

# **Korai negatív életesemények szerepe rágcsálók idegrendszeri fejlődésében és a depresszió három találat elméletén alapuló modelljében**

Doktori (PhD) értekezés

**Dr. Farkas József**

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola  
Neuroendokrinológia és neurohisztológia doktori program

Programvezető: Prof. Dr. Csernus Valér PhD, Dsc

Témavezetők: Prof. Dr. Reglődi Dóra PhD, Dsc; Dr. Gaszner  
Balázs PhD

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Anatómiai Intézet



Pécs  
2017

## Bevezetés

### **Major depressziós zavar (MDD)**

A „*Mentális betegségek kórmeghatározó és statisztikai kézikönyve (DSM 5)*” az MDD-t debilizáló betegségként definiálja. A betegek életének számos területét befolyásolja negatívan, ami gyakran öngyilkossághoz vezet. A pszichiátriai vetület mellett a depresszió növeli bizonyos szomatikus betegségek kialakulásának kockázatát is. Az emberi populáció jelentős részének szenved MDD-ben. A „*Global Burden of Disease Study*” szerint az MDD 2013-ban egyike volt azon három kórképnek, mely a legtöbb „*károsodott egészségi állapotban leélt évrét*” volt felelős. A depressziónak súlyos hatása van a gazdaságra is. Évente az európai GDP kb. 1%-át költik a betegség kezelésére. Világszerte 350 millió ember szenved MDD-ben, mely egyaránt érinti a magas, közepes és alacsony jövedelmű országokat, cáfolva azt a nézetet, hogy a fejlett országok betegsége lenne.

### **Jelentős korai és késői életesemények az MDD háttérében**

Az emberi test folyamatosan ki van téve olyan negatív befolyásoló tényezőknek, melyek veszélyeztetik annak egyensúlyát. Selye János 1936-ban ezen fenyegetésekre az emberi szervezet által adott nem specifikus válaszokat „stressz”-ként definiálta. Emberek esetében a stresszes életesemények és a depressziós epizódok közti összefüggés jól dokumentált. Ilyen események lehetnek például a környezeti katasztrófák, terrorizmus, erőszak, családon belüli erőszak, szexuális visszaélések, krónikus és életet veszélyeztető betegségek, munkanélküliség, magány, anyagi bizonytalanság, szeparáció és gyász. A születés körüli és a gyermekkori események szorosan összefüggnek a pszichológiai fejlődéssel. Tetemes mennyiségű szakirodalmi adat utal arra, hogy a gyermekkori

bántalmazás potenciálisan növeli a depresszió és más mentális betegségek kialakulásának valószínűségét.

A közelmúltban kifejlesztett „három találat elmélet” szerint az öröklött genetikai faktorok (1. találat), a jelentős (korai) életesemények által okozott epigenetikai változások (2. találat) és a környezeti stressz a későbbi életszakaszban (3. találat) együttesen tehetők felelőssé a depresszió kialakulásáért.

### **A PACAP hatása a stresszválaszra és az idegrendszer korai fejlődésére**

1989-ben Arimura és munkatársai a vazóaktív intesztinális peptid (VIP)/secretin/glucagon család egy új tagját izolálták, melyet hipofízis adenilát cikláz-aktiváló polipeptidnek (PACAP) neveztek el. A PACAP fő hatása a cAMP termelés fokozása PAC1, VPAC1 és VPAC2 receptorokat expresszáló sejtekben. A PACAP-ot az első izolálása óta kimutatták a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese (HPA) tengely alkotóelemeiben is. A PACAP több más funkciója mellett fontos szerepet tölt be számos szövet embrionális fejlődésében. Ezen felül növekedési faktorként szolgál az idegrendszer fejlődésében, valamint neuronális sérülések esetében. Ezen funkciók figyelembevételével nem meglepő a tény, hogy a PACAP génkiütött egerek számos viselkedési zavar tüneteit mutatják. Hashimoto és munkatársai bizonyítékot találtak ezen állatok esetében a depressziószerű viselkedésre és a fokozott szorongásra.

## **Célkitűzések**

### **1. Maternális deprivációs vizsgálatok**

Ezen kísérlet célja a neurobehaviorális fejlődés, a korai motoros koordináció és a korai open-field (OF) aktivitás vizsgálata volt Wistar patkány kölykökben két hetes maternális deprivációt követően. Mivel

ismert, hogy a maternális depriváció számos hatása függ a vizsgált utódok nemétől, a hím és nőstény állatokat külön-külön teszteltük.

## **2. PACAP mutáns egerek fejlődésének vizsgálata**

A kísérletsorozat ezen részében a részben (heterozigóta, HZ) és teljesen (homozigóta KO) PACAP génkiütött egerek posztnatális fizikai fejlődését vizsgáltuk. Megfigyeléseinket a posztnatális periódus első három hetében végeztük komplex vizsgálati módszerekkel. A neurobehavioralis fejlődésüket is figyelemmel kísértük.

## **3. Depresszió modell**

Az értekezés harmadik része a három találat elmélet alapján az emberi depresszió egy olyan új egér modelljének felállítását és validálását célozta meg. PACAP HZ egerek utódait (1. találat) vetettük alá maternális deprivációnak (2. találat). Később a felnőtt alanyokat krónikus variábilis enyhe stressznek (CVMS, 3. találat) tettük ki. A modell validitását a stressz hatására bekövetkezett fizikai, endokrinológiai és funkcionális morfológiai vizsgálatok segítségével végeztük.

# **Anyagok és módszerek**

## **1. Kísérleti állatok**

A kísérleti állatokat hőmérséklet és páratartalom kontrollált körülmények között, 12 órás világos-sötét ciklus (világos reggel 6 órától) mellett szabvány ketrecekben (3-4 patkány, 4-6 egér ketrecenként) tartottuk a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Anatómiai Intézetének állatházában. Az állatoknak *ad libitum* állat rendelkezésre táp és víz. (BA02/2000-25/2011, BA02000-39/2016)

CD1 típusú PACAP génkiütött egerek

PACAP WT, HZ és KO egereket használtunk fel a depresszió modell kísérlethez és a fejlődésvizsgálatokhoz.

