

**A VAZOPRESSZIN-HIÁNYOS BRATTLEBORO
PATKÁNY, MINT SKIZOFRÉNIA MODELL:
VALIDÁCIÓ ÉS LEHETSÉGES KÖZREMŰKÖDŐ
MECHANIZMUSOK A SKIZOFRÉNIA-SZERŰ
VISELKEDÉS KIALAKULÁSÁBAN**

Ph.D. tézisek

Török Bibiána

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Zelena Dóra DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Bagdy György DSc., egyetemi tanár
Dr. Toldi József Ph.D., egyetemi tanár

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Varga Gábor DSc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Helyes Zsuzsanna DSc., egyetemi tanár

Dr. Gyertyán István Ph.D., kutatócsoport
vezető

Budapest, 2021

1 Bevezetés

A skizofrénia (SCZ) egy krónikus mentális betegség, amely nemcsak a beteg életét, hanem az egész családját is negatívan befolyásolja. Ráadásul a SCZ-nak komoly gazdasági hátrányai is vannak. Figyelembe véve a SCZ világszerte fennálló magas prevalenciáját (0,4-0,87%) és a kezelés kudarcait, további vizsgálatokra van szükség a területen.

A SCZ tünetek három fő kategóriába sorolhatók: pozitív (egészséges embereknél nem tapasztalható viselkedés: hallucinációk, téveszmék, rendezetlen beszéd és viselkedés), negatív (például csökkent érzelmi kifejezés) és kognitív tünetek (memóriazavarok) (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-V). A DSM-V szerint az öt fő tünet közül legalább kettőnek (téveszmék, hallucinációk, beszédzavar, súlyosan szervezetlen, vagy katatón viselkedés, vagy negatív tünetek) egy hónapnál tovább kell fennállnia a SCZ diagnosztizálásához, és ezek közül az egyiknek téveszméknek, hallucinációknak, vagy rendezetlen beszédnek kell lennie.

A SCZ kialakulásának okai máig tisztázatlanok, és a rendelkezésre álló terápiák nem javítják a kognitív deficitet, továbbá csekély mértékben befolyásolják a SCZ negatív tüneteit, ezért új gyógyszereket kell kifejleszteni. A tudomány mai állása szerint az állatmodellek elengedhetetlenek egy új gyógyszer preklinikai vizsgálatához, a mögöttes mechanizmusok feltárásához, valamint új kezelési lehetőségek kidolgozásához.

A SCZ ígéretes genetikai modellje lehet a vazopresszin (AVP) hiányos Brattleboro patkány (di/di, diabetes insipidusra homozigóta). Valóban, az AVP számos ponton összefüggésbe hozható a SCZ-val. Ezenkívül a Brattleboro patkány a SCZ alapvető viselkedési tüneteit mutatja (például szenzomotoros kapuzási és kommunikációs deficit, memóriazavar), molekuláris változásokat mutat (a striatális dopamin-2 receptorok upregulációja), és a humánhoz hasonlóan reagál az antipszichotikus kezelésre.

Tehát ez a modell lehet a legalkalmasabb az AVP SCZ-szerű zavarokban betöltött szerepének feltárására, ezért fő célunk volt ennek az AVP-hiányos patkánymodellnek a teljes jellemzése.

2 Célkitűzés

Fő célunk az volt, hogy megerősítsük a centrálisan felszabaduló AVP szerepét a SCZ-szerű viselkedés kialakulásában AVP-hiányos (di/di) Brattleboro patkányban.

Először (**1. kísérlet**) a modell prediktív validitásának bizonyítása érdekében azt vizsgáltuk, hogy az antipszichotikus kezelés (akut, szubakut vagy krónikus) normalizálja-e a SCZ-szerű viselkedési változásokat (memóriakárosodás; szociális elkerülés; előimpulzus-gátlás, prepulse inhibition, azaz PPI zavara) felnőtt állatokban.

A patkánykölykök átjárhatóbb vér-agy gátjuk (BBB) és alacsony testtömegük miatt jó modellnek tűnnek az új antipszichotikus vizsgálatokhoz. A SCZ-val kapcsolatban az anyai elválasztás-indukálta ultrahang vokalizáció (MS-USV) a kommunikáció csökkenésének tüneteként értelmezhető. Ezért megvizsgáltuk, hogy a di/di kölykök csökkent MS-USV-je javítható-e antipszichotikus kezeléssel (**2. kísérlet**). A szedációt ("righting" reflex és negatív geotaxis) és a stresszhormon-emelő (ACTH, kortikoszteron) mellékhatásokat kizártuk. Ezt követően (**3. kísérlet**) azt vizsgáltuk, hogy mely AVP receptor altípus játszhat szerepet az MS-USV szabályozásában.

A lehetséges agyi mechanizmusok tanulmányozására (**4. kísérlet**) megvizsgáltuk a magnocellulárisan felszabaduló AVP hozzájárulását a szociális viselkedéshez: adeno-asszociált vírusvektor segítségével AVP expressziót indukáltunk a SON-ban. Egy másik lehetséges mechanizmusként (**5. kísérlet**) epigenetikai változásokat (3-as hiszton 9-es lizinjének acetilációja: AcH3K9) vizsgáltunk a Brattleboro patkány prefrontális kérgében (PFC), nucleus accumbensében, lateralis septumában (LS) és hippocampusában (HC).

3 Módszerek

3.1 Állatmodell

A Brattleboro patkányokat a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben tartottuk fenn egy olyan kolóniában, amelyet Harlan (Indianapolis, IN, USA) tenyészpatakányaiból indítottunk.

Az 1., 4. és 5. kísérletben 56-70 napos hím AVP-hiányos di/di-t hasonlítottunk össze homozigóta (+/+) kontroll patkányokkal. Ketrecentként 2 állatot tartottunk standard laboratóriumi körülmények között (hőmérséklet: $23\pm 1^{\circ}\text{C}$; relatív páratartalom: 50-70%),

patkányeledel és csapvíz ad libitum elérhető volt számukra. A 4. kísérletben az állatokat izolálva tartottuk a műtéti sebek biztonságosabb gyógyulása érdekében.

