

Zárójelentés a T 043161 számú OTKA szerződéshez

Témavezető neve: dr Makara B. Gábor

A téma címe: A hipofízis-mellékvesekéreg rendszer agyi szabályozása krónikus stresszt okozó betegségmodellekben

A kutatás időtartama: 2003. április 1.- 2006. december 31.

Jelenlegi pályázatunk egy korábbi, T 025845 jelű (1998-2001 között támogatott) "A hypophysis-mellékvesekéreg rendszer szabályozása krónikus stresszben" című pályázatunk természetes folytatása.

Betegségmodellek alkalmazásával nyert eredményeink a következők:

1. Az orvosbiológiai kutatásokban legáltalánosabban alkalmazott Wistar patkányokon kezdtük meg vizsgálatainkat.

a. A streptozotocin injekció által előidézett cukorbetegség fontos klinikai kórkép modellje. Bizonyítottuk, hogy a streptozotocin iv injekciójával cukorbetegé tett állatokban kialakultak a krónikus stresszre jellemző szomatikus (testsúly és csecsemőmirigysúly csökkenés, mellékvesesúly növekedés) és endokrin paraméterek (nyugalmi kortikoszteron szint emelkedés, az agyalapi mirigy első lebenyében az adrenokortikotróp hormon (ACTH) prekursor proopiomelanokortin (POMC) mRNS szint emelkedés). Ebben a modellben megvizsgáltuk a nucleus paraventricularis hypothalami (PVN) kiirtásának hatását és azt találtuk, hogy az alap kortikoszteron emelkedést egyáltalán nem, míg a POMC mRNS emelkedést csak részben védte ki, de a kiterjedtebb agyi összeköttetéseket megszüntető anterolaterális átvágás sem volt hatásosabb. Ezen adatok arra utalnak, hogy a cukorbetegség krónikus stresszre jellemző szomatikus paraméterek kialakításáért inkább perifériás mechanizmusok felelősek. A csökkent POMC mRNS szint ellenére megtartott kortikoszteron szekréció direkt mellékvese szabályozás jelenlétére utal. (közölve: Am J Physiol Endocrinol Metab 290: E243–E250, 2006).

b. A stresszhez való alkalmazkodás a homeosztázis fenntartásának nélkülözhetetlen eleme. A hypothalamo-hypophysis-mellékvese tengely (HHM) a fő megvalósítója a hormonális stressz reakciónak. Ebben a munkánkban arra kerestük a választ, hogy krónikus stressz során hogyan változik a tengely különböző szintjeinek érzékenysége. Mivel az emelkedett glukokortikoid szintek ellenére a tengely működése megtartott, azt feltételezhetjük, hogy a fokozott visszajelentés kiküszöbölésére az érzékenységnek nőnie kell és a visszajelentés gátló hatása pedig csökken. Háromféle 14 napos stresszmodellben (ismételt mozgáskorlátozás-restraint; streptozotocin-indukálta cukorbetegség; megjósolhatatlan stressz-depresszió modell) bizonyítottuk a stressz krónikussá válását testsúly- és csecsemőmirigysúly-csökkenés, mellékvesesúly-emelkedés és alap kortikoszteron-szint emelkedés mérésével. A legerőteljesebb elváltozások a cukorbeteg állatoknál voltak megfigyelhetőek. A stressz általános

mechanizmusainak megismerése céljából mindhárom modellben megvizsgáltuk a HHM tengely érzékenységét. *In vitro* szuperfúziós rendszerben a krónikusan stresszelt állatokból származó mellékvesék ACTH érzékenységét hasonlítottuk össze kontroll állatokkal kortikoszteron mérés segítségével, míg statikus inkubálással (mely alkalmas volt a szekréción túl a ciklikus AMP változás detektálására is) a hypophysisek kortikotrop elválasztást serkentő hormonra (CRH) adott reakcióit vizsgáltuk. A glukokortikoid feedback tanulmányozására a dexametazon gátló hatását vizsgáltuk *in vivo* mozgáskorlátozás-indukálta ACTH és kortikoszteron emelkedésre. A hypophysisben a CRH-val stimulált cAMP válasz minden krónikusan stresszelt csoportban kisebb volt. Jelentős ACTH érzékenység csökkenés csak a cukorbeteg állatok mellékveséjénél volt megfigyelhető. A dexametazon hatása enyhén fokozódott a cukorbeteg csoportban, míg a másik két stressznél nem találtunk változást. Eredményeink azt mutatták, hogy - feltevésünkkel ellentétben - az elhúzódó ingerek hatására a hypophysis és a mellékvese érzékenysége inkább csökken az elválasztásukat elsődlegesen serkentő molekulákra, míg a visszajelentés hatékonysága inkább nő. Minél erősebb a stressz, annál erőteljesebb változásokat tapasztalhatunk. (poszter: Magyar Endokrin és Anyagcsere Társaság konferenciája, 2006)

