

XXXII. OTDK Biológia Szekció

A patkány prefrontális kérgének struktúrális, funkcionális, epigenetikai vizsgálata a szociális izoláció indukálta abnormális agresszióban

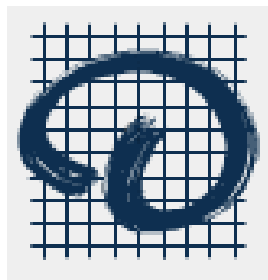
Szerző: **Biró László**

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, MSc Biológia II. évfolyam

MTA, Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Magatartás Neurobiológiai Osztály

Témavezetők: **Dr. Haller József**, MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

Dr. Mikics Éva, MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet



Budapest, 2014

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	2
2. Bevezető	3
2.1. Felvetés.....	3
2.2. Az agresszív magatartás	3
2.3. Mitől abnormális az agresszió?	4
2.4. A reaktív (emocionális) agresszió	5
2.5. Az agresszió laboratóriumi modellezése	5
2.6. A korai szociális környezet hatása az agresszióra	6
2.7. A prefrontális kéreg szerepe az agresszió szabályozásában.....	7
2.8. A korai szociális környezet hatása az epigenetikai mechanizmusokra.....	9
3. Célkitűzések	10
4. Anyag és módszer	10
4.1. Az állatok tartási körülményei	10
4.2. Viselkedés vizsgálat: rezidens-betolakodó teszt	11
4.3. Szöveti eljárások: immunhisztokémia	12
4.4. A mediális prefrontális kéreg területének kvantifikálása.....	13
4.5. Immunhisztokémiai jelölések kvantitatív analízise	13
4.6. Valós idejű, kvantitatív PCR.....	14
4.6.1. RNS izolálás.....	14
4.6.2. Reverz transzkripció	14
4.6.3. DNS amplifikálás	14
4.7. Statisztika.....	15
5. Eredmények	15
5.1. A korai szociális izolációhoz társuló magatartási változások	15
5.2. A korai szociális izoláció által indukált struktúrális változások.....	16
5.3. Az infralimbikus és prelimbikus kéreg neuronális változásai agresszív interakció hatására ..	18

5.4. A korai szociális izoláció indukálta epigenetikai változások	19
6. Értékelés	20
7. Összefoglaló	22
8. Szerzői hozzájárulás.....	22
9. Köszönetnyilvánítás	22
10. Irodalomjegyzék	23

2. Bevezető

2.1. Felvetés

Averzív szociális környezetben felnövő - bántalmazást, elszorított, szociálisan elhanyagolt - gyermekek felnőttkorukban nagyobb eséllyel mutatnak pszichopatológias vonásokat, melyek jellegzetes tünetei a szorongás, a megnövekedett stresszválasz, antiszociális viselkedés és a fokozott hajlam az agresszióra [1-6]. Ezek a viselkedésszerű változások olyan strukturális, funkcionális és epigenetikai változásokra vezethetők vissza, amelyek a szorongás és agresszió kontrolljában releváns agyterületeket (prefrontális kéreg, amygdala) érintenek [7-10]. A szociális elhanyagoltság az egyik fő tényező, mely kedvezőtlen hatással van az idegrendszeri fejlődés menetére, különösen gyermekkorban. [1, 2, 11]. Emberben a súlyos pszichopatológiák, különösen az agresszióval járó pszichés rendellenességek idegrendszeri hátterének tanulmányozása korlátozott, ezért ezeket a mechanizmusokat csak megfelelő állatmodellek segítségével tudjuk megérteni.

2.2. Az agresszív magatartás

Habár az agresszió egy elemi viselkedésforma meghatározását mégis többféleképpen lehet megragadni. Mivel a jelen dolgozat a humán agresszivitás hátterében álló mechanizmusokat igyekszik feltárni laboratóriumi állatmodellek alkalmazásával, így fenomenológiai és funkcionális szempontból definiáljuk ezen viselkedésformát. Fenomenológiai meghatározás szempontjából agresszió azon viselkedésforma, amelynek célja egy másik élő szervezet számára károsodás, hátrány, illetve sérülés okozása [12, 13]. A másik, funkcionális (etológiai-evolúciós) szempontokon alapuló definíció jobban megragadja mindezt, amikor az agresszivitást az azonos fajú egyedek között, a korlátozott erőforrások (táplálék, nemi partner, terület, búvóhely, stb.) megszerzéséért folytatott magatartásként

értelmezi [14]. Következésképp a túlélés szempontjából szükségszerű és adaptív, s noha jelentős energia (idő, energia) és kockázatvállalás (sérülések) ráfordításával társul hatékony módja a forrásfelosztásnak. Az agresszív interakció az evolúció során ritualizálódott ezzel mérsékelve az említett befektetéseket.

Az agresszív magatartás nem egy egységes jelenség, sokféle megnyilvánulási formája van, ezért különféle jellegek alapján többféleképpen csoportosítható. Emberknél elkülöníthetünk direkt fizikai, verbális, és indirekt agressziót [15, 16]. A direkt fizikai agresszió az ellenfél fizikai sérülésével jár, míg a verbális agresszió az ellenfél megfélemlítésére irányul. Az indirekt agresszió legtöbbször szociális manipulációt (pl. rosszindulatú intrikák) jelent, amely pszichológiai értelemben okoz károsodást (csökkent szociális státusz) [15]. Újabban, a humán agresszív magatartás leginkább elfogadottabb, leggyakrabban használt osztályozása az azt kiváltó ok, illetve az ahhoz társuló emocionális háttéren alapszik. Ez alapján elkülönítettek proaktív (hidegvérű, instrumentális), valamint reaktív (érzelmi) agressziótípusokat [17-19]. A proaktív (hidegvérű, instrumentális) agresszió célorientált, tervszerű, kontrollált viselkedés. Általában csökkent érzelmi működésekkel, stressz reaktivitással és vegetatív funkcióval jár együtt [19]. A reaktív (érzelmi) agresszió egy kihívásra (provokációra, fenyegetésre) adott reakció, amely legtöbbször kontrollálatlan dühkitörések formájában jelenik meg. Erre az agresszióformára túlzott érzelmi működések, valamint a stressz és vegetatív működések fokozódása jellemző [18].

2.3. Mitől abnormális az agresszió?

Amennyiben az agresszió a fajspecifikus szabályokon belül marad, akkor ritualizációhoz vezet, amely megelőzi a veszteségek és sérülések minimalizálását, így adaptívnek tekinthető. A fentebb említett indirekt és verbális agresszió verseny helyzetekben normálisnak tekinthető mivel adaptív előnyhöz jutathatja az agresszort. Ezzel ellenben, amikor az agresszív magatartás a kontextusnak nem megfelelő módon és mértékben mutatkozik meg, akkor abnormálisnak titulálható. Következésképp a direkt fizikai agresszió egy mindennapos élethelyzetben (munkahely, iskola) abnormálisnak tekinthető, míg bizonyos társas és szociális helyzetekben elfogadott, szükségszerű (rendőrség, katonaság), sőt akár megkövetelt is lehet bizonyos sportágak esetén (küzdősportok). Következésképp abnormális az agresszió, ha nem adekvát az adott szociális helyzetben, illetve ha a kontextusnak nem megfelelő módon és mértékben fejeződik ki. A különböző pszichiátriai kórképek gyakori eleme a túlzott, felfokozott agresszív magatartás, amely akkor tekinthető abnormálisnak, ha a személy életvitelében vagy környezetének problémát okoz [20]. Az abnormális agresszió több

pszichiátriai rendellenességnek központi (pl. antiszociális személyiségzavar, időszakos explozív zavar), míg másoknál az elsődleges kórképhez társuló másodagos elemként jelenik meg (skizofrénia, poszttraumatikus stressz zavar) [20]. Összességében, akkor mondhatjuk abnormálisnak az agressziót, ha figyelmen kívül hagyja a társadalmi-, és jogszabályokat, illetve ha pszichopatológiához asszociálódik [21].

2.4. A reaktív (emocionális) agresszió

A fentebb írottakkal illeszkedően a kóros agresszió is besorolható proaktív (instrumentális) és reaktív (emocionális) altípusba. A proaktív agresszió kontrollált, célorientált, átgondolt, gyakran előre megtervezett magatartás, míg ezzel ellentétben a reaktív agresszió nem kontrollált, magasabb érzelmi szinttel társuló, sokszor kitörésszerűen, hirtelen meggondolásból elkövetett magatartás [17-19, 22]. Mivel a dolgot a kóros reaktív agresszió köré szerveződik, ezért ennek a részletesebb taglalása következik. Ezen altípust a vegetatív izgalmi szinthez (*arousal*) képesti (*hiperarousal*) jellemzi, ami fokozott szívfrekvencia- és vérnyomásértékekben mutatkozik meg. Számos kórkép hordozza a reaktív *hiperarousallal* társuló karakterisztikákat, úgymint az időszakos explozív zavar, a borderline személyiségzavar és a poszttraumatikus stressz rendellenesség (PTSD) [23-25]. A *hiperarousal* fokozott stresszreaktivitással jár együtt, így hajlamosít a provokáció, illetve frusztráció kiváltotta impulzív kitörésekre [17-19]. Fontos megjegyezni, hogy az abnormális agresszió proaktív és reaktív altípusai a neurális mechanizmusait tekintve is különböznek, amely feltárásában alapvető szerepet játszottak a laboratórium kísérletes eredmények [21, 26].

2.5. Az agresszió laboratóriumi modellezése

Kezdetben az agresszió laboratóriumi kutatása a normális agresszív magatartás mennyiségi jellegeinek (harapások száma) leírására fókuszált, amely folyamán a legtöbbet a területiális agressziót tanulmányozták a rezidens-betolakódó paradigmával [27, 28]. A macskákon és a patkányokon végzett kísérletek (lokális léziók és farmakológiai kezelések) kirajolták azon főbb agyrégiókat, amelyek részt vesznek az agresszió szabályozásában [28]. Később elfogadottá vált az a tudományos nézet, hogy a pszichopatológiai rendellenességek nem a normális magatartáselemek túlzott megnyilvánulásai, hanem komoly idegrendszeri abnormalitásokkal járó kondíciók. Ekkor az új kezelési stratégiák kidolgozásában nagy szerepet kaptak azok a preklinikai kísérletek, amelyeket az abnormális agresszív viselkedés releváns, érvényesített állatmodelljein végeztek el [21]. Ezen új állatmodellek már konstrukciós és prediktív szempontból is jobban megfeleltethetőek a pszichiátriai kórképeknek [21, 26]. Az alábbi modelleket karakterizálták részletességgel: genetikailag

szelektált hiperagresszív egértörzs [29], szociális ösztönzés hajtotta agresszív viselkedés [30], glukokortikoid deficiencia indukálta abnormális agresszió patkányban [31, 32], korai nem szociális stresszor indukálta kóros agresszió [33] és korai szociális izoláció indukálta abnormális agresszió [5, 6, 34, 35].