A 2. és 3. kísérletben azonos alomból, homozigóta AVP-hiányos (di/di) apától és heterozigóta (di/+) anyától származó 7-8 napos Brattleboro kölyköket hasonlítottuk össze; ily módon di/+ és di/di patkányok születtek. Az alom méretét nem kontrolláltuk, továbbá nemek szerint nem csoportosítottunk. A kísérletet követően a kölykök genotípusát az agyalapi mirigy AVP tartalmából radioimmunoassay segítségével határoztuk meg. A 3. kísérletben Wistar patkányt is használtunk, amelyeket a Charles River-től (Budapest, Magyarország) szereztünk be, és a helyi állatházban pároztattunk. A kölykök az anyaállattal a saját ketrecükben, standard laboratóriumi körülmények között kerültek elhelyezésre (hőmérséklet: $23\pm 1^{\circ}\text{C}$; relatív páratartalom: 50-70%). A nappali/éjszakai ciklus 12/12 óra volt, a lámpák 07:00-kor kapcsolódtak fel.

Minden kísérletet 10:00 és 14:00 között végeztünk az Európai Közösségek Tanácsának 1986. november 24-i irányelvének (86/609/EGK) megfelelően, a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Állatjóléti Bizottsága által felülvizsgálva és jóváhagyva.

3.2 1. kísérlet: Javíthatják-e az antipszichotikumok a Brattleboro patkány viselkedési zavarait?

3.2.1 Manipulációk

A patkányokat 15 napon keresztül minden nap szubkután injekcióztuk antipszichotikus gyógyszerrel, vagy hordozóanyaggal. Az 1. (D1, akut), a 8. (D8, szubakut) és a 15. (D15, krónikus) kísérleti napon, 30 perccel a viselkedési tesztek előtt kaptak injekciót. Különböző dózisokat használtunk az aripiprazol (5 mg/kg; Richter Gedeon Nyrt., Budapest, Magyarország), a klozapin (1 mg/kg; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), a haloperidol (0,1 mg/kg; Sigma Chemical. Co., St. Louis, MO), az olanzapin (0,3 mg/kg; Richter Gedeon Plc., Budapest, Magyarország), és riszperidon (0,25 mg/kg; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) esetében (n~6 -8 minden csoportban). Az aripiprazolt 5%-os ecetsav-sóoldatban, míg a többi gyógyszert 50 μl 1 N HCl/ml sóoldatban oldottuk fel, és 3 N NaOH-val titráltuk 6-7 pH-értékre. A kontroll állatok vivőanyagot (HCl vagy ecetsav oldat) kaptak.

3.2.2 Kísérletek

A szociális diszkriminációt a kontroll, haloperidol, klozapin, olanzapin és riszperidon kezelt állatok összehasonlításával teszteltük, míg az aripiprazol-kezelést külön, megfelelő kontrollok segítségével végeztük. Az öt különböző kezelést öt „eltolt” sorozat tesztelésével végeztük, kb. 20 állat/nap, amely minden kezelési csoportból tartalmazott patkányokat. Mivel nem volt szignifikáns különbség a kontrollok (HCl vagy ecetsav tartalmú sóoldat) között, a későbbi vizsgálatok során csak HCl tartalmú vivőanyagot használtunk. Ezt követően – a többi antipszichotikus kezeléssel összhangban – a klozapin helyett az aripiprazol hatását vizsgáltuk, mivel a klozapin az olanzapinhoz hasonló receptorkötési profillal rendelkezik, és a korábbi preklinikai vizsgálatok során alaposan tesztelték.

Az aripiprazollal, haloperidollal, olanzapinnal és riszperidonnal kezelt állatokon a szociális elkerülés és a PPI tesztet ugyanazon a napon, egymás után végeztük. Annak elkerülése érdekében, hogy az egyik teszt befolyásolja a másikat, az állatok felénél először a szociális elkerülést, majd a PPI-t, míg a másik felénél először a PPI-t hajtottuk végre.

3.2.2.1 Szociális diszkrimináció teszt

A szociális diszkrimináció tesztet a kísérleti állatok számára új környezetben végeztük (plexi ketrec alommal, $41,3 \times 26 \times 29,8$ cm, GeoMaxi, Ferplast, Olaszország). A patkányokat 1 órán át a kísérleti ketrechez szoktattuk. 25-30 napos hím Wistar patkányokat használtunk stimulus állatokként. A teszt egy 4 perces mintavételi fázissal kezdődött, amikor egy fiatal patkány (Stim1) került a kísérleti állathoz a tesztketrecbe. 4 perc elteltével a Stim1-et kivettük. Harminc perccel később - a 4 perces választási szakaszban - a kísérleti állatokhoz a már ismerős Wistar kölyköt, azaz Stim1-et és egy ismeretlen, hasonló fiatal patkányt (Stim2) helyeztünk. A tesztet videóra vettük, az explorációs viselkedést eseményelemző szoftverrel (H77) elemezte egy, a kezelési körülményeket nem ismerő munkatárs. Annak érdekében, hogy a megfigyelő megkülönböztethesse a két fiatal patkányt, az egyiket zöld csíkokkal jelöltük (Edding 30 marker, szagtalan, zöld, Edding AG, Németország) legalább 30 perccel a tesztelés előtt. A megjelölt állatokkal szembeni preferencia vagy idegenkedés kizárása érdekében a jelölést a Stim1 és Stim2 között randomizáltuk. Az explorációs magatartás a fiatal patkányokkal szembeni közvetlen cselekvésként definiálható, beleértve az anogenitális

szaglászást, a nyalogatást, és a szoros üldözést. A Stim2 szignifikánsan hosszabb vizsgálati időtartama a Stim1-hez képest a választási fázisban az ép felismerési memória megnyilvánulásaként értelmezhető. A diszkriminációs indexet (DI) a következőképpen számítottuk ki:

$$DI = (\text{idő\% Stim2} - \text{idő\% Stim1}) / (\text{idő\% Stim 1} + \text{idő\% Stim 2}).$$

Az index eredménye -1 és 1 között változhat, ahol 0 = nincs megkülönböztetés. Normális esetben az állatok több időt töltenek az új ingerrel (újdomsághatás), így a ≤ 0 index a memóriazavar jele.

