

37. OTDK Biológia Szekció

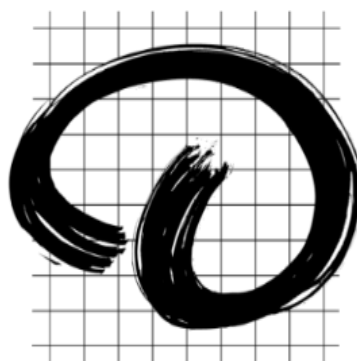
Stressz iránti sérülékenység agyi hálózati jellemzőinek feltérképezése poszttraumás stressz zavar modellben

Maróthy Róbert Dániel
Biológia MSc. II. évf.

Küldő intézmény:
Állatorvostudományi Egyetem

Kutatómunka helye:
HUN-REN Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet
Transzlációs Magatartás Idegtudomány Kutatócsoport

Témavezetők:
Dr. Tóth Máté
Balla Gyula



Budapest
2024

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés	4
1.1. A poszttraumás stressz zavar (PTSD)	4
1.2. A PTSD-t érintő neurobiológiai hálózatok.....	5
1.3. A PTSD terápiás lehetőségei és kutatása	6
2. Célkitűzések	8
3. Anyag és Módszer.....	9
3.1. Állatok.....	9
3.2. Kísérleti terv.....	9
3.3 Magatartástesztetek.....	9
3.3.1. Kontextuális félelmi kondicionálás	9
3.3.2. Kontextuális félelmi előhívás és kategorizálás	10
3.4. Perfúzió és metszés	10
3.5. Immunhisztokémia és mikroszkópia.....	11
3.6. Teljes agyi feltérképezés	12
3.6.1 Képek előkészítése	12
3.6.2. Illesztés.....	13
3.6.3. Korrekció.....	14
3.6.4. Szegmentálás	15
3.6.5. Kvantifikálás, képi analízis	16
3.7. Statisztikai elemzés	16
4. Eredmények	18
4.1. A félelmi generalizáció és kioltódás	18
4.2. A sérülékeny és ellenálló állatok idegsejt-aktivitási mintázatainak összehasonlítása	19
4.3. Az agyrégiók funkcionális kapcsoltságának összehasonlítása a vizsgált csoportokban .	23
5. Diskusszió	29
6. Összefoglaló.....	34
7. Summary	35
8. Köszönetnyilvánítás	36
9. Irodalomjegyzék	36

Rövidítések jegyzéke

ACC	anterior cinguláris kéreg (<i>anterior cingulate cortex</i>)
CA1	cornu ammonis 1, hippocampusz
DSM-3, -5	Mentális Zavarok Diagnosztikai és Statisztikai kézikönyv 3., 5. kiadás (<i>Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 3rd, 5th Edition</i>)
DMN	alapértelmezett hálózat (<i>default mode network</i>)
fMRI	funkcionális mágneses rezonanciavizsgálat
HPA	hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg (<i>hypothalamic-pituitary-adrenal</i>)
GABA	gamma-aminovajsav (<i>gamma-aminobutyric acid</i>)
PBS	foszfátpuffer sóoldat
PFA	paraformaldehid
SN	<i>salience network</i>
SNRI	szerootonin norepinefrin visszavétel gátló (<i>serotonin–norepinephrine reuptake inhibitor</i>)
SSRI	szelektív szerootonin visszavétel gátló (<i>selective serotonin reuptake inhibitors</i>)
TBST	0.01 M Tris*HCl, 0.1% TritonX-100, pH 7.4 Tris puffer oldat
TERE	többszörös emlékezeti rendszer elmélet
PTSD	poszttraumás stressz zavar (<i>post-traumatic stress disorder</i>)

1. Bevezetés

1.1. A poszttraumás stressz zavar (PTSD)

A történelem során számos névvel illették azt a jelenséget, mely egy súlyos traumát vagy életveszélyes eseményt követően az egyének nehezen tudtak, vagy nem is sikerült nekik visszatérniük a normális, hétköznapi életükbe. A 80-as évek elején a Mentális Zavarok Diagnosztikai és Statisztikai kézikönyv 3. kiadásban (DSM-3, [1]) ezt poszttraumás stressz zavarnak (PTSD) nevezték el, mely először a szorongásos zavarok közé tartozott, majd később a traumával és stresszorral összefüggő pszichiátriai kórképek közé sorolták (DSM-5, [2]). A stressz különböző formákban jelenik meg mindennapi életünkben. Egyes kutatások szerint, a társadalom akár 90%-a is átélte élete során legalább egy traumát [3], azaz halálos, tényleges veszélyt, szexuális erőszakot, vagy többszörös traumatikus eseménynek való kitettséget. Habár a traumatikus eseményt átéltek többsége a traumát követő hatásokból felépül, a traumát átéltek egy alpopulációjában (megközelítően 10-20%, a trauma típusa alapján) a traumát követően akár évekig is tartósan fennmaradnak a PTSD-ként diagnosztizált tünetek. Ezt a csoportot nevezzük veszélyeztetett, sérülékeny populációnak. A PTSD diagnosztikai követelménye a traumatikus esemény átélése, szemtanúsága, vagy valamelyes kitettségét követően a zavarral kapcsolatos valamennyi tünet tapasztalása. Ezen tünetegyüttesek közé tartoznak az intrúzív gondolatok (rémálmok, a traumáról betörő emlékek, gondolatok), elkerülő magatartás (személyek, helyszínek elkerülése, amely a traumára emlékeztetik az egyént), traumával kapcsolatos főbb emlékekről való megfélemezés, negatív hangulat, gondolkodásmód (például a trauma kialakulása miatti önhibáztatás, szociális izoláció, másoktól való elhatárolódás), valamint fokozott izgatottság ('hyperarousal', rossz alvási minőség, koncentrációs zavarok)[2].

Epidemiológiai vizsgálatok korábban demonstrálták, hogy a PTSD kialakulása nőknél magasabb, valamint egyéb mentális zavarokkal (szorongás, depresszió) vagy szerfüggőséggel komorbid lehet [4][5]. Szintén fontos kiemelni, hogy az élethosszig tartó PTSD prevalenciájában is jelentős különbségek vannak nemenként (férfiakban 6,2-8,2%, míg nőkben 20,9% [6]), illetve a trauma típusában (természeti katasztrófa túlélői között kialakult PTSD 5-10%, míg például szexuális erőszak áldozatai között ez az arány akár 40% felett is lehet [7]). Mindezen kívül a PTSD kialakulásának kockázatát növelheti számos, a traumát megelőző egyéb tényező is [8]. Epigenetikai vizsgálatok kimutatták, hogy korai gyermekkori elhanyagolás, vagy trauma átélése jelentősen befolyásolja az egyén stresszorokra adott válaszát, amely a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese (HPA) tengely abnormális működésében jelenik meg [9]. A HPA tengely megváltozott működése a hippokampusz glükokortikoid receptorainak

gátlásával történik meg. Mind rágcsgáló, mind humán tanulmányok alátámasztották, hogy ez a nem megfelelő HPA tengely regulációhoz, hosszútávú stresszválaszhoz vezet, amely megfigyelhető PTSD-vel diagnosztizált páciensekben is [10]. Teljes genom-asszociációs vizsgálatok (GWAS) rámutattak, hogy több gén (például szerotonin 2A receptor gén [11], FKBP5 [12]) polimorfizmusai is szerepet játszhat a PTSD kialakításában. Ezen kívül már meglévő pszichiátriai zavarok, háborús tapasztalatok, vagy akár az iskolázottság is hatással lehet a sérülékenységre [8, 13]. Noha jelen dolgozat ezen kérdésekre, faktorokra nem tér ki, hipotézisünk szerint mindezek megjelennek a molekuláris háttér, illetve a hálózati működés különbségeiben is, amelyek vizsgálataink fókuszában álltak.

1.2. A PTSD-t érintő neurobiológiai hálózatok

A többszörös emlékezeti rendszer elmélet (TERE) szerint a különböző tanúlással és emlékezéssel kapcsolatos rendszereket egymással versengő vagy együttműködő alrendszerekként kezelik [14], ezért komplex viselkedési folyamatoknál lehetőség szerint érdemes arra törekednünk, hogy a résztvevő agyi régiók koordinált működését vizsgáljuk az eseménnyel kapcsolatban. Ez az elmélet rámutat a különböző agyrégiók memóriafolyamatokban betöltött szerepeire, például a hippokampusz szerepére a térbeli tanulásban és epizódikus memóriában [15, 16], a kisagyéra a reflexes mozgásokban, vagy a striátuméra, a habitusok elsajátításában [17]. A PTSD főbb tünetegyüttese (a negatív hangulat, az elkerülő gondolkodásmód, a traumával kapcsolatos emlékek betörése, a heves reakciók és túlzott izgatottság) visszavezethetőek olyan tartós szerkezet- és/vagy funkcióbeli változásokra, amely a félelmi tanulás sérülésében, azaz a félelmi generalizáció zavarában nyilvánul meg. A félelmi tanulás egy jó példája a TERE-nek, hiszen egy neurobiológiailag összetett folyamatról van szó, számos szereplővel, melyek pontos működése sokszor tisztázatlan. A nem megfelelő félelmi válasz a rátermettségre (fitnessre) is hatással lehet, hiszen egy rosszul felmért vagy kivitelezett válaszreakció kritikusan befolyásolhatja az egyed életbenmaradási esélyeit. Ezért nagy jelentőséggel bír, hogy a félelmi válasz kialakulásáért felelős félelmi agyi hálózat evolúciósan egy gyors és plasztikus rendszerré fejlődött, ami faj-specifikus védekezésekben is megnyilvánul [18]. Rose és Schulkin szerint a félelmi válaszok (például vérnyomás növekedése, emelkedett szívverés szám, dermedési reakció) funkcionálisan adaptív viselkedési válaszok, amelyek valamilyen vészhelyzetben segítenek az egyednek a megfelelő védekezés kialakításában, ezzel segítve az életveszélyes helyzetek, illetve az azzal járó sérülések elkerülését [19]. A generalizáció ezen kívül számos külső tényezőn alapszik, mint például a stimulusok típusán és intenzitásán [20], kora-életkori stressz hatásokon [21], valamint a

környezeti elemeken [22]. Mivel sosem történik két ugyanolyan esemény ugyanolyan körülmények között, ezért fontos, hogy a generalizáció nem csak a múltbeli eseményekhez hasonló jelzések elkerülését szolgálja, hanem azok kiegészítésével a jövőbeli potenciális veszélyekre is felhívja az egyén figyelmét. Bár a generalizációnak meg vannak a maga előnyei, a túlgeneralizálás, vagy a félelmi válasz általánosítása már maladaptív, az egyén mindennapi életét nehezítheti meg, amikor a veszélyre nem jellemző ingerekre a szervezet potenciális veszélyként reagál. Ezt a félelmi hálózatnak a túlstimulálásával éri el a szervezet, olyan agyterületekre hatva, mint például az amigdala. Az amigdala egy, az érzelmi feldolgozáson kívül, a megfelelő megküzdési válasz kialakításában is részt vevő terület [23]. Humán funkcionális mágneses rezonanciavizsgálatokban (fMRI) az amigdala túlzott aktivitását figyelték meg PTSD-s emberekben [24], míg a csökkent aktivitását a PTSD-vel szembeni rezilienciával hozták összefüggésbe [25]. Más kutatások az anterior cinguláris kéreg (ACC) aktivitásával is foglalkoztak, mely a basolaterális amigdalával kölcsön hatva vesz részt a veleszületett félelmi reakciók, illetve kondicionált félelmi válasz kialakításában [26]. PTSD-s betegekben az ACC-t humán MRI vizsgálatok szintén összefüggésbe hozták a pszichofiziológiai félelmi válasz kialakításával (csökkent caudális ACC térfogat fenyegetettség érzékenységet, valamint fenyegetésre erősebb félelmi választ vált ki; [27]). Több vizsgálat fókusza a prefrontális kéreg (PFC) szerepére irányult, amely egyéb funkciói mellett fontos szerepet játszik az érzelmek felülről lefelé irányuló szabályozásában, a viselkedésben, a gondolkodásban [28], és sérülései, léziói révén a koncentráció, figyelem összpontosítás képességét rontja [29, 30]. Nem megfelelő szabályozása fokozott ingerlékenységet [31], meggondolatlan viselkedést eredményezhet [32], vagy a valós események és a visszatérő emlékek alacsony hatékonyságú megkülönböztetését okozhatja [33]. A PFC abnormális működése is megfigyelhető PTSD-s egyéneknél. Például Hayes és munkatársai meta-analízisükben PTSD-vel diagnosztizált személyeknél csökkent prefrontális kérgi aktivitást mutattak ki [33].

1.3. A PTSD terápiás lehetőségei és kutatása

A PTSD egy komplex pszichiátriai kórkép, melynél számos neurobiológiai rendszer érintett. Bár a PTSD patogenezisével számos kutatás foglalkozott [34], sajnos kevés olyan gyógyszerészeti lehetőség van, amely általános kezelésre alkalmazható lenne. Jelenleg elsősorban antidepresszánsokat (pl: szelektív szerotonin visszavétel gátlók (SSRI) és szerotonin norepinefrin visszavétel gátlók (SNRI)) használnak a PTSD kezelésére, de más rendszereket, mint például a glutamáterg és adrenerg rendszereket, valamint a HPA tengelyt érintő tüneteket

is célba vevő gyógyszerterápiákat is javasolnak [35]. Például felhasználják a benzodiazepineket, amelyek a GABA-A receptorok modulációja révén fejtik ki hatásukat, ezzel a PTSD szorongásos tüneteit megcélózva. Ugyanakkor mind a benzodiazepinek, mind más szorongásoldó szerek hatékonysága erősen vitatott [36]. Noha a fenti szerek bizonyos esetekben hatékonyak, sok terápia-rezisztens eset miatt a gyógyszeres kezelés kérdése a mai napig nem megoldott [37, 38]. Emiatt a kórkép pontosabb megértése, valamint a hatékonyabb gyógyszeres kezelési módok megtalálása kiemelt fontosságú. Fontos megjegyezni, hogy a gyógyszerterápiák mellett a különféle pszichoterápiák hatékonyságát kognitív viselkedés terápiával (pl. expozíciós terápia) lehet fokozni [39], mely során a pácienseket egy biztonságos környezetben, fokozatos szorongásoldással újra kiteszik az átélt traumára emlékeztető szituációnak, így a szorongás és azt kísérő elkerülő viselkedés csökken a kioltódás révén (biztonság újratanulása).

Ez a PTSD paradigma állatkísérletekkel jól modellezhető a félelmi kondicionálás hosszútávú verziójával több szempontból is: (1) a PTSD magvát egy kontextuális félelmi kondicionálás adja, ahol a maladaptív magatartás (PTSD) lényegét a biztonságos környezetben fellépő és nem kioltható félelem adja, (2) a hosszútávú progresszív- perzisztáló félelem, annak generalizálódása, kioltódása jól mérhető, manipulálható, így sérülékeny alpopulációk azonosíthatóak. A PTSD jobb megértésének tehát elengedhetetlen elemei a különböző állatmodellek, melyek segítségével a zavar pontosabb mechanizmusát tudjuk feltárni, valamint a klinikumnak potenciálisan új gyógyszer-célpontokat jelölhetünk ki. Ráadásul mindezek longitudinális módon végig követhetőek a mechanizmusok vizsgálatával együtt, például az agy fMRI vizsgálataival. Mivel a PTSD-t rendkívül sokféle trauma válthatja ki (fizikális és/vagy érzelmi), figyelembe véve az eltérő genetikai háttereket, valamint a tünetek heterogenitását, teljes kórképet lefedő állatmodell létrehozása szinte lehetetlen, ezért inkább a betegség egyes aspektusait demonstráló modellekről beszélhetünk [40]. Ezen modelleknek számos kritériumnak meg kell felelniük a transzlálhatóság szempontjából: (1) a tünetek hosszú ideig fennmaradjanak (például a traumát vagy stresszhatást követő több héttel is mérhető legyen az adott félelmi válasz), (2) több változót is mérjen a robosztusság miatt, (3) a mért hatás más laborokban, azonos körülmények között reprodukálható legyen, valamint (4) olyan súlyos stresszszorral rendelkezzen, amely az állat számára elkerülhetetlen, előre nem jelezhető, és utánozza a PTSD-vel kapcsolatos trauma aspektusait [41]. Más állatmodellekkel szemben (pl. ragadozó stressz, egyszeri hosszantartó stressz, korlátozó stressz, vagy előre nem jósolható stressz) a dolgozatban használt kontrollálhatatlan lábsokk modell rendelkezik a felsorolt

előnyökkel és validabb állatmodellnek tekinthető, laborunk vizsgálatai szerint is, ezért esett választásunk erre a paradigmára [40]. Mivel a félelmi emlékek és traumára adott válasz szerveződése számos agyi struktúrához kötődik, így fontos lenne elfogulatlan ('unbiased') módszerek alkalmazása a PTSD-ben történő elváltozások megértésére is. A teljes agyi térképezéssel kapcsolatos vizsgálatok csak az előző években megjelent volumetriás agyatlaszok publikálása után indultak kibontakozásnak [42, 43], hiszen rendkívül fontos, hogy az adatok feldolgozása során a lehető legpontosabban történjenek az anatómiai kijelölések [44]. Bár számos eszköz rendelkezésre áll az ilyen vizsgálatok kivitelezésére, a legtöbb összetett programkódokhoz kötött, legtöbbször grafikai felület nélküliek és a legtöbb egy-egy kutatócsoportnak a saját programja. Ezt a problémát kívánja orvosolni az EBRAINS konzorcium által fejlesztett és fenntartott nyílt kutatási infrastruktúrákat támogató platformja (<https://www.ebrains.eu>), valamint Puchades és munkatársai által fejlesztett volumetrikus atlaszadatokhoz történő illesztéseket és régióalapú kvantifikációkat elősegítő eszközök, amelyek nagyban segíthetik az egységes teljes agyi képelemzéseket [44].