A kutatócsoportunk által kifejlesztett glukokortikoid deficiencia- és korai szociális izoláció indukálta abnormális agresszió modellek karakterizálása során (a többi modelltől eltérően) külön figyelmet szenteltünk az agresszív viselkedés mennyiségi jellegei mellett (harapások száma), a minőségi jellegeinek az tanulmányozására is [5, 6, 31, 32, 34]. Nevezetesen, a fenti vizsgálatok során abnormalitás jelent meg a fajra jellemző viselkedési szabályok megszegésével, amikor a vizsgált egyedek saját territóriumukon sérülékeny testrészeket támadtak, egy náluk meglehetősen kisebb ellenféllel szemben. Ilyen szituációban, normális esetben az offenzív típusú támadás jellemző (fenyegetést követően a háti régiók támadása), nem pedig az életveszélyes helyzetekben előforduló defenzív jellegű támadás (hasi, feji és nyaki régió támadása). Az izoláltan nevelkedett patkányok ezen abnormális harapási mintázatát fokozott stresszválasz kísérte (agresszív interakcióra) [5, 6], amely komoly hasonlóságot mutat a humán reaktív (emocionális) agresszióval társuló pszichopatológiákkal, amelyek hátterében különösen gyakran a korai szociális élet során átélt elhanyagolás és bántalmazás áll [1-4, 11].

2.6. A korai szociális környezet hatása az agresszióra

Azok a gyerekek, akik averzív szociális környezetben (bántalmazás, elhanyagolás) nevelkedtek fel, nagyobb eséllyel vannak kitéve pszichopatológiai változásoknak felnőttkorukban. Jellemző tünetek a fokozott szorongás, antiszociális viselkedés és a fokozott hajlam az erőszakosságra, amelyek hátterében gyenge emocionális önkontroll áll [1-3]. Ezenkívül az agresszióval kapcsolatos szimptómák komolysága összefüggést mutat a gyermekkorában tapasztalt szociális zavarok mértékével [36], valamint a stressz rendszer fokozott reaktivitása is komoly kockázatot jelent a magatartási zavarok szempontjából [17-19].

A korai szociális viszonyok zavarait vizsgáló elterjedt laboratóriumi állatmodell az anyától való elválasztást követő, felnőtt korig tartó szociális izoláció [37-39]. Az izoláltan felnevelkedett rágcsálókban számos hosszú távú változás alakul ki: eltérő tömeggyarapodás, fokozott érdeklődés új környezetben, megnövekedett szenzomotoros érzékenység (deficit az összerezzenési reakció gátlásában), emelkedett szorongás, valamint a térbeli emlékezés és az új tárgyak felismerésének gyengülése [37]. Ezek mellett számos tanulmány eredménye szerint

az izolált állatokat fokozott agresszió és csökkent szociális kapcsolatteremtési képesség jellemzi [40-42]. Kutatócsoportunk korábban elsőként kimutatta, hogy izoláltan nevelkedett patkányok agresszivitása nemcsak mennyiségileg (harapások számának növekedése), hanem minőségileg (sérülékeny testrészekre irányuló harapások: fej, torok, has) is abnormális szintet mutat, amely a szociális kommunikáció markáns zavaival – a támadások előrejelzésének hiányával és a védekező magatartás paradox megemelkedésével – társul [5]. A felsorolt viselkedésbeli rendellenességeket az agresszív interakció által kiváltott túlzott glukokortikoid elválasztás és szívritmus emelkedés kísérte, amely az állatok felfokozott emocionális és vegetatív izgalmi szintjére (*arousal*) utal [6] és jól modellezi a korai averzív szociális környezet hatására megjelenő felnőttkori emocionális agressziót emberekben.

A felsorolt erőteljes viselkedési változások idegrendszeri háttere mindezekig nem teljesen tisztázott. Számos laboratóriumi tanulmány eredménye szerint a szociális izoláció jelentős hatást gyakorol az agresszivitást szabályozó kulcsfontosságú agyi területek (amygdala és prefrontális kéreg) struktúrájára és funkciójára [28, 43-46].

2.7. A prefrontális kéreg szerepe az agresszió szabályozásában

A prefrontális kéreg centrális szereppel bír a végrehajtó funkciók szervezésében és részt vesz számos kognitív, magatartásbeli, neuroendokrin és vegetatív folyamat szervezésében is, ezáltal a viselkedés tervezésében, kilakításában és szabályozásában [47, 48]. A fentieket alapul véve belátható, hogy a prefrontális kéreg feltételezhetően közreműködik az agresszív viselkedés szabályozásában. Ezt az állítást számos humán tanulmány is alátámasztja, melyek szerint a prefrontális kéreg sérülése a végrehajtó funkciók károsodása mellett (figyelmi zavarok, tervezési nehézségek, romlott munkamemória) komoly személyiségbeli változásokkal (impulzivitás, megromlott szociális kommunikáció), és gyakran súlyos kísérő tünetként megnövekedett agresszivitással jár [49-52]. A háttérben húzódó okok feltehetően a prefrontális kéreghez 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 [53-57]. A túlzott agresszióval társuló pszichiátriai kórképek többségében is (skizofrénia, fiatalkori magatartászavarok, borderline- és antiszociális személyiségzavar, időszakos explozív zavar és „borderline” személyiségzavar) kimutatható a prefrontális kéreg funkcionális alulműködése vagy szürkeállományának térfogati csökkenése [58-65]. Továbbá agresszivitásra hajlamos egyének, illetve agresszióval társuló pszichopatológiával diagnosztizált betegek csökkent eredményeket értek el a frontális lebeny

funkcióit vizsgáló pszichiátriai felmérésekben [66, 67]. Mindennek megfelelően, a prefrontális kéreg inhibitorikus funkciója az agresszió szabályozásában valószínűsített.

Meglepően a fenti vizsgálatoktól gyökeresen eltérő eredményt szolgáltatottak azok a képalkotó eljárásokon alapuló felmérések, amelyek a prefrontális kéreg 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 prefrontális kéreg fokozott aktivációt mutatott [68-72]. Ezen ellentmondásos helyzetet prefrontális paradoxonnak nevezhetjük.

Bár eleinte vita tárgyát képezte, ma már elfogadott az a tény, hogy a rágcsálók prefrontális kérgé fejlődéstani adatok és anatómiai kapcsolatai alapján (mediodorzális talamusz projekciós területe) homológoknak tekinthető a főemlős, illetve a humán prefrontális kéreg bizonyos területeivel. Rágcsálókban ez a terület két fő régióra osztható: az orbitofrontális és mediális prefrontális kéregre (mPFC), amelyek további alrégiókat foglalnak magukba [47, 73-76]. Az mPFC ventrális régiói, a prelimbikus kéreg (PrL) és az infralimbikus kéreg (IL), közvetlen afferenseket küldenek a mediobazális hipotalamusz egy meghatározott részéhez [77, 78], az ún. hipotalamikus támadási területhez, mely régió központi szerepet játszik az agresszió szabályozásában: annak direkt elektromos vagy optogenetikai stimulációja agresszív választ (támadás) indukál [79-83]. Már évtizedekkel ezelőtt kimutatták, hogy a patkány, illetve macska prefrontális kérgének elektromos stimulációja gátolja a hipotalamikusan kiváltott támadásokat, míg léziójuk növeli az agresszivitást [82, 84-86]. Általánosságban elmondható, hogy a rágcsálók prefrontális kérgé egyaránt aktiválódik pszichoszociális (nincs fizikai kontaktus az ellenféllel) és agresszív interakciókra [33, 34, 87-90].

A kóros agresszióval társuló pszichiátriai kórképekben az agyi képalkotó eljárásokkal kimutatott prefrontális kérgi alulműködés paradox módon viszonyul az abnormális agresszió állatmodelljeiben tapasztalt fokozott aktivációjához. Emellett egyes jelenségeket, mint például a prefrontális kéreg funkcionális és struktúrális lateralizációját a kóros agresszió során, csak humán képalkotó eljárásokkal vizsgálták [52, 91-94], állatmodellekben egyelőre nem. Ezen prefrontális paradoxon feloldása, illetve a háttérben zajló mechanizmusok állatmodellekben való feltárása komoly transzlációs lehetőséget is jelenthet, amely nagyban hozzájárulhat új terápiás módok, eszközök kifejlesztéséhez.

2.8. A korai szociális környezet hatása az epigenetikai mechanizmusokra

A pszichés rendellenességek hátterében álló mechanizmusok kutatása során az elmúlt években az érdeklődés középpontjába kerültek az epigenetikai változások, melyek a korai szociális környezet hatásait közvetíthetik a felnőttkori agyi funkciókra és magatartásra [18, 39, 95, 96]. Ebből következően az epigenetikai mechanizmusok tanulmányozása nagyban segítheti azoknak a bio-pszichoszociális mechanizmusoknak a megértését, amelyek felnőttkori krónikus abnormális agresszióhoz vezetnek [9, 10]. Epigenetikai hatások alatt olyan mechanizmusokat értünk, amelyek a szekvencia megváltoztatása nélkül okoznak hosszú távú változást a génfunkciókban. A legjobban leírt epigenetikai mechanizmusok a hiszton-acetiláció, -metiláció, -foszforiláció és a DNS-metiláció. Ezeket a kovalens változtatásokat specifikus enzimek végzik, úgynevezett DNS-metiltranszferázok (DNMT), illetve különböző, hisztonmódosításokért felelős enzimek (pl. deacetilázok, HDAC) [97-99]. A DNMT-ok által a DNS metiláció során a citozin-5'-pirimidin gyűrűgyéhez egy metil csoport kapcsolódik, ha a citozin után guanin következik (CpG dinukleotid). Bár más, citozintól különböző nukleotidok metilációja is leírt, ezeknek a előfordulása az emlős genomban alacsony [100]. Újabb adatok rávilágítottak arra, hogy a korai averzív szociális környezet tapasztalatai befolyásolják a DNMT-ok expressziós szintjét [101, 102]. Különösen érintett a DNS-metiltranszferáz 1 (DNMT1), amely patológiás expressziós változásokat mutat azon pszichiátriai rendellenességekben, amelyek etiológiájában meghatározott szerepet játszik a korai szociális környezet, a traumatikus élmények és a stressz [101, 102]. Ezen expressziós abnormalitások kifejezettek bizonyos limbikus struktúrákban (prefrontális kéreg, amygdala, hippocampus), amelyek fokozottan érintettek ezen kórképekben tapasztalt struktúrális és funkcionális abnormalitásokban [20, 55, 56, 64, 103-105]. Ilyen pszichiátriai betegség a skizofrénia, amelyben az mPFC-ben patológiás DNMT1 expressziós mintázatot írtak le [105, 106]. A skizofréniahoz gyakorta társulhat agresszív magatartás [107, 108] és etiológiájában meghatározott szereppel bír az averzív korai szociális környezet [109, 110]. A skizofréniaira vonatkozó eredmények mellett egyes humán eredmények az agresszió kontrolljának szempontjából kulcsfontosságú fehérjéket kódoló gének (szerotonin transzporter, monoamin oxidáz A) epigenetikai változásait is kimutatták gyermekkori bántalmazást elszenvedett, agresszív felnőttekben [111, 112]. Megjegyzendő, hogy az agresszió szabályozása szempontjából releváns agyterületek, pl. a PFC, szociális környezet által indukált epigenetikai változásai kevésbé ismertek. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy összesen egy laboratóriumi állatmodellen alapuló tanulmány jelent meg, amelyben az abnormális agresszióhoz asszociálódó epigenetikai változásokat vizsgálták a PFC-ben [33].