Wistar patkányok

6 alomnyi saját tenyésztésű Wistar patkányt használtunk fel ( $n=10\pm 1$  kölyök almonként). A hím és a nőstény állatokat egyaránt vizsgáltuk.

## 2. Kísérleti elrendezés

Maternális depriváció vizsgálata

- Az anya eltávolítása a fészekből az 1-14. posztnatális napokon (PND) reggel 8 és 11 óra között 180 percre.
- Maternálisan deprivált patkányok (MD)  $n=16$  hím,  $n=19$  nőstény
- Kontroll állatok: rövid kezelés a neurobehavioralis tesztek időtartamára ( $n=12$  hím,  $n=13$  nőstény)

PACAP mutáns egerek fejlődésének vizsgálata

- Összesen 46 db PACAP HZ szülőktől (6 alom) származó (11 db vad típusú (WT), 22 db heterozigóta (HZ) és 13 db génkiütött (KO) kölyök került felhasználásra
- A kísérlet értékelése során a leválasztási kort elérő hím és nőstény állatok adatai kerültek felhasználásra

Depresszió modell kísérlet

- 37 PACAP HZ szülőktől származó alom került felhasználásra
- Három fő csoportot definiáltunk: állatházi körülmények között tartott állatok (AFR) – 12 alom; 15 perces maternális szeparációs csoport (MS15) – 12 alom; 180 perces maternális deprivációs csoport (MD180) – 13 alom
- Szeparációs és depriváció a 1-14 PND között.
- Kizárólag hím állatokat vontunk be a kísérletbe (AFR:  $n=56$ , MS15:  $n=58$ , MD180:  $n=44$ ).

- Minden fenti csoportot további két kísérleti alcsoportra bontottunk: kontroll (CTRL) és CVMS-nek kitett csoport.
- A genotípus, az anyai gondoskodás minősége, és a stressz faktorok alapján végül az állatok 18 csoportba kerültek, csoportonként 4-19 egyeddel.

### **3. A neurobehaviorális fejlődés vizsgálata (PACAP mutáns egerek fejlődésének vizsgálata és maternális szeparációs kísérlet)**

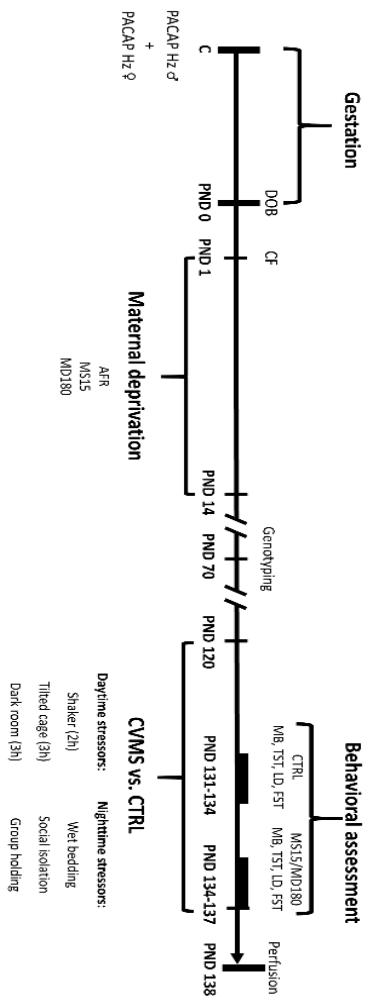
- *Fizikai jelek*: testtömeg, fizikai tulajdonságok (szemnyitás, metszőfog előtörés, fül fejlődés)
- *Neurológiai reflexek*: hasra fordulási reflex, negatív geotaxis, keresztezett extenzor reflex, szenzoros reflexek, ráhelyezési reflexek, fogó reflexek, mozgási reflexek, megrettenési reflex, levegőben hasra fordulási reflex
- *Motoros koordinációs tesztek*: lépés hiba teszt, mozgás indítási teszt, kötélen függeszkedési teszt, döntött palló teszt, rotarod teszt
- „*Open field*” aktivitás

### **4. Krónikus variábilis enyhe stressz (depresszió modell kísérlet)**

Felnőtt állatokat vettettünk alá olyan krónikus variábilis enyhe stressznek, melyet a habituáció elkerülése érdekében, véletlenszerű nappali és éjszakai stresszhatásokból állítottunk össze. Nappali stresszhatások: döntött ketrec, rázó pad, sötét szoba. Éjszakai stresszhatások: szociális izoláció, nedves alom és csoportos tartás.

Viselkedési tesztek:

- Üveggolyó-elrejtési teszt (Marble Burying Test - MBT)
- Faroknál fogva történő fellógatás (Tail Suspension Test - TST)
- Sötét-világos doboz teszt (Light-dark Box Test - LD)
- Kényszerített úszás teszt (Forced Swim Test - FST)



A három találat elmélet szerinti kísérleti elrendezés (Fogantatás – C, születés utáni nap – PND, születés ideje – DOB, Marble Burying Test – MB, Tail Suspension Test – TST, Forced Swim Test – FST, krónikus variábilis enyhe stressz – CVMS, cross fostering - CF)

## 5. Funkcionális morfológiai tesztek

Free floating kettős immunofluoreszcens jelölés

A kísérlet során célunk volt a bed nucleus of stria terminalis ovális magjában (BSTov) a korticotropin-releasing factort (CRF) termelő sejtek, a centrális projekciójú Edinger Westphal (cpEW) magban az urocortin 1-et (Ucn1) termelő sejtek és a dorzális raphe (DR) magban a szerotonint (5-HT) termelő sejtek aktivitásának meghatározása. Ennek érdekében CRF, Ucn1 és 5-HT jelölést végeztünk FosB festéssel párhuzamosan.