c. Krónikus ismételt mozgáskorlátozás (restraint, R) hatását megvizsgáltuk a hypothalamus és agytörzs prolactin-releasing peptide (PrRP) expressziójára különös tekintettel a nemi különbségekre. Az agytörzsben, ahol a PrRP az A1 és A2 katekolaminerg sejtcsoportokban noradrenalinval kolokalizál a tyrosine hydroxylase (TH) expresszióját is nyomon követtük. Az agytörzsben a nőstényekben magasabb nyugalmi PrRP expresszió volt megfigyelhető, míg ez a nemi különbség a hypothalamusban nem jelentkezett. A mozgáskorlátozás hatására mindhárom vizsgált régióban megnövekedett a PrRP expresszió, a legkisebb reakció, a nőstények agytörzsében volt megfigyelhető. Ezzel ellentétben a mozgáskorlátozás hatására létrejövő TH emelkedés nem mutatott nemi különbséget. A mozgáskorlátozás hatására létrejövő PrRP emelkedés relatíve magasabb volt, mint a TH emelkedés, eltolódást okozva ezzel az agytörzsi PrRP-TH kolokalizációban. A PVN kétoldalú kiirtása nem befolyásolta a mozgáskorlátozás hatására létrejött változásokat, de nyugalmi állapotban mind a PrRP, mind a TH mRNA expressziót csökkentette az A2 sejtcsoportban. A mozgáskorlátozás hatására az A1/A2 neuronokban megfigyelhető megemelkedett PrRP produkció a szintén emelkedett PrRP-TH aránnyal együtt arra utal, hogy a krónikus stressz állapot kialakulása során élesen elkülönül a medulláris TH és PrRP expresszió szabályozása, valószínűleg a HHM érzékenységét befolyásolva ezzel. (közlésre elküldve: Am J Physiol, 2006)

d. Általános nézet szerint az akut stressz alatt felszabaduló glukokortikoidok fekély képződést indukálnak. Különböző kísérleteinkben az állatok kortikoszteron szintjét, vagy hatását megpróbáltuk csökkenteni (a PVN vagy a mellékvese kirtásával, farmakológiai dózisú kortizol (300mg/kg ip) adásával, RU-38486 glukokortikoid receptor antagonistá alkalmazásával). A kialakuló alacsony kortikoszteron szintek hatását vizsgáltuk a fekélyképződésre különböző modellekben (víz-mozgáskorlátozás, hideg-mozgáskorlátozás, valamint indometacin vagy aszpirin injekció). Valamennyi kísérletünkben sikerült bizonyítanunk a glukokortikoidok gyomornyálkahártya védő szerepét, mely szerep az általános nézettel ellentétes. Kísérleteink folytatásaként a

krónikus stressz okozta tartós glukokortikoid emelkedés esetleges gyomornyálkahártya-védő hatását vizsgáltuk. A számos előző kísérletben alkalmazott 14 nap mozgáskorlátozást választottuk előzetes ingerként és indometacinnal előidézett gyomorfekély esetén vizsgáltuk a megemelkedett nyugalmi kortikoszteron szint védő hatását. Eredményeink csak részben erősítették meg az elméletileg elvárt védő hatást, a vártnál nagyobb egyéni érzékenység különbségeket figyeltünk meg (közlésre előkészítés alatt).

e. Az akut stressz jelentőségét az ischémiás szívbetegség súlyosbításában kimutatták. Kevés adat áll rendelkezésre azonban a krónikus stressz hatásáról. Előző kísérletünkkel összhangban itt is 14 nap mozgáskorlátozás hatását vizsgáltuk két angina modellben (Tonogén-Regitin és Ornipresszin) a bekövetkező vérnyomás- és EKG-változásokra hím Wistar patkányban. Mindkét esetben kialakultak az anginára jellemző EKG elváltozások a járulékos vérnyomásváltozásokkal együtt, és az előzetes krónikus stressz nem volt igazán jelentős befolyással ezen paraméterekre (közlésre előkészítés alatt).

