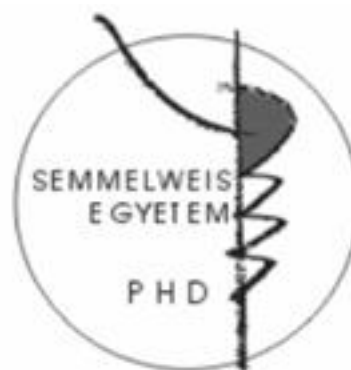


Az anyák magatartása és stressz-reaktivitása a vazopresszin hiányos Brattleboro patkányok tükrében

Doktori tézisek

dr. Fodor Anna

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Zelena Dóra, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Dobolyi Árpád, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Lévay György, Ph.D., tudományos tanácsadó

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Ligeti Erzsébet, az MTA tagja,
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Riba Pál, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Gacsályi István, Ph.D., kutató

Budapest
2015

BEVEZETÉS

A szülői gondoskodás egy nélkülözhetetlen magatartásforma, mely szükséges ahhoz, hogy az éretlenül világra jövő utód megélje azt a kort, amikor már önmagáról képes gondoskodni. Emlősöknél ez jelenthet anyai, apai vagy közös gondoskodást, de leginkább az anyai dominancia jellemző. Az, hogy az anya miként viselkedik a szülést követő időszakról kezdve gyermekével, hosszú távú következményekkel jár. Például befolyásolja a gyermek későbbi szociális viselkedését: az olyan csecsemők, akik korai életük során nem tudnak senkivel sem szorosabb kapcsolatot kialakítani, később vagy apatikusnak tűnnek, vagy a gyermek gátlástalanul igyekszik mindenkivel kötődést kialakítani. A kóros viselkedési minták kialakulása mellett a szomatikus fejlődésük is elmarad. Mindemellet a korai anya-gyermek kapcsolat megszakadása az immunfunkciók éréseben, működésében is zavarokat okozhat.

A harmonikus anya-gyermek kapcsolat kialakulásának útjában állhat, ha az anyánál pszichés zavarok jelennek meg a szülést követően. Ilyenkor az anyáknál lehangoltság, érzelmi kiürülés gyakran előfordulhat ("postpartum blues"). Ez érzelmi labilitással, sírásban való kitörésekkel, szorongással, állandó fáradtságérzéssel, alvászavarokkal, dühvel, irritabilitással járhat. Ha ez nem csak átmenetileg, pár napig jelentkezik, akár pszichotikus tünetekkel tarkított depresszió is kibontakozhat (postpartum depresszió, PPD). A PPD prevalenciája egy átfogó meta-analízis szerint 21,9 % körüli a szülést követő első évben. Akiknek a kórelőzményében előfordultak már ezek a betegségek, a terhesség során nagy valószínűséggel kiújulnak vagy rosszabbodnak. A PPD-ban szenvedő anyák ingerlékenyebbek és ellenségesebbek, kevesebb szeretettel és melegséggel fordulnak gyermekeikhez, később kevesebbet olvasnak nekik és játszanak velük. A szorongás, mint tünet, a legtöbb pszichiátriai betegségnél előfordulhat, depresszióban, főleg PPD-ban különösen gyakori. Terhesség alatt a szorongás prevalenciája 25% körülire tehető, szülést követően pedig 11,1%. A PPD tünetei között szerepelhet a düh és irritabilitás, valamint az agresszív és impulzív megnyilvánulások is gyakoribbak lehetnek. A PPD kialakulásában fontos szerepet játszik az anyát érő stressz (főleg a szociális stressz) és az azzal való megbirkózási képessége is: az újdonsült anyának rengeteg új szituációval kell megküzdenie, amiket nem mindegy, hogy miként képes kezelni. A terhesség az anya szervezetét rendkívüli módon leterheli, radikális változásokat okozva. Ilyenkor a stressz-tengely működésében is változások következnek

be: krónikus aktiváció csökkent stressz-reaktivitással, mely a laktáció ideje alatt is tovább folytatódik.

A vazopresszin (arginin-vazopresszin, AVP) kulcsszerepet tölt be a szociális viselkedés szabályozásában, befolyásolja a szociális kötődés kialakulását, az agressziót, az utódgondozásban való részvételt és azt, hogy milyen párkapcsolati modell jellemző az egyedre. Legnagyobb mennyiségben a hypothalamus magnocellularis sejtjeiben, a supraopticus (SON) és paraventricularis (PVN) magokban termelődik. Kisebb mennyiségben ezen magok parvocellularis neuronjaiban, valamint a nucleus suprachiasmaticus-ban (SCN), a bed nucleus of the stria terminalis (BNST)-ben és a medialis amygdalában is szintetizálódik. A magnocellularis neuronok a hátsó hypophysisbe vetítenek és a legfőbb feladatuk a szervezet ozmotikus háztartásának szabályozása. A medialis parvocellularis részből indul ki az az idegrost köteg, melyből származó AVP a portális ereken keresztül az adenohypophysishez kerül, s ott az adrenokortikotrop hormon (ACTH, a stressz-tengely hypophysealis komponense) termelését serkenti, hasonlóan a kortikotropin elválasztást serkentő hormonhoz (corticotropin-releasing hormone, CRH). Azaz az AVP a stressz-tengely fontos szabályozójának tekinthető. A PVN dorsalis része elsősorban az autonóm területekre vetít, melyek szerepet játszhatnak a stressz hatására bekövetkező szomatikus változások (szívfrekvencia növekedés, izzadás) közvetítésében. Ugyanakkor az AVP az anyai magatartás szabályozásában is szerepet játszhat, hiszen a szülés és a szoptatás során a szintje megnövekszik. Major depresszióban szenvedő betegeknél magasabb AVP szint mutatható ki.

