A vazopresszin szabályozó szerepe akut és krónikus stresszfolyamatok során

Tanulmányok Brattleboro patkánytörzsön

Doktori értekezés

Domokos Ágnes Judit

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola

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

Hivatalos bírálók: Dr. Hajszán Tibor tudományos munkatárs Ph.D.
Dr. Bódizs Róbert tudományos főmunkatárs Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Halász Béla egyetemi tanár, az MTA tagja
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Nagy M. György egyetemi tanár, az MTA tagja
Dr. László Lajos egyetemi docens

Budapest
2012

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék 2
Rövidítések jegyzéke 6
1. Bevezetés 8
1.1. Stresszelméletek 9
1.2. Stresszorok 10
1.3. A hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely 12
1.3.1. A hipotalamusz 13
1.3.1.1. A nucleus paraventricularis hypothalami anatómiája és peptidjei 13
1.3.1.2. Kortikotropin elválasztást serkentő hormon (CRH) 15
1.3.2. A hipofízis 16
1.3.2.1. Adrenokortikotróp hormon (ACTH) 17
1.3.3. Mellékvese 18
1.4. A stresszfolyamatok életkori sajátosságai: A perinatális kor 22
1.5. Vazopresszin (AVP) 23
1.5.1. Az AVP fő hatásai 24
1.5.2. Az AVP hatása stresszben 27
1.5.3. Az AVP jelentősége pszichiátriai betegségekben 29
2. Célkitűzések 32
3. Módszerek 33
3.1. Kísérleti állatok 33
3.1.1. A Brattleboro törzs 33
3.1.2. Tartási körülmények 35
3.2. Mintavétel 36
3.2.1. Krónikus juguláris kanül beültetése vérminták vétele céljából 36
3.2.2. Vérminta nyerése farokvénából 36
3.2.3. Vér és szövetminták nyerése dekapitálással 36
3.3. Mérések 37
3.3.1. Hormonmérések 37
3.3.2. In situ hibridizáció 38
3.3.2.1. Szövetelőkészítés 38
3.3.2.2. Hibridizáció 38
3.3.3. A mellékvesék szövettani feldolgozása 40
3.3.4. Statikus inkubálás 40
3.3.5. Szuperfúzió 41
3.4. Kísérletek-Kísérleti protokollok 42
3.4.1. Akut stressz kísérletek 42
3.4.1.1. Újdonság stressz (Novelty) 42
3.4.1.2. Szociális elkerülés (Social avoidance) 42
3.4.1.3. Emelt keresztpalló teszt (elevated plus maze (EPM)) 42
3.4.1.4. Lipopoliszacharid (LPS) injekció 43
3.4.1.5. Éter inhaláció 43
3.4.1.6. Hipertóniás só oldat injekciója 43

3.4.1.7. Anafilaktoid reakció 43
3.4.1.8. „Foot-shock” stressz (lábra mért áramütés) 44
3.4.1.9. Ulcerogén, hidegben történő immobilizáció 44
3.4.1.10. Mozgáskorlátozás (Restraint) 44
3.4.1.11. Szociális „kudarc” teszt (Social defeat) 44
3.4.1.12. Hipoglikémia 45
3.4.1.13. Forszírozott úszás stressz (forced swim test (FST)) 45
3.4.1.14. A CRH érzékenység vizsgálata 45
3.4.1.14.1. In vivo tesztelés 45
3.4.1.14.2. In vitro tesztelés: statikus inkubálás 45
3.4.1.15. Mellékvese inkubálás 46
3.4.1.16. AVP retrodialízis a PVN-be 46
3.4.1.17. Egyszeri morfin kezelés hatása 47
3.4.2. Krónikus stressz kísérletek 48
3.4.2.1. Krónikus morfin kezelés utáni morfin megvonás hatása 48
3.4.2.2. 28 napos ismételt mozgáskorlátozás (repeated restraint) 48
3.4.2.3. Krónikus váltakozó, enyhe stressz 49
3.4.2.4. Magatartás az emelt keresztpallón 49
3.4.2.5. Magatartás az FST alatt 50
3.4.3. Perinatális kor vizsgálata 50
3.4.3.1. Kispatkányok stressz reaktivitásának vizsgálata 50
3.4.3.2. Perinatális kor: Nemek közötti különbségek 52
3.5. Statisztika 53
4. Eredmények 54
4.1. A felnőtt Brattleboro patkányok akut stresszreaktivitása 54
4.1.1. Újdonság stressz (Novelty stress) 54
4.1.2. Szociális elkerülés (Social avoidence) 54
4.1.3. Emelt keresztpalló teszt (EPM) 54
4.1.4. Lipopoliszacharid (LPS) injekció 55
4.1.5. Éter inhaláció 55
4.1.6. Hipertóniás só oldat injekciója 56
4.1.7. Anafilaktoid reakció 56
4.1.8. „Foot-shock” stressz 57
4.1.9. Ulcerogén, hidegben történő immobilizáció 58
4.1.10. Mozgáskorlátozás (Restraint) 58
4.1.11. Szociális „kudarc” teszt (Social defeat) 59
4.1.12. Hipoglikémia 60
4.1.13. Forszírozott úszás stressz (FST) 60
4.1.14. A hipofízis elülső lebeny CRH érzékenység vizsgálata 61
4.1.14.1. In vivo tesztelés 61
4.1.14.2. In vitro tesztelés: statikus inkubálás 62
4.1.15. Mellékvese inkubálás 62
4.1.16. A vazopresszin hiányos állatok forszírozott úszástesztben mutatott stressz reaktivitása AVP retrodialízises kísérletben 63

4.1.16.1. ACTH és kortikoszteron szintek változása 63
4.1.16.2. Oxitocin 64
4.1.16.3. Oxitocin és CRH mRNS in situ hibridizáció a PVN-ben.....64
4.1.16.4. Az FST során a PVN-ből nyert mikrodialízis minták elemzése... 65
4.1.16.5. Szintetikus AVP retrodialízis hatásának vizsgálata FST alatt.....66
4.1.17. Vazopresszin hiányos állatok vizsgálata akut morfin kezelés után 67
4.2. A vazopresszin hiányos állatok krónikus stresszhelyzetekben mutatott stresszválaszának vizsgálata 68
4.2.1. Krónikus morfin kezelés utáni drogmegvonás hatása 68
4.2.1.1. Szomatikus változások..... 68
4.2.1.2. AVP mRNS szintek változása a PVN-ben 69
4.2.1.3. CRH mRNS szintek változása.....70
4.2.1.4. POMC mRNS szintek változása az adenohipofízisben 70
4.2.1.5. Nyugalmi kortikoszteron szintek változása 71
4.2.1.6. Krónikus morfin kezelést követő akut elvonás okozta hormonváltozások..... 71
4.2.2. A vazopresszin szerepének vizsgálata a krónikus, 28 napos mozgáskorlátozás kísérletben 72
4.2.2.1. Testsúly és egyes szervsúlyok változásai 72
4.2.2.2. Változások a mellékvesében..... 73
4.2.2.3. Változások az mRNS szintekben..... 74
4.2.2.4. Változások a hormonszintekben 77
4.2.3. Krónikus váltakozó enyhe stressz vizsgálata..... 78
4.2.3.1. Szomatikus paraméterek változásai 78
4.2.3.2. Változások a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengelyen 79
4.2.3.3. Emelt keresztpalló teszt a szorongás mérésére 80
4.2.3.4. Forszírozott úszás, a depresszió-szerű magatartás mérője 82
4.3. A vazopresszin szerepének vizsgálata perinatális korban 82
4.3.1. Kispatkányok stressz reaktivitásának vizsgálata 82
4.3.1.1. HHM tengely aktiváció 24 órás anyai depriváció hatására 10 napos korban 83
4.3.1.2. HHM tengely aktiváció 1, 4, 12, 24 órás anyai deprivációra 10 napos korban 83
4.3.1.3. A HHM tengely aktiváció fejlődése a perinatális korban..... 85
4.3.1.4. *Hypnorm* kezelés hatása 10 napos korban 86
4.3.1.5. A *Hypnorm* kezelés hatása 5, 10, és 20 napos kispatkányokban..... 87
4.3.1.6. A mellékvesék ACTH érzékenységének vizsgálata 87
4.3.1.7. Exogén ACTH iránti érzékenység: Synacten kezelés 10 napos patkányban..... 88
4.3.2. Különböző nemű kispatkányok stressz reaktivitásának vizsgálata 89
4.3.2.1. 24 órás anyai szeparáció 89
4.3.2.2. Ismételt éter stressz..... 91
5. Megbeszélés 92
5.1. A vazopresszin szerepének vizsgálata akut stresszhelyzetekben 92
5.1.1. Különféle akut stresszhelyzetek hatása 92

5.1.2. Mikrodialízis vizsgálatok 97
5.1.3. A vazopresszin hiányos állatok vizsgálata akut morfin kezelés után 101
5.2. Vazopresszin szerepe krónikus stresszben 101
5.2.1. Krónikus morfin kezelés utáni megvonás 101
5.2.2. Mozgáskorlátozás 28 napig 104
5.2.3. Krónikus váltakozó enyhe stressz (CMS) vizsgálata 108
5.3. Stressz reaktivitás a perinatális korban 110
5.3.1. A vazopresszin hatása a kispatkányok stresszreaktivitására 110
5.3.2. Különböző nemű kispatkányok stresszreaktivitásának vizsgálata 114
6. Következtetések 117
7. Összefoglalás 118
7. Summary 119
8. Irodalomjegyzék 120
9. Saját publikációk jegyzéke 138
9.1 A disszertácó alapjául szolgáló közlemények, könyvfejezet 138
9.2 . Egyéb- nem az értekezés témájában megjelent- közlemények: 139
10. Köszönetnyilvánítás 140

Rövidítések jegyzéke

ACTH	adrenokortikotropin (angol: andrenocorticotropin hormone)
ADX	mellékveseirtás (adrenalectomia)
AUC	görbe alatti terület (angol: area under the curve)
AVP	arginin vazopresszin
BSA	szarvasmarha szérum albumin (angol: bovin serum albumin)
CeA	centrális amigdala
CRH	kortikotropin elválasztást serkentő hormon (angol: corticotropin releasing hormone)
CMS	krónikus váltakozó, enyhe stressz (angol: chronic mild stress)
DAG	diacil-glicerol
DMEM	Dulbecco's minimal essential medium
EPM	emelt keresztpalló (angol: elevated plus maze)
FST	forszírozott úszás teszt, (angol: forced swim test)
GR	glükokortikoid receptor
HAB	high anxiety behavior, fokozott szorongási magatartást mutató állat az EPM alapján
HHM tengely	hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely
Hsp	hősokk protein
ip	intraperitoneális, hasüregbe történő injekció
IP_3	inozitol trifoszfát
iv	intravénás injekció
KPBS	kálium-foszfát puffer
LAB	low anxiety behavior, csökkent szorongási magatartást mutató állat az EPM alapján
LPS	lipopoliszacharid injekció, a bakteriális infekció modellje
MR	mineralokortikoid receptor
OT	oxitocin
PKA	protein kináz A