3. Célkitűzések

Jelen dolgozat a korai szociális izoláció indukálta abnormálisan agresszív patkányok prefrontális kérgi struktúrális, funkcionális és epigenetikai mechanizmusainak feltárására törekszik. Célkitűzéseink a következők voltak:

- (1) A mediális prefrontális kéreg (mPFC) területének kvantifikálása izoláltan nevelkedett patkányokban.
- (2) Az izoláltan nevelkedett patkányok mPFC-ének neuronális, gliális, dendritikus és mikrovaskuláris kvantifikálása.
- (3) A mPFC idegsejt aktivációjának összehasonlítása nyugalmi körülmények között, illetve agresszív interakció során szociálisan, illetve izoláltan nevelkedett laboratóriumi patkányokban.
- (4) A DNMT1 enzim mRNS szintjének az összehasonlítása szociálisan és izoláltan nevelkedett patkányok mPFC-ében.

4. Anyag és módszer

4.1. Az állatok tartási körülményei

Kísérleteinkben az anyától való elválasztás az állatok 21 napos korában történt, majd átkerültek egy 12 órás fordított napszakos ciklusú állatszobába, ahol a sötét periódus délelőtt 10:00 órakor kezdődött. A szobában állandó hőmérséklet (22 ± 2 °C) és páratartalom (60 ± 10 %) volt. Laboratóriumi patkánytáp és víz korlátlan mennyiségben állt az állatok rendelkezésére. Az izolált állatokat 7 héten át egyedül, míg a szociálisan tartottakat ugyanennyi ideig négyes csoportokban helyeztük el. A szociális és izolált csoportokba tartozó állatokat ugyanabban a szobában tartottuk. A rezidens-betolakodó tesztek az elválasztás utáni nyolcadik héten kezdődtek, ekkor az állatok tömege 400-450g volt.

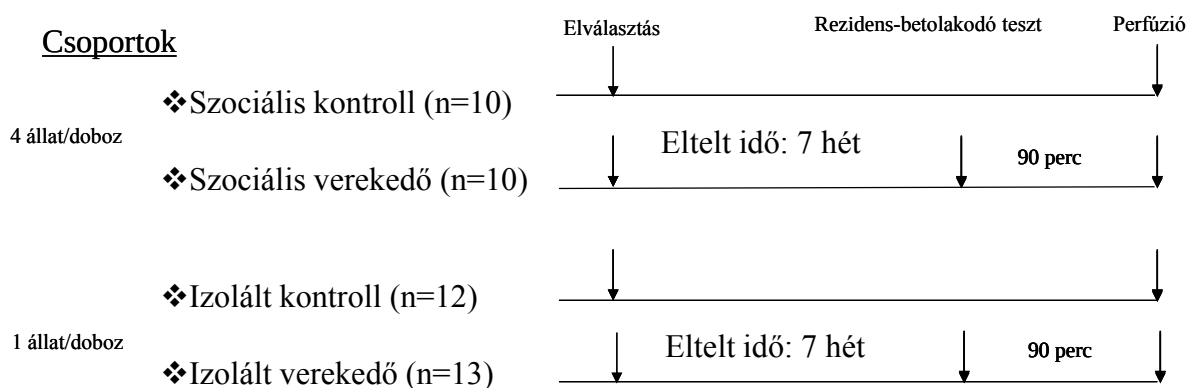
A rezidens-betolakodó tesztben betolakodóként csoportban nevelkedett, kb. 300g tömegű hím Wistar patkányokat használtunk. Négy állatot tartottunk egy dobozban a fent leírt körülmények között. A kísérleti elrendezés részletes bemutatása és az elemszámok feltüntetése az **(1. ábrán)** látható.

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

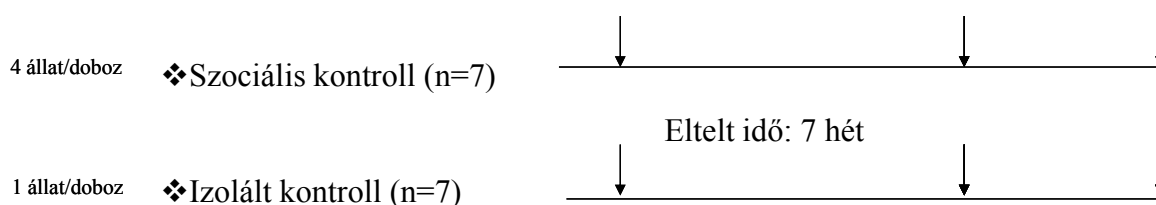
4.2. Viselkedés vizsgálat: rezidens-betolakodó teszt

Az állatok agresszív magatartását rezidens-betolakodó tesztben vizsgáltuk, amely a territoriális jellegű agresszivitás mérésére alkalmas. A kísérletben beállított megközelítőleg 30%-os súlykülönbség jelentősen megnöveli a rezidens állat győzelmi esélyeit, így megbízhatóan monitorozható a megjelenő agresszivitás mértéke és minősége.

Első kísérlet - Immunhisztokémia



Második kísérlet - valós idejű, kvantitatív PCR



1. ábra A kísérleti elrendezés reprezentatív bemutatása. Fent az első kísérlet, míg lent a második kísérlet elrendezése látható.

Az elválasztás utáni 8. héten a rezidensek három napra, egyesével nagyméretű (40x40x50cm) tesztdobozokba kerültek, függetlenül attól, hogy korábban csoportban, vagy izoláltan tartottuk őket. Erre azért volt szükség, hogy a territoriális magatartás kialakuljon. A tesztek a sötét (aktív) periódus első négy órájában zajlottak, enyhe vörös megvilágítás mellett. A rezidensek dobozába egy náluk kisebb ivarérett hím betolakodót helyeztünk 20 percre és viselkedésüket videokamerával rögzítettük. A videofelvételeken ezután azonosítottuk a harapásokat, majd azokat lassítva, képkockánként megállítva elemeztük („frame-by-frame analízis”), hogy azok célpontjait és intenzitását megállapítsuk. 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. Az erősség mértéke alapján megkülönböztettünk enyhe és durva harapásokat is. Durvának tekintettük azt, ami rúgással járt együtt, illetve az ellenfélből heves reakciót váltott ki (visítás,

gyors menekülés). Enyhének minősítettük azt, ami nem járt rúgással és az ellenfélből nem váltott ki visítást. Vizsgálataink kiterjedtek arra is, hogy az állatok előrejelezték-e harapási szándékukat, azaz rögzítettük, hogy milyen viselkedésem 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 egyéb viselkedés (szociális szaglászás, exploráció, öntisztogatás) előzte meg.

4.3. Szövetteni eljárások: immunhisztokémia

A viselkedésteszt után 90 perccel az állatokat (ketamin-xylazin-pipolphen 50-10-5 mg/kg, i.p.) 150-ml jéghideg foszfátpufferelt fiziológias sóoldattal (phosphate buffered saline, PBS), majd 300 ml jéghideg 4%-os, paraformaldehid-oldattal, a felszálló aortán keresztül mélyaltatásban perfundáltuk. Az állatok agyát kivettük, és 3 órás utófixálás után, egy napra 20%-os szacharóz-oldatba tettük krioprotekció céljából. Fagyasztó mikrotómmal, 30 µm vastag koronális agymetszeteket készítettünk. Az immunhisztokémiai során minden egyes ellenanyag során egyszeres jelöléseket hajtottunk végre. A neuronális aktiváció vizsgálatához c-Fos (az idegsejt aktiválódás általános markere), a dendritek immunjelöléséhez SMI-32 (a neurofilament H nem foszforilált epitópjához köt), és a neuronszám meghatározásához NeuN (idegsejt marker) immunhisztokémiát használtunk. Az immunhisztokémia során 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, 10%-os lószérummal blokkoltuk. Mind a poliklonális nyúl anti-c-Fos (Santa Cruz Biotechnology, 1:5000), mind a monoklonális egér anti-NeuN (Chemicon, 1:5000), illetve monoklonális egér anti-SMI-32 (Sigma-Aldrich, 1:1000) elsődleges ellenanyagokat egész éjszaka szobahőmérsékleten inkubáltuk a metszeteken. Másnap egy órát biotinilált másodlagos ellenanyaggal (Jackson Laboratories, 1:1000), 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 (tris(hydroxymethyl)aminomethane) pufferben történt. A tárgylemezre felhúzott metszeteket felszálló alkoholsorban és xilolban való 3-3 perces inkubáció után DPX (Sigma, USA) oldattal fedtük le.

A fluorescens GFAP (gliális fibrilláris savas protein) és Lectin immunhisztokémia esetén a feltárást, 0,5% Triton-X-100-t és 0,5% hidrogén-peroxidot tartalmazó, PBS-alapú

oldatban végeztük, valamint PBS-ben oldott 10%-os lószérummal blokkoltuk. Az asztrocita immunjelöléshez elsődleges egérben termeltetett GFAP (Sigma-Aldrich, 1:2000) monoklonális, míg a mikrovaskulátúra jelöléséhez biotinilált tomato Lectin (Sigma-Aldrich, 1:500) ellenanyagokat használtunk. A GFAP immunhisztokémia esetén három éjszakán át tartó 4 °C-on történő inkubálást követően egér ellen termeltetett, fluoroför jelölt másodlagos ellenanyaggal (Alexa-Flour 594, Life technology, 1:1000), szobahőmérsékleten kezeltük a metszeteket. A Lectin immunhisztokémia során a primer ellenanyag 1 napos 4 °C-on történő inkubálását követően streptavidin konjugált másodlagos ellenanyaggal (Alexa-Flour 488, Life technology, 1:1000) vizualizáltuk a mikrovaskulátúrát. Minden fenti lépést 3-szor 10 perces PBS-sel történő mosás előzött meg. A metszeteket desztillált vízben húztuk fel tárgylemezre, majd Mowiol 4-88 (Sigma, USA) oldattal fedtük le.

4.4. A mediális prefrontális kéreg területének kvantifikálása

A mPFC területének (infralimbikus és prelimbikus kéreg) kvantifikálása a Paxinos és Watson-féle patkányagy atlasz alapján a Bregmától számított 3,20-as antero-posterior síkban végeztük, amely korábbi adatok alapján direkt anatómiai kapcsolatot létesít a mediobazális hipotalamusszal, az agresszió egyik fő szabályozóközpontjával [28, 77]. Az egyes metszeteket sötét látóterű (dark field) mikroszkópia segítségével, 10x nagyítású objektívvel digitalizáltuk. A következőkben, ImageJ (NIH, USA) képelemző szoftver segítségével kvantifikáltuk a jobb és bal agyfélteke mPFC-ében kvalitatív módon is megfigyelhető területi asszimmetriát.