f. A krónikus stresszben a HHM tengely aktivációjában a vazopresszin szerepe több közlemény szerint előtérben kerül. Ezen kísérleteink során Wistar patkányok hypophysis nyelének roncsolásával olyan állapotot hoztunk létre, amikor a vazopresszin a perifériáról hiányzik, viszont a portális keringésbe fokozott mértékben ürül, azaz a HHM tengely szabályozását tekintve fokozott AVP expresszióról beszélhetünk. Kísérletünkben 5 nappal a műtét/álműtét után 2 hétig napi 1 órára mozgáskorlátozós stressznek tettük ki az állatokat, majd a 15 napon a harmaduk egy 15. ugyanolyan stresszt is kapott, a harmadukat pedig hipertóniás só, mint heterológ stressz hatásának tettük ki. A műtét hatására az állatok vízfogyasztása 3-4-szeresére nőtt, testsúlyuk elmaradt a kontrollokhoz képest, a hipofízis hátsó lebenyének oxytocin és vazopresszin tartalma jelentősen csökkent, míg az eminentia mediana oxytocin tartalma 4-8-szoros emelkedést mutatott, addig az eminentia mediana vazopresszin tartalmának emelkedése enyhe mértékű volt. A 2 hét stressz létrehozta a krónikus stresszre jellemzően a testsúlycsökkenést a csecsemőmirigy súlyának csökkenését és enyhe mértékben a mellékvesesúly növekedését. A nyélzúzás a krónikus stressz jellemző szomatikus paramétereit nem változtatta meg. A krónikus stressz hatására kialakul az alap kortikoszteron szint emelkedés is, míg a nyélzúzás önmagában a krónikus stressznél nagyobb mértékű emelkedést hoz létre, s a krónikus stressz enyhe, nem szignifikáns emelkedést képes ezen állatokban létrehozni. Az alap ACTH és prolaktin szinteket a krónikus stressz nem befolyásolta. Akut mozgáskorlátozás emeli az ACTH, kortikoszteron és prolaktin szinteket, míg a hipertóniás só kisebb mértékű ACTH és kortikoszteron emelkedést okoz prolaktin emelő hatás nélkül. Előzetes krónikus stressz nem befolyásolja az állatok reaktivitását, míg a nyélzúzás önmagában csökkenti (kb 30 %-al) a 15. mozgáskorlátozás ACTH emelő hatását, míg a kortikoszteron szekréciót nem befolyásolja, és hipertóniás só adása esetén pedig mindkét hormon szintjének jelentős csökkenése (50 illetve 40%) figyelhető meg. A krónikus stressz a nyélzúzás akut stresszt befolyásoló hatását csak a homológ stimulus esetén ACTH vonatkozásban erősítette. A nyélzúzás az alap prolaktin szinteket emelte, a stresszelteket pedig csökkentette a krónikus stressz alkalmazásától függetlenül. Következtetés: kísérleteinkben a 14 nap mozgáskorlátozás során kialakultak ugyan a krónikus stresszre jellemző szomatikus paraméterek, de a HHM tengely

reaktivitása változatlan. A nyélzúzás nem befolyásolta a szomatikus paramétereket és a krónikus stresszel sem mutatott semmilyen kölcsönhatást (a kis ACTH szint csökkenéstől eltekintve a 15. mozgáskorlátozás vonatkozásában, lsd. PVN lézió). Ez arra utal, hogy a nyélzúzás kapcsán végbemenő hormonális változások elsősorban a HHM tengely alap aktivitását (kortikoszteron alapszint emelkedés) és akut stressz reaktivitását befolyásolják, az ismételt ingerek esetén korlátozott a szerepük. A homológ stimulus esetén elsősorban az ACTH szintjében okoz a nyélzúzás változást, míg hipertóniás só adásakor ACTH/kortikoszteron szint csökkenés is létrejön, ami valószínűleg az 1 órás mozgáskorlátozás esetén a hormonok szintjének eltérő időbeli lefutásával magyarázható és nem tekinthető szisztémás különbségnek.