2. Célkitűzések

Dolgozatomban a PTSD félelem generalizáció zavarának teljes agyat lefedő elfogulatlan, komplexebb vizsgálatát tűztük ki. Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján jól elkülöníthetünk sérülékeny és ellenálló populációkat patkány PTSD-modellben, félelmi kondicionálás során. Ezen csoportok agymintáinak elemzésekor a következőkre voltunk kíváncsiak: 1) a kontextuális félelmi kondicionálást követő hosszútávú félelmi generalizáció során, mely területeken mutatkozik agyi aktivitásbeli különbség a PTSD-szerű tüneteket produkáló (sérülékeny) és azokat nem mutató (ellenálló) populációk tagjai között, mely magyarázza a félelmi generalizáció variabilitását, és 2) milyen összetett hálózati eltérések kísérik a sérülékenységet?

Ezen kérdések megválaszolását a csoportunkban már alkalmazott szoftverek (QuickNII, VisuAlign, ilastik és Nutil) segítségével végeztük el a mikroszkópos képek módosításával, feldolgozásával, majd az akut neuronális aktivitást jelző c-Fos marker kvantifikálásával a fent említett sérülékeny és ellenálló patkány populációk esetében.

3. Anyag és Módszer

3.1. Állatok

A kísérletekben 26 felnőtt (100-150 napos, csoportonként 8-9) hím Long Evans patkányt használtunk fel két kohort alkalmazásával. Az állatokat négy egyedből álló csoportokban tartottuk, fordított napszak ciklusban (lámpák 07:00-kor kapcsolódtak le, 19:00-kor kapcsolódtak fel). Az állattartó, illetve a kísérleti helyiségekben a hőmérséklet 22 ± 2 °C, míg a páratartalom $60 \pm 10\%$ volt. Az állatoknak *ad libitum* módon volt táplálék és víz biztosítva. A kísérletek az európai uniós irányelveknek megfelelően kerültek kivitelezésre, melyet a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Állatjóléti Tanácsa hagyott jóvá. Az állatkísérleti engedély számunk: PE/EA/874-5/2020.

3.2. Kísérleti terv

Az állatokon félelmi kondicionálást végeztünk adott kontextusban, majd teszteltük a félelmi előhívásukat, ami a következőképpen zajlott: az első napon kontrollálhatatlan lábsokk sorozatnak tettük ki az állatokat egy adott kontextusban ('A' kontextus, 1A. ábra bal oldal). 28 nappal később az állatokat az 'A' kontextusba helyeztük vissza, majd a következő két napon egy új (megváltoztatott taktilis, vizuális és olfaktórikus ingerek), úgy nevezett biztonságos kontextusba ('B' kontextusba) helyeztük az állatokat (1A. ábra jobb oldala). Irodalmi adatok alapján az állatok által mutatott félelmi válasz, a dermedés, az állatok belső-félelmi állapotának egy megbízható jelzője [45], így a félelmi generalizációt és kioltódást a dermedés százalékos arányával mértük. 90 perccel az utolsó tesztet követően mélyaltatásban perfundáltuk az állatokat (1A. ábra jobb oldala), majd ezt követően a szövetmintákat fixáltuk és immunhisztokémiai eljárással jelöltük a c-Fos fehérjét (1B. ábra). Ezt követően a kirakott szeletekről mikroszkópos képeket készítettünk, majd képfeldolgozási és elemzési lépések segítségével teljes agyi feltérképezést végeztünk el rajtuk (1B. ábra).

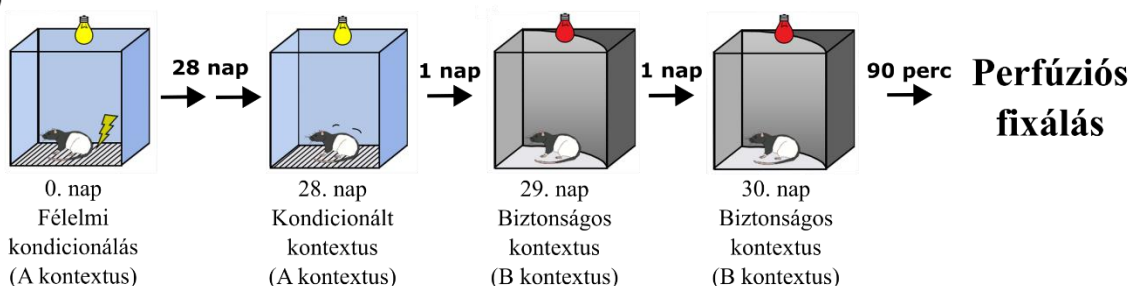
3.3 Magatartásteszték

3.3.1. Kontextuális félelmi kondicionálás

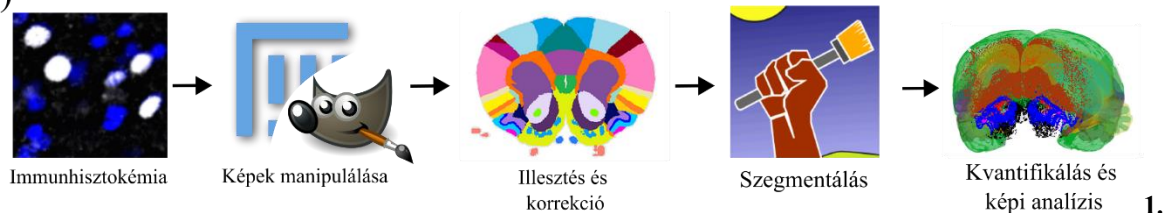
A kísérleti állatokat egyszeri kontrollálhatatlan lábsokk sorozat érte 50x50x50 cm-es plexi dobozokban jellegzetes 'A' kontextusban: fém rács aljzat, erős fény, csíkos oldalfalak, alkoholos törlés. A sokkolást megelőzte két és fél perc habituáció, mely a kontextuális kódolást segíti, majd tíz darab 2,4 mA erősségű lábsokkokat kaptak az állatok 5 perc alatt. Egy sokk 1 másodpercig tartott, két sokk közt eltelt idő 30 másodperc volt, a sokk impulzusok szaggatottak voltak (10 msec pulzus, 20 msec szünet) az ártalomhatás elkerülése végett (tkp. pszichés

stresszor). Az állatok félelmi válaszát a dermedéssel töltött idő százalékos arányával jellemeztük.

A)



B)



ábra: A munkafolyamatok szemléltetése. A) A 0. napon félelmi kondicionáltuk az állatokat, majd 28 nappal később a kondicionált 'A' környezetbe helyeztük vissza őket. Az ezt követő 2 napban egy biztonságos 'B' környezetbe helyeztük az állatokat, majd az utolsó teszt után perfundáltuk őket. B) A fixálás után immunhisztokémiai jelölést végeztünk (kék: Hoechst, fehér: c-Fos). Ezt követően mikroszkópos képekként rögzítettük a jeleket, ahol szükséges volt, korrigáltuk a metszetek elhelyezkedését és egy patkány 3D referencia atlaszhoz illesztettük azokat. Az illesztéssel párhuzamosan szegmentáltuk a képeinket majd analizáltuk őket azonosított egységként.

3.3.2. Kontextuális félelmi előhívás és kategorizálás

28 nappal a kondicionálást követően visszahelyeztük az állatokat az 'A' kontextusba, ellenben ez idő alatt nem kaptak lábsokkot. Ennek a célja az állatok félelmi memóriájának tesztelése (kontextuális félelmi előhívás) volt. Ezt követő két napon az állatokat egy új, biztonságos környezetbe helyeztük (50x50x50 cm-es plasztik doboz, fehér aljzat, csíkos oldalfalak, szappanos vízzel történő tisztítás, vörös fényben – 'B' kontextus), mely során a félelem generalizációját és félelmi kioldódást mértük 20 percen keresztül, szintén a dermedéssel töltött idő százalékos arányával. A B kontextusokban mért dermedési arány átlaga alapján az állatokat csoportokba soroltuk, ahol a populációs értékek alsó és felső 25%-ába tartozó állatokat ellenállóként és sérülékenyként definiáltuk. Ezen kívül nem sokkolt kontroll csoportot is alkalmaztunk, melyet nem ért lábsokk az első napon, azonban minden tesztben részt vettek.

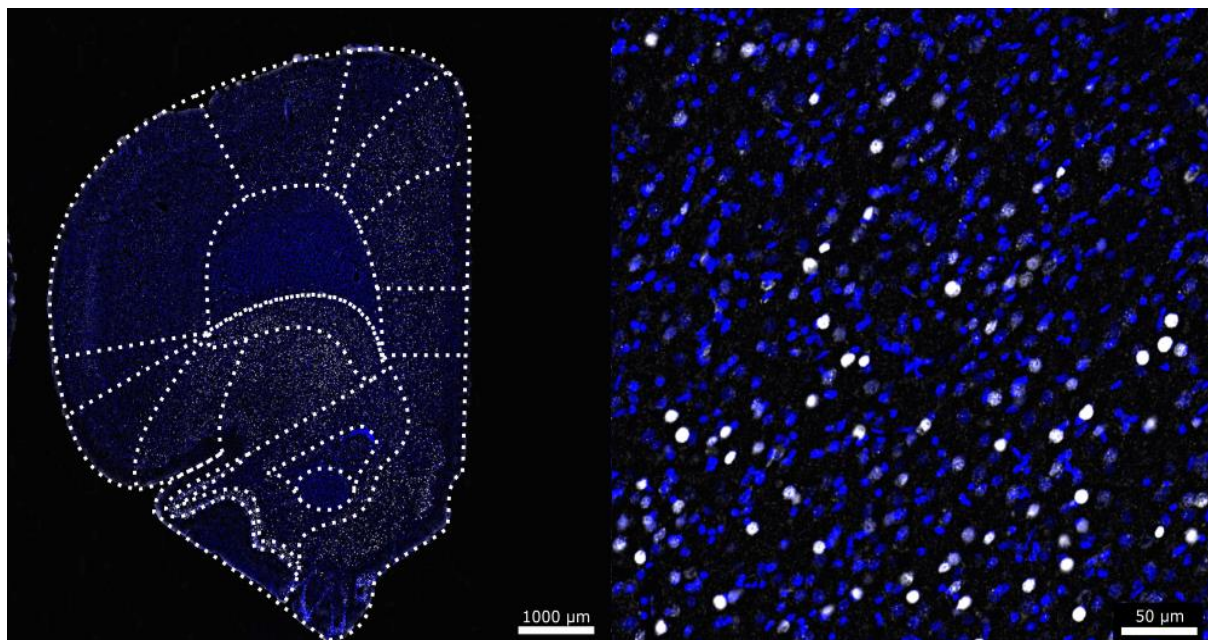
3.4. Perfúzió és metszés

A második B kontextus teszt után 90 perccel az állatokat mélyaltattuk hasüregbe injektált ketamin-xylazin-pipolphenel. A mélyaltatásban levő állatok mellkasát feltártuk és bal

szívkamrájukba egy kanült helyeztünk. Ezen keresztül fiziológiás foszfátpuffer sóoldattal (PBS) távolítottuk el az állatok szöveteiből a vért, majd 4%-os paraformaldehid (PFA) oldattal fixáltuk azokat. A metszetek készítését megelőzően a minták 24 órára 30%-os szacharóz tartalmú krioprotektív PBS-be kerültek, melynek célja a fagyási sérülések elkerülése volt. A mintákból 30 μm vastagságú koronális metszeteket készítettünk szánka-mikrotóm használatával. A metszést követően a metszeteket fagyállóba helyeztük és tároltuk -20°C -on.

3.5. Immunhisztokémia és mikroszkópia

A kutatásunkban vizsgálandó sejtpopulációk megjelenítéséhez immunhisztokémiai jelölést alkalmaztunk. A módszer során az általunk választott célgén által kódolt fehérje ellen termeltetett ellenanyagokkal jelöltük meg (elsődleges, primer ellenanyag), melyeket az elsődleges jelölő ellen termeltetett antitestekkel jelöltünk meg (másodlagos, szekunder ellenanyag), amikhez konjugált fluorofórok kapcsolódnak. Az általunk vizsgálni kívánt célfehérjék és a felhasznált ellenanyagok a következők voltak: c-Fos; elsődleges ellenanyag tengeri malacban termeltetett anti-c-Fos IgG (Synaptic Systems, 226004, 1:5000), másodlagos ellenanyag számarban termeltetett anti-egér IgG konjugált Alexa647-tel (Jackson ImmunoResearch, 706-605-148, 1/500); sejtmagjelölésére Hoechst 33258 reagenst használtunk (2. ábra).



2. ábra Reprezentatív epifluoreszcens mikroszkópos felvétel az általunk jelölt célfehérjék jelöléséről (kék: Hoechst, fehér: c-Fos).