Rágcsálóknál az anyai utódgondozás számos tevékenységet magába foglal: fészek megépítése és a kölykök oda gyűjtése, szoptatás, a kölykök nyalogatása, tisztogatása (licking-grooming, LG), megvédése más egyedek fenyegetésével szemben (anyai agresszió). Az anyaállat utódait igyekszik egy kupacba gyűjteni (pup retrieval, PR), és a fészek felett fekvő biztosítani a kölykök védelmezését és melegen tartását egyaránt, s ezzel az utódok táplálkozását is megkönnyíteni. A szoptatás számos pozícióban végzik az anyaállatok: kölykök felett (blanket posture, B), illetve mellett fekvő (passzív szoptatás), valamint aktív szoptató pozícióban (arched back posture, AB), mely során az anyaállat kinyújtott lábbal, magas háti kyphosisos pozícióban helyezkedik el. Az LG a tisztító funkción kívül egyéb szerepet is betölt: az anogenitális régió nyalogatása a

kölykök reflexes vizeletürítését váltja ki, emellett gyakoriságának függvényében epigenetikai változások is bekövetkeznek a kölykök genetikai állományában, melyeknek hosszú távú következményei vannak, s generációkon keresztül is kifejthetik hatásukat (pl. LG hatására a kölykök hippocampusában a glükokortikoid receptor szintje megnő). Az anyai védelmező magatartás elengedhetetlen a védtelen utódok túléléséhez, hiszen azok a természetben rengeteg potenciális veszélynek vannak kitéve. A legtöbb emlősnél ez aktív anyai agresszióban nyilvánul meg, amely azt jelenti, hogy az anyaállat a kölykeit potenciálisan fenyegető ellenfélre is rátámad.

Az anyai magatartás szabályozásában fontos szerepet játszik a vemhesség és a szoptatás alatt kialakult hormonális háttér, emellett azonban a kölykök felől érkező ingerek is fontos szerephez jutnak. Két fontos agyterületet lehet kiemelni az anyai magatartás szabályozásában: a hypothalamusban található medialis preoptikus area-t (mPOA) és a BNST ventralis részét. Ha károsodás éri ezeket az agyterületeket (pl. lézióval vagy toxinnal előidézve), az anyai magatartás zavart szenved.

CÉLKITŰZÉSEK

A bevezetésben említett irodalmi adatok arra utalnak, hogy az AVP kulcsszerepet tölt be a szociális viselkedés szabályozásában, többek között az utódgondozó magatartás kialakulásában is. Valamint hatással lehet az egyed pszichés állapotára, és a szervezet stresszorokra adott válaszára is.

Munkánk során az AVP laktáció alatti szabályozó szerepének alapos felderítése volt a cél. Ennek érdekében összehasonlítottuk AVP-vel rendelkező és AVP-hiányos laktáló Brattleboro patkányok viselkedését, valamint stressz-reaktivitását. Egyes vizsgálataink célja a következő kérdések megválaszolása volt:

1. Befolyásolja-e az AVP hiánya az utódgondozó magatartás (spontán és indukált anyai magatartás) kialakulását?
2. A postpartum időszakban a pszichés zavarok megjelenése függ-e az AVP-től?

AVP-től függően van-e különbség az anyaállatok:

- szorongási szintjében
- depresszió-szerű magatartásában
- agresszivitásának mértékében
- és impulzivitásában?

3. A laktáció időszaka alatt AVP hiányában megváltozik-e
 - a. a stressz-tengely alapaktivitása? (követve a szomatikus paraméterek (testtömeg, mellékvese tömeg) és a stressz-tengely alapaktivitásának változását szűz nőstényekhez képest)
 - b. a stresszorok hatására bekövetkező stressz-tengely aktiválódása?
4. Hogyan változik AVP-hiány hatására az AVP-t termelő, a stressz-folyamatok és az anyai magatartás szabályozásában részt vevő agyterületek alapaktivitása, valamint stressz-reaktivitása?