2. Általános nézet szerint a krónikus stressz alatt megfigyelhető szabályozás abban tér el az akuttól, hogy ekkor a PVN kissejtes (CRH) neuronjaiban kolokalizált vazopresszin szerepe megnő a HHM tengely szabályozásában. Ezen nézet tesztelésére természetes mutációval vazopresszin hiányossá vált Brattleboro állattörzset használtunk. Amennyiben a vazopresszin szerepe nagyon fontos, akkor hiányában a krónikus stresszre jellemző tünetek (testi tünetek (testsúlycsökkenés, mellékvese súlyának növekedése, csecsemőmirigy súlyának csökkenése), alap kortikoszteronszint emelkedés és POMC mRNS emelkedés az agyalapi mirigyben) nem figyelhetők meg. (Ann NY Acad Sci 1018: 151-161; 2004)

a. A streptozotocinnal előidézett cukorbetegségről igazoltuk, hogy krónikus stressz állapotot idéz elő patkányokban. A vazopresszin szerepét ebben a folyamatban is megvizsgáltuk. A vazopresszin hiányos Brattleboro patkányainkat heterozigóta testvéreikkel hasonlítottuk össze és két héttel egyszeri streptozotocin injekciót követően megvizsgáltuk őket. A cukorbetegség megjelenése (megnőtt vízfogyasztás és megemelkedett vércukorszint), valamint a krónikus stresszre jellemző szomatikus paraméterek elvárásunkkal ellentétben vazopresszin hiányában ugyanúgy kialakultak. A PVN-ben mérhető CRH mRNS szinteket a cukorbetegség csökkentette, míg a vazopresszin hiánya növelte, de egymás hatását nem befolyásolták. A cukorbetegség hatására megemelkedett hipofízis elülső lebeny POMC mRNS szint és nyugalmi kortikoszteron szint sem változott vazopresszin hiányában. Azaz a vazopresszin hiánya nem befolyásolta a cukorbetegség okozta krónikus stressztünetek kialakulását. (közlés: Am J Physiol Endocrinol Metab 290: E243–E250, 2006; Brain Research Bulletin 69 (2006) 48–56)

b. A vazopresszin szerepének elvonás-hozzászokásban betöltött vizsgálatára Brattleboro patkányokat 16 napon át morfinnal kezeltük, majd az elvonás hatására aktiválódó HHM tengelyt vizsgáltuk. A szomatikus paraméterek (testsúly és csecsemőmirigysúly csökkenés, mellékvesesúly emelkedés) és a megemelkedő alap kortikoszteron-szint jelzik, hogy állataink a krónikus stressz állapotába kerültek, de ezen paraméterek vazopresszin hiányában is ugyanúgy megjelentek. Az ACTH és kortikoszteron emelkedéssel jellemezhető elvonás kevésbé aktiválta a vazopresszin hiányos állatok HHM tengelyét. Az ismételt morfin kezelés megemelte a PVN CRH mRNS szintjét, de a vazopresszin hiánya önmagában is hasonló változásokat indukált a morfin további hatása nélkül. Az amygdala CRH mRNS szintjei csak a kezeletlen vazopresszin hiányos

állatokban voltak magasabbak és morfin kezelés hatására csökkentek. A vazopresszin mRNS szintek ismételt morfin adagolás hatására megemelkedtek, de a vazopresszin hiányos állatokban ez az emelkedés elmaradt. Eredményeink alátámasztják, hogy a vazopresszinnek a HHM tengely szabályozásában betöltött szerepe inkább az akut, mint a krónikus változások során fontos. (Magyar Idegtudományi Társaság ülése, 2005; közlésre előkészítve: Psychoneuroendocrinology)

c. Párhuzamosan folyó kísérleteinkben kimutattuk, hogy a vazopresszin fontos szerepet játszik a depresszió kialakulásában, a vazopresszin hiányos állataink csökkent depresszió-szerű magatartást mutattak. Jelen munkánkban azt vizsgáltuk, hogy a vazopresszin hiányos állatok ellenállóbbak-e a krónikus HHM tengely hiperaktivitás kialakulására a depressziómodellként ismert krónikus enyhe stressz (chronic mild stress, CMS) során. Hím vazopresszin hiányos Brattleboro patkányokat heterozigóta testvéreikkel hasonlítottunk össze. A krónikus enyhe stressz különféle enyhe stimulusok (pl. vizes vagy megdöntött doboz, megvilágítás változása) 6 héten át történő alkalmazásából állt. A plazma kortikoszteron szintjének változását ismételt farokvágással követtük, míg a különféle szerveket és a törzsvért dekapitálás útján nyertük. A kontrollokban a krónikus enyhe stressz létrehozta a jellemző szomatikus (súlynövekedés elmaradása, csecsemőmirigy beolvadás) és endokrin (nyugalmi plazma ACTH és kortikoszteron, valamint hipofízis első lebeny POMC mRNS szint emelkedés) változásokat. Várakozásunkkal ellentétben a vazopresszin hiánya egyik változást sem befolyásolta. Eredményeink arra utalnak, hogy vagy a vazopresszin nem elengedhetetlen a krónikus stressz által előidézett hipotalamo-hipofízis-mellékvese tengely elváltozások kialakulásához, vagy a Brattleboro állatainkban a vazopresszin szerepét valamilyen más kompenzáló tényező (pl. CRH) veszi át. (poszter, Magyar Idegtudományi Társaság ülése, 2007; közlésre elfogadva: Clinical Neuroscience)