Mikroszkópia, digitális képfeldolgozás és morfometria

A digitális mikrofotók elkészítéséhez Olympus Fluoview 1000 konfokális mikroszkópot használtunk. A fluoreszcens jelek szemikvantitatív detektálását szekvenciális szkenneléssel végeztük photon count módban az egyes fluoroforoknak megfelelően. A denzitometriát ImageJ szoftver segítségével végeztük (1.42. Verzió, NIH, Bethesda, MD).

## 6. Kortikoszteron radioimmunoassay

A kortikoszteron (CORT) titert vérplazma mintákból határoztuk meg radioimmunoassay (RIA) segítségével. Az így kapott értékekből a HPA tengely aktivitására következtettünk.

## 7. Statisztikai analízis

Az adatokat minden esetben az átlag  $\pm$  standard hiba (SEM) formátumban adtuk meg. Az analízis során két utas variancia analízist (ANOVA) végeztünk, melyet Dunn féle post hoc teszt követett a maternális deprivációs kísérletben és Fisher féle post hoc teszt a PACAP transzgenikus egerek fejlődésének vizsgálata során. A depresszió modell kísérletben multifaktoriális variancia analízist (MANOVA) végeztünk melyet Fisher



féle post hoc teszt követett. Az adatok varianciájának homogenitását (Barlett féle chi négyzet próbával) és normál eloszlását (Shapiro-Wilk teszttel) minden esetben ellenőriztük. Amennyiben az adatok nem mutattak normál eloszlást négyzetgyökvonás matematikai transzformációt végeztünk. Az adatokat szignifikánsnak tekintettük amennyiben a p érték nem haladta meg a 0.05-öt.

## Eredmények

### 1. Maternális deprivációs kísérlet

A maternális deprivációnak alávetett hím állatok gyorsabb tömegnövekedést mutattak kontroll társaikhoz képest. Ez a különbség kezdetben csak tendenciózus volt, viszont a harmadik hét végére elérte a statisztikailag szignifikáns mértéket. Az MD hím állatok a negyedik naptól kezdve szignifikánsan nehezebbek voltak MD nőstény társaiknál. A neurológiai reflexek megjelenésének vizsgálata során nem találtunk jelentős eltérést sem a kontroll és az MD csoportok sem pedig a nemek közt. Mindazonáltal a hím állatok tendenciózusan gyorsabb fejlődést mutattak. A motoros koordinációs tesztben csak a vétett hibák százalékos aránya volt alacsonyabb az MD hím állatok esetében a harmadik héten. Az open field teszt eredményeiben nem fedeztünk fel statisztikailag szignifikáns eltéréseket.

### 2. PACAP mutáns egerek fejlődése

A hím és nőstény PACAP KO egerek súlyfejlődése lassabb volt, mint a vad típusúaké. A leglassúbb súlygyarapodás a PACAP HZ állatoknál volt megfigyelhető. Az eredmények tanúsága szerint az első héttől eltekintve a vad típusú állatok súlya növekedett a leggyorsabban. A homozigóta KO

állatok esetében szabálytalanabb fejlődésmenetet tapasztaltunk. A szomatikus fejlődés nem mutatott jelentős eltérést az egyes csoportokat összehasonlítva. A nőstény HZ állatok reflexfejlődése szignifikáns késést mutatott a mellső láb megragadási reflexének megjelenése tekintetében. Az levegőben hasra fordulási reflex (air righting) megjelenése is hasonló mintázatot mutatott. A mozgás indítási (gait initiation) reflex megjelenése is késett a nőstény HZ állatok esetében a vad típusúakhoz képest. A hímek esetében hasonló, de csak tendenciózus különbségek voltak megfigyelhetőek. A harmadik héten a lépéshiba tesztben a HZ nőstény állatok szignifikánsan többet hibáztak, mint a WT és a KO egerek. A hímek ehhez hasonló, de a szignifikancia szintet el nem érő eltéréseket mutattak. A negyedik héten a hím HZ és KO állatok jelentősen többet hibáztak a vad típusúaknál. A nőstények esetében csak hasonló tendencia volt megfigyelhető.

### **3. Depresszió modell kísérlet**

A paradigma hatékonyságának vizsgálata

A krónikus variábilis enyhe stressz expozíció az AFR WT és HZ állatok esetében statisztikailag szignifikáns tömegcsökkenést okozott az AFR kontroll állatokhoz képest. Az MS15 csoportban a CVMS minden genotípusban csökkentette a testtömeget. Az MD180 csoport HZ állatai mind jelentősen veszítettek tömegükből a krónikus variábilis enyhe stressz hatására. A mellékvestömeg-adatok a CVMS paradigma hatékonyságát támasztották alá. Annak ellenére, hogy a CVMS-hez köthető mellékvesetömeg-növekedés statisztikailag nem tekinthető szignifikánsnak, az AFR CVMS HZ állatok esetében 28%-os gyarapodást tapasztaltunk.

Az AFR csoportban a vad típusú és a HZ állatok 78 és 76.7%-os szérum CORT növekedést mutattak CVMS expozíció hatására, míg a KO egerek

esetében elhanyagolható mértékű volt a változás. Az MS15 állatok esetében a CORT szint 99.13%-kal növekedett a stressz expozíció hatására, valamint az MD180 KO egerek esetében is jelentős növekedés volt megfigyelhető.

Az FST esetében az immobilitás idő szignifikánsan hosszabb volt az MD180 csoportban az AFR CTRL vad egereknél mért értékekhez képest. Az AFR WT állatok a CVMS hatására jelentősen több időt töltöttek mozdulatlanul. Az MD180 HZ egerek esetében hasonló körülmények között ez az érték jelentős, 130%-os növekedést mutatott.

Az MBT tesztben a krónikus variábilis enyhe stressz hatására az AFR csoportban minden genotípus, az MS15 csoportban pedig a WT és HZ egerek szignifikánsan több üveggolyót rejtettek el. Hasonló emelkedést az MD180 csoportban csak a HZ egerek mutattak.

