

A depresszió három találat elméletén alapuló állatmodell prediktív validitásának vizsgálata az epigenom változásainak tükrében

Doktori (PhD) tézis

Dr. Gaszner Tamás

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola (D95)

Neuroendokrinológia és neurohisztológia program (B-134/1993)

Programvezető: Prof. Dr. Reglődi Dóra

Témavezető: Dr. Gaszner Balázs

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Anatómiai Intézet



Pécs, 2022

Bevezetés

A depresszió és modellezése az alap kutatásban

A hangulatzavarok előfordulási gyakorisága meredeken emelkedik. Leggyakoribb formája, a májor depresszió önmagában több mint 280 millió embert érint világszerte a WHO adatai alapján. A betegségnek a pszichésen kívül kognitív, vegetatív és a szomatikus aspektusai is vannak. A diagnózist pedig a szerteágazó és nagyon széles spektrumon mozgó, időben is fluktuáló súlyosságú tünetek nehezítik. A depresszió hosszútávú, akár évekig-évtizedekig tartó lefolyása miatt az egészségügyi rendszer mellett a társadalmat és a gazdaságot is jelentősen megterheli, míg a betegség korai kezdete a produktív életevek nagymértékű csökkenését és az iskolázottsági arány visszaesését eredményezi. A kórkép fontosságát még jobban kiemeli, hogy az öngyilkossági kísérletek és a befejezett öngyilkosságok száma szoros összefüggést mutat a hangulatzavarok prevalenciájával. Annak ellenére, hogy az elmúlt évtizedekben széleskörű és mélyreható kutatások folytak az etiológia és a pathomechanizmus feltárására, annak rendkívüli összetettsége miatt még mindig csak néhány töredékét ismerjük ennek a hatalmas „kirakós”.

A gyógyszerfejlesztés és a betegség hátterének megismerése már az alap kutatás szintjén is nehézségekbe ütközik. Ennek egyik fő oka, hogy a mai napig nincs általánosan elfogadott állatmodellje a betegségnek, melyre égető szükség lenne annak érdekében, hogy a háttérben rejlő folyamatokat alaposabban meg lehessen vizsgálni. Hogy egy újonnan kialakított állatmodell megbízhatóságát meg tudjuk ítélni, a modell működését alaposan tesztelni kell. Nincs ez másképp a hangulatzavarok kutatásánál sem és az itt használatos állatmodelleket három klasszikus validitási kritérium szerint kell értékelni, melyek alapelveinek leírását Willnernek köszönhetjük. Az első a konstrukciós validitás, ami azt jelenti, hogy a modellnek a betegség ismert rizikófaktoraira, kiváltó tényezőire kell épülnie, míg a második, a fenomenológiai validitási kritérium szerint ezen kiváltó tényezők hatására az állatnak az emberi betegség során megfigyelt tüneteket kell mutatnia. A harmadik, és talán ez a legnehezebben teljesíthető kritérium, a modell prediktív validitását érinti. Eszerint, a betegség kezelésére emberben már sikerrel használt terápiás eljárásoknak, gyógyszereknek, hatásosnak kell lenniük abban a tekintetben, hogy a betegségre jellemző tüneteket mutató kísérleti állatokban a terápia javulást idézzen elő. Ez alapján a modell használható arra,

hogy a jövőbeli kezelések hatékonyságát teszteljük rajta. Ezért hívják prediktív kritériumnak ezt, hiszen az ilyen modell képes „megjósolni” a leendő kezelés hatékonyságát emberen.

Manapság a hangulatzavarok farmakoterápiájában használt szereket, köztük a leggyakrabban alkalmazott szelektív szerotonin visszavétel gátlókat (SSRI) is, az ún. monoamin-teória alapján létrehozott állatmodelleken kísérletezték ki. Ennek lényege, hogy a betegséget a monoamin rendszerek (szerotonin, noradrenalin, dopamin) funkciózavarára okozza. Régóta ismert tény azonban, hogy ezen farmakoterápiák hatékonysága a betegek majd harmadában elégtelen. Ez jól mutatja, hogy a monoamin rendszerek funkciózavarán túl másnak is állnia kell a betegség hátterében. A ma elfogadott nézet szerint a betegséget örökletes és/vagy környezeti tényezők alakítják ki. Ezt a nézetet alkalmazza és terjeszti ki a három találat elmélet, melyre a mi modellünk épül.