MÓDSZEREK

Állatok

Kísérleteinket nőstény Brattleboro patkányokon végeztük, amelyek a Harlan Laboratories-ból (Indianapolis, USA) származó állatokból kialakított, az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben fenntartott tenyészetből származtak. Az AVP-hiányos Brattleboro patkányok egy spontán mutáció következtében nem rendelkeznek működőképes AVP-vel, így centrális diabetes insipidusban (DI) szenvednek: az állatokra jellemző a vizelet alacsonyabb, a szérum magasabb ozmolalitása, sokat isznak és vizelnek. Kísérleteinkhez a nőstényeket homozigóta domináns (AVP+) vagy homozigóta recesszív (AVP-) hím patkányokkal pároztattunk össze, hogy az utódok között ne legyenek olyanok, amelyek DI-osak, hiszen az befolyásolhatja az anyák magatartását. Az átlagosan 21 napig tartó vemhesség után a megszületett utódok számát 6-ra redukáltuk minden alomnál (3 hím és 3 nőstény), hogy elkerüljük az eltérő utódszámból és az utódok neméből eredő különbségeket az anyai magatartásban. Az anyák pár napos eltéréssel hozták világra utódaikat, a kísérleteket azonban egy napon végeztük el rajtuk. Standard hőmérsékletet és páratartalmat biztosítottunk az állattartó és a kísérleti szobákban egyaránt. Az állatokat 12 órás fény-sötét ciklusban tartottuk, a kísérleteknek megfelelően normál vagy fordított periódusban. A kísérletek az Európai Unió előírásai szerint (2010/63/EU) és az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Állatjóléti Bizottságának jóváhagyásával zajlottak.

Anyai magatartás vizsgálata

Mivel felmerült annak a lehetősége, hogy az AVP-hiány okozta ivási és vizeleti kényszer befolyásolhatja az AVP- anyák kölykeikkel és egyéb tevékenységgel (anya a fészken kívül) eltöltött idejének arányát, valamint hogy az utódok anogenitális régiójának nyalogatása az AVP- anya só-víz háztartására megterhelő a kispatkányok magas ozmolalitású vizeletének elfogyasztása miatt, így az AVP perifériás pótlásával végeztük el ezeket a kísérleteket. Az AVP- anyák felének a bőre alá az ellés utáni nap gyors éter bódításban dezmpresszint (DDAVP, V₂ receptor agonista) kibocsájtó ozmotikus minipumpát ültettünk, míg a többi AVP- és AVP+ patkány áloperáción esett át. Ezt követően a spontán és az indukált anyai magatartásukat vizsgáltuk meg.

- Spontán anyai magatartás vizsgálata

A születést követő 7 napban, naponta háromszor (időpontok: 8:30, 14:30, 20:30) 60 percen keresztül néztük az almokat. 3 percenként ránéztünk az anyaállatra és feljegyeztük, hogy a következő viselkedési minták közül épp melyiket láthattuk nála: (1) *utódgondozás* (licking-grooming, LG), amikor az anya a kölyköket nyalogatja, tisztogatja; (2) *szoptató pozíció* (arched back posture, AB), amikor az anyaállatok magas háti kyphosisos pozícióban az utódaikat szoptatják; (3) *anya a kölykök felett* fekszik (blanket posture); (4) *passzív szoptatás*, amikor az anya az oldalán vagy a hátán fekszik, hagyva, hogy kicsinyei nyugodtan szophassanak; (5) *anya a fészken kívül* (mother-off) helyezkedik el (ezen belül feljegyeztük azt is, amikor az anyaállat ivott vagy evett).

- Indukált anyai magatartás (Pup retrieval test, PR)

A 8. napon a kölyköket elvettük 5 percre az anyáktól, majd azokat szétszórva visszahelyeztük anyjukhoz és megfigyeltük az anyaállat viselkedését. Stopperórával mértük (1) az első kölyök megfogásáig eltelt időt; (2) az első kölyök fészkebeviteléig eltelt időt; (3) az utolsó kölyök fészkebeviteléig eltelt időt.

Anyák pszichés állapotának vizsgálata

- Depresszió- és szorongás-szerű tünetek vizsgálata

Megemelt keresztpalló teszt (Elevated Plus Maze, EPM)

A 10-15. postpartum nap során egyszer az anyaállatokat egy fémből készült keresztspalló (melynek 2 karja nyitott, a másik 2 pedig zárt) centrumába helyeztük orral az egyik zárt kar felé 5 percre. Megfigyeltük, hogy az állat mennyi időt töltött a centrumban, a zárt és a nyílt karokban, illetve hányszor lépett be ezekbe a térrészekbe (belépésnek az számít, ha minimum 3 lábbal átlépte az adott kompartmentek közötti határvonalat).

Anhedónia teszt

A 12-17. napok között egyszer 24 órára az állatok ketrecéhez kétféle folyadékkal feltöltött itatót csatlakoztattunk és az ez idő alatt elfogyasztott folyadékok mennyiségét regisztráltuk (az edények kezdeti és végtömegének különbségéből): (1) 2,5%-os cukor oldat vs. 2,5%-os cukor + 8%-os alkohol oldat (cukor-preferencia) (2) 0,1% szacharin oldat vs. víz (szacharin-preferencia).