#### Morfológiai megfigyelések

##### CRF-FosB a BSTov-ban

Az AFR csoportban a CVMS expozíció a WT és a HZ állatok esetében statisztikailag szignifikánsan emelte a CRF-FosB együttes kifejeződését. A CRF pozitív sejtek száma az MD180 CTRL WT egerek esetében jelentősen magasabb volt, mint az AFR CTRL WT és az MS15 WT csoportban. Ehhez hasonlóan az MD180 CTRL HZ és KO egerek esetében több CRF-et expresszáló sejt volt kimutatható a BSTov-ban, mint az AFR megfelelő alcsoportjaiban. Az MD180 CTRL WT egerek esetében a specifikus szignál denzitás szignifikánsan magasabb értéket mutatott, mint az AFR CTRL és az MS15 CTRL csoport esetében.

##### Ucn1 a cpEW-ben

A CTRL csoporttal összehasonlítva a CVMS hatására az AFR WT és HZ állatokban jelentősen megnőtt az Ucn1-et és FosB-t együttesen expresszáló sejtek száma. Ez az érték a KO állatok esetében 48%-os

emelkedést mutatott, a kontroll csoporttal összehasonlítva. Ez a különbség statisztikailag nem szignifikáns. Az MD180 állatok esetében a bazális FosB expresszió is emelkedett. A CVMS exponált, MD180 alanyok esetében a KO csoport 2.8, míg a HZ 2.1-szer több Ucn1-FosB együttesen kifejező sejtet figyeltünk meg.

Szerotonin a DR-ben

Az AFR csoport egereiben a krónikus variábilis enyhe stressz expozíció megemelte a 5-HT-t és FosB-t együttesen expresszáló sejtek számát. Ez a növekedés csak a WT állatokban érte el a statisztikailag szignifikáns értéket. Az AFR csoporthoz képest az MD180 CTRL egerekben az 5-HT-t és FosB-t együttesen kifejező sejtek száma a WT és HZ állatokban szignifikánsan megemelkedett.

## **Eredmények megbeszélése**

### **1. Maternális deprivációs kísérlet**

Az eredmények arra engednek következtetni, hogy a napi 3 órás maternális depriváció nem vezet a reflexek jelentősen korábbi megjelenéséhez vagy késéséhez, illetve nem befolyásolja a motoros koordináció fejlődését sem. Mindazonáltal enyhe javulás volt tapasztalható a lépéshiba tesztben a maternális depriváción átesett hím állatok esetében és a hátsó fogó reflex és a mozgás idítés (gait) reflex valamivel előbb jelent meg. Ettől eltérően a nőstény MD állatok késést mutattak a mellső fogóreflex (fore limb grasp) és a levegőben hasrafordulás (air righting) reflex megjelenésében valamint a hasrafordulás (surface righting) megjelenésében. A maternális szeparáció semmilyen jelét nem tapasztaltuk ebben a fiatal korban az open-field teszt eredményeiben.

## **2. PACAP mutáns egerek fejlődése**

A kísérletsorozat ezen része fényt derített számos neurobehaviorális fejlődési különbségre PACAP HZ és vad típusú egerek között az élet első három hetében. A megfigyelési periódusban a PACAP hiányos egerek lassúbb testtömeggyarapodást mutattak. A PACAP HZ egerek szignifikánsan kisebb tömegűek voltak vad típusú társaikhoz képest. Az első három hétben nem tudunk nemi különbséget kimutatni. A PACAP HZ egerek esetében korábbi metszőfog előtörés volt megfigyelhető. A lépéshiba tesztben a PACAP KO egerek szignifikánsan több lépést tettek, viszont a vétett hibák száma is magasabb volt. Ez az eredmény összefüggésben állhat a korábban leírt hypermotilitással és az úgynevezett „explosive jumping” viselkedéssel. A megfigyelt jelenségek lehetséges magyarázata, hogy a PACAP teljes hiánya más jelátviteli utakon keresztül kompenzációs mechanizmusokat aktivált, mely részleges PACAP hiány esetén nem következik be.

## **3. Depresszió modell kísérlet**

A kísérletek ezen részének célja az volt, hogy validáljuk a három találat elmélet állatmodelljét. Feltételezésünk szerint a három paradigma kombinált alkalmazása depresszió szerű állapotot eredményez az egerekben. A PACAP gén/gének mutációja szolgált genetikai predispozícióként. A korai negatív életesemények, ebben a kísérletben a maternális depriváció töltötte be ezt a szerepet, oly módon változtathatják meg az epigenomot, hogy az hosszú távon befolyásolja az alanyok stressz adaptációs mechanizmusait. A harmadik találat a CVMS volt, melyet a genetikailag módosított, maternális depriváción átesett egereken alkalmaztunk.

## A CVMS paradigma hatékonyságának bizonyítása

A testtömeg változása egy széles körben elfogadott fizikai paraméter, mely a stressz expozíció hatékonyságára utal. A CVMS-nek alávetett csoportjainknál tapasztalt testtömeg csökkenés arra enged következtetni, hogy a stressz expozíció hatékony volt. Ezen felül kiemelendő, hogy az MD180 CTRL csoportban a WT és KO állatoknál is tapasztalható volt súlyvesztés, viszont a HZ állatok tömege nem mutatott eltérést. A CVMS-nek kitett MD180 csoportban a HZ állatok tömegcsökkenése már figyelemre méltó volt, míg a WT és KO állatok tömege nem változott. Ez arra enged következtetni, hogy a halmozódott negatív hatások erőssége, melyek a súlycsökkenést eredményezték a három találatral rendelkező egereknél, az MD180 CVMS HZ csoportban volt a legoptimálisabb. A mellékvese tömege is egy indikátor mely a stressz expozíció hatékonyságára utal. Statisztikai számításaink kimutatták a szignifikáns összefüggést a mellékvese tömege és a stressz expozíció között, alátámasztva a CVMS hatékonyságát kísérletünkben. Az emelkedett CORT értékek AFR WT és HZ állatokban, melyek a HPA tengely aktivitására utalnak, szintén a CVMS hatékonyságát igazolják. Korábbi vizsgálati eredményekkel egybevágóan az AFR KO egerek nem reagáltak. A jelen tanulmány egy figyelemreméltó új eredménye az a megfigyelés, hogy ha PACAP KO egereket rövid vagy hosszú idejű maternális szeparációnak vetünk alá, akkor normális CORT válasszal reagálnak CVMS-re. A CVMS expozíció hatékonyságát az FST eredményei is alátámasztották, hiszen az AFR CVMS WT állatok immobilitási ideje megnyúlt. A 180 perces maternális depriváció hatékonyan fokozta a depresszió szerű viselkedést a WT egereknél. Érdekes módon a depresszióknak megfelelő fenotípus kialakításához szükséges volt a CVMS expozíció az MD180 HZ egereknél, ami arra utal, hogy ez a csoport lehet a megfelelő alany a modellhez. Az anyai