3.2.2.2 Szociális elkerülés teszt

A szociális elkerülés tesztet csoportunk fejlesztette ki a szociális szorongás mérésére. A tesztetrec két alrekeszt tartalmaz, amelyeket egy tolóajtó választ el. A ketrecek a felső részen nyitottak; falaik 40 cm magasak. A kísérleti állatot a kisebb alrekeszbe (felület: 15 cm x 50 cm) helyeztük 3 perces szoktatásra. A nagyobb alrekesz (felülete: 40 cm x 40 cm) átlátszó, perforált műanyag fallal volt két egyenlő részre osztva. A kísérleti állattól távolabbi rekeszben egy ismeretlen, felnőtt ++ hím patkány volt. A szoktatási időszak után a tolóajtót eltávolítottuk, és a kísérleti állatot 5 percig hagytuk vizsgálni a kis és nagy rekeszeket. A műanyag ketrecek minden teszt után vízzel megtisztítottuk. A tesztberendezés nem tette lehetővé a fizikai érintkezést a kísérleti és a stimulus állatok között. Az alanyok tisztán látták a stimulus patkányt a tolóajtó eltávolításakor, de korábban nem. A viselkedést felülről rögzítettük videóra, és egy, a kezeléseket nem ismerő elemezte. Három változót definiáltunk: az stimulus állatot tartalmazó rekeszben töltött időt, a szociális interakcióval eltöltött időt és a szociális interakció latenciáját.

3.2.2.3 Prepulse inhibition (PPI) teszt

A PPI teszt a szenzomotoros gátlás mérésére alkalmas. Súlykalibrálás után a kísérleti állatokat egy szűk tesztetrecbe helyeztük egy hangtompított szekrénybe (Acoustic Startle setup, Coulbourn Instruments, LLC). 5 perces szoktatást követően az alanyoknak 40 ms hosszú, 120 dB-es akusztikus ingert („zaj”, impulzus) adott le a berendezés 20 másodpercenként ötször, hogy standardizálja a startle választ (összerezenés). A teszt során ötféle protokoll váltakozott: önmagában impulzus (120 dB), 80 ms-os impulzus előtt egy 20 ms-os, változó intenzitású előimpulzus (73, 77 vagy 81 dB „hang”), vagy 0 dB impulzus. Mindegyik protokoll ötször fordult elő a teszt során, randomizált

sorrendben. A program automatikusan rögzítette a startle válaszokat. A 0 dB-es impulzusra adott válasz a patkány tömege volt, ami levonásra került a későbbi startle válasz értékekből. A 120 dB-es impulzusra adott startle válasz átlagát előzetes impulzus nélkül minden állatra kiszámítottuk, és akusztikus startle válaszként szolgáltak. Ezt a választ 100%-osnak tekintettük, amelyből a PPI-t a következő képlettel számítottuk ki: $PPI = 100 - (\text{startle előimpulzus után} / \text{startle előimpulzus nélkül} * 100)$. Jelen vizsgálatunkban az eltérő előimpulzus intenzitásnak nem volt szignifikáns hatása, és nem módosította a genotípus vagy a kezelés hatását sem, ezért a három előimpulzus intenzitás átlagát használtuk minden napra és kezelésre.

3.3 2. kísérlet: Brattleboro patkánykölykök ultrahang vokalizációjának mérése antipszichotikus kezelés során

3.3.1 Manipulációk

A kölykök 1 µl/g szubkután antipszichotikus gyógyszer, vagy vivőanyag injekciót kaptak 30 perccel az MS-USV teszt előtt. A haloperidol (0,1 mg/kg, 1 mg/kg; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), klozapin (1 mg/kg, 10 mg/kg; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), olanzapin (0,3 mg/kg, 3 mg/kg; Richter Gedeon Nyrt., Budapest, Magyarország), riszperidon (0,25 mg/kg, 1 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) és aripiprazol (0,5 mg/kg, 5 mg/kg, 50 mg/kg; Richter Gedeon Nyrt., Budapest, Magyarország) esetében is különböző dózisokat alkalmaztunk. A haloperidolt, a klozapint, az olanzapint és a riszperidont 50 µl 1 N HCl/ml sóoldatban, míg az aripiprazolt 5%-os ecetsav-sóoldatban oldottuk fel, és 3 N NaOH-val titráltuk pH 6-7 értékre. A kontroll állatok vivőanyagot (HCl vagy ecetsav oldat) kaptak.

3.3.2 Kísérletek

3.3.2.1 Anyai elválasztás-indukálta ultrahang vokalizáció

A vizsgálat napján a 7-8 napos patkánykölyköket és anyaállataikat az állattartó helyiségből egy másik szobába helyeztük át, és legalább 1 órán keresztül zavartalanul hagytuk őket a viselkedési teszt megkezdése előtt. Az anyai hatások minimalizálása érdekében az azonos alomból származó kölyköket véletlenszerűen soroltuk az egyes kezelési csoportokba. Minden kísérlethez legalább három különböző anyától származó kölyköket használtunk. A kölykök egymás után, 12 percenként kaptak gyógyszer- vagy vivőanyag-injekciót (1µl/g), megjelölve visszakerültek az anyaállathoz és az alomtársakhoz. Harminc perccel a beadás után az egyik kölyköt egy hangszigetelt

helyiségbe vittük, és egy 2 literes üveg főzőpohárba helyeztük alom és fűtés nélkül. Az USV-t 10 percig mértük egy USV detektorral (CDB205, CIEL Electronique, Nizza, Franciaország), amelyet egy számítógéphez csatlakoztattunk. Az USV-detektor és a főzőpohár közötti távolság 10 cm volt. A hangokat az Audacity 2.0.5 szoftver segítségével rögzítettük. A korábbi vizsgálatok során azt találták, hogy a 8 napos patkányok által kibocsátott ultrahangok nagy része 30 kHz és 50 kHz közötti. A rögzített jeleket eszerint szűrtük. Az adatok automatikus számlálása egy Rat Call Counter nevű szoftverrel történt (Zsebők S. fejlesztése). A küszöbértéket 0,4 V jelamplitúdóra állítottuk be a háttérzaj kizárása érdekében. A kibocsátott USV-k számát és időtartamát definiáltuk.

