi rágcsálómodelljeinek összefoglalása. Haller 2017 nyomán készült (44).

Modell típusa	Laboratóriumi rágcsáló modell	Modellezett humán agresszió etiológiai aspektusa	Hivatkozások
Stressz modellek	Ismételt anyai szeparáció	Korai szülői elhanyagolás	Veenema és mtsai 2006
	Elválasztás utáni szociális izoláció	Korai szociális elhanyagolás	Bibancos és mtsai 2007, Toth és mtsai 2008
	Szociális alárendelés	Fiatalkori abúzus	Delville és mtsai 1998, Cunningham és McGinnis, 2008
	Nem-szociális peripubertás stressz	Serdülőkori stressz	Marquez és mtsai 2013
	Szociális „izgatás” kiváltotta eszkaláció	Akut provokáció	Fish et al 1999
	Frusztráció kiváltotta eszkaláció	Akut frusztráció	de Almeida és mtsai 2006
Kábítószer modellek	Alkohol fokozta agresszió	Alkohol abúzus	Miczek és mtsai 1992
	Pubertáskori anabolikus-androgén szteroid kezelés	Anabolikus szteroid abúzus	Melloni és mtsai 1996, Ambar and Chiavegatto, 2009
	Pubertáskori amfetaminkezelés	Amfetamin abúzus	Gobrogge és mtsai2009
	Pubertáskori kokainkezelés	Kokain abúzus	Ricci és mtsai 2005
Genetikai modellek	Agresszióra szelektált vagy genetikailag módosított rágcsálók	Agressziót meghatározó genetikai faktorok	Benus és mtsai 1991
	Szorongásra szelektált rágcsálók	Szorongás kiváltotta agresszió	Neumann és mtsai 2010
	MAO_A génkiütés	MAO_A deficiencia	Cases és mtsai 1995
Egyéb	Ismételt szociális győzelem	Visszatérő-megerősített agresszió	de Boer és mtsai 2003
	Glükokortikoid deficit	„Hidegvérű” agresszió	Haller és mtsai 2001



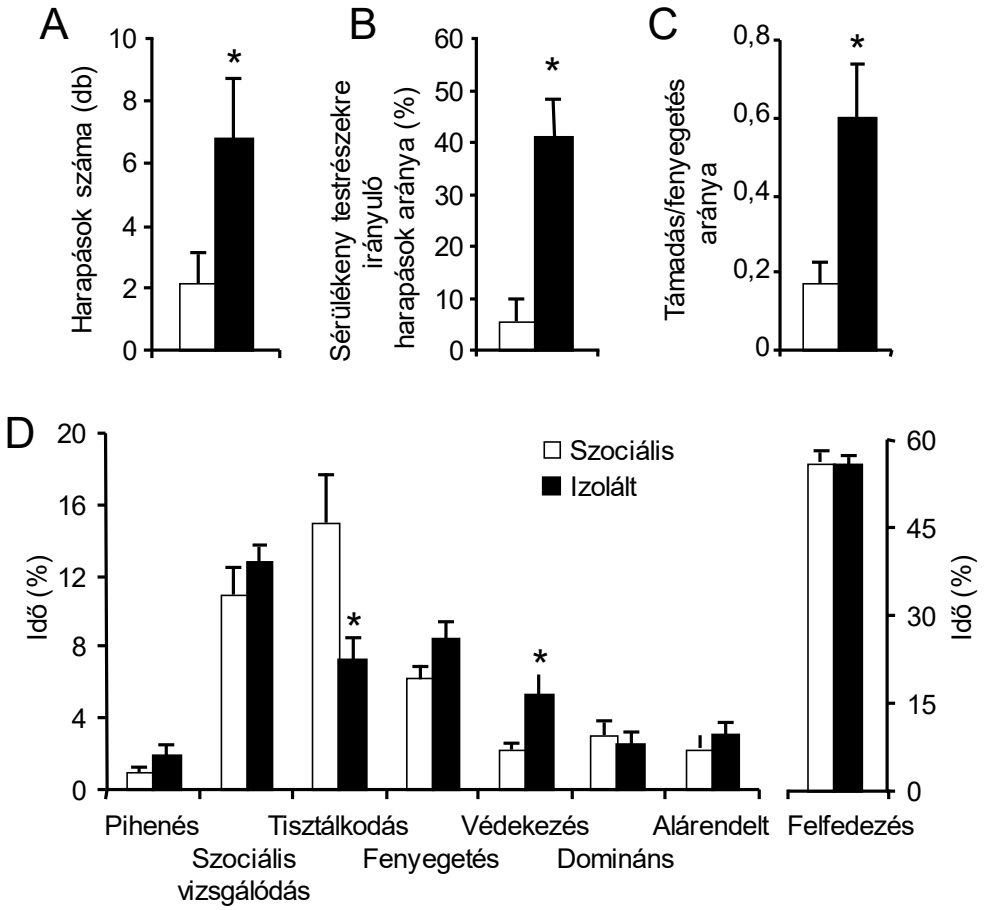
1. ábra. A glükokortikoid deficiencia okozta abnormális agresszió állatmodellje. A glükokortikoid deficiencia kiváltása kétoldali mellékveseirtás és szubkután kortikoszteron pótlás révén történt. **A,** A sérülékeny testrészekre irányuló harapások sematikus ábrázolása. **B és C,** Az RB tesztben a mellékveseirtott állatok jelentős mértékben ellenfeleik sérülékeny testrészeire haraptak, amiket ráadásul kevésbé előztek meg fenyegető viselkedésformák. **D,** A mellékveseirtott állatok csökkent szociális érdeklődést mutattak a szociális interakció tesztben. **E,** A mellékveseirtott állatok agresszív interakcióját csökkent szívritmus emelkedés kísérte az álműtött kontroll csoporthoz képest az RB teszt során. * $p<0,05$. Az ábra Haller és mtsai 2001 és Haller és mtsai 2004 nyomán készült (49, 62).

2.2. A korai szociális környezet zavarainak hatása az agresszív viselkedésre

Azok a gyermekek, akik averzív szociális környezetben (bántalmazás, elhanyagolás) nevelkednek, nagyobb eséllyel mutatnak felnőttkorukban pszichopatológiai elváltozásokat, jellemzően fokozott szorongást, antiszociális viselkedést és fokozott erőszakosságra való hajlamot. Ezen viselkedésjegyek hátterében gyenge emocionális kontroll állhat (2, 4, 64), melyet a stresszrendszer fokozott reaktivitása is kísér. Utóbbi szoros korrelációban áll az agresszióval kapcsolatos tünetek mértékével (28-30, 65).

A korai szociális viszonyok zavarait vizsgáló elterjedt laboratóriumi állatmodell az anyától való elválasztást követő és felnőttkorig tartó szociális izoláció (66-68), mely több fenotípusos változást okoz rágcsálókban: fokozott érdeklődést új környezetben, csökkent szenzoromotoros gátlást („prepulse inhibíciót"), emelkedett szorongást, valamint a térbeli emlékezés és új tárgyak felismerésének romlását (66).

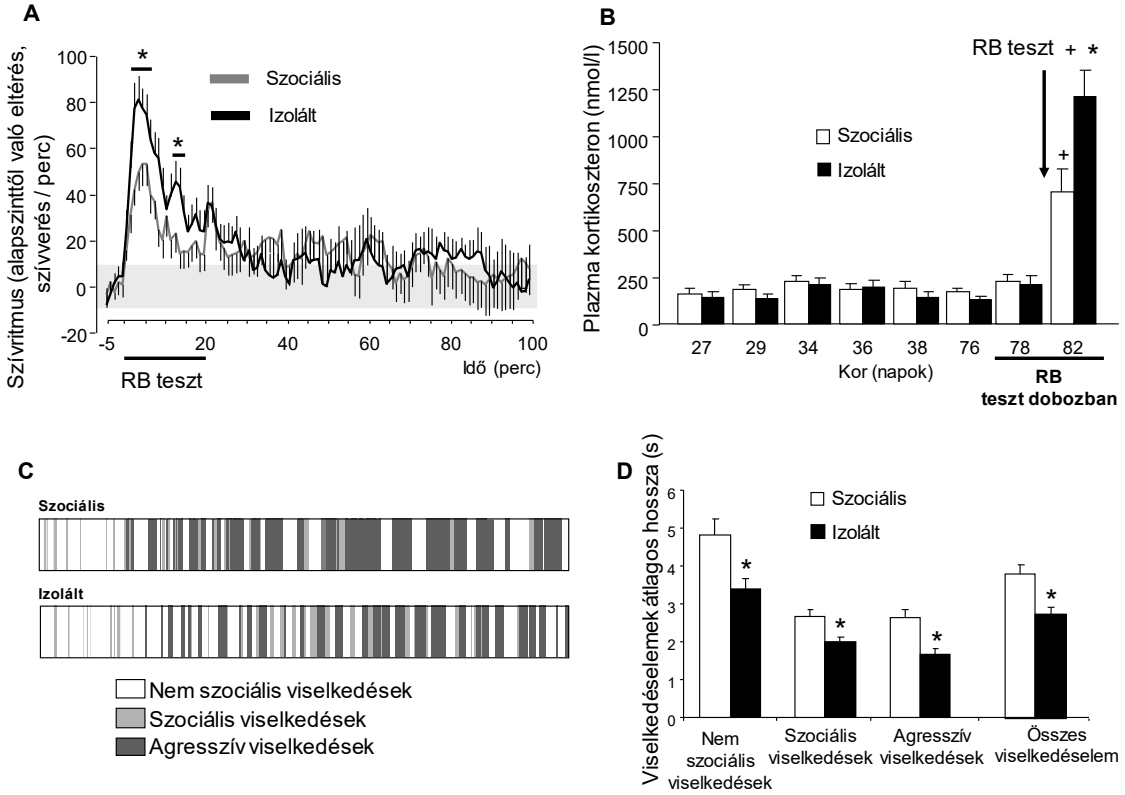
Néhány tanulmány utalt az izoláltan nevelkedett állatok fokozott agressziójára és csökkent szociális képességeire (69-71), azonban ezek részletes, minőségi analízisét kutatócsoportunk végezte el, kimutatva, hogy izoláltan nevelkedett patkányok agresszivitása nemcsak mennyiségileg (harapások számának növekedése, latenciájának csökkenése), hanem minőségileg is abnormális, mely a támadások előrejelzésének



2. ábra. A korai szociális izoláció okozta abnormális agresszió állatmodelljének bemutatása. A szociális izoláció okozta abnormális agresszió és szociális deficitek az RB tesztben. **A,** Az izolált patkányok szignifikánsan többet haraptak, mint a szociálisan tartottak. **B, C,** Az izolált patkányok ellenfeleik sérülékeny testrészeire haraptak, a harapásokat kevésbé előzték meg szociális fenyegetések. **D,** Az izoláltan nevelkedett állatok szignifikánsan kevesebb időt töltöttek tisztálkodással és több időt töltöttek védekezéssel. * $p<0,05$. Az ábra Tóth és mtsai 2008 nyomán készült (18).

hiányában, sérülékeny célpontok (fej, torok, has) preferenciájában, és ezzel párhuzamosan a védekező viselkedésformák paradox megemelkedésében nyilvánult meg (**2. ábra**) (18).

Fiziológiás szinten a fenti abnormálisan agresszív fenotípust fokozott glükokortikoid reaktivitás és szívritmus emelkedés kíséri, amely az állatok felfokozott emocionális és vegetatív izgalmi szintjére (*hiperarousal*) utal (**3. ábra**) (19) és jól modellezi a korai averzív szociális környezet hatására megjelenő felnőttkori emocionális agressziót emberekben.



3. ábra. A korai szociális izoláció okozta abnormális agresszióhoz társuló glükokortikoid és autonóm válaszok, illetve viselkedési fragmentáció.A, Szívritmus változások egy húsz perces RB teszt alatt és azt követően. A vízszintes szürke sáv a nyugalmi időszakban mért szívritmus ingadozás tartományát jelöli. Az izolált állatok szívritmusa szignifikánsan nagyobb mértékben emelkedett meg a szociálisan nevelkedett állatokéhoz képest. **B,** Különböző posztnatális napokon mért nyugalmi kortikoszteron szintek, illetve az agresszív interakció kiváltotta kortikoszteron válasz. Az izolált állatok kortikoszteron szintjei nem különböztek a szociális állatok értékeitől egyetlen időpontban sem, kivéve az RB tesztet, ahol szignifikánsan magasabb reaktivitás volt megfigyelhető a szociális kontroll csoporthoz képest. **C**, Reprezentatív viselkedési mintázatok az RB teszt első öt percében izolált, illetve szociálisan nevelkedett állatok esetében. Jól látható, hogy az izolált állatok átlagosan kevesebb időt töltenek egyes viselkedésformák végrehajtásával, azaz gyakrabban váltanak az egyes viselkedési kategóriák között, mely a **D** ábrán látható másodpercben kifejezve. * $p<0,05$. Az ábra Tóth és mtsai 2011 nyomán készült (19).

Megjegyzendő, hogy az izolált állatoknál leírt viselkedési változások tartósnak bizonyultak: hat nap leforgása alatt ismételt három RB teszt során sem mutatkozott csökkenés az abnormális támadásmintázatban (19). Ehhez hasonló eredményt mutatott

egy újabb kísérletsorozat, amely a felnőttkori reszocializáció hatását vizsgálta a korai szociális izolációban felnevelt patkányokban. Noha a harapási frekvenciát enyhén csökkentette, az abnormális támadási mintázat három hetes reszocializációs szakaszt követően sem normalizálódott. Emellett az izoláltan nevelkedett állatok a reszocializáció első hete alatt a nyugalmi periódusban szignifikánsan kevesebb együttalvást mutattak a szociálisan tartott, majd reszocializált társaikhoz képest, mutatva erős szociális deficitjüket és elkerülő magatartásformájukat (72).

A felsorolt erőteljes viselkedési változások idegrendszeri háttere mindezidáig nem teljesen tisztázott. Egyes korábbi vizsgálatok eredményei szerint a szociális izoláció jelentős hatást gyakorol az agresszivitást szabályozó kulcsfontosságú agyi területek, így az amigdala és a prefrontális kéreg (PFC) struktúrájára és funkciójára (66, 73-75). A szociális izoláció által kiváltott viselkedési deficitek és azt kísérő fiziológiás változások arra utalnak, hogy az izolált állatok felfokozott érzelmi-arousal állapottal kísért, azonban csökkent viselkedési kontrollt mutatnak, melynek hátterében feltételezhetően gyengült prefrontális kontroll állhat. A szociális izoláció mediális mPFC-re gyakorolt hatását ezért a célkitűzéseknél részletesen taglaljuk, mivel vizsgálataink egyik központi elemét képezi.

2.3. Az agresszió idegrendszeri szabályozása

2.3.1. Az agresszió idegrendszeri hátterének megértéséhez használt neurobiológiai vizsgálómódszerek

Az agresszió hátterében álló neurobiológiai kutatások a ma már klasszikusnak számító sebészeti léziós és elektromos stimulációs kísérletekkel kezdődtek. 1884-ben a temporális lobotómia szelídítő hatását tárták fel rhesus majmokban és szélsőségesen agresszív viselkedést mutató kutyákban (76, 77), amit Philip Bard kísérletei követtek macskák poszterior hipotalamikus régiójára koncentrálva: a poszterior hipotalamusz átvágása dühszerű agresszív viselkedésük megszűnését eredményezte (78). Ezen eredményeket alátámasztóan Walter Hess 1943-ban közölte Nobel-díjas kísérleteit, demonstrálva, hogy macskák hipotalamuszának elektromos stimulációja agresszív választ vált ki (79). Az 50-es és 60-as években a léziós kísérletek betekintést nyújtottak az intraspecifikus agresszivitás szabályozásában érintett neuroanatómiai struktúrákba (80), majd a metodikai fejlesztések (sztereotaxikus befogó, agyatlaszok) széleskörű elterjedése révén már megbízhatóan lehetett intrakraniális elektromos stimulációs

kísérleteket végezni patkányokon is, rámutatva az agresszió szabályozásának evolúciósan jelentősen konzervatív szabályozó mechanizmusaira (81, 82). Ebben az időben az elektromos stimuláció kiváltotta agresszió számos típusát tanulmányozták, köztük a predátoros agressziót. A komoly szisztematikussággal elvégzett stimulációs tanulmányok főként az LH-ra koncentrálódtak (83), majd Menno Kruk munkájának köszönhetően elindultak azok a kísérletek, amelyek azon hipotalamikus támadási területek körülhatárolását célozták meg, ahonnan specifikusan territoriális agresszivitást lehetett kiváltani, azaz **(1)** csak fajtárs jelenlétében mutatkozó magatartási választ, ami **(2)** nem motoros reakció, hiszen élettelen tárgyakkal szemben nem mutatkozott, és **(3)** mennyiségileg fokozható volt az áram növelésével (84, 85). Ezek a kísérletek tehát egy, az agresszív válasz direkt inicializálásában központi szerepet játszó ún. „hipotalamikus támadási területet" definiáltak (hypothalamic attack area, HAA) (86, 87). Jelen dolgozatban a HAA-ra mediobazális hipotalamuszként fogunk hivatkozni (MBH) anatómiai elhelyezkedése alapján. Az MBH afferens és efferens kapcsolatainak feltérképezése ugyancsak segítette az agresszió modulátoros régióinak feltérképezését (88, 89), rámutatva köztük az MBH jelentős prefrontális beidegzésére. Habár az elektromos stimulációs technika alkalmazása döntő fontosságú felfedezésekhez vezetett, megvannak a maga limitációi: a makroszkópos anatómiai pontosság ellenére az elektród által befolyásolt neuronpopulációk nehezen meghatározhatók és a hálózat szintű következtetések levonását megnehezítik az elektród alatt átfutó idegrostok, amelyek szintén stimulálódhatnak.

A stimulációs kísérleteket kiegészítendő, sok tanulmány vette célba az agresszív magatartást és annak változásait kísérő neuronális aktivációs mintázatokat. A felgyűlt adatok meghatározó része emberben durva felbontást adó metabolikus és keringési változásokon alapuló módszerek (6, 90-92), melyeket állatkísérletesen *in vivo* hasonló módon (2-doxiglükóz alapú funkcionális mágneses képalkotás fMRI), vagy *post mortem* sejtszintű felbontást adó korai átíródású géntermékek jelölésén alapulnak (48, 93-98). A kiváló térbeli felbontással szemben a korai átíródású géntermékek időbeli felbontása igen rossz, hiszen expressziójának lefolyása relatíve lassú folyamat (5-30 perc az mRNS átírása és 1-2 óra a fehérje megjelenése), ezért nem alkalmas egy rövid viselkedési esemény (pl. harapás) neuronális aktivitással történő részletes összehasonlítására, illetve ok-okozati viszonyok kiderítésére. Azonban átfogó képet nyújtanak az adott agyterület

viselkedésben betöltött szerepéről. Ezen túlmenően, a korai átíródású géntermékek kifejeződésének együttes vizsgálata genetikai vagy neuronális markerekkel (adott idegsejtpopulációt kirajzolva), illetve pályajelölőkkel hasznos információkat szolgáltathat az adott viselkedésben érintett neuronpopulációk neurokémiai jellegéről és kapcsolatairól (99). Az ilyen típusú vizsgálatok során a rezidens állatokat általában RB tesztnek vetik alá, amit transzkardiális perfúziót követő szövetgyűjtés követ, amelyen a c-Fos korai átíródású fehérje immunhisztokémiai detektálása, kvantifikálása lehetséges (100, 101).

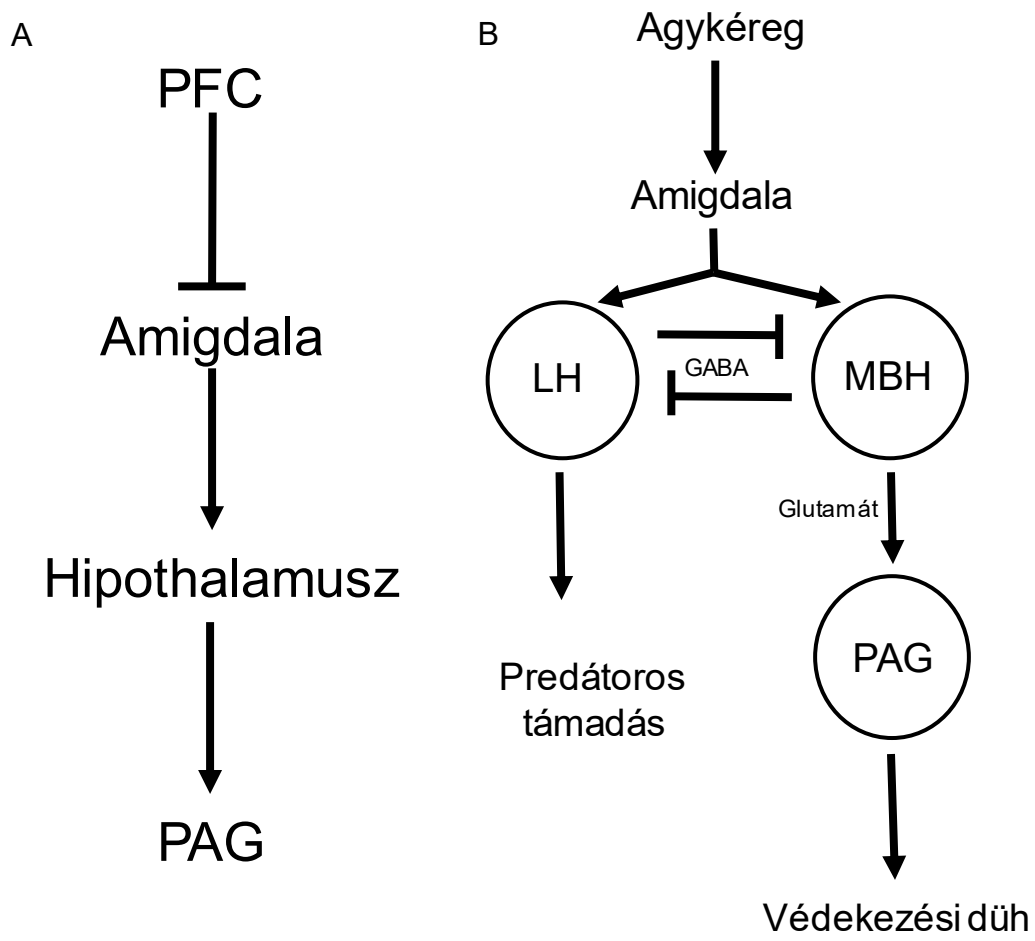
Csak úgy, mint a legtöbb viselkedés neurobiológiával foglalkozó területen, így az agressziókutatásban is komoly áttörést jelentett az optogenetikai és kemogenetikai stimulációs és inhibíciós módszerek kifejlesztése, mely egy kifinomultabb, specifikusabb szintre emelte a stimulációs tanulmányok lehetőségét. Ezen technikák alkalmazása megengedi adott neuronpopulációk fázikus (optogenetika) vagy tónikus (kemogenetika) aktiválását és gátlását viselkedő állatokban (102-104). Mind a két technika vírus vektorok mediálta géntranszferen alapul, amely lehetővé teszi a mesterségesen előállított receptorok sejttípus-specifikus kifejezését. A sejtek optogenetikai úton történő aktiválását fotostimulációnak (pl. channelrhodopsin 2 mediált) míg gátlását fotoinhibiciónak (pl. halorhodopsin mediált) nevezzük. A channelrhodopsin 2 (ChR2) egy fény hajtotta nem szelektív kation csatorna, amely algákból származik és kék fénnyel (473 nm) történő megvilágítása membrán depolarizációt okoz. A halorhodopsin (eNpHR) egy fény hajtotta klorid pumpa, amely halobaktériumokból származik és sárga fénnyel (561 nm) való aktiválása membrán hiperpolarizációt eredményez (103). Az optogenetikai manipulációk két típusba sorolhatóak az alapján, hogy az optikai szál a sejttestnél vagy az axon terminálisok fölött helyezkedik el. A sejttestnél alkalmazott fotomanipuláció az adott sejtpopuláció egész ideghálózatra gyakorolt nettó hatásának a feltárását teszi lehetővé, míg az axon terminálisok fotomanipulációja egy adott célterületre való projekciónak a szelektív tesztelését engedi meg, noha a sejttestre való visszaterjedő aktivitás (retropropagáció) lehetősége nem zárható ki (103, 104).

2.3.2. A különböző agresszió típusok idegrendszeri szabályozó útvonalai

Az embereken, macskán és rágcsálókon végzett tanulmányok alapján az agresszió idegrendszeri szabályozásában érintett agyterületek jelentősen átfednek az egyéb szociális viselkedésformákban érintett ideghálózatokkal (105). Az agresszív viselkedés

szabályozása az amigdala-hipotalamusz-periakveduktális szürkeállomány (PAG) központi útvonal köré szerveződik (15, 105), amelyet a PFC az amigdalán keresztül gátló módon modulál (**4/A ábra**) (6, 106, 107). Az első, macskákon végzett elektromos stimulációs tanulmányok nagyban hozzájárultak a fenti útvonalhoz tartozó agyterületek (és alterületeik) funkcionális szerepének megértéséhez, valamint rámutattak a proaktív és reaktív agressziófórmák idegrendszeri szabályozásának különbözőségeire is. Noha macskában ezen formák inkább etológiailag elkülönült célokat szolgálnak: a PAG vagy a hipotalamusz elektromos stimulációjának lokalizációjától függően védekezési düh (defensive rage, mint fajtársak felé mutatott agresszió) és predátoros támadás (predatory attack) megjelenése váltható ki (15).

Az MBH és a PAG dorzális-dorzolaterális részének az elektromos stimulációja védekezési dühöt vált ki. Ezzel ellentétben az LH és a PAG ventrális részének az elektromos stimulálása predátoros támadás megjelenését okozza (**4/B ábra**). A természetben a védekezési düh akkor jelenik meg, amikor az állatot egy fajtárs vagy egy másik fajhoz tartozó egyed fenyegeti. Ezt a viselkedési választ a következő jellemzők kísérik: fújás, piloerekció, lelapult fülek, mozdulatlan farok, vérnyomás és szívritmus fokozódás. A támadások szempontjából a védekezési dühöt az ellenfélre mért mancscsapások jellemzik, amelyek fokozottan impulzívak és hiányzik belőlük a megtervezettség (15, 36). A stimulációval kiváltott predátoros támadás során a macska először lopakodva megközelíti a prédaállatot (legtöbbször egy elaltatott patkány), majd tarkón harapja a prédaállatot, amely folyamat a stimuláció végéig tart. A kiváltott viselkedés kifejezetten a prédaállatra irányul és nem a környezet más elemeire. A védekezési dühvel összehasonlítva a predátoros támadás nem jár szimpatikus aktivációval, ugyanakkor tervezés és meghatározott stratégia alkalmazása szükséges hozzá, amely azt sejteti, hogy az agykéreg is szerepet játszik a támadási folyamat szervezésében. A laboratóriumban kiváltott predátoros támadás számottevő hasonlóságot mutat a természetes körülmények között megfigyelt formájával (15, 36).



4. ábra. Az agresszív viselkedés szervezésben érintett ideghálózat. A, Az agresszív viselkedés szabályozásában érintett konvencionális központi útvonal. B, Macskákban elektromos stimulációs kísérletekkel feltárt predátoros támadás és védekezési düh hátterében álló ideghálózat. Siegel és mtsai 1999 nyomán (15).

A fenti kutatások világítottak rá arra is, hogy az agresszió szabályozásában érintett agyterületek betölthetnek végrehajtó és moduláló jellegű szerepköröket. Míg a PAG vagy a hipotalamusz elektromos stimulációja direkt és azonnali támadást eredményez, az amigdala ingerlése csupán facilitálja annak megjelenését. Az amigdala agresszió facilitáló szerepére már a korai léziós tanulmányok is rámutattak, ugyanis az amigdala lézió csökkent agresszivitást eredményezett az RB tesztben (108, 109). Az elektromos stimulációval kiváltható támadási típusok hátterében álló idegrendszeri dichotómia az amigdala szintjén is fellelhető. Macskában a mediális amigdala (MeA) serkentése facilitálja, míg a centrális amigdaláé (CeA) elnyomja az MBH-ból kiváltott „védekező düh" reakciót (15, 110-112). A MeA ezen potencírozó hatása főként P anyag (substance P) transzmisszióhoz köthető, amely az MBH-ban kifejeződő neurokinin-1-es receptorokon keresztül hat (112). A MeA az MBH serkentése mellett gátolja az LH-ból

kiváltott predátoros támadások megjelenését is, mely egy diszinaptikus útvonalon keresztül játszódik le: a MeA-ból érkező projekciók GABA-erg neuronokra érkeznek az MBH szintjén, amelyek az LH-t gátolják (113). Az MBH és az LH közötti GABA-erg kapcsolat reciprok módon szerveződik, így alakítva ki a két agressziófórma egymást kizáró manifesztációját (114). A macskákban végrehajtott amigdaláris elektromos stimulációs kísérletekhez hasonlókat patkányokban nem végeztek, ugyanakkor leírták az amigdala agressziót serkentő szerepét aranyhörcsögben (115). Ezzel összhangban hörcsögben, pocokban, egérben és patkányban is az amigdala fokozott c-Fos kifejeződését írták le agresszív viselkedést követően. A territoriális agresszió során (RB teszt) a mediális amigdala aktiválódott a legfőképp az összes amigdala mag közül (94, 116-119) és a c-Fos aktiváció pozitív korrelációt mutatott az agresszivitás mértékével (116, 118), mely egybevág a macskákban találtakkal, s valószínűleg a territoriális agresszió egyik fő facilitátor régiójává teszi a MeA-t. Ezzel ellentétben a CeA nem vagy csak enyhe neuronális aktiválódást mutatott RB tesztet követően (116, 118, 120, 121). Az utóbbi években optogenetikai tanulmányok még nagyobb részletességgel feltárták egerekben a MeA szabályozási mechanizmusait. A poszterodorzális (MeApd) részén elhelyezkedő vezikuláris GABA transzportert (vGAT) kifejező neuronok fokozott c-Fos aktivációt mutatnak intraspecifikus agresszióra (122), ezen GABA-erg neuronpopuláció aktiválása agressziót vált ki, míg fotoinhibíciójuk megszünteti a folyamatban lévő harapást. Érdekes módon a MeApd GABA-erg neuronjainak egy része aromatáz enzimet fejez ki, amely az androgének ösztrogénekké történő átalakításában játszik kulcsszerepet (123). Ezen neuronok genetikai irtása csökkenti a territoriális agressziót (fokozott harapási latencia, csökkent harapás szám), kemogenetikai gátlásuk pedig a harapási latenciát növeli (124).

A kutatócsoportunk által jellemzett szociális izolációt kísérő felfokozott agressziófórmáknál ugyancsak a MeA fokozott aktivitását figyeltük meg, míg a glükokortikoid deficienciát kísérő sérülékeny testrészeket célzó proaktív/predátoros jellegű agressziófórmákat főképp a CeA fokozott aktivitása kísérte (17, 121). Utóbbi arra utal, hogy rágcsálókban hasonlóan kirajzolódik két agressziót differenciáltan szabályozó kör az amigdala szintjén, amit a hipotalamusz és a PAG funkcionális dichotómiája is követ, melyeket az alábbi fejezetekben külön taglalunk.

2.3.3. A hipotalamusz

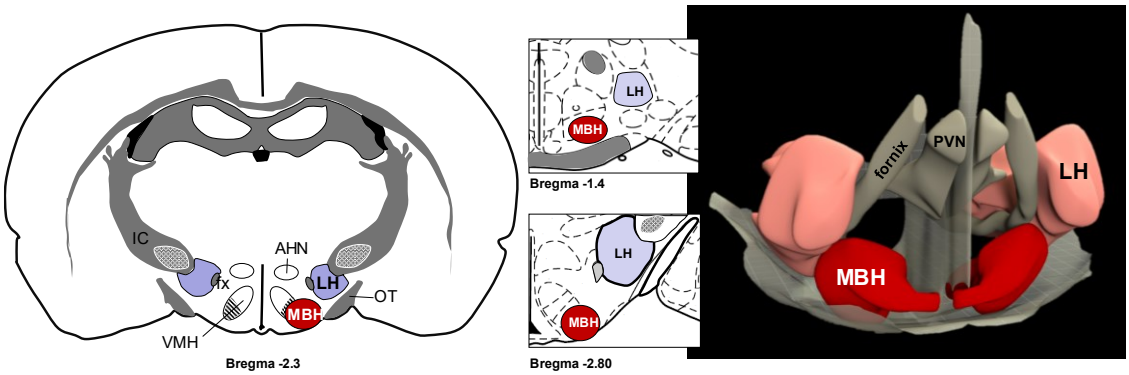
W. R. Hess macskák hipotalamuszában, végzett agressziót indukáló elektromos stimulációs kísérleteit számos más fajban, így emberben is reprodukálták, tehát, feltehetően a jelenség hátterében húzódó mechanizmusok evolúciósan jelentősen konzerváltak (79, 125, 126). A hipotalamusz a humán agresszióban is központi szerepet játszik az alábbi adatok szerint: **(1)** agresszív emberekre a hipotalamusz hiperaktivitása jellemző (127), **(2)** a humán hipotalamusz ingerlésével kontrolálhatatlan dühkitörések válthatók ki (126), **(3)** a poszteromediális hipotalamusz sebészeti és funkcionális léziója sikeresen enyhítette olyan páciensek kóros agresszióját, akik korábban más kezelésre nem reagáltak (128-131). Ugyanakkor a humán hipotalamusz kis mérete miatt képalkotó eljárásokkal nehezen vizsgálható részleteiben. A korábbiakban már ismertetett rendelkezésre álló szélesebb metodikai eszközök miatt a hipotalamusz agresszióban játszott szerepe legfőképp rágcsálókban tanulmányozott.

2.3.3.1. A mediobazális hipotalamusz (MBH)

Patkányokban Kruk és munkatársai több száz elektród helyzete alapján írták körül az MBH-t, mely a fornixtól mediálisan helyezkedik el, az anterior hipotalamusztól a dorzomediális magig terjed, s magában foglalja a tuber cinereum és a ventromediális hipotalamusz ventrolaterális részét (**5. ábra**) (84, 132, 133) Az MBH farmakológiai és elektromos serkentésével a fajtárssal szembeni agresszív viselkedés megbízhatóan kiváltható rágcsálókban. Lin újabban egerekben is azonosítottak egy hasonló régiót a ventromediális hipotalamusz ventrolaterális részén, ahonnan fotostimulálással agresszió váltható ki (134, 135). Az MBH nem pusztán egy végrehajtó szerepkörrel rendelkezik, hanem az agresszív viselkedést befolyásoló különböző motivációs állapotok, szociális és szenzoros ingerek feldolgozásának a központja is. Az innen kiinduló és az agytörzsbe térő pályákon át jutnak el az agresszív viselkedéshez szükséges mozgató parancsok a célszervekhez (136). Az MBH bizonyos neuronpopulációi a fajtárs szaglászásakor, tisztogatásakor is aktiválódnak, míg más neuronok tüzelése agresszív viselkedés alatt maximális, s a fenti két populáció csak kis mértékben fed át. Nőstény állattal való találkozás során az egér MBH neuronjai gátlás alá kerülnek, így a hímekben a párzásra való késztetés kerül fölénybe az agresszív viselkedés helyett (134). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az MBH bemenetein keresztül különféle szenzoros információkat kap a partnerről, aminek hatására a szociális és antiszociális késztetések versengésének

eredményeképpen dől el a viselkedési válasz. Hogy a hipotalamuszon keresztül milyen ingerek befolyásolják a viselkedést, egyelőre nem teljesen tisztázott. *In vivo* elektrofiziológiai eredmények szerint egereknél az MBH aktivitását olyan ingerek vezérlik, mint például a fajtárs szaga, távolsága, a mozgás sebessége és feltehetően vizuális és auditoros információk (137).

Egérben az MBH fotostimulálásával kiváltott támadás a fenti motivációs és szociális ingereket felülírja, nőstényekkel, kasztrált hímekkel, altatott állatokkal és élettelen tárgyakkal szemben is kiváltható, és nem kizárólag az állat saját territóriumán belül. Az ingerlés feltehetően az agresszív motivációt növeli és előre nem tervezett viselkedést vált ki (134). Egérrel ellentétben a patkány MBH elektromos stimulálása nem pusztán motoros választ vált ki, mivel másik patkány nélkül nem jelenik meg támadás, azonban célpont hiányában az állat izgatott, kereső magatartást mutat. A támadások célvezéreltségének hiányát jelzi, hogy azokat fenyegetések nem előzik meg, valamint random célpontokra irányulnak, így sérülékeny testrészeket is gyakran érnek (138). Ezen minőségi jellegek modulálását, szociális kontextushoz való hozzáigazítását feltételezhetően főként kortikális területek végzik, más szubkortikális területek befolyása mellett.



5. ábra. Az MBH (pirossal) és az LH (rózsaszínnel) anatómiai elhelyezkedése és 3D-s helyzete patkányokban. Az intraspecifikus agressziót irányító MBH a bregmától számított -1.4 és -2.80 közötti metszési síkokban helyezkedik el, a fornixtól mediálisan, az anterior hipotalamusztól a dorzomediális magig terjed, magában foglalja a tuber cinereum és a ventromediális hipotalamusz ventrolaterális részét. Az ábrán az MBH-t Lammers és munkatársai (1988) kísérleteiben a támadásokat sikeresen kiváltó elektródok helyzete alapján ábrázoltuk. A predátoros és intraspecifikus agresszióban szerepet játszó LH antero-poszterior irányban a preoptikus areától a ventrális tegmentális areáig terjed, mediálisan a dorzomediális hipotalamusz, a ventromediális hipotalamusz, mediális preoptikus area és a nucleus arcuatus határolja; laterálisan pedig a capsula interna és az optikus traktus. AHN: anterior hipotalamikus mag, fx: fornix, IC: capsula interna, OT: optikus traktus, PVN: paraventrikuláris mag, VMH: ventromediális hipotalamusz.