d. Előzetesen úgy találtuk, hogy 2 hét ismételt mozgáskorlátozás során a vazopresszin elhanyagolható szereppel bír a HHM tengely aktiválásában. Mivel felmerült, hogy a két hét viszonylag rövid egy krónikus folyamatban, ezért vizsgálatainkat kiterjesztettük a vazopresszin 4 hét mozgáskorlátozás esetén betöltött szerepének tanulmányozására. Mind a szomatikus paraméterek, mind az alap kortikoszteron és hypophysis POMC mRNS vizsgálatok azt mutatták, hogy a vazopresszin hosszabb távon sem tölt be jelentős szerepet. Az agyi CRH mRNS a nucleus paraventricularisban bár alapszintben kissé emelkedett volt, ellenben csökkent emelkedést mutatott 28 nap mozgáskorlátozásra vazopresszin hiányában. A vazopresszin mRNS in situ hybridizációs vizsgálatok értékelése folyamatban van. In vitro vizsgálatokban a vazopresszin hiányos állatok mellékveséjének ACTH érzékenysége nagyobb, de a kontrollokéhoz hasonlóan csökken előzetes stresszelés hatására. Bizonyítottuk továbbá, hogy a mellékvesék kéregállománya megnő krónikus stresszelés hatására. (közlésre elfogadva könyvfejezetként: Focus on Neuropeptide Research)

f. Irodalmi adatok a terhességet és szoptatást, mint krónikus stressz állapotot kategorizálják. Vizsgálatunkban azt a hipotézist próbáltuk alátámasztani, hogy a vazopresszin alapvetően fontos a terhesség és szoptatás okozta krónikus HHM tengely változásokban. Vazopresszin hiányos nőstény Brattleboro patkányokat pároztattunk és a

terhesség, valamint 20-22 napos szoptatás után az állatokat dekapitáltuk. Kontrollként szűz nőtények, illetve heterozigóta állatok szolgáltak. A patkányok test és szervsúlyait megmértük, a vérükből radioimmun módszerrel hormon meghatározásokat végeztünk, a hipofízisből POMC mRNS szinteket mértünk in situ hibridizációval. A szoptató anyák test és mellékvese súlya nagyobb, csecsemőmirigyének súlya kisebb volt, mint a kontrolloké. A vazopresszin hiányában a mellékvesék súlyának emelkedése elmaradt. A nyugalmi állapotban mért ACTH szintek nem különböztek, míg a kortikoszteron szintek emelkedettek voltak a szoptató kontrollokban, de vazopresszin hiányában ez az emelkedés elmaradt. A prolaktin szintek nagyfokú variabilitást mutattak csoportok közötti különbségek nélkül. Az adenohipofízis POMC mRNS szintje magasabb volt mind a szoptató anyákban, mind a vazopresszin hiányában. A vazopresszin hiányos szoptató nőtények POMC mRNS szintje tovább emelkedett. A közti lebeny POMC mRNS szintje a vazopresszin hiányos szűz és szoptató állatokban egyaránt magasabb volt a szoptatás jelentős hatása nélkül. Eredményeink alátámasztják, hogy a terhesség és szoptatás során a nőtényekben kialakulnak a krónikus stresszre jellemző változások (csecsemőmirigy súlyának csökkenése, mellékvesék súlyának emelkedése, nyugalmi kortikoszteron plazma-szint és adenohipofízis POMC mRNS szint emelkedés). A vazopresszinnek a krónikus HHM tengely aktivitásban betöltött szerepét csak a mellékvesék vonatkozásában (súly és kortikoszteron produkció) tudtuk igazolni. A vazopresszin hiányában az egész hipofízisben megemelkedett POMC mRNS szintek alátámasztják a korábban Brattleboro hímeiben megfigyelt fokozott POMC termékek képződését, habár az elválasztás oldalán (ACTH és prolaktin plazma szintek) nem voltak láthatóak ezek a különbségek, valószínűleg a szintézis és elválasztás más lépéseinek megváltozása miatt. (poszter: Magyar Élettan Társaság Konferenciája, 2006)