3.3.2.2 *Righting reflex*

Közvetlenül az MS-USV után righting (hasrafordulási) reflex latencia (RRL) tesztet alkalmaztunk a gyógyszerek szedatív hatásának vizsgálatára. Az utódok hanyatt fektetett testhelyzetbe kerültek egy sima felületen, majd manuálisan mértük a normál helyzetbe való visszatérés latenciáját (hasrafordulási reflex). Minden állatnak legfeljebb 30 másodperce volt a hasrafordulásra.

3.3.2.3 *Negatív geotaxis*

A negatív geotaxis teszt a mozgáskoordináció állapotát vizsgálta. Az RRL mérés után az utódokat orrukkal lefelé egy 45°-os ferde táblára helyeztük, és a 180°-os függőleges helyzetbe fordulás latenciáját mértük. Minden állat legfeljebb 60 másodpercet kapott a feladat végrehajtására. Ha a patkány legurult a táblán, nem teljesítette a feladatot, és a maximális időt, azaz 60 másodpercet rögzítettünk a teljesítménye értékelésére.

Mindkét tesztet háromszor ismételtük meg az USV mérések végén, és a három mérés átlagát vettük jellemző paraméternek.

3.3.3 *Hormon mérések*

Az állatokat feláldoztuk, és a vérérummintákból ACTH és kortikoszteron koncentrációkat mértünk specifikus radioimmunoassay (RIA) segítségével. Mindkét antitestet intézetünkben fejlesztettük ki. Az intra-assay variációs együttható 4,7% és 7,5% volt a két hormon esetében.

A kölykök hipofízisét is összegyűjtöttük, hogy meghatározzuk az AVP-tartalmat és ezáltal a genotípust. A minták előkészítése a következőképpen történt: 5 percre forrásban

lévő vízfürdőbe helyeztük, majd ultrahanggal homogenizáltuk, centrifugáltuk, és a 100-szorosra hígított felülúszóból AVP-tartalmat mértünk specifikus RIA-val a korábban leírtak szerint. A nyúl antitesteket Dr. Vecsernyés M. (Szent-Györgyi Orvostudományi Egyetem, Szeged, Magyarország) adományozta. A kimutatási határ 1 pg AVP/assay cső volt. A vizsgálaton belüli variációs együttható 10,7% volt.

Egy adott kísérletből származó összes mintát ugyanabban a RIA-ban vizsgáltuk, hogy elkerüljük a vizsgálatok közötti különbségeket.

3.4 3. kísérlet: Vazopresszin receptor-antagonisták hatása az anyai elválasztás-indukálta ultrahang vokalizációra

3.4.1 Manipulációk

A heterozigóta (di/+) anyától és diabetes insipidusra homozigóta (di/di) apától származó Brattleboro patkánykölykök ip. injekciót kaptak fiziológiás sóoldattal 30 perccel az MS-USV előtt.

A Wistar patkánykölykök ip. V1aR antagonistát (SSR49059), V1bR antagonistát (SSR149415), vagy V2R antagonistát (SSR121463B) kaptak (a Sanofi-Synthélabo cég nagylelkű ajándéka), amelyeket 0,4%-os Tween 80-ban oldottunk. 30 perccel az USV előtt mindegyiket három különböző koncentrációban alkalmaztuk: 3, 10 vagy 30 mg/kg. Egy további kísérletsorozatban 10 mg/kg V1aR antagonistát kevertünk össze 10 mg/kg V1bR antagonistával. A kontroll kezelés a vivőanyag volt 1 µl/g térfogatban. Minden beadást 15 µl fiziológiás sóoldat követett, hogy maximalizáljuk a fecskendőből a hatóanyag bejutását a szervezetbe.

3.4.2 Kísérleti elrendezés

3.4.2.1 *Anyai elválasztás-indukálta ultrahang vokalizáció*

Lásd 3.3.2.1.

3.4.2.2 *Righting reflex*

Lásd 3.3.2.2.

3.4.2.3 *Negatív geotaxis*

Lásd 3.3.2.3.

3.4.3 Hormon mérések

Lásd 3.3.3. Azonban csak a Brattleboro kölykök hipofízisét gyűjtöttük a genotípus meghatározásához (di/+ vagy di/di diszpozíció az AVP-tartalom alapján), a Wistar patkányokét nem.

3.5 4. kísérlet: Magnocelluláris AVP szerepe a szociális viselkedésben

A magnocelluláris AVP szintézis visszaállítására AVP-t tartalmazó adeno-asszociált vírus (AVP-AAV) vektort injektáltunk AVP-hiányos Brattleboro patkányok supraopticus nucleusába (SON) (di/di). Vad típusú, azaz +/+, di/di és AVP-AAV kezelt di/di hím patkányokat hasonlítottunk össze.

3.5.1 Manipulációk

Az altatás ketamin (50 mg/kg, SelBruHa Állatgyógyászati Kft., Budapest, Magyarország), xilazin (20 mg/kg, Spofa, Prága, Csehország) és promethazinium chloratum (0,2 ml/kg, EGIS, Budapest, Magyarország) keverékének intraperitoneális (ip.) injekciójával történt fiziológiás sóoldatban oldva.

Az altatott patkányokat sztereotaxiás műszerben rögzítettük (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). A lokális AVP szintézis visszapótlására Brattleboro patkányban az AVP-AAV-t (2-es típusú, CMV-GH-SP-AVP-NP-GP-SVPA, 7×10^9 genommásolat/ μ l, 100 nl/injekciós hely) mindkét oldali SON-ba injektáltuk di/di patkányokba (sztereotaxiás koordináták a Bregmától: AP: -0,4 mm, ML: +/-1,8 mm, DV: +9,7 mm) (a későbbiekben di/di-AVP). A kontrollok SON-jába (mind a +/+, mind a di/di állatoknak) ugyanazon a napon és ugyanazzal a volumennel sóoldatot injektáltunk, mivel nem állt rendelkezésre megfelelő kontrollvírus.

Csak azokat a di/di-AVP állatokat vontuk be a kísérletekbe, amelyek jelentős vízfogyasztás-csökkenést mutattak (10-ből 7), mivel ebben a törzsben a vízfogyasztás egyértelműen meghatározza a sikeres vírusbeadásokat. A vízfogyasztás csökkenését a SON-ban az AVP szintézis sikeres funkcionális visszapótlásának bizonyítékaként tekintettük, ezért két héttel a kezelés után kezdtük meg az állatok tesztelését. Az immunhisztokémiai adatok megerősítették a sikeres vírusbeadást: +/+ patkányok SON-jában a sejtek 23%-a, míg a di/di-AVP állatokban 17,5%-a mutatott AVP pozitivitást.

