

**HIPOFÍZIS ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID
GÉNHÁNYOS EGEREK STRESSZADAPTÁCIÓS
RENDSZEREINEK VIZSGÁLATA AKUT ÉS KRÓNIKUS
MODELLEKBEN**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Gaszneré Dr. Kormos Viktória

Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Neurofarmakológia Program

Programvezető: Prof. Dr. Pintér Erika

Témavezető: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet



Pécs, 2018.

BEVEZETÉS

Stressz és depresszió

Selye János, a klasszikus stressz-koncepció megalkotója szerint „a stressz a szervezet nem specifikus válasza bármilyen fenyegető igénybevételre” (1936.). A stressz tágabb értelemben a szervezet univerzális reakciója minden olyan valós, vagy valósnak vélt külső vagy belső fenyegető hatásra, mely a szervezet integritását és egyensúlyát veszélyezteti, és a túlélés érdekében az egyént alkalmazkodásra kényszeríti (McEwen 2000.). A nyugati típusú társadalmakban a stresszhez kapcsolódó hangulatzavarok prevalenciája egyre növekszik: a krónikus munkaképtelenség leggyakoribb oka a major depresszió, mely jelentős szociális és gazdasági terheket ró az egészségügyi ellátórendszerekre (WHO, 2016.). A depresszió komplex neurobiológiája és neurokémiai háttere nem teljesen ismert, és kezelése a több elérhető gyógyszercsoport ellenére sem kielégítő, mivel vannak nem reagáló betegek és a széles mellékhatásspektrum miatt sok esetben nem lehet optimális terápiás stratégiát választani. Szükség van ezért a hatékonyabb terápiás megközelítés érdekében a patofiziológiai mechanizmusok pontos megértésére, kulcsmediátorok és célmolekuláik azonosítására, amelyhez új állatmodellek beállítása és jellemzése elengedhetetlen. Számos neuropeptid rendszerről és azok receptorairól kimutatták, hogy fontos tónusos szabályozó szerepe van a stresszadaptációban állatokban és emberben egyaránt. Klinikai vizsgálatok kezdődtek annak feltárására, hogy az újonnan fejlesztett farmakológiai ágensek, melyek a neuropeptid receptorokat veszik célba, hatékony eszközként vethetők-e be a depresszió kezelésében (Lin 2012., Kormos és Gaszner 2013., Catena-Dell’Osso és mtsai., 2013.).

PhD munkám célja a stresszadaptációs rendszerek vizsgálata akut és krónikus egérmodellekben, mely fontos eredményekkel járulhat hozzá a depresszió hátterében álló mechanizmusok megértéséhez és az új terápiás megközelítések meghatározásához.

Hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) és depresszió

A PACAP a vazoaktív intesztinális polipeptid (VIP)/szekretin/glukagon család tagja, 27 és 38 aminosavból álló formája ismert. Receptorai közül a PAC1 specifikus a PACAP-ra nézve, míg a VPAC1 és VPAC2 a PACAP-ot és a VIP-t hasonló affinitással köti (Vaudry és mtsai., 2009., Hammack és May 2015.). A PACAP egy pleiotrop neuropeptid, funkcióit számos biológiai folyamatban leírták (Vaudry és mtsai., 2009., Reglődi és mtsai., 2012.), a központi idegrendszerben többek között neurotrop és neuroprotektív hatásokkal rendelkezik (Reglődi és mtsai., 2001., Hammack és mtsai., 2008., Hashimoto és mtsai., 2009.).

A PACAP génhiányos (KO) egerek depresszió-szerű viselkedést mutatnak *forced swim* tesztben (FST), és antidepresszáns gyógyszerek visszafordítják ezt a PACAP gén hiányából adódó fenotípust (Hashimoto és mtsai., 2001., 2009.). Mindezek alapján felmerült, hogy ez az állat alkalmas lehet az öröklött depresszió hajlam modellezésére. Hashimoto és munkatársai (2010.) humán vizsgálatok során megfigyelték, hogy egy a PACAP génre jellemző nukleotid polimorfizmus gyakran jár együtt major depresszióval. Egyéb adatok is alátámasztják a PACAP lehetséges szerepét emberi pszichopatológiákban (Hashimoto és mtsai., 2011.), mivel a PACAP PAC1 receptoron keresztül hatva növeli a DISC1 gén (*disrupted in schizophrenia 1*) expresszióját (Hattori és mtsai., 2007.), melyről kimutatták, hogy mind a skizofrénia (Millar és mtsai., 2000.), mind a major depresszió kialakulásában (Blackwood és mtsai., 2001.) szerepet játszik, továbbá a PACAP (Ressler és mtsai., 2011.) és PAC1 receptor (Almli és mtsai., 2013., Mercer és mtsai., 2016.) génpolimorfizmusok nőkben fontos szerepet játszanak a poszttraumás stressz szindrómák kifejlődésében.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Szorongás és akut stressz-reakció vizsgálata PACAP génhiányos egerekben viselkedési és c-Fos immunhisztokémiai módszerekkel

1.1. PACAP KO és vad típusú (WT) egerek viselkedési paramétereinek összehasonlítása szorongás és depresszió-szerű viselkedés értékelésére szolgáló magatartási tesztekkel.

1.2. Akut stressz-indukálta neuronális aktivációs mintázat feltérképezése a c-Fos marker expressziójának vizsgálatával a stressz-reaktív agyterületeken egérben, különös tekintettel azokra, amelyek PACAP-erg rostok beidegzése alatt állnak és/vagy a PACAP receptorait expresszálják. FST-t követően vad és PACAP génhiányos egereken az alább felsorolt területek immunhisztokémiai vizsgálatát végeztük el: a tágabb értelemben vett amygdalában a dorsolateralis (BSTdl), dorsomedialis (BSTdm), ovalis (BSTov) és ventralis (BSTv) *bed nucleus of the stria terminalis*-t (BST), a centralis (CeA), basolateralis (BLA) és medialis (MeA) amygdala magokat; a nucleus paraventricularis hypothalami (PVN) parvocellularis (pPVN) és magnocellularis (mPVN) magjait; a ventralis és dorsalis laterális septumot (LS); a dorsalis (dPAG) és laterális (lPAG) periaqueductalis szürkeállományt; az centrális projekciójú Edinger-Westphal magot (EWcp) és a nucleus raphe dorsalist (DR).

