

Zárójelentés 2012.

NN 71629 A stressz-függő viselkedés (szorongás) vazopresszinerg és oxytocinerg kontrollja: vizsgálatok Brattleboro patkányok felhasználásával

Az Egészségügyi Világszervezet legújabb adatai szerint a modern társadalmakat gazdaságilag leginkább sújtó betegségek listáján az első öt betegség mentális természetű. Ezek közül is az orvoshoz fordulás gyakoriságát tekintve a szorongás és a depresszió előfordulása kiemelkedő. Számos eredmény utal a strukturálisan hasonló neuropeptidek, az arginin vazopresszin (AVP) és az oxytocin (OXT) érzelmi zavarokban való fontos szerepére. Ebből a szempontból mindkét neuropeptidnek a neuromodulátor és nem a neurotranszmitter szerepe tűnik lényegesnek. Feltételezések szerint a nucleus paraventricularis hypothalami (PVN) magnocelluláris sejtjeinek sejttestéből és dendritjeiből ürülő AVP és OXT elér limbikus agyterületeket is, beleértve a szeptumot, és ezáltal befolyásolja a bejövő ingerek érzelmi értékelését. Kísérleteiben a PVN-ből származó AVP és OXT neuromodulátor szerepét vizsgáltuk stresszben és kapcsolódó érzelmi zavarokban. A klinikai kutatások előfázisának tekintett állatkísérletes modelleket alkalmaztunk és vizsgálatainkat jórészt természetes mutációval AVP hiányossá vált Brattleboro patkányokon végeztük. A kutatásainkat számos egyéb, az alapkérdést befolyásolható tényező vizsgálatára is kiterjesztettük (pl. akut és krónikus stressz-reaktivitás, korfüggő hatások, a tesztkörülmények befolyásoló hatása).

Eredményeink összefoglalása:

A. Magatartás vizsgálatok

I. Magatartási modellek

Előzetes terveinkkel összhangban több magatartásmodellt vizsgáltunk (kényszeres úszás- forced swim, FST; védekező-visszahúzó- defensive withdrawal, DW stb.). Ezek közül az FST tekinthető a depresszió leggyakrabban alkalmazott modelljének és erről a tesztről áll a legtöbb irodalmi adat is a rendelkezésre. Mivel ez tűnt a leginkább alkalmazhatónak a további vizsgálatokhoz, ezért a modell minél jobb megismerése érdekében megvizsgáltuk a különféle paraméterek (kísérleti állat testsúlya, víz hőmérséklete, fény-sötét stb.) hatását a magatartási teszt kimenetelére.

Pintér O., Domokos Á., Mergl Zs., Mikics É. and Zelena D.: *Do stress hormones connect environmental effects with behavior in the forced swim test?*, Endocrine Journal 58(5):395-407, 2011

Ezek alapján a további vizsgálatokhoz a 21-24°C-os, 35cm mély vizet tekintettük általánosan alkalmazhatónak. Meglepetésünkre az állat súlya és a teszt során alkalmazott megvilágítás kevésbé befolyásolta a lebegéssel töltött időt, ami a depresszió legfontosabb paramétere.

II. Vasopresszin pótlás

Mivel ezekben a tesztekben és előzetesen közölt eredményeink alapján is az AVP-hiányos Brattleboro patkányok számos magatartási paraméterben eltértek a kontrolloktól, ezért felmerült, hogy ez nem az AVP-hiány perifériás, diabetes insipidust okozó mellékhatása miatt van-e. Ezért a terveknek megfelelően egy kísérletsorozatban igazolni próbáltuk, hogy az AVP centrális támadásponttal befolyásolja a magatartást. Ehhez az AVP-hiányos állatokba éter altatásban egy DDAVP-t (desmopressin, V2 agonista) tartalmazó ozmótikus minipumpát helyeztünk (Alzet), majd pár nap felépülési idő után magatartás tesztekkel végeztünk (FST, DW, szorongás mérésére- emelt keresztpalló, EPM, "golyótemetés"- marble burying, memória megítélésére- tárgydiszkrimináció). Ezen eredmények arra utaltak, hogy bár a perifériás AVP pótlás szomatikus paraméterei megjelentek (vízfogyasztás csökkenés, test- és szervsúly növekedés), de a magatartási paraméterek különbsége változatlanul megmaradt. Azaz igazoltuk, hogy az AVP a központi idegrendszeren keresztül hat a magatartásra.