Kényszeres úszás teszt (Forced Swim Test, FST)

A 15-20. napon az állatokat egyszer csapvízzel megtöltött üveghengerekbe tettük 15 percre, s regisztráltuk, hogy mennyi időt tölt az állat a következő tevékenységekkel: (1) *küzdés* (struggling): a patkány erőteljes mozdulatokkal próbál kijutni a vízből, mellső lábaival áttöri a víz felszínét; (2) *úszás* (swimming): finom koordináló mozdulatok a négy végtaggal a víz felszíne alatt; (3) *lebegés* (floating): feladja a küzdést, mintegy felfújva testét tartja fenn magát és csak az orrát dugja ki a vízből; (4) *búvárkodás* (diving): az állat a víz alá bukik.

- Anyai agresszió vizsgálata – rezidens-betolakodó teszt

Az anyaállat dobozába a szülés utáni 5. vagy 6. és 18. vagy 19. napokon egy hím Wistar patkányt tettünk be 10 percre és kamerával rögzítettük tevékenységüket. A 10 perc elteltével a betolakodó állatot kivettük, majd további 20 percig folytattuk a videó felvételét, hogy megfigyeljük az anya magatartását a teszt után (fészek felett tartózkodás, kölykök nyalogatása, szorongás-szerű paraméterek). A felvételek később kerültek kielemezésre. Az agresszió teszt során a harapások számát és minőségét figyeltük meg a video lassított visszajátszásával: (1) veszélyes vs. nem-veszélyes terület harapása; (2) jelzett vs. nem jelzett harapás; (3) enyhe vs. durva harapás.

- Impulzív viselkedés vizsgálata

Az úgy nevezett „késleltetett jutalom paradigmát” alkalmazva Skinner-boxokban mértük fel az anyák impulzivitását. Ebben a dobozban az állat magának tudja orrbedugással adagolni a táplálékot (magas cukortartalmú pellet): az egyik lyuk kisebb (1 db), a másik nagyobb jutalmat (5 db cukor) eredményez.

A *tréning fázis* (kondicionálás) alatt az állat az orrbedugás után rögtön megkapta mindkét jutalommenyiséget. A nagy jutalomhoz rendelt oldal random módon lett meghatározva, de egy állat esetében a kísérlet egésze alatt adott maradt. A jutalom megjelenésével egy időben a kamrabilágítás 25 másodpercre felkapcsolódott. Ez idő alatt (holtidő, time-out) új jutalmat az állat nem tudott szerezni, de a rendszer az ez idő alatt adott válaszokat is regisztrálta. Akkor tekintettük sikeresnek a tréning fázist, ha az 5. nap végére az állatok 90 %-os preferenciával a nagy jutalmat eredményező oldalt választották. A következő 8 napon (*teszt fázis*) az orrbedugás és a nagy jutalom megjelenése között eltelt időt napról-napra növeltük. A késleltetés növekedésével a nagy jutalmat eredményező jel leadása csökkent. Az állat emelkedett döntési impulzivitását mutatja, ha nem képes a nagyobb jutalomért várni, és az átlagosnál hamarabb, rövid késleltetésnél is már a kisebb jutalommal járó lyukat preferálja. A motoros impulzivitásukra az inadekvát válaszok számából (mely a késleltetés vagy a jutalmat eredményező válasz utáni 25 másodpercig tartó holtidő alatt leadott összes válasz száma) következtethetünk. A teszt fázist követő 3 napban az állatok random módon 3 féle *farmakológiai kezelést* kaptak (minden egyes állat mindhárom típusú kezelésen átessen a 3 nap során, csak eltérő sorrendben): (1) klórdiazepoxid (CDP); (2) imipramin (IMI); (3) kontrollkezelésként vivőanyag (fiziológias sóoldat).

Stressz-tengely működésének vizsgálata laktáció alatt

- Laktáló és szűz nőtények szomatikus paramétereinek (testtömeg, mellékvese tömeg) és a stressz-tengely alapaktivitásának összehasonlítása:

Az ellés utáni 20-22. napon az anyákat és a szűz kontroll nőtényeket súlymérés után dekapitáltuk. Az állatok törzsvérét összegyűjtöttük a perifériás stresszhormonok koncentrációinak radioimmunoassay (RIA) módszerrel történő

meghatározására. A tetemekből kioperáltuk a mellékveséket és feljegyeztük tömegüket. A koponyacsontból a lehető leggyorsabban eltávolítottuk az agyakat a CRH és a hypophysiseket a proopiomelanokortin (POMC, az ACTH prohormonja) mRNS szintjének in situ hybridisatioval történő meghatározásához.

- Stresszorok hatására bekövetkező tengely-aktiválódás vizsgálata:

Az állatok másik két csoportját a 7-11. postpartum napokban különböző stresszoroknak tettük ki és vérmintáikból RIA módszerrel nyomon követtük az ACTH és a kortikoszteron koncentrációk változásait. Az egyik csoportnak előzőleg beültetett juguláris kanülön keresztül intravénás tojásfehérjét injektáltuk be egyszer, s azon keresztül vért vettünk tőlük a beadás előtt, majd az azt követő 15., 30., 60., 90. és 120. percekben. Az állatok másik felének 18 óras ételmegvonás után intraperitonealisan gyors hatású inzulint vagy fiziológias sóoldatot fecskendeztünk be (kontroll csoport), majd 1 óra múlva dekapitálással összegyűjtöttük a vérüket, melyből gyorseszttel segítségével a vércukorszintet is meghatároztuk.