2. PACAP génhíányos egerek vizsgálata krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) modellben viselkedési és funkcionális morfológiai módszerekkel

2.1. PACAP KO egerek tesztelése két héten át tartó CVMS depresszió modellben WT társaikkal összehasonlítva.

2.2. Triciklikus antidepresszáns imipraminnal kezelt csoportok összehasonlítása a vivóanyaggal kezelt kontroll csoportokkal, a CVMS okozta hatások visszafordíthatóságának értékelésére.

A modell validitásának megítélése viselkedés vizsgálati (FST), fizikai (test- és mellékvesetömeg változás mérése), endokrinológiai [kortikoszteron (CORT) titer mérése] és funkcionális-morfológiai módszerekkel történt. A stressz krónikus hatásának vizsgálatára a krónikus neuronális aktivációt jelző FosB festést alkalmaztuk az alábbi limbikus PACAP tartalmú területeken: CeA, MeA, BLA, BSTdm, BSTdl, BSTov, BSTv, a hippocampus CA1, CA3 régiói és a gyrus dentatus (DG), a dLS és a vLS. Mivel ezek a területek és a PACAP is befolyásolhatja a PVN parvo- és magnocellularis részének stresszre adott válaszát, a FosB kvantifikációt itt is elvégeztük. További célunk volt a FosB expresszió vizsgálata a szorongásos viselkedéssel összefüggő dPAG és a leszálló antinociceptív rendszerben részt vevő lPAG területén szintén jelentős PACAP-erg beidegzésük alapján, továbbá a DR és a EWcp területén is. Második lépésben szemikvantitatív kettős immunfluoreszcens jelölések segítségével vizsgáltuk a BSTov corticotropin-releasing factor (CRF), EWcp urocortin1 (Ucn1), illetve a DR-szerotonin (5-HT) tartalmú sejtjeinek működését és FosB aktivitását.

KÍSÉRLETI MODELLEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

1. Állatok

Az állatokat a Pécsi Tudományegyetem Anatómiai Intézet Állatházában standard műanyag ketrecben, 12 órás nappali-éjszakai ciklusban tartottuk, 24-25 °C fokon, *ad libitum* ellátva ivóvízzel és rágcsáló táppal.

• Akut stressz modell:

38 darab CD1 törzsbe tartozó, hím PACAP KO egeret vizsgáltunk, összehasonlítva ugyanennyi vad típusú (WT) egérrel.

• Krónikus stressz modell:

36 darab felnőtt hím PACAP KO egeret, és 33 vad típusú hím egeret választottunk ki. Az állatokat 12 csoportba osztottuk. Az állatok felénél 14 napon keresztül CVMS-t alkalmaztunk,

a másik felénél csak egy egyszeri 5 perces FST-et végeztünk 10 nappal a perfúzió előtt. Minden fő csoporton belül az állatok harmadát kezeletlenül hagytuk, harmadát intraperitoneálisan (i.p.) adott vivőanyaggal (fiziológiás sóoldat), harmadát pedig i.p. adott imipraminnal (naponta 15mg/testtömeg kg) kezeltük.

2. Viselkedés-vizsgálatok

Szorogási tesztek:

- *Open field* teszt
- Sötét-világos doboz (*light-dark box*) teszt
- Üveggolyó-elrejtési (*marble burying*) teszt

Depresszió teszt:

- *Forced swim* teszt

3. c-Fos immunhisztokémia az akut modellben

A *c-fos* gén fehérje terméke a c-Fos a sejtmagban halmozódik és általánosan elfogadott akut neuronális aktivációs markerként szolgál (Kovács 1998.). Ennek kvantitálása céljából az egereket 2 órával a FST után perfundáltuk. Az immunhisztokémiához c-Fos ellen nyúlban termeltetett poliklonális antiszérumot és biotinilált kecske anti-nyúl IgG-t használtunk.

4. Krónikus variábilis enyhe stressz paradigma

A CVMS modell (Willner 2005.) esetében két héten keresztül naponta különböző napközbeni és éjszakai stresszoroknak tettük ki az állatokat.

Napközbeni erősebb mértékű, de rövid ideig tartó stresszorok:

- Ferde ketrec stressz
- Laboratóriumi síkrázóra helyezés
- *Restraint* stressz

Éjszakai enyhébb mértékű, de hosszabb időtartamú stresszorok:

- Szociális izolációs stressz
- Nedves alom stressz
- *Group holding*

A stresszhez való adaptáció minimalizálásának érdekében a különböző stresszorokat random módon váltogattuk.

Az egerek testsúlyát az első és a hetedik napon a szokásos alomcsere alkalmával mértük. Az utolsó mérést a 15. napon végeztük az anesztéziát követően, a perfúzió előtt.

A stresszelt csoportok egyedeit a CVMS protokoll 14. napján 5 percen át tartó FST-nek vetettük alá. Hogy a FST akut hatásai ne befolyásolják a kontrolljainkat, a nem stresszelt csoportok tagjait 10 nappal a perfúzió előtt tettük ki az 5 percen át tartó FST-nek. A lehetséges krónikus hatásokat elkerülendő, az egereket egyszeri FST-nek vetettük alá, előtesztelés nélkül.

5. FosB immunhisztokémia a krónikus modellben

A krónikus neuronális aktiváció vizsgálatára FosB immunhisztokémiát alkalmaztunk. A festést nyúlban termeltetett anti-FosB antitestek oldatával majd biotinilált kecske anti-nyúl IgG-vel végeztük.

6. *Free-floating* CRF-FosB kettős immunfluoreszcens jelölés

Az ovBST területén elhelyezkedő CRF neuronok aktivitásának meghatározásához primer antitestként poliklonális nyúl anti-FosB és kecske anti-CRF antitesteket, szekunderként pedig Cy3 konjugált szamár anti-nyúl és biotinilált szamár anti-kecske antitesteket és Cy5 konjugált sztreptavidint használtunk.