A három találat elmélet

A három találat elmélet alapján a depresszió kialakulásáért genetikai, epigenetikai és környezeti tényezők együttes jelenléte felel. A hangulatzavarok hátterében számos potenciális genetikai rendellenességet azonosítottak már, ezek többsége a monoaminokkal kapcsolatos, pl. azok szintézisét vagy receptorait érinti, de van irodalmi evidencia többek között a depresszió és a skizofrénia, illetve a hangulatzavarok és a poszttraumás stressz betegség (PTSD) közös genetikai hátterére vonatkozóan is. Ezeken felül, egyre több állatkísérletes és humán bizonyíték támasztja alá a hypophysis adenilát cikláz-aktiváló polypeptid (PACAP) érintettségét depresszióban. Ismert, hogy PACAP génkiütött egerek viselkedési tesztekben depresszió-szerű viselkedést mutatnak, emellett heterozygóta (HZ) állatokról leírták, hogy agyukban a PACAP mennyisége csökkent. A HZ állatok használata, a génkiütött egerekkel kapcsolatos technikai nehézségek (alacsonyabb születési-, és magasabb elhullási arány) mellett transzlációs szempontból is indokolható, hiszen jelen tudásunk szerint emberben csak a PACAP gén polimorfizmusait írták le a depresszióval kapcsolatban, de a teljes funkcióvesztő mutációja emberben nem ismert. A genetikai mellett epigenetikai hatások is bizonyítottan hozzájárulnak a hangulatzavarok kialakulásához. Az olyan epigenetikai (tehát magát a DNS-kódot nem érintő, de génexpresszió szabályzásában résztvevő) változások, mint a hiszton fehérjék acetilációja, vagy metilációja, illetve a DNS szál metilációja szabályozhatják bizonyos stresszadaptációban fontos gének átírását. Az epigenetikai mintázat az

ún. vulnerábilis fázisok során épül fel, illetve alakul át leginkább. A legismertebb és legkézenfekvőbb ilyen a perinatális, azon belül is a postnatális időszak. Az ekkor elszenvedett negatív életeseményekről ismert, hogy hátrányosan befolyásolják a stressz-adaptációs készséget és predisponálnak hangulatzavarok kialakulására. A korai negatív életesemények állatkísérletes modellje az anyai megvonás. A születést követő anyai megvonásról ismert, hogy rágszálómodellekben depresszió-szerű viselkedést vált ki az állatokból. A környezeti stressz hangulatzavarok pathogenezisében betöltött szerepe régóta ismert. Az embert a hétköznapi életben érő stresszorok széles körben használt állatkísérletes megfelelője a krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS). A fentiek alapján PACAP heterozygóta egereket (első, genetikai találat) születés után anyai megvonásban (második, epigenetikai találat) és későbbi életükben CVMS-ben (harmadik, környezeti találat) részesítve a három találat elméletnek megfelelő modellt kapunk.

A stresszadaptációban szerepet játszó főbb agyterületek

A hangulatszabályzás szempontjából fontos magasabb rendű limbikus területek, úgy mint a prefrontális kéreg (PFC), illetve a hippocampus szerepe a depresszió patogenezisében bizonyított. A PFC-nek, mint kognitív, döntési és érzelmi központnak a szerepét nem csak állatkísérletek, de számos humán vizsgálat (funkcionális mágneses rezonancia-, és mély agyi stimulációs vizsgálatok, valamint PFC-sérültek esetleírásai) is bizonyítja a betegséggel kapcsolatban. A PFC-ről ismert továbbá, hogy a hangulatszabályozás más fontos területeihez is küld efferens rostokat, mint például a ventrális tegmentális áréához (VTA), az amygdalához és a hippocampushoz. Ez utóbbi talán a depresszió kapcsán a legtöbbet vizsgált agyterület. Ismert, hogy a stressz befolyásolja a hippocampális neuronok szinaptikus plaszticitását, brain-delivered neurotrophic factor (BDNF)-termelését (neuronok szinaptikus éréseért felelős fehérje) és aktivitását, így járulva hozzá a hangulatzavarok kialakulásához. Neuronális kapcsolataik rendkívül összetettek, a legfontosabb, hogy a PFC és a tágabb értelemben vett amygdala beidegzése mellett a hypothalamus-hypophysis-mellékvese (HPA)-tengely (a stresszreakció endokrin irányítója) közvetlen szabályozásában is részt vesz. A már többször említett amygdala, ennek főleg a centrális almagja (CeA), illetve a tágabb értelemben ehhez tartozó nucleus interstitialis striae terminalis ovális szubdivíziója (ovBNST) a CRH rendszer kiemelkedő központjai. Amellett, hogy e területek CRH neuronjai szabályozzák a HPA-tengely stresszválaszát, mindkettőről ismert, hogy PACAP-ot is