PKC	protein kináz C
PLC	foszfolipáz C
POMC	proopiomelanokortin
PVN	hipotalamusz paraventrikuláris magja (nucleus paraventricularis hypothalami)
RIA	radioimmuno assay
SAP	kockázatfelmérő magatartás (angol: stretched attend postures)
sc	szubkután, bőr alá történő injekció
SCN	hipotalamusz szuprakiazmatikus magja (nucleus suprachiasmaticus)
SHRP	csökkent stressz reaktivitású időszak (angol: stress hyporesponsive period)
SON	hipotalamusz szupraoptikus magja (nucleus supraopticus hypothalami)
SSC	nátrium-klorid, trinátrium-citrát puffer (angol: saline-sodium citrate buffer)
TRH	tireotropin elválasztást serkentő hormon (angol: thyrotropin releasing hormone)

1. Bevezetés

A stressz fogalma a mindennapi életben széles körben elterjedt, gyakran halljuk, olvassuk ezt a szót. Különböző tudományterületek is használják, bár a mai napig nincsen általánosan elfogadott definíciója. A stresszt az élettudományok által definiáltan, mint betegséget, sajátos kórállapotokat kiváltó tényezőt tekinthetjük. Az általános vélekedéssel ellentétben a stressz maga nem betegség, hanem egy betegségsorozat elindítója lehet, ugyanakkor a krónikusan fennálló betegségek komoly megterhelést jelentenek a szervezet számára és a krónikus stresszre jellemző tünetegyüttest hozzák létre. Ismert, hogy a tartósan stressznek kitett személyek immunrendszere legyengül, gyakrabban jelennek meg fertőzések, és a rákos megbetegedések száma is növekszik [1]**.** A krónikus stresszel kapcsolatba hozható betegségek közé sorolható a gyomorfekély [2], a magyar lakosságot is egyre nagyobb számban érintő magas vérnyomás [3] és cukorbetegség is [4]. Régóta ismert tény, hogy a stressznek a termékenység szabályozásában is nagy szerepe van [5]. A pszichiátriai rendellenességek közül a depresszió [6], a skizofrénia [7], a post traumás stressz betegség [8] és a szorongásos kórképek kialakulásával hozható összefüggésbe. A probléma összetettségét mutatja, hogy az említett mentális betegségek további fizikális és mentális problémákat vonzanak maguk után („enyhébb" esetben a dohányzást, az alkoholizmust, a drogfüggőséget, szélsőséges esetben az öngyilkosságot, ön- és közveszélyességet), amelyek - mintegy ördögi körként - maguk is stresszként szolgálnak a szervezet számára.

Az Egészségügyi Világszervezet előrejelzése szerint egy évtized múlva a stresszel igen szoros kapcsolatot mutató depresszió lesz a fejlett világban az egyik leggyakoribb betegség [9]. A felnőtt lakosság 6-15%-a esik át életében egyszer egy depressziós epizódon [10]. Magyarországon kb. 400 000 depressziós beteg van, de csak töredéküknél ismerik fel a betegséget, és még kevesebb azok száma, akik a megfelelő terápiában részesülnek.

Munkánk során Selye János elméletéből kiindulva [11] a stresszt a szervezet bonyolult és összetett válaszának tekintjük minden, a szervezetet érintő negatív kihívásra.

1.1. Stresszelméletek

Fontos tudománytörténeti mozzanat volt az a felismerés, hogy az élő szervezet mind a belső biológia rendszerének változásaira, mind pedig a külső környezetből érkező negatív, esetenként pozitív ingerekre, változásokra azonos módon képes reagálni. **Selye János** fogalmazta meg az **„általános adaptációs szindróma elméletét”** és a **„stressz”** fogalmát, mellyel örökre beírta magát a tudománytörténetbe [11]. Alapvető megfigyelései közé tartozott az, hogy különféle ingerek – az ingerektől független módon - nagyon hasonló válaszreakciókat váltanak ki a szervezetben. Ezek a *mellékvesék megnagyobbodása*, a *csecsemőmirigy visszafejlődése*, a gyomrot és a beleket érintő *fekélyek megjelenése*. A kiváltó ingereket stresszornak, ezen tüneteket összefoglaló néven pedig *„stressz-szindrómának”* nevezte el és a glükokortikoid hormonok tartós és fokozott elválasztásával hozta kapcsolatba. Felismerte azt is, hogy a glükokortikoidok alapvető fontosságúak a szervezet védekezőképességének fenntartásában. Bár a glükokortikoidok szerepe bizonyos élettani funkciók vonatkozásában jól ismert - a kardiovaszkuláris tónus fenntartása, az immunrendszer működésének gátlása, energia raktár mobilizálás - a stresszfolyamatok vonatkozásában napjaink kutatásainak sikerül újabb és újabb kérdésekre választ adnia.
Selye munkásságából kiindulva, illetve vele párhuzamosan számos más stresszelmélet létezik, melyek más és más nézőpontból közelítik meg és értelmezik a stressz fogalmát.

Alan Munck elmélete szerint a glükokortikoidok elsődleges funkciója egy sajátos *„önkorlátozó”* szerep a stresszre adott válaszokban. Vagyis megakadályozzák azt, hogy ezen válaszok elszabaduljanak és a szervezetben lejátszódó folyamatok károsak legyenek az egyénre nézve. Munck ezen elméletét látszanak alátámasztani azok a kísérletek, melyben a glükokortikoidok tartós elvonása krónikus gyulladásos kórképek megjelenését eredményezi [12].

Bruce McEwen sajátos oldalról közelíti meg a homeosztázis fennmaradásának és a stressznek a kérdéskörét. Elméletében egy homeosztatikus és egy allosztatikus rendszert jelenít meg. A homeosztatikus rendszerben a paraméterek csak egy nagyon szűk tartományon belül változhatnak, és ezen paraméterek mérhetetlenül nagy változásai az egyed halálát is okozhatják. Az allosztatikus rendszerben azonban a paraméterek egy

tágabb tartományon belül képesek a változásra és éppen ezek a változások lesznek azok, amelyek állandóságot biztosítanak az egyed számára. Ebben a megközelítésben az endokrin rendszer és ezen belül is a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely (HHM tengely) az allosztatikus rendszerek mintapéldája. Egyes kutatók szerint az allosztázis jelenségének létezése kérdéses, fogalmának bevezetése szükségtelen [13].

Elgondolkodtató modellt állít fel **Gerald Hüther.** A stresszt nem a homeosztatikus paramétereket befolyásoló folyamatnak írja le, hanem mint a törzsfejlődés, a szelekció egyik eszközét [14]. Elméletében arra világít rá, hogy minden egyed rendelkezik egy úgynevezett **„archaikus stresszválasszal”**, mely genetikailag kódolt, ennél fogva szűk keretek közé szorított. A törzsfejlődést követve, a magasabb rendű gerincesek felé haladva az archaikus stresszválasz egyre bonyolultabb viselkedési mintázatokkal egészül ki. Vagyis a stressz jelentősége ebben a modellben az, hogy a stresszválasz során bekövetkező sajátságos tanulási folyamatok megváltoztatják az egyedek viselkedési stratégiáit és az egyed eljuthat a stresszhez való adaptáció szintjére (kontrollálható stressz). Amennyiben azonban az egyed tartós stresszhelyzetben van, súlyos patológiai változások alakulhatnak ki. Ilyenek például a gonadotróp funkciók csökkenése, a depresszió, melyek nagymértékben csökkentik az egyed szaporodásra való képességét, ezáltal az adott genotípus eltűnhet a populációból. Hüther elméletét alátámaszthatja, hogy a stresszfolyamatokban kitüntetett szerepű glükokortikoidok receptorai legnagyobb számban a tanulási, emocionális folyamatokban központi szerepet játszó limbikus területeken találhatóak [15].

1.2. Stresszorok

Meglehetősen nehéz dolgunk van, ha arra készülünk, hogy a különböző stresszorokat csoportosítsuk, hiszen rengeteg szempont szerint tehetjük ezt. Csoportosíthatjuk őket **intenzitásuk** (erős vagy gyenge) alapján. Beszélhetünk **pszichológiai** (pl. újdonság stressz, szociális elkerülés), **fizikai** (pl. „foot-shock”, fertőzés, vérzés [16]), **metabolikus** (pl. hipoglikémia, hipertóniás só injekció, éhezés [17]) stresszről. Lehet a stressz **kognitív** (pl. mozgáskorlátozás - restraint), vagy **nem kognitív**

(pl. fertőzés) [18]; illetve **szisztémás** (pl. ozmótikus stressz stimulus vagy kardiovaszkuláris veszélyhelyzet) vagy **neurogén** (fizikai, pl. immobilizáció) [19].

A stresszkutatás mai nézetei szerint alapvetően két fő irányvonalat vázolhatunk fel a stresszorok csoportosításában. A csoportosítás alapja az, hogy vajon a stressz feldolgozásában magasabb előagyi struktúrák (pl. limbikus területek) részt vesznek-e vagy sem. A **fizikai stresszorok** valamely homeosztatikus paraméter viszonylagos állandóságát veszélyeztetik, ezek például metabolikus, ozmotikus, immunológiai megterhelést jelentenek. Jellemző, hogy az agykérgi aktiváció minimális, a stresszorok közvetlenül aktiválják az agytörzsi viszceroszenzoros központokat. Innen az ingerület egyszerű, néhány neuronos pályákon keresztül jut el a HHM tengelyhez. A neuronális bemenetek többfélék lehetnek és az aktivált területek is a stresszor természetétől függnek. A baroreceptorok, a tápcsatorna, a szív, a máj, a légzőrendszer kemoreceptorai a nucleus tractus solitarii-n keresztül érik el a hipotalamuszt [20, 21]. A plazma ozmolalitás változásai a cirkumventrikuláris szervekre vannak hatással [22], míg a testhőmérséklet változásai a hipotalamusz termoreceptív területeit aktiválják [23].

Pszichogén stresszorok például a megszokottól eltérő környezet, a bezártság, immobilizáció. Ebben az esetben sokkal összetettebb szomatoszenzoros (esetenként nociceptív) ingerek azok, melyek a HHM tengely fokozott működését váltják ki. Pályakövetéses és léziós vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy a *prefrontális cortex,* a *hippokampusz,* az *amigdala* elsődleges szerephez jut ezen stresszorokra adott endokrin válaszok kialakításában [24-27].

Noha az előbb említett két fő csoportba besorolhatjuk valamennyi stresszort, valójában minden stimulus fizikai és pszichogén elemeket egyaránt magába foglal eltérő arányban.

Még az irodalom sem egységes a stressz időbeni fennállásának megítélésével kapcsolatban. Ezen szempont alapján beszélhetünk **akut**, **krónikus,** valamint a két kategória közé eső **szubakut** stresszről. Az irodalom nagy része az akut stresszfolyamatok tanulmányozásáról szól, hiszen ez kívánja a legkevesebb munkát és ez okozza a legkevesebb szenvedést az állatoknak. Nehézséget jelenthet azonban az akut stressz megfogalmazása: az állatok új környezetbe helyezése történhet 5-10, de akár 30-60 perces időtartamra is, és egy immunválaszt kiváltó egyszeri lipopoliszacharid (LPS) injekció

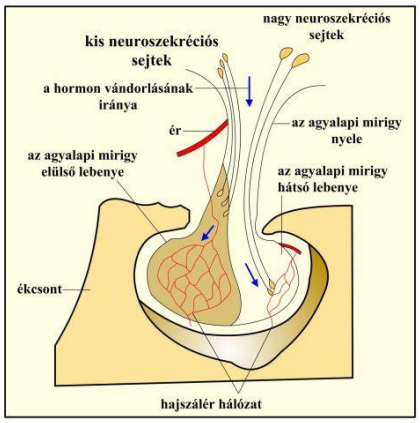
aktiváló hatása még napok múlva is kimutatható. Általános következtetések levonásához célszerű többféle stresszor összehasonlítása, akkor is, ha mindegyiket akut hatásúnak tekintjük is.