3. Mivel a krónikus stressz tanulmányozása közben alkalmazott akut reaktivitás vizsgálataink arra utaltak, hogy a vazopresszinnek - irodalmi adatokkal ellentétben - inkább az akut, mint a krónikus stressz szabályozásában van szerepe, ezért kitértünk néhány akut stressz-szituáció jellemzésére. In situ hibridizációs és hormon méréseink arra utalnak, hogy a vazopresszin hiányos állatok HHM tengelye alap állapotban kissé aktívabb (csak egyes esetekben éri el a szignifikancia szintet), mint kontroll társaiké, de a stressz-reaktivitásuk csökkent. Ez a gyengült stressz-reaktivitás néhány stressz esetén szignifikáns (novelty, forced swim, mozgáskorlátozás, anaphylactoid reakciótojáshérje), más stresszek esetén csak tendenciaként jelentkezik (elevated plus maze, footshock, ip hipertóniás só, lipopoliszacharid injekció, agresszív kontaktus) és csak az ACTH hormon vonatkozásában figyelhető meg, nem jelentkezik a kortikoszteron plazmaszintekben. (poszter: Magyar Élettani Társaság Konferenciája, 2005)

4. Vazopresszin szerepének vizsgálata perinatális HHM tengely szabályozásban: A vizsgálati periódus alatt került sor intézetünkben új állatház beindítására és ezáltal lehetővé és szükségessé vált új, vírusmentes Brattleboro törzs telepítése, mely vazopresszin hiányos állatok a vazopresszin szerepére irányuló kísérleteink alapját jelentik. Tenyésztési eljárásokkal sikerült egy, az eddigi heterozigótáknál talán jobbnak tekinthető, alap génállományában a homozigóta vazopresszin hiányos állatokhoz közeli, *homozigóta normális kontroll* vonal beállítása is. Egy előkísérletben jelentős különbséget találtunk a 10 napos heterozigóta és homozigóta vazopresszin hiányos állatok 24 órás

anyai elválasztásra adott ACTH és kortikoszteron reakcióiban, ezért a tenyésztés beállítása során egyébként is feldolgozásra kerülő állatokban 10 napos korukban megvizsgáltuk az 1-4-12 és 24 órás elválasztás során létrejövő hormon-szint változásokat.

a. A korai életszakaszban bekövetkező események különleges fontossággal bírnak az egyed további fejlődésében. 10 napos korban az anyjuktól elválasztott kispatkányok felnőtt korukban depressziós tüneteket mutathatnak, melyek szoros összefüggésben állhatnak a kiskorban bekövetkező hormonális változásokkal. A depressziós állapotban fokozódik a HHM működése, melynek a vazopresszin jelentős szabályozó faktora. Munkánk során arra kerestük a választ vajon, hogyan módosul vazopresszin hiányában az anyai szeparáció kiváltotta ACTH és kortikoszteron szintek emelkedése. Kísérleteinkben vazopresszin termelő és vazopresszin hiányos Brattleboro kispatkányokat használtunk. A 10 napos korban 24 órára elválasztott kölykökben a szeparáció jelentős kortikoszteron emelkedést okozott mindkét genotípusban, ugyanakkor a vazopresszin hiányos csoportban az ACTH emelkedés elmaradt. A 24 órás elválasztás alatt a vazopresszin hiányos kontroll állatok testsúlynövekedés kisebb, elválasztott társaik testsúlycsökkenése pedig nagyobb mértékű. A vazopresszin hiányában a plazma ozmolalitása emelkedett és az ozmolalitásnak a szeparációnak egyik genotípusban sem volt hatása. Az ACTH és a kortikoszteron eltérő időgörbéje miatt 1-4-12-24 órás elválasztás hatásait is megvizsgáltuk. Ezen kísérletek esetében is hasonló eredményeket kaptunk: jelentősen emelkedett kortikoszteron szintek a vazopresszin hiányos kölykökben, ACTH szint emelkedés nélkül. A születés utáni tizedik nap a kicsikre jellemző csökkent stressz érzékenységi periódus (angol: stress hyporesponsive period=SHRP) közepén található így újabb kísérleteinkben fiatalabb (4-5 napos) és öregebb (20 napos) kispatkányokat választottunk el az anyjuktól 24 órára. Ebben az esetben is emelkedett ACTH szinteket csak a vazopresszint termelő kispatkányokban találtunk. Az emelkedés a 10 napos korban volt a legnagyobb. Ugyanakkor a kortikoszteron szintje az elválasztás hatására minden életkorban, mindkét genotípusban szignifikánsan megemelkedett. Összefoglalásul elmondhatjuk, hogy vazopresszin hiányában a HHM-tengely működése zavart szenved, ugyanakkor kísérleteinkben ez csak az ACTH szabályozását érintette. A vazopresszin hiányában is fennmaradó kortikoszteron emelkedés feltehetőleg nem a két hormon eltérő időgörbéjének következménye és nem korlátozódik a SHRP időszakára, hiszen a születés utáni 5. és 20. napon is fennáll. (poszter, Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság kongresszusa, 2006; közlésre elküldve: Endocrinology, 2007)