4.5. Immunhisztokémiai jelölések kvantitatív analízise

Az immunhisztokémiai jelölődés analízise során a fentiekkel egyező módon, a Bregmától számított 3,20-as antero-posterior síkban végeztük. A NeuN-pozitív sejtszám és a GFAP, az SMI-32 és a Lectin immunojelölés intenzitás meghatározását automatizált módon ImageJ (NIH, USA) képelemző szoftver alkalmazásával végeztük. A c-Fos pozitív sejtek kvantifikálása a Paxinos és Watson patkányagy atlaszból kivett [113] 11*13 cellát tartalmazó rácsháló segítségével történt. Az aktiválódott sejteket minden cellában meghatároztuk és összehasonlítottuk a jobb és bal félteke, valamint a kezelt és kontroll állatok közötti különbséget.

4.6. Valós idejű, kvantitatív PCR

4.6.1. RNS izolálás

A DNMT1 gén expressziós vizsgálatához szociális vagy izoláltan felnevelkedett, magatartási tesztekben nem szereplő állatok prefrontális kérgéből nyert agypreparátumokat használtuk. A mintegy 1mm vastag és 1mm átmérőjű szövetdarabokat a dekapitalás után közvetlenül perforáló tűvel kimetszettük, majd RNA later (Qiagen, Netherland) oldatba helyeztük. A mintákat felhasználásig -80 °C-on tároltuk, hogy az RNS minőségét megőrizzük, és annak bomlását megakadályozzuk. A kiolvasztott mintához QiaZOL (Qiagen, Netherland) reagenst mértünk és kézi homogenizálóval roncsoltunk. 100mg preparált szövethez 1 ml QiaZOL-t pipettáztunk és szobahőmérsékleten homogenizáltuk. Ezt követően a mintákat jégre tettük, majd a homogenizátumhoz 200µl kloroformot (Sigma, USA) adva 10-20 másodpercig ráztuk. A kapott elegyet 5 perc szobahőmérsékleten történő inkubálás után lecentrifugáltuk (4°C-on, 12000 rpm, 15 perc), és az átlátszó RNS tartalmú felülúszóból 500 µl mennyiséget steril eppendorfcsőbe mértünk. QIAcube (Qiagen, Netherland) izoláló készülékben, magas zsírtartalmú, kis mennyiségű szövetmintákra kifejlesztett specifikus kitet (Lipid Tissue Mini Kit, Qiagen, Netherlands) használva alkoholos precipitálással izoláltuk az RNS-t, majd RNS mentes vízben oldottuk 30 µl össztérfogat eléréséig.

Az RNS eluátum koncentrációját és tisztaságát spektrofotométerrel (Nanodrop ND-1000) meghatároztuk és az A260/A280 értékkel igazoltuk. A továbbiakban a szerves- és fehérjeszennyeződést figyelembe véve azokat a mintákat használtuk fel, melyekben az A260/A280 érték 1,7 és 2 közé esett, illetve az RNS koncentrációja elérte a 20 ng/ul-t. Ezt követően a mintákat felhasználásig -80°C-on tároltuk.

4.6.2. Reverz transzkripció

Minden RNS mintából egységesen 140 ng-ot használtunk a cDNS szintéziséhez. A reverz transzkripció (RT) keverék (Applied Biosystem) a következő anyagokat tartalmazta: 140 ng RNS, 2 µl RT puffer, 2 µl RT Random Primer, 0,8 µl dNTP Mix, 0,5 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 0,5 µl RNase Inhibitor, RNSmentes desztillált vízzel, kiegészítve 20 µl össztérfogatra. A PCR készülékben (Applied Biosystem) a reverz transzkripció, a következő hőmérsékleti kondíciók között történt: 10 min 25°C, 120 min 37°C, 10 sec 85°C.

4.6.3. DNS amplifikálás

A cDNS mintákat tízszeres hígításban, két ismétlésben vizsgáltuk, belső kontrollként GAPDH háztartási gént használtunk. Egy mintára vonatkoztatva, a következő összetételű 10

μ l-es reakciót használtuk: 2 μ l cDNS templát, 5 μ l LightCycler® 480 Probes Master (Roche) , 2,5 μ l RNS mentes víz, 0,5 μ l DNMT1 Taqman génexpressziós assay (Rn00709664_m1 , Life technologies). A reakciókat a StepOnePlus™Real-time PCR System gépen (ABI) futtattuk a következő program szerint: kezdeti denaturáció 95°C 10 min, majd ezt követően 40 cikluson keresztül: 95°C 10 sec, 60°C 15 sec és 72°C 15 sec.

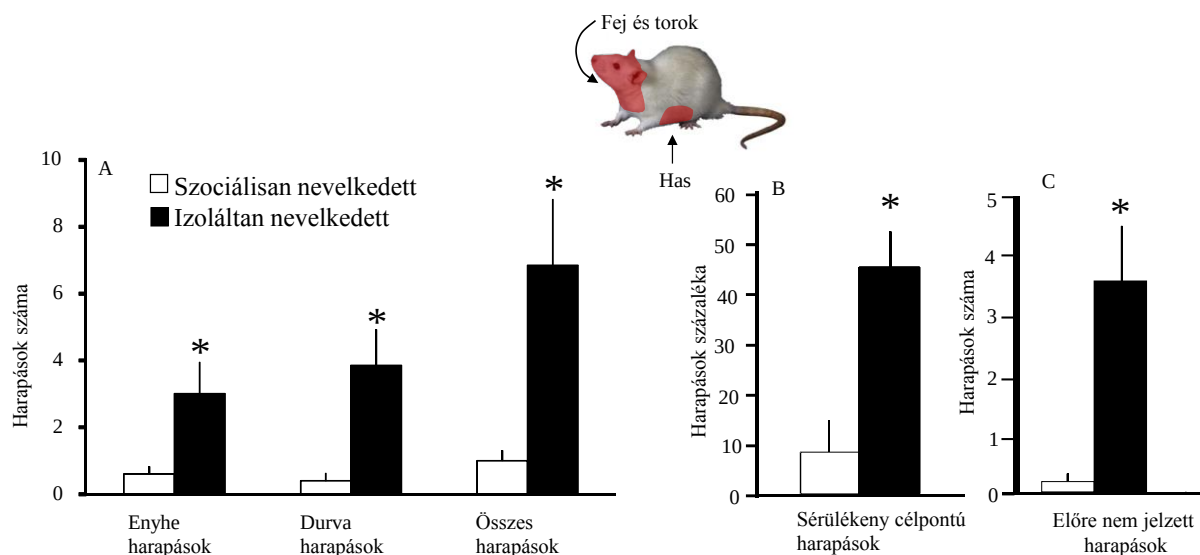
4.7. Statisztika

Az adatok átlag $\pm$ standard hiba (SE) formátumban adtuk meg. A statisztikai analízist a STATISTICA program (Statistica Inc., Tulsa, USA) segítségével végeztük. A magatartási változók esetében nem paraméteres Mann Whitney U tesztet, míg a szövettani eredményeknél variancia analízist alkalmaztunk (egy-utas és faktoriális ANOVA). Szignifikáns hatásnak a $p < 0,05$ értékeket tekintettük.

5. Eredmények

5.1. A korai szociális izolációhoz társuló magatartási változások

A szociálisan izolált állatok szignifikánsan többet haraptak a szociálisan tartott állatokhoz viszonyítva ($U=18$, $p=0,01$). A harapások részletesebb vizsgálata kimutatta, hogy mind az enyhe ($U= 30$, $p<0,01$), mind a durva harapások ($U=22$, $p=0,02$) száma jelentősen magasabb volt az izolált, mint a kontroll csoportban (2./A ábra).



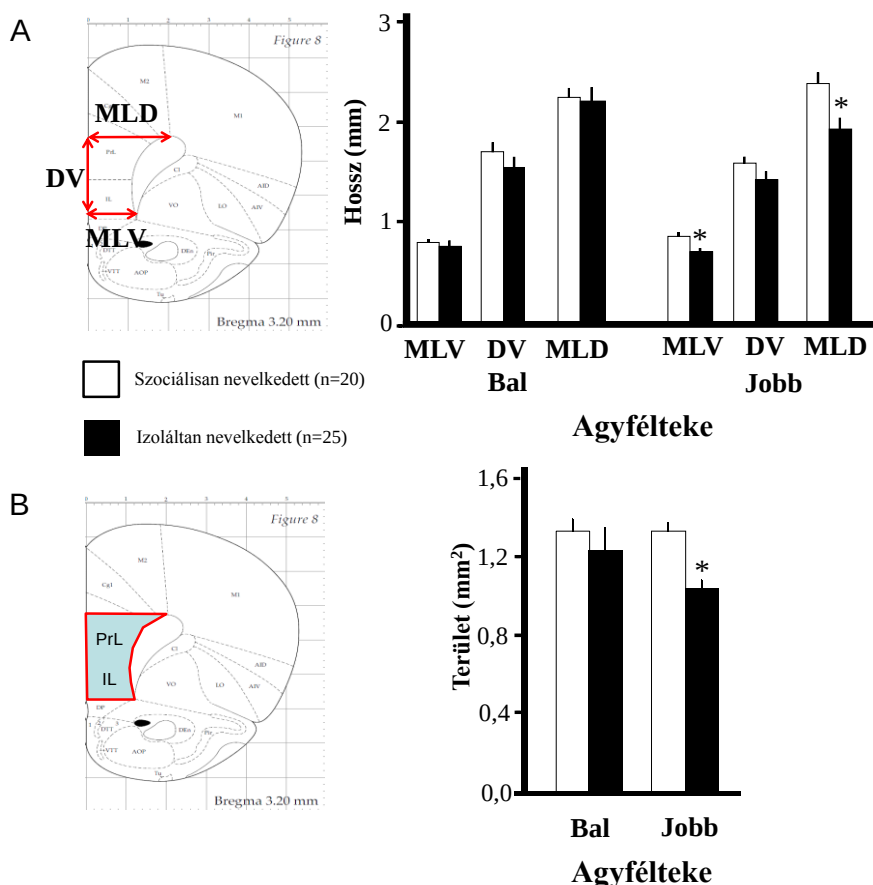
2. ábra A szociálisan és az izoláltan nevelkedett patkányok rezidens-betolakodó tesztben mért agresszivitásának mennyiségi és minőségi változásai. A harapások száma (A), a sérülékeny területeket (fej, torok, has) célzó támadások százaléka (B) és az előre nem jelzett harapások száma (C). *szignifikáns különbség a szociális közegben felnőtt állatokhoz képest ($p < 0,05$).

Mindemellett a sérülékeny testrészeket (fej, torok, has) célzó harapások száma ($U=17,5$, $p=0,01$) és aránya ($U=8,5$, $p=0,01$) is szignifikánsan megnövekedett (2./B ábra).

Az előre nem jelzett harapások száma az izoláció hatására szignifikánsan megemelkedett ($Z=-2,28$, $p=0,01$)(2./C ábra).