A humán patofiziológiás vonatkozások szempontjából azonban sokkal nagyobb a jelentősége a **krónikus** stressznek. Az állatkísérletekben alkalmazott időskála itt is elég széles. Az 5 naptól (streptozotocinnal kialakított cukorbetegség [28]) az 5-9 hétig (a depresszió modellnek számító krónikus enyhe stressz [29]) sokféle időtartammal találkozhatunk az irodalomban. Az ismétlődések hatására háromféle válaszkészség változás jöhet létre. 1.) az ismétlődő stresszorra deszenzitizáció, míg egy új stimulusra fokozott érzékenység jöhet létre. 2.) az ismétlődő ingerre ugyan nincs adaptáció, de az új ingerre hiperaktivitás figyelhető meg, mely főként ismételt fájdalmas ingerekre, és inzulin hipoglikémia esetén alakul ki. 3.) csökkent, elnyújtott stresszhormon válasz [30]. Mivel mindhárom esetben a HHM tengely működése eltérő mértékben, de megtartott, ezért feltételezték, hogy a szabályozás oly módon változik, hogy a megemelkedett glükokortikoid szintek *negatív feedback* hatása kevésbé érvényesül. Kimutatták, hogy a hipotalamuszban a neuropeptidek összetétele eltolódik. A glükokortikoidok negatív visszacsatolására kevésbé érzékeny vazopresszin (arginine vasopressin, AVP) mennyisége megnő [31]. Ezekből az adatokból Mary Dallman [32] és Greti Aguilera [30] arra a következtetésre jutottak, hogy az AVP lenne a HHM tengely fő hipotalamikus szabályozója krónikus stressz során. Saját vizsgálataink megkezdése előtt ez az elmélet kezdett szélesebb körben elfogadottá válni, bár bizonyító erejűnek számító vizsgálatok hiányoztak (pl. AVP hiányos állatokon kialakul-e a krónikus stressz).

1.3. A hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely

A stresszválaszok kialakításában számos agyi terület vesz részt, melyek a vegetatív, az endokrin, és a magatartási válaszkomponensek finom összehangolásával teszik lehetővé az egyed számára a túlélést. Ugyan a különböző stresszorok eltérő agyi területeket mozgósítanak a központi idegrendszerben, az ingerek minden esetben a végső feldolgozás

helyére, a hipotalamuszban található hipofizeotróp kissejtes (parvocelluláris) neuronokba futnak be. A feldolgozandó ingerek hatására ezek a sejtek kortikotropin elválasztást serkentő hormont (CRH) és AVP-t juttatnak az agyalapi mirigy sajátos portális keringésébe. A portális vérbe jutott CRH és AVP fokozza a hipofízis elülső lebenyének (adenohipofízis) adrenokortikotróp hormonjának (adrenocorticotropin, ACTH) termelődését, mely végső soron a mellékvesék kéregállományában található sejtek glükokortikoid szekrécióját fokozza (1. ábra).

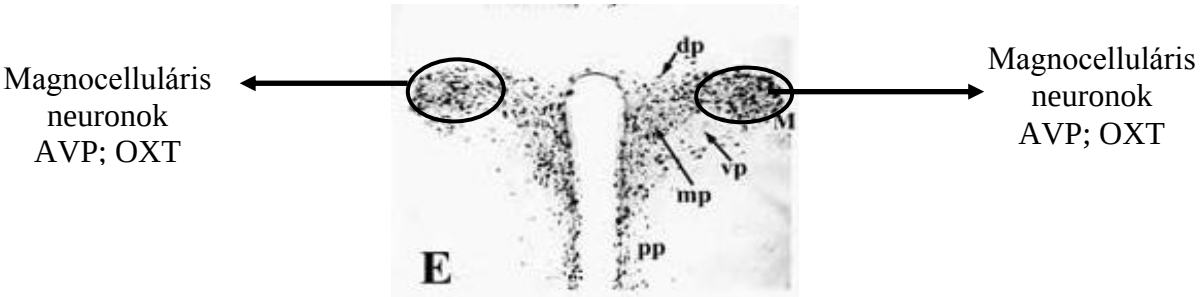


1. ábra
A hipotalamusz-hipofízis rendszer
sdt.sulinet.hu

1.3.1. A hipotalamusz

1.3.1.1. A nucleus paraventricularis hypothalami anatómiája és peptidjei

A hipotalamusz paraventrikuláris magja (PVN) a harmadik agykamra két oldalán elhelyezkedő sejtcsoport, szövettani metszeteken Nissl festéssel (magnocelluláris sejteket festi) jellegzetes alakjáról könnyen felismerhető (2. ábra).



2. ábra

A hipotalamikus PVN felépítése és almagjai
dp = dorzális parvocelluláris almag, mp = mediális parvocelluláris almag, pp = periventriculáris parvocelluláris almag, vp = ventrális parvocelluláris almag, M= magnocelluláris neuronok
http://www.endotext.org/neuroendo/neuroendo3b/neuroendo3b_4.htm

A mag a benne található sejtek felépítése, alakja, peptidtartalma, afferens és efferens kapcsolatai alapján több jól elkülönülő almagra osztható.

A mag oldalsó, felső részében találhatóak a nagysejtes (magnocelluláris) neuronok. Az elsődleges hormontartalmuk alapján ezeket vazopresszinerg és oxitocinerg sejtekre oszthatjuk. Mindkét sejt a két fő hormonon kívül további peptideket is termel, valamit az AVP és az oxitocin (OT) egyetlen sejtben is jelen lehet és különböző élethelyzetekben (pl. laktáció) a koexpresszió mértéke megváltozik [33]. Ezek a neuronok a hipofízis hátsó lebenyébe küldik rostjaikat.

A mag mediális része a parvocelluláris neuronokat tartalmazza, melyek egy része neuroendokrin, más része pedig autonóm funkcióval bír. Neuroendokrin sejtcsoportokat az anterior és a dorzális mediális parvocelluláris, illetve a periventrikuláris területeken találunk. Ezen sejtek axonjai az eminencia mediana területén végződnek a hipofízis kapillárisrendszerén és a szerv elülső lebenyének hormontermelését szabályozzák. A vegetatív funkciójú sejtek a neuroendokrin sejtektől elkülönülten, dorzálisan helyezkednek el („dorsal cap”). Ezen parvocelluláris rostok kilépve a hipotalamuszból az agytörzs és a gerincvelő preganglionáris központjaiban végződnek.

Az egyes sejtcsoportok nem csak anatómiájukban és elhelyezkedésükben, hanem funkcionálisan is eltérnek egymástól. A periventrikuláris területek jellemző hormonja a szomatosztatin, míg a tireotropin elválasztást serkentő hormon (TRH) termelő neuronok elsősorban a periventrikuláris területekről laterálisan elhelyezkedő részeken találhatóak. A CRH termelő sejteket a TRH neuronoktól még laterálisabban találjuk. Mind a magnocelluláris, mind a parvocelluláris sejtcsoportokra jellemző hogy a sejtek nem kizárólagosan egy neuropeptidet, hanem azok egy csoportját termelik. A TRH, CRH sejt stb. elnevezés arra utal, hogy mi a sejt fő hormonja, neuroaktív anyagja.

A parvocelluláris sejtekre különösen jellemző, hogy nem egyetlen, hanem több neuropeptid jelenléte is kimutatható egy adott sejtcsoport sejtjeiben (koexpresszió). Így például jelen vannak enkefalinok, galanin, angiotenzin II, neurotenzin és az AVP [34]. Az AVP kivételével ezen hormonok jelentősége a stressz szempontjából kevésbé vizsgált. Jellemző, hogy a koexpresszió folyamatosan fennáll, de mértéke dinamikusan változik.

1.3.1.2. Kortikotropin elválasztást serkentő hormon (CRH)

A stresszválaszok kialakításában az elsődleges szerep a CRH-nak tulajdonítható, az emlősök többségében ez az első számú molekula, amely a hipofizeális adrenokortikotropin (ACTH) elválasztását fokozza. A 41 aminosavból álló polipeptid egy 196 aminosavas prepro-CRH molekulából enzimatikusan hasítódik ki. A központi idegrendszerben a legnagyobb CRH sejtpopulációt a PVN parvocelluláris neuronjai adják. Normál körülmények között a sejttestekben CRH csak nagyon kis mennyiségben mutatható ki, míg az *eminentia mediana zona externa*-hoz futó axonokban jelentős a hormonmennyiség [35]. A CRH tartalmú vezikulák ebben a térben tárolódnak és stimulus hatására ürülnek a hipofízis portális keringésébe. A központi idegrendszerben nem a PVN az egyetlen terület, ahol CRH immunreaktivitás kimutatható. CRH termelő sejtek megtalálhatóak a supraopticus, a periventricularis és mediális preopticus régióban. Extrahipotalamikusan főként az agykéregben, az amigdala centrális magjában, a locus coeruleusban és a kisagyban mutathatók ki CRH sejtek [36]. Ezen kívül a perifériás szervekben is, mint például a placentában, a herében, a mellékvesék velőállományában, a petefészkekben, tüdőben is kimutatható CRH jelenléte [37].

Korábbi vizsgálatok két receptor jelenlétét tárták fel, melyek felelősek a CRH hatásainak közvetítésében. Mindkét receptorban közös, hogy 7 transzmembrán doménnel rendelkező G-fehérje kapcsolt proteinek, mindkét receptor serkenti az adenilát-cikláz aktivitását, s így az intracelluláris cAMP-protein kináz A (PKA) szignáltranszdukciós kaszkádon keresztül hatnak.

Az **1-es típusú CRH receptor (CRH-R1)** egy 70 kDa molekulatömegű fehérje. Nagy affinitással köti meg a CRH-t. Elsősorban a hipofízis elülső lebenyét alkotó sejtek membránjában található meg. Előfordul még az amigdala mediális és bazolaterális magjában, a neocortexben, a kisagy sejtjeiben [38, 39].

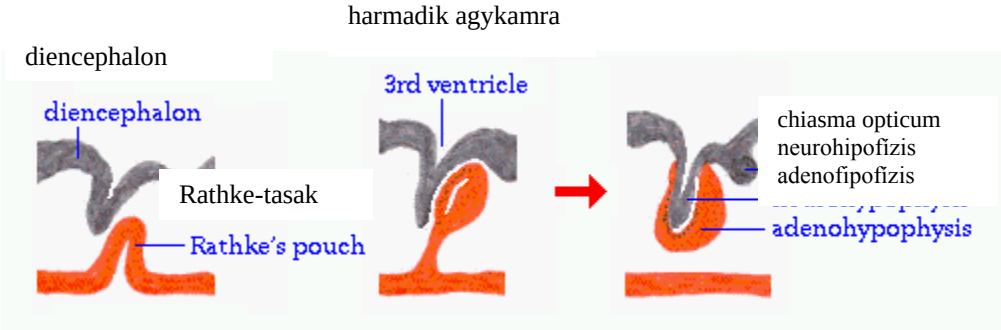
A **2-es típusú CRH receptorok (CRH-R2)** ugyan kisebb affinitást mutatnak a CRH irányába, de más, részben szekvencia homológ anyagokat, így például urokortinokat (mintegy 45%-os szekvenciahomológiát mutatnak a CRH-val: az urokortin I, urokortin II, urokortin III) nagy affinitással kötnek meg. Funkcionális változatai közül a CRH-R2α-

főleg szubkortikálisan, szinte kizárólag a limbikus struktúrákban van jelen, míg a CRH-R2β perifériás elhelyezkedésű [40, 41].