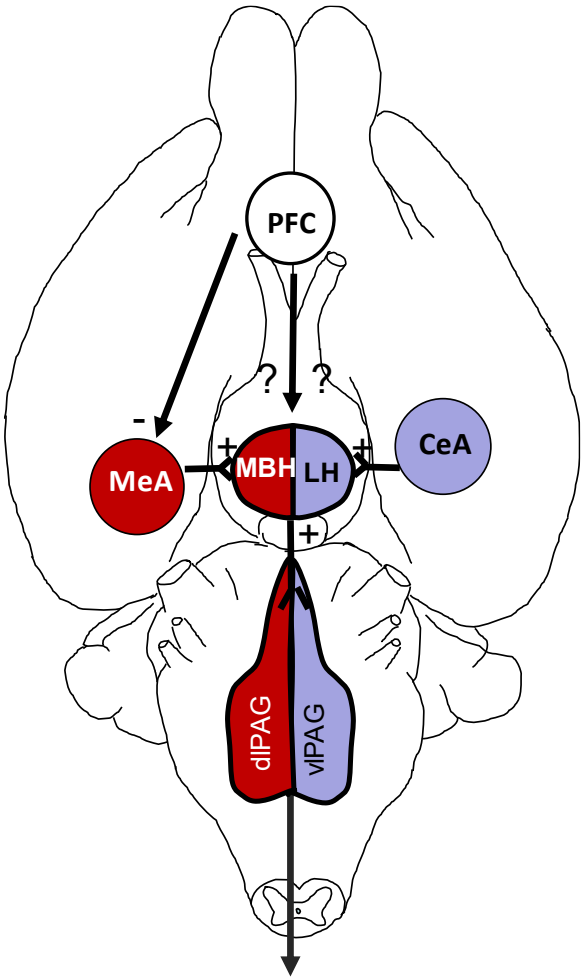
2.3.3.2. A laterális hipotalamusz (LH)

Patkányok esetében egerek, békák és rovarok megölésekor figyelhető meg predáció(15, 16, 81). Csakúgy, mint macskáknál patkányok esetében a ragadozói agresszió központja az LH (**5. ábra**) (15, 139), ahonnan közvetlen elektromos stimulációval támadás váltható ki, azonban ezek jellemzően a prédaállat sérülékeny testrészeire (kiváltképp nyakra) irányulnak, igen gyorsan kivitelezettek és fenyegetéssel nem társulnak (81, 140, 141). Macskákon az MBH és az LH egymást kölcsönösen gátolják, így az intraspecifikus és predátoros jellegű agresszióformák kontextusuknak megfelelően elkülönülnek (114). Korábbi eredmények alapján rágcsálókban nincs effajta reciprok gátlás, a két terület együttesen is aktiválódhat, azonban macskákhoz hasonlóan az aktivációs mintázat robusztussága utal a két régió funkciójára (17, 121). Patkányoknál az LH stimulálásával fajtárs megtámadása is kiváltható, de nagyobb ingererősséggel, mint azMBH területéről (83). Az LH fokozott aktivációja figyelhető meg az alacsony glükokortikoid szint indukálta abnormális agresszió esetén, mely jellemzőiben a ragadozói és territoriális agresszió keverékének tekinthető: fenyegetés nélküli és sérülékeny testrészeket célzó harapások jelentkeznek a fajtárssal szembeni agresszív interakció során (17, 98). Érdekes megfigyelés még, hogy az LH aktivációja pozitívan korrelál a fenti sérülékeny testrészekre irányuló és fenyegetéssel nem jelzett támadások arányával (17). Úgy tűnik tehát, hogy patkányokban az LH az intraspecifikus agresszióban is szerepet játszik, és az alacsony arousal szinttel járó abnormális agresszió esetén dominál.

2.3.3.3. Az MBH és az LH anatómiai kapcsolatai

Az MBH bemeneteit először kutatócsoportunk írta le retrográd pályajelöléssel, a legfőbb afferenseket adó struktúrák a MeA, a lateralis szeptum (LS), a BNST (bed nucleus of the stria terminalis) és az mPFC (89). A MeA-nak fontos szerepe van a szociális viselkedésekben, mivel jelentős szaglóafferentációt fogad, az információkat pedig a stria terminalison át közvetíti számos hipotalamikus magba (142, 143), amelyeken keresztül a szexuális és agresszív viselkedést egyaránt modulálja (122, 144, 145). AZ MBH legfontosabb kimenetei a PAG-ban, a mediodorzális talamuszban és az LS-ban végződnek. AZ MBH a támadásokhoz szükséges motoros parancsokat a PAG dorzolaterális részén és más agytörzsi struktúrákon keresztül közvetíti az izmokhoz(88).

Az LH agresszió szempontjából releváns bemenetét a CeA adja, legfontosabb kimenete pedig a PAG ventrolaterális részébe vetül, amely útvonalon az LH szabályozhatja az agresszióhoz társuló autonóm válaszokat is (17, 140, 146-149). Ilyen módon elképzelhető, hogy az LH dominanciája alacsony arousal szintet indukál predátoros jellegű agresszióformákban, míg a territoriális/intraspecifikus agresszióformákban a MeA-MBH-dl PAG útvonal magas arousal hátteret biztosít, mely az intraspecifikus interakció normális velejárója, sőt mint „belső kontroll/gát" fontos regulátor szerepet is betölt (17, 121). A két útvonal közötti kapcsolat elemei egyelőre nincsenek feltárva, azonban az mPFC MBH-ba és LH-ba vetítő projekciói révén potenciálisan mindkét útvonal aktivitását befolyásolhatja (89, 150-152). Továbbá kérdéses még, hogy az MBH-ba és az LH-ba vetítő mPFC neuronok egyazon vagy elkülönülő neuronpopulációhoz tartoznak-e (**6. ábra**).



6. ábra. Az agresszió szabályozásában érintett idegrendszeri útvonalak rágcsálókban.

Az MBH és az LH a PAG-on és egyéb agytörzsi kapcsolataik révén érik el a támadásokat irányító motoneuronokat. Az MBH jellemzően a PAG dorzolaterális részébe (dlPAG), míg az LH a PAG ventrolaterális részébe vetít (vlPAG), ami az intra- és interspecifikus agresszió mögött álló elkülönült vegetatív válaszok kiváltásában játszhat szerepet. Az MBH-t főként a MeA, az LH-t pedig a CeA-ból érkező afferensek modulálják. A PFC feltehetően a MeA-n keresztül közvetve, hipotalamikus projekciói révén pedig közvetlenül szabályozhatja az LH és az MBH működését, egyelőre nem tisztázott irányban. Az ábrán lilával főként a ragadozói agresszió, vörössel az intraspecifikus agresszió során aktiválódó területeket jelöltük.

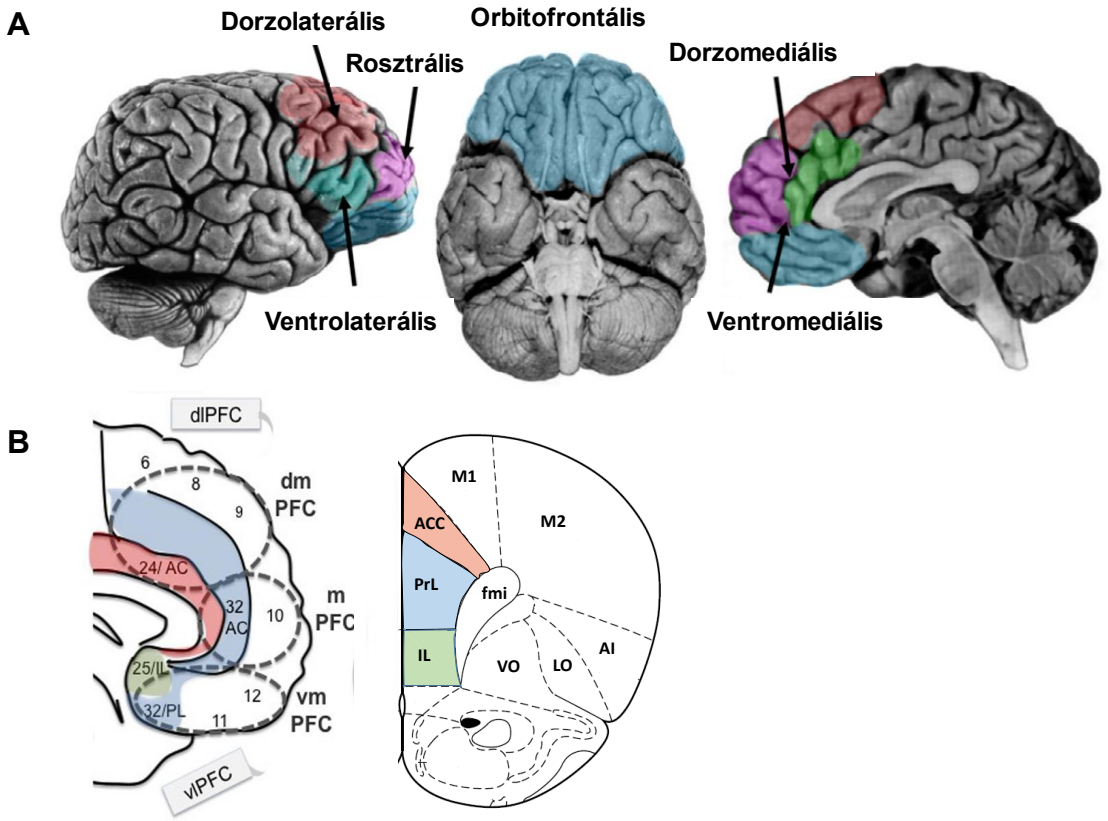
2.3.4. A prefrontális kéreg (PFC)

A PFC központi szereppel bír a „top-down” szabályozásban, a végrehajtó funkciók szervezésében, számos kognitív, neuroendokrin és vegetatív folyamat szabályozásában, és ezáltal a viselkedés tervezésében és kialakításában (32, 153, 154). A fentieket alapul véve feltételezhetően közreműködik az agresszív viselkedés szabályozásában is (155).

2.3.4.1. A PFC jellemzése

A PFC a frontális lebeny azon része, amely a motoros kéregtől anterior irányba helyezkedik el. Primátákban a PFC laterális, orbitofrontális és mediális részekre osztható (156, 157). Míg a laterális PFC (lPFC), a mediális és orbitofrontális PFC (OFC) bizonyos részei izokortexnek, addig a mediális és orbitofrontális PFC fennmaradó részei allokortexnek tekinthetőek. Utóbbiból hiányzik a jól fejlett granuláris negyedik réteg (157, 158). Habár a rágcsálóknak nincs a laterális PFC-nek megfeleltethető izokortexe, feltehetően a precentrális kéreg (PrC, az elsődleges motoros kéregtől anterior irányban található) tekinthető kezdetleges izokortikális PFC-nek (159). Mivel a PFC citoarchitektúrája különbségeket mutat a fajok között, a jelenlegi elfogadott definíció szerint a PFC a laterális, orbitális és mediális frontális lebeny azon része, amely rosztrálisan található az elsődleges motoros kéregtől és sűrű beidegzést kap a mediodorzális talamikus magtól (MD) (157, 158). Ennek megfelelően az anterior cinguláris kéreg (Cg1) szignifikáns innervációt fogad a MD-től, eképp mind primátákban, mind rágcsálókban az mPFC részét képezi. Az OFC felosztható mediális, centrális és laterális részekre. A 24. (dorzális Cg1), a 25. (ventrális és szubgenuális Cg1) és a 32. (az előző területektől rosztrálisan) Brodmann területek az mPFC-ben mind allokortexnek tekintettek. Anatómiai, fejlődéstani és funkcionális hasonlóságok alapján a patkány mPFC-t képező Cg1, a prelimbikus kéreg (PrL) és az infralimbikus kéreg (IL) homológnak tekintett a primáták 24., 25. és 32. területeivel (**7. ábra**) (154, 160, 161). A patkány PrC homológ lehet a primáták lPFC-vel (162, 163). Ahogy primátákban, úgy rágcsálókban is az orbitofrontális régiók feloszthatóak mediális (mediális és ventrális

orbitofrontális kéreg), centrális (ventrolaterális orbitofrontális kéreg) és laterális (laterális orbitofrontális és anterior agranuláris inzuláris kérgek) régiókra (157, 160, 164).



7. ábra. A prefrontális kéreg (PFC) felépítése humán és patkány agyban. A humán PFC mediális része dorzomediális és ventromediális részekre tagolható (dmPFC és vmPFC), laterális része szintén dorzolaterális és ventrolaterális régiókra (dl és vlPFC), az orbitofrontális kéreg pedig mediális, centrális és laterális részekre. Az mPFC 25. Brodmann területe a patkányok infralimbikus kérgével (IL), a 32. terület a prelimbikus kéreggel (PrL), a 24. terület pedig az anterior cinguláris kéreggel (Cg1) tekinthető homológnak. Fmi- forceps minor, M1/M2: elsődleges/másodlagos motoros kéreg, VO, LO: ventrális és laterális orbitofrontális kéreg, AI: agranuláris inzuláris kéreg.Az ábra Szczepanski és Knight 2014, illetve Bicks és mtsai 2015 nyomán készült (160, 164).

Price neuroanatómiai kapcsolataik alapján a PFC részeit egy mediális és orbitális hálózatra osztották fel (159). A mediális hálózat az mPFC-ből és az OFC legmediálisabb részeiből, míg az orbitális hálózat a centrális és laterális OFC-ből áll. A mediális hálózatnak fontos szerepe van a szociális kognícióban, a pozitív (például jutalom) és a negatív töltetű (pl. bűntudat, szégyen, megbánás, félelem) információk, érzések feldolgozásában, valamint amigdalával, ventrális striatummal és hipotalamusszal való kapcsolata révén az érzelmek és motivált viselkedések „top-down" jellegű szabályozásában (32, 152, 160, 165, 166).

Az mPFC-ben található neuronok 80-90 %-a serkentő piramissejt és mindössze 10-20 %-a gátló GABA-erg interneuron. Mind a piramissejtek, mind a GABA-erg

interneuronok morfológiai, fiziológiai és molekuláris jellegek alapján a további alcsoportokba sorolhatók (167, 168). A GABA-erg interneuronok (pl. parvalbumin (PV) és kolecisztokinin (CCK) tartalmúak) döntő szerepet játszanak a piramissejtek periszomatikus gátlása révén a kortikális funkciók szervezésében és összehangolásában (169). A különböző interneuronok, így például a PV és szomatosztatin tartalmú sejtek fotostimulálása eltérő hálózati hatásokat okoz (170), azaz másképp szólnak bele a hálózati működésbe, összetett módon szabályozva azt. Érdekes újabb találat, hogy a projekciós sejtek nem kizárólag serkentők, hanem megfigyelhető hosszú projekciós GABA-erg sejtek, melyek a PFC-ből erednek, s a ventrális striatumba vetítenek (171).

Az mPFC lamináris szerveződést mutat, amelynek fontos jelentősége van a jelfeldolgozásban. Az afferensek a limbikus és kortikális régiókból a szuperficiális rétegekbe érkeznek (I. és II. réteg) (172). Preszinaptikus fotostimulációs kísérletek megmutatták, hogy a II. rétegi PrL piramissejtek bemeneteket kapnak a középvonali talamikus magokból, bazolaterális amigdalából (BLA) és ventrális hippokampuszból. Ezen anatómiai és funkcionális összekapcsoltság révén az mPFC ideálisan helyezkedik el ezen forrásokból érkező információk feldolgozásában és továbbításában (173). A Cg1, a PrL és az IL egyaránt sűrűn bemeneteket kapnak a talamusz felől, amelyek szerepet játszanak az észlelésben, érzékelésben és kognícióban (150, 174, 175). Amellett, hogy talamikus bemenet érkezik a II. rétegbe, az I. rétegben elhelyezkedő interneuronok is kapnak afferentációkat a talamuszból. Ezen interneuronok előre-csatoló gátlással képesek modulálni a II./III. rétegi piramissejteket (176). Általánosan elmondható, hogy a felszíni rétegek fogadják az afferentációk jelentős részét, míg a mélyebb rétegekben elhelyezkedő sejtek adják az efferenseket (150, 175).

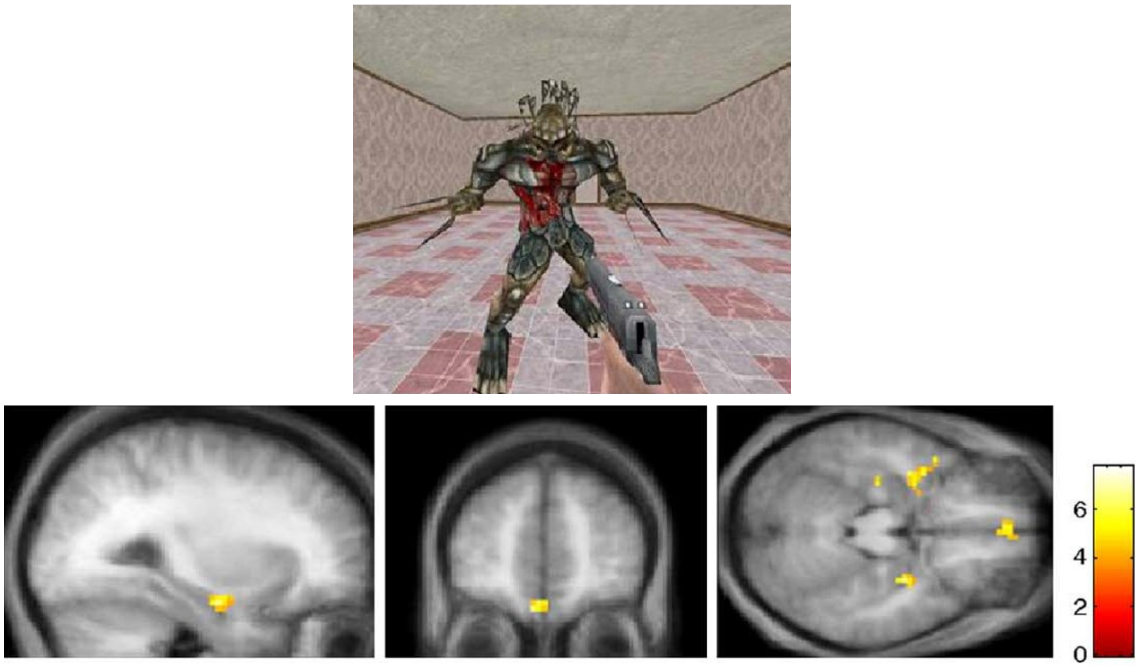
Az mPFC sűrű bemeneteket küld más kortikális és szubkortikális területekhez, amely révén befolyásolja a viszcerális, autonóm, limbikus és kognitív folyamatokat (152, 175). A pályajelöléses tanulmányok egy dorzoventrális gradienst írtak le a prefrontális kimenetek alapján: a dorzális részek (Cg1, dorzális PrL) főként a szenzorimotoros területekhez, míg a ventrális részek (ventrális PrL, IL) a limbikus területekhez küldenek projekciókat (151, 152). Ez a gradiens megmutatkozott az mPFC-ből az MBH-ba vetítő sejtek elhelyezkedésében is, miszerint ezen projekció zöme az IL és a PrL III./V. rétegébe szerveződik, ventrális irányban növekvő denzitásban (89). Az LH-ba vetítő mPFC sejtek némileg laterálisabban/mélyebben, főként az V. és a VI. rétegben helyezkednek el (150).

Az előzőkhöz hasonlatos dorzoventrális gradiens figyelhető meg az LH-ba vetítő mPFC neuronoknál is: a dorzális LH-ba inkább a Cg1 és dorzális PrL, míg a ventrális LH-ba inkább az IL és a ventrális PrL vetít (177, 178). Arra viszont nincs adat, hogy az LH-ba és az MBH-ba vetítő mPFC sejtek átfedő vagy elkülönülő populációt alkotnak-e.

2.3.4.2. A PFC szerepe a humán agresszióval társuló pszichopatológiai jelenségeknél

Számos humán tanulmány alátámasztja, hogy a PFC sérülése a végrehajtó funkciók károsodása mellett (figyelmi zavarok, tervezési nehézségek, romlott munkamemória) komoly személyiségbeli változásokkal járnak (impulzivitás, megromlott szociális kommunikáció), melynek gyakori kísérő tünete a megnövekedett agresszivitás (179-182). A háttérben húzódó okok feltehetően a PFC-hez köthető főbb funkciók kiesésében rejlenek: a kogníció és az értékelő képesség romlása következtében a szociális helyzetek nem megfelelő interpretálása, továbbá az emocionálisan felfokozott helyzetekben a magatartási kontroll alulműködése jelentkezik (7, 91, 183, 184). A túlzott agresszióval társuló pszichiátriai kórképek többségében (skizofrénia, fiatalkori magatartás zavarok, borderline- , antiszociális személyiségzavar és időszakos explozív zavar) ugyancsak kimutatható a PFC funkcionális alulműködése vagy szürkeállományának térfogati csökkenése (7, 185-189). Továbbá agresszivitásra hajlamos egyének, illetve agresszióval társuló pszichopatológiával diagnosztizált betegek csökkent eredményeket értek el a frontális lebeny funkcióit vizsgáló pszichiátriai felmérésekben (190, 191). Ezeknek megfelelően a PFC gátló funkciója az agresszió szabályozásában valószínűsített.

Meglepően, a fenti vizsgálatoktól gyökeresen eltérő eredményt szolgáltattak azok a képalkotó eljárásokon alapuló felmérések, amelyek a PFC krónikus aktivitása helyett az akut, agresszív magatartáshoz asszociálódó prefrontális működés feltérképezésére irányultak. Ilyen jellegű vizsgálatokban agresszív megtorlást, illetve erőszakos szituációkat modellező helyzetekben (fiktív ellenfelek büntetése, illetve erőszakos videojátékokkal való játék) a PFC megemelkedett aktivitását írták le (**8. ábra**). Az agresszióval társuló pszichopatológiával diagnosztizált betegeknél az ilyen típusú vizsgálatoknál az agresszív cselekedetekhez a PFC felfokozott aktivitása társult . Ezen ellentmondásos helyzetet prefrontális paradoxonnak nevezhetjük (192-196).



8. ábra. Erőszakos videojáték kiváltotta mPFC aktiváció emberben funkcionális mágneses rezonancia vizsgálat során. A kísérleti alanyok a videojátékban virtuális támadókat lőhettek le (fenti ábra), amely cselekedetet az mPFC fokozott aktivációja kísérte. King és mtsai 2006 nyomán (192).

2.3.4.3. A PFC szerepe a rágcsálók agresszivitásának szabályozásában.

Már évtizedekkel ezelőtt kimutatták, hogy a patkány, illetve a macska PFC elektromos stimulációja gátolja a hipotalamikusan kiváltott támadásokat, míg léziója növeli az agresszivitást (15, 197-200). Ezen vizsgálatok során a lézió kiterjedése főleg az OFC-re koncentrálódott. Rhesus majmokban az OFC lézió szintén fokozott agresszivitást eredményezett (201, 202). Ahogy már bemutattuk, a PFC mediális és az orbitofrontális hálózatra osztható fel. Ugyanakkor, a fenti vizsgálatok nem szolgáltattak adatokat arra, hogy a mediális hálózat milyen hatást gyakorolt az agresszív viselkedésre. Rudebeck hasonlította össze, hogy az OFC és a Cg1 lézió hogyan befolyásolja az agresszív viselkedést 5 perces szociális interakció teszt során. Az OFC lézió fokozott agresszivitást indukált, míg a Cg1 lézió csökkent szociális érdeklődést okozott.

Rágcsálókban az RB teszt neuronális aktivitást indukál mind az OFC-ben, mind az mPFC-ben (97, 121, 203, 204). Hasonló hatás jelentkezik, ha az állatokat pszichoszociális kontaktusnak teszik ki (nincs fizikai kontaktus az ellenféllel) (98, 203, 205). A fentiekhez hasonlatosan, mind az anyai agresszióhoz (206), mind a juvenilis kori játékos verekedéshez (play fight) fokozott neuronális aktivitás társult az mPFC-ben (120). Egy újabb tanulmány szerint az egér PFC piramissejtjeinek (anatómiailag inkább az OFC)

fotostimulációja csökkentette, míg fotoinhibíciója növelte a támadások számát (207). Ezen fotomanipulációs hatások számos efferensen keresztül érvényesülhettek, így nem kizárható, hogy akár egymást kioltó hatások létrejöttét is eredményezhették. Az mPFC számos szubkortikális területhez vetít és az egyes projekciók szelektív fotomanipulációja akár ellentétes viselkedési válaszok megjelenését is eredményezhetik (152, 175, 208). Ennek fényében indokolt az mPFC agresszióra gyakorolt hatásának projekció-specifikus vizsgálata. Az mPFC és a hipotalamusz közötti kapcsolat agresszióban betöltött funkcionális szerepéről nincs adat. Ennek megfelelően kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy az mPFC projekció-specifikus stimulálása az MBH és az LH területén milyen hatást fejt ki az intraspecifikus agresszió különböző aspektusaira.

2.3.4.4. A PFC szerepe a rágcsálók abnormális agresszivitásának szabályozásában.

Az abnormális agresszió modellekben a normális agressziónál megfigyelt agresszióhoz képest fokozottabb aktiváció (hiperaktiváció) volt megfigyelhető a PFC-ben (97, 203, 209), így a glükokortikoid deficiencia kiváltotta abnormális agresszió a GABA-erg neuronok aktiválódásával negatívan, míg a piramissejtek aktiválódásával pozitívan korrelált az mPFC-ben. A tanulmány arra is rámutatott, hogy míg a piramissejtek hiperaktiválódtak, addig bizonyos GABA-erg sejtek hipoaktivitást mutattak az adrenalektómiának kitett állatokban. A GABA-erg neuronok deficitje két neurokémiailag elkülönült típusban mutatkozott meg: a PV és CCK pozitív sejtekben. A hipoaktivitást mutató PV sejtek alterület szelektíven az IL-ben helyezkedtek el.

Nincs tudományos lelet arról, hogy a korai szociális izoláció okozta abnormális agresszióhoz az mPFC-ben milyen réteg, illetve alterület specifikus neuronális aktivációs mintázatok társulnak. Tovább az sem feltárt, hogy a szociális izoláció miként befolyásolja az agresszív interakció során aktiválódott glutamáterg és GABA-erg neuronok arányát. Emellett egyes jelenségeket, mint például a PFC funkcionális és strukturális lateralizációját a kóros agresszió során, csak humán képalkotó eljárásokkal vizsgáltak (6, 7, 92, 180), állatmodellekben egyelőre nem.

3. Célkitűzések

3.1. Az mPFC és a hipotalamikus támadási központok közötti projekciók anatómiai és viselkedési karakterizálása

Jelen dolgozat az mPFC agresszív viselkedésben betöltött szabályozó szerepének megértése köré szerveződik. A dolgozat első részének célja az mPFC hipotalamikus támadási központokba vetülő projekcióinak (mPFC-MBH és mPFC-LH) anatómiai szerveződésének, illetve agresszív viselkedésre gyakorolt funkcionális hatásainak feltárása.

3.1.1. Az MBH-ba és az LH-ba vetülő prefrontális kérgi neuronpopulációk átfedésének vizsgálata

Korábbi, anterográd és retrográd pályajelölést alkalmazó közlemények szerint mind az MBH, mind az LH közvetlen bemenetet kap az mPFC-ből (89, 150, 151, 210), azonban nem ismert, hogy egyazon vagy több elkülönülő neuronpopuláció idegzi-e be a két hipotalamikus területet. Munkánk első szakaszának célja ennek a kérdéskörnek a tisztázása volt.

3.1.2. Az mPFC-MBH és az mPFC-LH projekciók neurokémiai karakterizálása

Bár az mPFC projekciós neuronjai glutamáterg fenotípusúak, újabb adatok szerint GABA-erg projekciós sejteket is tartalmaz ezen kérgi terület (171). Ezt alapul véve célunk tisztázni, hogy az mPFC milyen arányban küld glutamáterg és GABA-erg projekciókat az MBH-hoz és az LH-hoz. A kérdés teljeskörű feltárása érdekében célunk megvizsgálni továbbá az mPFC projekció optogenetikai stimulálása által kiváltott posztszinaptikus áramokat a hipotalamikus területeken.

3.1.3. Az mPFC-MBH és az mPFC-LH projekciók agresszív és szociális viselkedésformákra gyakorolt hatásának vizsgálata

Irodalmi adatok alapján feltehető, hogy az agresszív viselkedés kontrolljában részt vesz az OFC (207), ugyanakkor az mPFC ilyen jellegű szerepe még nem tisztázott, továbbá az mPFC és a hipotalamusz közötti kapcsolat agresszióban betöltött funkcionális szerepéről sincs adat. Ennek megfelelően, kísérleteink célja megvizsgálni, hogy az mPFC-MBH és az mPFC-LH pályák fotostimulációja milyen hatást gyakorol az agresszió különböző aspektusaira

3.2. A korai szociális izoláció következtében kialakuló abnormális agresszió hátterében álló prefrontális kérgi strukturális és funkcionális változások

Emberekben a korai szociális elhanyagolás gyakran felnőttkori abnormális agresszióval társuló pszichopatológiai jelenségek kialakulásához vezet, melyek az mPFC strukturális és funkcionális deficitjeivel járnak együtt (3, 7, 11). Ehhez hasonlóan, a korai szociális izoláció patkánymodellben is fokozott és abnormális agresszivitáshoz vezet, amelyben kulcsszerepet játszhat az mPFC (14, 18, 19, 97, 121, 203). A dolgozat második felének célja ennek a kérdéskörnek a vizsgálata, feltárva a korai szociális izoláció által kiváltott abnormális agresszió mPFC szintjén megjelenő strukturális és funkcionális változásait. A vizsgálatok az mPFC egy jól körülhatárolt részére irányultak (**24/A ábra**), mely nagy denzitásban tartalmaz hipotalamuszba vetítő neuronokat és jelentős mértékű neuronális aktivitást mutat agresszív interakció során (89, 121, 150, 203). Vizsgálataink során a változásokat a bal és jobb hemiszfériumban külön értékeltük.

3.2.1. A korai szociális izoláció mPFC struktúrájára és az agresszív magatartásra gyakorolt hatásainak feltárása

Mind a korai gyermekkori elhanyagolás (211), mind az agresszióval társuló pszichopatológiai jelenségek az mPFC térfogatcsökkenésével járnak együtt (7). Különálló vizsgálatok szerint a korai szociális izoláció abnormális agresszív viselkedéshez (18, 72, 121), illetve az mPFC térfogatának csökkenéséhez vezet (212, 213). Ugyanakkor nincs irodalmi adat arra vonatkozóan, hogy korai szociális izoláció hatására abnormálisan agresszív patkányok mPFC-je milyen makroszkópos strukturális változásokat mutat. Az agresszióval társuló pszichopatológiai jelenségeknél tapasztalt mPFC térfogatcsökkenéssel járó celluláris változások egyelőre nem ismertek. Korábbi állatkísérletes tanulmányok szerint a korai szociális izoláció csökkenti az mPFC piramissejtjeinek dendritikus komplexitását és a dendrittüske denzitást (75, 214, 215), azonban a szociális izoláció gliára, illetve mikrovaszkulatúrára gyakorolt hatásairól egyelőre kevés, és többségében negatív adat áll rendelkezésre (216, 217). Munkánk ezen szakaszának célja ezen változások karakterizálása volt.

3.2.2.A korai szociális izoláció okozta abnormális agresszióhoz társuló neuronális aktivitásbeli változások feltárása az mPFC-ben

Az mPFC aktivitása mind rágcsálókban, mind egészséges emberekben fokozódik agresszív viselkedés során a nyugalmi helyzethez képest (193, 194, 203). Az abnormális agresszió rágcsálómodelljeiben és az agresszióval társuló pszichopatológiával diagnosztizált betegekben az aktiváció fokozódása még erőteljesebb (97, 121, 185, 205, 218, 219). A rágcsálókban végzett eddigi vizsgálatok globálisan jellemezték az mPFC neuronális aktivitását, de a finom aktivációs mintázatok nem ismertek (97, 121). Célunk egy részletesebb, a humán „voxel-jellegű" képalkotási módszereknek megfeleltethető vizsgálat volt, amely lehetővé teszi az mPFC aktiválódott neuronjainak topografikus eloszlásának leírása szociálisan izolált és szociálisan tartott állatokban.

3.2.3. A korai szociális izoláció következtében kialakuló abnormális agresszív viselkedés során aktiválódó neuronok neurokémiai jellemzése

Az mPFC-ben a neuronális excitatórikus/inhibitorikus egyensúly fenntartása alapvető szerepet játszik a szociális viselkedés modulálásában és felborulása szociális diszfunkciók megjelenését okozza (220, 221). Korábbi vizsgálatok alapján a glükokortikoid deficiencia következtében kialakult abnormális agresszió az mPFC-ben eltolódást okozott a priamissejtek és a GABA-erg interneuronok aktivációs arányában, amely az excitatórikus/inhibitorikus arány eltolódására utalt (203). A korai szociális izoláció okozta abnormális agresszió során aktiválódott neuronok neurokémiai jellegéről és arányáról nincs tudományos lelet. Célunk tehát az mPFC piramissejtjeinek és GABA-erg neuronjainak aktivitás vizsgálata volt RB teszt után szociálisan izolált és szociálisan tartott állatokban.

4. Módszerek

4.1. Az állatok tartási körülményei

A kísérletek során vizsgált állatok hím Wistar patkányok voltak (Charles River Laboratories). Minden kísérletben az anyától való elválasztás a tenyésztésben szokásos időpontban, az állatok 21 napos korában történt, amikor négyes-ötös csoportokban átkerültek egy 12 órás fordított napszakos ciklusú állatszobába, ahol a sötét periódus délelőtt 10:00 órakor kezdődött. A korai szociális izolációs kísérleteknél az izolált állatokat az elválasztásól kezdve 7 héten át egyedül, míg a szociálisan tartottakat ugyanennyi ideig négyes csoportokban tartottuk ugyanabban a szobában, random elhelyezésben Makrolon dobozokban (42 x 26 x 19 cm). Amikor a szociális állatok tömege elérte a 200 grammot, nagyméretű Makrolon dobozokba kerültek áthelyezésre (60 x 38 x 19 cm). A rezidens-betolakodó tesztek az elválasztás utáni nyolcadik héten kezdődtek, ekkor az állatok tömege 400-450 gramm volt. A szobában állandó hőmérséklet (22 ± 2 °C) és páratartalom (60 ± 10 %) volt. Laboratóriumi patkánytáp és víz korlátlan mennyiségben állt az állatok rendelkezésére.

A rezidens-betolakodó tesztben betolakodóként csoportban nevelkedett, kb. 300 gramm tömegű hím Wistar patkányokat használtunk melyeket ugyancsak négyes csoportokban tartottunk a fent leírt körülmények között. A kísérleti elrendezés részletes bemutatása és az elemszámok feltüntetése alább található.

Az állatkísérleteket az Európai Bizottság Tudományos Tanácsa ajánlásának (86/609/EEC) megfelelően, a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Állatjóléti Bizottságának felügyeletével és jóváhagyásával, a szükséges, állatkísérletek végzésére szóló engedélyek birtokában végeztük.

4.2. Kísérleti elrendezések

4.2.1. Kísérlet 1: Az MBH és az LH prefrontális afferentációjának feltérképezése

Ezen nyomkövető jelölést alkalmazó vizsgálatainkban arra voltunk kíváncsiak, hogy az MBH-ba és az LH-ba vetítő mPFC-ineuronpopulációk mennyiben képeznek átfedő vagy elkülönült neuronpopulációt, illetve milyen a réteg-specifikus eloszlásuk (**9/A ábra**). Ezen kísérlet során kettős retrográd pályajelölést alkalmaztunk: FluoroGoldot (FG), illetve Cholera Toxin ß (CTB) alegységet adtunk be rendre az MBH-ba és az LH-ba. A beadások után két héttel az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk és

immunhisztokémiai módszerekkel ellenőriztük a nyomjelölők beadási gócait. A kísérlet során csak azokat az állatokat vettük be az analízisbe, amelyeknél a nyomjelölő beadási góc az MBH-ra (n=4) vagy az LH-ra (n=4), illetve a kettős pályajelölő beadásoknál szelektíven e két területre (n=3) korlátozódott. Ezen állatok prefrontális kérgi metszetein NeuN/CTB/FG hármas immunjelölést hajtottunk végre annak érdekében, hogy meghatározzuk az LH-ba, az MBH-ba vagy mindkét hipotalamikus támadási területre vetítő sejtek arányát (a teljes NeuN+ neuronszámra is).

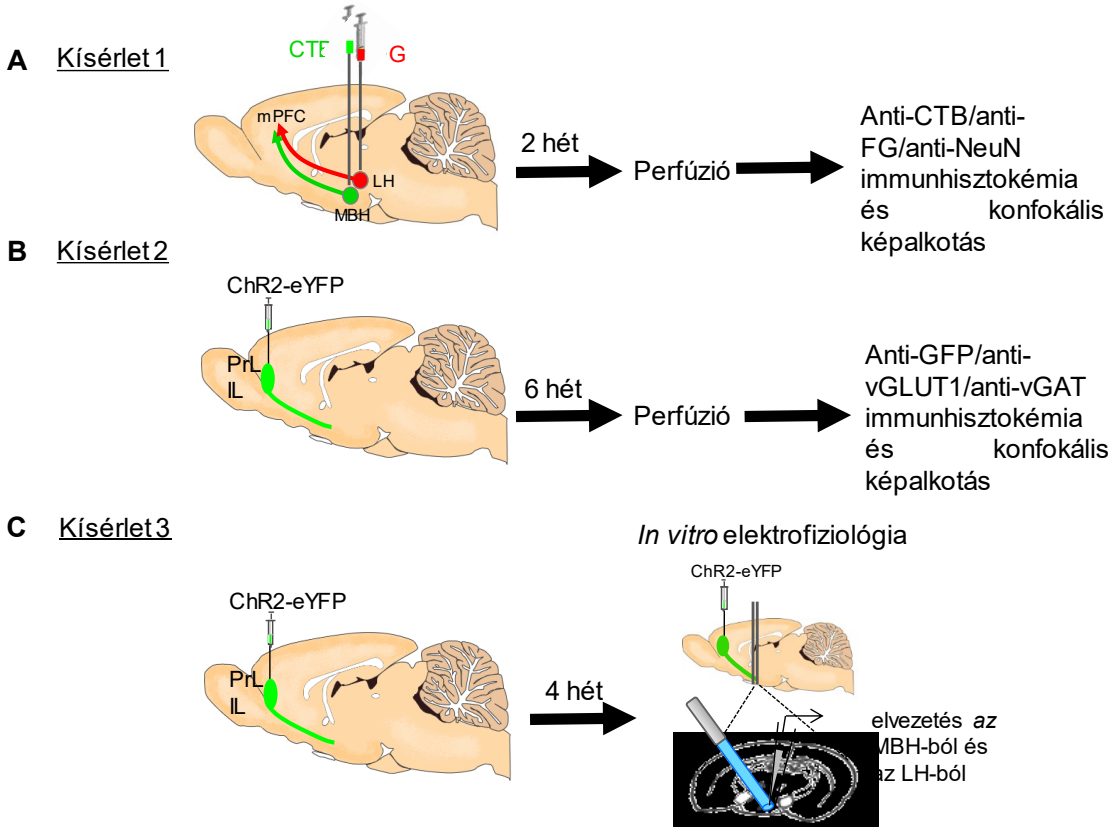
4.2.2. Kísérlet 2: Az MBH és az LH prefrontális afferentációjának neurokémiai karakterizálása

Második lépésben a fent azonosított mPFC-MBH és mPFC-LH projekciók neurokémiai fenotípusát (glutamáterg és/vagy GABA-erg) kívántuk meghatározni (**9/B ábra**). Ezen kísérlet során anterográd nyomjelölő gyanánt vírus vektorral idegsejtspecifikusan eYFP konjugált ChR2-t fejeztünk ki az mPFC-ben (pontosan IL-PrL kéreg) sztereotaxikus műtéti beadással. A vírusbeadáskor az állatok tömege megközelítőleg 300 gramm volt és csoportosan voltak tartva a sztereotaxikus műtétig, utána 6 hetet hagytunk a vírusexpresszió megfelelő szintjének elérésére, melyet immunhisztokémiai módszerrel ellenőriztünk. Azokat az állatokat, amelyeknél a vírusgóc túlhaladt az IL-PrL alrégiókon kizártuk az analízisből. A vizsgált állatokon (n=3) az MBH és LH területén anti-GFP/vGLUT1/vGAT hármas immunjelölést végezünk, amelyet konfokális mikroszkópos képalkotás követett.