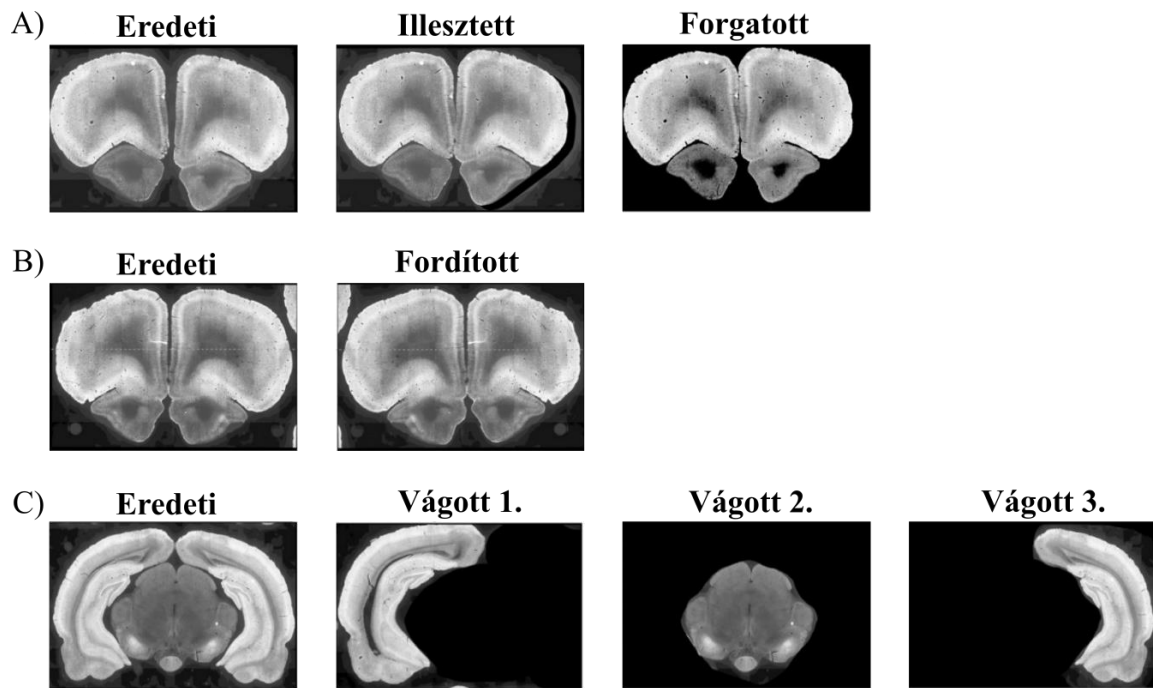
Az immunjelölés a kutatócsoportban korábban használt protokoll szerint történt [46]. Röviden: szabadon úszó metszetekkel dolgoztunk, amiket háromszor mostunk át 0.01 M

Tris*HCl, 0.1% TritonX-100, pH 7.4 oldattal (TBST). Minden további mosás TBST oldattal történt és egy mosás 5 percig tartott. A 3 mosást követően 10 mM 90°C-os pH 6.0 nátrium citrátos oldatban tártunk fel 15 percig, majd háromszori TBST mosást követően 5% normál szarv szérumos (Jackson ImmunoResearch, UK) TBST oldattal blokkoltuk az aspecifikus kötőhelyeket 1 órán át, majd ugyanilyen blokkoló oldatba oldottuk az elsődleges ellenanyagot és inkubáltuk a mintákat éjszakára, szobahőn. Másnap, háromszori mosás és egy órási blokkolást követően, a másodlagos ellenanyagok 1:500 hígítású oldatában inkubáltuk egy órára a metszeteket. Három mosás után a metszeteket felhúztuk tárgylemezre és Mowiol4-88-cal (Merck) fedtük azokat. A metszeteket Panoramic MIDI II automatizált fluoreszcens slide szkennert mikroszkóp (3DHISTECH, Magyarország) segítségével tettük láthatóvá és digitalizáltuk azokat.

3.6. Teljes agyi feltérképezés

3.6.1 Képek előkészítése

Ahhoz, hogy egy referencia atlaszhoz való illesztés megfelelő minőséggel és pontossággal történjen, az eredeti metszetképeken szükséges bizonyos szerkesztéseket elvégezni. Ezen szerkesztések célja, hogy a metszeteink orientációja könnyebben megfeleltethető legyen az atlaszképekhez és ne az illesztést követően történjenek meg a módosítások. Ennek függvényében háromféle módosítást hajtottunk végre a képeken: 1) Illesztés: bizonyos metszetek 2 részből állnak (például a corpus callosumtól anterioran elhelyezkedő részek) és egymástól távolabb kerültek felhúzásra, így ezeket az atlasznak megfelelően egymás mellé helyezzük (3A ábra); 2) Forgatás: szintén több részből álló metszetek esetén, amennyiben a metszetek dorso-ventralis síkjai nem párhuzamosak (3A ábra); 3) Fordítás: metszetfelhúzás esetén előfordulhat, hogy sorrendbe helyezés közben egy-egy metszetnek nem ugyanazt a felét fektetjük a tárgylemezre, így ezeket a képeket tükrözzük a dorso-ventralis tengely mentén (3B ábra); 4) Vágás: a metszetek válogatása során néha nem ugyanazt a síkot tartalmazó darabok lettek felhasználva egy szeletként; ezeket azonosítottuk, a képeket szétvágtuk és a kapott képek új azonosítót kaptak (3C ábra). Az illesztést, forgatást és fordítást Fiji-ben, míg a vágást Gimp programokban hajtottuk végre félig automatizált munkamenetekkel.

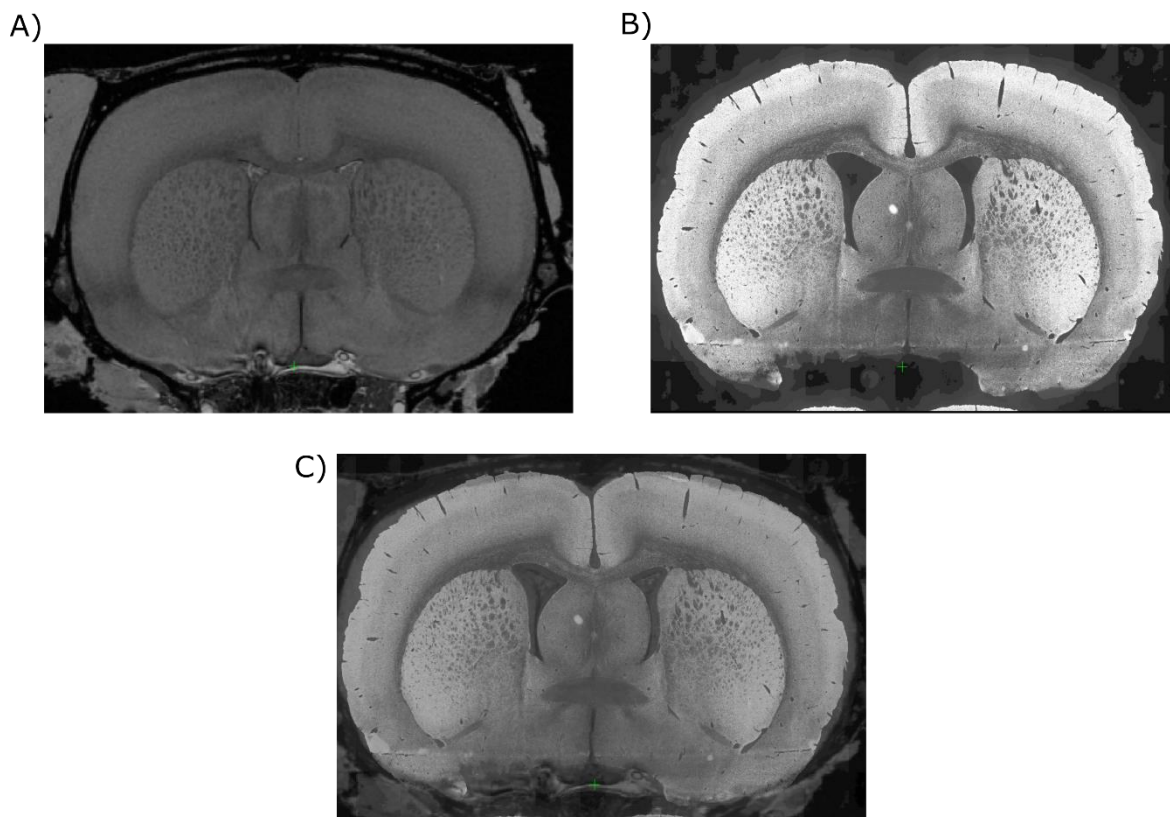


3. ábra: Reprezentatív ábrasorozat a képek korrekciójáról (forgatás és fordítás/tükrözés), illetve bizonyos területek szeparálásáról a későbbi pontos atlasz illesztések elérése végett.

3.6.2. Illesztés

A QuickNII egy neuroinformatikai eszköz, amely lehetővé teszi kétdimenziós (2D) metszetek háromdimenziós (3D) referencia atlaszhoz (Waxholm Space Sprague Dawley patkány agy atlasz [47]) való illesztését. A program előnye, hogy az illesztés során közvetlenül, interaktívan a beépített atlasz megjelenítését szerkesztjük, hogy az minél tökéletesen illeszkedjen a saját metszetünkhöz, így az általunk használt képek változatlanok maradnak. A program az eredeti képek arányosan csökkentett változatait használja az illesztés során, de a későbbiekben az adott arányokkal rendelkező bármilyen képekhez felhasználható (pl az eredeti, teljes méretű képekhez, vagy az azokon végzett, de a képek méretét nem befolyásoló módosulatokhoz). A referencia atlasz dorsoventrális (DV) és mediolaterális (ML) valamint rostrocaudalis (RC) síkokhoz tartozó értékeket is tudjuk módosítani (síkok döntése, horizontális és vertikális méretezés), ezáltal leképezve az egyedi változatosságokból és a kísérlet kivitelezéséből adódó variabilitást. Az illesztéseket az anatómiaiailag könnyebben illeszthető metszetekkel kezdtük (amik jól azonosítható struktúrákat tartalmaztak, mint a különféle fehérállományok, komisszurák vagy a hippokampusz), ugyanis a program az egyes mentett képek után a metszetek között uniform távolságot feltételezve megbecsüli a közbeeső szeletek pozícióit, így a felhasználót segíti egy lineáris becsléssel. Az eredmény egy egyedi atlasz képekből álló sorozat, amely megfeleltethető az általunk beolvasott metszeteknek, illetve a

transzformációs vektorokat (u, o, v) tartalmazó XML fájl, amely az eredeti referencia atlaszképek módosított helyzeteit kódolja. Az illesztési eljárás Puchades és társai által készült útmutató alapján történtek és a QuickNII 2.2 verzióját használtuk hozzá [44] (4.ábra).

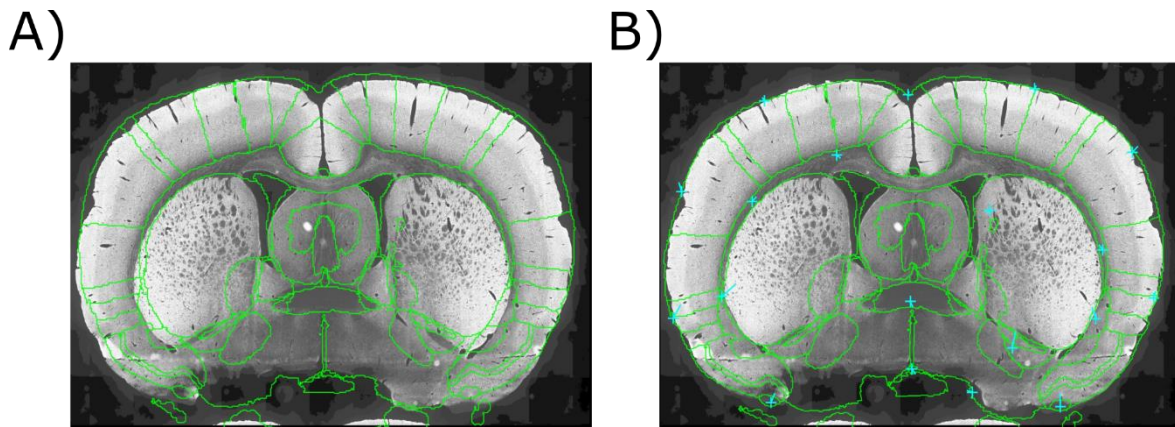


4. ábra: QuickNii által végezhető illesztési folyamat. A referencia atlaszban (A) megkeressük azt a síkot, melyre a metszetünk (B) a legjobban illeszkedik, majd a végeredményt (C) kiexportáljuk.

3.6.3. Korrekció

Bár a QuickNII egy kiváló eszköz a metszeteink referenciaatlaszhoz való illesztésére, pl. a perfúziókor fellépett műtermékek meglétét (pl. agykamrai tárgulatok), a felhúzással bevitt torzítást vagy az egyéni anatómiai variabilitást nem feltétlenül képes teljesen leképezni. A VisuAlign egy olyan eszköz, amely segítségével referencia atlaszra illesztett metszetek koordinátáit tudjuk nem lineárisan finomítani. Fontos, hogy ha térbeli elemzést végzünk, az adatainkat egy térbeli koordináta-rendszerre tudjuk illeszteni, hiszen nagy pontossággal kell eljárunk az anatómiai határok meghúzásakor. A VisuAlignt az imént említett problémák kiküszöbölésnek céljából hozták létre (<https://github.com/HumanBrainProject/VisuAlign>). A program a QuickNII-által generált atlaszfájlokkal dolgozik. Végighaladva az adott agyhoz tartozó egyes metszeteken a nem megfelelő régióhatárokat egyenként illeszthetjük. A korrekciókat befejezve eredményül a finomított illesztés koordinátáit kapjuk meg egy új .xml vagy .json fájlként. Ezen kívül a programmal kiexportálhatunk olyan jelentést, amely megadja,

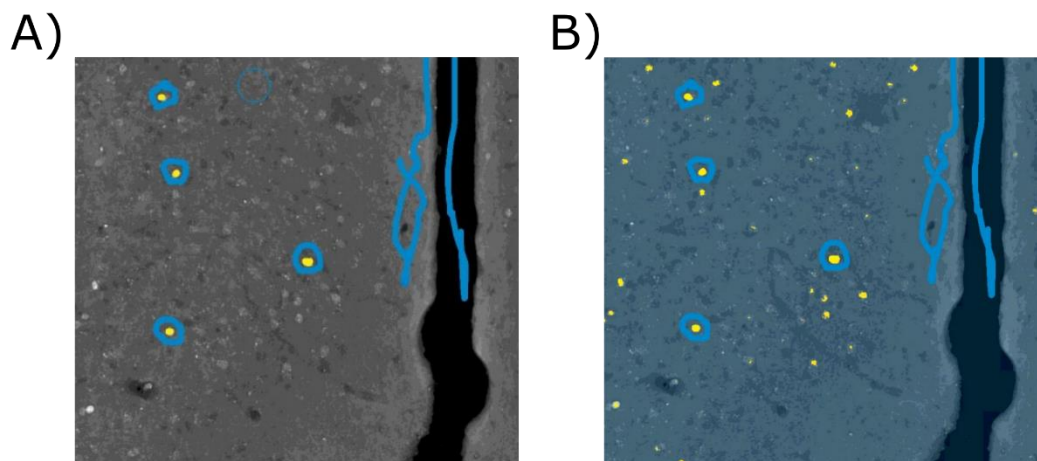
hogy átlagosan mennyi pixelt érintett a nem-lineáris transzformálás, illetve a QuickNII kimenete hány százalékban különbözött a nem-lineáris módosításoktól, ahol a legjobb eset az egyezés (100%) (5. ábra).



5. ábra: VisuAlign program kezelőfelülete. Az egyes metszeteken QuickNii-ből exportált atlaszképekből exportált anatómiai területek határai láthatóak nemlineáris korrekció előtt (zöld) (A), és után (B). A nemlineáris illesztés esetén a kék keresztekkel jelzett pontok mentén igazítjuk az anatómiai határokat.

3.6.4. Szegmentálás

Szegmentálásnak nevezzük azt a digitális képfeldolgozós folyamatot, mely során egy kép több szegmensre, esetünkben több objektumra, oszlik fel. A módszer célja, hogy komplex képeket leegyszerűsítsünk, ezáltal azok könnyebben értelmezhetővé válnak. Pontosabban minden pixelhez, pixelhalmazhoz rendelünk egy értéket és később ezeket az értékeket összegezzük, majd elemezzük. Ehhez az ilastik nevű programot használtuk. A program egy felügyelt gépi tanulós paradigmán alapszik, mely során a felhasználó egy reprezentatív mintán tanítja a programot az objektumok (esetünkben a Hoechst, c-Fos⁺ sejtek, illetve háttér) klasszifikálására (6A. ábra). A kapott eredményt követően eldönthetjük, hogy kívánunk-e módosítani azon (azaz több sejt vagy háttér kijelölésével) vagy azzal megelégedve az egész mintára kiterjesztve analizáljuk a képeket (6B. ábra). A tanulási folyamat során a program több visszajelzést is ad számunkra, például egy ún. bizonytalansági térképpel (uncertainty map), amely a felhasználó által megadott bemenetek alapján nem egyértelműen tudja a program eldönteni az objektumok identitását, így további kijelölésekkel taníthatjuk az algoritmust. A program részletes leírása a referenciában található [48].



6. ábra: Az ilastik programban jelölt háttér (kék) és c-Fos+ sejtek (sárga) a program tanítása előtt (A) és után (B).