A stressz által indukált HHM tengely aktivációban a CRH-R1 tölt be központi szerepet és ez a receptor tehető felelőssé a stresszhez kapcsolható viselkedési elemek megjelenésért is. Ezt CRH-R1 génkiütött egerekkel végzett kísérletek is alátámasztják. Ezek az egerek a különféle viselkedéstesztek során csökkent szorongást mutatnak, valamint bennük csökkent mértékű a HHM tengely stresszreaktivitása is. Hasonló eredményeket mutatnak a szelektív CRH-R1 antagonistákkal végzett kísérletek is [42-44].

1.3.2. A hipofízis

A HHM tengely következő eleme, a hipofízis, kettős eredetű szerv, amely a koponya töröknyergében (sella turcica) helyezkedik el. A szerv hátulsó lebenye, a neurohipofízis, idegi eredetű, a harmadik agykamra kitüremkedéséből alakul ki. Ezzel ellentétben az elülső lebeny, az adenohipofízis, hám eredetű, a Rathke-tasak származéka (3.ábra).

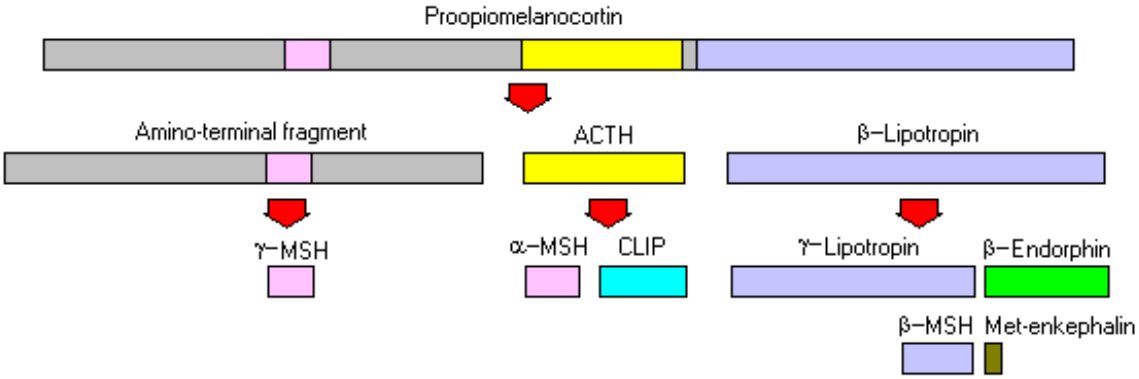


3. ábra
A hipofízis fejlődése
http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/hypopit/histo_pit.html

Funkcionálisan is két részre különül a szerv. Míg a neurohipofízis a hipotalamusz magnocelluláris sejtjeiben termelődő AVP-t és OT-t raktározza, addig az adenohipofízis a hipotalamusz parvocelluláris sejtjeiből származó serkentő és gátló hormonok hatására saját hormonok termelésével reagál. Ezen hormonok a nagyvérkörön keresztül a perifériás szervek hormontermelését szabályozzák. A stressz szempontjából a CRH/AVP szabályozás alatt álló kortikotróp sejtek fontosak, melyek ACTH-t termelnek.

1.3.2.1. Adrenokortikotróp hormon (ACTH)

Az ACTH egy 39 aminosavból álló egyláncú polipeptid, amely egy prekurzor molekula, a **proopiomelanokortin (POMC)** részeként termelődik. A molekuláris átalakulások során a prekurzorból 3 fő termék hasad ki. Az első az **N-terminális fragment,** melyből később az enzimatikus hasítások során a középső lebenyben a **γ-MSH** lesz. A második maga az **ACTH**, melyből a hipofízis közti lebenyében a **α-MSH** és a kortikotropin szerű középső lebeny hormon (**CLIP**) hasad ki. A harmadik pedig a **β-lipotropin (β-LPH),** amelyből a középső lebenyben további hormonok, a **γ-LPH** (ebből később a **β-MSH**), **β-endorfin** (ebből később a **met-enkefalin**) vágódik ki (4. ábra).

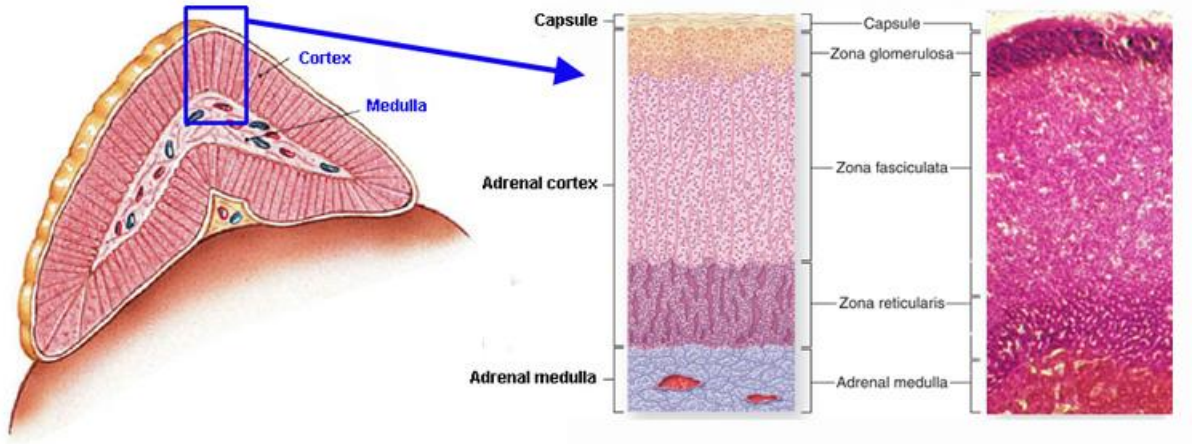


4. ábra
A POMC molekula és a belőle kihasadó peptidek
vivo.colostate.edu

Az elülső lebenyből felszabaduló ACTH a mellékvese kérgének mindhárom zónájában fokozza a hormontermelést és szekréciót. Fokozza a mellékvese kérgi sejtjeinek koleszterin felvételét, és a szteroid hormonok szintézisének limitáló lépését, a koleszterin-pregnenolon átalakulását is katalizálja. Az ACTH kötéséért felelős receptor az úgynevezett *melanokortin receptor család* tagja. Közös jellemzője az eddig öt tagot számláló családnak, hogy mindannyian 7 transzmembrán doménnel rendelkeznek és G fehérje kapcsoltak. Az ACTH a melanokortin receptor 2 (MC2R) specifikus agonistája. A receptorhoz való kötődés az adenilát cikláz-cAMP-PKA útvonalat aktiválja [45].

1.3.3. Mellékvese

A tengely harmadik szintje, a mellékvese fejlődéstani szempontból szintén összetett szerv. A kéregállomány a mezoderma származéka, míg a velőállomány neurális ektoderma eredetű (5. ábra) [46].



5. ábra
A mellékvese makroszkópos és mikroszkópos felépítése
capsule= a mellékvese kötőszövetes tokja, adrenal cortex= mellékvesekéreg,
adrenal medulla= mellékvesevelő
http://www.endocrinesurgery.net.au/adrenal-anatomy/

.

A **mellékvesevelő** (**medulla**) állományát hálózatos gerendákba rendeződött ún. kromaffin sejtek alkotják. A gerendák között szinuszok találhatóak. A kromaffin sejtekben membránnal határolt szekréciós granulomok találhatók, melyek a hormonokat raktározzák.

A kromaffin granulumok tartalma *adrenalin* vagy *noradrenalin*, *chromograninok* (vivőfehérjék), *ATP*, *enkefalinok* stb. A sejtek 80%-a adrenalint, 20%-uk noradrenalint választ el.

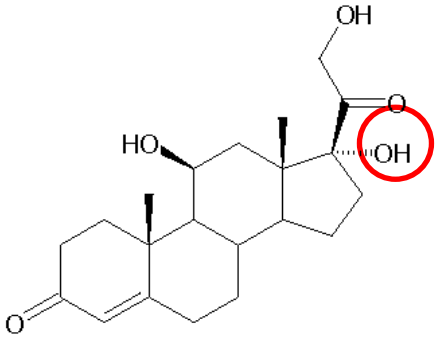
A kéregállomány mikroszkópikusan és funkcionálisan 3 részre osztható (5.ábra):

- A legkülső **zona glomerulosa** vékony réteg, közvetlenül a kötőszövetes tok alatt. Sejtjei fészkekbe rendeződnek. A sejtcsoportokat szinuszoid kapillárisok veszik körül. Sejtjei termelik a *mineralokortikoidokat*. Ezen hormonok a só- és vízháztartás fő szabályozói, a Na^+ és a K^+ ionok anyagcseréjében vesznek részt.
- A középső **zona fasciculata** sokszögű sejtjei a felszínre merőleges gerendákat képeznek. A gerendák között, velük párhuzamosan futnak a

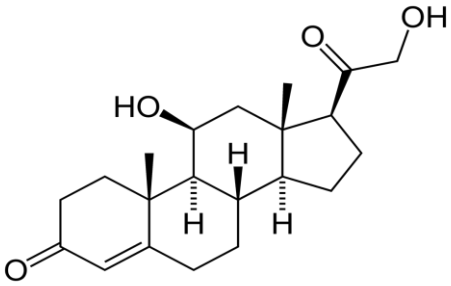
szinuszok. A réteg sejtjei termelik a *glükokortikoidok*at. A hormonok sokrétű hatással vannak a szervezet egészére. Fokozzák a fehérje lebontást, a májban fokozódik a glikogenezis és glikoneogenezis, csökkentik a vérben keringő immunsejtek számát, ezáltal immunszupresszív hatást fejtenek ki. Korlátozzák a gyulladásos folyamatokat, csökkentik a csontképződést.

- A belső **zona reticularis** hálózatos sejtkötegekből áll, melyek között szinuszok futnak. A sejtek elsődleges szerepe a *szexuálszteroidok* szintézise (elsősorban dehidroepiandroszteron, androszténdion).

A glükokortikoidoknak (ember esetében főleg a kortizolnak, míg rágcsálókban elsősorban a kortikoszteronnak) jut elsődleges szerep a stresszfolyamatok szabályozásában (6. ábra). Szteroid voltuknak köszönhetően a sejtek membránján szabadon képesek átdiffundálni, fő hatásukat intracelluláris magreceptorokon keresztül fejtik ki.