7. *Free-floating* Ucn1-FosB kettős immunfluoreszcens jelölés

Az Ucn1 neuronok aktivitásának meghatározásához primer antitestként poliklonális nyúl anti-FosB és kecske anti-Ucn1 antitesteket, szekunderként pedig Alexa Fluor 488-konjugált szamár anti-kecske és Cy3 konjugált szamár anti-nyúl antitesteket használtunk.

8. *Free floating* 5-HT-FosB kettős immunfluoreszcens jelölés

A DR területéről származó minták esetében az alkalmazott protokoll megfelelt az Ucn1-FosB festésnél lertaknak, azzal a különbséggel, hogy primer antitestként monoklonális egér anti-5-HT antitestet használtunk anti Ucn1 helyett.

9. Mikroszkópia

Metszeteinkről digitális fotókat készítettünk *Nikon Microphot FXA* mikroszkóp és *Spot RT color* digitális kamera (Nikon, Tokyo, Japán) segítségével. Az immunfluoreszcens preparátumokat *Olympus FluoView 1000* konfokális mikroszkóp segítségével rögzítettük.

10. Kortikoszteron radioimmunoassay

A vérplazma glükokortikoid hormon tartalmát a hypothalamus-hypophysis-mellékvese (HPA) tengely aktivitásának meghatározása céljából mértük.

11. Statisztikai értékelés

Akut stressz modell:

A statisztikai analízist két utas variancia-analízissel (ANOVA; $\alpha=5\%$) végeztük. Az ANOVA teszt statisztikai értékelhetőségének kritériuma az adatok normál eloszlásának (Shapiro-Wilk teszt; Shapiro és Wilk 1965.) és a csoporton belüli variancia homogenitásának (Bartlett's Chi-négyzet teszt; Snedecor és Cochran 1989.) ellenőrzése volt. *Post hoc* analízis a Fisher-féle teszttel történt Statistica 8.0 program segítségével ($\alpha=5\%$). A viselkedési tesztek statisztikai kiértékeléséhez Student-féle kétmintás t-próbát alkalmaztunk ($\alpha=5\%$). Adatainkat minden esetben csoportátlagokként adtuk meg, feltüntetve a csoportátlagok standard hibáját (\pm *standard error of the mean*, SEM).

Krónikus stressz modell:

A bemutatott adatok a kísérleti csoportok átlagát és az átlag standard hibáját reprezentálják. Az adatok eloszlásának normalitását Shapiro–Wilk teszt (Shapiro és Wilk, 1965.), a variancia homogenitását pedig Bartlett-féle Chi-négyzet próbával (Snedecor és Cochran, 1989.) ellenőriztük. A két szigma intervallumon kívül eső adatokat kizártuk a statisztikából. Az 1. számú adatsort két utas varianciaanalízissel (ANOVA) vizsgáltuk. A 2. adatsort multifaktoriális varianciaanalízissel (MANOVA) teszteltük. Minden *post hoc* analízist a Fisher-féle teszttel végeztünk a Statistica 8.0 szoftver ($\alpha=5\%$) segítségével.

EREDMÉNYEK, MEGBESZÉLÉS

1. Szorongás és akut stressz-reakció vizsgálata PACAP génhiányos egerekben viselkedési és c-Fos immunhisztokémiai módszerekkel

Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a PACAP KO egerek viselkedése eltér a WT állatoktól: *open field* tesztben fokozott lokomotoros aktivitással rendelkeztek, FST-ben kifejezettebb depresszió-szerű viselkedést mutattak, *light-dark box* tesztben és *marble burying* tesztben pedig alacsonyabb szorongási szintet tanúsítottak, mint vad típusú társaik. A PACAP hiánya csökkentette a FST hatására bekövetkező neuronális aktivációt jelző c-Fos expressziót a tágabb értelemben vett amygdala magkomplex, a LS, a PVN, a EWcp és a DR területén. Mindez arra utal, hogy a PACAP az állat hangulatát befolyásoló hatását ezeken az agyterületeken fejti ki.

1.2. A stressz központok FST kiváltotta aktivációs mintázatának értékelése c-Fos segítségével

1.2.1. Általános szempontok

A vad típusú egerekben a FST minden vizsgált agyterületen jelentős c-Fos expresszió-emelkedést okozott. Ennek mértéke azonban függ a vizsgált agyterülettől: például a dLS területén közel négyszeres c-Fos expresszió emelkedést tapasztaltunk, míg a DR területén ez több mint 75-szörös volt. Eszerint az egyes stressz központok különböző mértékben érzékenyek a FST-re, összhangban az irodalmi adatokkal (Duncan és mtsai., 1993., Cullinan és mtsai., 1995., Kovács 1998.).

Kutatásunk legfontosabb eredménye, hogy a FST által kiváltott c-Fos aktiváció PACAP KO egerekben jelentős mértékben elmarad számos (BSTov, BSTdl, BSTv, vLS, EWcp, DR, dPAG, IPAG), de nem minden (CeA, MeA, BSTdm, dLS) vizsgált agyterületen. Ezek alapján feltételezzük, hogy a PACAP hiányában megfigyelt, nagymértékben csökkent szorongási szint hátterében a stressz-magok csökkent érzékenysége állhat.

Összehasonlítottuk a stressz-genotípus interakció hatásának nagyságát a c-Fos expresszióra. A legerősebb hatást a DR, a EWcp és a IPAG területén tapasztaltuk a vizsgált agyterületek közül. A leszálló antinociceptív rendszerekhez tartozik a IPAG (Heinricher és mtsai., 2009.), míg a megfigyelt viselkedésbeli eltérésekben a DR és az EWcp játszhatnak fontos szerepet. Mind a szerotoninerg neuronok a DR-ban, mind az Ucn1-et termelő perikarionok az EWcp területén hozzájárulnak a stresszel kapcsolatos hangulatzavarok, és a szorongás kialakulásához (Kozicz és mtsai., 2008., Savitz és mtsai., 2010., Lowry és mtsai., 2008.). A DR neuronok c-Fos expressziója szorongás-szerű viselkedést eredményez (Bouwknicht és mtsai., 2007.); továbbá az EWcp urokortinerg idegsejtjei interakcióba léphetnek a DR szerotoninerg neuronjaival (Kozicz 2010., Neufeld-Cohen és mtsai., 2010.). A DR, a EWcp és a IPAG is PACAP tartalmú rostok beidegzése alatt áll (Hannibal 2002.) és ezekben a magokban a PACAP receptorai is kifejeződnek (Vaudry és mtsai., 2009.), ezért ezeken a területeken adottak a PACAP hatásának neuroanatómiai alapjai.