Balázsfői, D., Klausz, B., Pintér, O., Kovács, K.B., Engelmann, M., Zelena, D. *Depressive-like behavior of vasopressin-deficient Brattleboro rat is due to its regulatory role in the central nervous system.* Magyar Idegtudományi Társaság Konferenciája 2012- poszter; folyóiratban közlés alatt

Kísérleteink kiinduló hipotézise az volt, hogy a stressz-során a PVN-ből ürülő AVP elér egyéb limbikus területeket is (pl. szeptum), és ezen keresztül hat a magatartásra. Ennek a hipotézisnek a bizonyítására retrodialízissel AVP-t juttatunk a PVN területére és ezután az állatokat magatartás teszteknek vetettük alá (EPM, DW, FST). Az előzetesen tapasztalt magatartási eltérést az AVP-hiányos és kontroll állatok közt sikerült reprodukálnunk (előzőleg kérdéses volt, hogy az altatás, műtét nincs-e negatív hatással a magatartásra), de az alkalmazott két dózis (mely hasonló retrodialízis kísérletben más paraméterekre irodalmi adatok szerint hatékony volt) egyike sem befolyásolta az AVP-hiányos állat magatartását. Bár terveink közt szerepelt AVP antagonistá szeptumba történő adása, de ez az előző kísérlet negatív eredménye miatt okafogyottá vált.

Felmerült, hogy a mikro-dialízis manipulációja valamiképp befolyásolhatja az eredményeket, ezért az AVP szintézis helyreállításának tartósabb módjaként adeno-asszociált vírusvektorral jutattuk az AVP-t a PVN-be. A kísérleteket számos technikai probléma övezte (a vírus nagy mennyiségben történő előállítására tett kísérleteink nem jártak sikerrel, így a Japánból kapott kevés mennyiséggel tudtunk csak gazdálkodni; időközben az Intézetünkben felépült két vírus-vektorokkal történő manipuláció céljára alkalmas laboratórium is, de a munkát ezek kialakítása is késleltette). Kellő számú állat kezelése után azt a meglepő eredményt tapasztaltuk, hogy a beadás után 2 héttel a kontroll és AVP-hiányos állatok

magatartása sok tesztben nem különbözött tovább egymástól. Mivel a kontroll állatok is kaptak LacZ vírust, felmerült a gyanú, hogy ez az egyébként kontrollnak tekintett anyag is számos- esetünkben negatív- hatást válthat ki. Ahol volt különbség, az AVP-kezelés ott is hatástalannak bizonyult annak ellenére, hogy a vízfogyasztásokon lehetett látni, hogy az AVP beépül és funkcionális hatást is kivált (vízfogyasztás csökkenése). Sajnos ennek tükrében az AVP-vel kezelt állatok magatartása is értelmezhetetlen volt.

B. Stressztengely vizsgálatok

I. A nucleus paraventricularis hypothalami (PVN)-ban interstitialisan ürülő AVP és OXT szintek vizsgálata

A PVN extracelluláris terébe ürülő folyadék mikrodialízis vizsgálata azt mutatta, hogy az AVP hiányos állatok sokkal több OXT-t szekretálnak mind nyugalmi állapotban, mind FST hatására és a mag OXT mRNS szintje is emelkedett volt. Ezzel együtt az FST hatására a plazmában megemelkedő kortikoszteron (a stressz-tengely véghormonja) és OXT szintek az AVP-hiányos állatokban nem tértek vissza olyan hamar az alapállapotba. AVP retrodialízis gyorsította a hormonszint normalizálódását. Eredményeink arra utalnak, hogy a stressz-során a PVN-ben parakrin módon ürülő AVP elősegíti a hipotalamo-hipofízis-mellékvese (HHM) tengely és a plazma OXT szintjének normalizálódását.