gondoskodás minőségétől függetlenül a CVMS paradigma hatékonyságát a szorongás kialakításában tovább erősítették az MBT teszt eredményei. Mindkét PACAP allél mutációja esetén a szorongás mértékét a CVMS nem befolyásolta az AFR csoport kivételével. Az AFR KO egerek esetében tapasztalt csökkent szorongás, valószínűsíthetően az alacsony elemszám miatt, csak tendenciózus volt. Viszont ugyanezt az eltérést az MS15 csoportban statisztikailag is sikerült kimutatni. A tanulmány egyik érdekes új eredménye, hogy bizonyítékot szolgáltat arra, hogy a 180 perces maternális depresszió az MBT eredményére hosszútávú hatással van. Mindazonáltal az MD180 csoport állatainál alkalmazott CVMS nem tudta tovább növelni a szorongás szintjét az MBT-ben. Érdekes módon az MD180 PACAP HZ állatok esetében a CVMS-re is szükség volt a szorongási szint fokozásához. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy ez az állatcsoport tűnik alkalmasnak a hangulatzavarok vizsgálatára. Ezt a megállapítást az általunk végzett négy viselkedési teszt közül kettő egyértelműen alátámasztja (FST, MBT).

## Morfológiai megfigyelések

### CRF a BSTov-ban

A szövettani vizsgálataink újabb bizonyítékot szolgáltatottak a BSTov CRF termelő neuronjainak hangulatszabályozásban betöltött szerepére. Összhangban korábbi vizsgálataink eredményeivel elsőként megállapíthatjuk, hogy a CVMS hatására a CRF neuronok FosB expressziója megemelkedett a WT és a HZ állatokban, viszont a KO állatokban nem volt tapasztalható hasonló reakció. Ezen felül a sejtszám és a specifikus szignál denzitási adatok alapján kijelenthető, hogy az anyai törődés minősége egyértelműen befolyásolja a CRF peptid kifejeződését a BSTov-ban. Valamint, az eredmények tanúsága szerint a maternális depriváció megemeli a CRF pozitív neuronok FosB

expresszióját a kontroll állatokban, mely megváltozott génexpresszióra utal. Valószínűleg ez a jelenség megváltozott stressz alkalmazkodási képességgel jár. Mivel a CVMS expozíció nem tudta tovább növelni a FosB expressziót a WT és HZ állatokban, feltételezzük, hogy a CVMS és a 180 perces maternális depriváció együttes hatása megszünteti a BSTov CRF neuronjainak adaptációs képességét. A HZ egerekben tapasztalt erőteljes szorongás növekedés alapján arra következtethetünk, hogy a 70%-os PACAP szint csökkenés a 180 perces maternális deprivációval és a CVMS-sel együtt okozzák a megfigyelt fenotípust. A reakció viszonylagos hiánya az MD180 PACAP HZ egerekben részben magyarázható CVMS refraktív neuronális aktivitással a BSTov-ben.

#### Ucn1 a cpEW-ben

Jelen tanulmányunk az első, mely megállapítja, hogy a 180 perces maternális depriváció fokozza a FosB expressziót a cpEW idegsejtjeiben. Ez a jelenség különösen erőteljes a HZ és a KO egerekben, ami megváltozott gén expresszióra utal, mely valószínűleg PACAP expresszió függő módon befolyásolja a CVMS reaktivitást. A legmagasabb Ucn1-FosB koexpresszáló sejtszámot az MD180 KO csoportban találtuk.

#### Szerotonin a DR-ben

Korábbi tanulmányok megállapították, hogy a DR neuronok megváltozott 5-HT tartalma, metabolizmusa és/vagy aktivitása legalább részben felelőssé tehető a PACAP KO egerek megváltozott stressz adaptációjáért. Az AFR csoportban minden genotípus emelkedett 5-HT pozitív neuronaktivitással reagált a CVMS-re. A súlyos maternális depriváció erőteljesen megemeli a bazális FosB aktivitást az 5-HT sejtekben a DR-ben. Ezzel párhuzamosan az 5-HT pozitív sejtek száma



lecsökkent a HZ és KO egerekben, míg a WT csoportban változatlan maradt.

## **Konklúzió**

A kutatás céljával a korai életszakaszban elszenvedett negatív hatások neurobehavioralis fejlődésre kifejtett hatásainak vizsgálatát tűztük ki. Vizsgálataink eredményéből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy ezek a hatások nem befolyásolják erőteljesen a vizsgált paramétereket az első három posztnatális héten. A maternális deprivációs modell nem teszi tönkre az adaptációs képességet, valószínűleg köszönhetően a magas neuronális plaszticitásnak, mely erre az életszakaszra jellemző. Ezek ismeretében felmerülhet az a lehetőség, hogy további káros hatások együttesen depresszió-szerű állapotot eredményezhetnek.