5.2. A korai szociális izoláció által indukált struktúrális változások

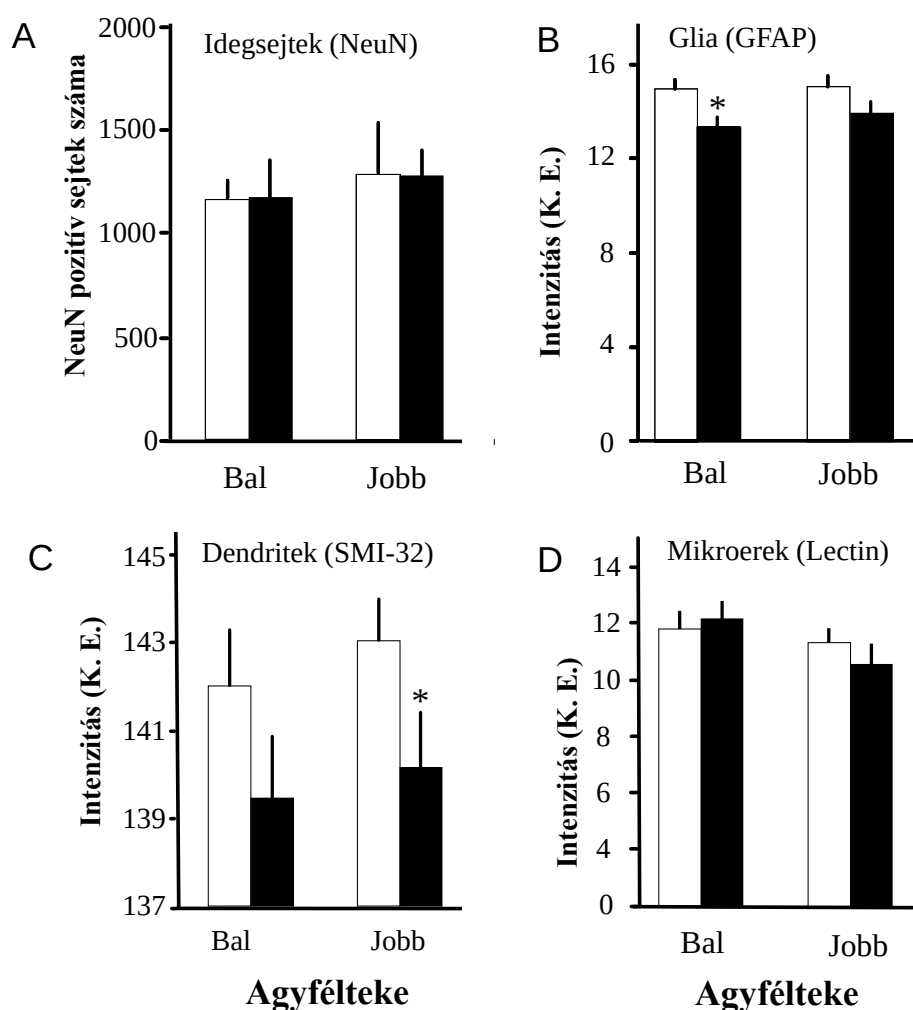
Az izoláltan és szociálisan nevelkedett állatok mindkét agyféltekéjében, a prelimbikus (PrL) és az infralimbikus (IL) kérgék (együtt mPFC) együttes területét, valamint azok dorzoventrális és a mediolaterális kiterjedését vizsgáltuk. Az izoláltan nevelkedett állatok jobb agyféltekéjében a mPFC szélesség mind medio-latero-ventrálisan ($F(1)=10,520$, $p=0,01$), mind medio-latero-dorsálisan ($F(1)=5,572$, $p=0,03$) szignifikánsan csökkent, míg a bal agyfélteke mPFC-énél nem tapasztaltunk változást (3./A ábra). Továbbá az izoláltan nevelkedett állatok jobb agyféltekéjének mPFC-e szignifikáns területi csökkenést mutatott a kontrollhoz viszonyítva ($F(1)=8,460$, $p=0,02$), azonban a bal oldali agyfélteke mPFC-ében hasonló eltérést nem tapasztaltunk a csoportok között ($F(1)=0,925$, $p=0,05$). (3./B ábra).



3. ábra A szociálisan izolált állatoknál megfigyelhető struktúrális változások (lateralizáció), a mPFC Bregmához képesti 3,20-as koronális síkjában. A mPFC szélessége (A) és területe (B). DV: dorzo-ventrális, MLV: medio-latero-ventrális, MLD: medio-latero-dorsális, PrL: prelimbikus kéreg, IL: infralimbikus kéreg. *szignifikáns különbség a szociális közegben felnőtt állatokhoz képest $p<0,05$.

A mPFC-ben vizsgált NeuN pozitív sejtek számában nem különbözött egymástól a szociális és izolált csoport ($F_{\text{bal oldal}}(1)=0,001$, $p=0,89$; $F_{\text{jobb oldal}}(1)=0,010$, $p_{\text{jobb oldal}}=0,93$)

(4./A ábra). Szignifikáns GFAP immunojelölődés intenzitás csökkenést figyeltünk meg azonban az izolált patkányok bal oldali agyféltekéjének mPFC-ében, a kontrollokhöz viszonyítva, míg a jobb oldalon a csökkenés nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét ($F_{\text{bal oldal}(1)}=7,559$, $p_{\text{bal oldal}}=0,04$; $F_{\text{jobb oldal}(1)}=2,995$, $p_{\text{jobb oldal}}=0,09$) (4./B ábra). A piramissejt dendritikus marker SMI-32 jelölődése szignifikáns csökkenést mutatott izoláció hatására az állatok jobb oldali agyféltekéjének mPFC-ében ($F_{\text{jobb oldal}(1)}=4,970$, $p_{\text{jobb oldal}}=0,03$). Ezzel ellenben a bal oldali agyféltekében nem mutatkozott meg statisztikai különbség ($F_{\text{bal oldal}(1)}=7,559$, $p_{\text{bal oldal}}=0,04$) ($F_{\text{bal oldal}(1)}=1,88$, $p_{\text{bal oldal}}=0,18$) (4./C ábra). Végül, a Lectin immunojelölődés sem a bal ($F_{\text{bal oldal}(1)}=0,907$, $p_{\text{bal oldal}}=0,70$),

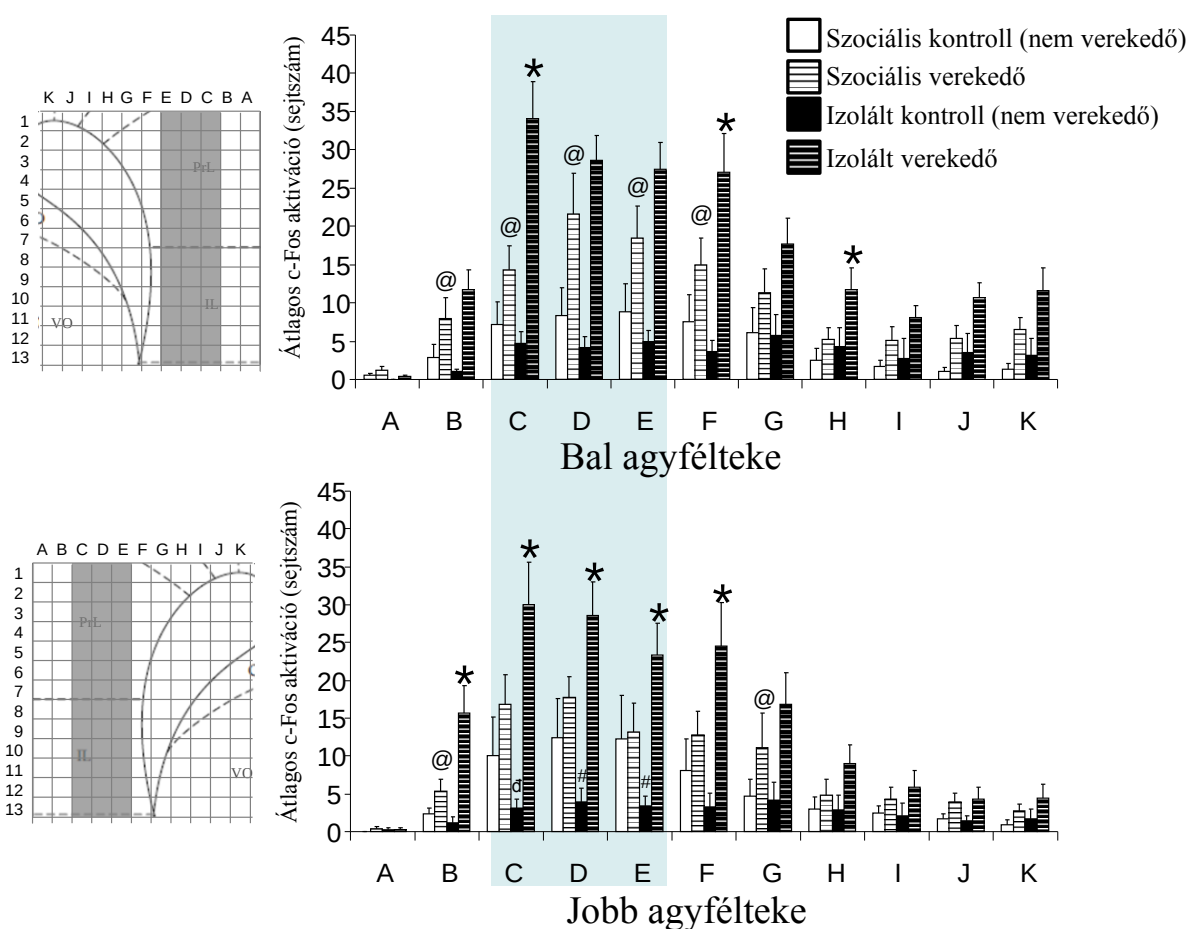


4. ábra A szociális izoláció hatása a mPFC-ben (IL+PrL) lokalizálódó neuronok, glia sejtek, dendritek és mikrovaskulátúra immunhisztokémiai jelölődése a Bregmától számított 3.20 frontális síkban. NeuN pozitív sejtek száma (A) és GFAP immunjelölés intenzitás (B). A dendritikus marker SMI-32 (C) és a mikrovaskulátúra marker Lectin (D) immunjelölődésének intenzitása. IL: infralimbikus kéreg, PrL: prelimbikus kéreg, K.E.: konvencionális egység, *szignifikáns különbség a szociális közegben felnőtt állatokhoz képest ($p<0,05$).

sem a jobb oldali agyféltekében nem mutatta a szociális izoláció szignifikáns hatását ($F_{\text{jobb oldal}(1)}=4,431$, $p_{\text{jobb oldal}}=0,36$) (4./D ábra).

5.3. Az infralimbikus és prelimbikus kéreg neuronális változásai agresszív interakció hatására

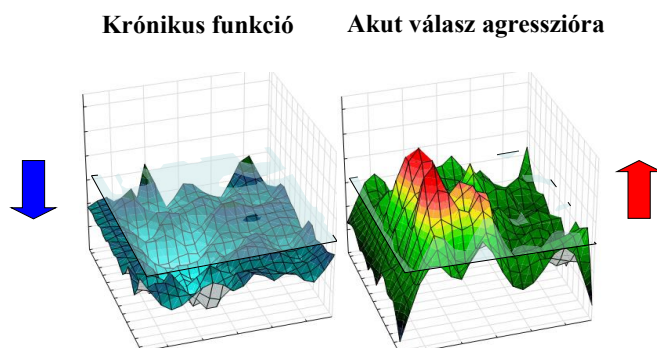
A c-Fos aktiváció mértékének meghatározása során a kezelési csoportokat (szociálisan nevelkedett, kontroll; izoláltan nevelkedett, kontroll; szociálisan nevelkedett, verekedő; izoláltan nevelkedett, verekedő), valamint az állatok jobb és bal agyféltekéjét is összehasonlítottuk. A vizsgálatok a mPFC két ventrális alrégiójában, az infralimbikus és a prelimbikus kéregben történtek, amelyekre a Paxinos és Watson féle agyatlasz [113] koordinátákon alapuló négyzethálót fektettünk. Az így létrejött cellákban kvantifikáltuk a c-Fos pozitív sejteket.