3.5.2 Kísérleti elrendezés

3.5.2.1 Szociális viselkedésteszték

Korábbi vizsgálataink kimutatták, hogy a MeA, egy mag, amely többek között a rágcslók társas viselkedésének szabályozásában játszott szerepéről ismert, reagált a SON-ban az AVP-szintézis visszapótlására. Ezért az AVP-AAV SON kezelés hatását vizsgáltuk a szociális viselkedésben. Tizennyolc nappal az AVP-AAV injektálás után az állatok szociális érdeklődését, majd három nappal később agresszív viselkedését vizsgáltuk.

3.5.2.1.1 Szociális érdeklődés

Több mint két héttel az AVP-AAV injektálást követően a patkányokat egy új ketrecre helyeztük át friss alommal 1 órával a teszt megkezdése előtt. A teszt során 4 percen keresztül vizsgálhatott a kísérleti állat egy még általa nem ismert fiatal fajtársat (Wistar patkány, kb. 25 napos). A szociális viselkedés időtartamát egy, az állatcsoportokat nem ismerő munkatárs mérte egy eseményrögzítő szoftver segítségével (EVENTLOG 1.0, írta Robert Hendersen 1986). A szociális viselkedést a következőképpen határoztuk meg: a kísérleti állatnak a fiatal stimulus patkánnyal szembeni közvetlen fellépését vettük figyelembe, beleértve az anogenitális szagolgotást, nyalogatást, és közeli üldözést.

3.5.2.1.2 Rezidens-intruder teszt (RI)

A kísérleti állatokat három napig GeoMaxi ketrecekben tartottuk. Ezután a kísérleti patkányokhoz 20 percre kisebb testű, ismeretlen Wistar-intrudert tettünk. Az expozíció alatti viselkedésüket videóra vettük, és később, a kezelési körülményekre vak kísérletező elemezte azt. A viselkedéselemzés az agresszív viselkedés befejező szakaszára, azaz a harapásos támadásokra összpontosított. A mennyiségi mérőszámok (azaz a támadások száma és latenciája) eredményeit mutatom be, mivel a minőségi mérőszámokban (azaz a támadás típusában és kontextusában) nem sikerült különbséget kimutatnunk.

3.5.3 AVP immunhisztokémia

A patkányokat mélyaltatásban transzkardiálisan perfundáltuk. Egy éjszakán át tartó posztfixálás után az agyakat 2 éjszakára 4 °C-on fagyálló hatású, 30%-os szacharózoldatba tettük át PBS-ben, majd -20 °C-on tároltuk a metszésig. A hipotalamusz SON-t és PVN-t tartalmazó 30 µm vastag koronális metszeteit csúszó mikrotómmal vágtuk, és 6 párhuzamos szeletsorozatra osztottuk.

A SON-t és a PVN-t tartalmazó agyszeleteket kiválasztottuk és megfestettük AVP-re. Az AVP antitestet Görcs Tamás állította elő. A másodlagos antitesteket a Jackson ImmunoResearch cégtől szereztük be. A szeletekben lévő sejtmagokat Hoechst 33258 (1:20 000; Sigma-Aldrich) segítségével tettük láthatóvá. A tárgylemezeket Mowiolal (Sigma-Aldrich) fedtük le.

A felvételek Nikon C2 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készültek a budapesti Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Nikon Központjában.

3.6 5. kísérlet: Epigenetikai változások a Brattleboro patkány agyban

3.6.1 Immunhisztokémia

Az agyszövet kezelését lásd a 3.5.3. fejezetben. A specifikus epigenetikai változásnak a jelölésére anti-hisztón H3 (Acetyl-Lys9) antitestet (gazda: nyúl, 1:5000; SAB4500347, Sigma–Aldrich, Inc., Magyarország) használtunk. Az Ach3K9 immunpozitív sejteket nikkell- 3,3'-diaminobenzidinnel (DAB) tettük láthatóvá.

A mikroszkópos képeket OLYMPUS CCD kamerával digitalizáltuk, a megfestett Ach3K9 pozitív sejtmagokat a ScionImage szoftver segítségével számoltuk meg.

3.7 Statisztikai módszerek

Az adatokat kétutas ANOVA-val elemeztük a genotípus és a kezelés tekintetében a StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA Statistica 12.0 programjával. A különböző kísérleti csoportok adatainak post hoc összehasonlítását Newman–Keuls teszttel, vagy Fisher Least Significant Difference módszerrel végeztük. Az eredményeket ábrákban mutattuk be. A DI (diszkriminációs index) esetében egymintás t-tesztet végeztünk 0-val szemben (nincs diszkrimináció) minden egyes kezelési csoportban külön-külön. A korrelációkat Pearson módszerrel számítottuk ki. Többszörös regressziós analízist végeztünk a viselkedési és hormonális változások MS-USV-hez való hozzájárulásának meghatározására. Az adatokat átlag \pm S.E.M ábráztuk. A statisztikai szignifikancia szintjét minden statisztikai elemzésben $p < 0,05$ -nek vettük.

4 Eredmények

4.1 1. kísérlet: Javíthatják-e az antipszichotikumok a Brattleboro patkány viselkedési zavarait?

4.1.1 Szociális diszkrimináció teszt

Szociális érdeklődésre gyakorolt hatás: A 4 perces mintavételi periódus alatt a di/di patkányok ugyanannyit, vagy még több időt töltöttek a fiatal patkány (Stim1) vizsgálatával a +/+ patkányokhoz képest (genotípus hatás). Így minden patkánynak volt esélye emlékezni a Stim1-re a kísérlet következő fázisában.