Mivel a PACAP-nak hatása van a neurobehavioralis fejlődés számos aspektusára és a stressz válaszra, megvizsgáltuk annak lehetőségét, hogy a két öröklött mutáns PACAP allélnak milyen hatása van az egerek korai fejlődésére. Vizsgálataink során a PACAP KO egereknél lassult testtömegnövekedést és megkésett neurobehavioralis fejlődést figyeltünk meg. Ezek az egerek enyhe fenotípusos anomáliákat is mutatnak. Továbbá ismert tény, hogy a külső noxákhoz való adaptációs képességük csökkent.

A fentiek figyelembevételével jelen PhD értekezés harmadik részében olyan a humán depresszióinak megfelelő modellt állítottunk össze, melyben a korai életszakaszban elszenvedett negatív eseményt (maternális depriváció), a genetikailag csökkent adaptációs képességet (PACAP gén mutáció) és a negatív környezeti hatásokat utánozó krónikus variábilis enyhe stresszt kombináltuk a széles körben alkalmazott három találat elméletnek megfelelően egérben.

Az új modellünket a klasszikus Willneri kritériumok szerint értékeltük. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a konstrukciós validitást sikeresen elértük a PACAP HZ egereknél. A fenomenológiai validitást a testsúly és viselkedési adatok támasztották alá: az MD180 PACAP HZ egerek fokozott depressziós és szorongási szintet mutattak. A funkcionális és morfológiai vizsgálatok kimutatták, hogy a depresszió-szerű fenotípus az MD180 PACAP HZ egereknél valószínűleg az emelkedett bazális FosB expresszióhoz köthető a CRF-et és Ucn1-et termelő sejtekben, melyek a CVMS hatásra nem reagáltak. Továbbá valószínűsíthető az 5-HT neuronális aktivitás csökkenés szerepe is.

Ezen információk alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a 180 perces maternális depriváción átesett PACAP HZ egerek megbízhatóan használhatóak a depresszió tanulmányozására. A modell prediktív validitásának tesztelése jelenleg is folyik.

Jelen tanulmány fő eredménye egy olyan egér modell létrehozása, mely olyan ígéretes tulajdonságokkal rendelkezik, amelyek lehetővé teszik annak vizsgálatát, hogy a rizikó faktorok hogyan járulnak hozzá a betegség kialakulásához illetve hogyan alakulnak ki a terápia rezisztens esetek. Potenciálisan új antidepresszáns gyógyszerek modellünkben való tesztelése segíthet hatékonyságuk megítélésében. Modellünk segíthet a monoamin terápia rezisztens depresszió neurobiológiájának megértésében, mely utat nyithat új, egyénre szabott terápiás lehetőségek felderítésében.

## Új eredmények összefoglalása

- 1. A súlyos maternális depriváció nem okoz drasztikus változásokat a korai posztnatális fejlődésben a 21. posztnatális napig.** A Wistar patkányok fejlődésében a maternális depriváció által okozott finom változások részben nemtől függőek.

2. **A PACAP heterozigóta egerek lassabb neurobehaviorális és testtömegfejlődést mutattak, mint a PACAP génkiütött és vad típusú egerek.** Eredményeink fontos információt szolgáltatnak az endogén PACAP fejlődésben játszott szerepének megértéséhez.
3. **A 180 perces maternális depriváció hosszútávú hatással van az MBT-re.** Az MD180-as csoportnál alkalmazot CVMS nem tudta tovább növelni a szorongási szintet az MBT tanúsága szerint.
4. **Az endogén PACAP szükséges a BSTov CRF-et expresszáló neuronjainak stressz szenzitivitásához.** A CVMS expozíció fokozta a BSTov CRF-et termelő neuronjainak FosB aktivitását a HZ és a WT egerekben, de hatástalan volt a KO állatokban.
5. **A súlyos maternális depriváció a BSTov CRF-et expresszáló neuronjainak aktivitását megemeli és érzéketlenné teszi őket további CVMS expozícióra endogén PACAP függvényében.** Ez arra enged következtetni, hogy a CVMS és a 180 perces maternális depriváció együttes alkalmazása megszünteti a BSTov CRF neuronjainak adaptációs képességét.
6. **180 perces maternális depriváció megemeli a cpEW Ucn1-et expresszáló sejteinek FosB termelését.** Mivel ez a jelenség a HZ és a KO állatokban volt a legkifejezettebb, megállapítható, hogy a CVMS reaktivitás PACAP expresszó függő.
7. **A súlyos maternális depriváció erőteljesen fokozza a FosB aktivitást az 5-HT expresszáló DR neuronokban.** További CVMS expozíció drasztikusan csökkenti az 5-HT-t termelő neuronok aktivitását.
8. **Fizikai, endokrinológiai, viselkedési és morfológiai vizsgálatok támasztják alá új, három találat elméleten alapuló depresszió modellünk fenomenológiai validitását. PACAP heterozigóta**

állataink maternális depriváció háttérrel és krónikus variábilis stressznek alávetve a depresszió állapotmodelljeként szolgálhatnak.

## A szerző tudományos közleményei

### A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

- **Farkas J.**, Kovacs LA, Gaspar L, Nafz A, Gaszner T, Ujvari B, Kormos V, Csernus V, Hashimoto H, Reglodi D, Gaszner B, *Construct and face validity of a new model for the three-hit theory of depression using PACAP mutant mice on CDI background.* Neurosci (2017) 354: 11-29 (IF: 3.231)
- **Farkas J.**, Sandor B, Tamas A, Kiss P, Hashimoto H, Nagy AD, Fulop BD, Juhasz T, Manavalan S, Reglodi D, *Early Neurobehavioral Development of Mice Lacking Endogenous PACAP.* J Mol Neurosci (2017) 61:(4): 468-478 (IF: 2.229)
- **Farkas J.**, Reglodi D, Gaszner B, Szogyi D, Horvath G, Lubics A, Tamás A, Falko F, Besirevic D, Kiss P, *Effects of maternal separation on the neurobehavioral development of newborn Wistar rats.* Brain Res Bull. (2009) 79(3-4):208-214. (IF: 2,184)
- **Farkas J.**, Kovacs LA, Gaszner T, Gaszner B In: Dora Reglodi, Andrea Tamas (auth.) *Using PACAP Heterozygous Mice as Models of the Three Hit Theory of Depression Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP.* 840 p. Cham (Switzerland): Springer International Publishing, (2016) pp. 731-741. (Current Topics in Neurotoxicity; 11.) (ISBN:978-3-319-35133-9) – Book chapter