b. További kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy a vazopresszin hiányában csökkennek-e a perinatális szeparáció felnőttkori hatásai. Homozigóta vazopresszin hiányos Brattleboro patkányokat heterozigóta testvéreikkel hasonlítottuk össze. Egy alomban 6 hím állat volt és a kicsik felét 9 napos korukban 24h-ra elválasztottuk, majd visszahelyeztük az anyjuk alá. Vizsgálatainkat az állatok kb. 8 hetes korában kezdtük meg. A szeparált állatok szomatikus paraméterei (testsúly és csecsemőmirigysúly csökkenés, mellékvesesúly növekedés) nem mutattak egyértelmű eltérést a kontrolloktól azt jelezve, hogy markáns HHM tengely hiperaktivitás nem alakult ki az elválasztás hatására. A kisméretű testsúly elmaradás és kortikoszteron alapszint emelkedés, valamint a csökkent táplálékfelvétel csak a normális vazopresszin szintű állatokban volt

megfigyelhető. Felnőtt korokban az állatok mozgékonyágában, izomerejében és motorkoordinációjában számottevő eltérést nem tapasztaltunk. Ellenben a szorongás mérésére használt emelt keresztállás tesztben a kontroll állatok kevesebb időt töltöttek a nyílt karban, míg ez a vazopresszin hiányos állatokban nem volt kimutatható. A Porsolt tesztben nem találtunk fokozott depresszió hajlamot egyik csoportban sem. Eredményeink alátámasztják, hogy a perinatális szeparáció fokozott szorongáshoz vezethet a felnőtt korban, bár depressziós hajlam kialakulását nem igazoltunk. A vazopresszin hiányában csökkent a tünetek súlyossága, ami a vazopresszin oki szerepére utal a szeparációs szorongás kialakulásában. (poszter, Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság kongresszusa, 2006)

c. A szoptató anyák, valamint a kicsik stressz érzékenységének kiterjedt vizsgálata, továbbá az anyai nevelés hatásának a HHM tengelyre gyakorolt befolyása (Ann NY Acad Sci 1018: 477-479; 2004) vezetett ahhoz a vizsgálat sorozathoz, mely során heterozigóta és teljesen vazopresszin hiányos anyák utódainak fejlődését követtük nyomon. A heterozigóta utódok súlynövekedését nem befolyásolta az anya genotípusa (anyai magatartás). A vazopresszin hiányos anyától származó vazopresszin hiányos utódok elmaradtak mind a testvéreiktől, mind a heterozigóta anyától származó vazopresszin hiányos utódoktól. Kb. 10. naptól az anya genotípusának hatása csökken és előtérbe kerül az utód genotípusa. A vazopresszin hiányos utódok testi fejlődése általában gyorsabb, mint kontroll társaiké. Az anyai vazopresszin hiánya tovább gyorsítja a folyamatot. A korai fejlődésben nem tudtunk különbséget tenni a genotípusok között. Az elválasztás körül a vazopresszin hiányos állatok nehezebben adaptálódnak (Magyar Élettan Társaság Konferenciája, 2005).