El kell ismernünk azonban, hogy az antipszichotikus kezelés csökkentette a Stim1 vizsgálatára fordított időt (kezelési hatás). Ez minden (akut, szubakut és krónikus) aripiprazol- és haloperidol-kezelésnél szignifikáns volt, de ismételt klozapin, olanzapin és riszperidon kezelés után is. Mindazonáltal ez a – feltehetően szedatív – hatás egyaránt érintette a +/+ és a di/di állatokat (nincs genotípus x kezelés interakció). Ezért a genotípusok közötti memóriakülönbség nem tulajdonítható ennek a jelenségnek. Ráadásul még a legalacsonyabb mintavételi idő is 20% felett volt (nagyjából 1 perc), ami elegendő időt biztosít a mintavételre.

SCZ-szerű viselkedés kimutatása: A teljes megfigyelési időszak alatt (azaz akut, szubakut és krónikus kezelést követően is) a vivőanyaggal kezelt di/di patkányok rövid távú memóriája gyenge volt, mivel a DI értéke nem tért el szignifikánsan a nullától. Ezzel szemben a +/+ kontrollcsoportnak mindvégig mérhető volt szociális memóriája. Az aripiprazol és az olanzapin képesek voltak normalizálni a di/di patkányok szociális memória hiányát anélkül, hogy befolyásolták volna a +/+ állatok ép memóriáját. Ez a hatás független volt a kezelés időtartamától. A haloperidol kezelés egyáltalán nem volt hatékony, míg a klozapin és riszperidon kezelés hatása ellentmondásos volt, szignifikánsan növelte a DI-t di/di-ben, de a legtöbb esetben csökkentette +/+ patkányokban.

4.1.2 Szociális elkerülés teszt

Rekeszpreferencia: Egyik állat sem részesítette előnyben az ismeretlen, nagy rekeszt, amelyben egy ivarérett, hím stimulus állat található (kevesebb, mint 50% itt töltött idő). Az ismételt tesztelés során (1 hét különbséggel) megnőtt az érdeklődés (időhatás). A kezelés (az aripiprazol kivételével) jelentősen csökkentette a „szociális” részlegben töltött

időt, ami káros mellékhatásra utal. Ennek ellenére nem volt különbség a genotípusok között, és a genotípus sem a kezelés hatását, sem az időt nem befolyásolta.

SCZ-szerű tünetek kimutatása: Az 1. napon szignifikáns különbség volt a vivőanyaggal kezelt di/di és a kontrollcsoport között a stimulus állattal való közvetlen interakció időtartamában. Ez a különbség a következő vizsgálatok során eltűnt. A 8. vivőanyag injekciót követően a di/di patkányok szignifikánsan később kezdték meg a társas interakciót, mint a megfelelő kontrollok. Hasonló különbség nem volt látható az 1., vagy 15. injekció után.

Minden kezelés csökkentette a stimulus állatokkal töltött időt. Logikus módon ez a kölcsönhatás később kezdődött, kivéve az aripiprazollal kezelt csoportokat, amelyek tekintetben hasonlóak voltak a kontrollhoz. A genotípusnak nem volt hatása, és a kezelések hatásait sem módosította.

4.1.3 Prepulse inhibition teszt

SCZ-szerű tünetek kimutatása: az AVP-hiányos, vivőanyaggal kezelt patkányok minden vizsgálati napon csökkent PPI-t mutattak a +/+ C csoporthoz képest.

Az antipszichotikumok hatásai: A 15. aripiprazol kivételével minden kezelésnél eltűnt a genotípusok közötti különbség minden vizsgált időpontban. A kezelt di/di patkányok azonban szignifikánsan különböztek a vivőanyaggal kezeltektől, de csak ismételt kezelés után (kivéve az olanzapint, ahol az egyszeri kezelés is hatásos volt).

4.2 2. kísérlet: Brattleboro patkánykölykök ultrahang vokalizációjának mérése antipszichotikus kezelés során

A genotípus minden esetben szignifikánsan befolyásolta a kibocsátott USV számát és időtartamát, a di/di kölyköknél alacsonyabb szinten. Az ACTH szintek mindig szignifikánsan alacsonyabbak voltak a di/di patkányokban, mint a di/+ állatokban, míg a kortikoszteron szint mindig magasabb volt.

4.2.1 Első generációs antipszichotikus hatás az MS-USV-re

A haloperidol kezelés nem befolyásolta az MS-USV-t, továbbá dózisfüggően növelte az ACTH és a kortikoszteron szintjét anélkül, hogy kölcsönhatásba lépne a genotípus hatással.

4.2.2 Második generációs antipszichotikus hatás az MS-USV-re

A klozapin, olanzapin, riszperidon és aripiprazol alacsonyabb dózisa normalizálták a kibocsátott MS-USV-t a di/di kölykökben a di/+hoz képest. Ezzel szemben a nagyobb

dózisok a di/+ kölykök vokalizációját di/di szintre csökkentették. A magasabb dózisok szedatív hatásúak voltak a viselkedési tesztek során, és szignifikánsan növelték az ACTH és a kortikoszteron szintet. A di/di állatokban nem volt ACTH emelkedés.

4.3 3. kísérlet: Vazopresszin receptor-antagonisták hatása az anyai elválasztás-indukálta ultrahang vokalizációra

4.3.1 Genetikai AVP-hiány

Az AVP-hiányos Brattleboro patkányok (di/di) kevésbé szorongtak a kibocsátott USV száma és időtartama alapján, mint heterozigóta alomtársaik. Ezzel összefüggésben az ACTH szintjük szignifikánsan alacsonyabb volt, a kortikoszteronszint jelentős változása nélkül. A righting reflex és a negatív geotaxis értékek hasonlóak voltak a két genotípusban.

4.3.2 Farmakológiai AVP-hiány

4.3.2.1 *V1aR* antagonista

A *V1aR* antagonista kezelés csak 30 mg/kg koncentrációban csökkentette az MS-USV-t, míg a kortikoszteron szint szignifikánsan magasabb volt a 30 mg/kg antagonistával kezelt csoportban. Nem volt különbség a csoportok között a hasrafordulási reflex latenciájában, valamint a negatív geotaxisban.

4.3.2.2 *V1bR* antagonista

A *V1bR* antagonista kezelés csökkentette a kibocsátott USV számát az ACTH szint csökkenésével, a kortikoszteron változása nélkül. Nem volt különbség a csoportok között a hasrafordulási reflex és a negatív geotaxis latenciájában.