Kortizol



Kortikoszteron

6. ábra
A kortizol és a kortikoszteron molekulaszerkezete. A piros kör a két molekula közötti egyetlen hidroxilcsoportbeli különbséget jelzi.
en.citizendium.org

A magreceptorok egyik csoportja az **I.-es típusú receptor vagy mineralokortikoid receptor (MR).** Ezek a receptorok igen nagy affinitással kötik meg a kortikoszteront és a kortizolt, ezen kívül az aldoszteront. Az MR eloszlás az agyon belül specifikus mintázatot mutat, főleg a limbikus rendszerben mutatható ki jelentős számban (laterális szeptum,

amigdala, hippokampusz [47]). A **II.-es típusú receptor** (glükokortikoid receptor, GR) sokkal szélesebb körű elterjedést mutat, kevésbé specifikus, mint az MR. Megtalálható a legtöbb agyterületen, pl. az agytörzsben, a limbikus rendszerben, a neokortexben és az adenohipofízisben is. Affinitása a kortizolhoz, és a kortikoszteronhoz kisebb, mint az MR-é, ugyanakkor a szintetikus dexametazont nagy affinitással köti. Mind a két receptor jellemzője, hogy a nukleáris receptorok hatalmas családjának tagjai. Tulajdonképpen ligandok által aktivált transzkripciós faktorok, és szerkezetileg 3 doménből állnak. 1.) a C-terminálisan megtalálható domén a ligandkötőhely; 2.) a molekula közepén helyet foglaló domén a DNS kötéséért felel, míg 3.) a molekula N-terminális vége a transzaktivációs kötőhely. Sajátságos a szteroidok által közvetített hatás. A receptorok C-terminális része a citoplazmában helyezkedik el és ott hősokk proteinekkel (Hsp 70, Hsp 90) alkot komplexet. Szteroid hormon kötődés hatására ezek a dajka Hsp molekulák leválnak a C-terminális részről, az MR esetében helyet adva egy másik szteroid-receptor komplexnek. A GR nem dimerizálódik, hanem úgynevezett transzkripciós faktorokat köt. A dimerizáció, illetve a transzkripciós faktorok kötődése után képes a hormon-receptor komplex a sejtmagba vándorolni. A sejtmagban kitüntetett DNS szakaszokhoz kötődik, majd a célgének transzkripcióját pozitívan vagy negatívan szabályozza. Ez a glükokortikoid hormonok lassú **genomiális hatás**ának az alapja [48].

Létezik egy úgynevezett gyors, **nem-genomiális** hatás is, mellyel a glükokortikoidok befolyásolni képesek az idegrendszer neuronális aktivitását [49, 50]. Ez független a génexpresszió változásaitól, gyorsan kialakul. A jelenség oka feltehetően az, hogy a szteroid hormonok a sejtmembránon való áthaladásukkor kölcsönhatásba lépnek a membránfehérjékkel, ezzel pedig azok működését, így végső soron a sejtek, sejtcsoportok aktivitását változtatni képesek.

A HHM tengely szabályozásának egyik kulcspontja: A glükokortikoid feedback

A glükokortikoidok attól függően, hogy szintjük alacsony, vagy magas, eltérőképpen szabályozzák a HHM tengely működését. Alacsony szintjük mellett fennmarad a HHM tengely működése, míg magas szintjük mind az ACTH, mind a CRH elválasztását gátolja [51-53]. A feedback során mind az MR-ek, mind a GR-ek fontos szerephez jutnak, ám más-más módon. A glükokortikoidok termelődése jellegzetes napi,

azaz cirkadián ritmust mutat. Emberben reggel, patkányokban este (mivel éjszaka aktívak), ébredés előtt a legmagasabb a plazma kortizol, illetve kortikoszteron szintje. Stresszmentes körülmények között az MR-ek kötik meg a glükokortikoidokat, míg a GR-ek nagyfokú telítődése csak a reggeli órákban, a hormonszint maximumán, illetve stressz során figyelhető meg. Ezen megfigyelésekre alapozva mondhatjuk, hogy a cirkadián csúcs idején bekövetkező HHM tengely aktiválódás korlátozásához elengedhetetlen a GR-ek jelenléte, hiszen az MR-ek nagy százalékban már telítettek. Értelemszerűen az adenohipofízis GR rendszere is csak a magas kortikoszteron szintek esetében aktivizálódik [54]. Feltételezhetően a MR rendszer az, amely a HHM tengely bazális működését szabályozza, az alaptónus beállítását, durvahangolást végez a rendszeren. A GR rendszer ugyanakkor a cirkadián csúcs idején, illetve a HHM tengely aktiválódása során lép előtérbe, negatívan szabályozza annak működését, és a perifériás stresszválaszok kialakítását koordinálja [53]. A glükokortikoid feedback hipotalamikus és extrahipotalamikus összetevőket egyaránt tartalmaz. Mellékvese irtott (adrenalectomia, ADX) állatokban megfigyelték, hogy erőteljesen fokozódik a CRH termelése [55], emelkedik az AVP és CRH koexpresszió mértéke, a POMC expresszió és az ACTH szekréció. A folyamat a PVN közelébe, vagy a hippokampuszba implantált dexametazonnal visszafordítható [56-58]. A hippokampusznak, illetve a limbikus területeknek kitüntetett szerepet tulajdonítanak a glükokortikoidok negatív visszacsatolásában. Kísérletes körülmények között a hippokampusz hipotalamikus kapcsolatainak sérülése, vagy átvágása (fornix, ventrális szubikulum) a plazma kortikoszteron, illetve ACTH szintjének emelkedéséhez vezet, illetve AVP hiperszekréciót is eredményez [59, 60]. A limbikus rendszer szerepét mutatja az is, hogy az előagyi GR rendszer zavara vagy hiánya markánsan emeli a kortikoszteron szinteket. Ezzel együtt, míg a PVN-ben nem változik sem a CRH mRNS szintje, sem a GR-ek mennyisége, az AVP mRNS mennyisége másfélszeresére nő. Ezek alapján feltételezhető, hogy az előagyi területekről induló negatív szabályozás elsődleges célpontja a parvocelluláris AVP. A negatív feedback molekuláris mechanizmusa részben már tisztázott: Glükokortikoidra érzékeny rész (glucocorticoid responsive element, GRE) található a CRH, az AVP és a POMC gén promóter szakaszán, vagyis a génexpresszió közvetlen szabályozása így megvalósulhat [61].

A depressziós betegekben megfigyelhető patológiásan magas kortizol szintek is a kórosan vagy elégtelenül működő feedback-re vezethetőek vissza [42-44].

1.4. A stresszfolyamatok életkori sajátosságai: A perinatális kor

Felnőtt patkányokban az ACTH elválasztását elsősorban a PVN parvocelluláris neuroszekréciós sejtjeiben termelődő CRH és AVP szabályozza. Ezen hormonoknak a részvétele az ACTH felszabadításában feltehetőleg stresszorspecifikus [62]. Általánosan elfogadott, hogy a fő ACTH szekretagóg a CRH, míg az AVP ezt a hatást fokozza [63]. Amíg a felnőtt korban lejátszódó folyamatokról, neuroendokrin szabályozásáról sok ismerettel rendelkezik az irodalom, addig a HHM tengely fejlődéséről meglehetősen keveset tudunk.

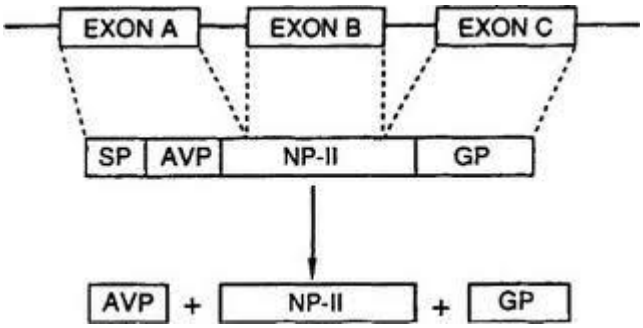
Kispatkányoknál a HHM tengely már a késő magzati korban is működőképes. A magzatokban magas kortikoszteron szinteket mutattak ki, és a magas hormonszint a születés után is megfigyelhető az újszülöttekben. A második posztnatális napra a kortikoszteron szintje jelentősen lecsökken és a 14. napig alacsony szinten marad [64, 65]. Ezalatt az idő alatt a HHM tengely különböző stresszorok (éter stressz, hideg stressz, anyai depriváció) által kiváltott stresszválasza erősen csökkent mértékű [66]. Az irodalomban ezt ***stressz hiporeszponzív periódus****ként* (SHRP) említik és emberek és patkányok esetében is megfigyelték. Az SHRP létezése egyértelműen jelzi, hogy a HHM tengelynek, illetve a szabályozási folyamatoknak egy érési folyamaton kell átesnie ahhoz, hogy a felnőttkori működési szintet elérje [66, 67]. Az SHRP alatt végbemenő folyamatok nem kellően tisztázottak. Egyes cikkek azt feltételezik, hogy a plazma meglehetősen alacsony transzkortin (glükokortikoid kötő plazmafehérje) szintjének a következménye az emelkedett nyugalmi kortikoszteron szint. Ennek eredménye pedig a hipofízis szintjén ható erőteljes negatív feedback [66, 68, 69]. Más nézőpontok szerint a hipotalamikus ACTH szekretagógok alacsony termelődési szintje és/vagy transzportja az, mely stressz hatására csökkent kortikoszteron választ eredményez [70]. Feltételezhetően a CRH gén expressziójának glükokortikoidok általi szabályozása még nem elég érett az SHRP alatt [71]. Ezzel ellentétesen az AVP gén expressziójának szabályozása meglehetősen korán éretté válik [71, 72], ez pedig arra enged következtetni, hogy az SHRP alatt az AVP a fő

faktor, amely az ACTH termelődését és elválasztását szabályozza [73, 74]. Az intézetünkben tartott és tenyésztett AVP-hiányos Brattleboro patkányok megfelelő alanyai annak vizsgálatára, hogy a korai posztnatális időben lejátszódó (vagyis az SHRP alatti) stressz aktiválta hormonális válaszokat nyomon kövessük.

A Brattleboro törzsről bővebben a „Módszerek" fejezet „Kísérleti állatok" pontja alatt írtam.

1.5. Vazopresszin (AVP)

Az AVP egy nagyobb molekula (prepropresszofizin) részeként szintetizálódik (7. ábra). Fő forrása a hipotalamikus szupraoptikus mag (SON) és a PVN magnocelluláris sejtjei. Ezen sejtekben termelődő AVP a hipotalamo-hipofizeális traktuson, a hipofízis nyélen keresztül haladva éri el a hipofízis neuronális eredetű hátsó lebenyét, ahol az úgynevezett Gömöri-féle testekben raktározódik.



7. ábra
A vazopresszin gén és a vazopresszin molekula
SP=szignálpeptid, NP-II= neurofizin II,
GP=C-terminális glikopeptid
comprehensivephysiology.com

A neurohipofízis felépítése sajátságos: gliaszerű sejtek tömegéből áll, melyeknek önálló hormontermelése nincsen, ugyanakkor rengeteg idegvégződés található itt, melyeknek feltételezhetően a szabályozásban van szerepe. AVP termelés számos idegsejtre jellemző a központi idegrendszeren belül és kívül egyaránt. A PVN magnocelluláris neuronjain kívül jelen vannak AVP-t termelő sejtek a *bed nucleus of stria terminalisban (BNST),* a *mediális és centrális amigdalában*. A cirkadián változásokért felelős *szuprakiazmatikus mag (SCN)* fő neurotranszmittere is AVP [75, 76]. A HHM tengely szabályozása szempontjából kitüntetett szerepe van annak, hogy az AVP a CRH-val együtt kolokalizáltan is termelődik a PVN parvocelluláris sejtjeiben [30].