4.2.3. Kísérlet 3: A prefrontális kérgi efferensek neurofiziológiai hatásának verifikálása az MBH és LHszintjén

Harmadik kísérletünk arra irányult, hogy a ChR2-t kifejező prefrontális kérgi bemenetek fotostimulálása megbízhatóan képes-e kiváltani posztszinaptikus választ a hipotalamikus sejtekben (**9/C ábra**). Ezen kísérletek során a vírus konstrukció beadása korábban történt (30-35. posztnatális napokon, n=3) a többi kísérletben leírt vírus beadáshoz képest, ugyanis a hipotalamikus sejtek *in vitro* életképessége megkívánta a minél korábbi mérést, azonban jelentős hipotalamikus vírus expressziót csak 4 hét inkubációt követően tudtunk detektálni. Ezen időszak alatt az állatokkal semmilyen viselkedési teszt nem történt. A négy hét elteltével az állatokból nyert hipotalamikus agyszeleteken *in vitro* elektrofiziológiai méréseket végeztünk a posztszinaptikus áramokra fókuszálva, amelyek során egy nyugalmi alapszakasz felvétele után az

elvezetett sejtekre érkező prefrontális afferenseket kék lézerfénnyel fotostimuláltuk. A mérések során összesen 12 sejtből történt elvezetés.

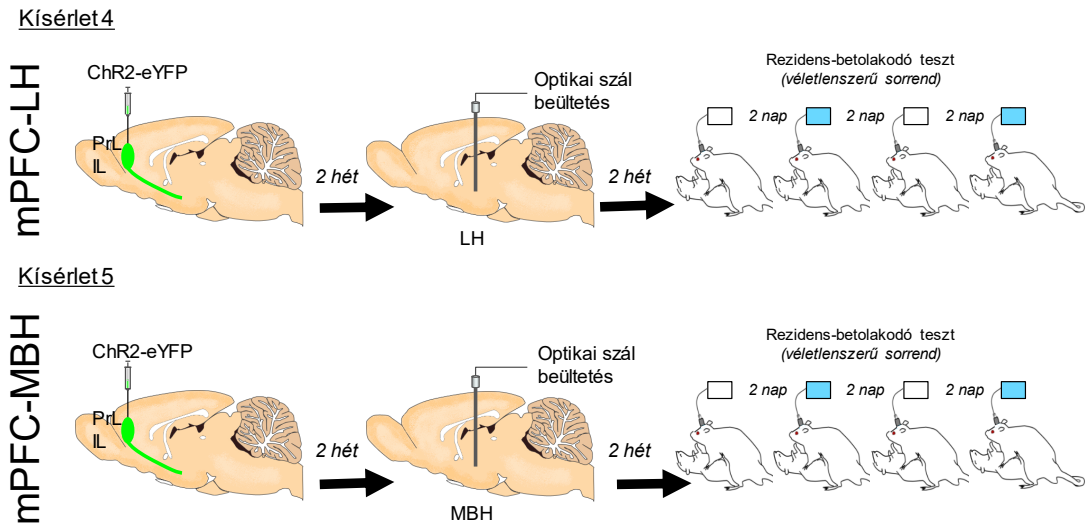


9. ábra. Kísérlet 1-2-3 kísérleti elrendezései. ChR2, channelrhodopsin 2; CTB, Cholera Toxin ß alegység;eYFP, enhanced yellow fluorescent protein (sárga fluoreszcens riporter fehérje);FG, FluoroGold, IL, infralimbikus kéreg, LH, laterális hipotalamusz; MBH, mediobazális hipotalamusz; NeuN, neuronális sejtmag fehérje; PrL, prelimbikus kéreg, vGAT vezikuláris GABA transzporter; vGLUT1, egyes típusú vezikuláris glutamát transzporter.

4.2.4. Kísérlet 4 és 5: Az mPFC-LH és az mPFC-MBH projekciók direkt hatásának vizsgálata az agresszív magatartásformákra

A negyedik és ötödik kísérletek célja az volt, hogy a fenti kísérletek során azonosított mPFC-LH és mPFC-MBH projekciók funkcionális hatását teszteljük agresszív interakció során (**10. ábra**). Ezeknél a kísérleteknél ChR2-t (AAV5-hSyn-hChR2(H134R)-eYFP; University of Pennsylvania, titer 10^{13}) fejeztünk ki az állatok prefrontális kérgi neuronjaiban a harmadik kísérletsorozatnál leírt módon. A 4. és az 5. kísérletek identikusak voltak minden paraméterben, csupán az optikai szálak lokalizációja volt különböző (*4. kísérlet:*LH, n=10; *5. kísérlet:*MBH, n=8). A vírusbeadást két héttel követte az optikai szálak beültetése, majd újabb két hét felépülési periódus, amelynek a végén az állatok rezidens-betolakodó tesztekben vettek részt. A rezidens-betolakodó tesztet minden rezidens állattal négy alkalommal, 48 órás időközökkel ismételtük.

Minden rezidens a négy teszt során kétszer fényingerlés közben, kétszer pedig a lézervezeték csatlakoztatásával, de fényingerlés nélkül ismeretlen betolakodóval találkozott. Az ingerlési sorrendet és az állatok tesztelési sorrendjét randomizáltuk, önkontrollos kísérleti elrendezést kialakítva. Az utolsó viselkedési tesztet követően az állatokat 90 perccel paraformaldehiddel transzkardiálisan perfundáltuk és immunhisztokémiai módszerek alkalmazásával ellenőriztük a vírus kifejeződést az mPFC és hipotalamusz szintjén, illetve az optikai szálak pozícióját a megfelelő hipotalamikus területek fölött.



10. ábra. Kísérlet 4-5 kísérleti elrendezései. ChR2: channelrhodopsin 2, eYFP: enhanced yellow fluorescent protein (sárga fluoreszcens riporter fehérje), IL: infralimbikus kéreg, LH: laterális hipotalamusz, MBH: mediobazális hipotalamusz, PrL: prelimbikus kéreg.

4.2.5. Kísérlet 6: Kontroll vizsgálatok a ChR2-t nem tartalmazó vírus konstrukciókkal az mPFC-MBH projekció fotostimulálásakor

Kontroll kísérleteink során a kapott viselkedési hatások szelektivitását kívántuk ellenőrizni, azaz hogy a viselkedési hatások nem a vírus infekció vagy fotostimuláció melléktermékei. Ennek elérésére csak riportergént (eYFP, funkcionális ChR2 molekulák nélkül az mPFC-ben) kifejező állatokat teszteltünk a fenti kísérleti elrendezésben fotostimulációval és anélkül (n=8).

4.2.6.Kísérlet 7: Az mPFC-MBH projekciók fotostimulálásának specificitása: lokomotoros és szociabilitásbeli hatások tesztelése

Ebben a kísérletben tisztázni kívántuk, hogy a fotostimuláció hatásai specifikusak-e az agresszív viselkedésformákra, és nem a szociális motivációban bekövetkezett

változások másodlagos következményei. Az utolsó RB teszt után két nappal fotostimulációval társított szociabilitás tesztet végeztünk a patkányokkal (n=8).

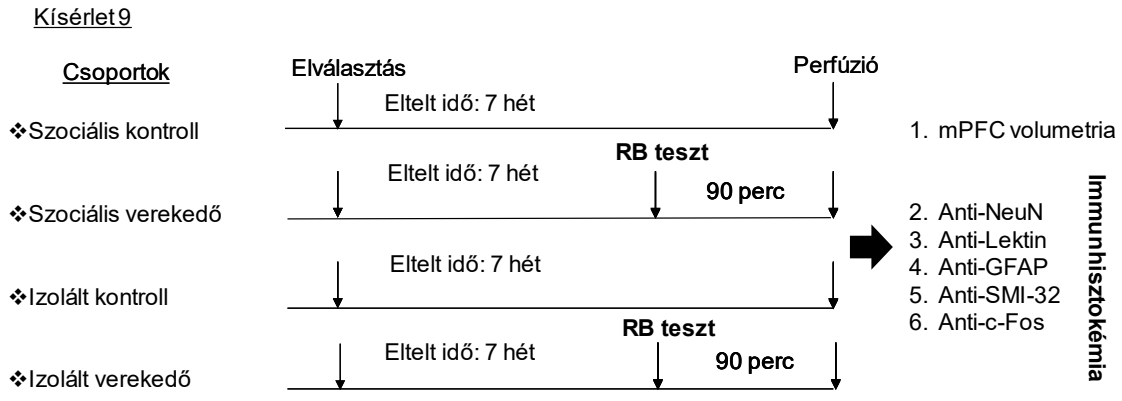
4.2.7. Kísérlet 8: A hipotalamikus fotostimuláció hatása az mPFC neuronális aktivációjára

A nyolcadik kísérletsorozat az axonális fotostimuláció hatására megjelenő esetleges retropropagáció feltárására irányult, mely során a visszaterjedő akciós potenciál az mPFC neuronjait aktiválhatta. E jelenség vizsgálatára a patkányok mPFC-jében ChR2-eYFP-t (n=8) vagy csak eYFP riporter (n=7-8) fehérjét fejeztünk ki, és négy hét múlva fotostimulációt végeztünk az MBH vagy LH régiókban mialatt az állatok saját dobozukban tartózkodtak, így tisztán a fotostimuláció hatását kívántuk mérni. 90 perccel később paraformaldehiddel transzkardiálisan perfundáltuk az állatokat és c-Fos immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk az mPFC-ben aktiválódott eYFP+ sejtek azonosítására.

4.2.8. Kísérlet 9: A korai szociális izoláció hatása az agresszív magatartásra, valamint a prefrontális kéreg strukturális és funkcionális változásaira

A kilencedik kísérletsorozatot a **11. ábra** foglalja össze. Ezen kísérletsorozatba a patkányokat 21 naposan választottuk el az anyjuktól és véletlenszerűen kétféle tartási körülménybe csoportosítottuk őket: szociális közegben (dobozonként 4 állat, n=24) vagy izoláltan (n=24) nőttek fel. Az egyes kísérleti csoportok állatait egyenlő arányban képezték alomtársak. A szociális közegben tartott állatok legalább 3 különböző alomból származtak. 7 héttel később a patkányok 400-450 grammos testtömeget értek el, a szociális és izolált csoport ebben nem különbözött. Az elválasztást követő 8. hét végén minden állatot individuálisan egy új, nagyméretű dobozba helyeztünk át három napra, amelyet a rezidens-betolakodó teszt követett. A kísérlet ezen fázisában a szociálisan és izoláltan nevelkedett állatokat további csoportokra bontottuk annak érdekében, hogy megfigyelhessük az agresszív interakciótól mentes nyugalmi állapotot kísérő prefrontális kérgi változásokat, így négy kísérleti csoportunk lett: szociális kontroll csoport (n=10), szociális verekedő csoport (n=14), izolált kontroll csoport (n=10) és izolált verekedő csoport (n=14). A fent említett kontroll csoportok állatait nem tettük ki az RB tesztnek, míg a verekedő állatokkal lezajlott az RB teszt. Az agyak feldolgozása során három agy sérült meg, ezeket az állatokat kizártuk a kísérletből. Az RB teszt után 90 perccel az állatokat elaltattuk és paraformaldehiddel transzkardiálisan perfundáltuk a strukturális és

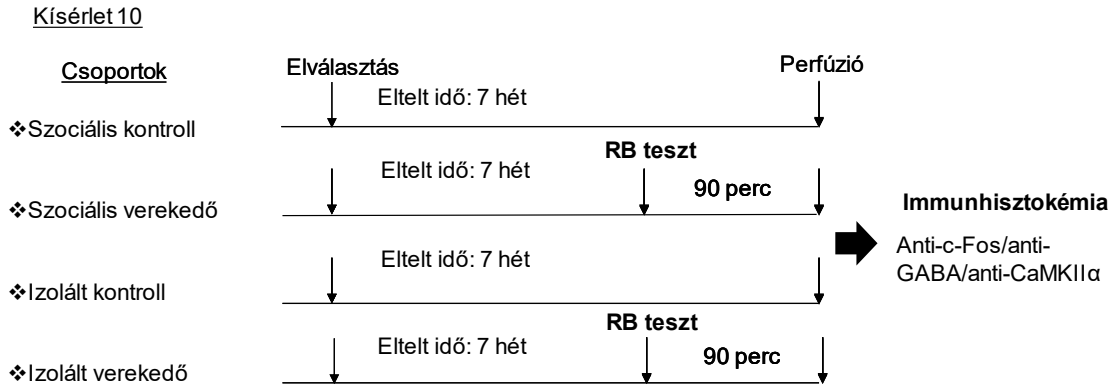
funkcionális immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzése érdekében. Vizsgálataink a korábbiakban ismertetett mPFC régióra irányultak. A kísérletek során megvizsgáltuk ezen régió térfogati kiterjedését, az itt található idegsejtek számát, a mikrovaszkulatúra gliális és dendritikus elemeinek optikai denzitását. Emellett megvizsgáltuk az agresszív interakció által kiváltott neuronális aktivációt, valamint az aktiválódott idegsejtek térbeli mintázatát.



11. ábra. Kísérlet 9 kísérleti elrendezése. GFAP (glia marker), gliális fibrilláris savas fehérje; NeuN (neuron marker), neuronális sejtmag fehérje; SMI-32 (dendritikus marker), nem foszforilált neurofilament H; RB teszt, rezidens-betolakodó teszt.

4.2.9. Kísérlet 10: Agresszív interakció során aktiválódott idegsejtek neurokémiai azonosítása

A tizedik kísérlet elrendezését a **12. ábra** foglalja össze. Ez a kísérletsorozat az elsővel megegyező módon zajlott le azzal a különbséggel, hogy az immuncitokémiai vizsgálatok során c-Fos/GABA/CaMKIIα hármas immunjelölést alkalmaztunk annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az mPFC gátló és serkentő sejtjeinek aktivációs megoszlását. Az alábbi kísérleti csoportjaink voltak: szociális kontroll csoport (n=4), szociális verekedő csoport (n=5), izolált kontroll csoport (n=3) és izolált verekedő csoport (n=7).



12. ábra. Kísérlet 10 kísérleti elrendezése. CaMKIIα (piramissejt marker), Kálcium-Kalmodulin dependens proteinkináz II α; GABA (GABA-erg marker), gamma-amino-vajsav.

4.3. Viselkedés vizsgálatok

4.3.1. Rezidens-betolakodó teszt

Az agresszív viselkedést az ún. rezidens-betolakodó (RB) tesztben vizsgáltuk, amely egy „rezidens" állat egy a ketrecébe helyezett „betolakodó" állattal szemben mutatott territoriális jellegű agresszivitásának mérésére alkalmas viselkedésteszt (15, 33).

Az elválasztás utáni 8. héten a kísérleti alanyokat rezidens állatként, három napra, egyesével nagyméretű (60 x 40 x 50 cm) átlátszó műanyag tesztdobozokba helyeztük, függetlenül attól, hogy korábban csoportban, vagy izoláltan tartottuk őket. Erre azért volt szükség, hogy kialakuljon a territoriális viselkedés, a rezidens állat egy a ketrecébe helyezett betolakodó egyeddel szemben agresszív magatartást mutasson. A rezidens állat támadásra való motivációját kisebb testtömegű betolakodó egyedek alkalmazásával biztosítottuk (megközelítőleg 30%-os súlykülönbség a rezidens és betolakodó állat között). Mindezek révén a nagyobb testtömegű rezidens saját területén domináns pozícióba kerül, agresszív viselkedést mutat, így tanulmányozható annak mértéke és formája, potenciálisan megjelenhet és detektálhatóvá válhat, ha az túlzott mértéket és abnormális jelleget ölt (pl. fenyegetés nélküli vagy sérülékeny testrészekre irányuló támadások lásd alább).

A tesztek a sötét (aktív) periódus első négy órájában zajlottak, enyhe vörös megvilágítás mellett. A rezidens állatok ketrecébe egy náluk kisebb ivarérett hím betolakodót helyeztünk 20 percre és viselkedésüket videokamerával rögzítettük. A videofelvételeken azonosítottuk a harapásokat, majd azokat lassítva, képkockánként megállítva elemeztük („frame-by-frame analízis") azok célpontjait és a harapásokat

megelőző viselkedéselemeket (18, 19, 203). A harapások célpontjait az alábbi kategóriákba soroltuk: fej (a fülek előtti terület), torok (a fülek alatti ventrális terület), hát (a fülek mögötti terület), has (a lábak közötti ventrális terület), lábfejek, farok. Az ellenfél fejét, torkát és a hasát érintő harapásokat sérülékeny célpontú harapásnak minősítettük (**1/A ábra**). Vizsgálataink kiterjedtek a harapási szándék előre jelzésének azonosítására is, azaz rögzítettük, hogy milyen viselkedéselem előzte meg a támadást. „Előre jelzett" harapásnak tekintettük, amikor a rezidens fenyegető viselkedés, illetve domináns testhelyzet felvétele után harapta meg ellenfelét. „Előre nem jelzett" harapásnak tekintettük, amikor a támadást arra nem utaló viselkedés (szociális szaglászás, exploráció, öntisztogatás) előzte meg. A vizsgálatok analízise során azokat a harapásokat, melyeket nem előzött meg fenyegetés vagy sérülékeny testrészekre irányultak *abnormális harapásoknak* tekintettük. *Fokozottan abnormális támadásnak* tekintettük az előre nem jelzett, sérülékeny testrészekre irányuló harapásokat. A harapások elemzése mellett a rezidens állatok viselkedését részletesen karakterizáltuk a H77 eseményregisztráló szoftver segítségével. Ennek során - a videofelvétellel párhuzamosan, az egyes magatartási változókhoz rendelt billentyűk lenyomásával - minden monitorozott magatartási elem esetében megállapítottuk a viselkedéssel töltött összidőt, illetve ennek arányát a teljes teszt idejére vonatkoztatva (időszázalék), valamint azok előfordulási gyakoriságát és első előfordulásának latenciáját. A megfigyelt magatartási változók a következők voltak: *pihenés* (lokomóció nélkül töltött idő); *exploráció* (környezetre irányuló szaglászás); *szociális interakció* (a betolakodó egyed oldalára, nazális, illetve anogenitális régiójára irányuló szaglászás); *mosakodás* (öntisztálkodás a mellső mancsokkal, vakarózás a hátsó lábakkal); *fenyegetés* (betolakodó egyed agresszív tisztogatása, oldalsó fenyegetés, offenzív felágaskodás, bírkózás és betolakodó üldözése); *defenzív magatartás* (defenzív felágaskodás, defenzív rúgás, menekülés, dermedt viselkedés); *domináns pozíció* (hátán fekvő betolakodó egyed talajra való lenyomása); *szubmisszív pozíció* (háton való fekvés, míg a betolakodó egyed a talajra nyomja a rezidens egyedet).

4.3.2. Rezidens-betolakodó teszt optogenetikai ingerléssel

Az optogenetikai fotostimulációt alkalmazó kísérleteink során vizsgált agresszivitást a fent leírt RB teszt segítségével vizsgáltuk, az előzőekkel identikus kísérleti elrendezésben, de ez alkalommal 10 perces időtartamban. Közvetlenül az RB

teszt előtt csatlakoztattuk az optikai vezetéket az optikai szálhoz. A prefronto-hipotalamikus projekciók fotostimulációja minden esetben a 10 perces teszt első három percében történt, 20 Hz-es, 10 ms-os időtartamokban felvillanó (20 ms-os szünetekkel alternálva) 20 mW kimeneti teljesítményű kék (473 nm) lézer impulzusok alkalmazásával. A fotostimulálási paraméterek megegyeztek a korábbi hipotalamikus fotostimulációs vizsgálatokéival (134, 135). A teszt hátralévő hét percében az állatok viselkedését további ingerlés nélkül követtük nyomon. A fotostimuláció nélküli tesztek során az optikai vezeték csatlakoztatásával, de lézer megvilágítás nélkül vizsgáltuk az állatok agresszív viselkedését.

4.3.3. Szociabilitás teszt optogenetikai ingerléssel

A szociabilitás tesztben egy szociális stimulus (ugyanazon nemű fajtárs) iránti érdeklődés mértékét vizsgáltuk egy neutrális stimulus (élettelen tárgy) iránti érdeklődéssel szemben, mely alapján megállapítható a szociális preferencia/érdeklődés mértéke. Az 5. kísérlet állatait az utolsó RB teszt után két nappal vetettük alá a szociabilitás tesztnek. Az állatokat egy 100 x 100 cm alapterületű 40 cm magas fallal körülvett műanyag ládába helyeztük, majd 5 perc tesztarénabeli habituációt követően az aréna egyik sarkába egy kisebb hím fajtársat (8 hetes, 300-350 grammos) raktunk rácsos hengerben, a másik sarokba egy üres cilindert. A fajtárs rácsos cilinderben való elhelyezése lehetővé tette olfaktoros és vizuális ingerek észlelését a kísérleti alany részéről, azonban nem tett lehetővé közvetlen fizikai kontaktust az állatok között. A fajtárs behelyezését követő 3 percben az RB teszttel megegyező ingerlési paramétereket alkalmaztuk, majd további 7 percig fotostimuláció nélkül folytattuk a tesztet. A lokomotoros aktivitást Noldus EthoVision segítségével elemeztük. A fajtársat tartalmazó és üres cilinder explorációját H77 eseményrögzítő szoftverrel kvantifikáltuk. A szociális motivációt a következő formula révén adtuk meg:[(fajtárs szaglászásával töltött idő/(fajtárs szaglászásával töltött idő + üres cilinder szaglászásával töltött idő)] x 100.

4.4. Műtéti beavatkozások

4.4.1. Sztereotaxikus műtétek

A kettős pályajelöléshez és az optogenetikai manipulációkhoz (vírus beadás, optikai szál beültetés) szükséges műtéti eljárásokat sztereotaxikus készülékben (Kopf Instruments) végeztük, mely előtt az állatokat intraperitoneális injekcióval adott 50 mg/kg ketamin (Medicus Partner), 20 mg/kg xylazin (Medicus Partner) és 0,2 ml/kg pipolphen

(Egis) keverékével elaltattuk. A beavatkozások koordinátáit minden esetben a bregmától számított antero-poszterior (AP), medio-laterális (ML), valamint a koponyafelszíntől számított dorzo-ventrális (DV) távolság szerint adtuk meg, Paxinos és Watson patkányagy atlasza alapján választottuk (222).

4.4.2. Kettős retrográd pályajelölők beadása

Az mPFC hipotalamuszba vetítő sejtjeinek feltérképezésére Cholera toxin β (CTB; List Biologicals) és FluorGold (FG; Fluorochrome) retrográd irányban terjedő pályajelölő anyagokat adtunk be az MBH-ba (CTB) és az LH-ba (FG). A fejbőr középvonalban történő felnyitása után a koponya átfúrásával tettük hozzáférhetővé a célterület fölötti agyfelszínt. Mind a retrográd nyomjelölőket, mind a virális vektorokat üvegkapillárison keresztül adagoltuk a célterületekre mikroinjektor segítségével (Micro Syringe Pump Controller Syste, World Precision Instruments). Az LH-ba 50 nl 1%-os FG oldatot (AP 2,3 mm; ML 2,1 mm; DV 8,5 mm), míg az MBH-ba 20 nl 2% CTB oldatot (AP 1,6 mm; ML 1,2 mm; DV 9,2 mm) adagoltunk be. Két héttel a nyomjelölők beadása után az állatokat mély altatásban transzkardiálisan paraformaldehiddel perfundáltuk későbbi szövettani vizsgálatokhoz. Az ebben a kísérletben szereplő állatokkal nem végeztünk viselkedési teszteket.

4.4.3. Vírus beadások

Kísérletünkben egy eYFP-vel kapcsolt ChR2-t tartalmazó adeno-asszociált víruskonstrukciót injektáltunk hígítatlan formában (AAV2.5-hSyn-hChR2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH; University of Pennsylvania, titer 10^{13}) az állatok mPFC-jébe, mely az idegsejtekben általánosan jelenlévő szinapszin fehérje promótere mögé épült be, így biztosítva a neuron-specifikus expressziót. A víruskontrollként használt állatok esetében csak riportergént tartalmazó „fluorofór" vektort (AAV5-hSyn-eYFP, titer $3x10^{12}$, University of North Carolina) injektáltunk ugyanezen területre. A műtétek során a vírust mikroinjektor segítségével, 30 µm átmérőjű üveg kapillárison keresztül, 50-50 nl térfogatban fecskendeztük be az IL és a PrL területére (AP: 2,8 mm; ML: 0,6 mm; DV: 4.4 és 5 mm) unilaterálisan. A vírus szétterjedésére és a dorzálisabb területek fertőzésének elkerülése végett, az injektálást követően 5-5 perc diffundálási időt hagytunk a kapilláris eltávolítása előtt. Azokat az állatokat, melyeknél a vírusfertőzés kiterjedése nem az mPFC területére korlátozódott kizártuk az analízisből.

4.4.4. Optikai szálak beültetése

Két héttel a vírusbeadás után az ipsilaterális LH-ba 8,5 mm hosszú, míg az MBH esetében 11 mm hosszú 250 µm átmérőjű optikai szálat (Thorlabs) ültettünk be. Az optikai szál beadási helyének koordinátái az LH esetében AP -2,3 mm; ML 2,0 mm, DV 7,4 mm; az MBH esetén AP -2,3 mm; ML 1,0 mm, DV 8,8 mm volt. Az optikai szálakat fogorvosi cementtel (Duracryl Plus SpofaDental), valamint három kisméretű csavarral rögzítettük a koponyához. Az optikai szál beültetését két hetes felépülési idő követte a magatartás vizsgálatok előtt. Az optikai szálak pontos helyét minden állat esetében a teszteket követő mikroszkópos szövettani vizsgálatokkal azonosítottuk, és azokat az állatokat, melyeknél az optikai szál nem az LH vagy az MBH területére esett, a későbbi elemzésekből kizártuk.

4.5. Szövettani eljárások

4.5.1. Perfúzió és agymetszés

A viselkedéstesztek után 90 perccel az állatokat mélyaltatásban (ketamin-xylazin-pipolphen 50-10-5 mg/kg, i.p.) 150ml jéghideg foszfátpufferelt fiziológiás sóoldattal (phosphate buffered saline, PBS), majd 300 ml jéghideg 4%-os, paraformaldehid-oldattal, a felszálló aortán keresztül transzkardiálisan perfundáltuk. Az állatok agyát eltávolítottuk a koponyából, majd 3 órás utófixálás után, egy napra 30%-os szacharóz-oldatba tettük krioprotekció céljából. Ezt követően fagyasztó szánkamikrotómmal 30 µm vastag koronális agymetszeteket készítettünk.

4.5.2. Az mPFC strukturális változásainak felmérése

Az mPFC strukturális változásainak felmérését a Paxinos és Watson-féle patkányagy atlasz alapján (222) a Bregmától számított AP+3,20 mm és +2,70 mm közötti síkokban végeztük állatonként két metszeten (a metszetek között távolság 180 µm volt). Ebben a régióban a kérgestest (corpus callosum) elülső része különösen jól látható anatómiai indikátor, amely lehetővé tette az agykéreg vastagságának megbízható felmérését, amelyet korábbi tanulmányokban használt módszer alapján végeztünk (212, 213, 223). Az mPFC-t tartalmazó metszeteket bilaterálisan sötét látóteres (dark field) mikroszkópia segítségével, 10x nagyítású objektívvel digitalizáltuk. Ezt követően ImageJ (NIH, USA) képelemző szoftver alkalmazásával kvantifikáltuk a kéreg mediális falvastagságát két merőleges vonal segítségével, melyeket az agy szélétől a kérgestest dorzális illetve ventrális széléhez húztunk megbízható anatómiai pontok alapján (**24/A és**

D ábra). Az mPFC vastagságát a vonalak hossza jellemezte. Annak érdekében, hogy felmérjük a kérgestest méretének változását, a meghúzott vonalak közötti távolságot is megmértük. Megvizsgáltuk, hogy a kapott változások hátterében nem az egész agyra kiterjedő térfogati változás áll-e, ezért megbecsültük a PAG méretét is, oly módon, hogy sötét látóteres felvételeken kijelöltük a teljes szürkeállományt állatonként három metszeten (a metszetek közötti távolság ez esetben is 180 µm volt). A térfogati változások becslése során a teljes PAG területéből (mm^2) kivontuk az akveduktusz területét.

4.5.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az immunhisztokémiai kísérletek során használt elsődleges és másodlagos ellenanyagokat az **2. és a 3. táblázat** mutatja be, a felhasznált egyéb reagensek és módszer pedig az **4. táblázatban** láthatóak.

2. táblázat Az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt elsődleges ellenanyagok és molekulák.

Elsődleges antitest/molekula	Gazdaszervezet	Gyártó	Cikkszám	Koncentráció
anti-**Neu**ronal **N**uclei fehérje	egér	Merck/Millipore	MAB377	1;5000
anti-**C**holera **T**oxin **β** alegység	kecske	List Biological Laboratories	#703	1;5000
anti-**F**luoro**G**old	nyúl	Fluorochrome		1;10000
anti-**G**reen **F**luorescent **P**rotein	csirke	Life Technologies	#A10262	1;2000
anti-c-Fos	nyúl	Santa Cruz Biotechnology	#sc-52	1;5000
anti-c-Fos	tengerimalac	Synaptic Systems	#226004	1;5000
anti-**V**ezikuláris **G**ABA **T**ranszporter	nyúl	Synaptic Systems	#131003	1;2000
anti-**V**ezikuláris **G**lutamát **T**ranszporter	tengerimalac	Synaptic Systems	#135304	1;1000
anti-**G**liális **F**ibrillárisSavas**P**rotein	egér	Sigma-Aldrich	G3893	1;2000
anti-**SMI-32**	egér	Merck/Millipore	NE10243	1;1000
biotin konjugált lektin	Lycopersicon esculentum	Sigma-Aldrich	L0651	1;4000
anti-GABA	nyúl	Sigma-Aldrich	A2052	1;500
anti-**Kálcium**/Kal**m**odulin dependens **p**rotein**k**ináz **II** α	egér	Pierce Biotechnology	MA1-048	1;500

Mindegyik eljárás esetén az első lépés a metszetek háromszor 10 perces, a felhasznált pufferben történő mosása volt, a primer és szekunder ellenanyagokkal illetve hidrogén-peroxiddal történő inkubációkat is háromszori mosás követte.

A tárgylemezre felhúzott metszeteket NiDAB-bal történő vizualizáció esetében felszálló alkoholsorban és xilolban 3-3 percet inkubáltuk, majd DPX (Sigma, USA) oldattal lefedtük. A kiemelt régiókról egy CCD kamera rendszerrel felszerelt Olypmus DP70 fénymikroszkóppal digitalizáltuk a felvételeket 60-250x-es nagyításon.

A fluoreszcens jelölések esetén a metszeteket Mowiol 4-88 (Sigma, USA) oldattal fedtük le és Nikon Ni-C2 típusú lézer-pásztázó mikroszkóp (Nikon Europe, Amsterdam,

Hollandia) segítségével digitalizáltuk. A képalkotás során a fluorfórokat 488 nm-es, 561 nm-es, és 642 nm hullámhosszú lézerekkel gerjesztettünk (CVI Melles Griot).

4.5.3.1. A CTB, FG és NeuN immunhisztokémia és analízise

A retrográd kettős pályajelölést alkalmazó kísérletek szövettani vizsgálatai során elsőként egyszeres jelöléseket végeztünk a beadási gócok kiterjedésének meghatározására. Az anti-FG és anti-CTB immunhisztokémiai jelöléseket külön metszetsorozatokon hajtottuk végre a hipotalamusz szintjén (a metszetek közötti távolság 90 μm volt). Az immunhisztokémiai jelöléshez használt protokoll egy korábbi retrográd pályajelölést alkalmazó közleményünkön alapult (89). Az immunkötést megelőzően 0,3% Triton-X-100-t és 0,3% hidrogén-peroxidot tartalmazó PBS-alapú oldattal növeltük a biológiai membránok áteresztő-képességét, valamint kimerítettük az endogén peroxidázokat. Az aspecifikus endogén kötőhelyeket PBS-ben oldott, 5 %-os szamár szérummal blokkoltuk. Majd a metszeteket 72 órán át, 4ºC-on inkubáltuk nyúl anti-FG vagy kecske anti-CTB ellenanyagokkal, 2 %-os normál szamár szérumban oldva PBS-ben. Az elsődleges ellenanyag kimosása után egy órát biotinilált másodlagos ellenanyaggal, majd ABC-vel (avidin-biotin komplex, Vector Laboratories, 1:1000) tettük specifikussá az immunreakciót. Az előhívás 0,003% hidrogén-peroxidot, 0,2 mg/ml diaminobenzidin-tetrahidrokloridot és 0,1% nikkel-ammónium-szulfátot tartalmazó TRIS (trisz(hidroximetil)-aminometán) pufferben történt.

A CTB/FG/NeuN hármas immunjelöléshez a prefrontális kérgi metszeteket az elsődleges ellenanyagok kimosása után az FG jel felerősítése érdekében a metszeteket biotinilált anti-nyúl másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk 1 órán át. Ezt követően a metszeteket Alexa Fluor 647-konjugált anti-egér IgG (szamár), Alexa 597-konjugált anti-kecske IgG (szamár) és Alexa 488-konjugált streptavidin ellenanyagokkal inkubáltuk. Állatonként három agymetszetről készítettünk teljes mPFC-t magába foglaló kompozitfelvételeket a bregmához képest AP +3,7, +3,2 és +2,7 mm síkokból. Az FG és CTB jel ko-expressziójának meghatározásához az egyszeres és kétszeres immunjelölt sejteket manuálisan számoltuk meg a NIS Elements szoftvert használva. A NeuN immunjelölt sejtek meghatározását ImageJ (NIH, USA) képelemző szoftverrel végeztük.

3. táblázat. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt másodlagos ellenanyagok összefoglalása.

Másodlagos antitest	Gazdaszervezet	Gyártó	Cikkszám	Koncentráció
Alexa Fluor 488 konjugált streptavidin		Life Technoloiges	S11223	1;500
anti-csirke Alexa Fluor 488 konjugált IgG	kecske	Life Technologies	A10262	1;1000
anti-tengerimalac Alexa Fluor 488 konjugált IgG	kecske	Life Technologies	A11073	1;200
anti-kecske Alexa Fluor 594 konjugált IgG	szamár	Life Technoloiges	A32754	1;200
anti-egér Alexa Fluor 594 konjugált IgG	kecske	Life Technologies	A11005	1;1000
anti-nyúl Alexa Fluor 594 konjugált IgG	kecske	Life Technologies	A11012	1;500
anti-tengerimalac Cy3 konjugált IgG	kecske	Jackson ImmunoResearch Laboratories	106-165-003	1;200
anti-egér Alexa Fluor 647 konjugált IgG	szamár	Jackson ImmunoResearch Laboratories	715-605-150	1;200
anti-nyúl Alexa Fluor 647 konjugált IgG	kecske	Jackson ImmunoResearch Laboratories	111-605-003	1;200
anti-egér Alexa Fluor 647 konjugált IgG	kecske	Life Technologies	A32728	1;200
anti-kecske biotin konjugált IgG	szamár	Jackson ImmunoResearch	705-065-147	1;1000
anti-nyúl biotin konjugált IgG	szamár	Jackson ImmunoResearch	711-065-152	1;500 - 1;1000
anti-egér biotin konjugált IgG	szamár	Jackson ImmunoResearch	715-065-151	1;500

4.5.3.3. vGLUT1 és vGAT immuncitokémia és analízise

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk a vírus kifejeződéséről az mPFC szintjén, az eYFP jel felerősítésére GFP immunjelölést alkalmaztunk az mPFC teljes antero-poszterior kiterjedésében (a metszetek közötti távolság 90 µm volt). Az mPFC-ből az MBH-ba és az LH-ba vetítő ChR2-eYFP pozitív sejtek fenotípusának azonosításához kortikális dominanciát mutató vezikuláris glutamát transzporter-1 (vGLUT1) és általános GABA-erg markerként használt vezikuláris GABA transzporter (vGAT) kettős jelölést alkalmaztunk (224, 225).A vizsgálat során nyúl poliklonális anti-vGAT, illetve tengerimalacból nyert poliklonális anti-vGLUT1 antitestet és az eYFP pozitív axonok fluoreszcenciájának felerősítéséhez csirke anti-GFP antitestet használtunk. Ezután a metszeteket Alexa Fluor 647-konjugált anti-nyúl IgG másodlagos ellenanyaggal (kecske), cyanine 3 (Cy3) konjugált anti-tengerimalac IgG-vel (kecske) és Alexa Fluor

488-konjugált anti-csirke IgG-vel (kecske) inkubáltuk 1% normál kecske szérumot tartalmazó PB oldatban (0,1 M).