expresszálnak. Az agytörzsi monoamin-rendszerekhez tartozó központok szerepe szintén ismert a hangulatzavarokkal kapcsolatban. A mesencephalikus dopaminerg VTA, a mesocorticolimbikus pálya központjaként a jutalmazási rendszer egyik kulcseleme. A dopamintermelés sebességmeghatározó lépése a tirozin-hidroxiláz enzim (TH) működése, melynek vizsgálata régóta alkalmazott eszköz a VTA aktivitásának vizsgálatára. A periaqueductális szürkeállomány és azon belül is a centrális projekciójú Edinger-Westphal (cpEW) mag, illetve ennek urocortin1 (UCN1) tartalmú neuronjai szintén fontos szerepet játszanak a depresszió pathomechanizmusában. Ezt számos különböző állatfajon végzett kísérlet, illetve öngyilkosságok áldozatainak cpEW mintáinak vizsgálata is alátámasztja. Nem mellékesen, e sejtekről is ismert, hogy PACAP-ot expresszálnak. A raphe magok, ezek közül is a nucleus raphe dorsalis (DR) a szerotoninerg (5-HT) rendszer központjai, melyek kapcsolatban állnak az extrahypothalamikus CRH-rendszerekkel és a cpEW-vel is, a szerotoninerg jelátvitel pedig szintén bizonyítottan kruciális fontosságú a hangulat szabályozásában és így a hangulatzavarok pathomechanizmusában is.

Célkitűzés és hipotézis

A három találat elmélet alapján létrehozott állatmodellünk Willner-féle konstrukciós és a fenotípusos validitását kutatócsoportunk korábban bizonyította. Jelen kísérletünk célja a modell prediktív validitásának vizsgálata volt. Hipotézisünk szerint, a három találatnak kitett állatok esetén a hangulatzavarok farmakoterápiájában leggyakrabban használt SSRI típusú antidepresszánnal, a fluoxetinnel történt kezelés visszafordítja a depresszió-szerű viselkedést, bizonyítva modellünk prediktív validitását. Ennek igazolására állatainkat viselkedési teszteknek vetettük alá, fizikai és endokrinológiai paramétereit mértük, valamint a fent leírt, a hangulatzavarok pathomechanizmusában bizonyítottan fontos központok, a PFC, a hippocampus, a tágabb értelemben vett amygdala, a VTA, a cpEW és a DR funkcionális-morfológiai vizsgálatait is elvégeztük. Azt feltételeztük, hogy a találatok, mint kockázati tényezők kölcsönhatásba lépnek egymással és a fluoxetin kezeléssel, amit a megváltozott CRH, TH, UCN1 és 5-HT immunreaktivitás, valamint a H3 hiszton acetilációjának, és a FOSB neuronális aktivitási mintázatának változása is tükröz.

Módszerek

Kísérleti állatok és kísérleti elrendezés

Saját tenyésztésű PACAP HZ CD1 egereink pároztatásából származó 17 alomnyi egér hím példányaival dolgoztunk a kísérletben. Az almok felét a születés utáni első két hétben három órás anyai megvonásnak tettünk ki (MD180), tehát napi három órára anyjuktól elválasztva melegítőlapra helyeztük az állatokat, míg az egerek másik felét normál állatházi körülmények között tartottuk mindvégig (AFR). A születés utáni 70. napon farokminták segítségével megtörtént az állatok genotípezálása. Ezután a PACAP HZ egerekkel dolgoztunk tovább. Az állatok négy hónapos korában két héten keresztül mind az MD180, mind az AFR főcsoportok állatainak felét CVMS-nek tettük ki úgy, hogy mind a nappali (ferde ketrecállás, rázóasztal, sötét szoba) mind pedig az éjszakai (nedves alom, szociális izoláció, csoportban tartás) stresszorokat variáltuk. A főcsoportok állatainak másik fele kontroll csoportként szolgált. Az így létrejött négy csoportot (AFR-CVMS és AFR-kontroll, illetve MD180-CVMS és MD180-kontroll) tovább bontottuk kezelés szempontjából. Az állatok fele intraperitoneális fluoxetin injekcióban részesült naponta, a másik fele vivőanyagot kapott. Így összességében nyolc csoporttal dolgoztunk, csoportonként 4-6 állattal. Az *in vivo* kísérleteket a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal engedélyezte (engedélyszám: BAI/35/51-122/2016).

Viselkedési tesztek

Kísérleti állatainkat a stresszperiódus után viselkedési teszteknek vetettük alá. A szorongási szint megítélésre marble burying tesztet (MBT) és light-dark box tesztet (LDT) végeztük. Az MBT esetében az alomra helyezett 24 üveggolyó közül a több elrejtett jelez magasabb szorongási szintet. Míg az LDT esetében a doboz sötét és világos, de egymás közt átjárható részei közül a világos kompartmentben töltött kevesebb idő utal magasabb szorongási szintre. A depresszió-szint meghatározására tail suspension tesztet (TST) és forced swim tesztet (FST) végeztünk. Mindkét teszt lényege, hogy az állat mozgásában nem gátolt, de szabadulni nem tud az adott helyzetből, viszont próbálkozik ezzel. Annak az egérnek magasabb a depresszió szintje, amelyik kevesebb időt tölt szabadulási kísérlettel, tehát magasabb az immobilitási ideje.