Más magokban (mPVN, pPVN, BSTov, BSTdl, BSTv, BLA) a stressz-genotípus interakció hatása kevésbé volt markáns, mégis nagymértékben szignifikánsnak bizonyult. A FST által kiváltott c-Fos expresszió ezekben a magokban is jelentősen kisebb mértékű volt KO egerekben, ami felveti ezen agyterületek szerepét a megfigyelt viselkedésbeli eltérések kialakításában.

Megfigyelésünk szerint bizonyos magokban a stresszválasz csökkent, ami arra utal, hogy a PACAP-nak fontos szerepe lehet e magok stressz aktivációjában, és a stressz által kiváltott szorongás illetve hangulatzavarok kialakulásában. Ezzel összhangban Ressler és munkatársainak (2011.) eredményei szerint a PACAP gén és a PAC1 receptor génjének polimorfizmusai olyan szorongásos kórképekkel állhatnak kapcsolatban, mint a poszttraumás stressz szindróma.

1.2.2. Nucleus interstitialis striae terminalis

A BSTov és a BSTdl területén stresszt követően jelentősen kisebb mértékű c-Fos expresszió növekedést tapasztaltunk PACAP hiányban (rende: -63.83% és -40.10%).

1.2.3. Amygdala magkomplex

Meglepő, hogy a CeA és MeA területén a PACAP géntermék hiányának c-Fos expresszióra kifejtett hatását nem találtuk szignifikánsnak. Ezzel ellentétben a BLA területén szignifikáns interakciót találtunk a stressz és a genotípus között, valamint a c-Fos expresszió szignifikánsan (-27%) alacsonyabb volt.

1.2.4. Nucleus paraventricularis hypothalami

A FST és a genotípus interakciója erős hatást fejt ki a c-Fos expresszióra, ami FST-et követően jelentősen elmaradt a génhányos egerekben a vad típussal összehasonlítva.

1.2.5. Centralis projekciójú Edinger-Westphal mag

A PACAP hiány 43.46%-kal csökkenti a c-Fos expresszió mértékét az EWcp területén egérben.

1.2.6. Periaqueductalis szürkeállomány

A nem stresszelt génhányos és vad típusú állatok között egy alap c-Fos expresszió különbséget találtunk, mely különbség a FST stresszt követően eltűnik.

A IPAG területén erős stressz-genotípus interakciót tapasztaltunk, és a nem stresszelt állatoknál az alap neuronális aktivitásban is különbséget találtunk.

1.2.7. Nucleus raphe dorsalis

Az egyes agyterületeket összehasonlítva azt találtuk, hogy a c-Fos válasz csökkenésének mértékét illetően a legerősebb hatás a DR területén mutatkozott, ahol 78%-os sejtszám csökkenést tapasztaltunk.

1.3. Következtetések

Eredményeink alátámasztják a korábbi tanulmányokban megfigyelt markáns viselkedésbeli eltéréseket PACAP KO egereken szorongási és depresszió modellekben. Ez az első olyan tanulmány, amely bizonyítja, hogy a PVN és a MeA mellett számos stressz rendszer csökkent azonnali génexpresszióval reagál akut stresszre, és hogy a PACAP hiányának hatása agyterület-specifikus is egyben. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a PACAP hiánynak moduláló szerepe lehet a stressz (mal)adaptáció szabályozásában, mely megnövekedett depresszió-szerű viselkedéshez és csökkent szorongási szinthez vezet a peptid hiányában. Eredményeink alapján azonosítottunk néhány olyan agyterületet, melyeknek központi szerepe lehet a megfigyelt viselkedési eltérésekben.

2. PACAP génhiányos egerek vizsgálata krónikus variábilis enyhe stressz modellben viselkedési és funkcionális morfológiai módszerekkel

2.1. A modell validitása

A CVMS hatását az állatok csökkent testtömeg-gyarapodása támasztotta alá, mely egyéb CD1 egereken végzett kutatásokkal összhangban van (Bolej és mtsai., 2014., Rabasa és mtsai., 2015., Harris 2015.). A CVMS nem csökkentette a PACAP KO egerek testtömegét, mely Mustafa és mtsai. (2015.) eredményeivel egyezik meg. Az imipramin csökkentette a stressznek ki nem tett WT állatok testtömegét, mely jelenséget más laboratóriumok is kimutatták mind patkányban (Lewis és mtsai., 1983.), mind egérben (Zhao és mtsai., 2015.).

A CVMS modell validitását támasztja alá továbbá a WT egerek mellékvesetömegének CVMS paradigma hatására bekövetkező növekedése is (Bali és mtsai., 2015.). Ezzel ellentétben, a CVMS nem okozott említésre méltó mellékvesetömeg növekedést a PACAP KO egerekben. Ennek magyarázatául szolgálhat az az új megfigyelésünk, mely szerint a stressznek ki nem tett PACAP KO egerek mellékveséje nagyobb tömegű, mint a vad típusú kontrolloké. Az a megfigyelésünk, miszerint a CVMS nem okoz mellékvesetömeg növekedést PACAP KO állatokban, jól korrelál a HPA tengely csökkent aktivitásával, melyet CORT mérések támasztottak alá (jelen tanulmány, Storth és Eiden 2010., Tsukiyama és mtsai., 2011., Mustafa és mtsai., 2015.). A CVMS által kiváltott CORT emelkedés minden stresszelt WT csoportban megfigyelhető volt, mely további érv a modell validitása mellett. Az a megfigyelés, hogy az imipramin nem normalizálta a CORT értékeket a WT egereinknél, azzal az ismert ténnyel

magyarázható, hogy az imipramin hatásossága attól is függ, hogy milyen egértörzset vizsgálunk (Ibarguen-Vargas és mtsai., 2008.).