4. táblázat. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt egyéb reagensek összefoglalása.

Vizsgálat	Puffer	Feltárás	Blokkolás	Primer
CTB, FG és NeuN	PBS	0,3% Triton-X-100 és 0,3% hidrogén-peroxid	5 %-os normál szamár szérum	2 %-os normál szamár szérum, 72 órán át, 4ºC
vGlut és vGAT	0,1 M-os foszfát puffer	–	10%-os normál kecske szérum	0,1 % Triton-X-100 és 2% normál kecske szérum, 72 órán át
c-Fos (fluoreszcens)	PBS	0,3%-os Triton-X-100	2 %-os normál szamár szérum	2 %-os normál szamár szérum, 48 órán át, 4ºC
NeuN	PBS	0,3% Triton-X-100 és 0,5% hidrogén-peroxid	5%-os ló szérum	2,5%-os ló vagy kecske szérum, 24-74 órán át, 4°C
GFAP	PBS	0,3% Triton-X-100 és 0,5% hidrogén-peroxid	5%-os ló szérum	2,5%-os ló vagy kecske szérum, 24-74 órán át, 4°C
SMI-32	PBS	folyékony nitrogénes feltárás, 0,5% hidrogén-peroxid	5%-os ló szérum	2,5%-os ló vagy kecske szérum, 24-74 órán át, 4°C
lektin	TBS	0,3% Triton-X-100 és 0,5% hidrogén-peroxid	5 %-os normál szamár szérum	72 órán át, 4°C
c-Fos (NiDAB alapú)	PBS	0,3% Triton-X-100 és 0,5% hidrogén-peroxid	5%-os ló szérum	2,5%-os ló vagy kecske szérum, 24-74 órán át, 4°C
c-Fos, GABA és CaMKIIα	TBS	–	–	0,1 % Triton-X-100-t és 2% normál kecske szérum, 48 órán át, 4°C

Az MBH és az LH területén a 30 µm-es metszetek felső 10 µm-ében z-síkban haladva fél µm-enként végeztük el az optikai szeletelést. A szkennelést 60x (NA=1,4) objektívvel végeztük. Az elkészült képeket NIS Elements C program (Nikon) segítségével vizsgáltuk. A bregmától számított AP -1,80, -1,88 és -2,12 mm-es metszési síkokban egy-egy 250 x 250 µm-es kereten belül, a z-síkban haladva számoltuk meg az eYFP/vGLUT1, illetve az eYFP/vGAT koexpressziót mutató szinapszisokat az MBH és az LH területén.

4.5.3.4. Fluoreszcens c-Fos immunhisztokémia és analízise

A kiváltott neuronális aktivációt c-Fos korai átíródású gén fehérjetermékének kvantifikálásával mértük, amelyet nyúl poliklonális anti-c-Fos ellenanyaggal valamint Alexa Fluor 594-konjugáltanti-nyúl fluoreszcens másodlagos ellenanyaggal mutattunk ki.

Az immunhisztokémiai jelölés analízise során a PFC-ben 50 x 750 µm-es keretben automatizált módon, ImageJ (NIH, USA) képelemző szoftverrel határoztuk meg a c-Fos immunreaktivitást mutató sejtek számát.

4.5.3.5. NeuN, SMI-32, GFAP és lektinimmunhisztokémiai jelölések és kvantitatív analízisük

Az alábbi immunhisztokémia kísérletek során egyszeres jelöléseket hajtottunk végre a bregmától számított AP +3,20 és +2,70 mm-es síkokban végeztük állatonként két metszeten. A neuronszám meghatározásához NeuN (idegsejt marker), a dendritikus denzitáshoz SMI-32 (a neurofilament H nem foszforilált epitópjához kötődő jelölőanyag), az asztrocita denzitáshoz GFAP (gliális fibrilláris savas fehérje) és a mikrovaszkulatúra jelöléséhez lektin (endotél sejtek glikoproteinjeinek markere) immunjelölést alkalmaztunk (161, 226-228). Az egér anti-NeuN, egér anti-SMI-32 vagy egér anti-GFAP primerellenanyagokat biotinilált másodlagos ellenanyaggal jelöltük, majd avidin-biotin komplexszel(ABC, Vector Laboratories, 1:1000) inkubáltuk. Az előhívást a korábbiakban leírt módon végeztük. A GFAP-t Alexa Fluor 594-konjugált anti-egér IgG (kecske) másodlagos ellenanyaggal vizualizáltuk. A lektin jelölés során a metszeteket biotin konjugáltlektinnel inkubáltuk, amelyet streptavidinnel konjugáltatott Alexa-Flour 488 fluorofórral vizualizáltuk.

A NeuN-pozitív sejtek számának, valamint a GFAP, az SMI-32 és a lektin jelölődés intenzitásának meghatározását automatizált módon ImageJ (NIH, USA) képelemző szoftver alkalmazásával végeztük az mPFC azon részén ahol a kortikális vastagságot mértük fel.

4.5.3.6. Ni-DAB alapú c-Fos immunhisztokémiai jelölés és kvantitatív analízise

A c-Fos immunjelölés detektálására használt eljárás mindenben megegyezik az előző protokollban leírt NeuN jelölésnél használt protokollal, amely részletesen leírásra került korábbi közleményekben (16, 121, 203, 229).

A c-Fos pozitív sejtek kvantifikálása egy 11 x 13 cellát (egy cella 0,01 mm széles és vastag volt) tartalmazó rácsháló segítségével történt (**25/A**). A rácshálót arányosítottuk az adott agymetszetekre olyan főbb anatómiai képletek figyelembe vételével, mint a mediális longitudinális fisszura és a kérgestest anterior része. Az aktiválódott sejteket minden cellában megszámoltuk. Az egyes cellákat egyedi azonosítóval láttuk el, a sorokat jelölő számok és az oszlopot jelölő betűk alapján. A NeuN immunfestés esetében is

hasonló analízist folytattunk annak érdekében, hogy feltárjuk, a c-Fos aktiváció hátterében az idegsejtek számának változása állhat-e.

4.5.3.7. c-Fos/GABA/CaMKIIα hármas immunjelölés és analízise

A vizsgálat arra irányult, hogy meghatározzuk az mPFC-ben a c-Fos-t kifejező sejtek neurokémiai fenotípusát, amelyhez a c-Fos mellett kalcium-kalmodulin-dependens protein kináz II α (CaMKIIα) és GABA hármas immunjelölést végeztünk állatonként négy agymetszeten. A CaMKIIα kortikális piramissejt (230), míg a GABA GABA-erg interneuron marker (231, 232). A metszeteket tengerimalac anti-c-Fos, egér anti-CaMKIIα és nyúl anti-GABA elsődleges ellenanyagokat tartalmazó oldatban inkubáltuk, valamint Alexa Fluor 594-konjugált anti-nyúl IgG-t, Alexa Fluor 647-konjugált anti-egér IgG-t és Alexa Fluor 488-konjugált anti-tengerimalac IgG-t másodlagos ellenanyagokat használtunk. A metszeteket a fentiekben leírt módon készítettük elő a képalkotáshoz, amelyet a bregmától számított AP +3,20 mm és +2,70 mm-es síkokban végeztük. A teljes mPFC-t magába foglaló kompozit képeken a c-Fos/CaMKIIα és c-Fos/GABA kettő immunreaktivitást mutató sejteket manuálisan számoltuk meg a NIS Elements szoftvert használva.

4.6. *In vitro* elektrofiziológia

Dekapitálás után az agyat 1-2 percen belül eltávolítottuk a koponyából és jéghideg nátrium tiszta oldatba merítettük (amely 205,0 mM szacharózt; 2,5 mM KCl-t, 26 mM $NaHCO_3$-t, 1 mM $CaCl_2$-t, 5 mM $MgCl_2$-t, 1,25 mM NaH_2PO_4-t és 10 mM glukózt tartalamzott), amelyet 95%-os O_2 és 5%-os CO_2 keverékével buborékoltattunk. Ezt követően egy VT-1000S vibratóm segítségével az MBH-t tartalmazó 250 µm vastag akut agyszeleteket vágtunk nátrium tiszta oldatban. Egyensúlyba hozás céljából az agyszeleteket egy órára O_2/CO_2-vel telített mesterséges cerebrospinális folyadékba helyeztük át (aCSF), amely 130 mM NaCl-t, 3,5mM KCl-t, 26 mM $NaHCO_3$-t, 2,5 $CaCl_2$-t, 1,2mM $MgSO_4$-t, 1,25mM NaH_2PO_4-t és 10mM glükózt tartalmazott. Az aCSF kezdeti hőmérséklete 33°C volt, amely szobahőmérsékletűre hűlt le az egyensúlyba hozás alatt. Az elektrofiziológiai elvezetéseket 33°C-on végeztük és az aCSF-ben lévő agyszeletek oxigén ellátottságát O_2/CO_2 gázkeverék buborékoltatatásával biztosítottuk. Az elvezetéshez Axopatch 200B patch-clamp erősítőt, Digidata-1322A adatrögzítő rendszert és 10.4 verziójú pCLAMP szoftvert használtunk. A neuronok kiválasztása egy BX51WI IR-DIC mikroszkóp (Olympus) segítségével történt, amely egy S'Table rázkódásmentes

asztalra (Supertech) volt helyezve. A patch elektródák (külső átmérő: 1,5 mm, vékonyfalú, Hilgenberg) egy Flamin-Brown P-97 húzó készülékkel (Sutter Instrument) készültek és a polírozáshoz MF-830 Microforge (Narishige) készüléket használtunk. Az MBH-t mikroszkóp segítségével határoltuk be. A 473 nm emissziós tarományú IKE-473-100-OP lézer üvegkapilláris kimenete az agyszelet felszínéhez volt illesztve (Ikecool) az MBH szintjében. A kiválaszott neuront patch-clampeltük az üveg kapilláris közelében (200-300 µm). A posztszinaptikus áramok (PSC) teljes sejt patch-clamp konfigurációban történtek. A neuronok feszültség zárban voltak a pipettával -70 mV tartott potenciálon. A pipetta ellenállása 1-2 MΩ, míg a gigaseal 2-3 GΩ volt. A pipettában 130 mM K-glukonát, 10 mM NaCl-t, 10 mM KCl-t, 0,1 mM $MgCl_2$-t, 10 mM HEPES-t, 1 mM EGTA-t, 4 mM Mg-ATP-t, 0,3 mM Na-GTP-t (pH 7,3) tartalmazó oldat volt. Az oldat ozmolaritása szorbitol segítsévéel 295-300 mOsm közé volt állítva. A lézerimpulzus időtartama 10 ms, frekvenciája 0,2 Hz volt, 2,5 mW intenzitással. Az analízis során 60 impulzus alatti mérést átlagoltunk. Az elvezetéseket a 10.4 verziójú pCLAMP szoftvert Clampfit modulja révén tároltuk és dolgoztuk fel (Molecular Devices).

4.7. Statisztikai analízis

A feltüntetett adatok átlag±standard hiba (SE) formátumban adtuk meg. A statisztikai analízist STATISTICA program (Statistica Inc., Tulsa, USA) segítségével végeztük. A fotostimulációt alkalmazó teszteknél és retrográd pályajelöléses vizsgálatnál egy, illetve két faktoros variancia analízist (ANOVA) alkalmaztunk a kezelési hatások vizsgálatára, amelyet Duncan-féle post-hoc páros összehasonlítás követett amennyiben az ANOVA statisztikailag szignifikáns kezelési hatást mutatott ki. A szociális izolációt alkalmazó kísérletek viselkedési tesztjeiből származó adatok vizsgálatára Kruskal-Wallis nem-paraméteres tesztet alkalmaztunk, mivel a viselkedési változók nem teljesítették az ANOVA normális eloszlásra vonatkozó kritériumát. A strukturális és funkcionális szövettani adatok esetében ismételt méréses ANOVA modellt alkalmaztunk, amelyet Tukey-féle post-hoc összehasonlítás követett (Holm-Bonferroni korrekcióval). Az adatokat négyzetgyök transzformációnak vetettük alá, ha nem feleltek meg az ANOVA előkövetelményeknek. Szignifikáns hatásnak a $p<0,05$ értékeket tekintettük.

5. Eredmények

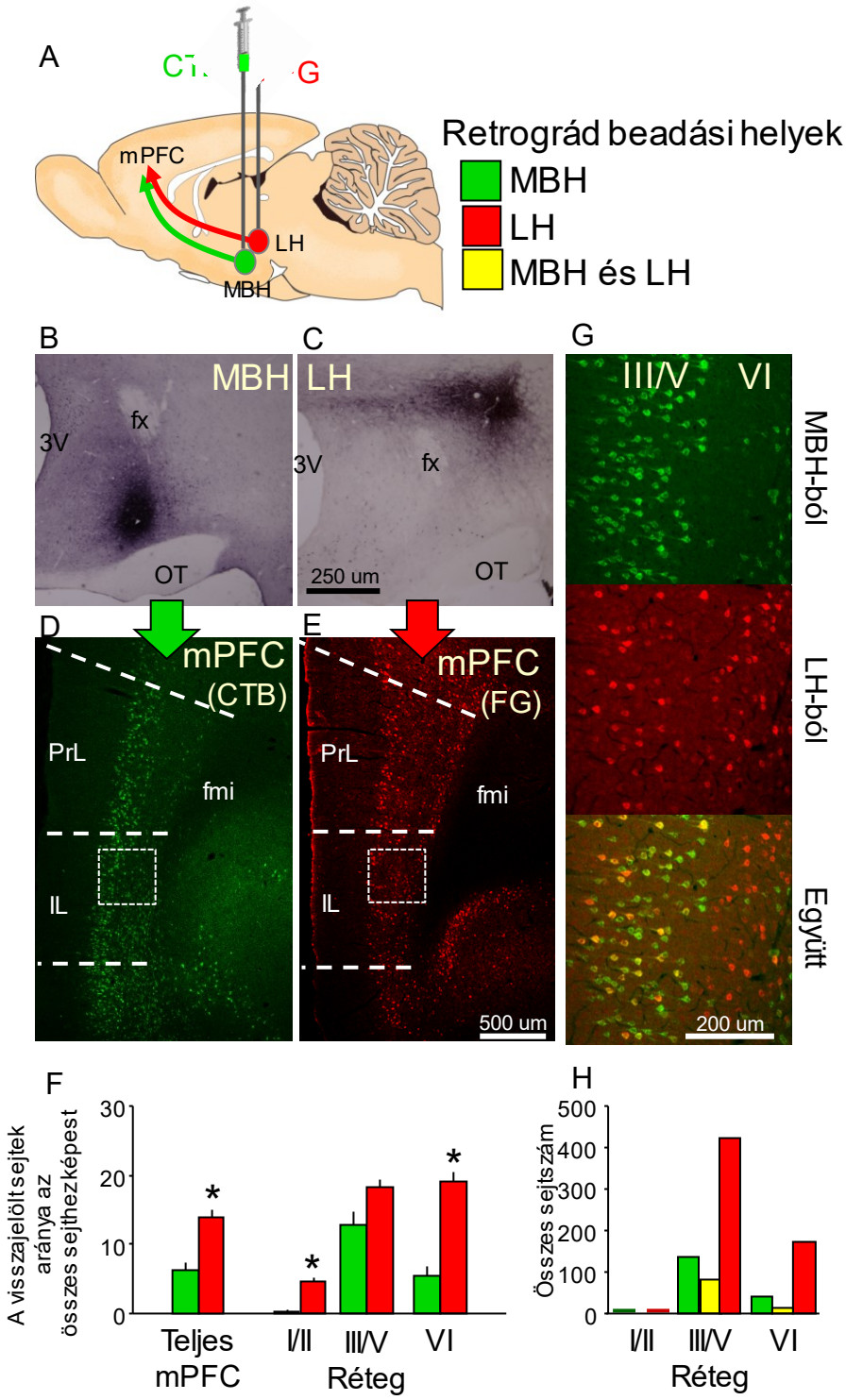
5.1. A prefrontális kéreg és a hipotalamikus támadási központok közötti projekció anatómiai és viselkedési karakterizálása

5.1.1. Az MBH-t és az LH-t beidegző mPFC idegsejtek réteg-specifikus eloszlása

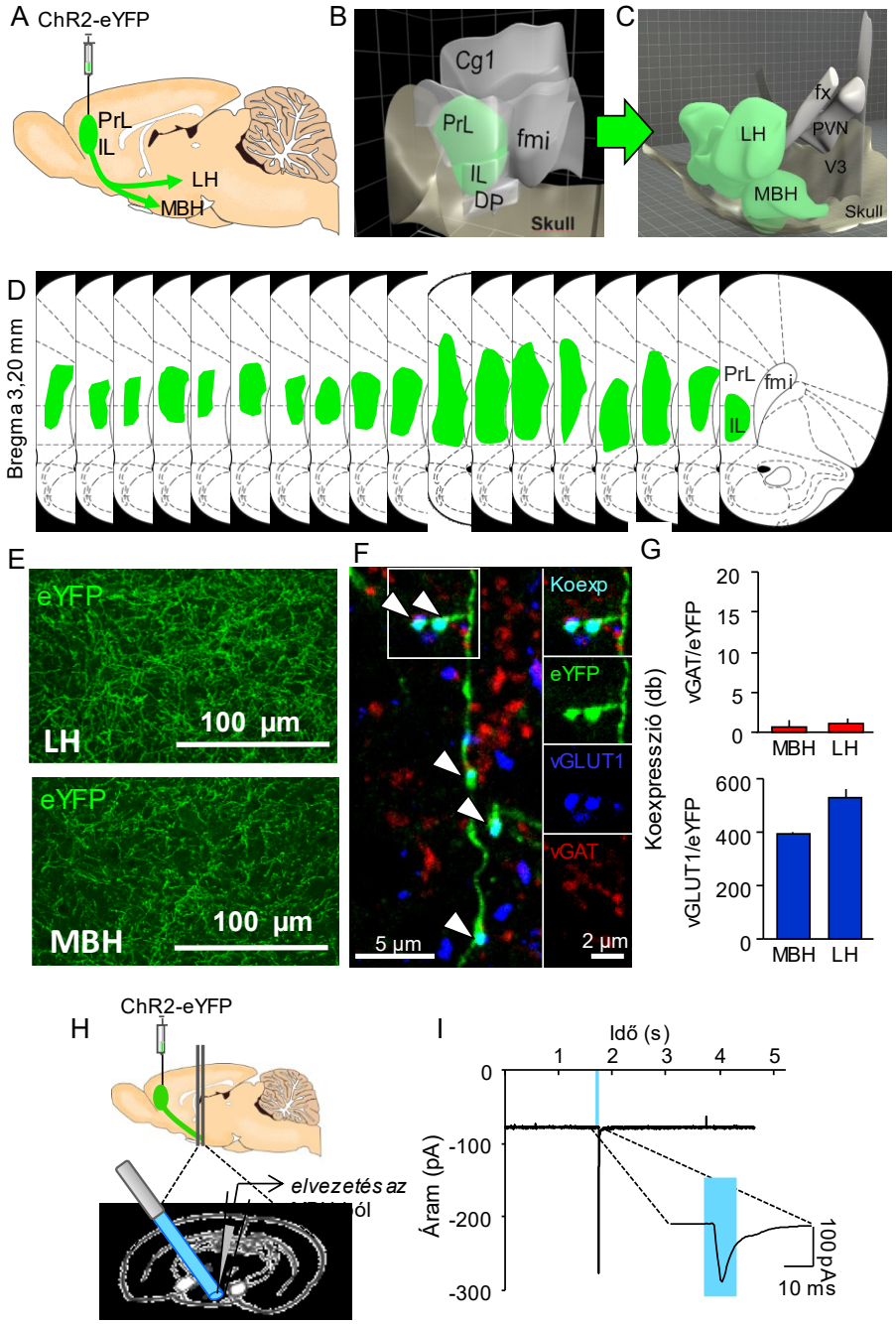
Eredményeink alapján az mPFC sejtjei jelentős bemenetet adnak a hipotalamikus támadási központokhoz (**13/D-F ábrák**). Az MBH-ba és az LH-ba vetítő sejtek eltérő eloszlást mutattak a prefrontális kéreg külön böző rétegeiben ($F_{\text{beadási terület x réteg}}(2,18)=4,13$, $p=0,03$; **13/F ábra**). A kettős CTB/FG retrográd pályajelölés alapján három különböző típusú vetítő sejtpopulációt találtunk az mPFC-ben (**13/G és H ábra**): három patkányból összesen 864 visszajelölt sejtet számoltunk meg, amelyből 598 darab sejt vetített az LH-ba, 168 darab sejt vetített az MBH-ba és 98 darab sejt vetített mindkét hipotalamikus központba. Az MBH-ba vetítő sejtek főként a III./V. rétegben, míg az LH-ba vetítő sejtek a III./V. mellett a VI. rétegben is sűrűn helyezkedtek el (**13/F ábra**).

5.1.2. Az mPFC projekciók neurokémiai karakterizálása az MBH és LH szintjén

A vírus vektorok segítségével sikeresen megfertőztük a prefrontális kéreg IL és PrL alterületeinek neuronjait (**14/A-D ábrák**). Mind az MBH, mind az LH területén nagy denzitásban találtunk az mPFC-ből érkező axonokat (**14/E ábra**). Eredményeink szerint az MBH-ba és az LH-ba vetítő mPFC sejtek kizárólagosan glutamátergek: a vizsgált kereteken belül az MBH-ban átlagosan 372 ± 11; míg az LH-ban 506 ± 31 vGLUT1-eYFP ko-expressziót számoltunk. A vGAT-eYFP ko-expresszió száma elenyésző volt, az MBH esetén átlagosan 1 ± 0,7; az LH esetén 1 ± 0,6 GABA-erg szinapszist számoltunk (**14/E-G ábra**).



13. ábra. Az MBH-ból és az LH-ból visszajelölt sejtek a prefrontális kérgi neuronjainak jelentős és többnyire nem átfedő részét alkotják. A, Kísérleti elrendezés. **B, C,** Reprezentatív CTB és FG beadási helyek az LH és az MBH szintjén. **D, E,** Kis nagyítású reprezentatív felvételek az mPFC-ben lokalizálódó CTB és FG jelölt sejtekről, amelyek az LH-ba és az MBH-ba vetítenek. **F,** Vetítő sejtek megoszlása az IL és a PrL alrégiókban az összes sejtszám százalékában megadva. Az összes neuronszám meghatározása NeuN jelöléssel történt (nincs bemutatva az ábrán). **G,** Nagy nagyítású reprezentatív felvételek, amelyek az MBH-ból, az LH-ból és a két területről együttesen visszajelölt sejteket ábrázolják. **H,** A kísérlet során megszámolt összes visszajelölt sejt. 3V, harmadik agykamra, fmi, forceps minor, fx, fornix, OT, optikus traktus, * szignifikáns különbség az MBH-ból és az LH-ból visszajelölt sejtekben $p<0,01$.



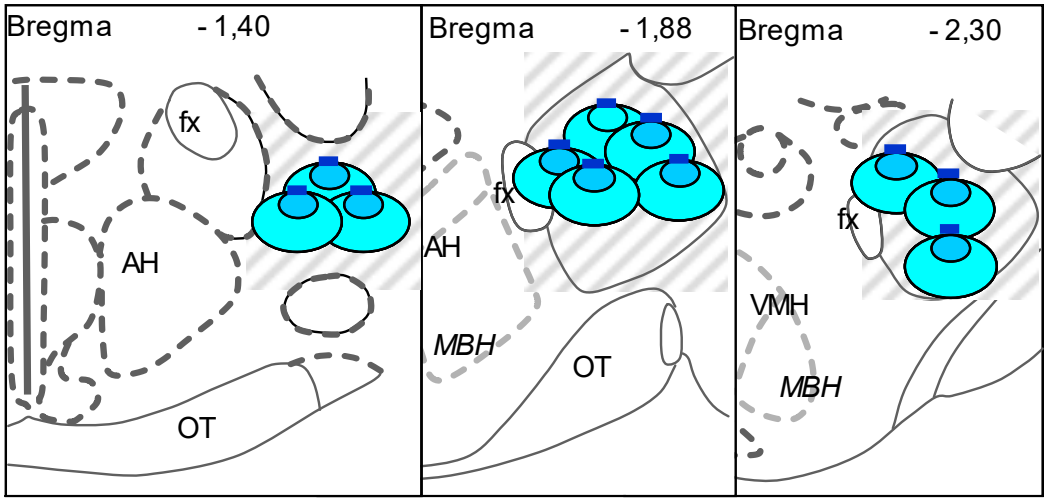
14. ábra. Az mPFC robosztus serkentő beidegzést ad a hipotalamikus támadási területekre. A, Kísérleti elrendezés. **B,** Reprezentatív háromdimenziós rekonstrukció az eYFP riporter fehérje kifejeződéséről az mPFC-ben. **C,** Az MBH és az LH reprezentatív háromdimenziós rekonstrukciója anatómia határokkal. **D,** A rezidens betolakodó tesztekben használt állatok vírusfertőzésének kiterjedése az mPFC-ben. A sematikus ábra a bregmától számított AP +3,20-as síkot ábrázolja, ahol a legerősebb volt a vírus kifejeződése. **E,** Reprezentatív konfokális felvételek az LH-ban és az MBH-ban, amelyek bemutatják a prefrontális projekciók sűrűségét. **F,** Konfokális felvételek, amelyek bemutatják az eYFP, vGAT (GABA-erg szinaptikus marker) és vGLUT1 (glutamáterg szinaptikus marker) hármas jelölést a hipotalamusz szintjén. **G,** Átlagos vGAT/eYFP és vGLUT1/eYFP koexpresszió az MBH-ban és az LH-ban. **H,** Az *in vitro* elektrofiziológiai kísérletek sematikus bemutatása. **I,** A prefrontális projekciók fotostimulációjával kiváltott átlagos posztszinaptikus áramok a hipotalamikus sejtekből. Nagyítás: az **I** ábrába, amely bemutatja a lézer bekapcsolása és a kiváltott posztszinaptikus áram időbeli viszonyát. Cg1: anterior cinguláris kéreg, DP: dorzális pedunkuláris kéreg, fmi: forceps minor, fx: fornix, PVN: paraventrikuláris hipotalamikus mag, V3: harmadik agykamra.

5.1.3. Az mPFC bemenetek fotostimulálásának hatása az MBH neuronjainak posztszinaptikus aktivitására

In vitro elektrofiziológiai kísérleteink alapján az mPFC axonjainak fotostimulálása megbízhatóan váltott ki posztszinaptikus válaszokat akut hipotalamikus szeletekben az MBH-ban (**14/H és I ábrák**). A megfelelő hipotalamikus vírusexpressziót megkövetelő 4-5 hetes inkubáció, valamint az LH MBH-hoz képest mutatott fokozott érzékenysége a sejtek elhalására az akut, szeletekben nem tette lehetővé a kísérlet kivitelezését az LH területén. Ennek ellenére feltételezhető a rostok denzitása, valamint vGLUT1 pozitív mivolta alapján, hogy az mPFC bemenet fotostimulációja az MBH-nál tapasztaltakhoz hasonló módon aktiválja az LH sejtjeit is.

5.1.4. Az mPFC-LH projekció fotostimulálásának hatása az agresszív viselkedésre és más szociális viselkedésformákra

Annak érdekében, hogy az mPFC-LH útvonal agresszív viselkedésben betöltött szerepét feltárjuk, adeno-asszociált vírus vektorok segítségével kifejeztük a ChR2-t az mPFC-ben (**14/A-D és 16/A ábrák**) és optikai szálat ültettünk be az LH fölé (**15. ábra**), ezzel lehetővé téve az axonális fotostimulációt.



15. Az optikai szálak végződésének elhelyezkedése, valamint a feltételezett fénykúp megjelenítése az LH-ban. A vastag kék vonalak az optikai szálak végét jelölik, míg a kék területek a fény áteresztését szemléltetik (sötét kék: 10 %-a, világos kék 1 %-a a kimeneti intenzitásnak) Yizhar és mtsai 2011 nyomán (104).

Az LH-ba érkező prefrontális kérgi bemenetek fotostimulálása nem befolyásolta sem a harapások számát ($F_{fotostimuláció}(1,35)<0,01$, $p=0,92$; $F_{teszt}(1,35)<0,01$, $p=0,95$) sem latenciáját ($F_{fotostimuláció}(1,35)<0,01$, $p=0,99$; $F_{teszt}(1,35)=0,04$, $p=0,83$) (**16/B és C ábra**). Ezzel ellentétben a fotostimuláció szignifikánsan növelte mind az abnormális

($F_{fotostimuláció}(1,35)<19,24$, $p<0,01$; $F_{teszt}(1,35)=0,07$, $p=0,78$), mind a *fokozottan* abnormális harapások arányát $F_{fotostimuláció}(1,35)=4,37$, $p=0,04$; $F_{teszt}(1,35)<0,01$, $p=0,98$) (**16/C és D ábrák**). Hasonló hatásokat az MBH fotostimulációja során nem tapasztaltunk (**18/C és D ábrák**).

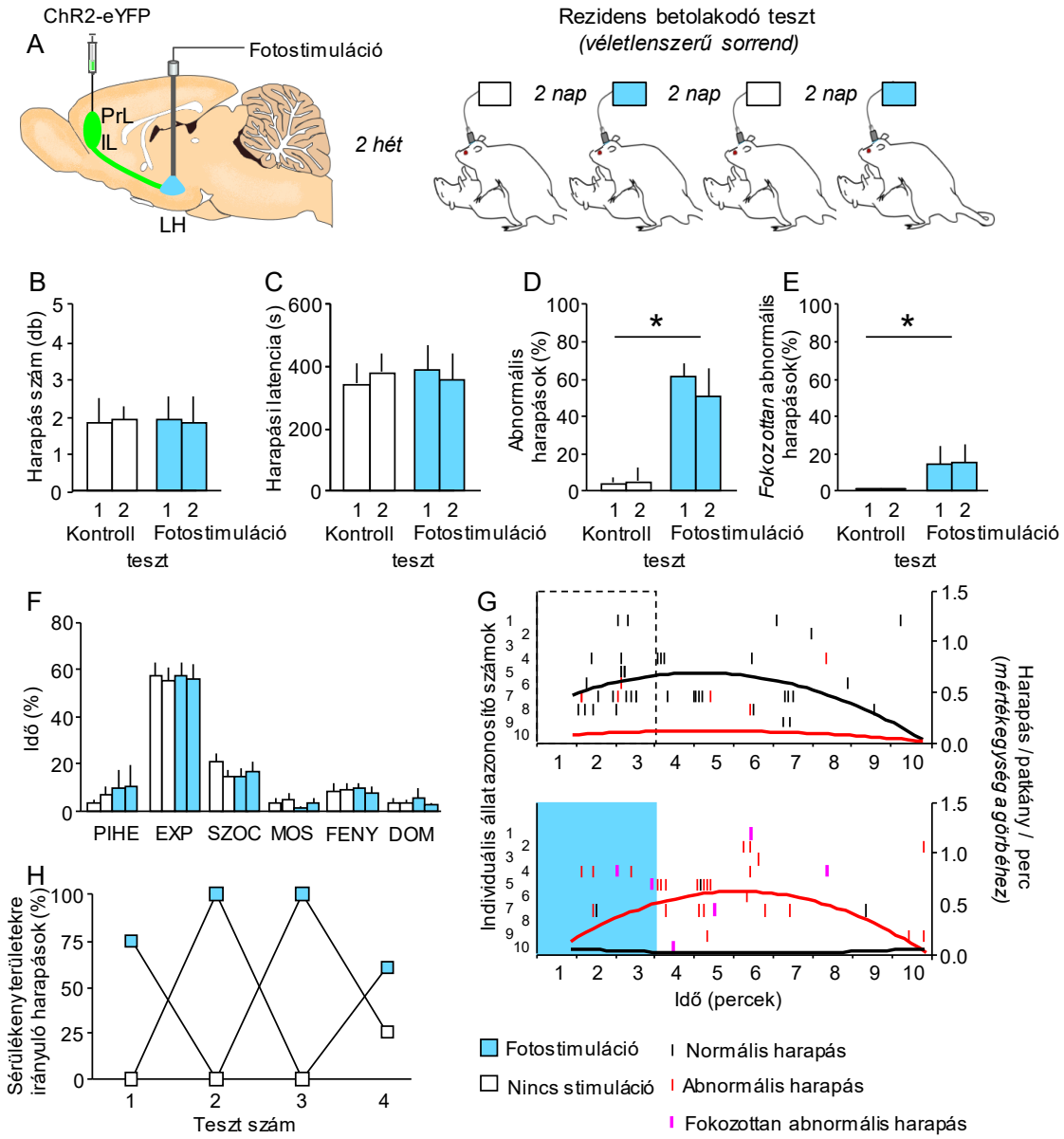
A fotostimuláció más viselkedésformákra nem gyakorolt hatást az RB tesztben, ami a fotostimuláció viselkedés-specifikus hatását támasztja alá (**16/F ábra**). Az **5. Táblázat** tartalmazza a vizsgált viselkedési paraméterekhez tartozó statisztikai elemzés részleteit. Annak érdekében, hogy a harapások időbeli eloszlását megjelenítsük, az egyes patkányok által végrehajtott harapásokat az egyes teszt blokkokra perces bontásban ábrázoltuk (**16/G ábra**). A harapások időbeli eloszlása fordított U-alakú görbe alakjához hasonlított mind a fotostimulációval társított, mind a kontroll tesztek alatt, mutatva, hogy mennyiségi eltérés az LH stimulációjakor nem mutatkozott. Ezzel szemben a természetesnek tekintett, szociális kontextusnak megfelelő harapásokat felváltották a megnövekedett számú abnormális harapások, amelyek az egész tesztidőtartam alatt megfigyelhetőek voltak. Megjegyzendő, hogy a fotostimuláció elhúzódó, az egész tesztre kiterjedő hatása volt megfigyelhető (**16/H ábra**). Ugyanakkor a fotostimuláció elhúzódó, következő tesztre kiterjedő hatása nem volt megfigyelhető.

5. táblázat. Az mPFC-LH projekció fotostimulációjához tartozó viselkedési paraméterek statisztikai összefoglalója.

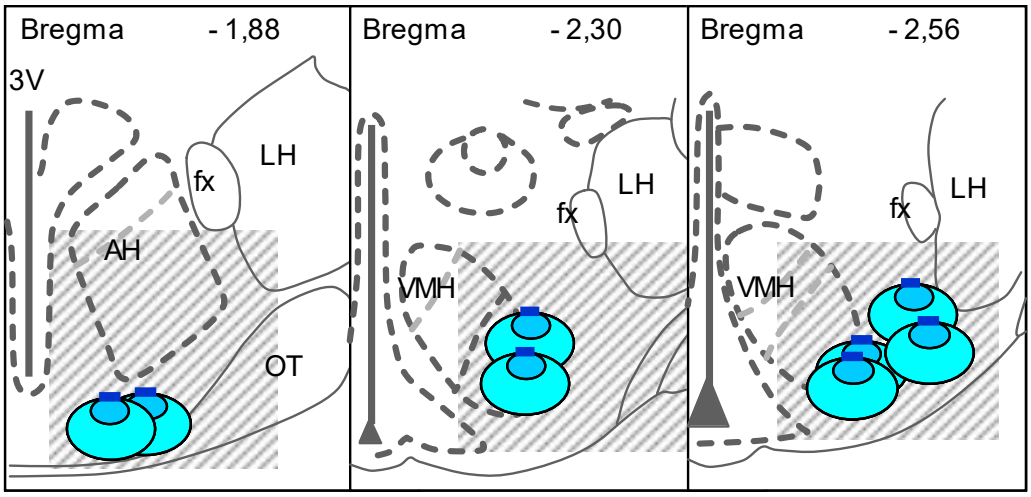
ANOVA	$F_{fotostimuláció}$	p=	F_{teszt}	p=	$F_{interakció}$	p=
Pihenés	0,01	0,99	0,04	0,84	0,02	0,88
Exploráció	0,07	0,79	0,06	0,81	0,00	0,99
Szociális interakció	1,35	0,25	0,00	0,97	0,44	0,51
Mosakodás	0,24	0,63	0,06	0,80	1,08	0,31
Fenyegetés	0,77	0,39	0,06	0,80	0,03	0,85
Domináns pozitúra	0,18	0,68	0,47	0,50	0,04	0,85

5.1.5. Az mPFC-MBH projekció fotostimulálásának hatása az agresszív viselkedésre és a nem agresszív szociális viselkedésformákra

Annak érdekében, hogy az mPFC-MBH projekció agresszív viselkedésben betöltött szerepét feltárjuk, adeno-asszociált vírus vektor segítségével ChR2-t fejeztünk ki az mPFC-ben (**14/A-D ábrák és 18/A ábra**) és optikai szálat ültettünk be az MBH fölé (**17. ábra**), ezzel lehetővé téve az axonális fotostimulációt.



16. ábra. Az mPFC-LH projekció fotostimulálása szelektíven növelte az abnormális harapások arányát. A, A kísérlet sematikus bemutatása. **B-E,** Támadásokat jellemző viselkedési változók bemutatása. Abnormális harapás: a harapást nem előzte meg fenyegetés vagy sérülékeny testrészekre irányult (fej, torok, has). *Fokozottan* abnormális harapás: a harapást nem előzte meg fenyegetés és sérülékeny testrészre is irányult (fej, torok, has). **F,** Az RB tesztek során megfigyelt viselkedésformák időszázaléka. Minden egyes oszlop külön tesztnek felel meg. DOM domináns pozitúra, EXP exploráció, FENY fenyegető viselkedés, PIHE pihenés, SZOC szociális interakció, MOS mosakodás **G,** A harapások időbeli eloszlása. A fotostimulálást a kék szín jelöli. Az y tengely mentén az egyedek azonosítószáma látható, így minden sorban látható vertikális vonal egyetlen patkány által végrehajtott individuális harapást jelöl. A görbék a teljes kumulált harapás gyakoriságot jelölik az adott percre a populációban. **H,** Két reprezentatív patkány sérülékeny területekre irányuló harapásainak a bemutatása. Az egyik patkánynál a fotostimulációt a 2. és 3. tesztnél, míg a másik patkánynál az 1. és a 4. tesztnél alkalmaztuk. * $p<0,5$ szignifikáns különbség a fotostimulációval társított és a fotostimuláció nélküli RB tesztekben.