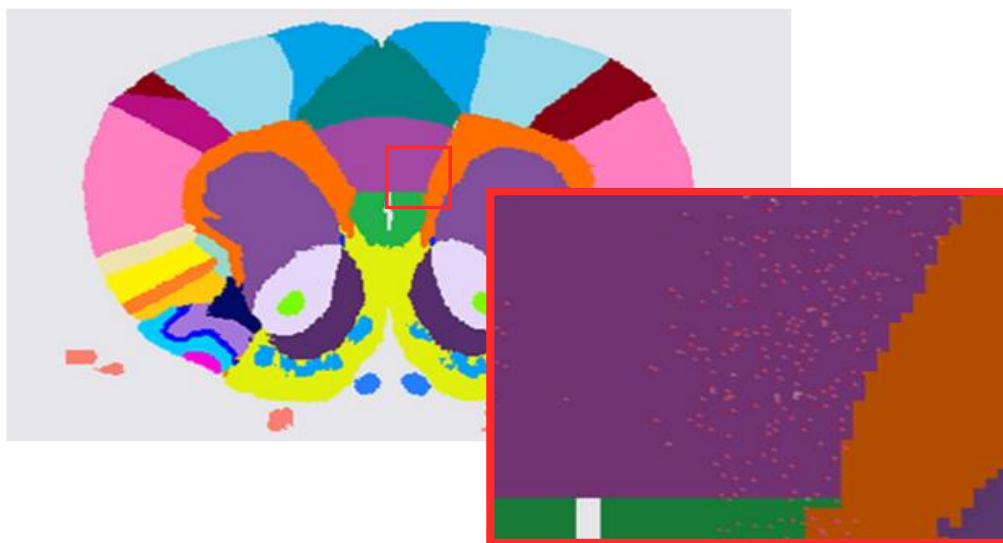
3.6.5. Kvantifikálás, képi analízis

A szegmentált objektumaink régiónkénti analízisét a nutil nevű szoftver Quantifier funkciója segítségével végeztük [49]. A program lényegében egy feldolgozási folyamat, mely során pontos leíró statisztikát generálhatunk, ami tartalmazza az objektum-adatainkat és koordinátáinkat, valamint az adott koordináthoz párosított térkép-adatokat is. Az analízishez vizsgálati egységenként (állatonként) csoportosítjuk a szegmentált mikroszkópos képeinket, az azoknak megfeleltethető egyedi térkép-fájlokat, illetve a kétféle fájl típus közötti információs kapcsolatot tartalmazó .xml fájlokat. Az analízis a nagy adatmennyiség miatt rendkívül erőforrás és időigényes, annak végén állatonként több szöveges fájlt kapunk, amik tartalmazzák az objektum-adatokat régiónkénti és metszetenkénti bontásokban. Az adatok feldolgozásához és analíziséhez ezeket az értékeket előbb állatonként összevontuk, majd létrehoztunk egy teljes, összesítő adatszettet, ami minden állat minden régiójának értékeit tartalmazta. A további összehasonlító vizsgálatokat ezzel az adatszettel végeztük (7. ábra).

3.7. Statisztikai elemzés

A kapott adatokat R statisztikai környezetben elemeztük. A normalitás fennállását Shapiro–Wilk teszttel, a szórás homogenitását Brown-Forsythe teszttel ellenőriztük. A félelmi generalizáció összehasonlításakor két-mintás t-próbát, illetve ismételt mérések varianciaanalízist alkalmaztunk. Az analízisünk során az összetett teljes adatszettben található objektumszám-értékek nem ideálisak az állatonkénti és csoportonkénti összehasonlítások szempontjából. Az egyenlőtlenségek adódhatnak egyrészt mintavételezési különbségekből (bár mindig törekedtünk lehetőleg ugyanazokat az egymásnak megfelelő metszési síkokat használni, ez gyakorlatban pontosan nem kivitelezhető), másrészt folyamatbeli eltérésekből (festési

reakciók közötti variabilitás). Mivel a régiónkénti objektumszám mellett régiónkénti területi adatokkal is rendelkezünk, ez lehetővé tette az egységenkénti objektumsűrűség számítását. A következő lépésben a sűrűségi értékeket felhasználva az összes vizsgált állat tekintetében megállapítottuk, melyek az aktivitás szempontjából legkevésbé variabilis régiók, majd azokat felhasználva (legalacsonyabb F és H értékek), és belőlük állatonkénti átlagos-nemvariabilis sűrűséget számolva, állatonként normalizáltuk az objektumsűrűségeket. Az így kapott régiónkénti és állatonkénti normalizált értékeket alkalmaztuk a további analízisben. A normalizált c-Fos+ denzitás vizsgálata során csak a sérülékeny és ellenálló csoportok közti különbségekre voltunk kíváncsiak, ezért a csoportok közötti összehasonlításokat két mintás t-próbákkal végeztük el. Amennyiben valamely feltétel nem teljesült, Wilcoxon-féle rangpróbát vagy Mann-Whitney-U próbát alkalmaztunk. Az összesen 217 agyterületből csak a szignifikánsan vagy marginálisan különböző területeket tüntettük fel a dolgozatban. A szignifikancia szintet minden esetben 0,05 p-értéknél húztuk meg. A csoportonkénti aktivációs mintázatok közötti különbségeket hierarchikus klaszterezéssel vizsgáltuk, a klasztereket a Ward-féle variancia-minimalizálási algoritmus segítségével azonosítottuk és ábrázoltuk a régiók aktivitásai közötti hasonlóságokat azok egymástól vett euklideszi távolságai szerint.

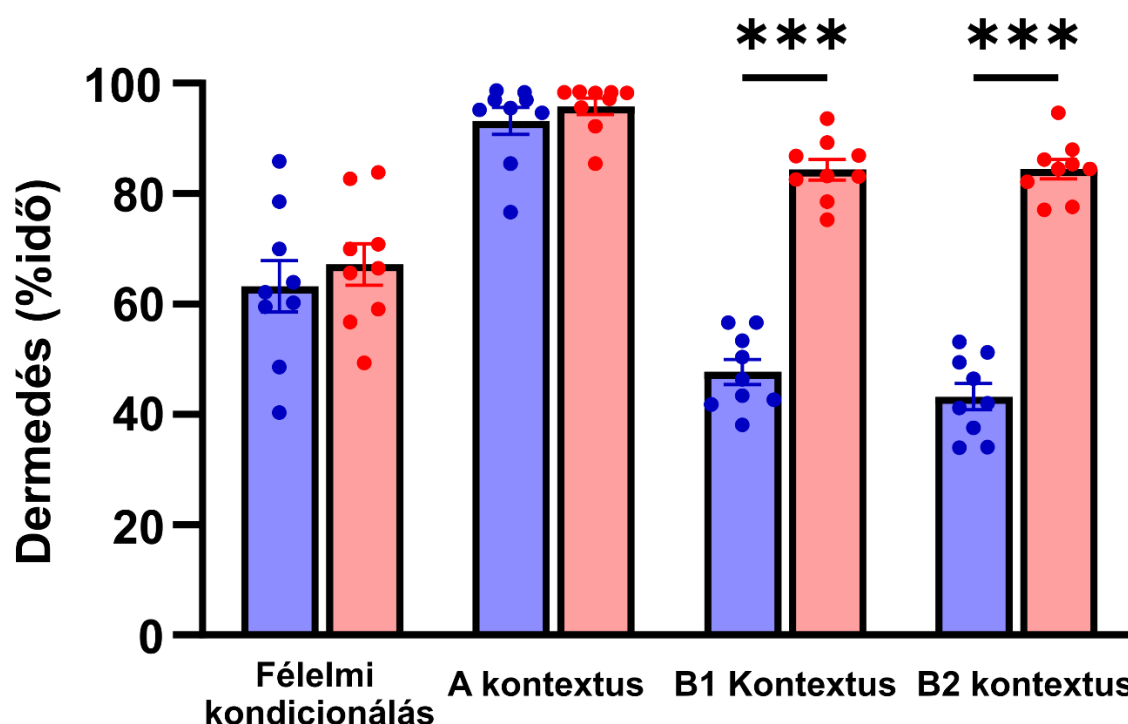


7. ábra: A nutil képelemző program eredményeképpen készült kép látható, ahol az egyes objektumok régiókhoz rendelték, illetve saját azonosítóval rendelkeznek.

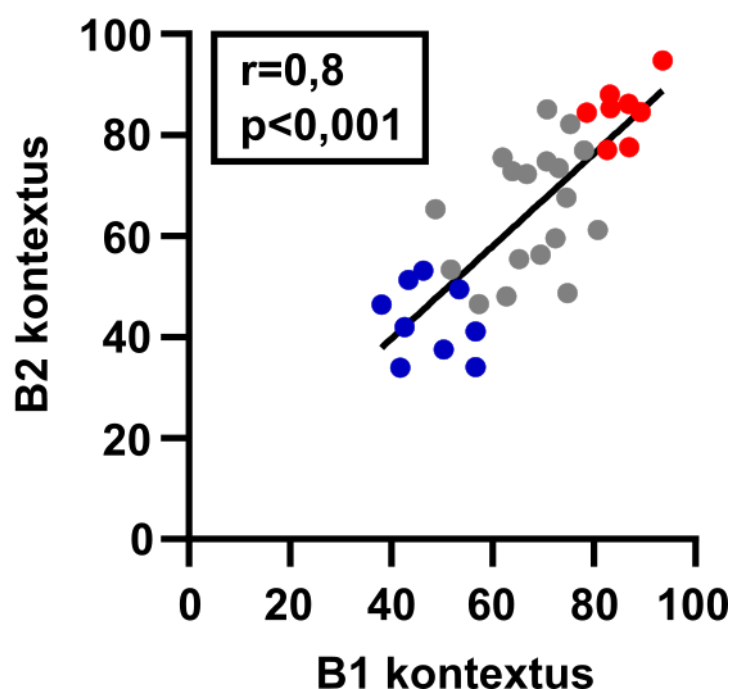
4. Eredmények

4.1. A félelmi generalizáció és kioltódás

Félelmi kondicionálás során az ellenálló és sérülékeny állatok ugyanolyan félelmi választ mutattak, és a félelmi válaszuk az emlékeztető teszt során sem változott (félelmi kondicionáláskor: $t=0,66$, $p=0,52$, 'A' kontextus: $U=30$, $p=0,37$, 8. ábra). Ellenben a 'B1' és 'B2' kontextusokban a sérülékeny állatok szignifikánsan több időt töltöttek dermedéssel, mint az ellenálló állatok ('B1' kontextus: $F_{(1,16)}=157,4$, $p<0,0001$, 'B2' kontextus $F_{(1,16)}=188,4$, $p<0,0001$, 8. ábra). A különböző napokon vizsgált fenotípusok közötti konzisztencia becsléséért korreláltattuk a 29. és 30. napi dermedési adatokat. Pearson-féle korreláció alapján szignifikáns regressziót látunk az állatok között ($r=0,7977$, $p<0,0001$), amely megerősít minket abban, hogy a kondicionálás során egy markáns fenotípust láthatunk (9. ábra).



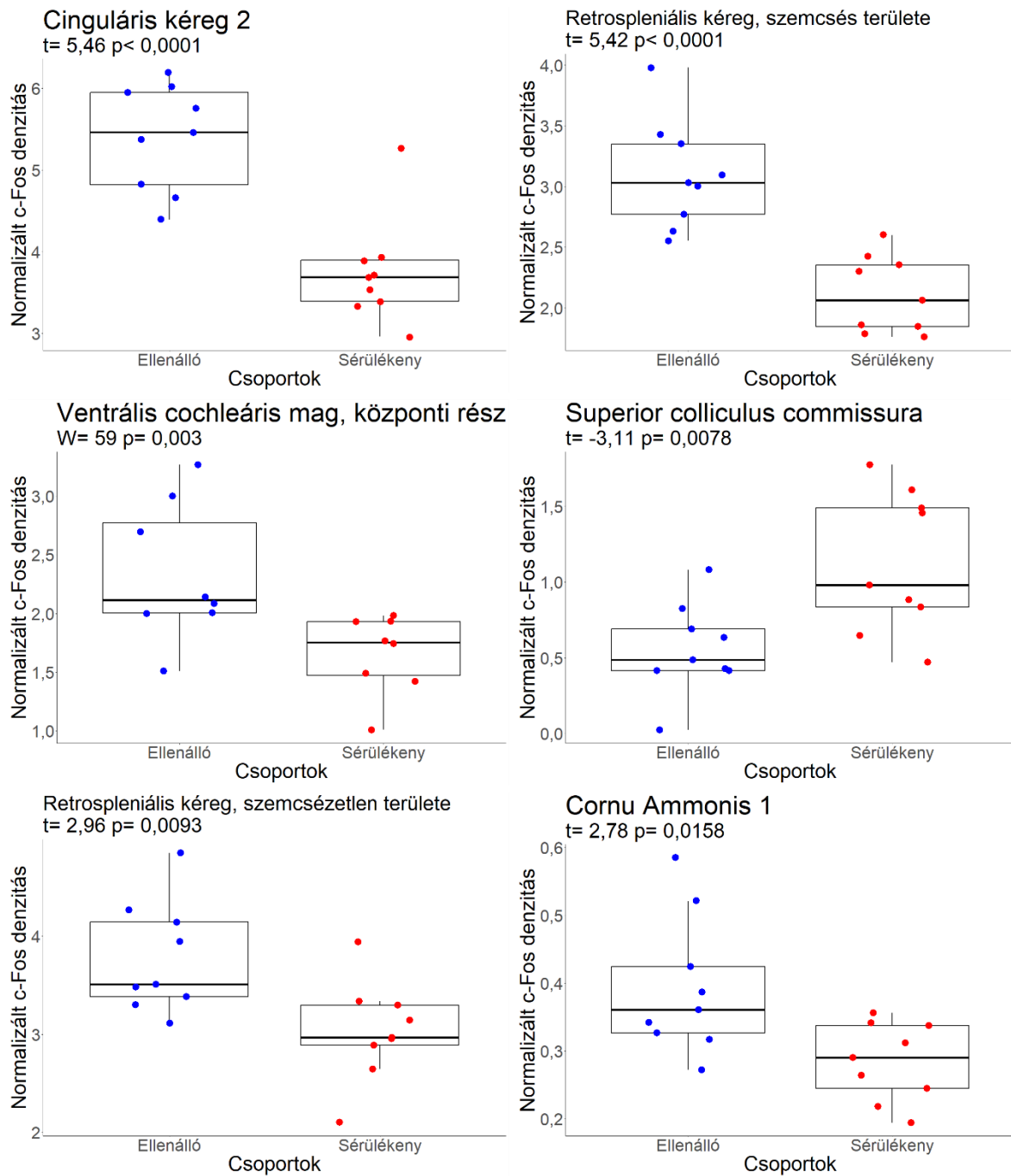
8. ábra: A kísérletek alatt mért dermedés %-os időaránya csoportonként. Csoportok: ellenálló: kék, sérülékeny: piros. ***: $p<0,001$