Immuncitokémiai vizsgálatok

Stresszeletlen kontroll állatokat, akikkel nem történtek magatartás vizsgálatok, a szülést követő 15-20. napon és a kényszeres úszás teszten átesetteket 2 órával a teszt után random sorrendben perfundáltuk az agy fixálásának céljából. Az agyakat lemetsztük és c-Fos immuncitokémiai módszerrel a neuronok aktivitását elemeztük. Mivel az állataink AVP-hiányosak voltak, megvizsgáltuk a hypothalamus *PVN*-jét és a *medialis amygdalát (MeA)*, a depresszió- és szorongás-szerű magatartás szabályozásában szerepet játszó *centralis amygdalát (CeA)* és az anyai magatartás szabályozásában fontos szerepet játszó *mPOA*-t és *BNST*-t. A *PVN* különböző régióit külön elemeztük az eltérő funkcióik miatt: neurohypophysisebe vetítő *magnocellularis régió*, az autonóm idegrendszeri központokba vetülő *dorsalis parvocellularis PVN (dpPVN)* és az adenohypophysishoz futó *medialis parvocellularis régió (mpPVN)*.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

Anyai magatartás

Az AVP- anyák szignifikánsan kevesebb időt töltöttek a kölykeik nyalogatásával, tisztogatásával (LG), mint az AVP+ anyák (leginkább a 8:30 és a 20:30 időpontokban), s ez a különbség DDAVP pótlás után is megmaradt. Az ellést követő első héten az idő teltével a LG-gal töltött idő mennyisége egyik csoportnál sem csökkent. Ez az alacsonyabb LG gyakoriság magyarázattal szolgálhat a megelőző vizsgálatainkra, miszerint az AVP- anyák utódainak stressz-reaktivitása magasabb, hiszen az irodalmi adatok szerint az alacsony LG hatására a kölykök hippocampusában a glükokortikoid receptor expressziója alacsonyabb, s ezáltal a stressz-reaktivitásuk magasabb.

A spontán anyai magatartások közül a patkánykölykök szomatikus fejlődéséhez elengedhetetlen szoptatás gyakoriságában az AVP- anyák nem mutattak különbséget, de a szoptatás módja eltért a genotípusok között. Az aktív szoptató pozícióban (AB) mind az AVP-, mind a DDAVP-vel kezelt AVP- csoport szignifikánsan kevesebbet tartózkodott az AVP+ genotípushoz képest, mely különbség a 14:30 és a 20:30 időpontokban volt a legkifejezettebb. A DDAVP kezelt csoport szignifikánsan kevesebbet szoptatta kölykeit a fészek felett tartózkodva, míg passzív pozícióban az AVP- anyák és a DDAVP kezelt csoport is szignifikánsan többet szoptatták kölykeiket, mint az AVP+ genotípusúak. A fészken kívül tartózkodás nem mutatkozott különbözőnek a csoportok között. Mivel a vízháztartás zavarát V_2R agonista kezeléssel (bőr alá helyezett, dezmozpresszinnel megtöltött ozmotikus minipumpával) megszüntetve a viselkedési hatások fennmaradtak, megállapíthatjuk, hogy a centralis AVP-hiány áll az eltérő anyai viselkedés háttérében. Eredményeink megerősítik az irodalmi adatokat, melyek szerint az AVP növelheti az anyai törődést, még hozzá 1a típusú receptorokon keresztül.

Az indukált anyai magatartás vizsgálata során nem találtunk szignifikáns különbséget a genotípusok között. Irodalmi adatok szerint a spontán és az indukált anyai magatartás neuronális szabályozása különbözik, számos kísérletben tapasztalták a kezelések eltérő hatását (pl. ha az agykamrákba AVP-t injektáltak be hosszabb időn keresztül, akkor emelkedést figyeltek meg a szoptató pozíció (AB) előfordulásában, viszont a többi megfigyelt viselkedésminta száma nem változott). Az indukált viselkedést az anya kezdeményezi, aktív anyai reakcióként írható le, ezzel ellentétben a szoptató,

gondoskodó magatartást a kölykök indukálják azzal, hogy az anya hasát és emlőbimbóját ingerlik, így egy passzív anyai reakcióként írható le.

Anyák pszichés állapota

A megemelt keresztpalló teszt során se a nyílt karban töltött időben, se a mozgékonyaságtól függetlenül kifejezett nyílt kari aktivitásban (nyílt kari belépések száma/ (nyílt+zárt kari belépések száma) nem láttunk szignifikáns különbséget a genotípusok között a 10-15 napos laktáló anyaállatok vizsgálata esetén. Vagyis az állatok szorongási szintje nem tért el. A zárt kari belépések számában, vagyis a mozgékonyaságukban sem különböztek a csoportok. Megelőző kísérleteinkben ezzel egyhangúan, hím Brattleboro patkányoknál sem találtunk eltérést a genotípusok között a szorongási szintjeikben.