Perfúzió és minta előkészítés

A kísérlet 140. napján állatainkat uretán segítségével túlaltattuk, mellkasukat felnyitottuk. A bal kamra megnyitása után vérmintát vettünk az állatok corticosteron (CORT) szintjének meghatározására, majd kanült vezetünk az aortába, amibe előbb sóoldatot juttattunk az erek átmosása céljából, majd pedig 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk az állatokat. Mellékveséiket és thymusukat eltávolítottuk, ezek tömegét megmértük. Az agyakat eltávolításuk után posztfixáltuk és vibratóm segítségével koronális síkú metszeteket készítettük. Négy sorozat 30 μm vastag metszetet antifreeze oldatban -20°C -on tároltunk a festésig.

Szövettani vizsgálatok

A CeA, az ovBNST, a VTA, a cpEW és a DR területén free-floating kettős immunjelöléseket végeztünk, ahol a második jelölés mindig a FOSB-t célozta. Így az alábbi kettős festések történtek: CRH-FOSB kettős jelölés a CeA és az ovBNST területén, TH-FOSB a VTA-ban, UCN1-FOSB a cpEW-ben és 5-HT-FOSB a festés a DR-ban. Az immunfluoreszcencia vizsgálatát és digitalizálását Olympus Fluoview 1000 konfokális mikroszkóp segítségével végeztük. A szövettani fotókon sejtszámolást és denzitometriát végeztünk a CRH, TH, UCN1, 5-HT jelölt sejtek esetében és FOSB-vel való kolokalizációjukat is vizsgáltuk. A PFC, illetve a hippocampus három régiójában, a cornu ammonis 1 (CA1), CA3 és a gyrus dentatus (DG) területén FOSB immunjelölést végeztünk diamino-benzidin (DAB) kromogénnel, ezen felül az összes fenti régióban acetil-lizin H3 hiszton (H3K9ac) jelölést végeztünk szintén DAB segítségével. A DAB-jelölt H3K9ac és FOSB immunhisztofestés preparátumait Nikon Microphot FXA mikroszkóppal értékeltük és digitalizáltuk Spot RT kamera segítségével, melyet szintén sejtszámolás követett.

Statisztika

A statisztikai elemzést Statistica szoftverrel végeztük. A két szigma tartományon túli adatokat kizártuk az értékelésből. Az adatok normalitását Shapiro-Wilk teszttel, míg a variancia homogenitását Bartlett Chi-négyzet próbával vizsgáltuk. Az adatokat többutas varianciaanalízisnek (MANOVA) vetettük alá, amelyet Tukey *post hoc* tesztek követtek ($\alpha < 5\%$). Az adatsorok mélyebb kapcsolatának feltárása érdekében Spearman-féle korrelációs tesztet is végeztünk.

Eredmények és diszkusszió

A fizikai és endokrinológiai paraméterek

A CVMS hatékonyságát alátámasztotta a testtömeggyarapodás mértékének csökkenése a stressz-expozíció második hetében. Az anyai megvonás is a testtömeg-gyarapodás csökkenésével járt együtt, ami azt mutatja, hogy a modellben sikerült az epigenetikai mintázatba beavatkozni az élet korai szakaszára jellemző vulnerábilis fázisban. Ennek további kísérleti bizonyítására morfológiai munkánkat egy epigenetikai marker, az H3K9ac szemikvantitatív meghatározásával bővítettük. A relatív mellékvese és a thymus tömeg adatok még inkább alátámasztották az anyai megvonás, mint epigenetikai stresszor általános hatékonyságát, ahogyan azt a MANOVA is mutatta. A CORT vizsgálatok szerint az anyai depriváció és a stressz együttes alkalmazása után az SSRI kezelés enyhén csökkentette a corticosteron szintet. E jelenség, hogy a HPA-tengely túlműködése antidepresszánsok hatására normalizálódhat, ismert.

A viselkedési tesztek értékelése

Az MBT-ben azt tapasztaltuk, hogy az anyai gondoskodás minőségétől függetlenül a stressznek kitett állatok fluoxetin kezelés után kevesebb üveggolyót rejtettek el. Ez az eredmény nyilvánvalóan alátámasztja modellünk érzékenységet prediktív validitás tekintetében, mivel a fluoxetin kezelés hatékonyan csökkentette az állatok szorongásszintjét. A fluoxetin hatásának hasonló tendenciája volt megfigyelhető az LDT-ben AFR állatok esetében, míg az anyai megvonás alkalmazása teljesen megszüntette a fluoxetin hatását. Ez tovább hangsúlyozza, hogy az élet korai szakaszában elszenvedett negatív életesemények jelentősen befolyásolják a stresszadaptációt és az antidepresszáns kezelésre adott választ. A TST szerint az SSRI-kezelés erőteljesen csökkentette a depresszió szintjét az AFR állatokban. Az anyai megvonás viszont (CVMS nélkül is) csökkentette a fluoxetin kezelés hatékonyságát. Ha valamennyi kockázati tényezőnek ki voltak téve, az állatok már nem tudtak alkalmazkodni. Ezek a viselkedési eredmények egyrészt tovább erősítik modellünk prediktív validitását, másrészt felhívják a figyelmet a személyre szabott terápia jelentőségére a hangulatzavarok kezelésében. Modellünkben a depresszió szint mérésére használt tesztek közül a TST nagyobb érzékenységet mutatott, mint az FST. Az FST kisebb különbségeket talált az egyes csoportok között, és magasabb depresszió szintet mutatott a fluoxetin kezelés után az AFR,