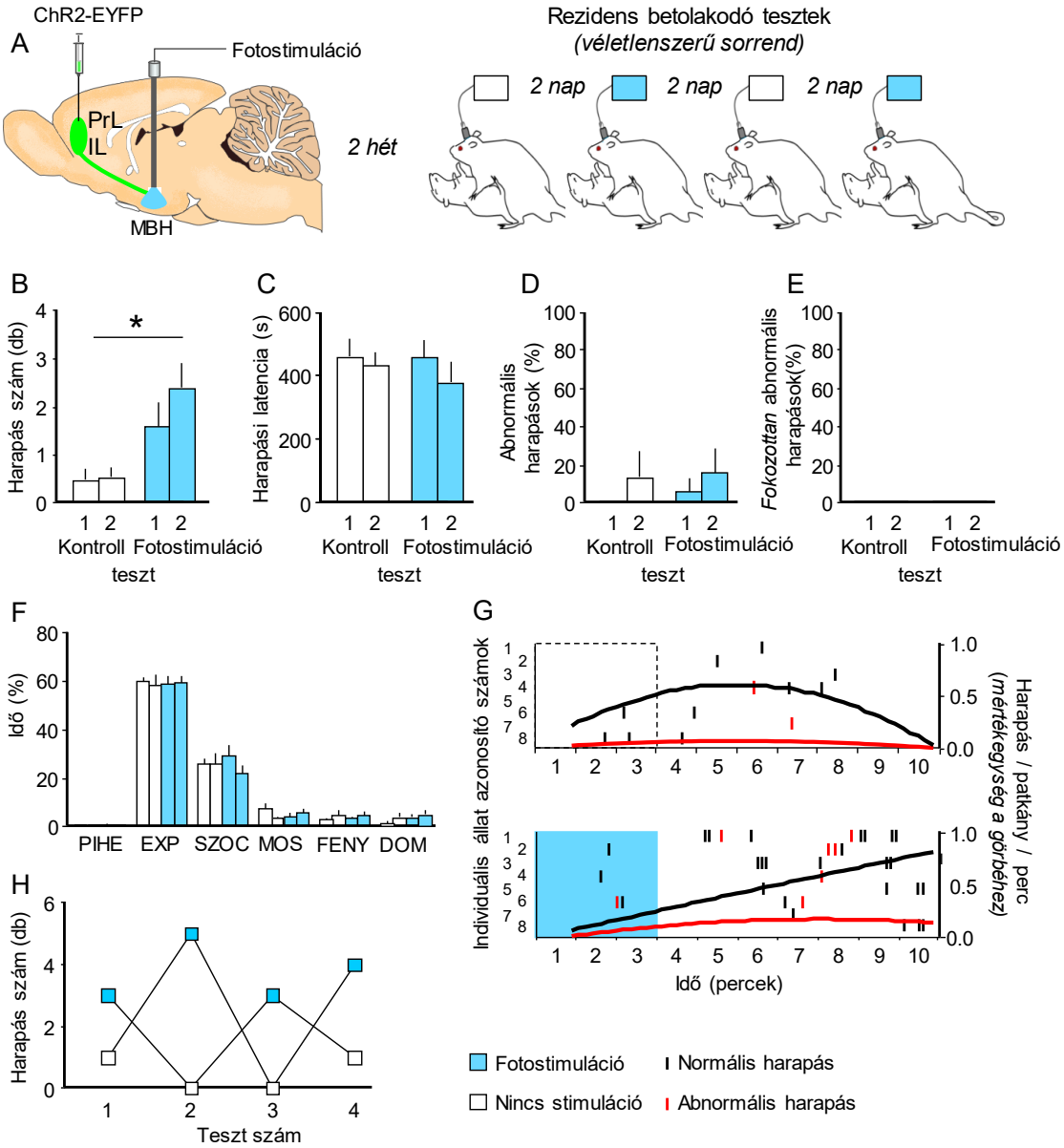


17. ábra. Az optikai szálak végződésének elhelyezkedése, valamint a feltételezett fénykúp megjelenítése az MBH-ban. A vastag kék vonalak az optikai szálak végét jelölik. A kék területek a fény áteresztését szemléltetik (sötét kék: 10 %-a, világos kék 1 %-a a kimeneti intenzitásnak) Yizhar és mtsai 2011 nyomán(104).

Az MBH-ba érkező prefrontális kérgi bemenetek fotostimulálása szignifikánsan növelte a harapások számát a stimulációval nem társított tesztekhez képest ($F_{fotostimuláció}(1,28)=10,23$, $p<0,01$; $F_{teszt}(1,28)=0,63$, $p=0,43$, **18/B ábra**). A fotostimuláció hatása szelektívnek bizonyult, ugyanis sem a harapási latenciára ($F_{fotostimuláció}(1,28)=0,73$, $p=0,40$; $F_{teszt}(1,28)=0,26$, $p=0,61$), sem az abnormális harapások arányára ($F_{fotostimuláció}(1,28)=0,32$, $p=0,57$; $F_{teszt}(1,28)=2,01$, $p=0,16$) nem gyakorolt szignifikáns hatást (**18/C és D ábrák**). Ebben a kísérletben egyik patkány sem mutatott *fokozottan*abnormális harapást (**18/E ábra**). A fotostimuláció viselkedési szelektivitása abban is megnyilvánult, hogy nem okozott szignifikáns változást más viselkedési változókban, így a pihenéssel, explorációval, szaglászással, mosakodással, fenyegetéssel és domináns viselkedéssel töltött időmennyiségében (**18/F ábra**). A fenti viselkedési változók részletes statisztikai elemzését az **6. táblázat** foglalja össze.

6. táblázat. Az mPFC-MBH projekció fotostimulációjához tartozó viselkedési paraméterek statisztikai összefoglalója.

ANOVA	$F_{fotostimuláció}$	p=	F_{teszt}	p=	$F_{interakció}$	p=
Pihenés	0.12	0.99	0.19	0.66	0.33	0.56
Exploráció	0,02	0,90	0,04	0,84	0,16	0,69
Szociális interakció	0,04	0,83	1,26	0,27	1,32	0,26
Mosakodás	0,10	0,75	0,51	0,48	2,57	0,12
Fenyegetés	0,00	0,99	2,15	0,15	0,06	0,81
Domináns pozitúra	1,17	0,29	1,15	0,29	0,01	0,93



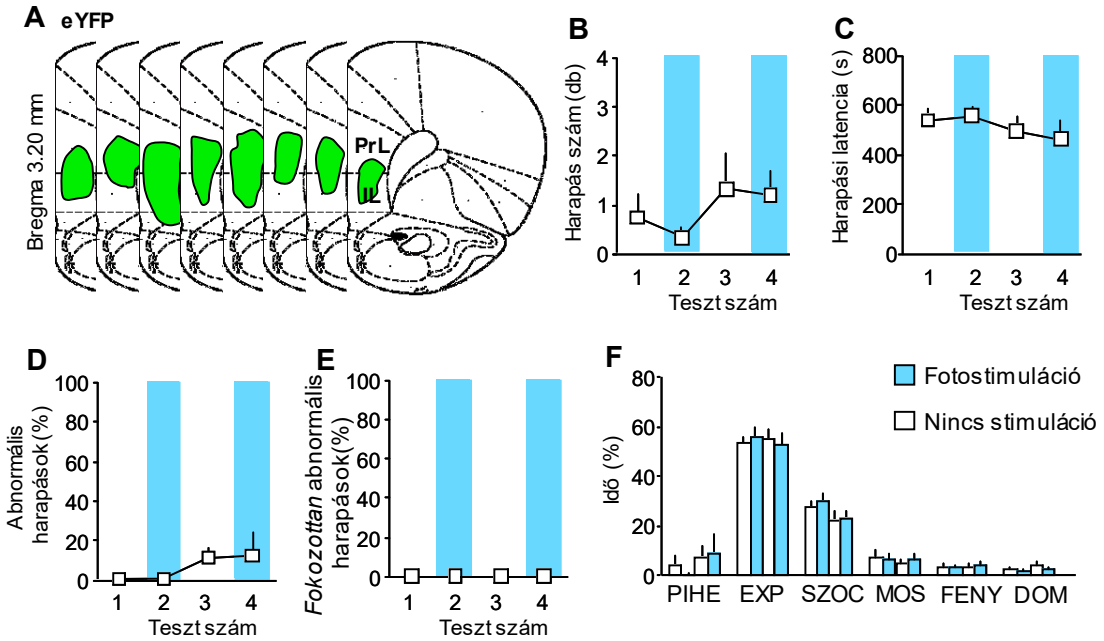
18. ábra. Az mPFC-MBH projekció fotostimulálása szelektíven növelte a harapások számát. A, A kísérlet sematikus bemutatása.**B-E,** A támadásokat jellemző viselkedési változók bemutatása. Abnormális harapás: a harapást nem előzte meg fenyegetés vagy sérülékeny testrészekre irányult (fej, torok, has). *Fokozottan*abnormális harapás: a harapást nem előzte meg fenyegetés és sérülékeny testrészre is irányult (fej, torok, has). **F,** Az RB tesztek során megfigyelt viselkedésformák időszázaléka. Minden egyes oszlop külön tesztnek felel meg.DOM domináns pozitúra, EXP exploráció, FENY fenyegető viselkedés, PIHE pihenés, SZOC szociális interakció, MOS mosakodás.**G,** A harapások időbeli eloszlása. A fotostimulálást a kék szín jelöli. Az y tengely mentén az egyedek azonosítószáma látható, így minden sorban látható vertikális vonal egyetlen patkány által végrehajtott individuális harapást jelöl. A görbék a teljes kumulált harapás gyakoriságot jelölik az adott percre a populációban. **H,** Két reprezentatív patkány összes harapási számának a bemutatása. Az egyik patkánynál a fotostimulációt az 1. és a 3. tesztnél, míg a másik patkánynál a 2. és a 4. tesztnél alkalmaztuk. * $p<0,05$ szignifikáns különbség a fotostimulációval társított és afotostimuláció nélküli RB tesztekben.

A teszten belüli események részletes elemzése rávilágított, hogy a harapások gyakorisági eloszlása jelentős változást mutatott fotostimuláció hatására (**18/G ábra**): a

fotostimulációtól mentes kontroll tesztek alatt a harapások növekvő, majd hanyatló száma volt megfigyelhető, míg a fotostimulációval társított tesztek alatt nem csökkent a harapások száma az idő múlásával, hanem elnyújtott módon fokozódott (**18/G ábra**). Ismét megjegyzendő, hogy a fotostimuláció elhúzódó, következő tesztre kiterjedő hatása nem volt megfigyelhető (**18/H ábra**).

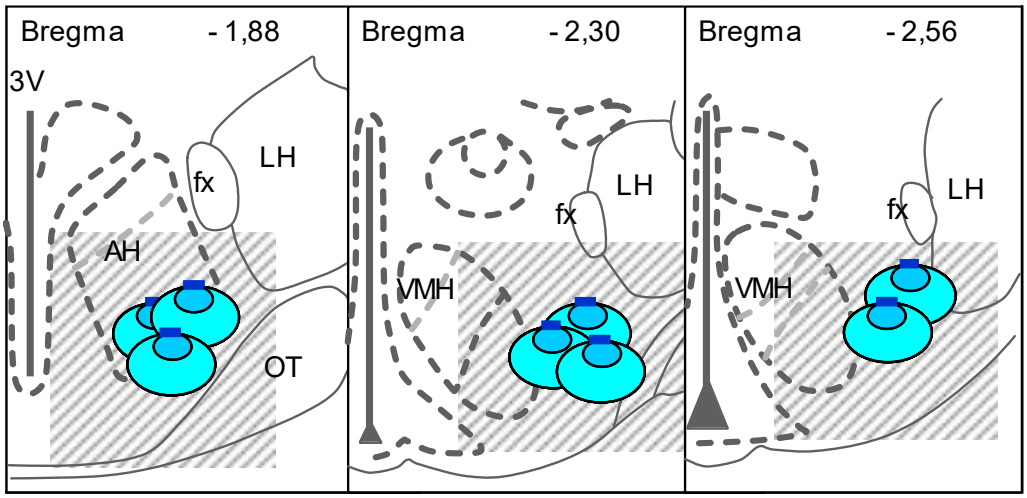
5.1.6. Kontroll kísérlet ChR2-t nem tartalmazó kontroll vírus konstrukcióval: az mPFC-MBH projekció fotostimulálásának hatása az agresszív viselkedésre és a nem-agresszív szociális viselkedésformákra

Annak érdekében, hogy kizárjuk a vírusfertőzés és a fotostimuláció aspecifikus hatásait, kontroll kísérlet során ChR2-t nem kifejező, csak riportergént (eYFP) tartalmazó vírust juttattunk be az állatok mPFC-be (**19/A ábra**), illetve az optikai szálakat az MBH fölé ültettük be (**20. ábra**). A ChR2 mentes mPFC bemenetek fotostimulációja nem gyakorolt szignifikáns hatást a harapások számára ($F_{fotostimuláció}(1,28)=0,91$, $p=0,34$; $F_{teszt}(1,28)=2,80$ $p=0,10$), latenciájára ($F_{fotostimuláció}(1,28)=0,04$, $p=0,84$; $F_{teszt}(1,28)=3,44$, $p=0,07$) és az abnormális harapások arányára ($F_{fotostimuláció}(1,28)=0,01$, $p=0,94$; $F_{teszt}(1,28)=2,89$, $p=0,10$, **19/B-E ábrák**). Ebben a kísérletsorozatban sem figyeltünk meg *fokozottan* abnormális harapásokat.



19. ábra. Kontroll kísérlet ChR2-t nem tartalmazó kontroll vírus konstrukcióval.A, A vírusgócok kiterjedése az mPFC-ben. **B-E,** Támadásokat jellemző viselkedési változók bemutatása. Abnormális harapás: a harapást nem előzte meg szociális jelzés vagy sérülékeny testrészekre irányult (fej, torok, has). DOM domináns pozitúra, EXP exploráció, FENY fenyegető viselkedés, PIHE pihenés, SZOC szociális interakció, MOS mosakodás.

A fotostimuláció nem okozott szignifikáns változást a pihenéssel, explorációval, szaglászással, mosakodással, fenyegetéssel és domináns viselkedéssel töltött idő mennyiségében (**19/F ábra**). A fenti viselkedési paraméterek részletes statisztikai elemzését a **7. táblázat** foglalja össze.



20. ábra. Az optikai szálak végződésének elhelyezkedése, valamint a feltételezett fénykúp megjelenítése az MBH-ban a ChR2-t nem tartalmazó kontroll vírus konstrukciós kísérletnél. A vastag kék vonalak az optikai szálak végét jelölik. A kék területek a fény áteresztését szemléltetik (sötét kék: 10 %-a, világos kék 1 %-a a kimeneti intenzitásnak) Yizhar és mtsai 2011 nyomán (104).

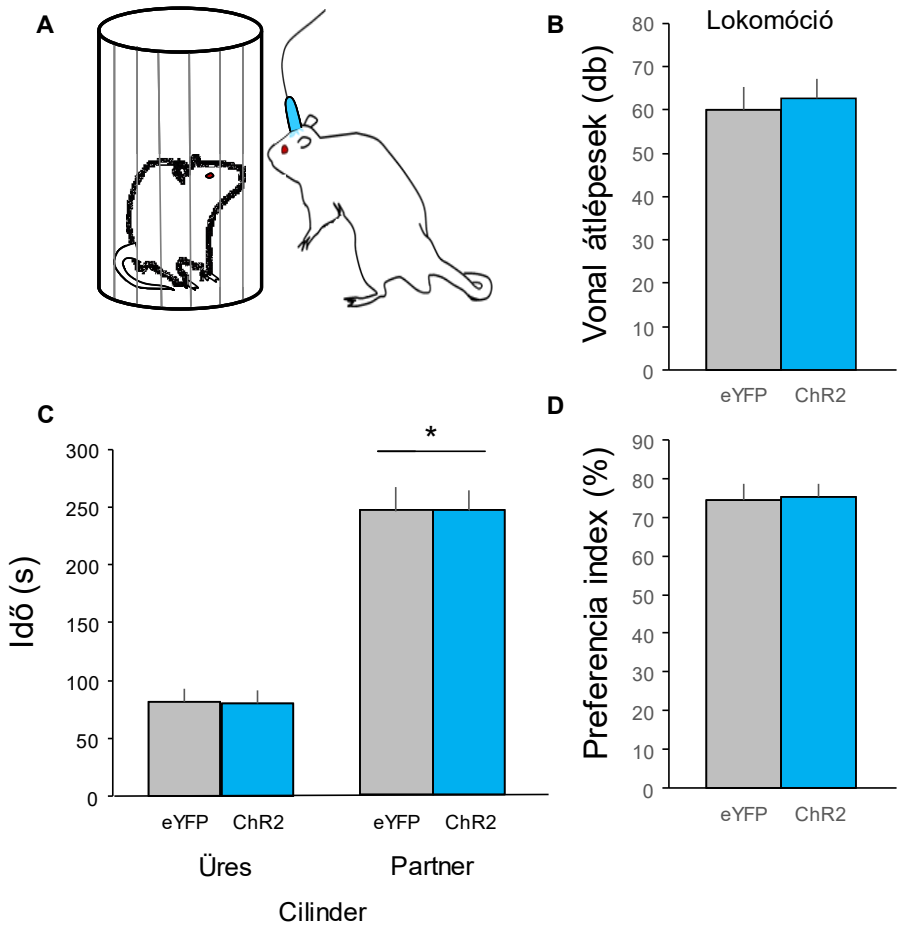
7. táblázat. A ChR2-t nem tartalmazó kontroll vírus konstrukciós kísérlet viselkedési paramétereinek statisztikai összefoglalója.

ANOVA	$F_{fotostimuláció}$	p=	F_{teszt}	p=	$F_{interakció}$	p=
Pihenés	0,01	0,95	1,56	0,22	0,34	0,56
Exploráció	0,01	0,92	0,11	0,74	0,44	0,51
Szociális interakció	0,19	0,67	3,74	0,06	0,04	0,84
Mosakodás	0,04	0,84	0,49	0,49	0,44	0,51
Fenyegetés	0,02	0,88	0,12	0,73	0,27	0,61
Domináns pozitúra	0,67	0,42	1,68	0,21	0,21	0,65

5.1.7. Az mPFC-MBH projekció fotostimulálásának hatása a kísérleti állatok lokomóciójára és szociális motivációjára

A fotostimuláció nem gyakorolt hatást a lokomócióra, ugyanis nem mutatkozott szignifikáns különbség a ChR2-t és eYFP riporter fehérjét kifejező állatok vonal átlépéseinek a számában ($F_{vírus}(1,12)=0,13$, $p=0,72$, (**21/B ábra**). Noha az állatok szignifikánsan több időt töltöttek a szociális partnert tartalmazó, mint az üres cilinder körül, nem mutatkozott szignifikáns különbség a ChR2-t és eYFP riporter fehérjét kifejező kísérleti csoportok között. ($F_{vírus}(1,12)=0,01$, $p=0,94$; $F_{cilinder}(1,12)=72,29$,

p<0,01, **21/C ábra**). Ennek megfelelően a szociális preferencia indexben sem mutatkozott szignifikáns különbség a kísérleti csoportok között ($F_{vírus}(1,12)=0,02$, $p=0,89$ **21/D ábra**).

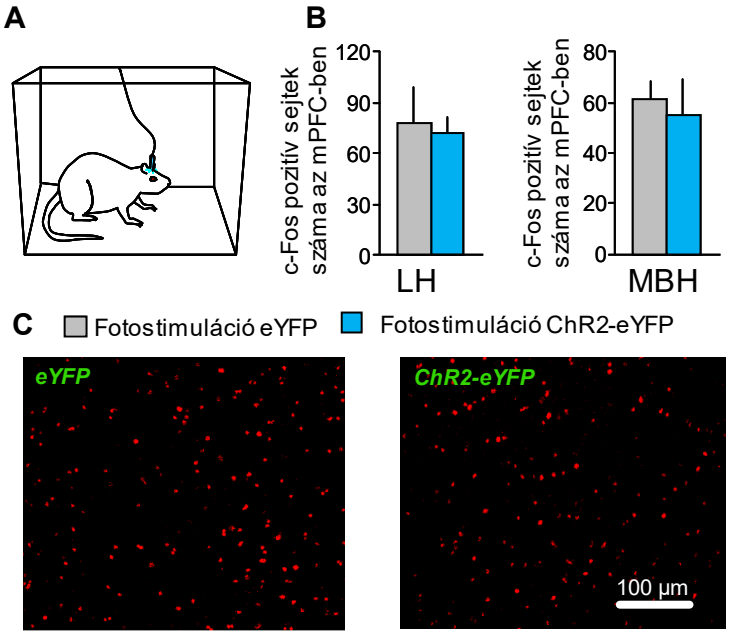


21. ábra. Az mPFC-MBH projekció fotostimulálása nem volt hatással a lokomócióra és szociális motivációra. **A,** A szociabilitás teszt sematikus bemutatása. **B,** A fotostimuláció nem gyakorolt hatást a lokomócióra. **C és D,** A fotostimuláció nem befolyásolta az állatok szociális motivációját. * p<0,05 szignifikáns különbség az üres cilinder és partnert tartalmazó cilinder között.

5.1.8. A hipotalamikus fotostimuláció hatása az mPFC neuronális aktivitására

Annak kizárására, hogy az axonális fotostimulációval esetlegesen visszaterjedő akciós potenciál az mPFC egyéb neuronjait vagy kollaterálisait is aktiválta, az mPFC-ben c-Fos immunhisztokémiával vizsgáltuk meg a terület neuronális aktivitását. Sem az MBH, sem az LH fotostimulálása nem növelte szignifikánsan az mPFC c-Fos pozitív neuronjainak a kifejeződését az eYFP kontroll csoportokhoz képest (**22. ábra**). Az mPFC-LH projekció stimulálásakor a ChR2-t kifejező állatok mPFC-ében átlagosan 72,17±8,91, a kontroll állatok mPFC-ében pedig 77,89±20,79 c-Fos pozitív sejtet számoltunk az optikai szállal ipszilaterális oldalon, a különbségek nem bizonyultak szignifikánsnak ($F_{vírus}(1,14)=0,06$, $p=0,80$). Az mPFC-MBH projekció stimulálásakor a

ChR2-t expresszáló állatok mPFC-ében átlagosan 54,75±14,45, a kontroll állatok mPFC-jében pedig 60,89±7,65 c-Fos pozitív sejtet számoltunk az optikai szállal ipszilaterális oldalon, a különbségek nem bizonyultak szignifikánsnak ($F_{vírus}(1,13)=0,12$, $p=0,73$).



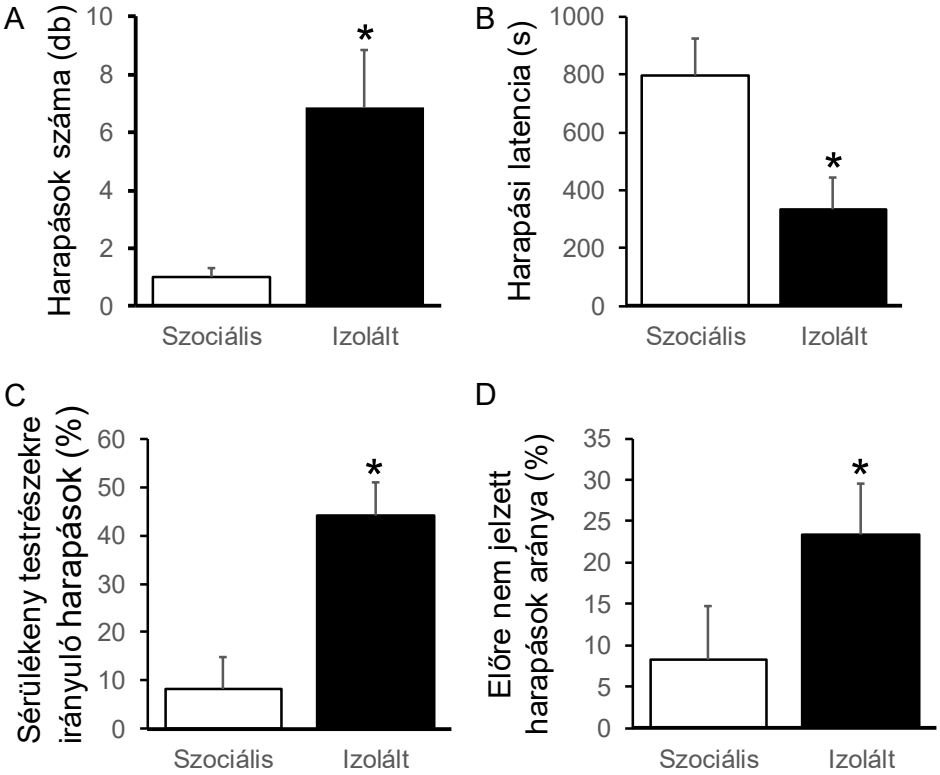
22. ábra. A hipotalamikus fotostimuláció hatása az mPFC neuronális aktivitására.A, A fotostimulációt az állatok saját dobozában hajtottuk végre, amelyet transzkardiális perfúzió követett 90 perccel később. **B,** Az MBH és az LH fotostimulációjakor nem mutatkozott különbség az mPFC c-Fos aktivációjában az eYFP-t és ChR2-t kifejező állatok között. **C,** Reprezentatív mikroszkópos képek az mPFC c-Fos mintázatáról.

5.2. A korai szociális izoláció okozta abnormális agresszióhoz kapcsolódó prefrontális kérgi strukturális és funkcionális változások

5.2.1 A korai szociális izoláció kiváltotta abnormális agresszió

A szociálisan izolált állatok szignifikánsan alacsonyabb latenciával és többször haraptak a szociálisan tartott állatokhoz viszonyítva az RB tesztben ($H(1;23)=7,57$ $p=0.01$; $H(1,23)=8,76$ $p=0,01$, **23/A és B ábrák**). A sérülékeny testrészeket (fej, torok, has) célzó harapások száma is szignifikánsan megnövekedett korai szociális izoláció hatására ($H(1,23)=10,19$ $p=0,01$) (**23/C ábra**), valamint kevesebb alkalommal előzte meg fenyegető viselkedés a támadásaikat ($H(1,23)=6,80$ $p=0,01$, **23/D ábra**). A prefrontális

kérgi aktiváció neurokémiai karakterizálásban részt vett állatok viselkedési mintázata hasonló változásokat mutatott (**8. táblázat**).



23. ábra. A kilencedik kísérlet eredményei: A korai szociális izoláció kiváltotta viselkedési változások a rezidens-betolakodó tesztben. **A,** Harapások száma. **B,** Harapási latencia. **C,** Sérülékeny testrészekre (fej, torok, has) irányuló harapások százalékos megoszlása. **D,** Előre nem jelzett harapások százalékos megoszlása. * p<0,05szignifikáns különbség a szociálisan és az izoláltan nevelkedett csoportok között.

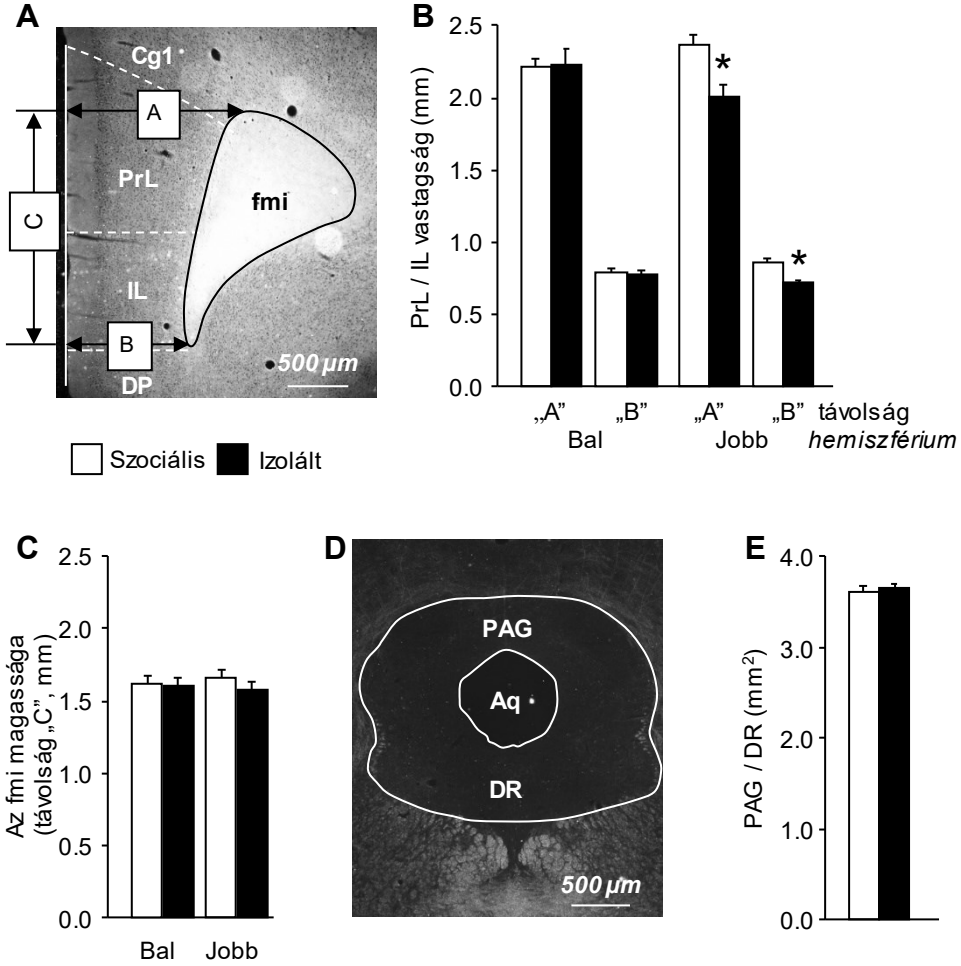
8. táblázat. A tizedik kísérlet viselkedési eredményei.A prefrontális kérgi aktiváció neurokémiai karakterizálásban részt vett állatok magatartási eredményei az RB tesztben.

Csoport	**Harapások száma (db)**	**Harapási látencia (s)**	**Sérülékeny testrészekre irányuló harapások aránya (%)**	**Előre nem jelzett harapások aránya (%)**
Szociális	2 ± 1	1027,4 ± 212,5	4 ± 4,5	0 ± 0
Izolált	5,9* ± 0,7	190* ± 36	35,8* ± 11,6	13,9* ± 5,4
Kruskal-Wallis ANOVA	H(1,12) = 5,54	H(1,12) = 5,66	H(1,12) = 3,97	H(1,12) = 3,75
p	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05

5.2.2. A korai szociális izolációhoz társuló prefrontális kérgi strukturális változások

Az izoláltan nevelt állatok jobb agyféltekéjében az mPFC mediolaterális kiterjedése mind dorzálisan ($F_{izoláció\ x\ hemiszférium}(1,28)=10,04$, p=0,01), mind ventrálisan ($F_{izoláció\ x\ hemiszférium}(1,28)=8,17$, p=0,01) szignifikánsan csökkent (**24/B ábra**). Ezzel szemben sem a forceps minor (fmi), sem a PAG kiterjedése nem mutatott szignifikáns

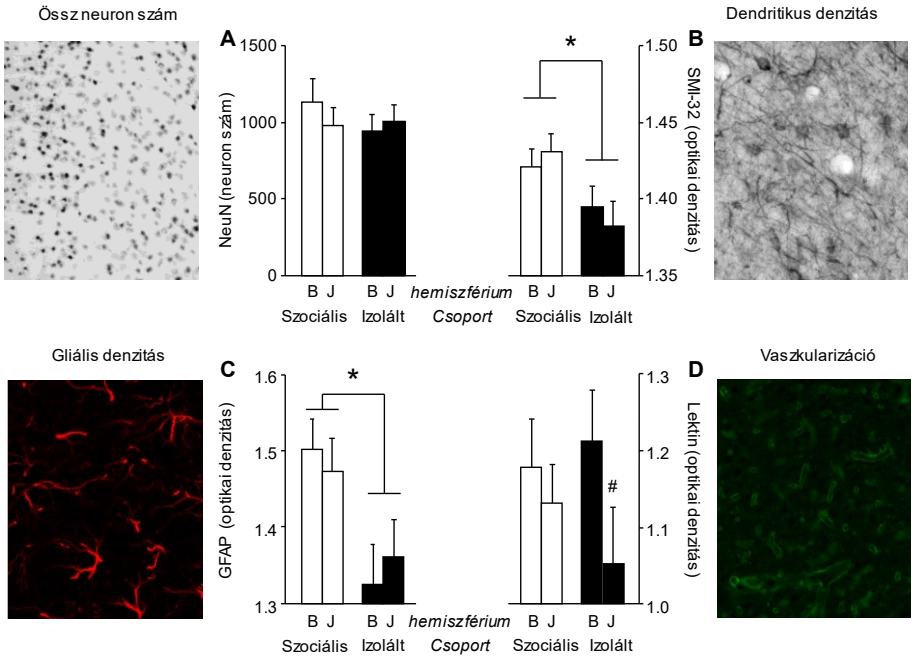
változást izoláció hatására (*fmi*: $F_{izoláció}(1,28)<1$, p=0,45; $F_{izoláció\ x\ hemiszférium}(1,28)=1,11$, p=0,30, **24/C ábra**; *PAG*: $F_{izoláció}(1,25)<1$, p=0,57, **24/E ábra**), utalva ezzel arra, hogy nem általános térfogatcsökkenést detektáltunk a szociálisan izolált állatokban.



24. ábra. Az mPFC kiterjedésének változása a Bregmától számított +3,20-2,70-es koronális síkokban. A, Reprezentatív „dark field” felvétel a vizsgált koronális síkról. A nyilak a mért távolságot jelölik (”A” mPFC szélessége a forceps minor dorzális részétől a mediális agyfelszínhatáráig, “B” mPFC szélessége a forceps minor ventrális részétől a kéreg széléig, “C” a forceps minor magassága). **B,** Az mPFC**szélessége** a jobb és bal hemiszfériumon a fent megjelölt koronális síkokban. **C,** A forceps minor magassága a fent megjelölt koronális síkokban. **D,** Reprezentatív „dark field” felvétel a PAG-ról a bregmától számított -6,8-as koronális síkban (a fehér vonalak a megvizsgált területet jelölik). **E**, A PAG területe a vizsgált koronális síkban (az Aq területe nélkül). “A” mPFC vastagsága a corpus callosum dorzális részétől a kéreg széléig, Aq: akveduktusz, Cg1: anterior cinguláris kéreg, DP: dorzális pedunkuláris kéreg, DR: dorzális raphe, fmi: forceps minor, IL: infralimbikus kéreg, PrL: prelimbikus kéreg, PAG: periakveduktális szürkeállomány, * p<0,05szignifikáns különbség a szociálisan és izoláltan nevelkedett patkányok között.

Bár a jobb oldali mPFC vastagsága csökkent, a neuronok száma nem mutatott változást egyik hemiszfériumban sem NeuN immunjelölés alapján ($F_{izoláció}(1,42)<1$, p=0,60; $F_{hemiszférium}(1,42)<1$ p=0,65; $F_{izoláció\ x\ hemiszférium}(1,42)=1,36$, p=0,25, **25/A ábra**). Ezzel szemben, az SMI-32 immunoreaktív idegi nyúlványok bilaterális csökkenést mutattak a

korai szociális izoláció hatására ($F_{izoláció}(1,21)=7,55$, $p=0,01$; $F_{izoláció\ x\ hemiszférium}(1,21)<1$ $p=0,61$, **25/B ábra**), akárcsak a gliális denzitás ($F_{izoláció}(1,20)=10,10$, $p=0,01$; $F_{hemiszférium}(1,20)<1$, $p=0,62$; $F_{izoláció\ x\ hemiszférium}(1,20)=2,37$, $p=0,14$, **25/C ábra**). A mikrovaszkulatúra jelölésére használt lektin immunjelölés hasonlóan csökkent optikai denzitást mutatott az izoláltan tartott állatokban, azonban ez csak a jobb oldali hemiszfériumra korlátozódott ($F_{izoláció\ x\ hemiszférium}(1,26)=4,79$, $p=0,03$, **25/D ábra**).

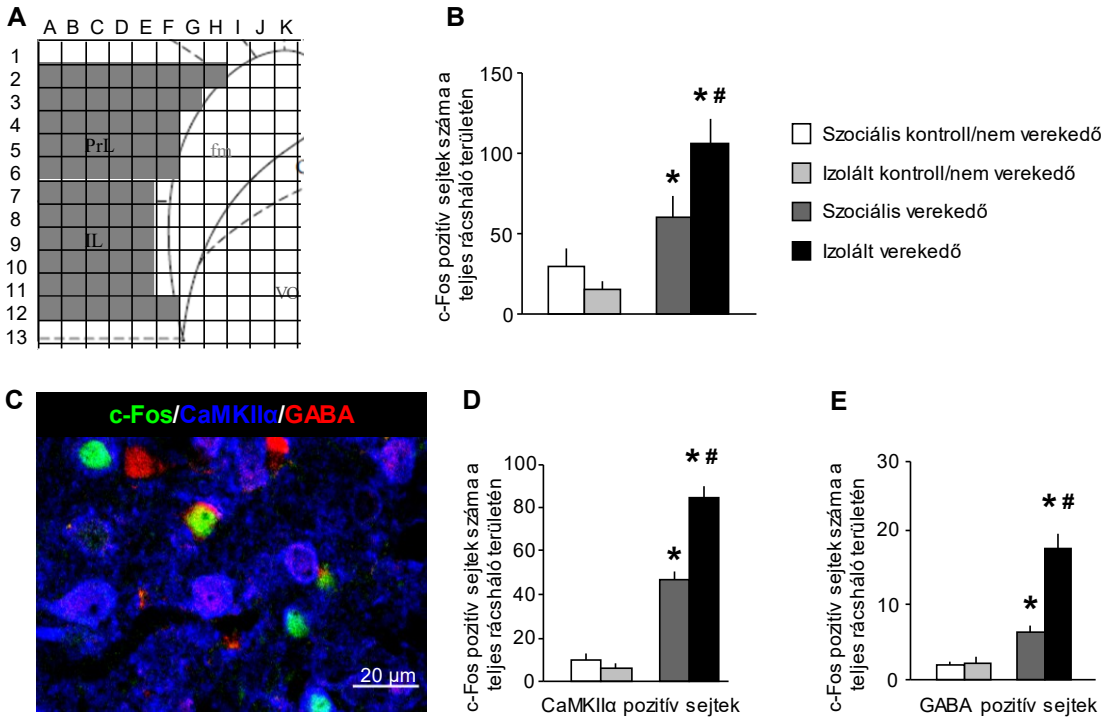


25. ábra. Az mPFC mikrostrukturális változásai a bregmától számított +3,20-2,70-es koronális síkokban. **A,** NeuN pozitív sejtmagok száma a **24/A ábrán** bejelölt területnek megfelelően. **B, C, D,** SMI-32, GFAP és lektin immunjelölés optikai denzitása, amelyek rendre a dendritek, a gliasejtek és a mikrovaszkulatúra denzitását jelölik. Az adott immunjelölésekhez tartozó reprezentatív felvételek az ábrák mellett láthatók. B: bal oldali hemiszférium, J: jobb oldali hemiszférium,* $p<0,05$szignifikáns különbség a szociálisan és izoláltan nevelkedett patkányok között, # $p<0,05$szignifikáns különbség a két hemiszférium között.

