

## Streszczenie:

Doświadczenia traumatyczne są ważnym czynnikiem etiologicznym wielu zaburzeń psychicznych. Takie doświadczenia wpływają na objawy prezentowane przez pacjentów, między innymi pogarszając funkcje poznawcze osób, które ich zaznały. Doświadczenia traumatyczne, rozumiane jako ekspozycja na silny stres przekraczający zdolności radzenia sobie jednostki, mogą być spowodowane wieloma czynnikami, między innymi: zaniedbaniem opiekunów, znęcaniem i zastraszeniem w miejscu pracy lub w rodzinie, ekspozycją na przemocą fizyczną, emocjonalną lub seksualną. Doświadczenia traumatyczne mogą być szczególnie szkodliwe, gdy przyjmują wymiar chroniczny, czyli długotrwały. Współczesna literatura poświęca coraz więcej uwagi zmianom neurobiologicznym zachodzącym pod wpływem traumy oraz stresu. W ostatnich latach pojawia się coraz więcej doniesień o epigenetycznych zmianach wywoływanych przez chroniczny stres i doświadczenia traumatyczne oraz o specyficznej, wyciszającej funkcji układu endokannabinoidowego, względem nadmiernego pobudzenia osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA). Literatura przedmiotu wykazuje negatywny wpływ doświadczeń traumatycznych na funkcje poznawcze zarówno w grupie pacjentów z zaburzeniami psychicznymi, jak i w grupie osób zdrowych. Testy oparte o uczenie się z nagród i kar (na przykład Probabilistic Selection Task, PST), to proste narzędzia pozwalające badać funkcje poznawcze jednostki, szeroko wykorzystywane w badaniach ludzi oraz w modelach zwierzęcych. Neurobiologiczne podłoże uczenia się z nagród i kar jest dobrze opisane - dzięki temu wiemy, które części mózgu wykazują wzmożoną aktywność podczas badania PST. Struktury te okazują się być istotnymi miejscami działania osi HPA, układu endokannabinoidowego oraz miejscami intensywnych zmian epigenetycznych inicjowanych przez stres. Istnieje potrzeba opracowania protokołu umożliwiającego badanie doświadczeń traumatycznych wywołanych przez ekspozycję na chroniczny stres, z wykorzystaniem modelu zwierzęcego, który daje znacznie więcej możliwości kliniczno-laboratoryjnych niż opisowy model ludzki. W literaturze przedmiotu większość badań przeprowadzana jest z wykorzystaniem jednorazowej ekspozycji na ostry stres (ang. acute stress), brakuje protokołów umożliwiających badanie uczenia się z nagród i kar podczas ekspozycji na stres. Opracowany w ramach pracy doktorskiej protokół różni się od innych, opisywanych w literaturze przedmiotu, wprowadzając chroniczną ekspozycję na zapach drapieżnika (12 dni) oraz codzienny pomiar uczenia się na podstawie nagród i kar za pomocą badania PST. W protokole wykorzystano także test behawioralny interakcji z nowym osobnikiem (ang. Social Interaction Test, SIT), badający wycofanie społeczne wywołane przez lęk.

### Cele pracy:

Celem pracy było 1) opracowanie nowego protokołu badawczego na modelu zwierzęcym, pozwalającego badać konsekwencje traumy wywołanej przez chroniczną ekspozycję na stres,

2) zaprojektowanie i zbudowanie innowacyjnego urządzenia badającego uczenie się zwierząt na podstawie nagród i kar w sposób identyczny, jak badania PST u ludzi, z wykorzystaniem ekranu dotykowego wyświetlającego bodźce,

3) zbadanie wpływu traumy, wywołanej chronicznym stresem, na uczenie się na podstawie nagród i kar (PST) oraz zbadanie wpływu traumy na behavior związany z interakcjami społecznymi (SIT), w ramach eksperymentu z użyciem opracowanego protokołu badawczego,

4) opisanie neurobiologicznych zmian, zachodzących pod wpływem traumy, w kontekście rozwoju zaburzeń psychicznych, ze szczególnym uwzględnieniem struktur odpowiedzialnych za funkcje poznawcze.

#### Materiały i metody:

W badaniu wykorzystano n=20 osobników szczura wędrownego linii Wistar Rat (*Rattus norvegicus*), grupa eksperymentalna (n=10) została poddana chronicznej ekspozycji na zapach drapieżnika. W trakcie okresu traumatyzacji przez ekspozycję (12 dni), zwierzęta były poddawane procedurze badawczej funkcji poznawczych przy użyciu testu uczenia się z nagród i kar (ang. Probabilistic Selection Task, PST). W trakcie wykonywania testu PST, na ekranie dotykowym wyświetlano symbole, których wybór, za pomocą dotknięcia ekranu, powodował otrzymanie nagrody (kropli słodkiego płynu) lub kary (braku nagrody). Zbudowane w ramach pracy doktorskiej urządzenie do badania funkcji poznawczych mierzyło postęp uczenia się w trakcie postępującego procesu traumatyzacji. By ocenić wpływ traumatyzacji na behavior, wykorzystano Test Społecznej Interakcji (ang. Social Interaction Test, SIT). W trakcie SIT dokonywano pomiaru czasu spędzanego przez każdego osobnika w tunelu, na eksploracji otwartej przestrzeni oraz w obszarze kontaktu z nowym, nieznanym osobnikiem. Procedura eksperymentalna całego badania uwzględniała: etap przyuczania zwierząt do swobodnego korzystania z urządzenia (w którym otrzymywały kary i nagrody w zamian za wybór symboli na ekranie dotykowym), etap badania zdolności uczenia się na podstawie wzmocnień bez ekspozycji na chroniczną traumę, etap ekspozycji na traumę, badanie po zakończonej ekspozycji oraz dwa badania behawioralne SIT. Grupa kontrolna (n=10) została poddana identycznej procedurze badawczej, z wyłączeniem ekspozycji na traumatyzujący bodziec.