stresszben részesült egerekben. Ez a második megállapítás gyakorlatilag minden más eredménnyel ellentmond. Más laboratóriumok eredményei is a TST magasabb érzékenysége hívják fel a figyelmet, míg az utóbbi időben egyre több elismert szakember van azon a véleményen, hogy a FST-t nem lenne szabad tovább használni a depresszió szintjének mérésére.

A PFC szövettani vizsgálata

A PFC-ben a FOSB CVMS-reaktivitását az anyai gondoskodás minősége és az SSRI-kezelés egyaránt befolyásolta. A FOSB a stresszkutatásban széleskörűen használt neuronális aktivitási marker, ami azt a reakciót tükrözi, ahogyan egy ingerre adott sejtszintű válasz a géntranszkripció szintjén is megjelenik. Az általunk ebben a vizsgálatban használt antitest felismeri mind a teljes hosszúságú FOSB-t, mind annak *splice* variánsát, a deltaFOSB-t. Figyelembe véve a teljes hosszúságú FOSB rövidebb felezési idejét és azt, hogy ebben a vizsgálatban az egereket egy nappal az utolsó stresszexpozíció után perfundáltuk, a detektált FOSB fehérje jelnek a delta izoformának kell megfelelnie, amely a krónikus neuronális aktivációt tükrözi. Az a jelenség, hogy a krónikus stresszexpozíció növeli a FOSB immunreaktivitást a PFC-ben, jól ismert. Fontos, hogy itt megfigyeltük, hogy ha a CVMS-expozíciót az MD180 talaján alkalmaztuk, sem a CVMS, sem a fluoxetin kezelés nem emelte meg a FOSB aktivitást a PFC-ben. Ennek a jelenségnek nagy transzlációs jelentősége lehet, mivel a FOSB-vel kapcsolatos transzkripciós változásokat egyre inkább a terápiás hatékonyság meghatározására használják a májor depresszió modelljeiben. A hiszton acetiláció vizsgálatánál azt találtuk, hogy az AFR egerekben a fluoxetin kezelés csökkent acetilációval társult, de ha az egerek MD180-n estek át, akkor egy eleve alacsonyabb acetilációs szintet láttunk, amelyet a fluoxetin kezelés már nem befolyásolt. Ez arra utal, hogy a fluoxetin terápia és a korai életkori stressz kölcsönhatásba lép a PFC-ben, tehát ismételten bizonyítékot találtunk arra, hogy a korai életkorban elszenvedett negatív életesemények befolyásolják az antidepresszánskezelésre adott választ.

A hippocampus szövettani vizsgálata

Mivel az anyai megvonás nagyon alacsony, szinte kimutathatatlan FOSB jellel társult a hippocampus minden vizsgált régiójában, le kell szögeznünk, hogy az SSRI kezelésnek nem sok

tere volt a FOSB immunreaktivitás csökkentésére. Ezt a megfigyelést lehetne esetleg azzal magyarázni, hogy technikai hiba történt, amely megakadályozta az immunjel kialakulását, de mivel ugyanazon állatok PFC metszetei ugyanabban a festési folyamatban megbízható jelet adtak, úgy ítéljük meg, hogy az MD180 egerek alacsony hippocampalis FOSB sejtszámai valódi terület-specifikus megfigyelések. A hippocampalis hiszton acetiláció dinamikája különbözött a PFC-ben megfigyelttől. Az MD180 csökkentette a H3 hiszton acetilációját az összes hippocampalis régióban. A CVMS pedig csökkentette a H3K9ac immunreaktivitást a vivőanyaggal kezelt, AFR egerekben az összes vizsgált régióban, viszont a fluoxetin kezelés növelte az acetilációt a korábban CVMS-t átélt egerekben. Jelen vizsgálatunk azt mutatja, hogy a CVMS-nek kitett, MD180-at is elszenvedett egerekben a fluoxetin acetiláció-növelő hatása megszűnt a CA1-ben, és átfordult egy csökkentő hatásba a CA3-ban és a DG-ban. Ez a mi modellünkben arra utal, hogy az antidepresszánsok hatékonysága függhet a kockázati tényezők számától és az epigenetikai státusztól, amelyet a modellállat hordoz. Ez végső soron aláhúzza az egyénre szabott terápiás megközelítés fontosságát a depresszió kezelésében, a farmakoterápia hatékonyságának növelése érdekében.