5.2.3. A korai szociális izolációt kísérő abnormális agresszióhoz társult mPFC neuronális aktiváció

Amikor a rácsháló által teljesen beborított prefrontális kérgi területét vettük figyelembe (**26/A ábra**), akkor a c-Fos aktiváció az izoláció és az agresszív kontaktus interakciójától függött ($F_{izoláció\ x\ agresszív\ interakció}(1,54)=9,69$, $p=0,01$). Az agyféltekék lateralizációja nem mutatott szignifikáns hatást önmagában ($F_{hemiszférium}(1,54)<0,01$, $p=0,99$) és nem jelentkezett szignifikáns interakció szociális izolációval sem az agresszív interakcióval (az F értékek 0,08, illetve 0,26, míg a p értékek 0,91, illetve 0,61). Az agresszív interakció szignifikánsan fokozta a c-Fos aktivációt, mind a szociálisan, mind az izoláltan tartott patkányokban ($F_{agresszív\ interakció}(1,54)=32,89$, $p<0,01$). Az izoláltan

tartott állatokban ez a növekedés nagyobb volt, mint a szociálisan nevelkedett csoportban (post-hoc összehasonlítás p<0,01, **26/B ábra**).

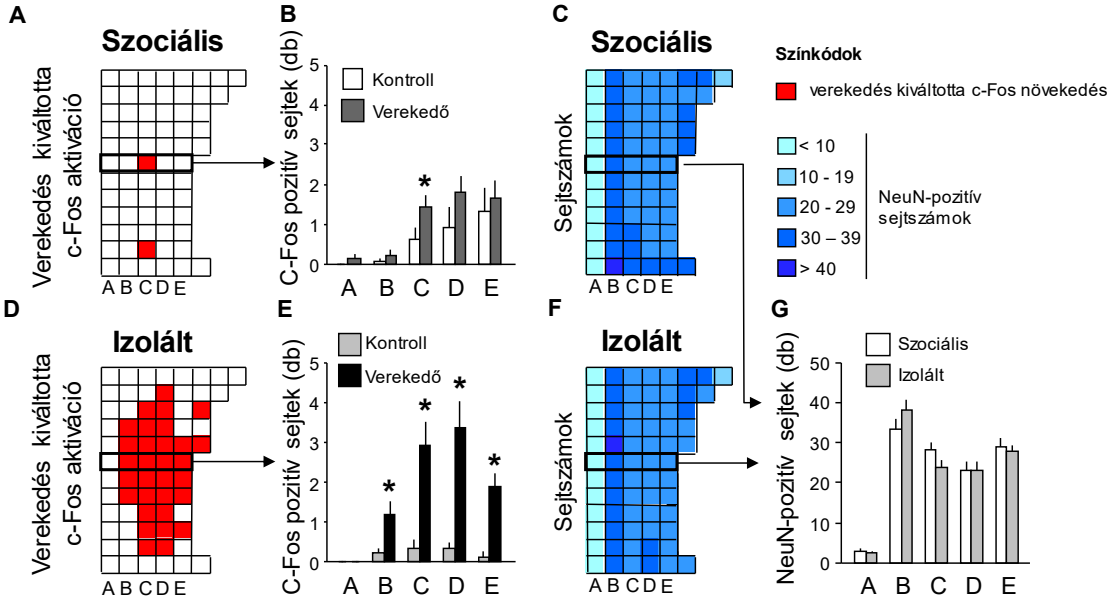


26. ábra. A szociális izoláció és a verekedés együttes hatása a neuronális aktivációra a bregmától számított +3,20-2,70-es koronális síkokban. A, A vizsgálatokban érintett mPFC terület és a ráfektetett rácsháló. A rácsházlót minden egyes metszet mikroszkópos képére egyedileg illesztettük az anatómiai határokat figyelembe véve. A rácsháló celláit az oszlopok (betűk) és a sorok (számok) elnevezése alapján jelöltük. **B,** Átlagos c-Fos pozitív sejtszám a rácsháló szürkével kiemelt celláiban (**26/A**). **C,** Reprezentatív mikroszkópos felvétel a c-Fos (zöld), CaMKIIα (kék) és GABA (piros) hármas immunjelölésről az mPFC-ben. **D,** c-Fos és CaMKIIα pozitív sejtek száma. **E,** c-Fos és GABA pozitív sejtek száma a rácsháló szürkével kiemelt celláiban. fmi: forceps minor, IL: infralimbikus kéreg, PrL: prelimbikus kéreg VO: ventrális orbitofrontális kéreg, * p<0,05szignifikáns verekedés hatás, # p<0,05szignifikáns izoláció hatás.

A rácsháló alapú összehasonlítás során a c-Fos aktiváció tekintetében a kísérleti csoportok és a cellák között interakció állt fenn ($F_{\text{izoláció x agresszív interakció}}(189,3648)=2,29$, p<0,01), azaz más aktivációs mintázat volt megfigyelhető a két kísérleti csoportban. A szociálisan tartott állatokban az aktiváció a C7-es és a C11-es cellákban (~III./V. réteg) mutatott szignifikáns emelkedést agresszív interakció hatására. Az izoláció által fokozott mPFC aktivitás ugyancsak jobban lokalizálható volt a rácsháló segítségével, mely rámutatott a PrL és az IL III./V. és VI. rétegének fokozott aktivitására (**27/D ábra**). A szociálisan és izoláltan tartott állatok közötti eltérés nagyságát a rácsháló 7. sora (ventrális PrL, A7-től E7-ig tartó cellák) jól reprezentálják **27/B és E ábrák**.

Az előzőkhöz hasonló rácsházlóval kvantifikáltuk a NeuN pozitív sejtek számát annak felderítésére, hogy a c-Fos aktivációs mintázatban látott változások összefüggenek-e az itt lokalizálódó neuronok számával. Nem jelentkezett csoport különbség a rácsháló

egyik cellájánál sem (**27/C és F ábrák**). A szociálisan és az izoláltan tartott állatok közötti különbség nem jelentkezett a rácsháló azonos celláinak az összehasonlítása során. A sejtszámok közötti hasonlóságot a 7. sorban (A7-től E7-ig tartó cellák) a **27/G ábra** mutatja be. Összegezve, ezek az adatok azt mutatják, hogy az mPFC aktivációja nagyobb volt az izoláltan nevelkedett állatok esetében, és ez a hatás az mPFC egy jól körülhatárolt alrégiójára koncentrálódott. Megjegyzendő, hogy az aktivációs mintázatban látott különbség nem a neuronszám változásának volt a következménye.



27. ábra. Az mPFC c-Fos aktivációjának voxel-jellegű ábrázolása. A képeken megjelenített négyzet rácshálók megfelelnek a **26/A ábrán** láthatónak. **A,** Az agresszív interakciónak kitett és nyugalmi kontroll csoportok közötti különbségek a szociálisan nevelkedett állatoknál. **B,** A verekedő és kontroll állatok közötti különbségek ábrázolása a rácsháló 7. sorából (vastagon kiemelve az A panelen). **C,** A szociálisan nevelt állatok adott celláihoz tartozó neuron számok a NeuN immunjelölés alapján. **D,** Az agresszív interakcióban részt vett és nyugalmi kontroll csoportok közötti különbségek az izoláltan nevelt állatokban. **E,** A verekedő és kontroll állatok közötti különbségek ábrázolása a rácsháló 7. sorából (D panelen vastagon kiemelve). **F,** Az izolációnak kitett állatok celláihoz tartozó neuron számok a NeuN immunjelölés alapján. **G,** A csoportok közötti különbségek ábrázolása a rácsháló hetedik sorához tartozó neuron számokban. * $p<0,05$szignifikáns verekedés hatás.

5.2.4. Az agresszív interakció hatására aktiválódott idegsejtek neurokémiai azonosítása

A fenti kísérlethez hasonlóan ebben a kísérleti kohortban is reprodukáltuk az agresszív interakcióban megjelenő fokozott c-Fos aktivációt az mPFC területén az izolált csoportban ($F_{\text{agresszív interakció}}(1,15)=48,89$, $p<0,01$; $F_{\text{izoláció x agresszív interakció}}(1,15)=10,59$, $p=0,01$), mely mind a CaMKIIα és a GABA immunoreaktivitást mutató sejtek esetében megfigyelhető volt (CaMKIIα: $F_{\text{agresszív interakció}}(1,15)=168,59$, $p<0,01$, $F_{\text{izoláció x agresszív interakció}}(1,15)=21,67$, $p<0,01$; GABA: $F_{\text{agresszív interakció}}(1,15)=36,11$, $p<0,01$;$F_{\text{izoláció x agresszív interakció}}(1,15)=11,43$, $p<0,01$). Így ezen csoportosítással nem volt detektálható, hogy vajon

a serkentő projekciós neuronok vagy a gátló interneuronok szintjén lehet az aktivációs mintázatok eredete (**26/C-E ábra**). A sejtek 10%-a mind CaMKIIα-ra, mind GABA-ra immunonegatív volt.

6. Megbeszélés

6.1. Az mPFC-MBH és az mPFC-LH projekciók anatómiai és viselkedési karakterizálása

Kísérletünk célja az agresszió végrehajtásában központi szerepet játszó hipotalamikus területek prefrontális kérgi szabályozásának vizsgálata volt. Az mPFC az agresszív viselkedés kontrollálásában fontos szerepet tölt be (5, 32, 92, 233), azonban eddig nem tisztázták az agresszió végrehajtásáért felelős fő szubkortikális területek működését szabályozó funkcióit, illetve ezen keresztül az agresszivitásra gyakorolt hatásait. Az MBH és az LH prefrontális kérgi afferenseinek jelentős mivolta alapján (89, 150, 151, 157, 234, 235) feltételezhető, hogy az mPFC közvetlenül részt vesz az agresszió modulálásában, az indirekt utakon (pl. amigdala modulálása) kívül. Az mPFC ezen közvetlen hipotalamikus hatását vizsgáltuk projekció-specifikus optogenetikai fotostimuláció alkalmazásával.

Eredményeink alapján az mPFC két jelentősen elkülönült, nem átfedő (<10%) glutamáterg neuronpopulációja idegzi be az LH-t és az MBH-t. Ezen két prefronto-hipotalamikus projekció fotostimulációja eltérő módon befolyásolta az agresszív interakció során jelentkező agresszív támadásokat. Az mPFC-MBH projekció fotostimulálása fokozta a harapások számát, azonban nem volt hatással ezek minőségi jellegére. Ezzel szemben az mPFC-LH projekciók fotostimulálása erőteljesen megváltoztatta a támadások jellegét, fokozva mind a fenyegetéssel nem-jelzett, mind a sérülékeny testrészekre irányuló ún. abnormális támadások arányát, a támadások számának befolyásolása nélkül. Összegezve, az mPFC két specifikus útvonalon modulálja az agresszió mennyiségi és minőségi jellegeit, mégpedig fokozva azokat. Noha az MBH és az LH ezen jellegeire volt már korábbi adat: előbbi a fajspecifikus agresszió kifejeződését közvetíti (15, 84, 121, 133-135), míg az LH a predátoros és abnormális támadások esetében aktívabb (16, 17), jelen eredményeink rámutatnak, hogy mPFC ezt direkt útvonalon facilitálja és vélhetően aktív „top-down” kontrollal modulálja ezen jelleget az agresszív interakció során.

6.1.1. Az mPFC-MBH és az mPFC-LH projekciók jellemzése

Az mPFC számos agyterülethez küld sűrű projekciókat a körülötte lévő kortikális területektől a középagyon át az agytörzs poszterior régiójáig (151, 157, 236). Figyelembe

véve az mPFC számos célterületét és azt, hogy az mPFC-ben található neuronok milyen sűrű projekciókat küldenek az agresszív viselkedésben érintett hipotalamikus területekre, kijelenthető, hogy az mPFC meghatározó szerepet tölt be az agresszív viselkedés szabályozásában.

Eredményeink szerint, korábbi anterográd és retrográd pályajelölést alkalmazó vizsgálatok eredményeivel összhangban, mind az MBH-hoz (89, 151, 210), mind az LH-hoz sűrű projekciók érkeznek az mPFC-ből (150, 151, 210). A vizsgálatainkban visszajelölt sejtek száma, az idegrostok sűrűsége és az erőteljesebb vGLUT1/eYFP ko-expresszió alapján is az mPFC-LH projekció robusztusabbnak tekinthető az mPFC-MBH projekciónál. Kutatócsoportunk korábbi retrográd nyomjelölést alkalmazó tanulmányával megegyező módon az MBH-ba vetítő sejtek főként az mPFC III./V. rétegeiben (89), míg az LH-ba vetítő sejtek az mPFC V. és VI. rétegeiben mutattak sűrűbb visszajelölődést, korábbi tanulmányokhoz hasonlóan (150). *In vitro* elektrofiziológiai elvezetéseink a markáns vGLUT1/eYFP ko-expressziós immunjelöléssel egybevetve mutatják, hogy az mPFC erős excitátoros hatást fejt ki az MBH és az LH területén.

Az agresszív viselkedésben érintett ideghálózat részletesebb megértése szempontjából fontos lenne az mPFC-MBH és az mPFC-LH projekciók posztszinaptikusan elhelyezkedő célsejtjeinek neurokémiai jellemzése, mivel mind az MBH, mind a LH egyaránt tartalmaz glutamáterg és GABA-erg neuronokat, melyek eltérő eloszlást mutatnak a két vizsgált hipotalamikus terület között (237-239). Noha eredményeink egy nettó facilitáló hatást mutattak ki, nem tisztázott, hogy ez hálózati szinten milyen neuronpopulációk aktivitásából eredhet. Az MBH-ban a glutamáterg sejtek főleg a VMHvl részében találhatóak, amelyet laterális és ventrális irányból GABA-erg neuronok által képzett burok vesz körül. A LH-ban ilyen szintű anatómiai szegregáltság nem figyelhető meg: a GABA-erg és glutamáterg sejtek keverten helyezkednek el (240, 241). Az alapján, hogy az mPFC-MBH axonok főleg az MBH laterális részén sűrűsödnek, feltételezhetően a projekció célsejtjei zömében GABA-erg neuronok. Ez a feltételezés összeegyeztethető Potegal hipotézisével, miszerint az mPFC a szubkortikális GABA-erg neuron populációk innerválásán keresztül *diszinhibíció* révén szabályozza az agresszív viselkedést (155), noha ez felveti többszörös helyi gátlókörök létezését, amit eddig nem bizonyítottak. Ezt a hipotézist anatómiai megfigyelések is támogatják: az mPFC GABA-erg sejteket idegez be a BNST-ben, a ventrális tegmentális

areában (VTA) és a dorzális raphe magban is (162, 163, 242), illetve hasonló jelenséget írtak le patkányban az mPFC-LH projekció esetében is az LH poszterior területének tekintetében (243). Az LH GABA-erg neuronjai nagy diverzitást mutatnak (244). Az LH számos neuronjai számos neuropeptidet tartalmaznak, amelyek befolyásoló szereppel bírnak a táplálkozás és a motiváció szabályozásában (241, 244). Ilyen neuropeptid az orexin, amely az LH GABA-erg neuronjainak egy részében fejeződik ki (244). Az orexin tartalmú sejtek sűrű direkt bemenetet kapnak az IL felől (245). Habár az orexin tartalmú sejtek a táplálékfelvétel és az energia háztartás szabályozásában töltenek be szabályozó szerepet, újabb hipotézisek szerint kognitív-motiváció közvetítőként is működhetnek (246). Csakugyan az LH neuronjai a laterális habenulába vetülő projekcióin keresztül képesek befolyásolni az elkerülő viselkedést (247, 248). Nincs kísérletes lelet arról, hogy LH-laterális habenula projekciók hogyan modulálják az agresszív viselkedést, noha a laterális habenula érintett az agresszív viselkedés jutalmazó aspektusainak a modulálásában (249).

Nem leírt azonban az, hogy az LH vagy az MBH neuronjai milyen finom lokális kapcsolatokon keresztül befolyásolják egymás aktivitását. Feltehetően a jövőbeli tanulmányok, amelyek *in vitro* elektrofiziológiai elvezetéseket ötvöznek *post-hoc* anatómiai rekonstrukciókkal és projekció specifikus optogenetikai manipulációkkal majd árnyaltabb képet adnak a hipotalamusz neuronjainak hálózati elrendezéséről (250).

Noha macskában leírt az MBH és az LH reciprok gátló beidegzése, és rágcsálókban is dokumentált a két terület közötti kapcsolat, ezek részletes neurokémiai, fiziológiai és viselkedési jellemzése még várat magára (89, 114, 177, 178). Jelen és korábbi eredményeink arra utalnak, hogy rágcsálók esetében nem válik szét ilyen élesen a kétféle támadási mintázat, amit ökológiai, etológiai magyarázatok is érthetően alátámasztják, hiszen macskák esetében a predáció a viselkedési repertoárjuk része, jelentős szabályozást igényel, mint adaptív táplálékszerző magatartás. Ezzel szemben a rágcsálók mindenevő sajátsága nem jellemezhető határozott viselkedési mintázatokkal, s feltételezhetően sokkal nagyobb átfedést mutat az egyéb agresszióformákkal szabályozás szintjén is. Érdekes találat azonban, hogy az mPFC szelektíven szabályozza a kétféle jelleget („normális” és „abnormális” agresszió mértékét) az MBH-n és az LH-n keresztül. Utóbbi azért fontos különösen, mivel az ember is hasonló karakterjegyekkel jellemezhető és patológiás esetekben is egyfajta kevert mintázat látható, ahol a két magatartásforma

leginkább az autonóm válaszreakcióban érhető tetten leginkább (alacsony stressz-reaktivitás a proaktív formákban, míg magas stessz-reaktivitás a reaktív formákban). Ennek tükrében eredményeink felvetik annak lehetőségét, hogy a reaktív agresszióval társuló kórformákban inkább az mPFC-MBH projekció deficitek, míg a proaktív agresszióval társuló kórformák során (pl. pszichopátia) inkább az mPFC-LH deficitek dominálhatnak. Utóbbiak felderítésére a hipotalamusz aktivitását részletesebb felbontással célzó fMRI vizsgálatok mutathatnak rá.

Az mPFC-MBH és az mPFC-LH projekciós neuronok anatómiai elkülönülése alapján felvetődhet a lehetősége annak is, hogy egyéb hipotalamikus alterületek szabályozását is elkülönült prefrontális kérgi neuronpopulációk végzik. Egy másik fontos kérdés ehhez, hogy az mPFC-ben elhelyezkedő neuronok axon kollaterálisaikon keresztül milyen és hány szubkortikális és kortikális célterülethez küldenek afferenseket. Klasszikusan az ilyen kérdések megvizsgálására többszörös retrográd pályajelöléses technikákat használnak. Egy újabb hármas retrográd pályajelöléses vizsgálat szerint az mPFC-ben elhelyezkedő neuronok külön populációi vetítenek a ventrális striatumban (NAc), VTA és a bazolaterális amigdalába (BLA) (251), azaz az általunk talált szerveződés több szubkortikális terület szabályozásában hasonlóan működhet. Noha az mPFC-amigdala reciprok kapcsolatok döntő szerepet játszanak a magatartás (152, 235, 252-254), így az agresszív viselkedés szervezésében (15, 105), nem feltárt az, hogy az amigdalába és MBH-ba, illetve LH-ba vetítő sejtek átfednek-e és ha igen milyen arányban.

6.1.2. A prefronto-hipotalamikus kapcsolatok szerepe a különböző agresszív viselkedésformák szabályozásában

Az mPFC-MBH projekció szelektív fotostimulációja mennyiségileg növelte, míg az mPFC-LH projekció fotostimulációja minőségileg befolyásolva, abnormális irányba tolta el az agresszió jellegét. Az mPFC agressziót pályaspecifikus módon befolyásoló hatásainak leírása különösen érdekes az agresszió prefrontális deficit hipotézisének fényében, mely szerint az agresszióval társuló pszichopatológiai jelenségeket prefrontális strukturális deficitek kísérik (233, 255). Bár a hipotézis olyan tanulmányokon alapszik, melyek az mPFC-t mint agyterületet egészként értelmezték és funkcióit nem vizsgálták projekció specifikusan, az agresszió kiváltotta neuronális aktivációs mintázatok összhangban állnak eredményeinkkel, miszerint az mPFC aktiválódása akut módon

előidézheti az agresszív viselkedést megjelenését. Ezen tanulmányok szerint mind rágcsálókban, mind emberekben az agresszív viselkedéshez megnövekedett mPFC aktivitás társul, amely növekedés különösen hangsúlyos pszichopatológiai jelenségek, illetve az abnormális agresszió laboratóriumi modelljeinek esetében (97, 121, 193-195, 203, 205, 209, 256). Jelen dolgozat eredményei további bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a két egymásnak ellentmondó jelenség egy időben is fennállhat. Ez összhangban áll azon felvetéssel miszerint hosszú távon a prefrontális deficitek hajlamosító tényezőként szolgálhatnak az abnormális agresszióra, továbbá az agresszív cselekedetek kivitelezéséhez fokozott prefrontális aktivitás szükséges (14).

Eredményeink szerint az mPFC-ben lévő elszórt neuronpopulációk az MBH-ba és az LH-ba vetülő glutamáterg projekciói révén közvetlenül képesek szabályozni az agresszív viselkedést és aktívan részt vesznek az agresszió végrehajtásának kontrolljában. Az MBH prefrontális kérgi bemenetének stimulációja fokozta a patkányok agresszivitásának mértékét, az állatok többször harapták meg a territóriumukban lévő idegen hím fajtársukat, azonban a stimuláció az agresszió minőségi jellemzőit nem befolyásolta, a támadásokat megelőző szociális jelzések, illetve a harapások célpontjai normális tartományban mozogtak. Mivel az MBH korábbi tanulmányok alapján egyfajta integrátor központnak tekinthető, melyben a különböző agyterületekről érkező bemenetek fokozhatják, illetve gátolhatják az agresszív motivációt, de emellett befolyásolnak egyéb szociális magatartásformákat is (134-137, 257), kísérletünkben azt is megvizsgáltuk, hogy az mPFC-ből érkező bemenet stimulációjának van-e hatása a szociális érdeklődésre, elkerülésre. Eredményeink alapján a projekció aktiválása nem befolyásolta az állatok szociabilitás tesztben mutatott viselkedését, mely támogatja azt a feltételezést, hogy a fent leírt hatások specifikusak voltak az agresszív támadásokra. Ezt a következtetést támogatja az is, hogy az RB teszt folyamán mutatott nem-szociális és nem-agresszív jellegű szociális magatartásokban sem láttunk eltérést a fotostimuláció hatására. Ezek alapján úgy tűnik, hogy az mPFC az MBH-ba vetülő efferensei révén az intraspecifikus agresszió fontos direkt modulátora.

Meglepő módon ugyanez a prefrontális kérgi terület LH-beli vetületének stimulációja a fentiektől eltérő módon befolyásolta az agresszív viselkedést: az agresszió mértéke nem változott, azonban az agresszív támadásokat kevésbé kísérték szociális jelzések, fenyegetések, és nagyobb arányban irányultak sérülékeny testrészekre, melyek

életveszélyes helyzetben adekvátnak, egy kisebb fajtárssal való agresszív konfliktus során azonban abnormális viselkedésnek tekintendők (35, 40, 42, 80).

Kísérleteink során a stimuláció és a kiváltott magatartási hatás idődinamikája eltérő volt korábbi hipotalamikus stimulációkat alkalmazó tanulmányokban leírtaktól. Ezen vizsgálatok során az elektromos stimuláció kiváltott viselkedési válaszok másodpercekkel a stimuláció kezdete után megjelentek és annak végeztével azonnal megszűntek (138, 140, 141). A fentiekhez hasonlóan, egerek MBH-jának fotostimulációja azonnali harapást váltott ki, amelyet nem kísért az eredményeinkhez hasonló elnyújtott posztstimulációs hatás (134, 135). Kísérleteink során az mPFC projekciók fotostimulációja következtében kiváltott viselkedés válaszok jelentős latenciával és elnyújtottabb dinamikával jelentkeztek, továbbá reverzibilisnek bizonyultak a teszteket elválasztó két nap során. Mindez alapján az mPFC feltételezhetően nem közvetlen kiváltója a hipotalamikus támadási mechanizmusoknak, hanem modulálja azokat. Fontos megjegyezni, hogy az MBH és az LH kivitelező központnak tekinthető sok magatartás esetében (pl. táplálkozás, ivás, szexuális magatartás), ezzel szemben az mPFC innerváció ezen terület modulációját végzi, s eredményeink alapján nem közvetlen kiváltója a hipotalamikus támadási mechanizmusoknak, hanem „tónikusabb módon” modulálja azokat. Az már megalapozottnak tekinthető, hogy az mPFC nyomon követi a folyamatban lévő viselkedési konfliktusokat, továbbá szerepet játszik a különböző viselkedési választások értékének a felmérésében, kiszámításában és a megfelelő viselkedési válasz kiválasztásában (175, 258, 259). A jelenséget magyarázhatja, hogy az mPFC a hipotalamikus támadási területek modulációja révén fokozatosan megváltoztatta viselkedési konfliktus jellegét. Nem kizárható, hogy az mPFC bemenetek stimulálása olyan hálózati aktivitás eltolódást eredményezett a hipotalamusz szintjén, amely változást okozhatott szociális jelzések feldolgozásában és integrálásban. Ezzel összhangban legújabb irodalmi adatok alapján egyre inkább előtérbe kerül az a koncepció miszerint a hipotalamikus támadási területek nem automatizált végrehajtó szerepet töltenek be, hanem a különböző szerzorimotoros bemenetek integrátoraként szervezik a viselkedési válaszokat (136, 257). Egy kurrens elképzelés szerint ha az MBH-ba érkező bemenetek átlépnek egy „küszöböt”, akkor az MBH rekurrens hálózata gyorsan felerősíti az aktivitást a harapás megkezdéséhez és fenntartásához szükséges szintre (257). Így az

MBH spontán aktivitásának növelése közelebb hozza a „küszöb”-höz a hálózat aktivitását, így növelve annak átlépésének a valószínűségét (257). Ezt a hipotézist támogatja, hogy az MBH spontán neuronális aktivitásának a növelése kemogenetikai manipuláció révén növeli a támadások frekvenciáját, de nem okoz azonnal harapást (260). Ennek megfelelően az MBH spontán aktivitásának csillapítása csökkenti a harapási frekvenciát (134, 261). Lehetséges, hogy a kísérleteink során alkalmazott fotostimulálás mind az MBH-ban, mind az LH-ban rekurrens hálózati aktivitást indukált, amely potencírozta az adott hipotalamikus területre jellemző harapási karakterisztika megjelenését.

Összességében tehát magatartási eredményeink arra utalnak, hogy az mPFC két külön hipotalamikus hálózaton keresztül szabályozza az agresszivitás mennyiségi és minőségi jellegét. Potegal elmélete szerint az mPFC és a hipotalamusz közötti anatómiai kapcsolat a düh és agresszió „top-down” eszkalációjában játszhat szerepet, amit jelenlegi eredményeink kísérletesen alátámasztanak (155). Az agresszív viselkedés kvantitatív és kvalitatív megnyilvánulásának mértéke erősen kontextus-függő, bonyolult és gyors neuronális feldolgozást igényel, pl. a szociális jelzések folyamatos értelmezése, taktikai előnyszerzés, morális döntések, kockázatok és nyereségek felmérése. Az agresszió ezen kognitív szabályozása mögött agykérgi működést sejthetünk, melyben eredményeink tükrében jelentősen részt vesz az mPFC.

6.2. A korai szociális izoláció következtében kialakuló abnormális agresszió hátterében álló prefrontális kérgi strukturális és funkcionális változások

A korai szociális izoláció - korábbi adatainkkal egybevágóan – felnőttkorban abnormális agresszió megjelenéséhez vezetett, amely a harapások megnövekedett számában és inadekvát/abnormális jellegében is megnyilvánult, hiszen az ellenfél sérülékeny testrészeire (fejre, a torokra és a hasra) irányultak, valamint a harapásokat ritkán előzték meg fenyegető viselkedések, amelyek szociális csoportban nevelt kontroll állatoknál megfigyelhetőek. Paradox módon, a fenti violens támadási mintázat mellett megnőtt a védekező viselkedésformákkal töltött idő is, mely az állatok fokozot szociális averziójáról, szorongásáról árulkodhat. Utóbbiakat alátámasztják korábbi kísérleteink, miszerint a fenti izoláció által kiváltott defenzív-violens fenotípus megnövekedett glükokortikoid stresszválasszal és szívritmus emelkedéssel társultak interakció során,

amely az állatok fokozott emocionális és vegetatív izgalmi szintjére (*hiperarousal*) utal (18, 19). Jelen munka eredményei szerint mindezek a fajspecifikus szabályoktól eltérő deviáns viselkedésformák a jobb oldali mPFC térfogatának és vaszkularizációjának szignifikáns csökkenésével társultak, valamint kétoldali csökkenést találtunk a gliális és dendritikus markerek kifejeződésében is. Ezen markáns strukturális változások ellenére agresszív interakció során az izolált állatok mPFC-jében fokozott neuronális aktivitást detektáltunk szociálisan nevelkedett társaikhoz képest. „Voxel-alapú" analízisünk rávilágított, hogy a neuronális hiperaktivitás az mPFC egy jó körülhatárolható régiójára koncentrálódott. Fontos még, hogy mind a glutamáterg, mind a GABA-erg neuronok hiperaktivációt mutattak az izolált állatokban, azaz nem egy globális gátlás-serkentés arány eltolódás látható az mPFC hiperaktiválódás hátterébe. Egy finomabb interneuron-specifikus jelölés lehetséges, hogy rámutathatott volna bizonyos elemek szelektív zavarára (pl. PV vagy CCK pozitív sejtek változásai), ahogy az a glükokortikoid hiány indukálta abnormális agressziós modellben látható (203). Összességében a fentiek alapján feltételezhetően a korai szociális izoláció által kiváltott abnormális agresszió hátterében zavart strukturális mPFC fejlődés állhat, mely funkcionálisan hiperaktivációban nyilvánul meg. Feltételezésünk összhangban áll irodalmi adatokkal, miszerint a prefrontális deficitek állnak az agresszióval társuló pszichopatológiai jelenségek hátterében, s valószínűleg kauzális módon elősegítik az agreszió fokozódását (5, 6, 32, 92).

6.2.1. A korai szociális izoláció kiváltotta prefrontális kérgi strukturális deficitek

Vizsgálatainkban csökkent mPFC térfogatot detektáltunk szociális izolációban nevelt állatok esetében. Újabb, a szakirodalomban terjedő álláspont szerint az abnormális agresszióval társuló pszichopatológiák egyfajta fejlődési rendellenességnek tekinthetők, melyeket környezeti és biológiai (genetikai, neurobiológiai) faktorok interakciója okozhat (255, 262). Ismert, hogy a PFC különösen hosszútávú fejlődésmenettel rendelkezik, amely így különösen érzékeny a fiatalkori averzív környezeti behatásokra (8, 9). Ilyen jellegű behatásokra (pl. gyermekkori bántalmazás és/vagy elhanyagolás) emberekben a PFC térfogata csökken (11-13). Ez a csökkenés gyakran megjelenik olyan humán pszichiátriai kórképekben, melyekre jellemző abnormális agresszióformák megjelenése (pl. antiszociális személyiségzavar, borderline személyiségzavar, gyermekkori viselkedési zavar, piszchopátia) (12, 185, 218, 219, 263, 264). Ilyen

kórképekben a PFC térfogatának csökkenése elsősorban a jobb agyféltekében kifejezett (7, 263, 265). A PFC térfogatának ilyen jellegű, lateralizált csökkenését, illetve ennek az abnormális agresszióval való asszociációját elsőként vizsgáltuk átfogó – a viselkedési és élettani hatásokra kiterjedő – módon laboratóriumi rágcsálókban. Eredményeink szerint a korai szociális izoláció, mint fiatal korban bekövetkező averzív környezeti behatás-humán, illetve egyes rágcsálókon végzett tanulmányok eredményeivel összhangban (212, 213) -, az mPFC erőteljes térfogatcsökkenéséhez vezetett a jobb agyféltekében. Továbbá elsőként mutattuk ki, hogy az mPFC környezeti behatás által kiváltott térfogatcsökkenéséhez abnormális agresszióformák kialakulása is társulhat. Ez egybevág korábbi adatokkal, miszerint az mPFC a magatartási, érzelmi és stresszválaszok szabályozásábanközponti szerepet tölt be (266). Jelen eredmények magyarázhatják az izolált állatok markáns glükokortikoid, szívfrekvencia válaszát agresszív interakciók során, amit felfokozott, agitált, védekező és fokozottan támadó magatartás követ.

Érdekes módon az izoláció-indukálta térfogatcsökkenés hátterében nem találtunk változást a neuronok számában (NeuN-pozitív sejtek). Hasonló jelenséget korábban kísérletesen kiváltott hipotiroidizmus és szociális izoláció esetén írtak le: míg az mPFC térfogata csökkent, az nem járt a neuronok számának változásával (213, 267). Ezen tanulmányok során a térfogati csökkenés hátterében a dendritikus csökkenés állt, hasonlóan a mi eredményeinkhez, ahol az izolált állatokban a piramissejt dendritek csökkent mennyiséget mutattak a szociálisan nevelkedett állatoknál tapasztaltakhoz képest. Ez az eredmény ugyancsak egybevág azon találatokkal, miszerint a szociális izoláció csökkenti a piramissejtek dendritikus komplexitását (75) és a dendrittüskék denzitását (214), melyet több modellben interpretálnak a depresszió, szorongás és a skizofrénia kialakulásban szerepet játszó mechanizmusként (75, 268, 269).

Továbbá, a szociális izoláció a GFAP immunjelölődést csökkentette az mPFC-ben, amely a glia denzitásának csökkenésére utalhat. Ezzel összevethetően, rágcsálókban is leírtak perinatális stressz hatására csökkenő GFAP expressziós szinteket (270), valamint szociális izolációt követően a glia sejtek denzitásának trendszerű csökkenését az IL és PrL régiókban (217), noha ezek agresszivitással való összefüggéseiről nincs adat.

A korai szociális stresszorok hatására a vaszkularizációban jelentkező csökkenés ismeretlen volt rágcsálókban, ugyanakkor az mPFC csökkent vérátáramlása és csökkent

glukóz metabolizmusa gyakori velejárója a humán agresszióval társuló pszichopatológiai jelenségeknek (271, 272).

Az mPFC strukturális változásait összegezve a korai szociális izoláció patkányoknál prefrontális fejlődési deficitet okoz, ami abnormális agresszív viselkedéssel jár együtt, mely lehetséges magyarázó modellként szolgálhat a gyermekkori szociális elhanyagoltság, bántalmazás által fellépő fokozott agresszióra emberek esetében.

6.2.2. A korai szociális izoláció okozta abnormális agresszióhoz kapcsolódó mPFC aktivációs mintázatok

Mind emberben, mind rágcsálókban az agresszió fokozott mPFC aktivitással jár együtt (97, 121, 193, 203, 209), mindez fokozódik jelentős agresszióval társuló pszichopatológiai jelenségek esetében (256, 273-275). A jelen dolgozatban alkalmazott „voxel-jellegű" vizsgálat rámutatott az mPFC (PrL és IL) III./V. rétegeinek hiperaktivációjára izoláció okozta abnormális agresszió esetében. Ezen alrégió tartalmazza a korábban bemutatott MBH-ba és LH-ba vetítő neuronpopulációkat is, ezáltal erősítve ezen neuronpopulációk feltételezhető szerepét az abnormális agresszió kialakulásában, pontosabban ezen területek hiperaktivitását, mely az agreszió fokozódásához vezethet, ahogy optogenetikai eredményeink mutatták.

Korábbi eredményeink alapján a korai szociális izoláció által kiváltott, az abnormális agresszióhoz köthető megváltozott mPFC aktivitás hátterében feltételezhető a piramissejt populáció jelentős érintettsége (203). Az mPFC-ben található GABA-erg interneuronok (pl. PV és CCK tartalmúak) döntő szerepet játszanak a piramissejtek periszomatikus gátlása révén a kortikális funkciók szervezésében és összehangolásában (169), így jelentős szerepet töltenek be az agresszív viselkedés szabályozásában (155), így az abnormális formákban is (203). A közelmúltban bebizonyosodott, hogy a szociális izoláció az mPFC-ben található PV tartalmú interneuronok diszfunkcióját idézi elő (csökkent PV mRNS és fehérje szint) (276), mely hatására az excitatórikus/inhibitorikus egyensúly megváltozik. Feltehetőleg ez a hatás is felelhet – legalábbis részben – az mPFC jelen tanulmányban bemutatott megváltozott működéséért és az ebből eredő viselkedési változásokért. Erről a jelenségről egyelőre kevés információ áll rendelkezésünkre, kutatócsoportunk jövőbeli tervei között szerepel a hatások részletes tisztázása.