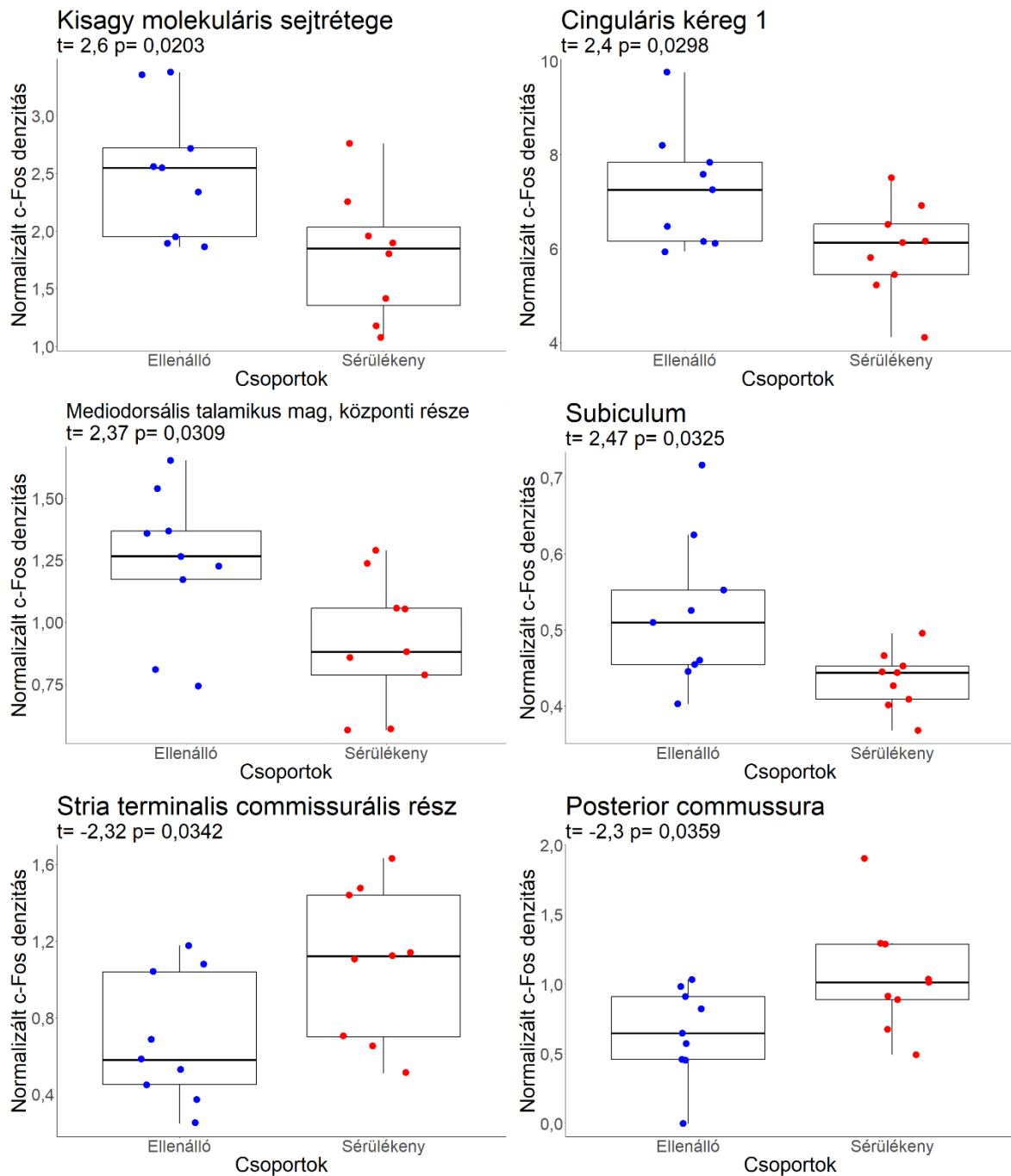
9. ábra: Pearson-féle korreláció a B1 és B2 kontextusok között, egész populáció tekintetében. Csoportok: kék: ellenálló, szürke: köztes, piros: sérülékeny

4.2. A sérülékeny és ellenálló állatok idegsejt-aktivitási mintázatainak összehasonlítása

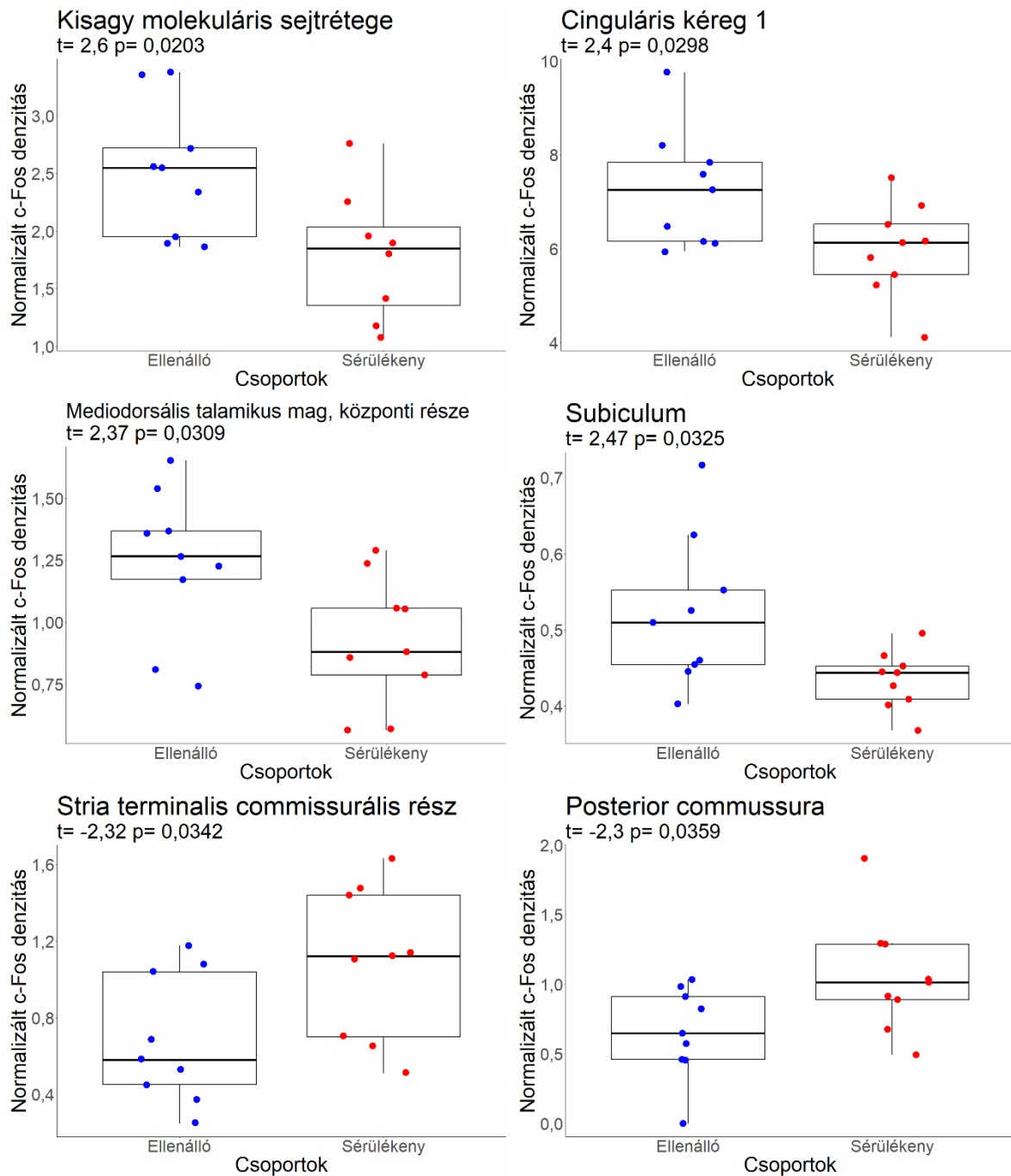
Összesen 217 agyterületet vizsgáltunk, amelyből 16 agyterület szignifikánsan, míg 2 agyterület marginálisan különbözött a sérülékeny és ellenálló egyedek között. Ezek a területek a következők voltak: cinguláris kéreg 2 ($t= 5,46$, $p < 0,0001$), retrospleniális kéreg szemcsés ($t= 5,42$, $p < 0,0001$), ventrális cochleáris mag, központi része ($W= 59$, $p= 0,003$), superior colliculus commissura ($t= -3,11$, $p= 0,0078$), retrospleniális kéreg szemcsészetlen területe ($t= 2,96$, $p= 0,0093$), cornu ammonis 1 régió ($t=2,78$, $p= 0,0159$), kisagy molekuláris sejtrétege ($t= 2,6$, $p= 0,0203$), cinguláris kéreg 1 ($t= 2,4$, $p= 0,0298$), mediodorsális talamikus mag, központi része ($t= 2,37$, $p=0,0309$), subiculum ($t= 2,47$, $p= 0,0325$), stria terminális commissurális része ($t= -2,32$, $p= 0,0342$), posterior commissura ($t= -2,3$, $p= 0,0359$), globus pallidus externa, mediális része ($t= 2,22$, $p= 0,0418$), superior kisagynyél és prerubrális mező ($t= 2,18$, $p= 0,0447$), inferior colliculus centrális magja ($W= 57$, $p= 0,0464$), olfaktorikus mag laterális traktusa ($t= 2,09$, $p= 0,0557$), laterális entorhinális kéreg ($t=2,03$, $p= 0,0614$) (10-12. ábra).



10. ábra: Normalizált c-Fos denzitások boxplotjai az ellenálló (kék) és sérülékeny (piros) csoportok függvényében.



11. ábra: Normalizált c-Fos denzitások boxplotjai az ellenálló (kék) és sérülékény (piros) csoportok függvényében.

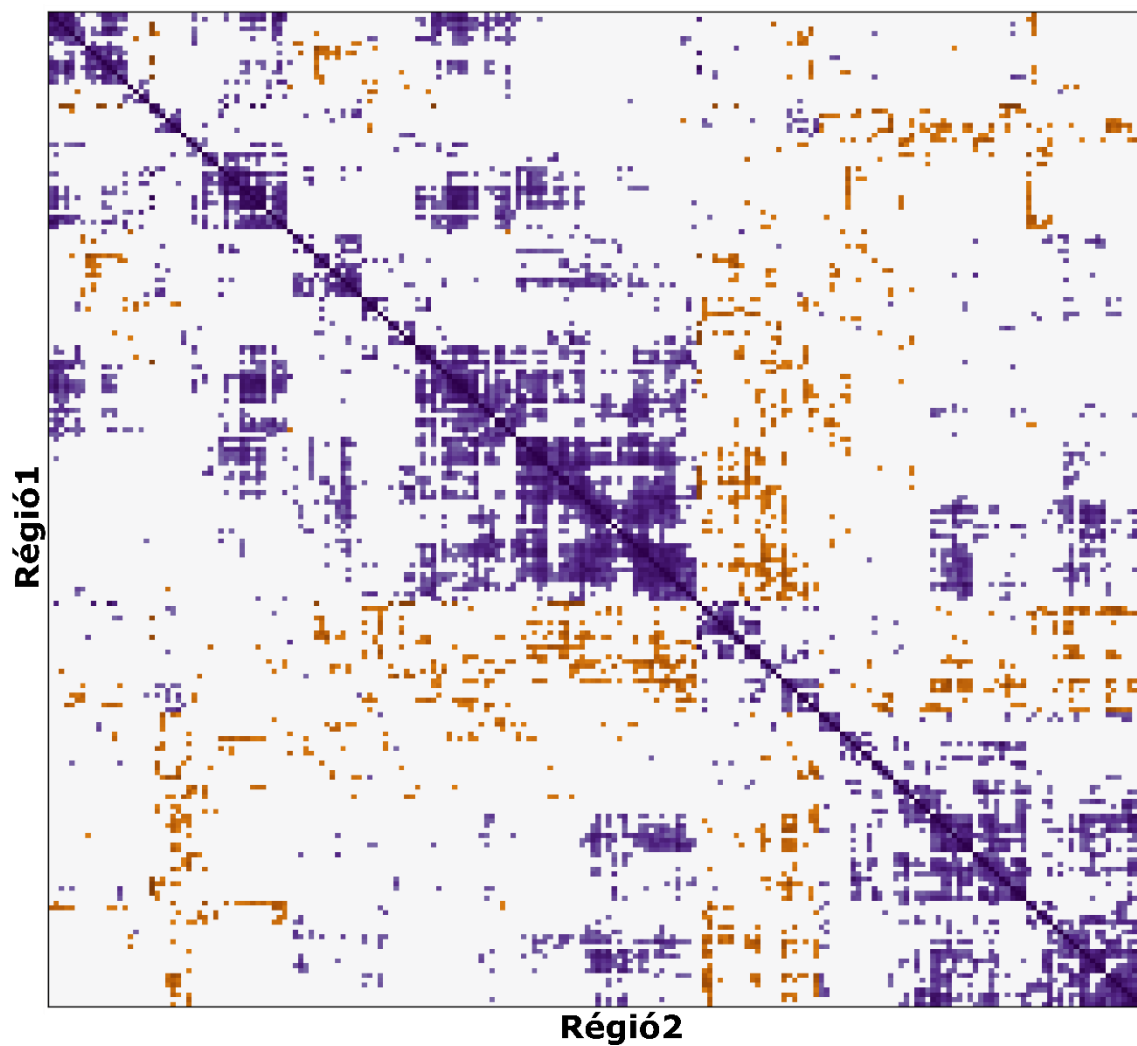
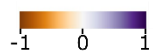


12. ábra: Normalizált c-Fos denzitások boxplotjai az ellenálló (piros) és sérülékény (kék) csoportok függvényében.

4.3. Az agyrégiók funkcionális kapcsoltságának összehasonlítása a vizsgált csoportokban

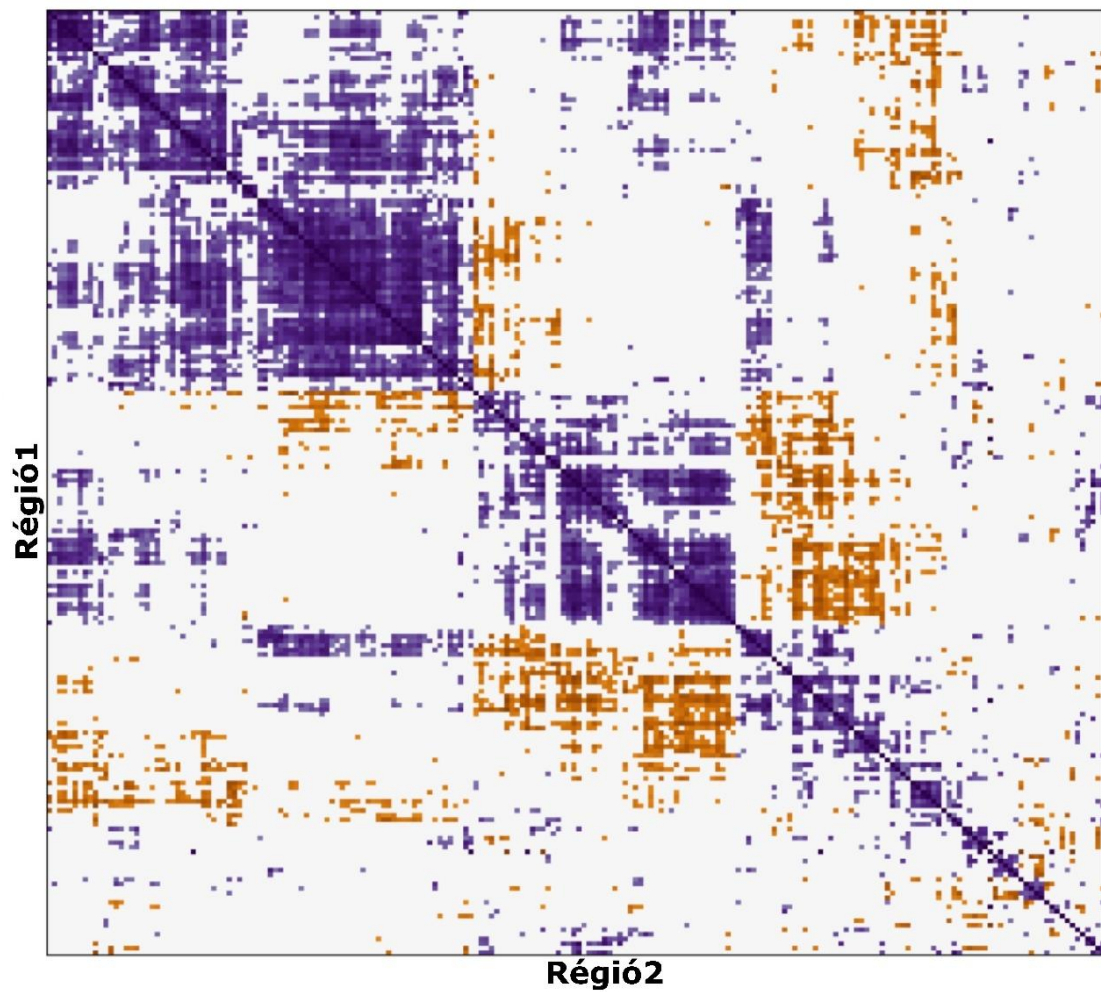
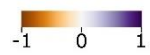
A vizsgált állatok elérő viselkedése a paradigmánkban eredhet hálózati szintű különbségekből, ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy a különböző régiók aktivációja hasonló aktivitási mintázatot követ-e az egyes csoportok között. Ehhez csoportonként korreláltattuk az egyes területek normalizált c-Fos sűrűségértékeit, majd a kapott mátrixon hierarchikus klaszterezést végeztünk Ward-féle módszer segítségével, ami a modulok közötti variancia-minimalizáláson alapuló algoritmus. A kapott távolságok azt mutatják meg, hogy a fa ágai között az egyes régiók milyen hasonlóságot mutatnak egymással. Egy klaszteren belül a tagok közötti variancia kisebb, mint más klaszter bármelyik tagjához viszonyítva. Ez alapján az összehasonlítás alapján készültek el a kontroll csoport (13. ábra), ellenálló csoport (14. ábra) és sérülékeny (15. ábra) csoportok klasztertérképei, illetve dendogramjai (16. ábra). Az ábrák alapján elmondható, hogy a csoportok között eltérő nagyságúak az egyes modulok, illetve az egyes alklaszterek tagjai is különböznek a csoportokon belül. Szembeötlő, hogy az ellenálló csoport egyes moduljain belül jelentősen erősebb korrelációkat figyelhettünk meg, mint a kontroll, vagy a sérülékeny állatoknál. Ez arra enged következtetni, hogy a csoportok között eltérő hálózatszintű aktivációs mintázat figyelhető meg és mindenképp további vizsgálatokat igényel.