Az ovBNST szövettani vizsgálata

Korábbi eredményeinkkel ellentétben a CVMS-expozíció nem indukált jelentős neuronális aktivációt az ovBNST-ben az AFR állatok körében, ami a vivőanyagot kapott állatok napi intraperitoneális injekciói által okozott enyhe stressz hatásával lehet magyarázható. Anyai megvonást követően azonban az ugyanerre a stresszre adott válasz nagysága mind a CRH, mind a FOSB sejtek számának tekintetében csökkent. Ez alátámasztja a viselkedési tesztjeink azon értelmezését, hogy az MD180 állatoknál maladaptációt látunk. Korrelációs elemzéseink igazolták, hogy a szorongás (MBT-ben) és a depresszió szintje (TST-ben) fordítottan arányos az ovBNST/CRH sejtek FOSB-pozitivitásával. Ehhez hasonlóan, a fluoxetin kezelés által kiváltott CRH/FOSB sejtszám emelkedés látható a legtöbb csoportban, ami erős anxiolitikus és antidepresszáns hatással járt együtt a viselkedési tesztekben. A CRH specifikus jelzenítés (SSD) mérések nagyon alacsony ovBNST/CRH-tartalmat mutattak ki minden deprivált csoportban, ami arra utal, hogy az anyai depriváció csökkenti e sejtek CRH-tartalmát.

A CeA szövettani vizsgálata

A CeA stressz hatására történő aktivációja jól ismert jelenség. Modellünkben mi is emelkedett CRH-FOSB számot és egyidejűleg magasabb CRH-denzitást találtunk, ami fokozott aktivitásra utal. A stresszt követő fluoxetin kezelés csökkentette a CRH pozitív neuronok számát. Az anyai megvonás hatása alapjaiban rendezte át a neuronális aktivitási mintázatot, mivel a fluoxetin kezelés egyaránt csökkentette a CeA aktivitását és CRH tartalmát, a stressz pedig ez után nem aktiválta a magot, és nem növelte a CRH-termelő sejtek számát sem. Ez a megfigyelésünk ismételten kiemeli, hogy az élet korai szakaszában átélt szignifikáns negatív életesemények máladaptív változásokat okoznak a neuronális stresszadaptációban, mely végső soron hozzájárulhat a viselkedési tesztekben tapasztalt eltérésekhez. A CeA/CRH SSD és az MBT-ben elrejtett üveggolyók száma közötti negatív korreláció a fluoxetin erős anxiolitikus hatását bizonyítja stressz után, további bizonyítékot szolgáltatva modellünk prediktív validitására.

A VTA szövettani vizsgálata

Az anyai megvonás hatása hasonló volt ebben a magban, mint amit a tágabb értelemben vett amygdalában megfigyelhettünk. A TH SSD 40%-os csökkenése az anyai deprivációt elszenvedett utódoknál egybevág más kutatócsoportok eredményeivel. Ezek az adatok tovább hangsúlyozzák, hogy a fiatal korban átélt szignifikáns negatív életesemények hosszú távú változásokat okoznak a stresszadaptációban és az antidepresszáns terápiára való reaktivításban. H3K9ac eredményeink szerint csak a fluoxetin kezelés növelte az acetiláció mértékét az állatokban. A fluoxetin ezen hatásával növelheti a jutalmazás érzését a mezolimbikus jutalmazó pálya aktiválásával, így enyhítve a depresszió olyan tipikus tüneteit, mint az anhedónia és a motiváció hiánya.

A cpEW szövettani vizsgálata

Az UCN1-termelő neuronok fluoxetin kezelésre adott válasza minden csoportban egységes volt: csökkent UCN1-tartalmat mutattak. Ez az MBT eredményeivel korrelálva megalapozza a modellünk prediktív validitását, és alátámasztja a cpEW jelentőségét a szorongással kapcsolatos

betegségekben. A korai életkorban elszenvedett stressz nem befolyásolta az urocortinerg sejtek számát, de csökkentette a FOSB-aktivitásukat és az UCN1-tartalmukat. Ez összhangban van a hisztonfehérjék acetilációjának mértékével, valamint az acetiláció és az UCN1-denzitás közötti korrelációra vonatkozó eredményekkel, ahol az alacsonyabb acetiláció alacsonyabb UCN1 SSD-vel párosult. A cpEW-ben vizsgált hiszton acetiláció és az ovBNST-ben mért CRH SSD közötti további korreláció alátámasztja az urocortinerg rendszer szerepét a BNST és a HPA-tengely szabályozásában.