Zelena, D., Langaese, K., Domokos, A., Pintér, O., Landgraf, R., Makara, G.B. Engelmann, M.: *Vasopressin administration into the PVN normalizes plasma oxytocin and corticosterone levels in Brattleboro rats*, Endocrinology, 150(6):2791-8. 2009

II. A nucleus supraopticus (SON)-ban interstitialisan ürülő AVP és OXT szintek vizsgálata

Az AVP-hiányos állatok SON-jében is magasabb OXT mRNS szinteket és immuncitokémiával nagyobb OXT fehérje szinteket is lehetett detektálni. Ezzel ellentétben az SON interstitiális terében a nyugalmi OXT szintek azonosak voltak kontroll és AVP-hiányos állatokban, valamint az előzőleg is alkalmazott FST teszt során az AVP-hiányos állatokban elmaradt az OXT-szint emelkedés. Ezen meglepő eredményt altatott állatnak adott ip hipertóniás só injekcióval is sikerült megismételni. A direkt mikrodialízissel az SON-be juttatott hipertóniás só képes volt OXT elválasztást létrehozni az AVP-hiányos állatokban is, ami arra utalt, hogy a szekréciós folyamat teljesen normálisan működik ezekben a patkányokban is. Eredményeink arra a meglepő következtetésre vezettek, hogy a mRNS és fehérje szintek nem mindig állnak párhuzamban a szekrécióval.

Zelena, D., Pintér, O., Langnaese, K., Richter, K., Landgraf, R., Makara, G.B., Engelmann, M. *Oxytocin in Brattleboro rats: Increased synthesis is contrasted by blunted release from supraoptic nucleus neurons.* Endocrinology, 2012. közlésre beküldve

III. A Brattleboro patkány stressztengelye

Mivel kísérleteink fő kérdése az AVP stressztengelyre gyakorolt hatására irányult, ezért célszerűnek tűnt a modellállatunk alapos tanulmányozása ebből az irányból is. Számos stresszhelyzetben vizsgáltuk a Brattleboro állatok adrenokortikotropin (ACTH, a stressztengely hipofízeális komponense) és kortikoszteron elválasztását és a kapott adatok alapján a stresszorokat 3 kategóriába sorolhattuk:

- a) Csökkent ACTH és kortikoszteron válasz (morfin injekció, agresszió teszt, mozgáskorlátozás), vagyis az AVP mindkettő szabályozásában részt vesz.
- b) Csökkent ACTH válasz, a kortikoszteron válasz szignifikánsan nem különbözik a két genotípusban (újdonság stressz, hipoglikémia, EPM), vagyis az AVP csak az ACTH szintek szabályozására van hatással.
- c) Az AVP hiányának nincsen hatása sem az ACTH sem pedig a kortikoszteron szintjének szabályozására pl. a szociális elkerülés, foot-shock, éter belélegzés stressz esetén.

Ezen csoportok nem mutatnak átfedést egyik ismert beosztással sem (pl. szisztémás-lokális; pszichogén-szomatikus stb.), azaz az AVP másként kategorizálja a stresszorokat, mint egyéb elképzelés alapján tennénk. Jelentős megfigyelésünk, hogy az ACTH és kortikoszteron szintek disszociálnak.

Zelena D, Domokos A, Jain S, Jankord R, Filaretova L.: *The stimuli-specific role of vasopressin in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response to stress.*, J Endocrinol. 202(2):263-78., 2009

Az eltérő stressz-reaktivitás hátterében a sympathoadrenális rendszer megváltozott működése állhat, amit α -adrenoreceptorok vizsgálatával sikerült is bizonyítanunk.

Bundzikova J, Pirnik Z, Zelena D, Mikkelsen JD, Kiss A.: *The alpha(2)-adrenoceptors do not modify the activity of tyrosine hydroxylase, corticoliberine, and neuropeptide Y producing hypothalamic magnocellular neurons in the Long Evans and Brattleboro rats*, J Physiol Pharmacol. Aug;61(4):391-8., 2010

Bundzikova J., Pirnik Z., Zelena D., Mikkelsen JD., Kiss A.: *α 2-adrenergic stimulation of oxytocinergic neurons in the hypothalamic magnocellular neurons is influenced by its antagonists in Brattleboro rats.*, Cell Mol Neurobiol 29(6-7):1015-23., 2009

A kortikotropin-elválasztást serkentő hormonnal (CRH) rokon urokortinok szabályozása azonban nem tér el a kontroll és AVP-hiányos állatokban.