Interrégióális c-Fos korrelációk (r-értékek) - Kontroll



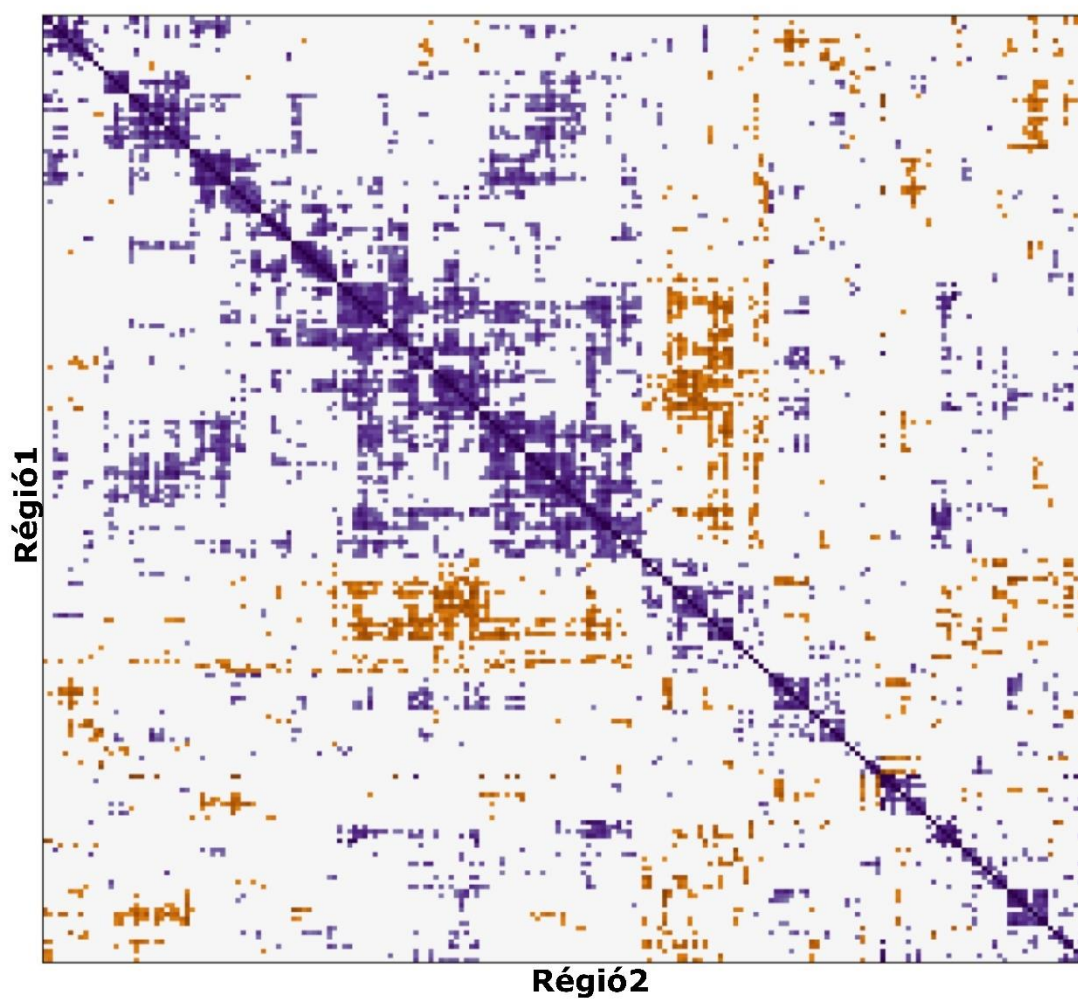
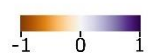
13. ábra: Kontroll csoport interrégióális c-Fos korrelációk ábrázolása. Kéktől piros skála a korrelációs koefficiens -1 és 1 közötti értékek felel meg.

Interrégionális c-Fos korrelációk (r-értékek) - Ellenálló

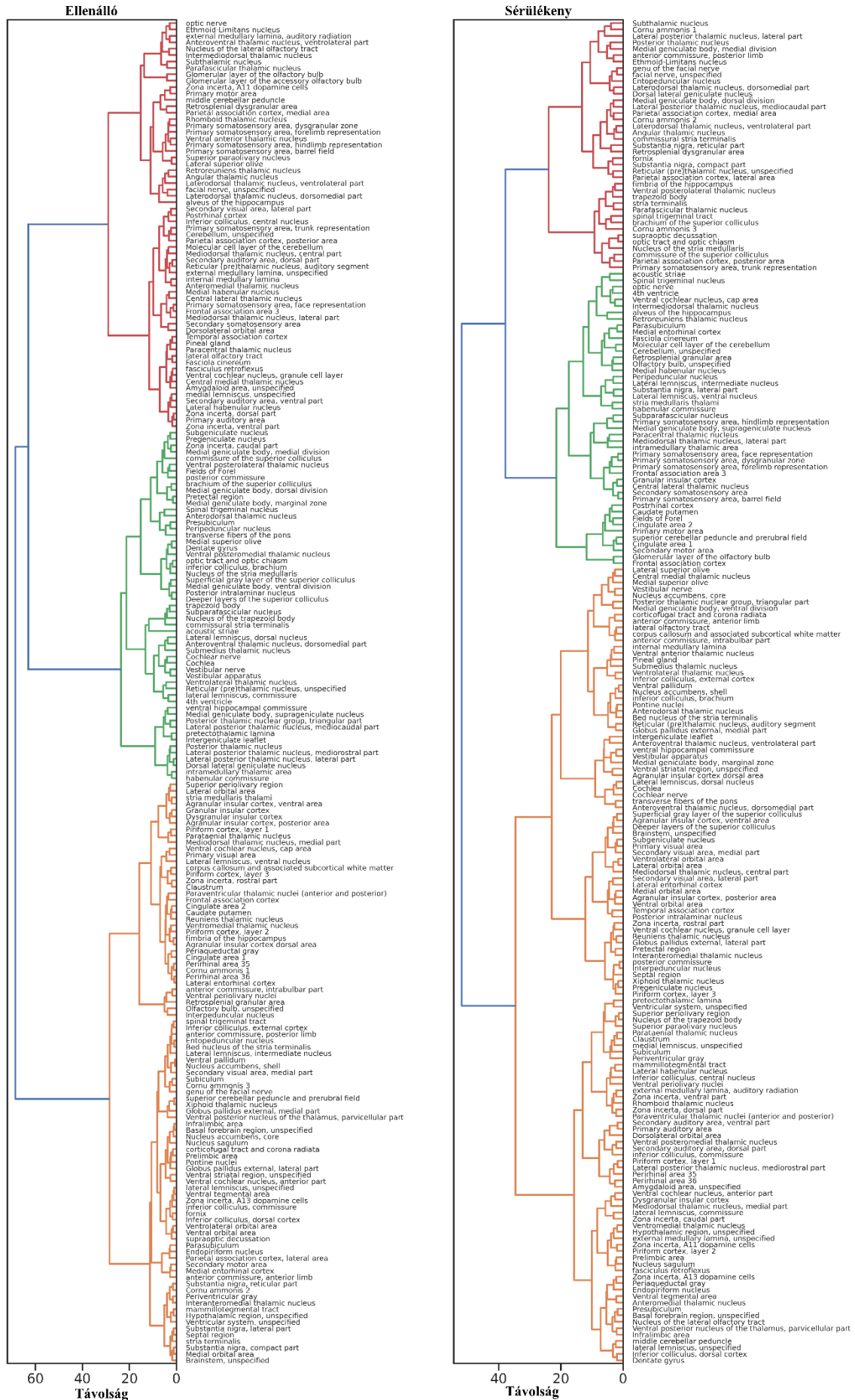


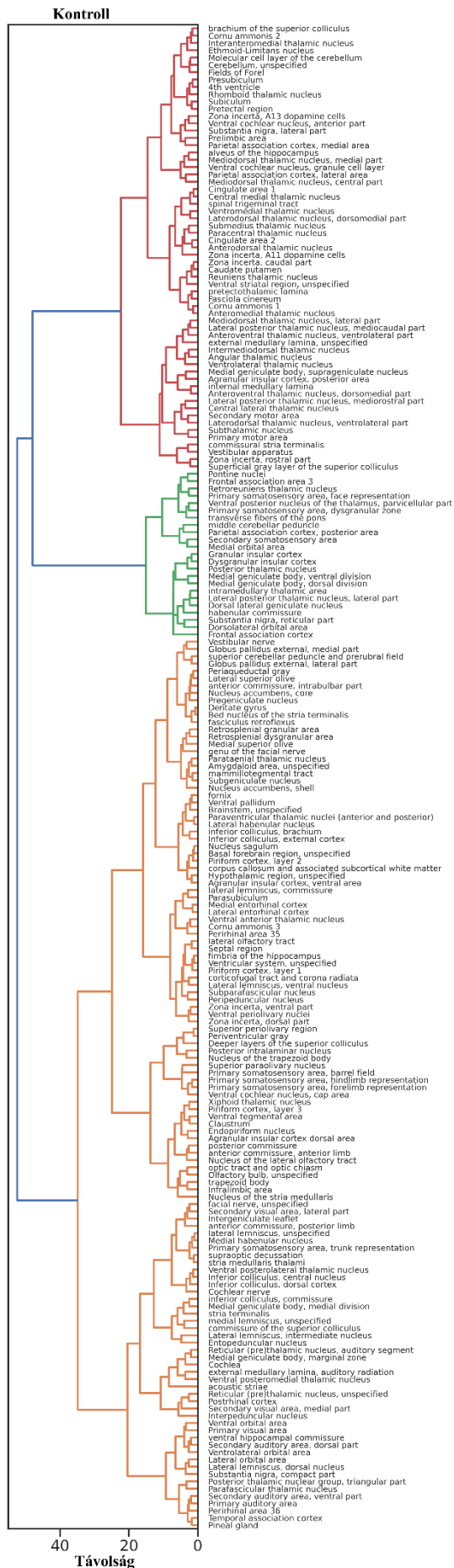
14. ábra: Ellenálló csoport interregionális c-Fos korrelációinak ábrázolása. Narancssárga-lila skála jelzi a korrelációs koefficiensek -1 és 1 közti értékeit.

Interrégióális c-Fos korrelációk (r-értékek) - Sérülékeny



15. ábra: Sérülékeny csoport interregionális c-Fos korrelációinak ábrázolása. Narancssárga-lila skála jelzi a korrelációs koefficiensek -1 és 1 közti értékeit.





16. ábra: A 13-15. ábrákhoz tartozó hierarchikus klaszterezés kontroll, ellenálló és sérülékeny csoportok dendrogramjai, ahol a színek az egyes klasztereket jelölik.

5. Diszkusszió

Kutatásunk célja a PTSD-szerű félelmi generalizáció zavar hálózat szintű feltérképezése volt. Vizsgálatunkban immunhisztokémiai szövetjelöléssel hím Long Evans patkányok teljes agyi mintáiban jelöltük a sejtaktiválódás hatására kifejeződő c-Fos fehérjét. Az agymintákon látható jelek a félelmi kondicionálás után 4 héttel, a biztonságos környezetben mért aktivációs mintázatot mutatja, így összehasonlítható az ellenálló és sérülékeny állatokban a félelmi generalizáció. Különböző agyterületek összehasonlítását követően több aktivációbeli különbség volt megfigyelhető, a kérdésünk szempontjából releváns csoportok között (például cinguláris kéreg 1 és 2, cornu ammonis 1 (CA1), retrosplenialis kéreg szemcsés és szemcsészetlen területei, laterális entorhinális kéreg). Ezen kívül hierarchikus klaszterezéssel vizsgáltuk az egyes csoportok hálózat szintű aktivációs mintázatát, ahol teljes hálózat szintű működésbeli különbséget mutattunk ki, pontosabban, az egyes csoportok aktivációs mintázataiban az azonosított modulok összetétele mind a résztvevő régiókban, mind a klaszterek méretében jelentősen különbözött. Az ellenálló állatok aktivitási mintázata jelentősen különbözött mind a kontroll, mind a sérülékeny populációhoz viszonyítva, sokkal magasabb számú és erejű korrelációkat tartalmazott a klasztereken belül. Érdekes továbbá, hogy számos kortikális és magasabb rendű talamikus terület által alkotott modult figyelhettünk meg az ellenálló állatoknál, ami megemelkedett hálózati kontrollra utalhat. Ennek oka és további jellemzése mindenképp további vizsgálatokat igényel.

Szakirodalomból tudjuk, hogy a PTSD-hez kapcsolható tünetek hátterében számos agyterület részt vesz. A cinguláris kéreg 1 és 2-ben is csökkent aktivációt látunk a sérülékeny állatoknál, ami párhuzamba állítható humán kísérletekkel, melyekben csökkent cinguláris kérgi aktivitást, megnövekedett fenyegetettség érzetét, illetve a fenyegetésre erősebb félelmi választ is mutattak [27]. A kapcsoltsági adatokból feltételezhető, hogy a kimeneti kapcsolatai is változtak, például a basolaterális amigdalával, mely egy dokumentáltan fontos szereplő a félelmi szabályozásban, többek között a cinguláris kéreggel együttműködve [26]. Bár számos kutatás leírta az amigdala szerepét mind a félelmi generalizációban, mind a PTSD-ben [24], érdekes módon mi nem találtunk különbséget az aktivitásában. Ez azzal magyarázható, hogy az általunk használt anatómiai atlaszban az amigdala egy nagyobb területként, ún. amigdaloid komplexként szerepelt, annak ellenére, hogy egyes részei mind a generalizációban, vagy a kioltódásban fontos szereppel bírnak. Az egyes objektumok pontos pozíciójának birtokában az elkövetkezőkben tervezzük ennek a nagyobb régióknak a pontos annotálását, ezáltal felfedhetjük majd az esetleges különbséget az amigdala alrégiói közötti aktivációs mintázatokban.

A retrosplenialis kéregnek fontos szerepet tulajdonítottak a kondicionálás és a kontextuális memória előhívása során [50], ellenben a háttérben lévő mechanizmus még nem teljesen tisztázott. A terület főemlősökben a corpus callosum caudalisán helyezkedik el, rágcshalókban viszont dorsalisán található és kiterjedésében nagyobb is. Egyes tanulmányok szerint ennek az agyterületnek a funkcionalitását a térbeli memóriában mutatták ki, a hippocampális régióhoz és a vizuális kéreghez való közelsége miatt [51]. Ez az agyi régió két részre osztható: egy szemcsés és egy szemcsészetlen területre. Pan és munkatársai a tavalyi évben végeztek kutatást alrégió specifikus funkciók után kutatva [52], ahol patkányokat félelmi kondicionáltak és figyelték a félelmi memória előhívásukat. Amikor a szemcsészetlen terület gátlása történt, a patkányok nem tudták megfelelően elválasztani a kontextusokat egymástól, míg a szemcsés terület gátlásakor ez nem volt megfigyelhető náluk. Ugyan ezen területek farmakológiai kezelésekor, a szemcsészetlen terület kezelésénél az állatok kevesebb félelmi választ mutattak, mint a kontroll állatok, és nem találtak különbséget a szemcsés terület kezelésekor. Ez azért is érdekes, mert a mi eredményünk szerint mind a szemcsés, mind a szemcsészetlen terület magasabb aktivitást mutatott az ellenálló állatoknál, így bár a szemcsészetlen terület funkcionalitásával hasonló következtetéseket vonhatunk le, mint Pan és munkatársai, a szemcsés területet további vizsgálatokkal kell majd igazolni a félelmi generalizáció és/vagy kioltódás szempontjából.