5. Az egyre elterjedtebbé váló génmanipulált egerek kiterjedt alkalmazása miatt a krónikus stressz modelleket egérre is adaptálnunk kellett.

a. Egér morfin kezeléssel végzett további vizsgálataink célja, egy, az eddiginél egyszerűbben alkalmazható krónikus stressz-modell kialakítása és annak bizonyítása, hogy a krónikus stresszt az ismétlődő elvonási periódusok jelentik. Közölt eredményeink alapján az ismételt spontán elvonás csak enyhe stresszként jelentkezik, míg a naloxon által előidézett ismételt elvonások a krónikus stresszre jellemző HHM tengely eltéréseket okoznak. Ezen elváltozások erőteljesebbek, mint az általában alkalmazott krónikus stresszmodellekben megfigyelhetők (ismételt mozgáskorlátozás, patkány stressz). A legsúlyosabb elváltozások cukorbeteg állatokban voltak megfigyelhetők. (közlés: Neuroendocrinology 2005;81:205–215)

b. Az irodalom tanulmányozása során feltűnt, hogy az intermittáló morfin adás az egyszeri adásra megemelkedett mozgékonyág további érzékenyítését okozza. Kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy a magatartási érzékenyítés együtt jár-e a hormonális változások felerősödésével. Azt találtuk, hogy az ACTH emelkedés tekintetében a várttal ellentétesen, adaptáció jön létre, de a csatlakozó kortikoszteron szintek változatlan volta egy bizonyos mértékű érzékenyülésre utal. (közlés: Brain Research 1021 (2004) 63– 68)

6. A fokozódó drog fogyasztás, illetve a cannabinoid receptorok felfedezése következtében megnőtt az érdeklődés a lipid természetű neurotranszmitterek vizsgálata iránt. Intézetünkben elérhetővé vált az agyi szabályozásokban fontos CB1 receptor knockout egértörzs, így ennek a receptornak a vizsgálatát vontuk be krónikus stresszel kapcsolatos kutatásainkba.

a. Első lépésben akut stresszhelyzetben tűnt célszerűnek megvizsgálni a cannabinoid rendszer HHM tengely szabályozásában betöltött szerepét. A CB1 receptor knockout egerek alap plazma ACTH és kortikoszteron szintje magasabb volt és új-környezet (novelty) hatására is magasabb emelkedést mutatott. In vitro szuperfúziós rendszerben a hypophysisek szekrécióját vizsgáltuk. Nem találtunk különbséget a CB1 receptor knockout és vad típus CRH-val stimulált illetve cannabinoid agonistára adott reakcióiban, de a dexametazon gátlásában sem. Ezek alapján arra következtettünk, hogy a cannabinoidok fontos szerepet töltenek be a HHM aktivációban, de ez a hatás elsősorban nem a hypophysis szintjén valósul meg. (közlés: Life Sciences 75 (2004) 2959–2970)

b. Bár eredeti szándékunk szerint a CB1 receptor szerepét az ismételt morfin adagolással létrehozott krónikus stresszállapot során akartuk tisztázni, azonban az opiát és kannabinoid rendszer közötti számos interakció hatására inkább egy “tisztán neuronális” stimulust választottunk, az ismételt mozgáskorlátozást (restraint). Napi 1 óra stimulust alkalmaztunk. Az egerek viselkedését a 11. napon emelt keresztpalló tesztben vizsgáltuk. Az állatokat a 15. napon újabb stressz végén vagy a nélkül dekapitáltuk. A 10-szeres mozgáskorlátozás növelte az állatok mozgékonyágát, ezzel párhuzamosan megnőtt a nyílt karban töltött idő is. A fokozott szorongás jeleként a stresszelt egerekben megnőtt a kockázatfelméréssel töltött idő és a fekális ürítés mennyisége is. A CB1 receptor hiánya megnövelte a szorongást a mozgáskorlátozás hatását azonban nem befolyásolta. A két hét során a stresszelt vad típus kevesebbet eszik és iszik a depresszió tüneteiként. A CB1 receptor hiánya ezeket a tendenciákat nem befolyásolta. A krónikus stresszre jellemző szomatikus elváltozások itt is kialakultak, de a CB1 receptor hiánya nem befolyásolta létrejöttüket. Az 1 óra akut stressz megemelte a kortikoszteron szinteket. A két hét végén a nyugalmi kortikoszteron szintek is enyhén emelkedettek voltak és fokozott érzékenység volt megfigyelhető egy újabb stimulusra. A knockout egerekben emelkedett alapszinteket lehetett megfigyelni, mely emelkedés nem mutatott interakciót a mozgáskorlátozós stresszel. Eredményeink alátámasztják a CB1 receptor szorongáscsökkentő és HHM tengely aktivitását gátló szerepét. Arra következtethetünk, hogy a HHM tengelyen a cannabinoid receptoroknak nem a stressz-reaktivitás fenntartásában, hanem inkább egy gátló tónus kialakításában lehet elsődleges szerepe. (előadás, Molecular basis of neurological and psychiatric disorders, Martin, 2006)