A viselkedési tesztek eredményeit illetően, tekintetbe véve a viszonylag kis elemszámból adódó technikai korlátokat is, megállapíthatjuk, hogy a modell hatékonyan növelte a FST-ben az immobilitási időt WT egerekben, mely a CVMS hatékonyságát támasztja alá. Kezeletlen PACAP KO egereink emelkedett immobilitási szinttel rendelkeztek, habár ez a különbség nem volt szignifikáns a korábbi kísérletek eredményeivel ellentétben (Hashimoto és mtsai., 2001., Gaszner és mtsai., 2012.). Fontos kiemelni, hogy a vivőanyaggal kezelt WT egerek immobilitási szintje viszonylag magas volt melyet az intraperitoneális injekciók által okozott stresszhatás magyarázhat.

A CVMS a PACAP KO állatok viselkedésében mélyreható viselkedési változásokat idézett elő FST-ben. Az eredmények arra utalnak, hogy az enyhe stressz paradox módon csökkent a depresszió-szerű viselkedést a CD1 alapon tenyésztett PACAP KO egereinknél, és az immobilitási idő az imipramin kezelt kontroll KO egerek szintjére csökkent a Lehmann és mtsai. (2013.) által leírtakkal összhangban.

Összefoglalva, a WT CD1 állatok a stresszhatás okozta klasszikus fizikai, endokrinológiai és viselkedési jeleket mutatják, mely a modell validitását támasztja alá. Meg kell állapítanunk, hogy eredményeink a kísérletben nem támasztják alá a CD1 törzsbe tartozó PACAP KO állatok depresszió-szerű fenotípusát. Mindazonáltal kétségtelen, hogy ezek az állatok csökkent válaszkészséget mutatnak a CVMS expozícióra. Folyamatban lévő kísérletünkben ezért további stressz faktorok hatásának vizsgálatával egészítjük ki a CVMS paradigmát, hogy egy megbízhatóbb depresszió modellt fejleszthessünk ki a PACAP génihiányos egerek felhasználásával (Gaszner és mtsai., 2013., 2014., Farkas és mtsai., 2016., 2017.).

2.2. A FosB neuronális aktivitás mintázata

A kísérletben azt találtuk, hogy az intraperitoneális vivőanyag illetve az imipramin injekció növelhette a bazális FosB expressziót egyes állatokban. Annak érdekében hogy az ezen csoportok közti összehasonlítást elkerüljük, eredményeinket két adatsorra bontva értékeltük.

A CVMS szignifikáns változást okozott a FosB expresszióban a kísérletünkben vizsgált 18 agyterület közül 11-ben (CeA, MeA, BSTdm, BSTov, DG, vLS, pPVN, mPVN, IPAG, EWcp, DR). Két további stresszérzékeny területet, a hippocampus CA1 áréáját és a BSTv-t, a stresszhatás × genotípus interakció befolyásolta a stressz főhatása nélkül. Ezek az eredmények további bizonyítékként szolgálnak a CVMS paradigma validitására, mivel a vizsgált stresszadaptációs központok több mint fele érintett volt a modellben.

Az imipramin hatása a FosB expresszióra négy agyterületre korlátozódott (CeA, MeA, vLS, pPVN). Ezen kívül a stressz és a kezelés interakciója a DR területén, valamint a kezelés × genotípus kölcsönhatás a BSTdm, BSTv, CA1, CA3 áréakban és a DG területén befolyásolta a FosB expressziót. A *post hoc* tesztek azt mutatták, hogy a CVMS FosB-re kifejtett hatását a kezelés csak a BSTdm, a hippocampus három régiójában és a DR területén fordította vissza. Az imipramin kezelés FosB kifejeződésre gyakorolt viszonylagos hatástalansága annak is betudható, hogy a PACAP KO egerekben a FosB expresszió növekedés majdnem teljes mértékben elmaradt, ezért a kezelés nem csökkenthette tovább a közel bazális szintű FosB sejtszámokat.

2.3. A PACAP hiánya agyterület és stresszorfüggő módon befolyásolja a FosB expressziót

Az ANOVA teszt kilenc *post hoc* összehasonlítást tett lehetővé a kezeletlen WT és KO egerek esetében CVMS-t követően. Ezek közül nyolc régióban a FosB válasz csökkent mértékű volt. A PACAP KO állatok stressz által kiváltott idegsejtaktivitás mintázatán végzett vizsgálataink arra utalnak, hogy a PACAP stresszor- és agyterület specifikus módon befolyásolja az idegsejtekben megfigyelhető választ mind CVMS-ben (Kormos és mtsai., 2016.) mind a FST-et követően (Gaszner és mtsai., 2012.). A PACAP szükséges a krónikus stresszben bekövetkező FosB válasz kifejlődéséhez a pPVN, CeA, BSTdm, BSTov, BSTv, CA1, vLS és DR területén. Mivel az utóbbi hét limbikus terület afferens összeköttetésben van a PVN-nel, illetve a periPVN régióval (Risold és Swanson 1997., Larsen és mtsai., 1996., Hammack és mtsai., 2010., Ulrich-Lai és Herman., 2009.), nem meglepő hogy a legnagyobb hatást a pPVN területén figyelhettük meg. Kétségtelen az is, hogy a PACAP nagymértékben befolyásolja a PVN reaktivitását (Grinevich és mtsai., 1997., Agarwal és mtsai., 2005., Norrholm és mtsai., 2005., Das és mtsai., 2007., Kageyama és Suda 2009.). A PACAP hiánya funkcionális változásokat okoz a HPA tengely működésében, és valamelyest ellentmondó viselkedési fenotípussal jár (Storth és Eiden., 2010., Tsukiyama és mtsai., 2011., Gaszner és mtsai., 2012., Lehmann és mtsai., 2013.).

2.4. A PACAP KO egerek CRF neuronjai a BSTov területén nem aktiválódnak CVMS hatására

Korábbi munkánk eredményei alapján azt feltételeztük, hogy a CVMS befolyásolhatja a BSTov-CRF neuronok aktivitását. A CVMS megnövelte a FosB aktivitást a CRF neuronokban a WT egerekben, ezzel szemben ezt a PACAP KO állatokban nem figyelhettük meg. A teljes FosB és a CRF-FosB sejtek számának összehasonlítása során arra a következtetésre jutottunk,

hogy a FosB immunreaktivitás emelkedése a CRF neuronokra specifikus jelenség az BSTov területén. A CRF sejtek számának értékelése alátámasztja azt, hogy a PACAP hiány befolyásolja az BSTov-CRF neuronokat. Azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a PACAP KO egerekben megfigyelt csökkent BSTov-CRF aktivitás hozzájárulhat a viselkedési fenotípusban megnyilvánuló változásokhoz.