A DR szövettani vizsgálata

A DR/5-HT neuronok a HPA-tengely és a limbikus agyterületek fontos regulátorai a hangulatszabályozásban. A PACAP KO egereknél korábban megfigyelt viselkedési anomáliák főként a szerotoninerg rendszer változásainak tulajdoníthatók. Itt azt láttuk az AFR egerekben, hogy a stressz csökkentette mind a DR/5-HT sejtek számát, mind az 5-HT SSD-t, viszont anyai deprivációt követően emelkedett sejtszámot találtunk. Az anyai megvonást elszenvedett egerekben a stressz önmagában nem befolyásolta a DR/5-HT-t, míg a fluoxetin hatására csökkent a DR/5-HT sejtszám. Ez tovább erősíti a korai életszakaszban elszenvedett averzív életesemények hosszútávú jelentőségét a stresszadaptációs válaszban és a hangulatszabályozásban. Az elrejtett üveggolyók száma az MBT-ben negatív korrelációt mutatott a DR/5-HT sejtek számával és 5-HT SSD mértékével. Ez meggyőzően támasztja alá azt, hogy valódi kapcsolat áll fenn a morfológiai és viselkedési eredményeink között. Mindez egybevág a szerotoninerg rendszerek jól ismert jelentőségével hangulatszabályozásban. Acetiláció tekintetében az anyai megvonást elszenvedett egerekben a stressz nem okozott változást, de CVMS-t követően a fluoxetin adása növelte a hiszton acetilációt a DR-ban. Az 5-HT-pozitív sejtek számának és a DR H3K9ac sejtek számának erős negatív korrelációja ismételten rávilágít az epigenetika fontosságára a hangulatszabályozásban. Az 5-HT-sejtek száma és az ovBNST/CRH, valamint a cpEW/UCN1 sejtek száma közötti erős korreláció pedig bizonyítja, hogy a fenti központok között funkcionális kapcsolat van.

A viselkedési és funkcionális-morfológiai eredmények kapcsolata

Ebben a tanulmányban funkcionális neuroanatómiai vizsgálatokat végeztünk számos limbikus központban és megállapítottuk, hogy a vizsgált agyterületek mindegyike hozzájárulhatott a megváltozott hangulati állapothoz. Az ovBNST és a CeA CRH aktivitása negatívan, míg a cpEW/UCN1 és a DR/5-HT pozitívan korrelált az MBT-ben megfigyelt szorongási és a TST-ben regisztrált depresszió szintekkel. Ez arra utal, hogy ellentétes irányú hatással bírnak a hangulati állapot szabályozásában. A VTA-ban a hiszton acetiláció korrelált az FST viselkedéssel, ami azt sugallja, hogy ez a terület hosszú távon hozzájárul a hangulati állapot alakulásához.

Összefoglalás

Kísérleteink során nem csak bizonyítottuk korábbi eredményeink reprodukálhatóságát a három találat elméleten alapuló egérmodell konstrukciós és fenotípusos validitásával kapcsolatban, de a kísérleti felállást kibővítve -a humán terápia gold standardjaként széleskörben alkalmazott fluoxetin kezeléssel-, modellünk prediktív validitása is bizonyítást nyert, hiszen a fluoxetin kezelés állatkísérletes eredményeink szerint csökkentette az állatok szorongási és depresszió szintjét. A kapott viselkedési eredmények jól korreláltathatók voltak a vizsgált agyterületekben megfigyelt változásokkal, további bizonyítékot szolgáltatva a magasabb limbikus központok, a CRH-, és urocortinerg rendszerek HPA-tengelyre gyakorolt hatására, így alátámasztva azok stresszadaptációban betöltött szerepét. A szerotoninerg rendszer eredményei és főleg ezek szoros korrelációi a viselkedési eredményekkel aláhúzzák a szerotoninerg neurotranszmisszió és a raphe magvak hangulatszabályzásban betöltött kulcsszerepét. A VTA-ban gyűjtött eredményeink pedig jól mutatják, hogy a hangulatzavarok patogenezisében a jutalmazási pályák esetleges málfunkciója is fontos szerepet kaphat. Epigenetikai vizsgálataink jól bizonyítják, hogy a korai életkorban kapott (epigenetikai) stressz, az ekkor elszenvedett negatív életesemények alapjaiban befolyásolják egyrészt a stresszadaptációs mechanizmust, megágyazva egy esetleges későbbi hangulatzavarnak, másrészt magát az antidepresszáns kezelésre adott választ is.

A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények

Gaszner T., Farkas J, Kun D, Ujvári B, Berta G, Csernus V, Füredi N, Kovács LÁ, Hashimoto H, Reglődi D, Kormos V, Gaszner B. Fluoxetine treatment supports predictive validity of the three hit model of depression in male PACAP heterozygous mice and underpins the impact of early life adversity on therapeutic efficacy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022. 13:995900. doi: 10.3389/fendo.2022.995900.

IF(2021): 6,055; Q1

Gaszner T., Farkas J, Kun D, Ujvári B, Füredi N, Kovács LÁ, Hashimoto H, Reglődi D, Kormos V, Gaszner B. Epigenetic and neuronal activity markers suggest the recruitment of the prefrontal cortex and hippocampus in the three-hit model of depression in male PACAP heterozygous mice. *Int J Mol Sci*. 2022. 23(19):11739. doi: 10.3390/ijms231911739.