Sterrenburg L, Borch A, Peeters BW, Pintér O, Zelena D, Roubos EW, Kozicz T.: *Acute ether stress differentially affects corticotropin-releasing factor and urocortin 1 in the Brattleboro rat.*, Brain Res. 1398:21-9., 2011

Mivel az általunk is leggyakrabban alkalmazott stresszor, az FST depresszió-teszt, ezért adódott, hogy a Brattleboro patkányokat egyéb depresszió-modellben (pl. krónikus enyhe stressz) is megvizsgáljuk. Várakozásunkkal ellentétben az AVP-hiány a krónikus enyhe stressznek sem a szomatikus, sem a magatartási paramétereit nem változtatta meg. Egyedül a nyugalmi kortikoszteron szint emelkedést csökkentette. Így azt mondhatjuk, hogy az irodalomban régebben elterjedt vélekedéssel ellentétben az AVP nem tekinthető fontosabb stressztengely szabályozó molekulának krónikus stressz folyamatok során, mint a CRH.

Varga J, Domokos A, Barna I, Jankord R, Bagdy G, Zelena D.: *Lack of vasopressin does not prevent the behavioural and endocrine changes induced by chronic unpredictable stress.*, Brain Res Bull 84:45-52., 2011

IV. Perinatális kor

Mivel felmerült, hogy a felnőtt AVP-hiányos állatban számos kompenzáló mechanizmus elfedheti az AVP hatását, ezért figyelmünk a perinatális korra irányult, amikor a kompenzáció legalábbis kisebb. Feltártuk, hogy a felnőtt és kispatkány HHM tengelyének szabályozása alapvetően eltér egymástól, míg a felnőttben a CRH, addig a perinatális korú patkányban az AVP az ACTH elválasztás fő szabályozója. Ugyanakkor az ACTH és kortikoszteron szintek lefutása disszociál, ami felveti az ACTH-n kívüli más szabályozó faktorok szerepét is.

Domokos A, Mergl Z, Barna I, Makara GB, Zelena D *Congenital vasopressin deficiency and acute and chronic opiate effects on hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity in Brattleboro rats.* J Endocrinol. 196:113-21, 2008

Zelena D, Barna I, Pintér O, Klausz B, Varga J, Makara GB.: *Congenital absence of vasopressin and age-dependent changes in ACTH and corticosterone stress responses in rats.*, Stress 14(4):420-30, 2011

Makara GB, Varga J, Barna I, Pintér O, Klausz B, Zelena D: *The vasopressin deficient Brattleboro rat: Lessons for the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation.*, Cellular and Molecular Neurobiology in press, 2012

A kispatkányok perinatális fejlődését is megvizsgáltuk, ami meglepő módon sok esetben gyorsultabb volt, mintha a kisebb, génhibás állatok korábbi önállóságra törekedtek volna.

Zelena D, Mergl Zs, Makara GB: *Postnatal development in vasopressin deficient Brattleboro rats with special attention to the hypothalamo-pituitary-adrenal axis function: the role of maternal genotype*, Int. J. Devl Neuroscience 27: 175–183, 2009

Mivel felnőtt Brattleboro patkány sympatho-adrenomedulláris tengelye jelentősen eltér a kontroll és AVP-hiányos állatokban, ezért megvizsgáltuk, vajon hasonló különbség megfigyelhető-e a kispatkányban. Vizsgálataink során nem sikerült semmi eltérést kimutatnunk, de a sympatho-adrenomedulláris tengely pontosabb elemzéshez további kísérletek szükségesek.

Zelena D, Barna I, Csabai K, Orlando GF, Makara GB, Engelmann M.: *Response of the adrenomedullary system to early postnatal stress in the Brattleboro rat.*, Ann N Y Acad Sci. 1148:456-61., 2008

Az egyén kora jól ismert befolyással bír a gyomorfekély kialakulására, de eddig nem volt ismert, hogy az AVP szerepe is más és más lehet ebben a folyamatban az egyes életkorokban. Az AVP hiánya fiatal (kb. 25 napos) állatokban csökkentette az indomethacin-indukálta gyomorfekély területét, míg idős (1 év körüli) állatokban a fekély területének növekedése volt megfigyelhető. Általános tanulságként megállapíthatjuk, hogy minden kísérletnél érdemes odafigyelni az állatok pontos korára.

Zelena D, Filaretova L.: *Age-dependent role of vasopressin in susceptibility of gastric mucosa to indomethacin-induced injury.*, Regulatory Peptides, 161(1-3):15-21. 2010

Úgy tűnik, hogy számos már stresszorhoz hasonlóan a cannabinoid rendszer stressztengely aktivációja is erősen korfüggő módon szabályozódik AVP-vel: AVP-hiányos kispatkányban a cannabinoid 1 receptor agonista-indukálta ACTH-szint emelkedés elmarad, míg felnőtt állatban ez nem figyelhető meg. Ugyanakkor a kortikoszteron-szintekre semmi hatása nincs az AVP-hiánynak.