2.5. A PACAP hiány CVMS-ben befolyásolja az urokortinerg EWcp működését

Sikerült bizonyítanunk feltételezésünket, miszerint a PACAP hiány CVMS során KO egerekben befolyásolja az Ucn1 neuronokat: a PACAP KO egerek Ucn1 neuronjai nem mutattak FosB expresszió emelkedést CMVS hatására, mely korábbi eredményeinkkel összhangban van, ahol a EWcp c-Fos expresszióját tanulmányoztuk (Gaszner és mtsai., 2012.). Továbbá az Ucn1 immunjel denzitása csökkent a WT egereinknél CVMS expozíciót követően, mely egybevág a korábbi tanulmányokban (Korosi és mtsai., 2005., Kozicz és mtsai., 2008.) taglaltakkal. Mindezek alapján arra következtetünk, hogy a PACAP szabályozhatja a EWcp Ucn1 neuronjait, melynek révén a stresszadaptációra többféle módon is kifejtheti hatását.

2.6. A PACAP génhíányos egerekben magasabb a DR idegsejtjeinek szerotonin tartalma

Az egyik fő eredménye kutatásunknak az, hogy a PACAP KO egerekben mind a 5-HT sejtek száma, mind azok szerotonin tartalma emelkedett volt a DR területén, továbbá egy erős, harmadrendű interakciót találtunk a CVMS, a genotípus és a kezelés között, mely arra utal hogy a DR 5-HT neuronjait ez a modell befolyásolja. Hashimoto és munkatársai (2001.) ezzel egybehangzóan azt figyelték meg, hogy a PACAP KO egerekben csökkent az agy 5-hidroxi-indolecetsav tartalma. Ennek alapján arra következtethetünk, hogy a szerotoninerg rendszert a PACAP hiány befolyásolja, habár Hannibal (2002.) csak gyenge PACAP tartalmú rostsűrűséget figyelt meg a patkány DR területén. Erre magyarázatot szolgáltathat az urokortin1 (Kozicz 2010, Gaszner és mtsai., 2012.) és a CRF. Ezt alátámasztja az is, hogy Waselus és munkatársai (2009.) mindkét CRF receptort kimutatták a DR sejtjein, melyek megjelenését a stressz eltérően befolyásolja. Mindezek alapján arra következtetünk, hogy az EWcp-Ucn1 és BST-CRF rendszer közvetítheti a PACAP hiány hatását a DR felé. Tekintettel arra, hogy mind a EWcp (Kozicz 2010.) mind a BST közvetlen kapcsolatban áll a DR-szal (Peyron és mtsai., 1998.), meghatározhatják a DR-5-HT neuronok aktivitását, melyek pedig a HPA tengelyre (Jørgensen 2007.) és a viselkedésre (Neufeld-Cohen és mtsai., 2010., Kozicz 2010.) vannak hatással.

2.7. Következtetések

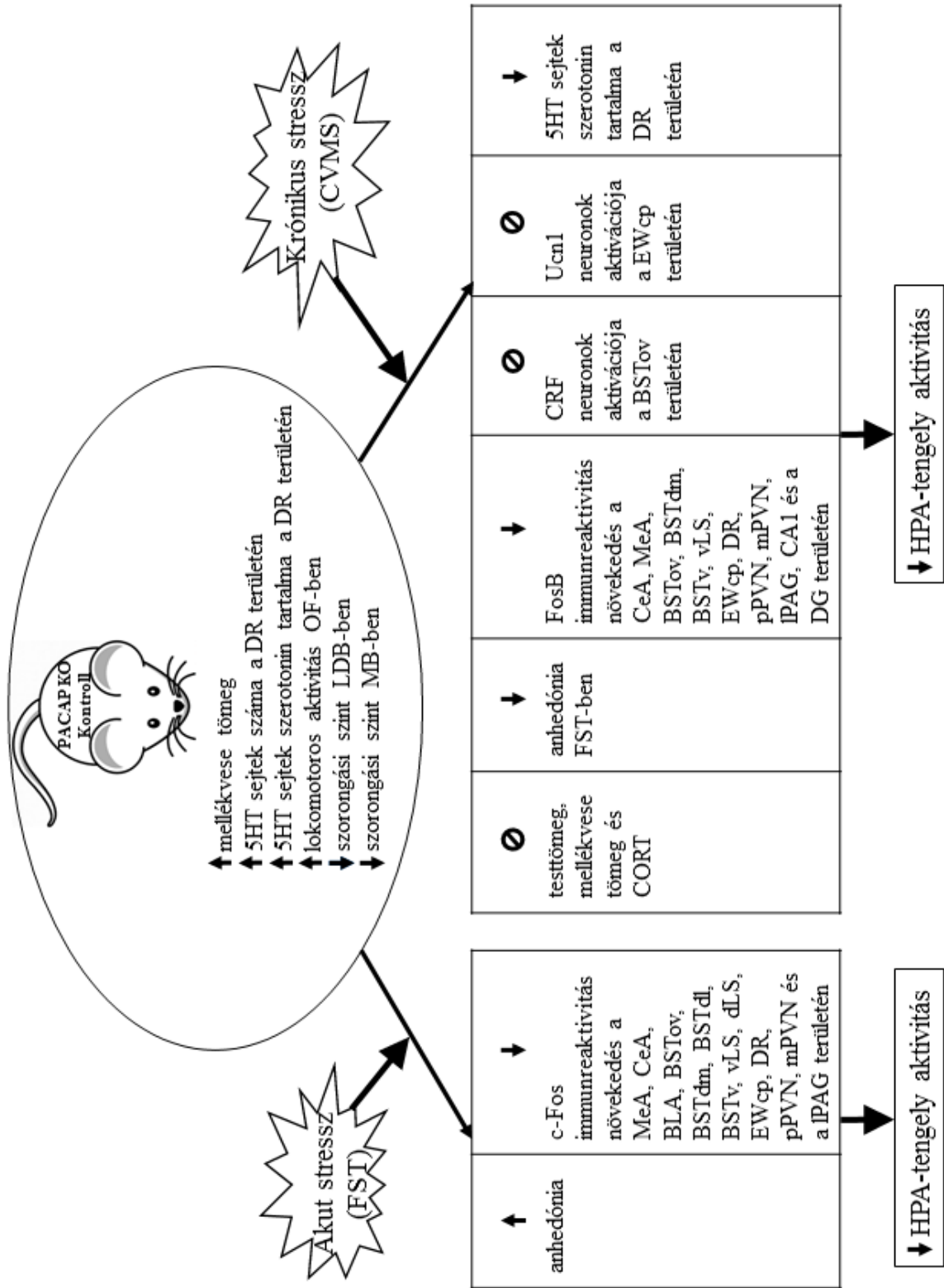
A CVMS alkalmas modell a depresszió tanulmányozására CD1 egértörzsben. A PACAP hiány egérben a HPA csökkent aktivitásával és a pPVN idegsejtjeinek markáns aktivitáscsökkenésével jár együtt. A CVMS által kiváltott FosB aktivitásának csökkent volta azokon a limbikus területeken, melyek a PVN vagy a periPVN területtel összeköttetésben állnak [vLS (Risold és Swanson 1997.), DR (Larsen és mtsai., 1996.) a CeA, a MeA, az BSTov, és a BSTdm (Ulrich-Lai és Herman 2009., Hammack és mtsai., 2010.)] hozzájárulhatnak a HPA tengely csökkent érzékenységéhez. Arra következtethetünk tehát, hogy a PACAP a magasabb rendű központok stresszadaptációja szempontjából is nélkülözhetetlen.