A vazopresszin hatását 3 különböző receptor közvetíti. Közös bennük, hogy mindhárom receptor 7 transzmembrán doménnel rendelkezik és G-fehérje kapcsoltak. Az **1-es (V1)** (Gq kapcsolt) típusú receptor a foszfolipáz C (PLC)/inozitol trifoszfát

(IP_3)/diacil-glicerol (DAG) szignalizációs jelátvitelt „használja”. A receptoron való kötődés eredménye az intracelluláris Ca^{2+} szint megemelkedése. A **V1a** altípus a májban, az erek simaizomzatában, herékben, számos más perifériás szövetben található meg. A központi idegrendszerben patkányok esetében a hippokampusz, az SCN, a ventrális tegmentális area, a szubsztancia nigra, a dorzális rafe, colliculus superior, laterális szeptum területén mutatható ki [77]. **V1b** típusának fő előfordulása a központi idegrendszerben a hipofízis elülső lebenyében van [78], de megtalálható még a szaglógumóban, a hippokampusz CA2 rétegének piramis sejtjeiben, az SCN, a kisagy és a kortex területén is [79]. Megtalálható ezen kívül perifériásan a hasnyálmirigy Langerhans-sziget sejtjeiben, a mellékvesében, a vesében is [80].

A **2-es típusú (V2)** receptor szintén G fehérje kapcsolt (Gs), az adenilát-cikláz/cAMP/PKA szignalizációs útvonalon keresztül közvetíti az AVP hatását. Aktiválásának hatására megemelkedik a vese gyűjtőcsatornáiban a sejtek vízáteresztése azáltal, hogy a sejtek apikális membránjában nagy számban jelennek meg az aquaporin-2 molekulák [81, 82]. Fokozódik ezen sejtekben a szabad víz visszavétele, csökken a vizelet mennyisége. A receptorok fő előfordulási helye a vese gyűjtőcsatornáinak bazolaterális membránja. Extrarenálisan egyedül a kisagyban mutatták ki [83].

1.5.1. Az AVP fő hatásai [84]:

- Vízvisszatartás a vesében V2 receptor által közvetítetten.
- Nagy dózisban a simaizmok kontrakcióját okozza V1a receptor által közvetítetten: a vazokonstrikció vérnyomás és pulzusszám emelkedést okoz, a gyomor és a belek izomzatán fokozott mozgást vált ki.
- Mitogén aktivitás V1a receptor közvetítetten: kinázok foszforilációja, DNS szintézis és a sejtproliferáció fokozódása [85].
- Feltételezhetően direkt hatással rendelkezik - a máj V1a receptorai által közvetítetten - egyes metabolikus folyamatok szabályozására is: hiperglikémia, glükozuria, csökkent glükóz tolerancia (másodlagos hatás is a glükokortikoidok által) [86].

- Mint „belső lázcsillapító” a preoptikus régió, és az anterior hipotalamusz termoregulációs neuronjainak szabályozásában vehet részt [87]. Noha az AVP elválasztás fokozódása lázas állapotokban előnyös lehet, a nagy mennyiségű AVP már hátrányos.
- Cirkadián ritmus: az emlősök viselkedési mintázatára az egyedek cirkadián ritmusa hatással bír. A központi cirkadián ritmus kialakításában a SCN-nek jut a főszerep. Az első hormon, amit az SCN-ben nagy mennyiségben azonosítottak az AVP volt [88]. Az AVP segít fenntartani más hormonok szekréciójának cirkadián ritmusát is [89].
- Fájdalomérzékelés: abban az esetben, amikor fájdalmas stimulus éri az egyedet, fokozódik a PNV-ben az AVP termelődése és szekréciója. Az agykamrákba adott AVP a fájdalomküszöb emelkedését, míg a lokális AVP neutralizáció a fájdalomérzet fokozódását eredményezi. Ezekből az adatokból arra következtethetünk, hogy az AVP mint endogén antinociceptív anyag van jelen a PVN-ben [90, 91].
- *Szociális viselkedés, interakciók:*
  1. **agresszió**, mely függ az állat szociális „előéletétől”, a korábban megélt élethelyzetektől. A V1b receptorok nagy száma a hippokampusz CA2 mezőjében arra enged következtetni, hogy ennek a receptor altípusnak lehet szerepe a szociális memória kialakításában, melynek a korábbi élethelyzeteknek a tárolásában lehet szerepe. Aranyhörcsögökkel végzett kutatások arra világítanak rá, hogy a mediális preoptikus és az anterior hipotalamikus területeken található V1a [92], illetve V1b receptorok [93] közvetítette szignáloknak is szerepe lehet az agresszív magatartás szabályozásában. Génkiütött egerekben a V1b receptorok közvetítette szabályozás látszik az elsődlegesnek [94, 95].
  2. **szociális kapcsolatok**, melyek növelik a szociális biztonságot, ezáltal csökkenteni képesek a stresszt és a szorongást. A pockokban a szociális monogámia (amely egyébként az emlősöknek kevesebb, mint 5%-ra jellemző) szorosan összefügg az agyuk V1a receptor eloszlásával. A monogám pockoknál

a laterális szeptumban kisebb, míg az amigdalában nagyobb az AVP mennyisége, mint a poligám pockoknál [96]. Erős korreláció áll fenn a szülői gondoskodás mértéke és az AVP szintek között is. Míg az AVP laterális szeptumba történő beadása a szülői magatartást erősíti, addig V1a receptor antagonisták annak mértékét csökkentik [97].

3. Hasonló különbségek figyelhetők meg más fajokban is. Patkányok esetében a vemhesség késői szakaszában, a **vajúdás és a szoptatás** alatt is emelkedett AVP szintek mutathatók ki mind az SON, mind a PVN területén [88]. Ennek egyik kézenfekvő magyarázata az lehet, hogy a vemhesség majd szoptatás alatt az AVP segít fenntartani a szervezet víz- és sóháztartásának egyensúlyát.
4. **Tanulási és memória folyamatok:** Nagy szerep tulajdonítható az AVP-nek a szociális interakciók során lejátszódó folyamatok szabályozásában, így például a szociális felismerés, a szociális memórianyomok kialakításában. Míg emberben és főemlősökben a hallás és látás jut elsődleges szerephez, addig a rágcsálók esetében a szaglás a legfontosabb érzékelés. Egy a Nature-ben megjelent közlemény alapján feltételezhetjük, hogy az olfaktórikus területen található AVP részt vesz a szociális felismerésben [98]. A laterális szeptum V1a receptorainak is fontos a szerepe [99], valamint a hippokampális V1b receptor rendszer a memórianyomok rögzítése és ezen memórianyomok „visszahívása" kapcsán vesz rész a folyamatban. Ez a rendszer lehet továbbá a kulcsa a szociális felismerés által kiváltott viselkedési válaszok megjelenésének [100]. Az első, a viselkedési mintázatok és az AVP közötti kapcsolatot leíró tanulmány (egy shuttlebox segítségével végzett nem-szociális memória teszt) a 1960-as években jelent meg [101]. Azóta számos cikk számolt be az AVP és a nem térbeli memóriát érintő tanulás, a memória és különösképpen a memórianyomok „előhívása" közötti kapcsolatról [88]. További cikkek a V1a receptorok fontosságáról írnak ennek a folyamatában [102]. Az endogén AVP jelenléte szükségesnek látszik a térbeli memória kialakításában is. Ezt az is bizonyítja, hogy a természetes mutáció révén AVP hiányos Brattleboro patkányok munkamemóriája kisebb mint egészséges kontroll társaiké [103].

1.5.2. Az AVP hatása stresszben

Az AVP nagy fontossággal bír az adenohipofízis ACTH elválasztása szempontjából. Az AVP ugyan önmagában meglehetősen gyenge ACTH szekretagóg, ugyanakkor CRH jelenlétében, annak ACTH elválasztást fokozó hatását jelentősen potencírozni képes. Ezt ***in vivo*** és ***in vitro*** kísérletek is bizonyítják [104]. Az ACTH felszabadulás cAMP függő. Ugyanakkor az AVP a hipofízis sejtek V1b receptorain kötődve a PLC/IP_3/DAG utat aktiválja. Az IP_3 a megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} szint révén az ACTH raktárak gyors ürülését eredményezi CRH-tól független módon. A sejtekben képződő DAG ezzel párhuzamosan a protein kináz C (PKC) útvonalat aktiválja és a CRH-R1-en keresztüli ACTH szekréciót fokozza. Vagyis az AVP a CRH/CRH-R1/PKC/cAMP útvonalat képes indirekt módon felerősíti, így emelve az adenohipofízis ACTH elválasztását [105]. Fontos hozzátenni azonban, hogy míg a CRH az ACTH raktárak gyors ürülését és az ACTH prekurzor POMC génjének átíródását is fokozza, addig az AVP a POMC átíródására nincsen hatással.

Kiemelkedő jelentősége van a stresszfolyamatok szabályozása szempontjából annak, hogy a magnocelluláris neuronokon kívül a parvocelluláris neuronokban is kimutatható az AVP jelenléte. Nyugalmi körülmények között a parvocelluláris neuronok AVP termelése rendkívül alacsony, de a patkányoknál a CRH termelő sejtek mintegy fele AVP-t koexpresszál. Elhelyezkedésük is sajátos a magon belül. A CRH+/AVP+ sejteket laterálisan és dorzálisan találhatunk, míg a CRH+/AVP- sejtek ventrálisan és mediálisan helyezkednek el. Megemlítendő az is, hogy a két neuropeptid egyazon szekréciós granulumban található meg [106]. Az egyes fajok esetében a kolokalizáció mértéke eltérő lehet, illetve egy fajon belül a CRH+/AVP+ sejtek arányát az állat aktuális stressz állapota és kortikoszteron szintje dinamikusan befolyásolják. Például a CRH+ axon AVP+ is lesz, ha az állat mellékveséjét kiirtják (adrenalectomia, ADX) és ez a folyamat visszafordítható, ha a glükokortikoidot pótoljuk [107]. Akut, illetve krónikus stressz hatására szintén megváltozik a CRH/AVP kolokalizációjának mértéke [108]. Akut stressz esetében gyors CRH és AVP ürülés figyelhető meg az axonterminálisokból a hipofízis portális keringésébe az eminentia mediana külső zónájának a területén. Krónikus stressz esetében azonban a CRH felszabadulásban nem tapasztalható változás, viszont emelkedik az AVP és az AVP

mRNS mennyisége a PVN-ben [109], a CRH/AVP termelődés aránya az AVP javára tolódik el. Egyes szerzők szerint a parvocelluláris eredetű AVP kevésbé érzékeny a glükokortikoidok gátló hatására, mint a CRH [30, 32]. Vagyis a megemelkedett AVP szint funkciója, hogy a HHM tengely működőképességét a krónikus stressz körülményei között is fenntartsa. Tartósan magas glükokortikoid szintek mellett is létre kell jönnie az egyed túlélése szempontjából elengedhetetlen hatásoknak [30].

A parvocelluláris mellett a magnocelluláris eredetű AVP is képes lehet az ACTH felszabadulás kiváltására. Kimutatták, hogy az eminentia mediana belső zónájában az AVP axonok varikozitásaiból (Herring testek) hormon szabadul fel [110]. A portális vérben jelentős mennyiségű AVP van jelen akkor is, amikor a parvocelluláris sejtekben az AVP expresszió nem mutatható ki [111]. Ugyanakkor megemlítendő, hogy a parvocelluláris CRH és AVP választ kiváltó stresszorok nincsenek hatással a magnocelluláris AVP sejtekre, az ADX-es állatok esetében a hiányzó negatív glükokortikoid feedback a magnocelluláris sejtek AVP expresszióját nem befolyásolja. Az is elgondolkodtató adat, hogy a glükokortikoid receptor szám a parvocelluláris sejtekben magas, míg a magnocelluláris sejtek esetében elenyésző [112].