IF (2021): 6,208; Q1

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 12,263

Az érekezés alapját nem képező egyéb közlemények

Farkas J, Kovacs LÁ, **Gaszner T**, Gaszner B. Using PACAP heterozygous mice as models of the three hit theory of depression. In Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide—PACAP. 2016. (pp. 731-741). Springer, Cham. ISBN: 978-3-319-35135-3.

Farkas J, Kovács LÁ, Gáspár L, Nafz A, **Gaszner T**, Ujvári B, Kormos V, Csernus V, Hashimoto H, Reglődi D, Gaszner B. Construct and face validity of a new model for the three-hit theory of depression using PACAP mutant mice on CD1 background. Neuroscience. 2017. 354:11-29. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.04.019.

IF: 3,308

Kormos V, Gáspár L, Kovács LÁ, Farkas J, **Gaszner T**, Csernus V, Balogh A, Hashimoto H, Reglődi 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. 330:335-58. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.06.004.

IF: 3,277

Kormos V, Kecskés A, Farkas J, **Gaszner T**, Csernus V, Alomari A, Hegedüs D, Renner É, Palkovits M, Zelena D, Helyes Z, Pintér E, Gaszner B. Peptidergic neurons of the Edinger-Westphal nucleus express TRPA1 ion channel that is downregulated both upon chronic variable mild stress in male mice and in humans who died by suicide. J Psychiatry Neurosci. 2022. 47(3):E162-E175. doi: 10.1503/jpn.210187.

IF (2021): 5,699

Ujvári B, Pytel B, Márton Z, Bognár M, Kovács LÁ, Farkas J, **Gaszner T**, Berta G, Kecskés A, Kormos V, Farkas B, Füredi N, Gaszner B. Neurodegeneration in the centrally-projecting Edinger-Westphal nucleus contributes to the non-motor symptoms of Parkinson's disease in the rat. J Neuroinflammation. 2022.19(1):31. doi: 10.1186/s12974-022-02399-w.

IF: (2021): 9,549

A disszertáció alapját nem képező egyéb közlemények összesített impakt faktora: 21,833

Köszönetnyilvánítás

Köszönet elsősorban témavezetőmet és egyben mentoromat, Dr. Gaszner Balázst illeti, a kezdő TDK-hallgató korom óta nyújtott –éjszakát, hétvégét és úgy egyáltalán szabadidőt nem ismerő– segítségéért, tanácsaiért, példaértékű kutatói attitűdjéért, oktatói iránymutatásáért, őszinte és segítő kritikáiért. Külön hálás vagyok neki végletekig oldott és közvetlen stílusáért, mellyel a hagyományos mester-tanítvány viszonyt újraértelmezve, produktív és inspiráló légkört hozott létre. Ezeken felül köszönöm fáradhatatlan és precíz munkáját a statisztikai analízisben és az ábraanyag szerkesztésében.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Reglődi Dórának, a doktori iskola vezetőjének, aki egyben az Intézetünk vezetője is: támogatásáért, iránymutatásáért és a PACAP génhiányos egerekhez való hozzáférés biztosításáért.

Köszönet illeti kutatócsoportunk minden tagját. Név szerint elsősorban Dr. Farkas Józsefet, akinek az állatkísérletek során végzett munkája nélkül ezen értekezés nem jöhetett volna létre. Köszönöm TDK-hallgatómnak, Dr. Kun Dánielnek és kollégámnak Dr. Ujvári Baláznak a szövettani képek kiértékelésénél nyújtott segítségüket. Köszönet illeti Dr. Kormos Viktóriát, Dr. Füredi Nórát és Dr. Kovács László Ákost munkájukért az állatkísérletek és a szövettani feldolgozás során. Szeretném köszönetemet kifejezni Prof. Dr. Csernus Valérnak, a kortikoszteron mérésekért. Köszönöm asszisztensnőinknek, Orbán Izabellának és Godáné Brumán Beatrixnak áldozatos munkájukat.

Hálás köszönettel tartozom családomnak: elsősorban Feleségemnek és Leányomnak, akik mellettem álltak a jobb és a nehezebb napokon is, emellett Szüleimnek, Nagyszüleimnek és Feleségem szüleinek is hálás vagyok türelmükért és támogatásukért.

Ezen disszertációban összefoglalt tudományos munka finanszírozásáért köszönet illeti támogatókat: Innovációs és Technológiai Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alap, (projektazonosítók: TKP2021-EGA-16 és 2020-4.1.1-TKP2020, pályázati kódok TKP2021-EGA és TKP2020-IKA-08); valamint NKFIH (PD100706 és FK124188) továbbá a NAP 2017-1.2.1-NKP-2017-00002 és MTA-TKI14016 projektek.