Barna I, Csabai K, Makara GB, Zelena D.: *Cannabinoid-mediated regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in rats: age dependent role of vasopressin.*, Endocr Regul. 43(1):13-21., 2009

A perinatális kor fontos szerepét vizsgálva az anyai MDMA (Extasy hatóanyaga) kezelés késői következményeiről is szoltunk, valamint megvizsgáltunk az intrauterin elektromágneses sugárzásnak kitett állatokat is. Ehhez első lépésként a felnőttek elektromágneses tér iránti fogékonyságát térképeztük fel.

Adori C, Zelena D, Tímár J, Gyarmati Z, Domokos A, Sobor M, Fürst Z, Makara G, Bagdy G.: *Intermittent prenatal MDMA exposure alters physiological but not mood related parameters in adult rat offspring.*, Behav Brain Res. 206(2):299-309., 2010

Szemerszky R, Zelena D, Barna I, Bárdos G.: *Stress-related endocrinological and psychopathological effects of short- and long-term 50Hz electromagnetic field exposure in rats.*, Brain Res Bull. 81(1):92-9., 2010

A perinatális kor vizsgálata az anya vizsgálatához is elvezetett, akiknél az AVP hiánya kissé megzavarta az anyai magatartást, míg ugyanezen AVP hiányos szoptató anyák a depresszió-szerű magatartást modellező teszteken éppen jobb eredményt értek el. A háttérben bizonyos agyterületek csökkent c-fos aktivációja állhat.

Fodor A, Klausz B, Pintér O, Daviu N, Rabasa C, Rotllant D, Balazsfi D, Kovacs KB, Nadal R, Zelena D.: *Maternal neglect with reduced depressive-like behavior and blunted c-fos activation in Brattleboro mothers, the role of central vasopressin.*, Hormones and Behavior közlésre beküldve, 2012

C. Előző és jelenlegi OTKA pályázatunk alapján számos összefoglaló művet készítettünk

1. az AVP érzelmi zavarokban betöltött szerepéről:

Zelena, D.: *The Role of Vasopressin in Affective Disorders: Possible Targets of Intervention.*, Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry 8:275-285, 2008
Zelena D: *Yin-Yang Neuropeptides In Depression*, Frontiers in Neuroscience 3:251-252, 2009
Zelena D, Jain SK: *Oxytocin and Vasopressin in Stress and Stress-Related Diseases: Yin/Yang Counterparts or Substitutes?*, In: Handbook of oxytocin research, Chapter 1., p1-34, 2009
Zelena D, Jain SK: *Another Side of the Antidiuretic Hormone, Vasopressin: Its Role in Stress Regulation*, Journal of Experimental Sciences Vol. 1, No9, 2011
Zelena, D.: *Vasopressin in health and disease with a focus on affective disorders*, Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry 2012 in Press

2. az AVP egyéb stresszel-összefüggő betegségei közül a gyomorfekélyről:

Zelena D., Morozova OYu., Filaretova LP.: *Age-dependent role of vasopressin in susceptibility of gastric mucosa to indomethacin-induced injury.*, Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/ Organoprotection in the Gastrointestinal Tract - Mechanisms, Prevention & Treatment, Karger, 2012

3. az ACTH és kortikoszteron szekréció disszociációja kapcsán az ACTH extradrenális szerepéről:

Zelena D., Makara GB.: *The role of adrenocorticotropin beyond the glucocorticoid horizon.*, Nova Publisher, In Advances in Medicine and Biology, Vol. 43. Chapter III., 2012

4. további stressz-függő pszichiátriai betegségek epigenetikai vonatkozásairól:

Zelena D.: *Co-regulation and epigenetic dysregulation in schizophrenia and bipolar disorder*, J. Minarovits and H.H. Niller (eds.), Patho-Epigenetics of Disease, Springer Science+Business Media New York, 2012

A projekttel kapcsolatban keletkezett még publikálatlan eredményeket 2012 nyarán Magdeburgban egy projektzáró minikonferencián tervezzük megvitatni, ahol további publikációkat, illetve a közös munka folytatásának lehetőségét is meg fogjuk beszélni.