Bár számos tanulmány foglalkozik az AVP HHM tengelyre gyakorolt hatásával, de a fiziológiás szerepéről még nem alakult ki egyértelmű vélemény. **Immunneutralizálás** bizonyította a szabályozó szerepét restraint stressz (mozgáskorlátozás), éter belélegzés és formalin injekció stresszben, a nyugalmi szintekre gyakorolt befolyás nélkül [113, 114]. A **V1b receptor kiütése** egerekben az egyik törzs esetén csökkentette az alapszinteket [115], míg egy másik esetben nem volt hatással a reggeli és esti nyugalmi ACTH és kortikoszteron szintekre [18]. 30 perc mozgáskorlátozás vagy agresszív kontaktus hatására kialakult HHM tengely aktiváció nem különbözött a vad és V1b receptor kiütött egerekben, míg a hipoglikémia, a lipopoliszacharid injekció (LPS, bakteriális infekció modellje), kényszres úszás (forced swim test, FST) és alkohol intoxikáció hatására szignifikánsan kisebb emelkedések jöttek létre a génkiütött állatokban [18, 115, 116]. Az akut hatásokkal ellentétben nem találtak különbséget a krónikus mozgáskorlátozás [18], vagy az ismételt LPS injekciók hatására aktiválódott HHM tengely működésében a vad és V1b receptor kiütött állatok között [116]. V1b receptor **szelektív antagonista** (SSR149415, Sanofi) kb.

50%-kal csökkentette a mozgáskorlátozás hatására megemelkedő ACTH szinteket [117] és gátolta az éter belélegzés hatását. Ugyanakkor az FST hatására aktiválódó HHM tengelyre hatástalan volt [118]. Természetes mutációval létrejött **Brattleboro törzzs**el kapcsolatban is eltérő eredmények láttak napvilágot [119, 120]. Általában normális nyugalmi ACTH és kortikoszteron szinteket tudtak kimutatni ezen törzs AVP hiányos egyedeiben [84], de a stresszre adott válaszuk erősen változó volt.

1.5.3. Az AVP jelentősége pszichiátriai betegségekben

Az érzelmi zavarok olyan hangulati változások, amelyek magukba foglalják az unipoláris depressziót, szorongást, beleértve a generalizált szorongást, poszt-traumás stressz betegséget, pánikot, fóbiát és az obszesszív-kompulzív megbetegedést. Mindezen kórképek etiológiájában szerepel a stressz, s valószínűleg az AVP, mint a HHM tengely egyik fontos szabályozója is „szerepet kap" [121].

Mivel a depresszió humán megbetegedés, ezért elég nehéz megfelelő, új antidepresszánsok tesztelésére alkalmas állatmodellt találni. Egy jó modellnek a humánhoz hasonló etiológiával, patofiziológiával és hasonló kezelési profillal kell rendelkeznie [122]. A **forszírozott úszás** teszt (angol: forced swim test, FST, behavioral despair) az egyik ilyen elfogadott modell, bár ez elsősorban új gyógyszerek tesztelésére és nem az etiológia vagy a patofiziológia tisztázására szolgál [123]. A teszt alapja, hogy ha az állatot 15 percre egy vízzel telt edénybe helyezzük, akkor kezdetben küzd, ki akar szabadulni, majd egy idő után feladja, és az idő nagy részét lebegő, immobilis pozitúrában tölti. Az antidepresszáns kezelés csökkenti a lebegés időtartamát. Az FST AVP elválasztást indukál mind az SON, mind a PVN magokból [124], továbbá a szeptumból [125] és az amigdalából is [126]. Habár a plazma AVP szint emelkedés hiánya a centrális (parvocelluláris) és perifériás (magnocelluláris) AVP elválasztás disszociációjára utal [124].

Egy másik, széles körben alkalmazott modell, mely depresszió-szerű állapotot hoz létre, a krónikus váltakozó enyhe stressz, vagy megjósolhatatlan stressz (**chronic mild stress, CMS**, chronic unpredictable stress, CUS). A sorozatos stresszorok hatására az állat anhedóniássá válik, mely csökkent cukorpreferencián mérhető [29, 127]. Egérben a CMS

modellben az AVP antagonista SSR149415 (10 and 30 mg/kg, i.p.) csökkentette a fizikai leromlást, a szorongást, valamint az FST-ben mért depresszió-szerű tüneteket [127].

Saját megfigyelésünk szerint az AVP hiánya a hím *Brattleboro patkányok*ban nem befolyásolta az állat mozgékonyságát sem az izomerőt mérő függeszkedés (wire suspension), sem a mozgáskoordináció vizsgálatára szolgáló forgó rúd (rotarod) tesztekben [128]. Néhány irodalmi adattal [129] ellentétben a mi állataink általános aktivitása sem különbözött a kontroll állatokétól a nyílt tér tesztben (openfield). Mindezek alkalmassá teszik a Brattleboro patkányokat az AVP szorongás-depresszió tesztekben való alkalmazására, mivel ezen tesztek legtöbbje aktív mozgást igényel, s így a mozgékonyság változásai befolyásolhatják a tesztből levont következtetéseket. Az AVP hiányos állatok a további tesztek során kevésbé szorongtak és mutattak depresszió-szerű tüneteket és hedonistábbak voltak, mint a kontroll állatok [128].

Az **emelt keresztpalló** (elevated plus maze, EPM) teszt a szorongás mérésére szolgál. Ez a földtől 70cm-re lévő két egymásra merőleges vékony (20cm széles) léc, melyek közül az egyik lécen a két szemben levő karnak oldalfala is van. A patkányok szeretik a szűk, sötét járatokat, ugyanakkor szeretik felderíteni a környezetüket is. A kevésbé szorongó állat bátrabb, több időt tölt a nyílt, kevésbé védett karban. A klinikailag hatékony szorongásoldók (pl. klórdiazepoxid) növelik a nyílt karban eltöltött időt. Ezen teszt alapján került elválasztásra a *LAB* (low anxiety, kevéssé szorongó) és *HAB* (high anxiety, nagyon szorongó) patkány-törzs. Feltételezhető, hogy a LAB állatok csökkent szorongásáért a centrális AVP alacsonyabb szintje lehet a felelős [130]. V1a receptor antagonista adása csökkentette a HAB állatok szorongás- és depresszió-szerű viselkedését [131]. Napjainkban eltolódás figyelhető meg a hagyományos állatmodellektől az endofenotípus vizsgálatok irányába [132]. Ebben a vonatkozásban kimutatták, hogy a HAB állatokban van egy egyedi nukleotid polimorfizmus (angol: single nucleotide polymorphism (SPN)), melynek hatására fokozott a PVN-jükben az AVP átírása, ami a fokozottan szorongó fenotípushoz vezethet [133].

A hím *V1a receptor kiütött egerek* számos teszt során csökkent szorongást mutattak vad társaikhoz képest [134, 135]. Másrészről a V1a receptor a laterális szeptumban történő túltermeltetése (overexpression) fokozta a szorongást [136]. Habár itt nagy különbség volt

megfigyelhető a nemek közt. Úgy tűnik, hogy a hímekkel ellentétben a nőstényeknél az oxitocin (OT) játszik fontosabb szerepet a szorongás szabályozásában [137].

Az AVP érzelmi zavarokban betöltött fontos szerepét támasztják alá a különféle *agyterületek célzott injekciójá*val végzett kísérletek is. A szeptumba adott V1a mRNS *antisense* oligonukleotid [138], illetve V1a antagonista [139] jelentősen csökkentette a szorongást anélkül, hogy hatott volna a mozgékonyságra. Másrészről Appenrodt és munkatársai mind az intraszeptális, mind az intraperitoneális AVP injekciót szorongáscsökkentő hatásúnak találták. Ez arra utal, hogy a szeptumon kívül is lehet az AVP-nek támadáspontja [140]. A szeptumba vagy az amigdalába adott V1a receptor antagonista a szorongáscsökkentő hatáson kívül csökkentette a depresszió-szerű tüneteket is [125, 126].

Érdekes módon a V1b receptorok kiütése nem vezetett kevésbé szorongó vagy depresszió-szerű magatartás megjelenéséhez [94, 141]. Továbbá a specifikus V1b antagonista SSR149415 nem volt szorongáscsökkentő hatású az EPM tesztben, ha a laterális szeptumba [142], csak ha a bazolaterális amigdalába adták [143].

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az AVP fontos szerepet játszik a szorongásos-depresszió-szerű állapotok kialakulásában. Mivel a tesztek legtöbbje (EPM, FST) akut változásokat mér, a depresszió pedig egy krónikus állapot, mely csak tartós (legalább 2 hét) kezeléssel gyógyítható, ezért szükségesnek tűnik az AVP szerepének vizsgálata a CMS tesztben is, nem csak az ismételt injekciókkal járó AVP antagonistával (ami maga is krónikus stressz), hanem a génkiütött állatokkal is.

2. Célkitűzések

Közelebb vihet az AVP HHM tengelyre gyakorolt hatásának megértéséhez, ha egyetlen modell esetén vizsgáljuk a különféle, intenzitásukban, modalitásukban eltérő stresszorok hatását. Az intézetünkben tartott és tenyésztett Brattleboro patkányok szolgáltak állatmodellként vizsgálataink során. A törzs egyedei megfelelő modellnek tekinthetők, hiszen az AVP hiánya ezen állatokban már a születéstől fogva „természetesen" adott, vagyis a vazopresszinerg rendszer manipulációja nem igényelt esetünkben semmilyen extra beavatkozást (pl. immunneutralizáció injekcióval, AVP antagonisták vagy agonisták bejuttatása szervezetbe injekcióval, agyi léziós műtétek), mely kezelések maguk is stresszorok. Lehetőségünk nyílt tehát egy átfogó kísérletsorozat elvégzésére, ezek alapján pedig a célkitűzéseink a következők voltak:

- ***A vazopresszin szerepének vizsgálata akut stresszhelyzetekben***
    1. Vazopresszin hiányos állatok akut stresszhelyzetekben mutatott stresszválaszának vizsgálata
    2. Vazopresszin hiányos állatok forszírozott úszás tesztben mutatott stressz reaktivitása AVP retrodialízis kísérletben
    3. Vazopresszin hiányos állatok vizsgálata akut morfin kezelés utáni megvonásos helyzetben
- ***A vazopresszin szerepének vizsgálata krónikus stresszhelyzetekben***
    1. A vazopresszin szerepének vizsgálata ismételt morfin kezelés hatására kialakuló tolerancia utáni megvonásos stresszhelyzetben
    2. A vazopresszin szerepének vizsgálata ismételt, 28 napos mozgáskorlátozás (restraint) kísérletben
    3. Krónikus enyhe stressz vizsgálata, magatartási hatások
- ***A vazopresszin szerepének vizsgálata perinatális korban***
    1. Kispatkányok stressz reaktivitásának vizsgálata
    2. Különböző nemű kispatkányok stressz reaktivitásának vizsgálata