5. ábra A prelimbikus (PrL) és az infralimbikus (IL) kéreg idegi aktivációs változásai agresszív interakció hatására a Bregmától számított 3.20 koronális síkban. Az abszcisszán a PrL és az IL mediolaterális irányban felosztott oszlopok (A-tól K-ig) átlagos c-Fos aktivációja látható. *szignifikáns különbség a szociális-verekezőkhöz képest ($p < 0,05$), @szignifikáns különbség a szociális kontrollhoz képest ($p < 0,05$), ^dszignifikáns különbség a szociális-kontrollhoz képest ($p < 0,05$), #marginális különbség a szociális kontrollhoz képest ($p < 0,07$).

Az egyes cellákat dorzoventrálisan oszlopokba foglaltuk és ezeket mediolaterális irányban reprezentáltuk (5. ábra). Az izolált-kontroll csoport jobb agyféltekéjében szignifikánsan

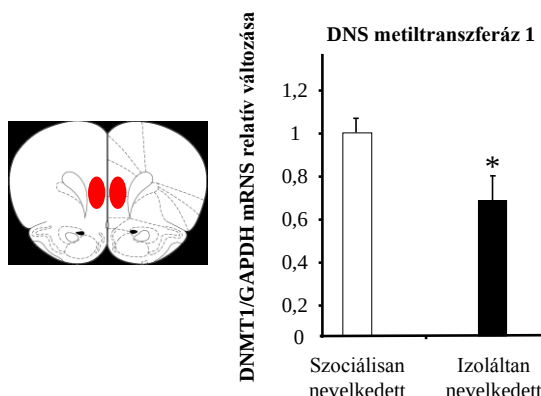
kevesebb sejtet számoltunk a C ($F(1)=1,68$, $p=0,04$) oszlopban, valamint marginálisan kevesebbet a D ($F(1)=2,39$, $p=0,07$) és az E ($F(1)=2,23$, $p=0,07$) oszlopokban a szociális kontroll csoporthoz képest. Az izolált-kontrollok bal agyféltekéjében nem észleltünk hasonló változást ($p_{C-D-E}=0,9$). A szociális-verekező csoportnál a bal agyféltekében szignifikáns aktivitás növekedést tapasztaltunk a szociális-kontrollhoz képest az alábbi oszlopokban: B ($F(1)=0,16$, $p=0,05$), C ($F(1)=5,14$, $p=0,03$), D ($F(1)=0,47$, $p=0,05$), E ($F(1)=0,98$, $p=0,05$), F ($F(1)=0,98$, $p=0,05$). Ugyanezen csoportnak a jobb agyféltekéjében a B ($F(1)=4,26$, $p=0,01$) és a G ($F(1)=0,71$, $p=0,05$) oszlopokban volt szignifikáns növekedés. Az izolált verekező csoportnál a jobb agyféltekében a B ($F(1)=6,65$, $p=0,03$), C ($F(1)=5,12$, $p<0,03$), D ($F(1)=6,73$, $p<0,04$), E ($F(1)=5,49$, $p<0,03$) és F ($F(1)=4,19$, $p<0,04$) oszlopokban volt markáns emelkedés az izolált kontroll csoporthoz képest. A két verekező csoportot összehasonlítva, a bal agyféltekében szignifikáns növekedés volt látható a C ($F(1)=11,96$, $p=0,01$), az F ($F(1)=3,73$, $p=0,01$) és a H ($F(1)=3,89$, $p=0,01$) a szociális csoporthoz viszonyítva. A jobb oldalon a B ($F(1)=7,06$, $p<0,03$), C ($F(1)=3,83$, $p=0,01$), D ($F(1)=4,64$, $p<0,03$), E ($F(1)=3,39$, $p=0,05$), F ($F(1)=3,42$, $p=0,05$) és G ($F(1)=0,87$, $p<0,04$) oszlopokban volt szignifikáns növekedés (**5. ábra**). A szociális izoláció indukálta c-Fos aktivációs mintázat eredményeinek reprezentatív háromdimenziós összegzését a **6. ábra** mutatja.



6. ábra Az izoláltan nevelkedett patkányok mediális prefrontális kérgének (mPFC) reprezentatív aktivációs mintázata szociális (agresszív interakció) és nem szociális (nyugalmi) helyzetekben. Szociális izoláció hatására a patkányok mPFC-ében nyugalmi körülmények között (bal oldali ábra) krónikus hipofunkció, míg agresszív interakció hatására (jobb oldali ábra) akut hiperaktiválódás mutatkozik meg a szociális kontroll állatokhoz képest.

5.4. A korai szociális izoláció indukálta epigenetikai változások

A DNMT1 mRNS koncentrációja szignifikánsan eltért az izolált és kontroll állatok esetében ($F(1)=7,187$ $p=0,04$) (**7. ábra**).



7. ábra A DNMT1 mRNS relatív változása. *szignifikáns különbség a szociális közegben felnőtt állatokhoz képest ($p < 0,05$).

6. Értékelés

Kísérletünkben az elválasztás utáni szociális izoláció - korábbi adatainkkal egybevégezve - nemcsak mennyiségileg, hanem minőségileg is súlyosbította az agressziót. Eredményeink szerint az izoláció csökkentette a prefrontális kéreg méretét és a gliális és dendritikus markerek expresszióját is, amihez egy releváns epigenetikai marker fehérje, a DNS metiltranszferáz 1 mRNS szintjének a csökkenése társult.

Az elválasztás utáni szociális izoláció komoly változásokat okozott az állatok viselkedésében. Az abnormalis agresszió a harapások megnövekedett számában és a harapások célpontjának megváltozásában nyilvánult meg. A harapások gyakran irányultak az ellenfél sérülékeny testrészeire (fejre, a torokra és a hasra). Ehhez az állatok szociális kommunikációjának markáns zavara társult; a harapást ritkán előzték meg azok a figyelmeztető jellegű fenyegető viselkedések, amelyeket a kontroll állatoknál megfigyeltünk. Paradox módon a megnövekedett számú, sérülékeny testrészekre irányuló, és rosszul előrejelzett harapás a védekező magatartás megemelkedésével járt együtt, ami kóros magatartási mintázatról árulkodik. Korábbi kísérleteinkben a felsorolt viselkedései rendellenességeket az agresszív interakció által kiváltott megnövekedett glukokortikoid stressz válasz és szívritmus emelkedés kísérte, melyek az állatok felfokozott emocionális és vegetatív izgalmi szintjére (*arousal*) utalnak [6].

A prefrontális kéregre vonatkozó adataink látszólag ellentmondásosak. A szociális izoláció strukturális deficitet eredményezett, ugyanakkor az agresszió során fokozott aktivációt figyeltünk meg. Az első lelet összecseng humán megfigyelésekkel. Agresszióhoz kapcsolódó pszichopatológiai állapotokban (pl. pszichopátiában) a prefrontális kéreg

térfogata csökken [58, 62, 63, 114]. Érdekes módon, mind a csökkenés mértéke (ami embernél 15% körüli), mind lateralizációja (általában a jobb oldali agyféltekére terjed ki) megfelelt annak, amit kísérleti állatainknál tapasztaltunk [58, 63, 114]. Úgy tűnik tehát, hogy gyermekkori szociális elhanyagoltság embernél, és a korai szociális izoláció patkányoknál prefrontális fejlődési deficitet okoz, ami abnormális agresszív viselkedéssel jár együtt. A prefrontális deficit mellett kísérleti állatainknál a DNS metiltranszferáz 1 enzim mRNS szintje is csökkent a prefrontális kéregben, amely csökkent DNS metilációs tevékenységet sejtet. Elképzelhető, hogy ez a korai szociális tapasztalat hiányának tudható be; míg a kontrolloknál a szociális tapasztalat epigenetikai változásokat indukált a prefrontális kéregben, a szociális izoláció miatt ez nem következett be a kísérleti csoportnál. Feltételesem ez arra utalhat, hogy a szociális kapcsolatok és a prefrontális kéreg fejlődése közötti kapcsolatot epigenetikai folyamatok teremtik meg. Bár a lelet érdekes, eredményeink megerősítésre várnak. A mRNS változásokat nem mindig követik változások a fehérjék szintézisében, ugyanakkor nem tudjuk, hogy milyen változások következtek be más epigenetikai folyamatokban. A jelenség további vizsgálatát elkezdjük részben csoportunkon belüli, részben egy, az epigenetikai kutatásban járatos finn csoporttal való együttműködés keretében.

A szociálisan izolált állatok megnövekedett, agresszió által kiváltott prefrontális aktivációja már korábban is tapasztalt, de nehezen értelmezhető jelenség [34, 89]. Jelen tanulmányban a hiperaktiváció fő régióját is azonosítottuk: a hatás az infralimbikus és a prelimbikus kéreg azon régióira lokalizálódott, amelyek közvetlen anatómiai kapcsolatban állnak az agresszió fő szabályozó régiójával, a hipotalamikus támadási területtel [77, 78]. Általánosan elfogadott nézet, hogy a prefrontális kéreg gátolja az agresszivitást, ami tovább növeli az adat értelmezésének nehézségeit. Elképzelhető, hogy a prefrontális kéreg projekciós célpontjai GABAerg idegsejtek a hipotalamikus támadási zónában, így megnövekedett aktivációjuk tulajdonképpen közvetett gátlást eredményez. Ez a hipotézis azonban nehezen egyeztethető össze azzal, hogy az agresszivitás szintje növekedett a szociálisan izolált állatokban. Elképzelhető ezért, hogy a prefrontális kéreg bizonyos régiói – ellentétben más régiókkal – az agresszív viselkedés kiváltásában és fenntartásában játszanak szerepet, így a kéreg régióinak és neuronjainak szerepe az agresszivitás szabályozásában nem egységes. Itt bemutatott eredményeink nem alkalmasak arra, hogy eldöntsük a kérdést, ezért a továbbiakban optogenetikai technikákat vetünk majd be a kérdés tisztázására.

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy a korai szociális izoláció abnormális agresszió megjelenését eredményezi felnőttkorban; ez a viselkedés a prefrontális kéreg fejlődési deficitjével jár együtt, amit talán a szociális tapasztalat hatásait mediáló epigenetikai

jelenségek háttérbe szorulásával lehet magyarázni. A prefrontális kéreg fokozott aktivációja szociális kapcsolatok során érdekes, de nehezen magyarázható jelenség, amelynek tisztázására további kísérletekre van szükség.