A hippocampusnak fontos szerepe van a PTSD kialakulásában, mely például csökkent térfogatban és diszfunkcionális aktivitásban jelentkezik [53–56]. Arra viszont nincs bizonyíték, hogy a csökkent térfogat a trauma hatása miatt, vagy a traumát megelőzően alakul ki. Hippokampális aktiváció terén egyesek a hippocampusz túlzott aktivitását hozták összefüggésbe PTSD-vel [57, 58], míg mások a csökkent aktivitását [59, 60]. van Rooij kutatásában a növekedett hippocampális aktivitás inkább a PTSD egy reziliencia faktoraként jelent meg, hiszen a traumát követő megnövelt hippocampális aktiváció a PTSD-vel diagnosztizált emberekben a tünetek súlyosságának csökkenésével járt [61]. A hippocampusz szoros kapcsolatban áll az entorhinális kéreggel is, amely a memória konszolidációjában, térbeli memória kialakulásában vesz részt. Ennek a területnek két része van: mediális és laterális régiók. Mi az utóbbi régióban láttunk megemelkedett aktivitást az ellenálló egyéneknél, a CA1 és a subiculum megnövekedett aktivációja mellett. Ez azzal magyarázható, hogy a sérülékeny állatok a csökkent hippocampális aktiváció miatt nem tudták megfelelően elválasztani a kondicionált környezetet a biztonságos környezettől (kontextuális differenciáció), hozzájárulva ezzel a PTSD-szerű tünetek, azaz a nagyobb félelmi válaszreakció kialakulásához.

Egy nemrégiben megjelent kutatás szerint a kisagy molekuláris rétegében levő interneuronok részt vesznek az asszociatív félelmi memória konszolidációban, endokannabinoidok által befolyásolt plaszticitással [62]. Eredményeinkben az ellenálló állatok mutattak mind molekuláris rétegbeli, mind a kisagyat és a közti agyat összekötő rostokban megnövekedett aktivitást. Eredményünk és Carzoli-ék tanulmánya között lehet összefüggés, ellenben a kisagy rétegződésének pontosságát manuálisan is meg kell erősítenünk ahhoz, hogy következtetést vonhassunk le, mivel tapasztalataink szerint a legnehezebben illeszthető régió volt az analízis során. Későbbiekben érdemes lenne megvizsgálni, hogy a modellünkben ezeken a területen milyen endokannabinoidok szintek jellemzőek, összefüggés esetén pedig farmakológiailag vizsgálni ezen interneuronok, az endokannabinoidok és a félelmi memória háttérében lévő mechanizmust.

Megemelkedett aktivációt találtunk a mediális genikuláris testben is az ellenálló állatoknál. Ez a terület összeköttetésben áll a köztiagggyal, a hallókéreggel, valamint a retikuláris talamikus maggal [63]. Legutóbbi régió fontos szerepet játszik a szenzoros információk feldolgozásában, a kognícióban, hyperarousalban is, valamint kortikális régiók információinak szűrésében [64]. A mag külső rétegében GABAerg neuronok talamokortikális neuronokat gátolnak, a kortikális és szubkortikális bemenetek alapján. Amennyiben a GABAerg neuronok emelkedett aktivációja az, amit látunk és ezek a gátlások a mediális genikuláris testből indulnak ki, lehetséges, hogy a félelmi válasz kialakításában is részt vesz a megfelelő beérkező információk gátlása révén, ellenben ezt további kísérletekkel is igazolnunk ki.

A mediodorsális talamikus mag centrális részében is megnövekedett aktivitást figyeltünk meg az ellenálló egyéneknél. Ez a terület a PTSD-vel szoros összefüggésben álló területektől, például az amigdalától, a PFC-től is bemenetet kap [65] és mint egy központi terület, elengedhetetlen a megfelelő munkamemória, döntéshozás, jutalom feldolgozás, tanulás, szenzoros diszkriminációban [66–68]. Így érthető, ennek a területnek az ellenálló állatokban megnövekedett aktivitása. Természetesen a többi terület további elemzést, irodalmi összevetést igényel, azonban a terjedelemre való tekintettel itt csak a legfontosabbnak tartott változásokra tértem ki.

A hálózatszintű változások megértésére alkalmazott hierarchikus klaszterezéssel az egyes csoportokban megfigyelhető régiónkénti aktivációs kapcsoltságot vizsgáltuk. Eredményünk szerint, a csoportokra más- más aktivációs mintázat jellemző, amely a klaszterek és alklaszterek számában, valamint az egyes alklaszterek elemeinek különbségében nyilvánulnak meg. Ezen kívül az ellenálló állatoknál a klasztereken belüli kapcsoltság nagyobb

mértékű, mint a sérülékeny egyéneknél. Ez feltehetőleg azzal magyarázható, hogy az ellenálló állatoknál a régiók közti kommunikáció/együtt aktiváció sokkal erősebb, feltételezhetően a működésük jobban szinkronizált, ami hatékonyabb információ átadást tesz lehetővé, de akár a különböző területek szimultán gátlása is jobban kivitelezhető így (pl. prefrontális kéreg amigdalára kifejtett, félelmi választ gátló hatása) [69].

A komplex hálózati működés értelmezése bonyolult, humán tanulmányok leginkább a funkcionális egységek (kapcsoltság alapján) változását vizsgálják képalkotó eljárásokkal. Az egyik gyakran vizsgált ilyen hálózat az ún. alapértelmezett hálózat (default mode network; DMN), amely egy olyan agyi régiókból álló hálózat, mely jellemzően akkor aktív, amikor az egyén nem a külvilágra fókuszál, azaz egy pihenő ('resting') állapotban van [70]. Számos kutatás összefüggést talált a PTSD és a DMN viszonyában, pontosabban a traumát átéltek között a DMN-en belüli kapcsoltság gyengébbnek bizonyult [71]. Más kutatások is alátámasztották a DMN-en belüli gyengébb kapcsoltságot, például a ventromediális PFC és a posterior cinguláris kéreg, vagy a posterior cinguláris kéreg és a hippokampusz között [72]. Figyelemre méltó, hogy a DMN számos tagja jelentős aktivációs különbséget mutatott a vizsgált csoportok tekintetében, illetve aktivációs mintázataik is erősebben korreláltak az ellenálló csoport esetében, mint a sérülékenyeknél vagy a kontrolloknál.

A DMN-en kívül egy másik fontos hálózattípust is meg kell említeni, a salience network (SN), amelynek részei olyan területek, mint például az amigdala, hippokampusz, talamusz, striátum és a külső és belső kiugró stimulusokra adott válaszban van fontos szerepe. Ezen kívül az SN feltehetően az adott feladathoz tartozó vagy nem tartozó viselkedések közti szabályozásban is szerepet játszik. PTSD-vel diagnosztizált emberekben erősebb kapcsoltságot mutattak ki a SN egyes területei, pl az amigdala és anterior cinguláris kortex [73] vagy az amigdala és az insula között [74]. Humán fMRI vizsgálatok alapján a legreprodukáltabb eredmény az amigdalához kapcsolódó nyugalmi állapotban is megnövekedett aktivitása. A DMN-ben és SN-ben kimutatott különbségek rávilágítanak a hálózatszintű kutatás fontosságára. A dolgozatban mutatott csoportok közti különbségek további vizsgálatai során érdemes lesz figyelmet fordítani az egyes területek közti strukturális konnektivitás vizsgálatára, illetve a funkcionális kapcsolatok pontosabb feltérképezésére és azok megértésére. Terveink között szerepel továbbá az objektumok egymáshoz való pozícióinak elfogulatlan összevetése is, ami az anatómiai összevetés mellett egy elfogulatlan vizsgálatot eredményezve kisebb funkcionális egységek azonosítását is lehetővé teheti.

Összefoglalva eredményeinket számos olyan agyterületet azonosítottunk (például hippocampális régiókat: CA1, laterális l entorhinális kéreg, subiculum; mediális talamikus mag), amelyek fontos szerepet játszanak a PTSD kialakulásában. Ezen kívül hálózat szinten elmondható, hogy a traumának kitett, de PTSD-szerű tüneteket nem mutató állatok agyi régióinak erősebb kapcsoltsága hozzájárul a PTSD-vel szembeni ellenállóság kialakításában. Továbbiakban érdemes lesz ezeknek a területeknek a pontosabb anatómiai és funkcionális összeköttetéseinek feltérképezése, valamint opto- és/vagy kemogenetikai módszerekkel, potenciális sejtpopulációk farmakoterápiás kezeléseinek vizsgálatával a PTSD mögöttes mechanizmusának feltárása.

6. Összefoglaló

A poszttraumás stressz zavar (PTSD) a traumát átélők 10-20 %-ánál kialakuló pszichiátriai kórkép, melyet tartós félelmi generalizáció jellemez (biztonságos környezetben is markáns szorongásos reakciók). Habár bizonyos agyterületek (PFC, amigdala és hippokampusz) térfogati és/vagy aktivitásbeli eltérése ismert PTSD esetén, a specifikus tünetekhez, így a maladaptív félelmi generalizációhoz társuló hálózat szintű elváltozások nem tisztázottak.

Dolgozatomban egy rágcsló PTSD modellben megjelenő félelmi generalizáció teljes agyi hálózati aktivitásának sejtszintű felbontással történő feltérképezését mutatom be. Modellünkben hím Long-Evans patkányokat tettünk ki kontrollálatlan lábsokknak (trauma), amit 4 héttel később a félelmi válasz mérése követett mind a trauma kontextusában (tanulás mérése), mind biztonságos környezetben (generalizáció mérése). Utóbbi teszt alapján sérülékeny és ellenálló csoportokat azonosítottunk (felső és alsó 25% dermedési válasz arányában), melyeket a félelmi generalizáció időpontjában perfundáltunk és koronális agyi metszetein immunhisztokémiával jelöltük az akut neuronális aktivitás marker c-Fos fehérjét. Automatizált mikroszkópia segítségével láthatóvá tettük és digitalizáltuk a metszeteket, amiket a Waxholm Space Atlas volumetrikus atlaszterébe helyeztünk el a régiók azonosítása céljából. A c-Fos pozitív immunjeleket neurális hálók segítségével szegmentáltuk, binarizáltuk és hozzárendeltük az atlasz régiókhoz, így kvantifikálva az agyi régiók neuronális aktivitását.

Eredményeink részben megerősítik a szakirodalom által PTSD-ben kulcsfontosságúnak tartott agyi területek aktivitásbeli eltérését (cinguláris kéreg, hippokampusz CA1), másrészt új régiók esetében is találtunk markáns aktivitásbeli különbségeket (például retrosplenialis kéreg, inzuláris kéreg). Továbbá kimutattuk, hogy teljes hálózati működés tekintetében is markáns különbségek láthatók az ellenálló és sérülékeny csoportok között, nevezetesen az ellenálló egyedeknél szignifikánsan erősebb funkcionális kapcsoltságot figyeltünk meg modulokon belüli aktivitás-korrelációknál, mint a sérülékeny populációnál. Eredményeink egyrészt új régiók funkcionális szerepére hívhatják fel a figyelmet a félelmi generalizáció mechanizmusát illetően, másrészt szélesebb hálózati eltérésekre is rámutathatnak ezen maladaptív elváltozások mögött.

7. Summary

Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a psychiatric disorder in 10-20% of trauma survivors, characterised by persistent fear generalisation (marked anxiety reactions even in a safe environment). Although volume and/or activity abnormalities in certain brain areas (prefrontal cortex, amygdala and hippocampus) are known in PTSD, the network-level changes associated with specific symptoms, such as maladaptive fear generalisation, are not clear.

In this dissertation, I present a cellular resolution mapping of whole brain network activity of fear generalization in a rodent model of PTSD. In our model, we exposed male Long-Evans rats to uncontrolled footshock (trauma), followed by a measure of fear response both in the context of trauma (a measure of learning) and in a safe environment (a measure of generalization) 4 weeks later. Based on the latter test, we identified vulnerable and resilient groups (upper and lower 25% in proportion of freezing response in the safe context), which were perfused at the time of fear generalization and immunohistochemically labeled coronal brain sections for the acute neuronal activity marker c-Fos protein. Using automated microscopy, we visualized and digitized the sections, which were placed in the volumetric atlas of the Waxholm Space Atlas for region identification. With the help of neural networks, c-Fos positive immunosignals were segmented, binarized and assigned to the atlas regions, thus quantifying the neuronal activity of brain regions.

These results partly confirm the activity differences in brain areas identified in the literature as key in PTSD (cingulate cortex, hippocampal CA1), but also reveal marked differences in activity in new regions (e.g. retrosplenial cortex, insular cortex). Furthermore, we showed that significant differences in overall network function were also apparent between the resilient and vulnerable groups, namely, we observed significantly stronger functional connectivity in activity correlations within modules in the resilient animals than in the vulnerable population. Our results may point to a new functional role for regions in the mechanism of fear generalization and may also point to broader network differences underlying these maladaptive alterations.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőimnek, Dr. Tóth Máténak és Balla Gyulának a sok szakmai észrevételt és hogy bármikor fordulhattam hozzájuk, mind a TDK dolgozat előtt, alatt és után is. Köszönöm a lehetőséget Dr. Mikics Évának, akinek köszönhetően a kutatócsoport tagjaként végezhettem a TDK munkámat és egyben köszönöm munkatársaim támogatását is. Ezen felül szeretném megköszönni Dr. Puska Gina segítségét is, amit a konzultációk során nyújtott.

9. Irodalomjegyzék

1. APA (1980) Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-III), 3rd Edition. Washington DC
2. American Psychiatric Association (2013) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. American Psychiatric Association
3. Breslau N, Kessler RC, Chilcoat HD, Schultz LR, Davis GC, Andreski P (1996) Trauma and Posttraumatic Stress Disorder in the Community Detroit Area Survey of Trauma
4. Kessler RC (1995) Posttraumatic Stress Disorder in the National Comorbidity Survey. Arch Gen Psychiatry 52:1048. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1995.03950240066012>
5. Atwoli L, Stein DJ, Koenen KC, McLaughlin KA (2015) Epidemiology of posttraumatic stress disorder. Curr Opin Psychiatry 28:307–311. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000167>
6. Breslau N (1991) Traumatic Events and Posttraumatic Stress Disorder in an Urban Population of Young Adults. Arch Gen Psychiatry 48:216. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1991.01810270028003>
7. Forbes D, Fletcher S, Parslow R, Phelps A, O'Donnell M, Bryant RA, McFarlane A, Silove D, Creamer M (2012) Trauma at the Hands of Another. J Clin Psychiatry 73:372–376. <https://doi.org/10.4088/JCP.10m06640>
8. DiGangi JA, Gomez D, Mendoza L, Jason LA, Keys CB, Koenen KC (2013) Pretrauma risk factors for posttraumatic stress disorder: A systematic review of the literature. Clin Psychol Rev 33:728–744. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2013.05.002>
9. Richter-Levin G, Sandi C (2021) Title: “Labels Matter: Is it stress or is it Trauma?” Transl Psychiatry 11:385. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01514-4>
10. Anacker C, O'Donnell KJ, Meaney MJ (2014) Early life adversity and the epigenetic programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function. Dialogues Clin Neurosci 16:321–33. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2014.16.3/anacker>
11. Mellman TA, Alim T, Brown DD, Gorodetsky E, Buzas B, Lawson WB, Goldman D, Charney DS (2009) Serotonin polymorphisms and posttraumatic stress disorder in a trauma exposed African American population. Depress Anxiety 26:993–7. <https://doi.org/10.1002/da.20627>
12. Young DA, Inslicht SS, Metzler TJ, Neylan TC, Ross JA (2018) The effects of early trauma and the FKBP5 gene on PTSD and the HPA axis in a clinical sample of Gulf War veterans. Psychiatry Res 270:961–966. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2018.03.037>
13. Sayed S, Iacoviello BM, Charney DS (2015) Erratum to: Risk Factors for the Development of Psychopathology Following Trauma. Curr Psychiatry Rep 17:80. <https://doi.org/10.1007/s11920-015-0623-8>
14. Squire LR (1992) Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. Psychol Rev 99:195–231. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.99.2.195>