4.3.2.3 *V2R* antagonista

A 3 mg/kg *V2R* antagonista kezelés fokozta az MS-USV-t, míg a magasabb dózisok nem voltak hatással az MS-USV-re. Mindkét stresszhormon szint magasabb volt 45 perccel egyszeri 30 mg/kg *V2R* antagonista kezelés után, mint a kontroll csoportban. Nem volt különbség a csoportok között a righting reflex latenciájában, valamint a negatív geotaxisban.

4.3.2.4 *V1aR+V1bR* antagonisták

A *V1a* és *V1bR* antagonisták kombinációja hatékonyan csökkentette az MS-USV-t, anélkül, hogy bármilyen hatással lett volna a stresszhormonokra. Ugyanekkora dózisú

V1aR antagonistá 34,3%-os, illetve 26,8%-os nem szignifikáns csökkenést indukált az MS-USV hívások számában és időtartamában, míg a V1b esetében 51,5%-os és 54,3%-os szignifikáns csökkenés volt látható. A kombináció 57,1%-kal csökkentette az MS-USV hívások számát, és 68,53%-kal csökkentette az időtartamot. Nem volt különbség a csoportok között a hasrafordulási reflex latenciájában, valamint a negatív geotaxisban.

4.3.3 Korrelációk

Ahogy az várható is volt, az anyai elválasztás-indukálta kibocsátott USV száma és időtartama minden kísérleti sorozatban pozitívan korrelált egymással. Érdekes módon ugyanez igaz volt az ACTH és a kortikoszteron korrelációra is, kivéve a Brattleboro patkányok esetében, ahol egyáltalán nem volt összefüggés. Brattleboro patkányokban a hipofízis AVP tartalma szignifikáns pozitív korrelációt mutatott az MS-USV hívások számával és időtartamával. Sőt, esetükben a szérumban ACTH szint is pozitív korrelációt mutatott az MS-USV hívások számával. Érdekes módon hasonló ACTH és MS-USV hívásszám-korrelációt detektáltunk V1bR antagonistá kezelés után.

4.4 4. kísérlet: Magnocelluláris AVP szerepe a szociális viselkedésben

A korábbi eredményeknek megfelelően az AVP-AAV injekció a SON-ban fiziológiailag és funkcionálisan is helyreállította a lokális AVP szintézist.

A szociális érdeklődés teszt során a di/di-AVP patkányok több időt töltöttek a juvenilis vizsgálatával, mint a +/+ és a di/di állatok.

Az RI tesztben az agresszió kvantitatív mértéke (harapások száma) csökkent a di/di-AVP patkányokban a +/+-hoz képest, ami szintén alacsonyabb tendenciát mutat a di/di csoporthoz képest.

4.5 5. kísérlet: A Brattleboro patkány agy epigenetikai változásainak vizsgálata immunhisztokémiával

A következő agyi régiókat vizsgáltuk: a nucleus accumbens core (AcbC) és shell (AcbS) régióit, a prefrontális kéreg (PFC) prelimbic (PrL), infralimbicus (IL) és dorsalis peduncularis (DP) alrégióit; a dorsalis (LSD), "intermediate" (LSI) és ventrális (LSV) részeit a laterális septumnak (LS), valamint a dorsalis HC CA1, CA2 és CA3 alrégióit.

Di/di állatokban az AcH3K9 immunfestés szignifikánsan kevesebb jelölt sejtet mutatott a PFC DP-ben, mint a +/+ patkányokban. A többi vizsgált PFC területen (PrL és

IL) nem volt kimutatható különbség a genotípusok között. Az AcH3K9 immunhisztokémiája nem mutatott szignifikáns különbséget a di/di és +/+ állatok között sem a teljes Acb-ben, sem a külön vizsgált magban (AcbC) és héjban (AcbS). Az LS-ben csak az LSV kompartmentben volt szignifikánsan kevesebb AcH3K9 immunpozitív sejt di/di-ben, a +/+ patkányokhoz képest. A CA1-ben szignifikánsan több AcH3K9 jelölt sejt volt di/di patkányokban, mint +/+ -ban, míg CA2-ben és CA3-ban nem volt genotípus-hatás.

A vizsgált agyterületek értékeit korreláltattuk egymással. Szignifikáns pozitív korreláció volt a DP és az AcbC, LSI és LSV között. Az AcbC régió szignifikánsan korrelált a CA3-mal, míg az AcbS régió pozitívan korrelált az LSD-vel, LSI-vel és LSV-vel.

5 Következtetések

Vizsgálataink széleskörűen tanulmányozták az AVP-hiányos Brattleboro patkányt, mint a SCZ lehetséges modelljét, több szempontból is, hogy megerősítsük a preklinikai kutatásra való alkalmasságát.

Megerősítettük, hogy a klinikailag hatékony antipszichotikumok enyhítették a SCZ-szerű tüneteket felnőtt, hím AVP-hiányos Brattleboro patkányokban. Így a törzs terápiás válasza a gyógyszeres kezelésre hasonló a humán SCZ-betegekéhez. Ezért prediktív validitása alapján ez az állat a SCZ jó preklinikai modellje lehet. A PPI-ről feltételezték, hogy a kognitív deficitet modellezi, ám pozitív és negatív tünetként is értelmezhető. Ezenkívül a szociális diszkrimináció teszt (SD) a kognitív tüneteket modellezi. Mivel az új gyógyszereknek a jelenleg alacsony hatékonysággal kezelhető negatív és kognitív tüneteket kellene megcélözniük, ez lehet ennek a modellnek a különleges erőssége, mivel a di/di Brattleboro patkányok negatív és kognitív SCZ-szerű tüneteket mutatnak.

Emellett a 7-8 napos di/di Brattleboro patkánykölyök jó modell lehet a SCZ kommunikációs deficitjére. Ez az állatmodell kiváló lehetőség lehet az újonnan kifejlesztett gyógyszerek tesztelésére: a kísérletünkben használt összes antipszichotikum alacsonyabb dózisban "normalizálta" az MS-USV-t AVP-hiányos állatokban. Továbbá a farmakológiailag előállított AVP-hatás hiány következtében a Wistar patkánykölyök

MS-USV-je szintén csökkent a kontrollokhöz képest, és pozitív korrelációt mutatott az agyalapi mirigy AVP-szintjével, megerősítve ennek a neuropeptidnek a szeparáció által kiváltott vokalizációban betöltött szerepét.