7. Összefoglaló

A szakirodalom alapján a gyermekkori szociális környezet zavarai kockázati tényezőként szerepelnek a felnőttkori abnormális agresszióval társuló pszichopatológiák kialakulásában. A korai averzív szociális környezet elfogadott laboratóriumi modellje, az anyától való elválasztás utáni szociális izoláció. Kutatásunk során az agresszió szabályozásában alapvető szerepet játszó mediális prefrontális kéreg (mPFC) struktúrális, funkcionális és epigenetikai hátterét vizsgáltuk izoláltan nevelkedett hím patkányokban. Eredményeink szerint korai szociális izoláció hatására, felnőttkorban abnormális agresszió jelent meg, melyet a támadások előrejelzésének hiánya, számának emelkedése és az ellenfél sérülékeny testrészeinek (fej, torok, has) célzása jellemez. Immunhisztokémiai módszerekkel kimutattuk az izoláltan nevelkedett állatoknál az mPFC térfogati, gliális és dendritikus csökkenését. A korai szociális izoláció következtében kialakuló abnormális agressziót az mPFC két alterületének, az infralimbikus (IL) és a prelimbikus kéreg (PrL) fokozott aktivációja kíséri. Ezen régiók szoros anatómiai kapcsolatban állnak az agresszió fő szabályozóközpontjával, a mediobazális hipotalamusszal, amelynek mind elektromos, mind optogenetikai stimulációja agresszív választ (harapást) indukál. RT-PCR vizsgálataink eredménye szerint egy kulcsfontosságú epigenetikai marker, a DNMT1 metiltranszferáz 1 enzim mRNS expressziója szignifikánsan csökkent az izoláltan tartott állatok mPFC-ében. Így elképzelhető, hogy a magatartási, struktúrális és funkcionális elváltozások mögött, epigenetikai mechanizmusok rejlenek.

8. Szerzői hozzájárulás

1. Részt vettem a kísérletsorozat vizsgálatainak megtervezésében és a kísérleti protokoll elkészítésében.
2. Részt vettem a rezidens-betolakodó tesztek kivitelezésében és kielemezésében.
3. A perfúziót és a mikrotómos metszést végeztem.
4. Az immunhisztokémia vizsgálatokat és kvantifikálásukat, illetve az epigenetikai vizsgálatokhoz szükséges szövetgyűjtést végeztem.
5. Részt vettem az RNS izolálásban, az adatok elemzésében és az eredmények interpretálásában.

9. 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. Külön köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak, Dr. Sipos Eszternek és Dr. Aliczki Manónak, hogy egyrészt tudásukkal és tapasztalatukkal segítettek a mindennapokban, másrészt hogy mindezt barátokként tették. Emellett szeretnék köszönetet mondani Szabó Tamásnak, Barsvári Beátának, Farkas Líviának, Bruzsik Bíborkának, Szepte Lászlónak és Saiz Miskolczi Christinának, akiktől rengeteg bátorítást és gyakorlati segítséget kaptam. Továbbá, hálás köszönettel tartozom a Magatartásneurobiológiai Osztály többi munkatársának is.

10. Irodalomjegyzék

1. Susman, E.J., *Psychobiology of persistent antisocial behavior: stress, early vulnerabilities and the attenuation hypothesis*. Neurosci Biobehav Rev, 2006. **30**(3): p. 376-89.
2. Chapple, C.L., K.A. Tyler, and B.E. Bersani, *Child neglect and adolescent violence: examining the effects of self-control and peer rejection*. Violence Vict, 2005. **20**(1): p. 39-53.
3. Neigh, G.N., C.F. Gillespie, and C.B. Nemeroff, *The neurobiological toll of child abuse and neglect*. Trauma Violence Abuse, 2009. **10**(4): p. 389-410.
4. Glaser, D., *Child abuse and neglect and the brain--a review*. J Child Psychol Psychiatry, 2000. **41**(1): p. 97-116.
5. Tóth, M., et al., *Early social deprivation induces disturbed social communication and violent aggression in adulthood*. Behav Neurosci, 2008. **122**(4): p. 849-54.
6. Toth, M., et al., *Post-weaning social isolation induces abnormal forms of aggression in conjunction with increased glucocorticoid and autonomic stress responses*. Horm Behav, 2011. **60**(1): p. 28-36.
7. Teicher, M.H., et al., *The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment*. Neurosci Biobehav Rev, 2003. **27**(1-2): p. 33-44.
8. Teicher, M.H., et al., *Childhood neglect is associated with reduced corpus callosum area*. Biol Psychiatry, 2004. **56**(2): p. 80-5.
9. Tremblay, R.E., *Understanding development and prevention of chronic physical aggression: towards experimental epigenetic studies*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2008. **363**(1503): p. 2613-22.
10. Tremblay, R.E. and M. Szyf, *Developmental origins of chronic physical aggression and epigenetics*. Epigenomics, 2010. **2**(4): p. 495-9.
11. Goldstein, R.B., et al., *Antisocial personality disorder with childhood- vs. adolescence-onset conduct disorder: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions*. J Nerv Ment Dis, 2006. **194**(9): p. 667-75.
12. Buss, A.H., *The psychology of aggression*. 1961, New York: Wiley. 307 p.
13. Zillmann, D., *Hostility and Aggression*. 1979: L. Erlbaum Associates.
14. Csányi, V., *Etológia*. 1994: Nemzeti Tankönyvkiadó.
15. Vaillancourt, T. and S. Sunderani, *Psychopathy and indirect aggression: the roles of cortisol, sex, and type of psychopathy*. Brain Cogn, 2011. **77**(2): p. 170-5.

16. Gomes, M.M., *A concept analysis of relational aggression*. J Psychiatr Ment Health Nurs, 2007. **14**(5): p. 510-5.
17. Blair, R.J., *Neurocognitive models of aggression, the antisocial personality disorders, and psychopathy*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2001. **71**(6): p. 727-31.
18. Kempes, M., et al., *Reactive and proactive aggression in children--a review of theory, findings and the relevance for child and adolescent psychiatry*. Eur Child Adolesc Psychiatry, 2005. **14**(1): p. 11-9.
19. Lopez-Duran, N.L., et al., *Hypothalamic pituitary adrenal axis functioning in reactive and proactive aggression in children*. J Abnorm Child Psychol, 2009. **37**(2): p. 169-82.
20. American Psychiatric Association, A.P.A.D.S.M.T.F. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5*. 2013.
21. Haller, J. and M.R. Kruk, *Normal and abnormal aggression: human disorders and novel laboratory models*. Neurosci Biobehav Rev, 2006. **30**(3): p. 292-303.
22. Poulin, F. and M. Boivin, *Reactive and proactive aggression: evidence of a two-factor model*. Psychol Assess, 2000. **12**(2): p. 115-22.
23. Coccaro, E.F., M.A. Posternak, and M. Zimmerman, *Prevalence and features of intermittent explosive disorder in a clinical setting*. J Clin Psychiatry, 2005. **66**(10): p. 1221-7.
24. Painuly, N., P. Sharan, and S.K. Mattoo, *Relationship of anger and anger attacks with depression: a brief review*. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2005. **255**(4): p. 215-22.
25. Schmahl, C.G., et al., *Psychophysiological reactivity to traumatic and abandonment scripts in borderline personality and posttraumatic stress disorders: a preliminary report*. Psychiatry Res, 2004. **126**(1): p. 33-42.
26. Miczek, K.A., S.F. de Boer, and J. Haller, *Excessive aggression as model of violence: a critical evaluation of current preclinical methods*. Psychopharmacology (Berl), 2013. **226**(3): p. 445-58.
27. Grant, E.C. and J.H. Mackintosh, *A comparison of the social postures of some common laboratory rodents*. Behaviour, 1963. **21**(3-4): p. 246-259.
28. Siegel, A., et al., *Neuropharmacology of brain-stimulation-evoked aggression*. Neurosci Biobehav Rev, 1999. **23**(3): p. 359-89.
29. Sluyter, F., et al., *Toward an animal model for antisocial behavior: parallels between mice and humans*. Behav Genet, 2003. **33**(5): p. 563-74.
30. de Almeida, R.M., et al., *Escalated aggressive behavior: dopamine, serotonin and GABA*. Eur J Pharmacol, 2005. **526**(1-3): p. 51-64.
31. Haller, J., J. van de Schraaf, and M.R. Kruk, *Deviant forms of aggression in glucocorticoid hyporeactive rats: a model for 'pathological' aggression?* J Neuroendocrinol, 2001. **13**(1): p. 102-7.
32. Haller, J., et al., *Chronic glucocorticoid deficiency-induced abnormal aggression, autonomic hypoarousal, and social deficit in rats*. J Neuroendocrinol, 2004. **16**(6): p. 550-7.
33. Marquez, C., et al., *Peripuberty stress leads to abnormal aggression, altered amygdala and orbitofrontal reactivity and increased prefrontal MAOA gene expression*. Transl Psychiatry, 2013. **3**: p. e216.
34. Toth, M., et al., *The neural background of hyper-emotional aggression induced by post-weaning social isolation*. Behav Brain Res, 2012. **233**(1): p. 120-9.
35. Tulogdi, A., et al., *Effects of resocialization on post-weaning social isolation-induced abnormal aggression and social deficits in rats*. Dev Psychobiol, 2012.
36. Chen, P., et al., *Moderating effects of childhood maltreatment on associations between social information processing and adult aggression*. Psychol Med, 2012. **42**(6): p. 1293-304.
37. Fone, K.C. and M.V. Porkess, *Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders*. Neurosci Biobehav Rev, 2008. **32**(6): p. 1087-102.
38. Lukkes, J.L., et al., *Consequences of post-weaning social isolation on anxiety behavior and related neural circuits in rodents*. Front Behav Neurosci, 2009. **3**: p. 18.