15. Lisman J, Buzsáki G, Eichenbaum H, Nadel L, Ranganath C, Redish AD (2017) Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. *Nat Neurosci* 20:1434–1447. <https://doi.org/10.1038/nn.4661>
16. Eichenbaum H (2017) Prefrontal-hippocampal interactions in episodic memory. *Nat Rev Neurosci* 18:547–558. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.74>
17. Squire LR, Knowlton B, Musen G (1993) The Structure and Organization of Memory. *Annu Rev Psychol* 44:453–495. <https://doi.org/10.1146/annurev.ps.44.020193.002321>
18. Bolles RC (1970) Species-specific defense reactions and avoidance learning. *Psychol Rev* 77:32–48. <https://doi.org/10.1037/h0028589>
19. Rosen JB, Schulkin J (1998) From normal fear to pathological anxiety. *Psychol Rev* 105:325–350. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.105.2.325>
20. Baldi E (2004) Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 81:162–166. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.02.004>
21. Elliott ND, Richardson R (2019) The effects of early life stress on context fear generalization in adult rats. *Behavioral Neuroscience* 133:50–58. <https://doi.org/10.1037/bne0000289>
22. Huckleberry KA, Ferguson LB, Drew MR (2016) Behavioral mechanisms of context fear generalization in mice. *Learning & Memory* 23:703–709. <https://doi.org/10.1101/lm.042374.116>
23. Janak PH, Tye KM (2015) From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature* 517:284–292. <https://doi.org/10.1038/nature14188>
24. Shin LM, Orr SP, Carson MA, Rauch SL, Macklin ML, Lasko NB, Peters PM, Metzger LJ, Dougherty DD, Cannistraro PA, Alpert NM, Fischman AJ, Pitman RK (2004) Regional Cerebral Blood Flow in the Amygdala and Medial Prefrontal Cortex During Traumatic Imagery in Male and Female Vietnam Veterans With PTSD. *Arch Gen Psychiatry* 61:168. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.61.2.168>
25. Britton JC, Phan KL, Taylor SF, Fig LM, Liberzon I (2005) Corticolimbic blood flow in posttraumatic stress disorder during script-driven imagery. *Biol Psychiatry* 57:832–840. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.12.025>
26. Jhang J, Lee H, Kang MS, Lee H-S, Park H, Han J-H (2018) Anterior cingulate cortex and its input to the basolateral amygdala control innate fear response. *Nat Commun* 9:2744. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05090-y>
27. Young DA, Chao L, Neylan TC, O'Donovan A, Metzler TJ, Inslicht SS (2018) Association among anterior cingulate cortex volume, psychophysiological response, and PTSD diagnosis in a Veteran sample. *Neurobiol Learn Mem* 155:189–196. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.08.006>
28. Miller EK, Cohen JD (2001) An Integrative Theory of Prefrontal Cortex Function. *Annu Rev Neurosci* 24:167–202. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.167>
29. Wilkins AJ, Shallice T, McCarthy R (1987) Frontal lesions and sustained attention. *Neuropsychologia* 25:359–365. [https://doi.org/10.1016/0028-3932\(87\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0028-3932(87)90024-8)
30. Chao LL, Knight RT (1995) Human prefrontal lesions increase distractibility to irrelevant sensory inputs. *Neuroreport* 6:1605–1610. <https://doi.org/10.1097/00001756-199508000-00005>
31. Barrash J, Tranel D, Anderson SW (2000) Acquired Personality Disturbances Associated With Bilateral Damage to the Ventromedial Prefrontal Region. *Dev Neuropsychol* 18:355–381. <https://doi.org/10.1207/S1532694205Barrash>
32. Aron AR (2011) From Reactive to Proactive and Selective Control: Developing a Richer Model for Stopping Inappropriate Responses. *Biol Psychiatry* 69:e55–e68. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.07.024>

33. THOMPSON-SCHILL SL, JONIDES J, MARSHUETZ C, SMITH EE, D'ESPOSITO M, KAN IP, KNIGHT RT, SWICK D (2002) Effects of frontal lobe damage on interference effects in working memory. *Cogn Affect Behav Neurosci* 2:109–120. <https://doi.org/10.3758/CABN.2.2.109>
34. Girgenti MJ, Hare BD, Ghosal S, Duman RS (2017) Molecular and Cellular Effects of Traumatic Stress: Implications for PTSD. *Curr Psychiatry Rep* 19:85. <https://doi.org/10.1007/s11920-017-0841-3>
35. DePierro J, Lepow L, Feder A, Yehuda R (2019) Translating Molecular and Neuroendocrine Findings in Posttraumatic Stress Disorder and Resilience to Novel Therapies. *Biol Psychiatry* 86:454–463. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.07.009>
36. Watts B V, Schnurr PP, Mayo L, Young-Xu Y, Weeks WB, Friedman MJ (2013) Meta-analysis of the efficacy of treatments for posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry* 74:e541–50. <https://doi.org/10.4088/JCP.12r08225>
37. Cipriani A, Williams T, Nikolakopoulou A, Salanti G, Chaimani A, Ipser J, Cowen PJ, Geddes JR, Stein DJ (2018) Comparative efficacy and acceptability of pharmacological treatments for post-traumatic stress disorder in adults: a network meta-analysis. *Psychol Med* 48:1975–1984. <https://doi.org/10.1017/S003329171700349X>
38. Watts B V, Schnurr PP, Mayo L, Young-Xu Y, Weeks WB, Friedman MJ (2013) Meta-analysis of the efficacy of treatments for posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry* 74:e541–50. <https://doi.org/10.4088/JCP.12r08225>
39. Hetrick SE, Purcell R, Garner B, Parslow R (2010) Combined pharmacotherapy and psychological therapies for post traumatic stress disorder (PTSD). *Cochrane Database Syst Rev* CD007316. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007316.pub2>
40. Deslauriers J, Toth M, Der-Avakian A, Risbrough VB (2018) Current Status of Animal Models of Posttraumatic Stress Disorder: Behavioral and Biological Phenotypes, and Future Challenges in Improving Translation. *Biol Psychiatry* 83:895–907
41. Goswami S, Rodríguez-Sierra O, Cascardi M, Paré D (2013) Animal models of post-traumatic stress disorder: face validity. *Front Neurosci* 7:. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00089>
42. Wang Q, Ding S-L, Li Y, Royall J, Feng D, Lesnar P, Graddis N, Naeemi M, Facer B, Ho A, Dolbeare T, Blanchard B, Dee N, Wakeman W, Hirokawa KE, Szafer A, Sunkin SM, Oh SW, Bernard A, Phillips JW, Hawrylycz M, Koch C, Zeng H, Harris JA, Ng L (2020) The Allen Mouse Brain Common Coordinate Framework: A 3D Reference Atlas. *Cell* 181:936–953.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.007>
43. Papp EA, Leergaard TB, Calabrese E, Johnson GA, Bjaalie JG (2014) Waxholm Space atlas of the Sprague Dawley rat brain. *Neuroimage* 97:374–86. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.04.001>
44. Puchades MA, Csucs G, Ledergerber D, Leergaard TB, Bjaalie JG (2019) Spatial registration of serial microscopic brain images to three-dimensional reference atlases with the QuickNII tool. *PLoS One* 14:e0216796. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216796>
45. Hagenaaars MA, Oitzl M, Roelofs K (2014) Updating freeze: Aligning animal and human research. *Neurosci Biobehav Rev* 47:165–176. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.07.021>
46. Biro L, Miskolczi C, Szebik H, Bruzsik B, Varga ZK, Szenté L, Toth M, Halasz J, Mikics E (2023) Post-weaning social isolation in male mice leads to abnormal aggression and disrupted network organization in the prefrontal cortex: Contribution of parvalbumin interneurons with or without perineuronal nets. *Neurobiol Stress* 25:100546. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2023.100546>
47. Kleven H, Bjerke IE, Clascá F, Groenewegen HJ, Bjaalie JG, Leergaard TB (2023) Waxholm Space atlas of the rat brain: a 3D atlas supporting data analysis and integration. *Nat Methods*. <https://doi.org/10.1038/s41592-023-02034-3>
48. Berg S, Kutra D, Kroeger T, Strachle CN, Kausler BX, Haubold C, Schiegg M, Ales J, Beier T, Rudy M, Eren K, Cervantes JI, Xu B, Beuttenmueller F, Wolny A, Zhang C, Koethe U, Hamprecht FA, Kreshuk A (2019) ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. *Nat Methods* 16:1226–1232. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0582-9>

49. Groeneboom NE, Yates SC, Puchades MA, Bjaalie JG (2020) Nutil: A Pre- and Post-processing Toolbox for Histological Rodent Brain Section Images. *Front Neuroinform* 14:37. <https://doi.org/10.3389/fninf.2020.00037>
50. Kwapis JL, Jarome TJ, Lee JL, Helmstetter FJ (2015) The retrosplenial cortex is involved in the formation of memory for context and trace fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 123:110–6. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.06.007>
51. Vann SD, Aggleton JP, Maguire EA (2009) What does the retrosplenial cortex do? *Nat Rev Neurosci* 10:792–802. <https://doi.org/10.1038/nrn2733>
52. Pan T-T, Liu C, Li D-M, Zhang T-H, Zhang W, Zhao S-L, Zhou Q-X, Nie B-B, Zhu G-H, Xu L, Liu H (2022) Retrosplenial Cortex Effects Contextual Fear Formation Relying on Dysgranular Constituent in Rats. *Front Neurosci* 16:. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.886858>
53. Chen LW, Sun D, Davis SL, Haswell CC, Dennis EL, Swanson CA, Whelan CD, Gutman B, Jahanshad N, Iglesias JE, Thompson P, Mid-Atlantic MIRECC Workgroup, Wagner HR, Saemann P, LaBar KS, Morey RA (2018) Smaller hippocampal CA1 subfield volume in posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety* 35:1018–1029. <https://doi.org/10.1002/da.22833>
54. Bremner JD, Vythilingam M, Vermetten E, Southwick SM, McGlashan T, Nazeer A, Khan S, Vaccarino LV, Soufer R, Garg PK, Ng CK, Staib LH, Duncan JS, Charney DS (2003) MRI and PET study of deficits in hippocampal structure and function in women with childhood sexual abuse and posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 160:924–32. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.160.5.924>
55. van Rooij SJH, Kennis M, Sjouwerman R, van den Heuvel MP, Kahn RS, Geuze E (2015) Smaller hippocampal volume as a vulnerability factor for the persistence of post-traumatic stress disorder. *Psychol Med* 45:2737–46. <https://doi.org/10.1017/S0033291715000707>
56. Gurvits T V, Shenton ME, Hokama H, Ohta H, Lasko NB, Gilbertson MW, Orr SP, Kikinis R, Jolesz FA, McCarley RW, Pitman RK (1996) Magnetic resonance imaging study of hippocampal volume in chronic, combat-related posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 40:1091–9. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(96\)00229-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(96)00229-6)
57. Shin LM, Shin PS, Heckers S, Krangel TS, Macklin ML, Orr SP, Lasko N, Segal E, Makris N, Richert K, Levering J, Schacter DL, Alpert NM, Fischman AJ, Pitman RK, Rauch SL (2004) Hippocampal function in posttraumatic stress disorder. *Hippocampus* 14:292–300. <https://doi.org/10.1002/hipo.10183>
58. Whalley MG, Rugg MD, Smith APR, Dolan RJ, Brewin CR (2009) Incidental retrieval of emotional contexts in post-traumatic stress disorder and depression: an fMRI study. *Brain Cogn* 69:98–107. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2008.05.008>
59. Hayes JP, LaBar KS, McCarthy G, Selgrade E, Nasser J, Dolcos F, VISN 6 Mid-Atlantic MIRECC workgroup, Morey RA (2011) Reduced hippocampal and amygdala activity predicts memory distortions for trauma reminders in combat-related PTSD. *J Psychiatr Res* 45:660–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2010.10.007>
60. Carrión VG, Haas BW, Garrett A, Song S, Reiss AL (2010) Reduced hippocampal activity in youth with posttraumatic stress symptoms: an FMRI study. *J Pediatr Psychol* 35:559–69. <https://doi.org/10.1093/jpepsy/jsp112>
61. van Rooij SJH, Ravi M, Ely TD, Michopoulos V, Winters SJ, Shin J, Marin M-F, Milad MR, Rothbaum BO, Ressler KJ, Jovanovic T, Stevens JS (2021) Hippocampal activation during contextual fear inhibition related to resilience in the early aftermath of trauma. *Behavioural brain research* 408:113282. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113282>
62. Carzoli KL, Kogias G, Fawcett-Patel J, Liu SJ (2023) Cerebellar interneurons control fear memory consolidation via learning-induced HCN plasticity. *Cell Rep* 42:113057. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113057>
63. Li Y, Lopez-Huerta VG, Adiconis X, Levandowski K, Choi S, Simmons SK, Arias-Garcia MA, Guo B, Yao AY, Blosser TR, Wimmer RD, Aida T, Atamian A, Naik T, Sun X, Bi D, Malhotra D, Hession CC, Shema R, Gomes M, Li T, Hwang E, Krol A, Kowalczyk M, Peça J, Pan G, Halassa MM, Levin JZ, Fu Z,

- Feng G (2020) Distinct subnetworks of the thalamic reticular nucleus. *Nature* 583:819–824. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2504-5>
64. Wimmer RD, Schmitt LI, Davidson TJ, Nakajima M, Deisseroth K, Halassa MM (2015) Thalamic control of sensory selection in divided attention. *Nature* 526:705–709. <https://doi.org/10.1038/nature15398>
 65. Georgescu IA, Popa D, Zagrean L (2020) The Anatomical and Functional Heterogeneity of the Mediodorsal Thalamus. *Brain Sci* 10:. <https://doi.org/10.3390/brainsci10090624>
 66. Mitchell AS, Gaffan D (2008) The magnocellular mediodorsal thalamus is necessary for memory acquisition, but not retrieval. *J Neurosci* 28:258–63. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4922-07.2008>
 67. Mitchell AS, Chakraborty S (2013) What does the mediodorsal thalamus do? *Front Syst Neurosci* 7:37. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00037>
 68. Ouhaz Z, Fleming H, Mitchell AS (2018) Cognitive Functions and Neurodevelopmental Disorders Involving the Prefrontal Cortex and Mediodorsal Thalamus. *Front Neurosci* 12:33. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00033>
 69. Karalis N, Dejean C, Chaudun F, Khoder S, Rozeske RR, Wurtz H, Bagur S, Benchenane K, Sirota A, Courtin J, Herry C (2016) 4-Hz oscillations synchronize prefrontal-amygdala circuits during fear behavior. *Nat Neurosci* 19:605–12. <https://doi.org/10.1038/nn.4251>
 70. Buckner RL, Andrews-Hanna JR, Schacter DL (2008) The brain's default network: anatomy, function, and relevance to disease. *Ann N Y Acad Sci* 1124:1–38. <https://doi.org/10.1196/annals.1440.011>
 71. DiGangi JA, Tadayyon A, Fitzgerald DA, Rabinak CA, Kennedy A, Klumpp H, Rauch SAM, Phan KL (2016) Reduced default mode network connectivity following combat trauma. *Neurosci Lett* 615:37–43. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.01.010>
 72. Bluhm RL, Williamson PC, Osuch EA, Frewen PA, Stevens TK, Boksman K, Neufeld RWJ, Théberge J, Lanius RA (2009) Alterations in default network connectivity in posttraumatic stress disorder related to early-life trauma. *J Psychiatry Neurosci* 34:187–94
 73. Sripada RK, King AP, Welsh RC, Garfinkel SN, Wang X, Sripada CS, Liberzon I (2012) Neural dysregulation in posttraumatic stress disorder: evidence for disrupted equilibrium between salience and default mode brain networks. *Psychosom Med* 74:904–11. <https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e318273bf33>
 74. Brown VM, LaBar KS, Haswell CC, Gold AL, Mid-Atlantic MIRECC Workgroup, McCarthy G, Morey RA (2014) Altered resting-state functional connectivity of basolateral and centromedial amygdala complexes in posttraumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* 39:351–9. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.197>