Emellett kimutattuk, hogy a SON-ból származó AVP hozzájárulhat a rágsálók szociális viselkedésének finomhangolásához, esetleg a MeA-t is magában foglaló útvonalon keresztül.

A di/di Brattleboro patkányoknál tapasztalt viselkedési hiányosságok lehetséges, hogy epigenetikai változások következtében jelennek meg, ami szintén megerősítheti a di/di patkány, mint SCZ modell validitását, ugyanis korábbi human és állatmodell vizsgálatok is kimutatták az általunk vizsgált specifikus epigenetikai változást a SCZ-val összefüggésben. Ennek a lehetséges kapcsolatnak a feltárásához azonban további vizsgálatokra van szükség.

6 Saját publikációk jegyzéke

Disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

Török, B., C. L. Fazekas, A. Szabo, and D. Zelena. **2021.** "Epigenetic Modulation of Vasopressin Expression in Health and Disease." *Int J Mol Sci* 22 (17). doi: 10.3390/ijms22179415 **IF: 5.92**

Török, B., A. Fodor, B. Klausz, J. Varga, and D. Zelena. **2021.** "Ameliorating schizophrenia-like symptoms in vasopressin deficient male Brattleboro rat by chronic antipsychotic treatment." *Eur J Pharmacol* 909:174383. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174383. **IF: 4.43**

Török, B., A. Fodor, S. Zsebok, E. Sipos, and D. Zelena. **2021.** "The Effect of Vasopressin Antagonists on Maternal-Separation-Induced Ultrasonic Vocalization and Stress-Hormone Level Increase during the Early Postnatal Period." *Brain Sci* 11 (4). doi: 10.3390/brainsci11040444. **IF: 3.11**

Török, B., and D. Zelena. **2019.** "Vasopressin and Schizophrenia." *Advances in Health and Disease*, Edited by Lowell T. Duncan 12:Chapter 7.

Demeter, K., **B. Török,** A. Fodor, J. Varga, S. Ferenczi, K. J. Kovacs, I. Eszik, V. Szegedi, and D. Zelena. **2016.** "Possible contribution of epigenetic changes in the development of schizophrenia-like behavior in vasopressin-deficient Brattleboro rats." *Behav Brain Res* 300:123-34. doi: 10.1016/j.bbr.2015.12.007. **IF: 3.32**

Egyéb közlemények:

Fazekas, CL., Bellardie, M., Török, B., Sipos, E., Tóth, B., Baranyi, M., Sperlágh, B., Dobos-Kovács, M., Chaillou, E., and Zelena, D. **2021**. "Pharmacogenetic excitation of the median raphe region affects social and depressive-like behavior and core body temperature in male mice." *Life Sci.* 2021 Dec 1;286:120037. doi: 10.1016/j.lfs.2021.120037. **IF: 5.037**

Bruzsik, B., Biro, L., Sarosdi, KR., Zelena, D., Sipos, E., Szebik, H., Török, B., Mikics, E., and Toth, M. **2021**. "Neurochemically distinct populations of the bed nucleus of stria terminalis modulate innate fear response to weak threat evoked by predator odor stimuli." *Neurobiol Stress.* 2021 Oct 29;15:100415. doi: 10.1016/j.ynstr.2021.100415. **IF: 5.441**

Chaves, T., C. L. Fazekas, K. Horvath, P. Correia, A. Szabo, **B. Török**, K. Banrevi, and D. Zelena. **2021**. "Stress Adaptation and the Brainstem with Focus on Corticotropin-Releasing Hormone." *Int J Mol Sci* 22 (16). doi: 10.3390/ijms22169090. **IF: 5.92**

Sipos, E., **B. Török**, I. Barna, M. Engelmann, and D. Zelena. **2020**. "Vasopressin and post-traumatic stress disorder." *Stress* 23 (6):732-745. doi: 10.1080/10253890.2020.1826430. **IF: 3.10**

Fazekas, C. L., E. Sipos, T. Klaric, **B. Török**, M. Bellardie, G. N. Erjave, M. N. Perkovic, G. Lauc, N. Pivac, and D. Zelena. **2020**. "Searching for glycomic biomarkers for predicting resilience and vulnerability in a rat model of posttraumatic stress disorder." *Stress* 23 (6):715-731. doi: 10.1080/10253890.2020.1795121. **IF: 3.10**

Matuska, R., D. Zelena, K. Konczol, R. S. Papp, M. Durst, D. Guba, **B. Török**, P. Varnai, and Z. E. Toth. **2020**. "Colocalized neurotransmitters in the hindbrain cooperate in adaptation to chronic hypernatremia." *Brain Struct Funct* 225 (3):969-984. doi: 10.1007/s00429-020-02049-y. **IF: 3.30**

Szonyi, A., K. Zicho, A. M. Barth, R. T. Gonczi, D. Schlingloff, **B. Török**, E. Sipos, A. Major, Z. Bardoczi, K. E. Sos, A. I. Gulyas, V. Varga, D. Zelena, T. F. Freund, and G. Nyiri. **2019**. "Median raphe controls acquisition of negative experience in the mouse." *Science* 366 (6469). doi: 10.1126/science.aay8746. **IF: 41.85**

Török, B., E. Sipos, N. Pivac, and D. Zelena. **2019**. "Modelling posttraumatic stress disorders in animals." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 90:117-133. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.11.013. **IF: 4.36**

Balazsfi, D., A. Fodor, **B. Török**, S. Ferenczi, K. J. Kovacs, J. Haller, and D. Zelena. **2018**. "Enhanced innate fear and altered stress axis regulation in VGluT3 knockout mice." *Stress* 21 (2):151-161. doi: 10.1080/10253890.2017.1423053. **IF: 3.10**

Balazsfi, D., O. Pinter, B. Klausz, K. B. Kovacs, A. Fodor, **B. Török**, M. Engelmann, and D. Zelena. **2015**. "Restoration of peripheral V2 receptor vasopressin signaling fails to correct behavioral changes in Brattleboro rats." *Psychoneuroendocrinology* 51:11-23. doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.09.011. **IF: 4.73**