6.3. Az mPFC szerepe az abnormális agresszió szabályozásában - kitekintés

Jelen dolgozat az mPFC abnormális agresszióban betöltött szabályozó szerepének a pontosabb megértése köré szerveződik. Vizsgálataink során elsőként az mPFC hipotalamikus projekcióit tanulmányoztuk optogenetikai manipulációkkal, valamint megvizsgáltuk azt, hogy a kérdéses területet milyen strukturális és funkcionális változások jellemzik a reaktív abnormális agresszió korai szociális izolációs állatmodelljében. Ez egy új kutatásiterület hiszen a szakirodalomban elsőként tanulmányoztuk az agresszív viselkedés prefrontális szabályozását *patkányokban* optogenetikai módszerek alkalmazásával. Az agresszió szabályozásában érintett ideghálózat funkcionális feltárását főként *egerek* szubkortikális agyterületeinek (MBH, LS, bazális előagy, ventrális premammilláris mag) és projekcióinak (bazális előagy-habenula, LS-MBH) manipulálásával végzik (134-136, 249, 257, 277, 278).

Noha jelen eredményeink az mPFC agressziót elősegítő szerepét igazolták, nem állnak ellentétben azokkal az egerekben végzett megfigyelésekkel, melyek az mPFC agressziót gátló szerepére utalnak (207). Humán eredmények szerint az mPFC sérülése patológiás agresszióval társulhat (7, 180, 181), ugyanakkor paradox módon ugyanez a terület fokozott aktivációt mutat abnormális agresszió megnyilvánulásakor (193, 194, 256), amit jelen dolgozat korai szociális izolációs kísérletei is megerősítenek. Eredményeink az irodalomban elsőként szolgáltattak bizonyítékot arra, hogy az mPFC az agresszió elősegítésében is részt vehet, s ezek az új ismeretek segíthetik a prefrontális paradoxon feloldását. Ugyanakkor, meg kell jegyezni, hogy nem tudjuk, hogy normális agresszió során mekkora a funkcionális hozzájárulása az mPFC-MBH és az mPFC-LH projekcióknak az agresszív viselkedés modulálásában. Noha eredményeink szerint a korai szociális izoláció fokozza a III./V. és VI. rétegi neuronális aktivációt azon mPFC régiókban, ahol az MBH-ba és LH-ba vetítő sejtek elhelyezkednek. Egyelőre azonban nincs rendelkezésünkre álló adat arról, hogy ezen specifikus neuronpopulációk milyen funkcionális aktivációt mutatnak abnormális agresszió során. A jövőbeli c-Fos immunhisztokémiával kombinált retrográd pályajelöléses kísérleteink megválaszolhatják ezen kérdéseket. Ezzel együtt meg kell jegyezni, hogy a neurobiológiai vizsgáló módszerek már ott tartanak (fluoreszcens kálcium indikátorokon alapuló képalkotás kombinálása interszekcionális vírus vektor alapú projekció jelöléssel), hogy bepillantást

nyerhetünk az mPFC-ből az MBH-ba vagy az LH-ba vetítő sejtek neuronális aktivitásáról, amikor az állat agresszív viselkedést mutat. Így akár időben összeilleszthető ezen sejtek neuronális aktivitása a harapások megjelenésével is (251, 279, 280).

Végül a fenti kérdést fejlődési perspektívába helyezve korai szociális izolációs modellünkben kimutattuk, hogy a korai szociális életben bekövetkező deficitek komoly strukturális deficithez vezetnek az mPFC szintjén, mely kontrollálatlan, agitált, agresszív magatartáshoz vezet. Noha a jelen tanulmányban az mPFC szintjén jelentkező strukturális deficitek feltárására törekedtünk, meg kell jegyezni, hogy az izoláció befolyásolhatta az mPFC szubkortikális projekcióinak fejlődését is. Az averzív szociális környezet, így a szociális elhanyagolás strukturális és funkcionális deficitet okoz az mPFC-amigdala kapcsolatban is (10). Ezzel egybevágóan az agresszióval társuló pszichopatológiai jelenségeknél ezen kapcsolat deficitjeit írták le (281-283). Így nem kizárható az a felvetés, hogy korai szociális izoláció hatására az mPFC-hipotalamusz és az mPFC-amigdala kapcsolatok is strukturális átszerveződésen mennek át, amelyek befolyásolhatják az mPFC hipotalamuszra és amigdalára gyakorolt modulációjának hatékonyságát (284).

7. Következtetések

Kísérleti eredményeink alapján az alábbi következtetéseket vonhatjuk le:

1) Az mPFC projekció-specifikusan modulálja az agresszív viselkedés különböző aspektusait a hipotalamusz szintjén:

a) Az mPFC-ből elkülönült neuronpopulációk vetítenek az MBH-ba és az LH-ba, ahol sűrű excitatorikus szinaptikus vezikula felszabadulási helyeket alkotnak.
b) Az mPFC-MBH projekció az agresszió mennyiségi, míg az mPFC-LH projekció az agresszió minőségi jellegeinek modulálását szervezi.
c) Mind az mPFC-MBH, mind az mPFC-LH projekciók aktiválása szelektíven befolyásolja az agresszív viselkedést, egyéb szociális viselkedésformákra gyakorolt hatások nélkül.

2) A korai szociális izoláció felnőttkorban abnormális agresszió mintázatot hoz létre, amely hátterében az mPFC strukturális deficitjei és funkcionális hiperaktivitása áll:

a) A korai szociális izoláció hatására az mPFC térfogata csökken, melyet a dendritikus, glia és vaszkuláris elemek alacsonyabb kifejeződése kísér.
b) A korai szociális izolációt kísérő abnormális agresszióhoz az MBH-ba és az LH-ba vetítő mPFC régiók fokozott aktivitása társul, feltehetően hozzájárulva az abnormális agresszióformák megjelenéséhez.
c) Az agresszív interakciót kísérő neuronális hiperaktivitás mind a glutamáterg, mind a GABA-erg neuronok fokozott aktivitásával jár, így egyelőre kérdéses milyen sejttípus megváltozására vezethető vissza a megfigyelt hiperaktivitás.

8. Összefoglalás

A gyermekkori szociális elhanyagolás és a korai stressz jelentős prefrontális kérgi (PFC) deficithez vezet a fejlődés során, valamint kiemelt kockázati tényezőként hozzájárul a kóros agresszióval társuló magatartászavarok kialakulásához. Ugyanakkor számos korábbi vizsgálat szerint, agresszív viselkedés során a PFC fokozott aktivációja figyelhető meg a fokozott agressziót mutató állapotokban, így a PFC agresszió szabályozásában betöltött szerepe máig nem teljesen tisztázott.

Első kísérletsorozatunkban a mediális PFC (mPFC) agressziót szabályozó szerepét vizsgáltuk a hipotalamikus efferenseinek optogenetikai manipulációjával hím patkányokban. Az mPFC-mediobazális hipotalamusz közötti kapcsolat aktiválása fokozta az állatok agresszivitását, mely megnövekedett harapásszámban nyilvánult meg. Ezzel szemben az mPFC-laterális hipotalamusz kapcsolat stimulálása az agresszív viselkedést csak minőségileg befolyásolta, az állatok többet haraptak sérülékeny testrészekre és a támadásaikat megelőző fenyegetések száma csökkent, azaz abnormális támadásformákat aktivált. Összességében eredményeink arra utalnak, hogy az mPFC két elkülönülő hipotalamikus projekción keresztül szabályozza az agresszió minőségi és mennyiségi jellemzőit.

Második kísérletsorozatunkban a korai szociális izoláció agresszív viselkedésre gyakorolt hatását és az ehhez társuló prefrontális kérgi strukturális és funkcionális változásokat vizsgáltuk. Eredményeink szerint korai szociális izoláció hatására felnőttkorban abnormális agresszió alakul ki, melyet a támadások számának emelkedése, az ellenfél sérülékeny testrészeinek célzása, illetve a támadások előrejelzésének hiánya jellemez. Az izolált állatoknál csökken a jobboldali mPFC térfogata és vaszkulatúrája, továbbá bilaterálisan csökken a gliális és dendritikus denzitás, mutatva a megváltozott mPFC fejlődést izoláció hatására. A kialakuló abnormális agressziót az mPFC azon alterületeinek (infralimbikus (IL) és prelimbikus kéregnek (PrL))a fokozott aktivációja kísérte, melyek szoros anatómiai kapcsolatban állnak az agresszió fent jelzett hipotalamikus központjaival. Eredményeink tehát megerősítik a korai averzív szociális hatások és a PFC krónikus deficitjének abnormális agresszióban betöltött szerepét, továbbá rámutatnak az agresszió szabályozásának egy közvetlen prefrontális kérgi útvonalára.

9. Summary

Social neglect and early-life stress constitute a serious risk factor in the development of abnormal aggression-related psychopathologies and also influence the development and maturation of the PFC. Indeed, structural and functional deficits of PFC have been observed in aggression-related psychiatric disorders. However, preclinical and clinical research has shown *enhanced* activation of the PFC during aggressive behavior, therefore the role of the PFC in the modulation of aggression is still unclear.

In the first experiment, we optogenetically photostimulated excitatory mPFC efferents projecting to MBH and LH regions in male rats. Photostimulation of the mPFC-MBH projection increased attack frequency without qualitative changes. On the other hand, activation of the mPFC-LH projection influenced the qualitative aspects of aggression, i.e. reduced social signaling before attacks and increased the ratio of attacks aiming vulnerable body parts of the opponent (abnormal patterns). In summary, our results show that the mPFC modulates qualitative and quantitative aspects of aggression *via* two distinct hypothalamic projections.

In a second set of experiments, we investigated the effects of PWSI on aggressive behavior and associated structural and functional changes in the mPFC. Our results show that social isolation induces abnormal aggression in adulthood characterized by increased attack bouts, and robust increases of abnormal attacks aiming vulnerable body parts, and significant reduction of social signaling before attacks. These behavioral changes were associated with reduced thickness and vascularization of the right mPFC, and bilateral decrease in dendritic and glial density in isolated animals. Isolation-induced abnormal aggression was also accompanied by increased activation of two subregions of the mPFC, the infralimbic (IL) and prelimbic (PrL) cortices. These regions are anatomically connected to the hypothalamic centers of aggression, i.e. MBH and LH. In summary, our results confirmed the important role of early-life social disturbances in the development of prefrontal structural deficits resulting in abnormal aggression. Moreover, we revealed a direct prefronto-hypothalamic circuits involved in aggression modulation.

10. Irodalomjegyzék

1. American Psychiatric Association., (2013) Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5. Arlington, VA,: 461-480.
2. Chapple, C.L., Tyler, K.A., Bersani, B.E., (2005). Child neglect and adolescent violence: examining the effects of self-control and peer rejection. Violence Vict, 20: 39-53.
3. Gilbert, R., Widom, C.S., Browne, K., Fergusson, D., Webb, E., Janson, S., (2009). Burden and consequences of child maltreatment in high-income countries. Lancet (London, England), 373: 68-81.
4. Susman, E.J., (2006). Psychobiology of persistent antisocial behavior: stress, early vulnerabilities and the attenuation hypothesis. Neurosci Biobehav Rev, 30: 376-389.
5. Blair, R.J., (2010). Psychopathy, frustration, and reactive aggression: the role of ventromedial prefrontal cortex. British journal of psychology (London, England : 1953), 101: 383-399.
6. Blair, R.J., (2010). Neuroimaging of psychopathy and antisocial behavior: a targeted review. Current psychiatry reports, 12: 76-82.
7. Yang, Y., Raine, A., (2009). Prefrontal structural and functional brain imaging findings in antisocial, violent, and psychopathic individuals: a meta-analysis. Psychiatry research, 174: 81-88.
8. Kolb, B., Mychasiuk, R., Muhammad, A., Li, Y., Frost, D.O., Gibb, R., (2012). Experience and the developing prefrontal cortex. Proc Natl Acad Sci U S A, 109 Suppl 2: 17186-17193.
9. Spear, L.P., (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. Neurosci Biobehav Rev, 24: 417-463.
10. Teicher, M.H., Samson, J.A., Anderson, C.M., Ohashi, K., (2016). The effects of childhood maltreatment on brain structure, function and connectivity. Nature reviews. Neuroscience, 17: 652-666.
11. Lee, V., Hoaken, P.N., (2007). Cognition, emotion, and neurobiological development: mediating the relation between maltreatment and aggression. Child maltreatment, 12: 281-298.

12. Tomoda, A., Suzuki, H., Rabi, K., Sheu, Y.S., Polcari, A., Teicher, M.H., (2009). Reduced prefrontal cortical gray matter volume in young adults exposed to harsh corporal punishment. Neuroimage, 47 Suppl 2: T66-71.
13. Danese, A., McEwen, B.S., (2012). Adverse childhood experiences, allostasis, allostatic load, and age-related disease. Physiol Behav, 106: 29-39.
14. Haller, J., (2014). Neurobiological Bases of Abnormal Aggression and ViolentBehaviour. Vienna, Austria: Springer, 96-120.
15. Siegel, A., Roeling, T.A., Gregg, T.R., Kruk, M.R., (1999). Neuropharmacology of brain-stimulation-evoked aggression. Neurosci Biobehav Rev, 23: 359-389.
16. Tulogdi, A., Biro, L., Barsvari, B., Stankovic, M., Haller, J., Toth, M., (2015). Neural mechanisms of predatory aggression in rats-implications for abnormal intraspecific aggression. Behav Brain Res, 283: 108-115.
17. Tulogdi, A., Toth, M., Halasz, J., Mikics, E., Fuzesi, T., Haller, J., (2010). Brain mechanisms involved in predatory aggression are activated in a laboratory model of violent intra-specific aggression. Eur J Neurosci, 32: 1744-1753.
18. Tóth, M., Halász, J., Mikics, E., Barsy, B., Haller, J., (2008). Early social deprivation induces disturbed social communication and violent aggression in adulthood. Behav Neurosci, 122: 849-854.
19. Toth, M., Mikics, E., Tulogdi, A., Aliczki, M., Haller, J., (2011). Post-weaning social isolation induces abnormal forms of aggression in conjunction with increased glucocorticoid and autonomic stress responses. Horm Behav, 60: 28-36.
20. Buss, A.H., (1961). The psychology of aggression. Wiley, New York, 7-40.
21. Zillmann, D., (1979). Hostility and Aggression. Erlbaum, Hillsdale, NJ, 15-35.
22. Archer, J., (2009). The nature of human aggression. International journal of law and psychiatry, 32: 202-208.
23. Darwin, C., (1859). On the origin of species. London: John Murray.
24. Darwin, C., (1871). The descent of man and selection in relation to sex. London: John Murray.
25. Gomes, M.M., (2007). A concept analysis of relational aggression. Journal of psychiatric and mental health nursing, 14: 510-515.
26. Vaillancourt, T., Sunderani, S., (2011). Psychopathy and indirect aggression: the roles of cortisol, sex, and type of psychopathy. Brain and cognition, 77: 170-175.

27. Haller, J., Kruk, M.R., (2006). Normal and abnormal aggression: human disorders and novel laboratory models. Neurosci Biobehav Rev, 30: 292-303.
28. Blair, R.J., (2001). Neurocognitive models of aggression, the antisocial personality disorders, and psychopathy. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 71: 727-731.
29. Kempes, M., Matthys, W., de Vries, H., van Engeland, H., (2005). Reactive and proactive aggression in children--a review of theory, findings and the relevance for child and adolescent psychiatry. European child & adolescent psychiatry, 14: 11-19.
30. Lopez-Duran, N.L., Olson, S.L., Hajal, N.J., Felt, B.T., Vazquez, D.M., (2009). Hypothalamic pituitary adrenal axis functioning in reactive and proactive aggression in children. J Abnorm Child Psychol, 37: 169-182.
31. Scarpa, A., Raine, A., (1997). Psychophysiology of anger and violent behavior. The Psychiatric clinics of North America, 20: 375-394.
32. Siever, L.J., (2008). Neurobiology of aggression and violence. The American journal of psychiatry, 165: 429-442.
33. Grant, E.C., Mackintosh, J.H., (1963). A comparison of the social postures of some common laboratory rodents. Behaviour, 21: 246-259.
34. Gandelman, R., (1972). Mice: postpartum aggression elicited by the presence of an intruder. Horm Behav, 3: 23-28.
35. Parmigiani, S., Brain, P.F., Mainardi, D., Brunoni, V., (1988). Different patterns of biting attack employed by lactating female mice (Mus domesticus) in encounters with male and female conspecific intruders. J Comp Psychol, 102: 287-293.
36. Siegel, A., Victoroff, J., (2009). Understanding human aggression: New insights from neuroscience. International journal of law and psychiatry, 32: 209-215.
37. Eichelman, B.S., Jr., (1971). Effect of subcortical lesions on shock-induced aggression in the rat. J Comp Physiol Psychol, 74: 331-339.
38. Powell, D.A., Francis, J., Braman, M.J., Schneiderman, N., (1969). Frequency of attack in shock-elicited aggression as a function of the performance of individual rats. Journal of the experimental analysis of behavior, 12: 817-823.

39. Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., Rodgers, J., Weiss, S.M., (1990). The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. Neurosci Biobehav Rev, 14: 463-472.
40. Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., (1989). Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 13 Suppl: S3-14.
41. Blanchard, R.J., Flannelly, K.J., Blanchard, D.C., (1988). Life-span studies of dominance and aggression in established colonies of laboratory rats. Physiol Behav, 43: 1-7.
42. Miczek, K.A., de Boer, S.F., Haller, J., (2013). Excessive aggression as model of violence: a critical evaluation of current preclinical methods. Psychopharmacology, 226: 445-458.
43. Haller, J., Harold, G., Sandi, C., Neumann, I.D., (2014). Effects of adverse early-life events on aggression and anti-social behaviours in animals and humans. J Neuroendocrinol, 26: 724-738.
44. Haller, J., (2017). Studies into abnormal aggression in humans and rodents: Methodological and translational aspects. Neurosci Biobehav Rev, 76: 77-86.
45. Benus, R.F., Bohus, B., Koolhaas, J.M., van Oortmerssen, G.A., (1991). Behavioural differences between artificially selected aggressive and non-aggressive mice: response to apomorphine. Behav Brain Res, 43: 203-208.
46. Miczek, K.A., Weerts, E.M., Tornatzky, W., DeBold, J.F., Vatne, T.M., (1992). Alcohol and "bursts" of aggressive behavior: ethological analysis of individual differences in rats. Psychopharmacology, 107: 551-563.
47. Melloni, R.H., Jr., Ferris, C.F., (1996). Adolescent anabolic steroid use and aggressive behavior in golden hamsters. Annals of the New York Academy of Sciences, 794: 372-375.
48. Delville, Y., Melloni, R.H., Jr., Ferris, C.F., (1998). Behavioral and neurobiological consequences of social subjugation during puberty in golden hamsters. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 18: 2667-2672.

49. Haller, J., van de Schraaf, J., Kruk, M.R., (2001). Deviant forms of aggression in glucocorticoid hyporeactive rats: a model for 'pathological' aggression? J Neuroendocrinol, 13: 102-107.
50. Gobrogge, K.L., Liu, Y., Young, L.J., Wang, Z., (2009). Anterior hypothalamic vasopressin regulates pair-bonding and drug-induced aggression in a monogamous rodent. Proc Natl Acad Sci U S A, 106: 19144-19149.
51. Marquez, C., Poirier, G.L., Cordero, M.I., Larsen, M.H., Groner, A., Marquis, J., Magistretti, P.J., Trono, D., Sandi, C., (2013). Peripuberty stress leads to abnormal aggression, altered amygdala and orbitofrontal reactivity and increased prefrontal MAOA gene expression. Translational psychiatry, 3: e216.
52. Neumann, I.D., Veenema, A.H., Beiderbeck, D.I., (2010). Aggression and anxiety: social context and neurobiological links. Frontiers in behavioral neuroscience, 4: 12.
53. Veenema, A.H., Blume, A., Niederle, D., Buwalda, B., Neumann, I.D., (2006). Effects of early life stress on adult male aggression and hypothalamic vasopressin and serotonin. Eur J Neurosci, 24: 1711-1720.
54. Bibancos, T., Jardim, D.L., Aneas, I., Chiavegatto, S., (2007). Social isolation and expression of serotonergic neurotransmission-related genes in several brain areas of male mice. Genes, brain, and behavior, 6: 529-539.
55. Cunningham, R.L., McGinnis, M.Y., (2008). Prepubertal social subjugation and anabolic androgenic steroid-induced aggression in male rats. J Neuroendocrinol, 20: 997-1005.
56. Fish, E.W., DeBold, J.F., Miczek, K.A., (2005). Escalated aggression as a reward: corticosterone and GABA(A) receptor positive modulators in mice. Psychopharmacology, 182: 116-127.
57. De Almeida, R.M., Rosa, M.M., Santos, D.M., Saft, D.M., Benini, Q., Miczek, K.A., (2006). 5-HT(1B) receptors, ventral orbitofrontal cortex, and aggressive behavior in mice. Psychopharmacology, 185: 441-450.
58. Ambar, G., Chiavegatto, S., (2009). Anabolic-androgenic steroid treatment induces behavioral disinhibition and downregulation of serotonin receptor messenger RNA in the prefrontal cortex and amygdala of male mice. Genes, brain, and behavior, 8: 161-173.

59. Ricci, L.A., Grimes, J.M., Knyshevski, I., Melloni, R.H., (2005). Repeated cocaine exposure during adolescence alters glutamic acid decarboxylase-65 (GAD65) immunoreactivity in hamster brain: correlation with offensive aggression. Brain Res, 1035: 131-138.
60. Cases, O., Seif, I., Grimsby, J., Gaspar, P., Chen, K., Pournin, S., Muller, U., Aguet, M., Babinet, C., Shih, J.C., et al., (1995). Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. Science, 268: 1763-1766.
61. de Boer, S.F., van der Vegt, B.J., Koolhaas, J.M., (2003). Individual variation in aggression of feral rodent strains: a standard for the genetics of aggression and violence? Behav Genet, 33: 485-501.
62. Haller, J., Halasz, J., Mikics, E., Kruk, M.R., (2004). Chronic glucocorticoid deficiency-induced abnormal aggression, autonomic hypoarousal, and social deficit in rats. J Neuroendocrinol, 16: 550-557.
63. Virkkunen, M., (1985). Urinary free cortisol secretion in habitually violent offenders. Acta psychiatrica Scandinavica, 72: 40-44.
64. Neigh, G.N., Gillespie, C.F., Nemeroff, C.B., (2009). The neurobiological toll of child abuse and neglect. Trauma, violence & abuse, 10: 389-410.
65. Chen, P., Coccaro, E.F., Lee, R., Jacobson, K.C., (2012). Moderating effects of childhood maltreatment on associations between social information processing and adult aggression. Psychological medicine, 42: 1293-1304.
66. Fone, K.C., Porkess, M.V., (2008). Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. Neurosci Biobehav Rev, 32: 1087-1102.
67. Lukkes, J.L., Watt, M.J., Lowry, C.A., Forster, G.L., (2009). Consequences of post-weaning social isolation on anxiety behavior and related neural circuits in rodents. Frontiers in behavioral neuroscience, 3: 18.
68. Veenema, A.H., (2009). Early life stress, the development of aggression and neuroendocrine and neurobiological correlates: what can we learn from animal models? Front Neuroendocrinol, 30: 497-518.
69. Potegal, M., Einon, D., (1989). Aggressive behaviors in adult rats deprived of playfighting experience as juveniles. Dev Psychobiol, 22: 159-172.

70. Wongwitdecha, N., Marsden, C.A., (1996). Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test. Behav Brain Res, 75: 27-32.
71. Von Frijtag, J.C., Schot, M., van den Bos, R., Spruijt, B.M., (2002). Individual housing during the play period results in changed responses to and consequences of a psychosocial stress situation in rats. Dev Psychobiol, 41: 58-69.
72. Tulogdi, A., Toth, M., Barsvari, B., Biro, L., Mikics, E., Haller, J., (2014). Effects of resocialization on post-weaning social isolation-induced abnormal aggression and social deficits in rats. Dev Psychobiol, 56: 49-57.
73. Gos, T., Becker, K., Bock, J., Malecki, U., Bogerts, B., Poeggel, G., Braun, K., (2006). Early neonatal and postweaning social emotional deprivation interferes with the maturation of serotonergic and tyrosine hydroxylase-immunoreactive afferent fiber systems in the rodent nucleus accumbens, hippocampus and amygdala. Neuroscience, 140: 811-821.
74. Helmeke, C., Ovtscharoff, W., Jr., Poeggel, G., Braun, K., (2001). Juvenile emotional experience alters synaptic inputs on pyramidal neurons in the anterior cingulate cortex. Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991), 11: 717-727.
75. Wang, Y.C., Ho, U.C., Ko, M.C., Liao, C.C., Lee, L.J., (2012). Differential neuronal changes in medial prefrontal cortex, basolateral amygdala and nucleus accumbens after postweaning social isolation. Brain structure & function, 217: 337-351.
76. Brown, S., Schafer, E.A., (1888). An investigation into the functions of the occipital and temporal lobes of the monkey's brain. Phil. Trans. R. Soc. (B) 179: 303-327.
77. Goltz, F.L., (1884). Ueber die Verrichtungen des Grosshirns: Fünfte Abhandlung. Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Thiere 34: 450–505.
78. Bard, P., (1928). A diencephalic mechanism for the expression of rage with special reference to the sympatheticnervous system. Am. J. Physiol., 84: 490-515.
79. Hess, W.R., Bruegger, M., (1943). Bruegger, Das subkortikale zentrum der affectiven abwehrreaktion. Helv. Physiol. Acta, 1: 1-33.
80. Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., (1968). Limbic lesions and reflexive fighting. J Comp Physiol Psychol, 66: 603-605.

81. Woodworth, C.H., (1971). Attack elicited in rats by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. Physiol Behav, 6: 345-353.
82. Panksepp, J., (1971). Aggression elicited by electrical stimulation of the hypothalamus in albino rats. Physiol Behav, 6: 321-329.
83. Koolhaas, J.M., (1978). Hypothalamically induced intraspecific aggressive behaviour in the rat. Exp Brain Res, 32: 365-375.
84. Kruk, M.R., Van der Poel, A.M., Meelis, W., Hermans, J., Mostert, P.G., Mos, J., Lohman, A.H., (1983). Discriminant analysis of the localization of aggression-inducing electrode placements in the hypothalamus of male rats. Brain Res, 260: 61-79.
85. Kruk, M.R., van der Poel, A.M., (1980). Is there evidence for a neural correlate of an aggressive behavioural system in the hypothalamus of the rat? Progress in brain research, 53: 385-390.
86. Halasz, J., Liposits, Z., Meelis, W., Kruk, M.R., Haller, J., (2002). Hypothalamic attack area-mediated activation of the forebrain in aggression. Neuroreport, 13: 1267-1270.
87. Haller, J., Abraham, I., Zelena, D., Juhasz, G., Makara, G.B., Kruk, M.R., (1998). Aggressive experience affects the sensitivity of neurons towards pharmacological treatment in the hypothalamic attack area. Behavioural pharmacology, 9: 469-475.
88. Roeling, T.A., Veening, J.G., Kruk, M.R., Peters, J.P., Vermelis, M.E., Nieuwenhuys, R., (1994). Efferent connections of the hypothalamic "aggression area" in the rat. Neuroscience, 59: 1001-1024.
89. Toth, M., Fuzesi, T., Halasz, J., Tulogdi, A., Haller, J., (2010). Neural inputs of the hypothalamic "aggression area" in the rat. Behav Brain Res, 215: 7-20.
90. Wahlund, K., Kristiansson, M., (2009). Aggression, psychopathy and brain imaging - Review and future recommendations. International journal of law and psychiatry, 32: 266-271.
91. Anderson, N.E., Kiehl, K.A., (2012). The psychopath magnetized: insights from brain imaging. Trends in cognitive sciences, 16: 52-60.
92. Coccaro, E.F., Sripada, C.S., Yanowitch, R.N., Phan, K.L., (2011). Corticolimbic function in impulsive aggressive behavior. Biol Psychiatry, 69: 1153-1159.

93. Sagar, S.M., Sharp, F.R., Curran, T., (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. Science, 240: 1328-1331.

94. Kollack-Walker, S., Newman, S.W., (1995). Mating and agonistic behavior produce different patterns of Fos immunolabeling in the male Syrian hamster brain. Neuroscience, 66: 721-736.

95. Gammie, S.C., Nelson, R.J., (2001). cFOS and pCREB activation and maternal aggression in mice. Brain Res, 898: 232-241.

96. Hasen, N.S., Gammie, S.C., (2006). Maternal aggression: new insights from Egr-1. Brain Res, 1108: 147-156.

97. Haller, J., Toth, M., Halasz, J., De Boer, S.F., (2006). Patterns of violent aggression-induced brain c-fos expression in male mice selected for aggressiveness. Physiol Behav, 88: 173-182.

98. Ferris, C.F., Stolberg, T., Kulkarni, P., Murugavel, M., Blanchard, R., Blanchard, D.C., Febo, M., Brevard, M., Simon, N.G., (2008). Imaging the neural circuitry and chemical control of aggressive motivation. BMC Neurosci, 9: 111.

99. Delville, Y., De Vries, G.J., Ferris, C.F., (2000). Neural connections of the anterior hypothalamus and agonistic behavior in golden hamsters. Brain, behavior and evolution, 55: 53-76.

100. Kovács, K.J., (2008). Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. J Neuroendocrinol, 20: 665-672.

101. Kovacs, K.J., (1998). c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. Neurochemistry international, 33: 287-297.

102. Roth, B.L., (2016). DREADDs for Neuroscientists. Neuron, 89: 683-694.

103. Tye, K.M., Deisseroth, K., (2012). Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. Nature reviews. Neuroscience, 13: 251-266.

104. Yizhar, O., Fenno, L.E., Davidson, T.J., Mogri, M., Deisseroth, K., (2011). Optogenetics in neural systems. Neuron, 71: 9-34.

105. Nelson, R.J., Trainor, B.C., (2007). Neural mechanisms of aggression. Nature reviews. Neuroscience, 8: 536-546.

106. Raine, A., Meloy, J.R., Bihrle, S., Stoddard, J., LaCasse, L., Buchsbaum, M.S., (1998). Reduced prefrontal and increased subcortical brain functioning assessed

using positron emission tomography in predatory and affective murderers. Behavioral sciences & the law, 16: 319-332.

107. Fulwiler, C.E., King, J.A., Zhang, N., (2012). Amygdala-orbitofrontal resting-state functional connectivity is associated with trait anger. Neuroreport, 23: 606-610.

108. Albert, D.J., Walsh, M.L., (1984). Neural systems and the inhibitory modulation of agonistic behavior: a comparison of mammalian species. Neurosci Biobehav Rev, 8: 5-24.

109. Miczek, K.A., Brykczynski, T., Grossman, S.P., (1974). Differential effects of lesions in the amygdala, periamygdaloid cortex, and stria terminalis on aggressive behaviors in rats. J Comp Physiol Psychol, 87: 760-771.

110. Brutus, M., Shaikh, M.B., Edinger, H., Siegel, A., (1986). Effects of experimental temporal lobe seizures upon hypothalamically elicited aggressive behavior in the cat. Brain Res, 366: 53-63.

111. Shaikh, M.B., Schubert, K., Siegel, A., (1994). Basal amygdaloid facilitation of midbrain periaqueductal gray elicited defensive rage behavior in the cat is mediated through NMDA receptors. Brain Res, 635: 187-195.

112. Shaikh, M.B., Steinberg, A., Siegel, A., (1993). Evidence that substance P is utilized in medial amygdaloid facilitation of defensive rage behavior in the cat. Brain Res, 625: 283-294.

113. Han, Y., Shaikh, M.B., Siegel, A., (1996). Medial amygdaloid suppression of predatory attack behavior in the cat: II. Role of a GABAergic pathway from the medial to the lateral hypothalamus. Brain Res, 716: 72-83.

114. Cheu, J.W., Siegel, A., (1998). GABA receptor mediated suppression of defensive rage behavior elicited from the medial hypothalamus of the cat: role of the lateral hypothalamus. Brain Res, 783: 293-304.

115. Potegal, M., Hebert, M., DeCoster, M., Meyerhoff, J.L., (1996). Brief, high-frequency stimulation of the corticomedial amygdala induces a delayed and prolonged increase of aggressiveness in male Syrian golden hamsters. Behav Neurosci, 110: 401-412.

116. Duncan, G.E., Inada, K., Farrington, J.S., Koller, B.H., Moy, S.S., (2009). Neural activation deficits in a mouse genetic model of NMDA receptor hypofunction in tests of social aggression and swim stress. Brain Res, 1265: 186-195.

117. Gobrogge, K.L., Liu, Y., Jia, X., Wang, Z., (2007). Anterior hypothalamic neural activation and neurochemical associations with aggression in pair-bonded male prairie voles. The Journal of comparative neurology, 502: 1109-1122.

118. Halász, J., Liposits, Z., Kruk, M.R., Haller, J., (2002). Neural background of glucocorticoid dysfunction-induced abnormal aggression in rats: involvement of fear- and stress-related structures. Eur J Neurosci, 15: 561-569.

119. Pan, Y., Xu, L., Young, K.A., Wang, Z., Zhang, Z., (2010). Agonistic encounters and brain activation in dominant and subordinate male greater long-tailed hamsters. Horm Behav, 58: 478-484.

120. Cheng, S.Y., Taravosh-Lahn, K., Delville, Y., (2008). Neural circuitry of play fighting in golden hamsters. Neuroscience, 156: 247-256.

121. Toth, M., Tulogdi, A., Biro, L., Soros, P., Mikics, E., Haller, J., (2012). The neural background of hyper-emotional aggression induced by post-weaning social isolation. Behav Brain Res, 233: 120-129.

122. Hong, W., Kim, D.W., Anderson, D.J., (2014). Antagonistic control of social versus repetitive self-grooming behaviors by separable amygdala neuronal subsets. Cell, 158: 1348-1361.

123. Naftolin, F., Ryan, K.J., Petro, Z., (1971). Aromatization of androstenedione by the diencephalon. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 33: 368-370.

124. Unger, E.K., Burke, K.J., Jr., Yang, C.F., Bender, K.J., Fuller, P.M., Shah, N.M., (2015). Medial amygdalar aromatase neurons regulate aggression in both sexes. Cell reports, 10: 453-462.

125. Haller, J., (2013). The neurobiology of abnormal manifestations of aggression--a review of hypothalamic mechanisms in cats, rodents, and humans. Brain Res Bull, 93: 97-109.

126. Bejjani, B.P., Houeto, J.L., Hariz, M., Yelnik, J., Mesnage, V., Bonnet, A.M., Pidoux, B., Dormont, D., Cornu, P., Agid, Y., (2002). Aggressive behavior

induced by intraoperative stimulation in the triangle of Sano. Neurology, 59: 1425-1427.

127. Rosa, M., Franzini, A., Giannicola, G., Messina, G., Altamura, A.C., Priori, A., (2012). Hypothalamic oscillations in human pathological aggressiveness. Biol Psychiatry, 72: e33-35.

128. Dieckmann, G., Schneider-Jonietz, B., Schneider, H., (1988). Psychiatric and neuropsychological findings after stereotactic hypothalamotomy, in cases of extreme sexual aggressivity. Acta neurochirurgica. Supplementum, 44: 163-166.

129. Ramamurthi, B., (1988). Stereotactic operation in behaviour disorders. Amygdalotomy and hypothalamotomy. Acta neurochirurgica. Supplementum, 44: 152-157.

130. Sano, K., Mayanagi, Y., Sekino, H., Ogashiwa, M., Ishijima, B., (1970). Results of stimulation and destruction of the posterior hypothalamus in man. Journal of neurosurgery, 33: 689-707.

131. Schvarcz, J.R., Driollet, R., Rios, E., Betti, O., (1972). Stereotactic hypothalamotomy for behaviour disorders. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 35: 356-359.

132. Lammers, J.H., Kruk, M.R., Meelis, W., van der Poel, A.M., (1988). Hypothalamic substrates for brain stimulation-induced attack, teeth-chattering and social grooming in the rat. Brain Res, 449: 311-327.

133. Kruk, M.R., van der Poel, A.M., de Vos-Frerichs, T.P., (1979). The induction of aggressive behaviour by electrical stimulation in the hypothalamus of male rats. Behaviour, 70: 292-322.

134. Lin, D., Boyle, M.P., Dollar, P., Lee, H., Lein, E.S., Perona, P., Anderson, D.J., (2011). Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. Nature, 470: 221-226.

135. Lee, H., Kim, D.W., Remedios, R., Anthony, T.E., Chang, A., Madisen, L., Zeng, H., Anderson, D.J., (2014). Scalable control of mounting and attack by Esr1 neurons in the ventromedial hypothalamus. Nature.

136. Falkner, A.L., Lin, D., (2014). Recent advances in understanding the role of the hypothalamic circuit during aggression. Frontiers in systems neuroscience, 8: 168.

137. Falkner, A.L., Dollar, P., Perona, P., Anderson, D.J., Lin, D., (2014). Decoding ventromedial hypothalamic neural activity during male mouse aggression. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 34: 5971-5984.

138. Kruk, M.R., (1991). Ethology and pharmacology of hypothalamic aggression in the rat. Neurosci Biobehav Rev, 15: 527-538.

139. Comoli, E., Ribeiro-Barbosa, E.R., Negrão, N., Goto, M., Canteras, N.S., (2005). Functional mapping of the prosencephalic systems involved in organizing predatory behavior in rats. Neuroscience, 130: 1055-1067.

140. Bandler, R.J., (1970). Cholinergic synapses in the lateral hypothalamus for the control of predatory aggression in the rat. Brain Res, 20: 409-424.

141. Vergnes, M., Karli, P., (1969). Interspecific rat-mice agression behavior: effects of electric stimulation of the lateral hypothalamus, amygdala and hypopocampus. Journal de physiologie, 61 Suppl 2: 425.

142. Canteras, N.S., Simerly, R.B., Swanson, L.W., (1995). Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. The Journal of comparative neurology, 360: 213-245.

143. Dong, H.W., Swanson, L.W., (2004). Projections from bed nuclei of the stria terminalis, posterior division: implications for cerebral hemisphere regulation of defensive and reproductive behaviors. The Journal of comparative neurology, 471: 396-433.

144. Egger, M.D., Flynn, J.P., (1962). Amygdaloid suppression of hypothalamically elicited attack behavior. Science, 136: 43-44.

145. Egger, M.D., Flynn, J.P., (1963). Effects of Electrical Stimulation of the Amygdala on Hypothalamically Elicited Attack Behavior in Cats. J Neurophysiol, 26: 705-720.