Azok az eredményeink, hogy a a) BSTov CRF- és az b) EWcp Ucn1 neuronjai nem reagálnak a CVMS-re PACAP KO egerekben, továbbá, hogy ezen egértörzsben c) a kontroll állatokban magasabb bazális szerotonin tartalom a DR területén CVMS hatására csökkent, hozzájárulhatnak a HPA tengely csökkent aktivitásához és a depresszió-szerű viselkedési mintázathoz. Eredményeink egyik limitációja, hogy ebben a kísérletben a CD1 alapon tenyésztett PACAP KO egerek fenotípusa nem volt egyértelműen depresszióra utaló, illetve az imipramin kezelés nem fordította vissza a stressz fizikai és endokrinológiai hatásait.

További kutatásaink során egyéb stresszorokkal egészítjük ki a CVMS-t annak érdekében, hogy megbízható depresszió modellt fejlesszünk, melyet szelektív szerotonin visszavétel gátló kezelés segítségével is validálni szeretnénk (Gaszner és mtsai., 2013., 2014., Farkas és mtsai., 2016.).

ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Elsőként bizonyítottuk, hogy a PVN és a MeA mellett számos stressz rendszer csökkent azonnali gén expresszióval reagál PACAP hiányban **akut stresszre**, és hogy a PACAP hiányának hatása agyterület specifikus is egyben. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a PACAP hiánynak moduláló szerepe lehet a stressz (mal)adaptáció szabályozásában, mely megnövekedett depresszió és csökkent szorongási szinthez vezet. Azonosítottunk néhány olyan agyterületet, melyeknek központi szerepe lehet a megfigyelt viselkedési eltérésekben.
2. Ez az első tanulmány, mely a PACAP KO egereket a **CVMS** modellben vizsgálja antidepresszáns kezelésben részesített csoportok bevonásával, a PACAP stresszadaptációban betöltött szerepének tisztázására. A PACAP hiány e modellben a HPA tengely csökkent aktivitásával és a pPVN idegsejtjeinek markáns aktivitás-csökkenésével jár együtt.
3. A CVMS által kiváltott FosB aktivitás csökkent volta a vLS, DR, a CeA, MeA, BSTov, és a BSTdm területén hozzájárulhatnak a HPA tengely csökkent érzékenységéhez, amelyből arra következtethetünk, hogy a PACAP jelenléte a magasabb rendű központok stresszadaptációja szempontjából is nélkülözhetetlen.
4. Elsőként közöltük, hogy a) a BSTov CRF- és b) az EWcp Ucn1 neuronjai nem reagálnak a CVMS-re PACAP KO egerekben, továbbá ezen egértörzsben c) magasabb a DR bazális szerotonin tartalma. Ezek az anomáliák hozzájárulhatnak a HPA tengely csökkent aktivitásához és a depresszió-szerű viselkedési mintázathoz.



1. ábra: Legfontosabb eredményeink összefoglalása. A felső panel a nem stresszelt (kontroll) PACAP KO állatokban megfigyelt eltéréseket mutatja a stressznek ki nem tett (kontroll) PACAP vad típusú egerekkel összehasonlítva. A bal alsó táblázat az akut, a jobb alsó a krónikus stressz hatására bekövetkező változásokat reprezentálja ugyanezen egértörzsnél. (Kontroll PACAP KO: nem stresszelt PACAP hiányos állat, 5HT: szerotonin, DR: nucleus raphe dorsalis, OF: *open field* teszt, LDB: *light dark box* teszt, MB: *marble burying* teszt, FST: *forced swim* teszt, CVMS: krónikus variábilis enyhe stressz, MeA: nucleus medialis amygdalae, CeA: nucleus centralis amygdalae, BLA: nucleus basolateralis amygdalae, BSTov: nucleus interstitialis striae terminalis ovalis almagja, BSTdm: nucleus interstitialis striae terminalis dorsomedialis almagja, BSTdl: nucleus interstitialis striae terminalis dorsolateralis almagja, BSTv: nucleus interstitialis striae terminalis ventralis almagja, vLS: nucleus septi lateralis ventralis része, dLS: nucleus septi lateralis dorsalis része, EWcp: centralis projekciójú Edinger-Westphal mag, pPVN: nucleus paraventricularis hypothalami parvocellularis része, mPVN: nucleus paraventricularis hypothalami magnocellularis része, IPAG: periaqueductalis szürkeállomány lateralis része, CORT: kortikoszteron, CA1: cornu Ammonis 1. számú régiója, DG: gyrus dentatus, CRF: *corticotropin releasing factor*, Ucn1: urokortin 1, HPA-tengely: hipotalamusz-hipofízis-mellékvese-tengely)

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Kormos V*, Gaszner B*, Kozicz T, Hashimoto H, Reglódi D, Helyes Z.