#### Wyniki:

W grupie eksperymentalnej odnotowano istotne statystycznie pogorszenie zdolności uczenia się, na podstawie wzmocnień pozytywnych i negatywnych, mierzonych za pomocą PST w pierwszym dniu ekspozycji oraz dalsze pogorszenie po 11 dniach chronicznej ekspozycji, w porównaniu do wyników tej samej grupy przed traumatyzacją. Grupa kontrolna nie wykazała pogorszenia zdolności uczenia się na podstawie wzmocnień mierzonych za pomocą PST w kolejnych dniach badania. W porównaniach międzygrupowych nie odnotowano statystycznie istotnej różnicy w funkcjach poznawczych na etapie przed-ekspozycyjnym. W trakcie chronicznej ekspozycji grupa eksperymentalna osiągała znacznie gorsze wyniki w PST niż grupa kontrolna, która nie była eksponowana. Grupa eksperymentalna, mimo ekspozycji na traumę, nie wykazała pełnoobjawowej anhedonii ani katatonii (ang. freezing behavior) podczas PST. W badaniach behawioralnych z użyciem SIT, osobniki traumatyzowane wykazywały preferencję do izolacji i wycofania z interakcji społecznych, w porównaniu do zachowania przed-ekspozycyjnego. W pracy teoretycznej opisano procesy epigenetyczne, które w trakcie pojawienia się traumy psychicznej, przyczyniają się do powstawania licznych psychopatologii, między innymi zaburzają uczenie się z nagród oraz wywołują objawy wycofania społecznego. Przedstawiono także ochronną rolę układu

endokanabinoidowego względem długotrwałej i szkodliwej ekspozycji na doświadczenia traumatyczne. Wyniki eksperymentu, wraz z wynikami prac teoretycznych, pozwalają wnioskować o użyteczności opracowanego protokołu w badaniach zmian w funkcjach poznawczych oraz behawioru wywołanego przez chroniczną ekspozycję na traumę.

Wnioski:

1) proces chronicznej traumatyzacji prowadzi do pogorszenia funkcji poznawczych w zakresie uczenia się na podstawie nagród i kar u szczurów oraz powoduje wycofanie z kontaktów społecznych traumatyzowanych zwierząt,

2) opracowany protokół, wykorzystujący ekran dotykowy, umożliwia badanie funkcji poznawczych podczas ekspozycji na traumę na tej samej grupie osobników, rejestrując zmiany w uczeniu się na podstawie nagród i kar u szczurów *in vivo*, podczas traumatyzacji,

3) opracowany protokół, mimo wykorzystania ekspozycji na silny i chroniczny stres, nie wywołał anhedonii ani katatonii (ang. freezing behavior), która uniemożliwiłaby badanie funkcji poznawczych i behawioru związanego z interakcjami społecznymi,

4) wykazano potencjał translacyjny z modelu ludzkiego na model zwierzęcy - szczury nauczyły się korzystania z ekranów dotykowych, które wyświetlają symbole, dokonują wyborów poprzez dotknięcie odpowiedniego pola, korzystają z procedury PST identycznej do tej, wykorzystywanej na modelu ludzkim.

5) ekspozycja na zdarzenia traumatyczne wywołuje zmiany na poziomie epigenetycznym, które obniżają funkcje poznawcze oraz powodują objawy wycofania społecznego (wniosek pracy teoretycznej).

6) układ endokanabinoidowy pełni funkcję ochronną względem nadmiernego pobudzenia osi HPA wywołanego traumą, a niektóre ligandy receptorów kanabinoidowych mogą pełnić funkcję biomarkerów przeżytych traum (wniosek pracy teoretycznej).

7) w przyszłości, opracowany i opisany w ramach pracy doktorskiej protokół, może być użyteczny w badaniu zmian epigenetycznych wywołanych chroniczną traumą oraz w badaniu biologicznych systemów aktywowanych chronicznym stresem, takich jak układ endokanabinoidowy czy oś HPA.