39. Veenema, A.H., *Early life stress, the development of aggression and neuroendocrine and neurobiological correlates: what can we learn from animal models?* Front Neuroendocrinol, 2009. **30**(4): p. 497-518.
40. Potegal, M. and D. Einon, *Aggressive behaviors in adult rats deprived of playfighting experience as juveniles*. Dev Psychobiol, 1989. **22**(2): p. 159-72.
41. Wongwitdecha, N. and C.A. Marsden, *Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test*. Behav Brain Res, 1996. **75**(1-2): p. 27-32.
42. Von Frijtag, J.C., et al., *Individual housing during the play period results in changed responses to and consequences of a psychosocial stress situation in rats*. Dev Psychobiol, 2002. **41**(1): p. 58-69.
43. Heidbreder, C.A., et al., *Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome*. Neuroscience, 2000. **100**(4): p. 749-68.
44. Spear, L.P., *The adolescent brain and age-related behavioral manifestations*. Neurosci Biobehav Rev, 2000. **24**(4): p. 417-63.
45. Helmeke, C., et al., *Juvenile emotional experience alters synaptic inputs on pyramidal neurons in the anterior cingulate cortex*. Cereb Cortex, 2001. **11**(8): p. 717-27.
46. Gos, T., et al., *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, 2006. **140**(3): p. 811-21.
47. Rose, J.E. and C.N. Woolsey, *The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat*. Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis, 1948. **27** (1 vol.): p. 210-32.
48. Uylings, H.B. and C.G. van Eden, *Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans*. Prog Brain Res, 1990. **85**: p. 31-62.
49. Damasio, H., et al., *The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient*. Science, 1994. **264**(5162): p. 1102-5.
50. Grafman, J., et al., *Frontal lobe injuries, violence, and aggression: a report of the Vietnam Head Injury Study*. Neurology, 1996. **46**(5): p. 1231-8.
51. Blair, R.J. and L. Cipolotti, *Impaired social response reversal. A case of 'acquired sociopathy'*. Brain, 2000. **123** (Pt 6): p. 1122-41.
52. Brower, M.C. and B.H. Price, *Neuropsychiatry of frontal lobe dysfunction in violent and criminal behaviour: a critical review*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2001. **71**(6): p. 720-6.
53. Dodge, K.A., et al., *Hostile attributional biases in severely aggressive adolescents*. J Abnorm Psychol, 1990. **99**(4): p. 385-92.
54. Best, M., J.M. Williams, and E.F. Coccaro, *Evidence for a dysfunctional prefrontal circuit in patients with an impulsive aggressive disorder*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 8448-53.
55. Blair, K.S., et al., *Differentiating among prefrontal substrates in psychopathy: neuropsychological test findings*. Neuropsychology, 2006. **20**(2): p. 153-65.
56. Yang, Y. and A. Raine, *Prefrontal structural and functional brain imaging findings in antisocial, violent, and psychopathic individuals: a meta-analysis*. Psychiatry Res, 2009. **174**(2): p. 81-8.
57. Anderson, N.E. and K.A. Kiehl, *The psychopath magnetized: insights from brain imaging*. Trends Cogn Sci, 2012. **16**(1): p. 52-60.
58. Boccardi, M., et al., *Cortex and amygdala morphology in psychopathy*. Psychiatry Res, 2011. **193**(2): p. 85-92.
59. Finger, E.C., et al., *Abnormal ventromedial prefrontal cortex function in children with psychopathic traits during reversal learning*. Arch Gen Psychiatry, 2008. **65**(5): p. 586-94.
60. Gregory, S., et al., *The antisocial brain: psychopathy matters*. Arch Gen Psychiatry, 2012. **69**(9): p. 962-72.

61. Hazlett, E.A., et al., *Reduced anterior and posterior cingulate gray matter in borderline personality disorder*. Biol Psychiatry, 2005. **58**(8): p. 614-23.
62. Raine, A., et al., *Reduced prefrontal gray matter volume and reduced autonomic activity in antisocial personality disorder*. Arch Gen Psychiatry, 2000. **57**(2): p. 119-27; discussion 128-9.
63. Tiihonen, J., et al., *Brain anatomy of persistent violent offenders: more rather than less*. Psychiatry Res, 2008. **163**(3): p. 201-12.
64. Yang, Y., A.L. Glenn, and A. Raine, *Brain abnormalities in antisocial individuals: implications for the law*. Behav Sci Law, 2008. **26**(1): p. 65-83.
65. Soloff, P.H., et al., *Impulsivity and prefrontal hypometabolism in borderline personality disorder*. Psychiatry Res, 2003. **123**(3): p. 153-63.
66. Serper, M., et al., *Neuropsychological and symptom predictors of aggression on the psychiatric inpatient service*. J Clin Exp Neuropsychol, 2008. **30**(6): p. 700-9.
67. Lapierre, D., C.M. Braun, and S. Hodgins, *Ventral frontal deficits in psychopathy: neuropsychological test findings*. Neuropsychologia, 1995. **33**(2): p. 139-51.
68. King, J.A., et al., *Doing the right thing: a common neural circuit for appropriate violent or compassionate behavior*. Neuroimage, 2006. **30**(3): p. 1069-76.
69. Lotze, M., et al., *Evidence for a different role of the ventral and dorsal medial prefrontal cortex for social reactive aggression: An interactive fMRI study*. Neuroimage, 2007. **34**(1): p. 470-8.
70. Montag, C., et al., *Does excessive play of violent first-person-shooter-video-games dampen brain activity in response to emotional stimuli?* Biol Psychol, 2012. **89**(1): p. 107-11.
71. Pietrini, P., et al., *Neural correlates of imaginal aggressive behavior assessed by positron emission tomography in healthy subjects*. Am J Psychiatry, 2000. **157**(11): p. 1772-81.
72. New, A.S., et al., *Laboratory induced aggression: a positron emission tomography study of aggressive individuals with borderline personality disorder*. Biol Psychiatry, 2009. **66**(12): p. 1107-14.
73. Groenewegen, H.J., *Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography*. Neuroscience, 1988. **24**(2): p. 379-431.
74. Ongur, D. and J.L. Price, *The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans*. Cereb Cortex, 2000. **10**(3): p. 206-19.
75. Uylings, H.B., H.J. Groenewegen, and B. Kolb, *Do rats have a prefrontal cortex?* Behav Brain Res, 2003. **146**(1-2): p. 3-17.
76. Vertes, R.P., *Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat*. Neuroscience, 2006. **142**(1): p. 1-20.
77. Toth, M., et al., *Neural inputs of the hypothalamic "aggression area" in the rat*. Behav Brain Res, 2010. **215**(1): p. 7-20.
78. Floyd, N.S., et al., *Orbitomedial prefrontal cortical projections to hypothalamus in the rat*. J Comp Neurol, 2001. **432**(3): p. 307-28.
79. Kruk, M.R., et al., *Discriminant analysis of the localization of aggression-inducing electrode placements in the hypothalamus of male rats*. Brain Res, 1983. **260**(1): p. 61-79.
80. Lammers, J.H., et al., *Hypothalamic substrates for brain stimulation-induced attack, teeth-chattering and social grooming in the rat*. Brain Res, 1988. **449**(1-2): p. 311-27.
81. Lin, D., et al., *Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus*. Nature, 2011. **470**(7333): p. 221-6.
82. Siegel, A., et al., *Neuropharmacology of brain-stimulation-evoked aggression*. Neurosci Biobehav Rev, 1999. **23**(3): p. 359-89.
83. Lee, H., et al., *Scalable control of mounting and attack by Esr1 neurons in the ventromedial hypothalamus*. Nature, 2014.
84. de Bruin, J.P., H.G. van Oyen, and N. Van de Poll, *Behavioural changes following lesions of the orbital prefrontal cortex in male rats*. Behav Brain Res, 1983. **10**(2-3): p. 209-32.

85. De Bruin, J.P.C., *Orbital prefrontal cortex, dopamine, and social-agonistic behavior of male long evans rats*. Aggressive Behavior, 1990. **16**(3-4): p. 231-248.
86. Siegel, A., H. Edinger, and M. Dotto, *Effects of electrical stimulation of the lateral aspect of the prefrontal cortex upon attack behavior in cats*. Brain Res, 1975. **93**(3): p. 473-84.
87. Halasz, J., et al., *The activation of prefrontal cortical neurons in aggression--a double labeling study*. Behav Brain Res, 2006. **175**(1): p. 166-75.
88. Wall, V.L., E.K. Fischer, and S.T. Bland, *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, 2012. **107**(3): p. 440-50.
89. Ago, Y., et al., *Role of social encounter-induced activation of prefrontal serotonergic systems in the abnormal behaviors of isolation-reared mice*. Neuropsychopharmacology, 2013. **38**(8): p. 1535-47.
90. Ferris, C.F., et al., *Imaging the neural circuitry and chemical control of aggressive motivation*. BMC Neurosci, 2008. **9**: p. 111.
91. Bassarath, L., *Neuroimaging studies of antisocial behaviour*. Can J Psychiatry, 2001. **46**(8): p. 728-32.
92. Fumagalli, M. and A. Priori, *Functional and clinical neuroanatomy of morality*. Brain, 2012. **135**(Pt 7): p. 2006-21.
93. Krishnan, K.R., *Brain imaging correlates*. J Clin Psychiatry, 1999. **60 Suppl 15**: p. 50-4.
94. Bufkin, J.L. and V.R. Luttrell, *Neuroimaging studies of aggressive and violent behavior: current findings and implications for criminology and criminal justice*. Trauma Violence Abuse, 2005. **6**(2): p. 176-91.
95. Cushing, B.S. and K.M. Kramer, *Mechanisms underlying epigenetic effects of early social experience: the role of neuropeptides and steroids*. Neurosci Biobehav Rev, 2005. **29**(7): p. 1089-105.
96. Lesch, K.P., et al., *Targeting brain serotonin synthesis: insights into neurodevelopmental disorders with long-term outcomes related to negative emotionality, aggression and antisocial behaviour*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2012. **367**(1601): p. 2426-43.
97. Bird, A., *Perceptions of epigenetics*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 396-8.
98. Handel, A.E., G.C. Ebers, and S.V. Ramagopalan, *Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease*. Trends Mol Med, 2010. **16**(1): p. 7-16.
99. McGowan, P.O. and M. Szyf, *The epigenetics of social adversity in early life: implications for mental health outcomes*. Neurobiol Dis, 2010. **39**(1): p. 66-72.
100. Lister, R., et al., *Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences*. Nature, 2009. **462**(7271): p. 315-22.
101. Lutz, P.E. and G. Turecki, *DNA methylation and childhood maltreatment: from animal models to human studies*. Neuroscience, 2014. **264**: p. 142-56.
102. Blaze, J. and T.L. Roth, *Exposure to caregiver maltreatment alters expression levels of epigenetic regulators in the medial prefrontal cortex*. Int J Dev Neurosci, 2013. **31**(8): p. 804-10.
103. Miguel-Hidalgo, J.J., *Brain structural and functional changes in adolescents with psychiatric disorders*. Int J Adolesc Med Health, 2013. **25**(3): p. 245-56.
104. O'Neill, A. and T. Frodl, *Brain structure and function in borderline personality disorder*. Brain Struct Funct, 2012. **217**(4): p. 767-82.
105. Gavin, D.P., K.A. Chase, and R.P. Sharma, *Active DNA demethylation in post-mitotic neurons: a reason for optimism*. Neuropharmacology, 2013. **75**: p. 233-45.
106. Ruzicka, W.B., et al., *Selective epigenetic alteration of layer I GABAergic neurons isolated from prefrontal cortex of schizophrenia patients using laser-assisted microdissection*. Mol Psychiatry, 2007. **12**(4): p. 385-97.
107. Weiss, E.M., *Neuroimaging and neurocognitive correlates of aggression and violence in schizophrenia*. Scientifica (Cairo), 2012. **2012**: p. 158646.

108. Soyka, M., *Neurobiology of aggression and violence in schizophrenia*. Schizophr Bull, 2011. **37**(5): p. 913-20.
109. Brown, A.S., *The environment and susceptibility to schizophrenia*. Prog Neurobiol, 2011. **93**(1): p. 23-58.
110. Heinz, A., L. Deserno, and U. Reininghaus, *Urbanicity, social adversity and psychosis*. World Psychiatry, 2013. **12**(3): p. 187-97.
111. Beach, S.R., et al., *Methylation at 5HTT mediates the impact of child sex abuse on women's antisocial behavior: an examination of the Iowa adoptee sample*. Psychosom Med, 2011. **73**(1): p. 83-7.
112. Wang, D., et al., *Peripheral SLC6A4 DNA methylation is associated with in vivo measures of human brain serotonin synthesis and childhood physical aggression*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39501.
113. Paxinos, G. and C. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th ed. 1998, San Diego: Academic Press.