### A szerző egyéb közleményei:

Kiss P, Hauser D, Tamás A, Lubics A, Rác B, Horváth Zs, **Farkas J.**, Zimmermann F, Stepien A, Lengvári I, Reglodi D *Changes in open-field activity and novelty-seeking behavior in periadolescent rats neonatally treated with monosodium glutamate.* Neurotox Res (2007); 12: 85-93. (IF: 5,234)

Kiss P, Szogyi D, Reglodi D, Horváth G, **Farkas J.**, Lubics A, Tamás A, Atlasz T, Szabadfi K, Babai N, Gábrriel R, Koppán M, *Effects of perinatal asphyxia on the neurobehavioral and retinal development of newborn rats.* Brain Res (2009) 1255:42-50 (IF: 2,463)

Szabadfi K, Atlasz T, Horváth G, Kiss P, Hamza L, **Farkas J**, Tamás A, Lubics A, Gábrriel R, Reglődi D, Early postnatal enriched environment decreases retinal degeneration induced by monosodium glutamate treatment. *Brain Res* (2009) 1259:107-12 (IF: 2,463)

Gasznér B, Jensen K, **Farkas J**, Reglődi D, Csernus V, Roubos EW, Kozicz T Effects of maternal separation on dynamics of urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor in the rat non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus. *Int J Dev Neurosci* (2009) 27(5):439-451 (IF: 2,025)

Brubel R., Boronkai A, Reglodi D, Racz B, Nemeth J, Kiss P, Lubics A, Toth G, Horvath G, Varga T, Szogyi D, Fonagy E, **Farkas J**, Barakonyi A, Bellyei S, Szereday L, Koppan M, Tamas A, Changes in the expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the human placenta during pregnancy and its effects on the survival of JAR choriocarcinoma cells. *J Mol Neurosci* (2010) 42(3):450-8. (IF: 2,72)

Szakaly P, Horvath G, Kiss P, Laszlo E, **Farkas J**, Furjes G, Nemeth J, Reglodi D, Changes in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide following renal ischemia-reperfusion in rats. *Transplant Proc* (2010) 42(6):2283-6. (IF: 0,994)

Kiss P, Atlasz T, Szabadfi K, Horvath G, Griecs M, **Farkas J**, Matkovits A, Toth G, Lubics A, Tamas A, Gabriel R, Reglodi D, Comparison between PACAP- and enriched environment-induced retinal protection in MSG-treated newborn rats. *Neurosci Lett* (2011) 487(3):400-5. (IF: 1.925).

Szakaly P, Laszlo E, Kovacs K, Racz B, Horvath G, Ferencz A, Lubics A, Kiss P, Tamas A, Brubel R, Opper B, Baba A, Hashimoto H, **Farkas J**, Matkovits A, Magyarlaki T, Helyes Z, Reglodi D, Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) show increased susceptibility to in vivo renal ischemia/reperfusion injury. *Neuropeptides* (2011) 45(2):113-121 (IF: 2,036)

Brubel R, Reglodi D, Jambor E, Koppan M, Varnagy A, Biro Z, Kiss P, Gaal V, Matkovits A, **Farkas J**, Lubics A, Bodis J, Bay C, Veszpremi B, Tamas A, Nemeth J, Mark L, Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human gynecological and other biological fluids by using MALDI TOF mass spectrometry. *J Mass Spectrom* (2011) 189-194 (IF: 3,411)

Nakamachi T, **Farkas J**, Watanabe J, Ohtaki H, Dohi K, Arata S, Shioda S. Role of PACAP in neural stem/progenitor cell and astrocyte - from neural development to neural repair. *Curr Pharm Des* (2011) 17(10):973-84 (IF: 4,774)

Reglodi D, Kiss P, Szabadfi K, Atlasz T, Gabriel R, Horvath G, Szakaly P, Sandor B, Lubics A, Laszlo E, **Farkas J**, Matkovits A, Brubel R, Hashimoto H, Ferencz A, Vincze A, Helyes Z, Welke L, Lakatos A, Tamas A, PACAP is an endogenous protective factor-insights from PACAP-deficient mice. *J Mol Neurosci* (2012) 48(3):482-492. (IF: 2.922)

Tsuchikawa D, Nakamachi T, Tsuchida M, Wada Y, Hori M, **Farkas J**, Yoshikawa A, Kagami N, Imai N, Shintani N, Hashimoto H, Atsumi T, Shioda S, Neuroprotective effect of endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on spinal cord injury *J Mol Neurosci* (2012) 48(3):508-517. (IF: 2.891)

Nakamachi T, **Farkas J**, Kagami N, Wada Y, Hori M, Tsuchikawa D, Tsuchida M, Yoshikawa A, Imai N, Hosono T, Atrata S, Shioda S, Expression and distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor in reactive astrocytes induced by global brain ischemia in mice. *Acta Neurochir Suppl* (2013) 118:55-59 (IF: 1.788)

Kiss P, Szabadfi K, Horvath G, Tamas A, **Farkas J**, Gabriel R, Reglodi D, Gender-dependent effects of enriched environment and social isolation in ischemic retinal lesion in adult rats. *Int J Mol Sci* (2013) 14(8):16111-16123 (IF: 2.757)

Horvath G, Reglodi D, Vadasz G, **Farkas J**, Kiss P, Exposure to enriched environment decreases neurobehavioral deficits induced by neonatal glutamate toxicity. *Int J Mol Sci* (2013) 14(9):19054-19066 (IF: 2.757)