Következő kísérletsorozatunkban azt láttuk, hogy az AVP-hiányos állatok a postpartum időszakban alacsonyabb depresszió-szerű viselkedést mutattak a kontroll csoporthoz képest. Az AVP-hiányos egyedek cukor- és szacharin-preferenciája is szignifikánsan magasabb volt, mint az AVP+ genotípusú anyáké, vagyis jobban preferálták a cukros, édes oldatot, kevésbé mutattak anhedóniát. A kényszeres úszás tesztben ezek az állatok szignifikánsan több időt töltöttek küzdéssel, illetve kevesebbet úszással, valamint csökkent tendenciát mutattak a lebegéssel töltött idő tekintetében is. A búvárkodás 0,5 %-nál is kevesebbszer fordult elő és nem tapasztaltunk különbséget a genotípusok között. Az eltérő hatásmechanizmusú antidepresszánsok különböző módon hatnak az FST paramétereire. A Reboxetine (mely a noradrenalin reuptake rendkívül szelektív és hatékony gátlója; csak gyenge hatása van az 5-HT reuptake-re és nem hat a dopamin uptake-re) hatása hasonló, mint az AVP-hiány laktációkor tapasztalt hatása. Irodalmi adatok szerint az AVP az 1b típusú receptorokon keresztül képes a depresszió-szerű tüneteket befolyásolni

AVP hiányában nem csak az anyai gondoskodó magatartás, hanem a kölykök védelmezését szolgáló anyai agresszió is csökkenést mutatott. Az irodalmi adatoknak megfelelően mindkét genotípus agressziójának szintje csökkent a laktáció előrehaladtával, de az AVP- csoportnak még így is alacsonyabb maradt az agresszivitása a későbbi időpontban is, mint az AVP+ anyáknak. A durva és a veszélyes harapások száma a korábbi időpontban nem különbözött a genotípusok között, de a

későbbi időpontra az AVP- anyáknak csökkent, míg a másik csoportnak enyhén növekedett. Ezek a paraméterek az abnormális agresszió mértékével korrelálnak, vagyis AVP jelenlétében a laktáció idejével csökkenő agresszivitás patológiás irányba változhat. Az agresszió tesztet követően szintén csökkent anyai magatartást találtunk az AVP- anyáknál a szoptatás korai szakaszában. A fészek felett tartózkodás és a kölykök nyalogatásának ideje a 18-19. napon a két genotípus között már nem különbözött. Úgy tűnik, hogy AVP hiányában elmarad a korai laktáció alatt észlelhető anyai magatartások gyakoriságának növekedése. Ez az anyai agresszió szintjét is befolyásolhatja, hiszen a kölykök gondozása közben az anyát érő taktilis ingereknek agressziót fokozó hatása van. Mivel az AVP-hiányos anyák utódgondozó magatartása csökkent, kevesebb taktilis inger éri őket, ez pedig csökkenést okozhat az agressziójuk szintjében is. Eredményeinkkel megerősítettük Bosch munkáját, aki egy szorongás vizsgálatára specializált patkánytörzsön a következőket találta: a csökkent AVP szintű anyák kevésbé agresszívek, kevésbé szorongók és rosszabb anyák, mint a normál AVP-jű egyedek, s AVP adásával agresszivitásuk növelhető.

Irodalmi adatok szerint a nemi hormonok szerepet játszanak az impulzív viselkedés kialakulásában. Csoportunk kísérletei során a nőstény Brattleboro patkányok alacsonyabb impulzivitást mutattak, mint a hímek, függetlenül a genotípustól. Vagyis az ivar valószínűleg AVP független módon befolyásolja az impulzivitást. Ugyanakkor laktáló patkányok esetében, már az AVP is szerephez juthat, hiszen az AVP-hiányos laktáló nőstények csökkent impulzivitást mutattak az AVP+ anyákhoz képest. Az anyáknál az AVP+ csoportnál egyik kezelés sem változtatta meg se a döntési, se a motoros impulzivitást, az AVP- csoportnál pedig a CDP (az irodalmi adatoknak megfelelően) növelte az impulzivitás mindkét típusát, az IMI pedig meglepő módon (az irodalmi adatokkal ellentétben) szintén növelte a döntési impulzivitást. A laktáló AVP+ csoportnál a hatástalanság oka lehet az is, hogy a laktáció következtében létrejövő impulzivitás-emelkedés elért egy maximális szintet, amelyet a kezelés már nem tudott tovább fokozni. Mindemellett az AVP szabályozó szerepe fontosnak tűnik, hiszen laktáció alatt AVP függő módon fejtette ki a CDP az impulzivitást növelő hatását. Eredményeink azt támasztják alá, hogy a terhesség és a laktáció alatt bekövetkező hormonális változások befolyásolhatják az impulzivitást, illetve annak a szabályozását,

mely során úgy tűnik, hogy az AVP is szerephez juthat akár a GABA, akár az 5-HT neurotranszmisszió keresztül.