The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger-Westphal nucleus, ventral lateral septum, and dorsal raphe nucleus.

NEUROSCIENCE (2012) 202:283-299.

Impakt faktor: 3.122, Független citáció: 33

* Megosztott elsőszerzős közlemény

Kormos V, Gáspár L, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, Balogh A, Hashimoto H, Reglódi D, Helyes Z, Gaszner B.

Reduced response to chronic mild stress in PACAP mutant mice is associated with blunted FosB expression in limbic forebrain and brainstem centers.

NEUROSCIENCE (2016) 330:335-358.

Impakt faktor: 3.277, Független citáció: 2

Kormos V, Gaszner B.

Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. Review

NEUROPEPTIDES (2013) 47:401-419.

Impakt faktor: 2.546, Független citáció: 116

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 8.945

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények összes független citációja: 151

EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

Sándor K, **Kormos V**, Botz B, Imreh A, Bölcskei K, Gaszner B, Markovics A, Szolcsányi J, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Reglődi D, Helyes Z.

Impaired nocifensive behaviours and mechanical hyperalgesia, but enhanced thermal allodynia in pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide deficient mice.
NEUROPEPTIDES (2010) 44:363-371.

Impakt faktor: 1.917, Független citáció: 15

Markovics A, **Kormos V**, Gaszner B, Lashgarara A, Szőke E, Sándor K, Szabadfi K, Tuka B, Tajti J, Szolcsányi J, Pintér E, Hashimoto H, Kun J, Reglődi D, Helyes Z.

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays a key role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice.

NEUROBIOLOGY OF DISEASE (2012) 45:633-644.

Impakt faktor: 5.624, Független citáció: 49

Scheich B, Gaszner B, **Kormos V**, László K, Adori Cs, Borbély É, Hajna Zs, Tékus V, Bölcskei K, Ábrahám I, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs.

Somatostatin receptor subtype 4 activation is involved in anxiety and depression-like behavior in mouse models.

NEUROPHARMACOLOGY (2016) 101:204-215.

Impakt faktor: 5.012, Független citáció: 3

Farkas S, Bölcskei K, Markovics A, Varga A, Kis-Varga Á, **Kormos V**, Gaszner B, Horváth C, Tuka B, Tajti J, Helyes Z.

Utility of different outcome measures for the nitroglycerin model of migraine in mice.

JOURNAL OF PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL METHODS (2016) 77:33-44.

Impakt faktor: 2.238, Független citáció: 5

Borbély É, Hajna Z, Nabi L, Scheich B, Tékus V, László K, Ollmann T, **Kormos V**, Gaszner B, Karádi Z, Lénárd L, Paige CJ, Quinn JP, Szolcsányi J, Pintér E, Keeble J, Berger A, Helyes Z.

Hemokinin-1 mediates anxiolytic and anti-depressant-like actions in mice.

BRAIN, BEHAVIOR, AND IMMUNITY (2017) 59:219-232.

Impakt faktor (2016.): 5.964, Független citáció: 1

Farkas J, Kovács LÁ, Gáspár L, Nafz A, Gaszner T, Újvári B, **Kormos V**, Csernus V, Hashimoto H, Reglődi D, Gaszner B.

Construct an face validity of a new model for the three-hit theory of depression using PACAP mutant mice on CDI background.

NEUROSCIENCE (2017) 354:11-29.

Impakt faktor (2016.): 3.277, Független citáció: 0

Az egyéb publikációk összesített impakt faktora: 24.034

Az egyéb publikációk összesített független citációinak száma: 73

A citációs adatok a *Google Scholar* adatbázisból származnak (2017. 09. 17.)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani elsősorban témavezetőmnek, Prof. Dr. Helyes Zsuzsannának, a TDK munkám megkezdése óta nyújtott oktatómunkájáért, vezetéséért, kutatói példamutatásáért, tanácsaiért, segítségéért, továbbá lendületes, vidám, közvetlen magatartásáért.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Pintér Erikának, a Doktori Iskola vezetőjének és intézetvezetőnknek támogatásáért.

Külön köszönöm Dr. Gaszner Baláznak a szövettani feldolgozás és az immunhisztokémia módszerének elsajátításában nyújtott oktatómunkáját, statisztikai analízisben, illetve az ábraanyag szerkesztésében nyújtott időt és fáradságot nem kímélő segítségét, a lelkesítő támogatást, a példa értékű kutatói szemléletét, szorgalmát, precizitását, kritikusságát, mellyel bevezetett a kutatás világába.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Reglödi Dórának, a PACAP KO egerekhez való hozzáférés biztosításáért, Orbán Izabellának és Dittrich Erzsébetnek asszisztensi munkájáért és baráti támogatásáért, továbbá Prof. Dr. Kozicz Tamásnak szakmai tanácsaiért.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet és az Anatómiai Intézet minden dolgozójának, akik hozzájárultak munkámhoz: Dr. Sándor Katának, Dr. Gáspár Lászlónak, Dr. Farkas Józsefnek, Dr. Kovács László Ákosnak, Dr. Gaszner Tamásnak, Prof. Dr. Csernus Valérnak, Godáné Brumán Beatrixnak, és Hilyovszky Klárának.

Hálás köszönettel tartozom Családomnak, különösen Férjemnek és Gyermekeimnek, továbbá Szüleimnek és Férjem Szüleinek szeretetükért, támogatásukért, türelmükért és segítségükért.

A PhD dolgozatban összefoglalt kutatási tevékenység anyagi támogatásáért köszönet illeti a támogatókat: PEPSYS GINOP-2.3.2-15-2016-00050 - Stratégiai K+F műhelyek kiválósága: A peptiderg szignalizáció komplexitása és szerepe szisztémás betegségekben; EFOP-3.6.2 A neuroinflammáció vizsgálata a neurodegeneratív folyamatokban: a molekulától a betegágyig - "Neuroinflammációs mechanizmusok feltérképezése krónikus fájdalomban szerepet játszó centrális szenzitizációban".