Nemeth A, Szabadfi K, Fulop B, Reglodi D, Kiss P, **Farkas J**, Szalontai B, Gabriel R, Hashimoto H, Tamas A, Examination of Calcium-Binding Protein Expression in the Inner Ear of Wild-Type, Heterozygous and Homozygous Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)-Knockout Mice in Kanamycin-Induced Ototoxicity. *Neurotox Res* (2014) 25(1):57-67 (IF: 3.538)

Horvath G, Reglődi D, **Farkas J**, Vadasz G, Mammel B, Kvarik T, Bodzai G, Kiss-Illes B, Farkas D, Matkovits A, Manavalan S, Gaszner B, Tamas A, Kiss P, Perinatal positive and negative influences on the early neurobehavioral reflex and motor development. *Adv Neurobiol* (2015) 10:149-167 (IF:1.73)

Nakamachi T, Ohtaki H, Seki T, Yofu S, Kagami N, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Mark L, Lanekoff I, Kiss P, **Farkas J**, Reglodi D, Shioda S, PACAP suppresses dry eye signs by stimulating tear secretion. *Nat Commun* (2016) 7:12034. (IF: 12.124)

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 center. *Neuroscience* (2016) 330:335-58 (IF: 3.231)

**Farkas József** Skin receptors (structure, functions, pathology) In: Csernus Valér, Kállai János, Komoly Sámuel (auth.) Neural regulation of human life processes – from the neuron to the behaviour. Interdisciplinary teaching material concerning the structure, function and clinical aspects of the nervous system for students of medicine, health and life sciences in Hungary. 2266 p. Pécs: Dialóg Campus Kiadó, (2016). pp. 469-491. (ISBN:978-963-642-632-3) TÁMOP 4.1.2.A/1-11/1-2011-0094 Book chapter – Published in Hungarian, English and German

Rendeki Sz, Keresztes D, Woth G, Merei A, Rozanovic M, Rendeki M, **Farkas J**, Muhl D, Nagy B Comparison of VividTrac®, Airtraq®, King Vision®, Macintosh Laryngoscope and a Custom-Made Videolaryngoscope for difficult and normal airways in mannequins by novices. *Bmc Anesthesiol* (2017) 17 (1):68 (IF:1.525)

Keresztes D, Woth G, Nagy BJ, **Farkas J**, Németh Zs, Maróti P, Rendeki M, Rendeki Sz Kárhelyszíni elsősegélynyújtás - a Disaster Medic képzés első tapasztalatai tűzoltók körében Védelem Tudomány Katasztrófavédelmi Online Tudományos Folyóirat (2017) 2(1): 204-216.

Adel Jungling, Dora Reglodi, Zsófia Nozomi Karadi, Gabor Horvath, **Jozsef Farkas**, Balazs Gaszner, Andrea Tamas, Effects of Postnatal Enriched Environment in a Model of Parkinson's Disease in Adult Rats. *Int J Mol SCI* (2017) 18:(2) 406-411 (IF: 3.257)  
Kumulatív IF: 74.209

## Köszönetnyilvánítás

Ez úton szeretném hálámat kifejezni témavezetőimnek, Prof. Dr. Reglődi Dóra egyetemi tanárnak és Dr. Gaszner Balázs egyetemi docensnek áldozatos munkájukért és a támogatásért, amit tőlük kaptam először hallgatóként majd később doktoranduszként. Mindketten példaképként szolgálnak számomra mind szakmai mind pedig emberi értelemben.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Csrenus Valér egyetemi tanárnak, a doktori program vezetőjének a RIA mérések kivitelezésében nyújtott segítségéért.

Hálás vagyok Phd hallgató és orvostanhallgató munkatársaimnak, Dr. Gaszner Tamásnak, Dr. Kovács Lászlónak, Füredi Nórának, Ujvári Balásznak, Anna Nafznak és Dr. Gáspár Lászlónak magas színvonalú professzionális munkájukért és kedves biztatásukért közös munkánk során.

Szeretnék köszönetet mondani a PTE ÁOK Anatómiai Intézet minden dolgozójának is. Külön szeretném megköszönni Orbán Izabellának magas szintű immunhisztológiai munkáját és Godáné Brumán Beatrix segítségét a RIA mérésekben.

Ezúton szeretném hálámat kifejezni mentoraimnak és barátaimnak, Prof. Seji Shiodának, Dr. Tomoya Nakamachinak, Dr. Hirokazu Ohtakinak, Prof. Dr. Vigh Sándornak és Prof. Dr. Nagy György Miklósnak akik nélkül ma nem lennék az a kutató és az az ember aki vagyok.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani egész családomnak, feleségemnek Zsófinak és kislányomnak Lucának akik feltétel nélkül támogattak, hittek bennem és bíztattak az ide vezető út során illetve édesapámnak és édesanyámnak valamint testvéremnek akik elindítottak orvosi és kutatói pályámon és végig támogattak abban, hogy elérhessem céljaimat.



**Kutatásaimat az alábbi támogatásokból finanszíroztuk:**

Hungarian Grant OTKA PD 100706 and by the research grant of Pecs University No. KA-2017-01 (to BG), Hungarian Brain Research Program – Grant No. KTIA\_13\_NAP-A-III/5, MTA TKI 14016 (to BG, DR) and by GINOP-2.3.2-15-2016-00050 – PEPSYS. OTKA K104984, PD109644, National Research, Development and Innovation Fund K119759, GINOP-2.3.2-15-2016- 00050 PEPSYS, PTE AOK Research Grant, Hungarian Brain Research Program—KTIA\_13\_NAP-A-III/5, Centre for Neuroscience of the University of Pecs. The UNKP-16-4-IV New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities, and Centre for Neuroscience, Idegtudományi Kiválósági Központ, University of Pécs, TAMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012- 0001 National Excellence Program. Bolyai János Scholarship , Szodoray Lajos and Magyary Zoltán Funds by the European Union and the State of Hungary, University of Debrecen (RH/751/2015). Hungarian Science Research Fund (OTKA T046589, F67830, 78480), ETT439/2006