146. Petrovich, G.D., Canteras, N.S., Swanson, L.W., (2001). Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. Brain research. Brain research reviews, 38: 247-289.

147. Ono, T., Luiten, P.G., Nishijo, H., Fukuda, M., Nishino, H., (1985). Topographic organization of projections from the amygdala to the hypothalamus of the rat. Neurosci Res, 2: 221-238.

148. Bandler, R., Shipley, M.T., (1994). Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? Trends Neurosci, 17: 379-389.
149. Behbehani, M.M., (1995). Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. Progress in neurobiology, 46: 575-605.
150. Gabbott, P.L., Warner, T.A., Jays, P.R., Salway, P., Busby, S.J., (2005). Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. The Journal of comparative neurology, 492: 145-177.
151. Sesack, S.R., Deutch, A.Y., Roth, R.H., Bunney, B.S., (1989). Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. The Journal of comparative neurology, 290: 213-242.
152. Hoover, W.B., Vertes, R.P., (2007). Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. Brain structure & function, 212: 149-179.
153. Rose, J.E., Woolsey, C.N., (1948). The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat. Research publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease, 27 (1 vol.): 210-232.
154. Uylings, H.B., van Eden, C.G., (1990). Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. Progress in brain research, 85: 31-62.
155. Potegal, M., (2012). Temporal and frontal lobe initiation and regulation of the top-down escalation of anger and aggression. Behav Brain Res, 231: 386-395.
156. Barbas, H., (2007). Specialized elements of orbitofrontal cortex in primates. Annals of the New York Academy of Sciences, 1121: 10-32.
157. Ongur, D., Price, J.L., (2000). The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991), 10: 206-219.
158. Uylings, H.B., Groenewegen, H.J., Kolb, B., (2003). Do rats have a prefrontal cortex? Behav Brain Res, 146: 3-17.

159. Price, J.L., (2007). Definition of the orbital cortex in relation to specific connections with limbic and visceral structures and other cortical regions. Annals of the New York Academy of Sciences, 1121: 54-71.

160. Bicks, L.K., Koike, H., Akbarian, S., Morishita, H., (2015). Prefrontal Cortex and Social Cognition in Mouse and Man. Frontiers in psychology, 6: 1805.

161. Van De Werd, H.J., Uylings, H.B., (2008). The rat orbital and agranular insular prefrontal cortical areas: a cytoarchitectonic and chemoarchitectonic study. Brain structure & function, 212: 387-401.

162. Jankowski, M.P., Sesack, S.R., (2004). Prefrontal cortical projections to the rat dorsal raphe nucleus: ultrastructural features and associations with serotonin and gamma-aminobutyric acid neurons. The Journal of comparative neurology, 468: 518-529.

163. Radley, J.J., Gosselink, K.L., Sawchenko, P.E., (2009). A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 29: 7330-7340.

164. Szczepanski, S.M., Knight, R.T., (2014). Insights into human behavior from lesions to the prefrontal cortex. Neuron, 83: 1002-1018.

165. Rudebeck, P.H., Walton, M.E., Millette, B.H., Shirley, E., Rushworth, M.F., Bannerman, D.M., (2007). Distinct contributions of frontal areas to emotion and social behaviour in the rat. Eur J Neurosci, 26: 2315-2326.

166. Roy, M., Shohamy, D., Wager, T.D., (2012). Ventromedial prefrontal-subcortical systems and the generation of affective meaning. Trends in cognitive sciences, 16: 147-156.

167. Ascoli, G.A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S.A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsaki, G., Cauli, B., Defelipe, J., Fairen, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fregnac, Y., Freund, T.F., Gardner, D., Gardner, E.P., Goldberg, J.H., Helmstaedter, M., Hestrin, S., Karube, F., Kisvarday, Z.F., Lambolez, B., Lewis, D.A., Marin, O., Markram, H., Munoz, A., Packer, A., Petersen, C.C., Rockland, K.S., Rossier, J., Rudy, B., Somogyi, P., Staiger, J.F., Tamas, G., Thomson, A.M., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., West, D.C., Yuste,

R., (2008). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. Nature reviews. Neuroscience, 9: 557-568.

168. DeFelipe, J., Lopez-Cruz, P.L., Benavides-Piccione, R., Bielza, C., Larranaga, P., Anderson, S., Burkhalter, A., Cauli, B., Fairen, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fitzpatrick, D., Freund, T.F., Gonzalez-Burgos, G., Hestrin, S., Hill, S., Hof, P.R., Huang, J., Jones, E.G., Kawaguchi, Y., Kisvarday, Z., Kubota, Y., Lewis, D.A., Marin, O., Markram, H., McBain, C.J., Meyer, H.S., Monyer, H., Nelson, S.B., Rockland, K., Rossier, J., Rubenstein, J.L., Rudy, B., Scanziani, M., Shepherd, G.M., Sherwood, C.C., Staiger, J.F., Tamas, G., Thomson, A., Wang, Y., Yuste, R., Ascoli, G.A., (2013). New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. Nature reviews. Neuroscience, 14: 202-216.

169. Freund, T.F., Katona, I., (2007). Perisomatic inhibition. Neuron, 56: 33-42.

170. Kvitsiani, D., Ranade, S., Hangya, B., Taniguchi, H., Huang, J.Z., Kepecs, A., (2013). Distinct behavioural and network correlates of two interneuron types in prefrontal cortex. Nature, 498: 363-366.

171. Lee, A.T., Vogt, D., Rubenstein, J.L., Sohal, V.S., (2014). A class of GABAergic neurons in the prefrontal cortex sends long-range projections to the nucleus accumbens and elicits acute avoidance behavior. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 34: 11519-11525.

172. Romanski, L.M., Tian, B., Fritz, J., Mishkin, M., Goldman-Rakic, P.S., Rauschecker, J.P., (1999). Dual streams of auditory afferents target multiple domains in the primate prefrontal cortex. Nature neuroscience, 2: 1131-1136.

173. Little, J.P., Carter, A.G., (2012). Subcellular synaptic connectivity of layer 2 pyramidal neurons in the medial prefrontal cortex. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 32: 12808-12819.

174. Alitto, H.J., Usrey, W.M., (2003). Corticothalamic feedback and sensory processing. Current opinion in neurobiology, 13: 440-445.

175. Vertes, R.P., (2006). Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. Neuroscience, 142: 1-20.

176. Cruikshank, S.J., Ahmed, O.J., Stevens, T.R., Patrick, S.L., Gonzalez, A.N., Elmaleh, M., Connors, B.W., (2012). Thalamic control of layer 1 circuits in

prefrontal cortex. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 32: 17813-17823.

177. Hahn, J.D., Swanson, L.W., (2010). Distinct patterns of neuronal inputs and outputs of the juxtaparaventricular and suprafornical regions of the lateral hypothalamic area in the male rat. Brain research reviews, 64: 14-103.

178. Hahn, J.D., Swanson, L.W., (2012). Connections of the lateral hypothalamic area juxtadorsomedial region in the male rat. The Journal of comparative neurology, 520: 1831-1890.

179. Blair, R.J., Cipolotti, L., (2000). Impaired social response reversal. A case of 'acquired sociopathy'. Brain : a journal of neurology, 123 (Pt 6): 1122-1141.

180. Brower, M.C., Price, B.H., (2001). Neuropsychiatry of frontal lobe dysfunction in violent and criminal behaviour: a critical review. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 71: 720-726.

181. Damasio, H., Grabowski, T., Frank, R., Galaburda, A.M., Damasio, A.R., (1994). The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. Science, 264: 1102-1105.

182. Grafman, J., Schwab, K., Warden, D., Pridgen, A., Brown, H.R., Salazar, A.M., (1996). Frontal lobe injuries, violence, and aggression: a report of the Vietnam Head Injury Study. Neurology, 46: 1231-1238.

183. Best, M., Williams, J.M., Coccaro, E.F., (2002). Evidence for a dysfunctional prefrontal circuit in patients with an impulsive aggressive disorder. Proc Natl Acad Sci U S A, 99: 8448-8453.

184. Blair, K.S., Newman, C., Mitchell, D.G., Richell, R.A., Leonard, A., Morton, J., Blair, R.J., (2006). Differentiating among prefrontal substrates in psychopathy: neuropsychological test findings. Neuropsychology, 20: 153-165.

185. Boccardi, M., Frisoni, G.B., Hare, R.D., Cavedo, E., Najt, P., Pievani, M., Rasser, P.E., Laakso, M.P., Aronen, H.J., Repo-Tiihonen, E., Vaurio, O., Thompson, P.M., Tiihonen, J., (2011). Cortex and amygdala morphology in psychopathy. Psychiatry research, 193: 85-92.

186. Finger, E.C., Marsh, A.A., Mitchell, D.G., Reid, M.E., Sims, C., Budhani, S., Kosson, D.S., Chen, G., Towbin, K.E., Leibenluft, E., Pine, D.S., Blair, J.R.,

(2008). Abnormal ventromedial prefrontal cortex function in children with psychopathic traits during reversal learning. Arch Gen Psychiatry, 65: 586-594.

187. Gregory, S., ffytche, D., Simmons, A., Kumari, V., Howard, M., Hodgins, S., Blackwood, N., (2012). The antisocial brain: psychopathy matters. Arch Gen Psychiatry, 69: 962-972.

188. Hazlett, E.A., New, A.S., Newmark, R., Haznedar, M.M., Lo, J.N., Speiser, L.J., Chen, A.D., Mitropoulou, V., Minzenberg, M., Siever, L.J., Buchsbaum, M.S., (2005). Reduced anterior and posterior cingulate gray matter in borderline personality disorder. Biol Psychiatry, 58: 614-623.

189. Tiihonen, J., Rossi, R., Laakso, M.P., Hodgins, S., Testa, C., Perez, J., Repo-Tiihonen, E., Vaurio, O., Soininen, H., Aronen, H.J., Kononen, M., Thompson, P.M., Frisoni, G.B., (2008). Brain anatomy of persistent violent offenders: more rather than less. Psychiatry research, 163: 201-212.

190. Lapierre, D., Braun, C.M., Hodgins, S., (1995). Ventral frontal deficits in psychopathy: neuropsychological test findings. Neuropsychologia, 33: 139-151.

191. Serper, M., Beech, D.R., Harvey, P.D., Dill, C., (2008). Neuropsychological and symptom predictors of aggression on the psychiatric inpatient service. Journal of clinical and experimental neuropsychology, 30: 700-709.

192. King, J.A., Blair, R.J., Mitchell, D.G., Dolan, R.J., Burgess, N., (2006). Doing the right thing: a common neural circuit for appropriate violent or compassionate behavior. Neuroimage, 30: 1069-1076.

193. Lotze, M., Veit, R., Anders, S., Birbaumer, N., (2007). Evidence for a different role of the ventral and dorsal medial prefrontal cortex for social reactive aggression: An interactive fMRI study. Neuroimage, 34: 470-478.

194. Montag, C., Weber, B., Trautner, P., Newport, B., Markett, S., Walter, N.T., Felten, A., Reuter, M., (2012). Does excessive play of violent first-person-shooter-video-games dampen brain activity in response to emotional stimuli? Biological psychology, 89: 107-111.

195. New, A.S., Hazlett, E.A., Newmark, R.E., Zhang, J., Triebwasser, J., Meyerson, D., Lazarus, S., Trisdorfer, R., Goldstein, K.E., Goodman, M., Koenigsberg, H.W., Flory, J.D., Siever, L.J., Buchsbaum, M.S., (2009). Laboratory induced

aggression: a positron emission tomography study of aggressive individuals with borderline personality disorder. Biol Psychiatry, 66: 1107-1114.

196. Pietrini, P., Guazzelli, M., Basso, G., Jaffe, K., Grafman, J., (2000). Neural correlates of imaginal aggressive behavior assessed by positron emission tomography in healthy subjects. The American journal of psychiatry, 157: 1772-1781.

197. de Bruin, J.P., van Oyen, H.G., Van de Poll, N., (1983). Behavioural changes following lesions of the orbital prefrontal cortex in male rats. Behav Brain Res, 10: 209-232.

198. De Bruin, J.P.C., (1990). Orbital prefrontal cortex, dopamine, and social-agonistic behavior of male long evans rats. Aggressive Behavior, 16: 231-248.

199. Siegel, A., Edinger, H., Dotto, M., (1975). Effects of electrical stimulation of the lateral aspect of the prefrontal cortex upon attack behavior in cats. Brain Res, 93: 473-484.

200. Kolb, B., Nonneman, A.J., (1974). Frontolimbic lesions and social behavior in the rat. Physiol Behav, 13: 637-643.

201. Izquierdo, A., Suda, R.K., Murray, E.A., (2005). Comparison of the effects of bilateral orbital prefrontal cortex lesions and amygdala lesions on emotional responses in rhesus monkeys. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 25: 8534-8542.

202. Machado, C.J., Bachevalier, J., (2006). The impact of selective amygdala, orbital frontal cortex, or hippocampal formation lesions on established social relationships in rhesus monkeys (Macaca mulatta). Behav Neurosci, 120: 761-786.

203. Halasz, J., Toth, M., Kallo, I., Liposits, Z., Haller, J., (2006). The activation of prefrontal cortical neurons in aggression--a double labeling study. Behav Brain Res, 175: 166-175.

204. Wall, V.L., Fischer, E.K., Bland, S.T., (2012). Isolation rearing attenuates social interaction-induced expression of immediate early gene protein products in the medial prefrontal cortex of male and female rats. Physiol Behav, 107: 440-450.

205. Ago, Y., Araki, R., Tanaka, T., Sasaga, A., Nishiyama, S., Takuma, K., Matsuda, T., (2013). Role of social encounter-induced activation of prefrontal serotonergic

systems in the abnormal behaviors of isolation-reared mice. Neuropsychopharmacology, 38: 1535-1547.

206. Caffrey, M.K., Nephew, B.C., Febo, M., (2010). Central vasopressin V1a receptors modulate neural processing in mothers facing intruder threat to pups. Neuropharmacology, 58: 107-116.

207. Takahashi, A., Nagayasu, K., Nishitani, N., Kaneko, S., Koide, T., (2014). Control of intermale aggression by medial prefrontal cortex activation in the mouse. PLoS One, 9: e94657.

208. Riga, D., Matos, M.R., Glas, A., Smit, A.B., Spijker, S., Van den Oever, M.C., (2014). Optogenetic dissection of medial prefrontal cortex circuitry. Frontiers in systems neuroscience, 8: 230.

209. Beiderbeck, D.I., Reber, S.O., Havasi, A., Bredewold, R., Veenema, A.H., Neumann, I.D., (2012). High and abnormal forms of aggression in rats with extremes in trait anxiety--involvement of the dopamine system in the nucleus accumbens. Psychoneuroendocrinology, 37: 1969-1980.

210. Floyd, N.S., Price, J.L., Ferry, A.T., Keay, K.A., Bandler, R., (2001). Orbitomedial prefrontal cortical projections to hypothalamus in the rat. The Journal of comparative neurology, 432: 307-328.

211. Hart, H., Rubia, K., (2012). Neuroimaging of child abuse: a critical review. Frontiers in human neuroscience, 6: 52.

212. Schubert, M.I., Porkess, M.V., Dashdorj, N., Fone, K.C., Auer, D.P., (2009). Effects of social isolation rearing on the limbic brain: a combined behavioral and magnetic resonance imaging volumetry study in rats. Neuroscience, 159: 21-30.

213. Day-Wilson, K.M., Jones, D.N., Southam, E., Cilia, J., Totterdell, S., (2006). Medial prefrontal cortex volume loss in rats with isolation rearing-induced deficits in prepulse inhibition of acoustic startle. Neuroscience, 141: 1113-1121.

214. Silva-Gomez, A.B., Rojas, D., Juarez, I., Flores, G., (2003). Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical and hippocampal pyramidal neurons in postweaning social isolation rats. Brain Res, 983: 128-136.

215. Alquicer, G., Morales-Medina, J.C., Quirion, R., Flores, G., (2008). Postweaning social isolation enhances morphological changes in the neonatal ventral

hippocampal lesion rat model of psychosis. Journal of chemical neuroanatomy, 35: 179-187.

216. Schiavone, S., Sorce, S., Dubois-Dauphin, M., Jaquet, V., Colaianna, M., Zotti, M., Cuomo, V., Trabace, L., Krause, K.H., (2009). Involvement of NOX2 in the development of behavioral and pathologic alterations in isolated rats. Biol Psychiatry, 66: 384-392.

217. Kaalund, S.S., Riise, J., Broberg, B.V., Fabricius, K., Karlsen, A.S., Secher, T., Plath, N., Pakkenberg, B., (2013). Differential expression of parvalbumin in neonatal phencyclidine-treated rats and socially isolated rats. Journal of neurochemistry, 124: 548-557.

218. Raine, A., Lencz, T., Bihrle, S., LaCasse, L., Colletti, P., (2000). Reduced prefrontal gray matter volume and reduced autonomic activity in antisocial personality disorder. Arch Gen Psychiatry, 57: 119-127; discussion 128-119.

219. Tebartz van Elst, L., Hesslinger, B., Thiel, T., Geiger, E., Haegele, K., Lemieux, L., Lieb, K., Bohus, M., Hennig, J., Ebert, D., (2003). Frontolimbic brain abnormalities in patients with borderline personality disorder: a volumetric magnetic resonance imaging study. Biol Psychiatry, 54: 163-171.

220. Yizhar, O., Fenno, L.E., Prigge, M., Schneider, F., Davidson, T.J., O'Shea, D.J., Sohal, V.S., Goshen, I., Finkelstein, J., Paz, J.T., Stehfest, K., Fudim, R., Ramakrishnan, C., Huguenard, J.R., Hegemann, P., Deisseroth, K., (2011). Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. Nature, 477: 171-178.

221. Wang, F., Zhu, J., Zhu, H., Zhang, Q., Lin, Z., Hu, H., (2011). Bidirectional control of social hierarchy by synaptic efficacy in medial prefrontal cortex. Science, 334: 693-697.

222. Paxinos, G., Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th Edition. Academic Press, San Diego, 1998.

223. Spivey, J.M., Shumake, J., Colorado, R.A., Conejo-Jimenez, N., Gonzalez-Pardo, H., Gonzalez-Lima, F., (2009). Adolescent female rats are more resistant than males to the effects of early stress on prefrontal cortex and impulsive behavior. Dev Psychobiol, 51: 277-288.

224. Chaudhry, F.A., Reimer, R.J., Bellocchio, E.E., Danbolt, N.C., Osen, K.K., Edwards, R.H., Storm-Mathisen, J., (1998). The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 18: 9733-9750.

225. Fremeau, R.T., Jr., Troyer, M.D., Pahner, I., Nygaard, G.O., Tran, C.H., Reimer, R.J., Bellocchio, E.E., Fortin, D., Storm-Mathisen, J., Edwards, R.H., (2001). The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. Neuron, 31: 247-260.

226. van Praag, H., Lucero, M.J., Yeo, G.W., Stecker, K., Heivand, N., Zhao, C., Yip, E., Afanador, M., Schroeter, H., Hammerstone, J., Gage, F.H., (2007). Plant-derived flavanol (-)epicatechin enhances angiogenesis and retention of spatial memory in mice. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 27: 5869-5878.

227. Aksic, M., Radonjic, N.V., Aleksic, D., Jevtic, G., Markovic, B., Petronijevic, N., Radonjic, V., Filipovic, B., (2013). Long-term effects of the maternal deprivation on the volume and number of neurons in the rat neocortex and hippocampus. Acta neurobiologiae experimentalis, 73: 394-403.

228. Sanada, L.S., Sato, K.L., Machado, N.L., Carmo Ede, C., Sluka, K.A., Fazan, V.P., (2014). Cortex glial cells activation, associated with lowered mechanical thresholds and motor dysfunction, persists into adulthood after neonatal pain. International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience, 35: 55-63.

229. Haller, J., Tóth, M., Halász, J., (2005). The activation of raphe serotonergic neurons in normal and hypoarousal-driven aggression: a double labeling study in rats. Behav Brain Res, 161: 88-94.

230. Liu, X.B., Jones, E.G., (1996). Localization of alpha type II calcium calmodulin-dependent protein kinase at glutamatergic but not gamma-aminobutyric acid (GABAergic) synapses in thalamus and cerebral cortex. Proc Natl Acad Sci U S A, 93: 7332-7336.

231. Menegola, M., Misonou, H., Vacher, H., Trimmer, J.S., (2008). Dendritic A-type potassium channel subunit expression in CA1 hippocampal interneurons. Neuroscience, 154: 953-964.

232. Wolansky, T., Pagliardini, S., Greer, J.J., Dickson, C.T., (2007). Immunohistochemical characterization of substance P receptor (NK(1)R)-expressing interneurons in the entorhinal cortex. The Journal of comparative neurology, 502: 427-441.

233. Blair, R.J., (2015). Psychopathic traits from an RDoC perspective. Current opinion in neurobiology, 30: 79-84.

234. Hosoya, Y., Matsushita, M., (1980). Cells of origin of the descending afferents to the lateral hypothalamic area in the rat, studied with the horseradish peroxidase method. Neuroscience letters, 18: 231-236.

235. Vertes, R.P., (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. Synapse, 51: 32-58.

236. Heidbreder, C.A., Groenewegen, H.J., (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. Neurosci Biobehav Rev, 27: 555-579.

237. Hrabovszky, E., Halasz, J., Meelis, W., Kruk, M.R., Liposits, Z., Haller, J., (2005). Neurochemical characterization of hypothalamic neurons involved in attack behavior: glutamatergic dominance and co-expression of thyrotropin-releasing hormone in a subset of glutamatergic neurons. Neuroscience, 133: 657-666.

238. Choi, G.B., Dong, H.W., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Swanson, L.W., Anderson, D.J., (2005). Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. Neuron, 46: 647-660.

239. Nishizuka, M., Pfaff, D.W., (1989). Intrinsic synapses in the ventromedial nucleus of the hypothalamus: an ultrastructural study. The Journal of comparative neurology, 286: 260-268.

240. Jennings, J.H., Rizzi, G., Stamatakis, A.M., Ung, R.L., Stuber, G.D., (2013). The inhibitory circuit architecture of the lateral hypothalamus orchestrates feeding. Science, 341: 1517-1521.

241. Berthoud, H.R., Munzberg, H., (2011). The lateral hypothalamus as integrator of metabolic and environmental needs: from electrical self-stimulation to opto-genetics. Physiol Behav, 104: 29-39.

242. Steffensen, S.C., Svingos, A.L., Pickel, V.M., Henriksen, S.J., (1998). Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 18: 8003-8015.

243. Myers, B., Carvalho-Netto, E., Wick-Carlson, D., Wu, C., Naser, S., Solomon, M.B., Ulrich-Lai, Y.M., Herman, J.P., (2016). GABAergic Signaling within a Limbic-Hypothalamic Circuit Integrates Social and Anxiety-Like Behavior with Stress Reactivity. Neuropsychopharmacology, 41: 1530-1539.

244. Stuber, G.D., Wise, R.A., (2016). Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. Nature neuroscience, 19: 198-205.

245. Yoshida, K., McCormack, S., Espana, R.A., Crocker, A., Scammell, T.E., (2006). Afferents to the orexin neurons of the rat brain. The Journal of comparative neurology, 494: 845-861.

246. Petrovich, G.D., (2018). Lateral Hypothalamus as a Motivation-Cognition Interface in the Control of Feeding Behavior. Frontiers in systems neuroscience, 12: 14.

247. Lazaridis, I., Tzortzi, O., Weglage, M., Martin, A., Xuan, Y., Parent, M., Johansson, Y., Fuzik, J., Furth, D., Fenno, L.E., Ramakrishnan, C., Silberberg, G., Deisseroth, K., Carlen, M., Meletis, K., (2019). A hypothalamus-habenula circuit controls aversion. Mol Psychiatry.

248. Trusel, M., Nuno-Perez, A., Lecca, S., Harada, H., Lalive, A.L., Congiu, M., Takemoto, K., Takahashi, T., Ferraguti, F., Mameli, M., (2019). Punishment-Predictive Cues Guide Avoidance through Potentiation of Hypothalamus-to-Habenula Synapses. Neuron.

249. Golden, S.A., Heshmati, M., Flanigan, M., Christoffel, D.J., Guise, K., Pfau, M.L., Aleyasin, H., Menard, C., Zhang, H., Hodes, G.E., Bregman, D., Khibnik, L., Tai, J., Rebusi, N., Krawitz, B., Chaudhury, D., Walsh, J.J., Han, M.H., Shapiro, M.L., Russo, S.J., (2016). Basal forebrain projections to the lateral habenula modulate aggression reward. Nature, 534: 688-692.

250. Yamamoto, R., Ahmed, N., Ito, T., Gungor, N.Z., Pare, D., (2018). Optogenetic Study of Anterior BNST and Basomedial Amygdala Projections to the Ventromedial Hypothalamus. eNeuro, 5.

251. Murugan, M., Jang, H.J., Park, M., Miller, E.M., Cox, J., Taliaferro, J.P., Parker, N.F., Bhave, V., Hur, H., Liang, Y., Nectow, A.R., Pillow, J.W., Witten, I.B., (2017). Combined Social and Spatial Coding in a Descending Projection from the Prefrontal Cortex. Cell, 171: 1663-1677.e1616.

252. Adhikari, A., Lerner, T.N., Finkelstein, J., Pak, S., Jennings, J.H., Davidson, T.J., Ferenczi, E., Gunaydin, L.A., Mirzabekov, J.J., Ye, L., Kim, S.Y., Lei, A., Deisseroth, K., (2015). Basomedial amygdala mediates top-down control of anxiety and fear. Nature, 527: 179-185.

253. Yizhar, O., Klavir, O., (2018). Reciprocal amygdala-prefrontal interactions in learning. Current opinion in neurobiology, 52: 149-155.

254. McDonald, A.J., (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. Progress in neurobiology, 55: 257-332.

255. Glenn, A.L., Johnson, A.K., Raine, A., (2013). Antisocial personality disorder: a current review. Current psychiatry reports, 15: 427.

256. Veit, R., Lotze, M., Sewing, S., Missenhardt, H., Gaber, T., Birbaumer, N., (2010). Aberrant social and cerebral responding in a competitive reaction time paradigm in criminal psychopaths. Neuroimage, 49: 3365-3372.

257. Hashikawa, Y., Hashikawa, K., Falkner, A.L., Lin, D., (2017). Ventromedial Hypothalamus and the Generation of Aggression. Frontiers in systems neuroscience, 11: 94.

258. Saunders, B., Lin, H., Milyavskaya, M., Inzlicht, M., (2017). The emotive nature of conflict monitoring in the medial prefrontal cortex. International journal of psychophysiology : official journal of the International Organization of Psychophysiology, 119: 31-40.

259. Bonini, F., Burle, B., Liegeois-Chauvel, C., Regis, J., Chauvel, P., Vidal, F., (2014). Action monitoring and medial frontal cortex: leading role of supplementary motor area. Science, 343: 888-891.

260. Yang, T., Yang, C.F., Chizari, M.D., Maheswaranathan, N., Burke, K.J., Jr., Borius, M., Inoue, S., Chiang, M.C., Bender, K.J., Ganguli, S., Shah, N.M.,

(2017). Social Control of Hypothalamus-Mediated Male Aggression. Neuron, 95: 955-970.e954.

261. Falkner, A.L., Grosenick, L., Davidson, T.J., Deisseroth, K., Lin, D., (2016). Hypothalamic control of male aggression-seeking behavior. Nature neuroscience, 19: 596-604.

262. Sandi, C., Haller, J., (2015). Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms. Nature reviews. Neuroscience, 16: 290-304.

263. Morandotti, N., Dima, D., Jogia, J., Frangou, S., Sala, M., Vidovich, G.Z., Lazzaretti, M., Gambini, F., Marraffini, E., d'Allio, G., Barale, F., Zappoli, F., Caverzasi, E., Brambilla, P., (2013). Childhood abuse is associated with structural impairment in the ventrolateral prefrontal cortex and aggressiveness in patients with borderline personality disorder. Psychiatry research, 213: 18-23.

264. Fahim, C., He, Y., Yoon, U., Chen, J., Evans, A., Perusse, D., (2011). Neuroanatomy of childhood disruptive behavior disorders. Aggress Behav, 37: 326-337.

265. Boes, A.D., Tranel, D., Anderson, S.W., Nopoulos, P., (2008). Right anterior cingulate: a neuroanatomical correlate of aggression and defiance in boys. Behav Neurosci, 122: 677-684.

266. Sullivan, R.M., (2004). Hemispheric asymmetry in stress processing in rat prefrontal cortex and the role of mesocortical dopamine. Stress (Amsterdam, Netherlands), 7: 131-143.

267. Madeira, M.D., Pereira, A., Cadete-Leite, A., Paula-Barbosa, M.M., (1990). Estimates of volumes and pyramidal cell numbers in the prelimbic subarea of the prefrontal cortex in experimental hypothyroid rats. Journal of anatomy, 171: 41-56.

268. Pascual, R., Zamora-Leon, S.P., (2007). Chronic (-)-deprenyl administration attenuates dendritic developmental impairment induced by early social isolation in the rat. Developmental neuroscience, 29: 261-267.

269. Skupio, U., Tertil, M., Sikora, M., Golda, S., Wawrzczak-Bargiela, A., Przewlocki, R., (2015). Behavioral and molecular alterations in mice resulting from chronic treatment with dexamethasone: relevance to depression. Neuroscience, 286: 141-150.

270. Braun, K., Antemano, R., Helmeke, C., Buchner, M., Poeggel, G., (2009). Juvenile separation stress induces rapid region- and layer-specific changes in S100ss- and glial fibrillary acidic protein-immunoreactivity in astrocytes of the rodent medial prefrontal cortex. Neuroscience, 160: 629-638.

271. Hirono, N., Mega, M.S., Dinov, I.D., Mishkin, F., Cummings, J.L., (2000). Left frontotemporal hypoperfusion is associated with aggression in patients with dementia. Arch Neurol, 57: 861-866.

272. Goethals, I., Audenaert, K., Jacobs, F., Van den Eynde, F., Bernagie, K., Kolindou, A., Vervaet, M., Dierckx, R., Van Heeringen, C., (2005). Brain perfusion SPECT in impulsivity-related personality disorders. Behav Brain Res, 157: 187-192.

273. Herpertz, S.C., Sass, H., (2000). Emotional deficiency and psychopathy. Behavioral sciences & the law, 18: 567-580.

274. Schneider, F., Habel, U., Kessler, C., Posse, S., Grodd, W., Muller-Gartner, H.W., (2000). Functional imaging of conditioned aversive emotional responses in antisocial personality disorder. Neuropsychobiology, 42: 192-201.

275. Vollm, B., Richardson, P., McKie, S., Reniers, R., Elliott, R., Anderson, I.M., Williams, S., Dolan, M., Deakin, B., (2010). Neuronal correlates and serotonergic modulation of behavioural inhibition and reward in healthy and antisocial individuals. Journal of psychiatric research, 44: 123-131.

276. Jiang, Z., Cowell, R.M., Nakazawa, K., (2013). Convergence of genetic and environmental factors on parvalbumin-positive interneurons in schizophrenia. Frontiers in behavioral neuroscience, 7: 116.

277. Wong, L.C., Wang, L., D'Amour, J.A., Yumita, T., Chen, G., Yamaguchi, T., Chang, B.C., Bernstein, H., You, X., Feng, J.E., Froemke, R.C., Lin, D., (2016). Effective Modulation of Male Aggression through Lateral Septum to Medial Hypothalamus Projection. Current biology : CB, 26: 593-604.

278. Stagkourakis, S., Spigolon, G., Williams, P., Protzmann, J., Fisone, G., Broberger, C., (2018). A neural network for intermale aggression to establish social hierarchy. Nature neuroscience, 21: 834-842.

279. Gunaydin, L.A., Grosenick, L., Finkelstein, J.C., Kauvar, I.V., Fenno, L.E., Adhikari, A., Lammel, S., Mirzabekov, J.J., Airan, R.D., Zalocusky, K.A., Tye,

K.M., Anikeeva, P., Malenka, R.C., Deisseroth, K., (2014). Natural neural projection dynamics underlying social behavior. Cell, 157: 1535-1551.

280. Ghosh, K.K., Burns, L.D., Cocker, E.D., Nimmerjahn, A., Ziv, Y., Gamal, A.E., Schnitzer, M.J., (2011). Miniaturized integration of a fluorescence microscope. Nature methods, 8: 871-878.

281. Motzkin, J.C., Newman, J.P., Kiehl, K.A., Koenigs, M., (2011). Reduced prefrontal connectivity in psychopathy. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 31: 17348-17357.

282. Hoppenbrouwers, S.S., Nazeri, A., de Jesus, D.R., Stirpe, T., Felsky, D., Schutter, D.J., Daskalakis, Z.J., Voineskos, A.N., (2013). White matter deficits in psychopathic offenders and correlation with factor structure. PLoS One, 8: e72375.

283. Wolf, R.C., Pujara, M.S., Motzkin, J.C., Newman, J.P., Kiehl, K.A., Decety, J., Kosson, D.S., Koenigs, M., (2015). Interpersonal traits of psychopathy linked to reduced integrity of the uncinate fasciculus. Human brain mapping, 36: 4202-4209.

284. Arruda-Carvalho, M., Wu, W.C., Cummings, K.A., Clem, R.L., (2017). Optogenetic Examination of Prefrontal-Amygdala Synaptic Development. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 37: 2976-2985.

11. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. Biro, L., Toth, M., Sipos, E., Bruzsik, B., Tulogdi, A., Bendahan, S., Sandi, C., Haller, J., (2017). Structural and functional alterations in the prefrontal cortex after post-weaning social isolation: relationship with species-typical and deviant aggression. Brain structure & function, 222: 1861-1875.**IF: 4.231.**
2. Biro, L., Sipos, E., Bruzsik, B., Farkas, I., Zelena, D., Balazsfi, D., Toth, M., Haller, J., (2018). Task Division within the Prefrontal Cortex: Distinct Neuron Populations Selectively Control Different Aspects of Aggressive Behavior via the Hypothalamus. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 38: 4065-4075.**IF: 5.971.**

A szerző egyéb közleményei

1. Tulogdi, A., Soros, P., Toth, M., Nagy, R., Biro, L., Aliczki, M., Klausz, B., Mikics, E., Haller, J., (2012). Temporal changes in c-Fos activation patterns induced by conditioned fear. Brain Res Bull, 88: 359-370.**IF: 2.935.**
2. Toth, M., Tulogdi, A., Biro, L., Soros, P., Mikics, E., Haller, J., (2012). The neural background of hyper-emotional aggression induced by post-weaning social isolation. Behav Brain Res, 233: 120-129. **IF: 3.327.**
3. Tulogdi, A., Toth, M., Barsvari, B., Biro, L., Mikics, E., Haller, J., (2014). Effects of resocialization on post-weaning social isolation-induced abnormal aggression and social deficits in rats. Dev Psychobiol, 56: 49-57. **IF: 3.307.**
4. Tulogdi, A., Biro, L., Barsvari, B., Stankovic, M., Haller, J., Toth, M., (2015). Neural mechanisms of predatory aggression in rats-implications for abnormal intraspecific aggression. Behav Brain Res, 283: 108-115. **IF: 3.002.**
5. Zelena, D., Mikics, E., Balazsfi, D., Varga, J., Klausz, B., Urban, E., Sipos, E., Biro, L., Miskolczi, C., Kovacs, K., Ferenczi, S., Haller, J., (2016). Enduring abolishment of remote but not recent expression of conditioned fear by the blockade of calcium-permeable AMPA receptors before extinction training. Psychopharmacology, 233: 2065-2076. **IF: 3.308.**

6. Mikics, E., Toth, M., Biro, L., Bruzsik, B., Nagy, B., Haller, J., (2017). The role of GluN2B-containing NMDA receptors in short- and long-term fear recall. Physiol Behav, 177: 44-48. **IF: 2.517.**
7. Mikics, E., Guirado, R., Umemori, J., Toth, M., Biro, L., Miskolczi, C., Balazsfi, D., Zelena, D., Castren, E., Haller, J., Karpova, N.N., (2018). Social Learning Requires Plasticity Enhanced by Fluoxetine Through Prefrontal Bdnf-TrkB Signaling to Limit Aggression Induced by Post-Weaning Social Isolation. Neuropsychopharmacology, 43: 235-245. **IF:6.544.**
8. Balogh, Z., Szente, L., Biro, L., Varga, Z.K., Haller, J., Aliczki, M., (2019). Endocannabinoid interactions in the regulation of acquisition of contextual conditioned fear. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 90: 84-91.**IF: 4.185.**

12. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Haller Józsefnek és Dr. Mikics Évának a lehetőségért, hogy az általuk vezetett kutatásokban részt vehettem, valamint hogy segítettek a tudományos kutatáshoz szükséges gondolkodásmód és képességek kifejlesztésében és azt, hogy tudományos kérdéseimmel mindig bátran fordulhattam hozzájuk. Dr. Tóth Máténak, Dr. Tulogdi Áronnak és Dr. Aliczki Manónak köszönöm az útmutatást és a türelmet, amelyet felém mutattak a metodikai és elméleti ismeretek elsajátítása során. Külön köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak: Dr. Balázsfi Diána, Balogh Zoltán, Barsvári Beáta, Bruzsik Bíborka, Dr. Demeter Kornél, Dr. Farkas Imre, Miskolczi Saiz Christina, Bodóné Dr. Sipos Eszter, Szebik Huba, Szente László, Varga Zoltán Kristóf, Venczkóné B. Nikoletta, Dr. Zelena Dóra, hogy egyrészt tudásukkal és tapasztalatukkal segítettek a mindennapokban, másrészt, hogy mindezt barátokként tették. Továbbá hálás köszönettel tartozom a Magatartás Neurobiológiai Osztály többi munkatársának is.

Köszönettel tartozom Dr. Barna Lászlónak és Dr. Pongor Csabának a mikroszkópos képalkotás kivitelezésében nyújtott segítségükért.

Köszönöm továbbá a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet többi munkatársának, hogy szükség esetén mindig a segítségemre voltak.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Doktori Titkárság munkatársainak odaadó munkáját, amellyel a doktori képzést szervezik, és bármilyen adminisztratív kérdés esetén készségesen rendelkezésemre álltak.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni szüleimnek, társamnak, testvéremnek, rokonaimnak és barátaimnak, hogy szeretetük és biztatásuk végigkísért doktori munkám és a disszertációm elkészítése során.