## Abstract

Traumatic experiences are important etiological factors of many mental disorders. They disturb cognitive functions of those who have experienced them, and thus affect symptoms of numerous mental disorders. Traumatic experience, defined as an exposure to severe stress beyond one's ability to cope with, can be caused by many factors, including: caregiver neglect, bullying and victimization in the workplace or in the family, exposure to physical, emotional or sexual violence. Traumatic experiences can be particularly harmful when they are chronic. Growing body of research focuses on neurobiological changes evoked by traumatic experiences and chronic stress. In recent years, there have been an abundance of reports regarding epigenetic changes caused by chronic stress and traumatic experiences, and about specific, inhibitory functions of the endocannabinoid system against excessive hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis stimulation. There are many studies that report the negative impact of traumatic experiences on cognitive functions in patients with mental disorders, as well as in healthy individuals. Tests based on learning from rewards and punishments (for example, Probabilistic Selection Task, PST) are simple tools that enable assessment of one's cognitive functions. They are widely used in human research, as well as in animal models. Neurobiology of reward learning is well-described, thus we know which parts of the brain are activated during PST. Interestingly, these structures are heavily influenced by epigenetic changes during stress exposure, and are targeted by HPA axis and endocannabinoid system activity. There is a need for an experimental protocol that allows the study of traumatic experiences caused by chronic stress exposure with an animal model that offers more laboratory possibilities than (mostly) descriptive human models. In the literature, most of the research is carried out using one-time acute stress exposure, there are no protocols enabling measurement of reward learning during stress exposure. The protocol developed as part of the doctoral dissertation differs from the others described in the literature, due to usage of chronic exposure to predator odor (12 days), and daily measurement reinforcement learning via PST, as the trauma progresses. Moreover, in our experiment, we used the Social Interaction Test (SIT), as it examines anxiety-induced social withdrawal.

The aim of the study was 1) to develop a new experimental protocol that allows to study the consequences of trauma, caused by chronic exposure to stress, in an animal model,

2) to design and build an innovative device that measures reward learning via PST, using a touch screen that displays stimuli, in an approach identical with human PST testing,

3) to investigate the effects of chronic stress and trauma on reward learning (via PST) and investigate the effects of chronic stress on social interaction behaviour (via SIT) using novel protocol,

4) to describe neurobiological changes induced by trauma in brain structures responsible for cognitive functions, in the context of mental disorders development.

## Materials and methods:

N=20 Wistar Rat (*Rattus norvegicus*) were used in the study. Experimental group (n=10) was subjected to chronic exposure to predator odor. During that period (12 days), animals were subjected to Probabilistic Selection Task (PST). During the PST, symbols were displayed on the touch screen, selection was done via touch or nose-poke, and resulted in a reward (a drop of sweet liquid) or a punishment (lack of reward). The device, built as part of the doctoral dissertation, measured the progress of reinforcement learning via PST, during the process of traumatization. To assess the impact of trauma on one's behaviour, the Social Interaction Test (SIT) was used. During SIT, time spent by each individual in every part of the cage was measured (tunnel, open space, area of an interaction with an unknown rat). The experimental procedure included: accommodation to the device that displays PST, PST testing without exposure to chronic trauma, PST testing with parallel chronic trauma exposition, post-exposure PST measurement, pre- and post- trauma SIT measurement. The control group (n=10) was subjected to the identical test procedure, except for exposure to a traumatizing stimulus.

## Results:

In the experimental group, there was a statistically significant deterioration in PST during the first day of exposure. Further deterioration in PST was observed after 11 days of chronic exposure, in comparison to the pre- trauma performance. The control group did not present deterioration in reinforcement learning with PST throughout the experiment. In the intergroup comparisons, there was no statistically significant difference in PST performance at the pre-stress exposure stage. During chronic exposure, the experimental group performed significantly worse in PST in comparison with the control group. The experimental group, despite exposure to trauma, did not show full-blown anhedonia or catatonia during PST. In SIT, traumatized individuals revealed a preference for isolation and withdrawal from social interactions, in comparison with pre- stress exposure behavior. Review paper presents epigenetic processes which, during the onset of psychological trauma, contribute to the formation of numerous psychopathologies, disturb reinforcement learning and induce social withdrawal. The protective role of the endocannabinoid system against long-term and harmful exposure to traumatic experiences is presented in another review paper.

## Conclusions:

- 1) chronic trauma deteriorates reinforcement learning in rats, and induces social withdrawal,
- 2) novel protocol enables to measure PST performance during exposure to chronic trauma on animal model,
- 3) novel protocol does not induce full-blown anhedonia nor freezing behaviour,
- 4) the translational scope of the protocol has been demonstrated - rats learn to use touch screen monitors that displayed stimuli, similarly to human PST-procedure,
- 5) exposure to traumatic experience evokes epigenetic changes that disrupts cognitive functions and causes symptoms of social withdrawal (theoretical work conclusion),

6) endocannabinoid system has a potent, protective function against trauma-induced excessive activation of the HPA axis, ligands of cannabinoid receptors may act as biomarkers of trauma (theoretical work conclusion),

7) protocol may be useful in the future research of epigenetic changes induced by chronic trauma, as well as in the future research of biological systems involved during chronic stress activation, such as the endocannabinoid system or the HPA axis.