Stressz-tengely működésének vizsgálata laktáció alatt

Laktáló AVP+ anyák stressz-tengely alapaktivitása a krónikus stressz állapotnak megfelelő képet mutatott: megemelkedett mellékvese tömeg, CRH mRNS szint a PVN-ben, illetve plazma kortikoszteron-szint. Az AVP- csoportnál viszont nem találtunk különbséget a szűz és a laktáló nőstények stressz-tengely jellemzői között; a laktáló AVP- patkányok CRH és kortikoszteroid szintje is szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az AVP+ anyáké. Azaz AVP hiányában a laktációkor bekövetkező krónikus HPA-tengely aktiválódás nem következik be. Ez egybevág azzal az elképzeléssel, hogy az AVP HPA-tengely szabályozásában betöltött szerepe megnövekszik krónikus stresszfolyamatok során. A szűz nőstényekben a genotípusnak nem volt hatása a tengely alapműködésére, míg megelőző kísérleteinkben hímeknél AVP hiányában magasabb CRH mRNS-t találtunk a PVN-ben.

Mind az AVP hiány, mind a laktáció csökkentette a stressz-reaktivitást, de az AVP nem befolyásolta a laktáció hatását. Azaz a laktáló patkány akut stressz-reaktivitásának fenntartásában nem jelentősebb az AVP szerepe, mint a szűz állatok esetén. Az ACTH és kortikoszteron szintek disszociációját figyeltük meg, mely hím Brattleboro patkányokban is jellemző. AVP-hiányos állatok ACTH emelkedése szignifikánsan alacsonyabb volt, a kortikoszteron változása pedig nem különbözött a genotípusok között. Erre az egyik magyarázat a mellékvese fokozott ACTH érzékenysége lehet, hiszen az alacsonyabb ACTH szint ugyanolyan kortikoszteron szintet biztosít. Másik ok lehet a kortikoszteron szekréció ACTH-független kiváltása, melyben szerepet játszhat például a mellékvese velőállományából a stressz-válasz során felszabaduló adrenalin is.

Immuncitokémiai vizsgálatok

A *magnocellularis PVN* c-Fos alap aktivitását az AVP-hiányos patkányokban magasabbnak találtuk, mint AVP+ társaikét. Ennek magyarázata, hogy az AVP-hiány következtében a Brattleboro patkányok szérum ozmolalitása szignifikánsan magasabb, mint az AVP-vel rendelkező egyedeknek, így állandó ozmotikus stressznek vannak kitéve, mely folyamatosan stimulálja a PVN magnocellularis neuronjait. Ennek hatására ezek a neuronok hypertrophizálnak és hyperaktivitást mutatnak, valamint magasabb c-

Fos aktivitást lehet bennük mérni. Ennek az agyterületnek a kényszeres úszás tesztre bekövetkező aktivitás változása elenyésző volt.

A *parvocellularis PVN* dorsalis és medialis régiójának nyugalmi c-Fos aktivitása is hasonló tendenciát mutatott: az AVP- patkányok bazális szintje magasabb volt az AVP+ csoporthoz képest. Ezekben a sejtekben azonban mindkét genotípus szignifikáns c-Fos emelkedést mutatott a stressz hatására. Irodalmi adatok szerint stressz hatására (pl. FST) a PVN *parvocellularis* régiójában emelkedik meg leginkább a c-Fos aktivitás. A *medialis parvocellularis* részből kiinduló neuronokból származó CRH és AVP az adenohypophysishez kerül és az ACTH termelését serkentik, így a stressz-tengelyt aktiválják. A PVN *dorsalis* része elsősorban az autonóm területekre vetít. Ezek a területek szerepet játszhatnak a stressz hatására bekövetkező szomatikus változások (szívfrekvencia növekedés, izzadás) közvetítésében.

A *CeA*-ban az AVP-hiányos patkányokban magasabb alapszintű c-Fos aktivitást találtunk, azonban ezek az állatok nem mutattak jelentős emelkedést stressz hatására. Ez azzal magyarázható, hogy a *CeA*-t a krónikus stresszel és ennek következtében kialakuló affektív kórképekkel hozzák összefüggésbe, így az általunk alkalmazott akut stresszor (FST) hatására nem aktiválódott ez az agyterület. A *MeA*-ban az AVP-patkányok bazális aktivitása nem volt az AVP+ csoporténál jelentősen magasabb. Mindkét genotípus reagált stresszre, viszont az AVP-hiányosaknál az emelkedés csak fele akkora volt (hatszoros vs. háromszoros). A *MeA*-t az emocionális stresszre adott válaszreakció szabályozásával hozzák kapcsolatba; stimulálása a kortikoszteroid plazmaszintjének emelkedését okozza, míg léziójának következtében stressz hatására a medialis PVN-ben nem jön létre aktivitás fokozódás, melynek következtében az ACTH és a kortikoszteroid szintek sem emelkednek.

Az anyai magatartás szabályozásában fontos szerepet játszó agyterületek vizsgálata során a genotípusok között a *mPOA* alap-szintjében szignifikáns különbséget találtunk, mégpedig az AVP-hiányos anyáknál volt intenzívebb c-Fos jel. Ez látszólag ellentétben áll a viselkedésvizsgálatok során talált eredményekkel, hiszen az AVP-hiányos állatok csökkent anyai magatartást mutattak. Ez az ellentmondás azzal oldható fel, hogy az AVP-hiányos egyedek alap agyi aktivitása általánosságban magasabb, mint az AVP-t expresszálóké, de különféle kihívásokra (például a kicsinyek jelenléte) kisebb aktivitás-emelkedéssel reagál.

A *BNST* alap aktivitásában szignifikáns különbség nem mutatkozott. Ezt az agyterületet az anyai magatartás szabályozása mellett a szorongással hozzák még összefüggésbe; valamint a stressz-tengely szabályozásában is részt vesz a *PVN*-en és a *CeA*-n keresztül is. A *BNST* *c-Fos* aktivitásával párhuzamosan, a különböző genotípusú *Brattleboro* patkányok szorongás-szintjében sem találtunk eltérést.

KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánk során *AVP*-vel rendelkező és *AVP*-hiányos laktáló *Brattleboro* patkányok viselkedését és stressz-reaktivitását vizsgáltuk, mely alapján az *AVP* szabályozó szerepéről a következőket mondhatjuk:

1. Az anyák utódgondozó (spontán anyai) magatartása *AVP* hiányában csökken, míg indukált anyai magatartása nem változik.
2. A postpartum időszakban a depresszió-szerű tünetek megjelenése *AVP* hiányában ritkább, valamint csökken az agresszió és az impulzivitás mértéke is.
3. A stressz-tengely alap-aktivitásának növekedése a laktáció időszaka alatt szűz nőtény kontrollokhoz képest *AVP* hiányában nem következik be, stresszor hatására pedig kisebb mértékben aktiválódik a nőtény állatok *HPA* tengelye a reprodukív állapottól függetlenül.
4. Számos, az *AVP*-t termelő, a stressz-folyamatok és az anyai magatartás szabályozásában részt vevő agyterület bazális *c-Fos* aktivitása magasabb *AVP* hiányában, ugyanakkor stressz hatására a területek kevésbé aktiválódnak.

Összességében tehát a laktáció időszakában tapasztalható változások *AVP* hiányában nem jönnek létre, nem alakul ki megfelelő anyai magatartás, nem növekszik meg az anyák agressziója, impulzivitása és stressz-tengely aktivációja, ugyanakkor a stressz reaktivitásuk csökken. Mindezek mellett ugyan pozitív változásnak tekinthetőek az *AVP* hiányában csökkenő depresszió-szerű tünetek, azonban az *AVP* receptor antagonisták postpartum depresszióban való alkalmazását az anyai magatartásra és stressz-reaktivitásra gyakorolt negatív mellékhatásai erőteljesen korlátozzák.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

2014 Fodor A, Barsvári B, Aliczki M, Balogh Z, Zelena D, Goldberg SR, Haller J. The effects of vasopressin deficiency on aggression and impulsiveness in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2014 Sep;47:141-50.

Aliczki M, **Fodor A**, Balogh Z, Haller J, Zelena D. The effects of lactation on impulsive behavior in vasopressin-deficient Brattleboro rats. *Hormones and Behavior. Horm Behav*. 2014 Aug;66(3):545-51.

Fodor A, Zelena D. The effect of maternal stress activation on the offspring during lactation in light of vasopressin. *ScientificWorldJournal*. 2014 Jan 14;2014:265394.

2013 Fodor A, Pintér O, Domokos A, Langnaese K, Barna I, Engelmann M, Zelena D. Blunted HPA axis response in lactating, vasopressin-deficient Brattleboro rats. *J Endocrinol*. 2013 Oct 4;219(2):89-100.

Könyvfejezet:

Hormones and Behavior; Editors: Davis Simonsen; Nova Science Publishers; Pub. Date: 2013 - 2nd Quarter; ISBN: 978-1-62417-767-5

The Behavior of the Mother and Vasopressin (**Anna Fodor**, Dóra Zelena, HAS Institute of Experimental Medicine, Budapest, Hungary)

2012 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. *Horm Behav*. 2012 Sep;62(4):539-51.

Egyéb közlemények:

2014 Balázsfi D, Pintér O, Klausz B, Kovács KB, **Fodor A**, Török B, Engelmann M, Zelena D. Restoration of peripheral V2 receptor vasopressin signaling fails to correct behavioral changes in Brattleboro rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2014 Sep 19;51C:11-23. doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.09.011. (Epub ahead of print)

Fodor A, Timár J, Zelena D. Behavioral effects of perinatal opioid exposure. *Life Sci*. 2014 May 28;104(1-2):1-8.