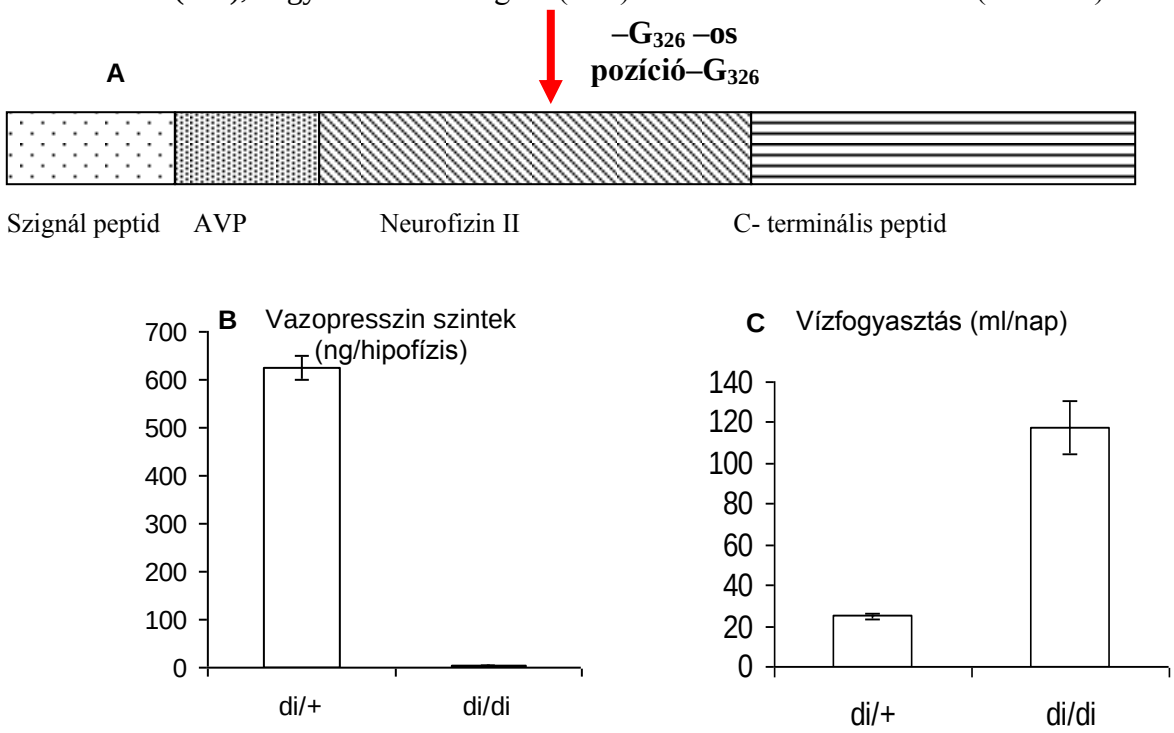
3. Módszerek

3.1. Kísérleti állatok

3.1.1. A Brattleboro törzs

A kísérleteket az intézetünkben tenyésztett hím ivarú Brattleboro patkányokon végeztük (a kispatkányok esetén nőstényeket is vizsgáltunk). A Brattleboro törzs a Long Evans patkánytörzsből alakult ki egy véletlenszerű autoszómás mutáció révén. Az AVP génje 3 exonból áll. A peptid hormon egy prekurzor protein részeként szintetizálódik. Ez a prekurzor protein a ***prepropresszofizin.*** Az első „A" exon kódolja a prekurzor molekulán belüli szignál peptidet, az AVP-t, illetve a neurofizin molekula N-terminális részét. A „B" és „C" exonok a neurofizin molekula középső, illetve C-terminális régióját, illetve a prepropresszofizin molekula végén található C-terminális glikoproteint kódolják. Egészséges állatok PVN-jének magno- és parvocelluláris sejtjeiben a prepropresszofizin molekula már az átíródása során a sejtek endoplazmás retikulumába transzportálódik. Később a transz-Golgi hálózatban jelenik meg és neuroszekretoros vezikulumok formájában kezdi meg útját a hipofízis hátsó lebenye felé. A vezikuláris transzport során vágódik ki a prekurzor molekulából az AVP, a neurofizin és a C-terminális glikoprotein egy di- és egy monobázikus hasítási helyen történő enzimatikus reakció során [144]. Poliuriás állatokban az AVP gén neurofizint kódoló régiójában, a $–G_{326}$ –os pozícióban bekövetkező egyetlen nukleotid deléciója miatt egy úgynevezett -1-es *frameshift* mutáció következik be (8.A ábra) [145]. A deléció következtében megváltozik az aminosav sorrend a neurofizin molekula C-terminális részén, eltűnik a vad típusban jelen lévő neurofizin és C-terminális glikoprotein közötti hasítási hely és a „stop kodonok" és egy polilizin farok jelenik meg a prekurzor molekula végén. A megváltozott prepropresszofizin molekula transzportja zavart szenved, szinte beragad az endoplazmatikus retikulumba. Ennek következtében sem a AVP, sem a többi részmolekula nem vágódik ki, nem jelennek meg a keringésben, így funkciójukat sem képesek betölteni (mérhetetlen AVP szint: 8.B ábra; polidipszia: 8.C ábra) [146].

Az állatok hipotalamikus eredetű ***diabetes insipidusban*** szenvednek (di/di genotípus). Ennek következtében jóval nagyobb mennyiségben fogyasztanak vizet, mint a mutációt nem (+/+), vagy csak heterozigóta (di/+) formában hordozó társaik (8.C ábra).



8. ábra
A: A vazopresszin génjében bekövetkezett pontmutáció helye; **B**: A különböző genotípus állatok hipofízisében mért vazopresszin szintje; **C:** A különböző genotípusú állatok vízfogyasztása

A kísérletek során a mutációt homozigóta (di/di) és heterozigóta (di/+) formában hordozó állatokat hasonlítottuk össze (9. ábra). Noha a di/+-os állatok AVP szintje alacsonyabb, mint a mutációt semmilyen formában nem hordozó +/+-os állatoké, ez mégis kielégítő szintet biztosít a vízháztartás szabályozásához, ezért ezek az állatok megfelelő (irodalmilag is elfogadott) kontrollként szolgálnak [147]. Mivel a Long Evans törzsből több mint 50 évvel ezelőtt alakult ki a Brattleboro törzs, így ezeket az állatokat nem tekinthetjük megfelelő kontrollnak, hiszen más génekben is történhetett olyan mutáció ez idő alatt, mely a korrekt összehasonlítást lehetetlenné teszi. Amennyiben nem Brattleboro kontroll állatokat használtunk, az adott kísérletek leírásánál ez külön jelöltem. A +/+ és di/+ genotípusú egyedek fenotipikusan nem különböznek egymástól, ezen állatok pontos genotípusát, csak nehézkes genetikai vizsgálatok után állapíthatjuk meg. A tenyésztés során

ezért a szülő párok genotípusát úgy választottuk meg (apa „di/di”, míg az anya közel normális AVP szinttel rendelkező „di/+”), hogy a születendő utódok vagy a di/+ vagy a di/di fenotípust mutassák. Ezek elkülönítése a vízivás mérésével könnyen kivitelezhető (8.C ábra). Kérdéses esetben az utólagos hipofizeális AVP szint mérés volt segítségünkre. Korábbi kísérleteink arra mutatnak, hogy a di/+ genotípusú anyák sikeresebben nevelik fel utódaikat, mint di/di társaik, így kísérleteink során az ilyen anyáktól származó utódokat használtuk [148]. Az utóbbi években kitenyésztettünk egy külön +/+ vonalat is, melyeket megpróbálunk a heterozigóta vonallal közeli rokonságban tartani.

9. ábra
A di/di (kisebb) és di/+ (nagyobb) genotípusú állatok közötti méretbeli különbség
Kép saját forrásból

3.1.2. Tartási körülmények

Az állatokat állandó, kontrollált körülmények között tartottuk (22° C ± 1° C; 50-70% páratartalom, 12 óra világos/12 óra sötét ciklus, világítás kezdete: 07:00 óra), ahol szabványos rágcsáló táphoz (Charles River; Hungary) és csapvízhez szabadon hozzáférhettek. Mivel a di/di fenotípussal rendelkező állatok vizeletmennyisége kiemelkedően magas, így ezen állatokat a szokásos másnaponkénti almozás helyett naponta almoztuk. A kísérletekhez használt állatok tenyésztése, tartása és kísérletek alatti felhasználása megfelelt a mind a Munkahelyi Állatvédelmi Bizottság (Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Budapest, Hungary) magyar, mind a European Communities Council Directive európai előírásainak. Fájdalmas, vagy műtéti beavatkozás kizárólag mély anesztéziában történt, törekedve a minél gyorsabb és kíméletesebb beavatkozásokra. A kísérletek során kizárólag a minimálisan szükséges állat mennyiséggel dolgoztunk.

3.2. Mintavétel

3.2.1. Krónikus juguláris kanül beültetése vérminták vétele céljából

Két nappal a kísérletek kezdete előtt az állatokat anesztézia céljából ketamin (50 mg/kg SelBruHa Állatgyógyászati Kft, Hungary)-xylazine (20 mg/kg Spofa, Prague, Czech Republic)-promethazinum chloratum (0,2 mg/kg, EGIS, Budapest, Hungary) keverék intraperitoneális alkalmazásával elaltattuk. A teljes anesztézia elérésekor az állatok jobb juguláris vénájába egy szilikon kanült helyeztünk (medical-grade silicone tubing; ID 0,64mm; OD 1,2 mm Dow Corning; MI; USA). A behelyezés után a kanült az állatok bőre alatt átvezettük a háti-nyaki régióhoz, majd heparinos fiziológiás sóoldattal feltöltöttük és a kísérlet kezdetéig lezártuk. A kísérlet napján heparinos fiziológiás sóoldattal átmostuk, majd egy hosszabb szilikon cső segítségével egy fecskendőt csatlakoztattunk a vénába vezetett kanülhöz az éber, szabadon mozgó állaton végzett folyamatos vérvétel céljából (0,4 ml vér/ minta, levétele után fiziológiás sóoldattal visszapótolva).

3.2.2. Vérminta nyerése farokvénából

Az állatokat egy csőbe helyeztük, melyből a farkuk szabadon kilógott. A farokvénát steril, egyszer használatos szike pengével megvágtuk, majd a kiserkedő vért Eppendorf csövekbe fogtuk fel (0,3-0,4 ml).

3.2.3. Vér és szövetminták nyerése dekapitálással

A feldolgozás során az állatok csecsemőmirigyét, mindkét oldali mellékveséjét előre lemért csövekbe, az állatok törzsvérét (kb. 7-10 ml) pedig jégen hűtött, K_2-EDTA (150µl 20 w/v % EDTA) tartalmú csövekbe gyűjtöttük. A dekapitálás után a koponyát felnyitottuk, az agyakat eltávolítottuk és szárazjégen azonnal fagyasztottuk, a CRH és AVP mRNS *in situ* hibridizációig -70°C-on tároltuk. A hipofíziseket beágyazó médiumban szárazjég segítségével azonnal lefagyasztottuk és az agyakhoz hasonlóan a POMC mRNS *in situ* hibridizációig tároltuk.

3.3. Mérések

3.3.1. Hormonmérések

1. A hormonszintek mérése során a „radioimmuno assay (RIA)" módszerét használtuk. Az **ACTH** méréshez szükséges specifikus ellenanyagokat (nyúlban termeltetett h-$ACTH_{1-39}$ ellen) intézetünkben fejlesztettük ki [149]. Az ellenanyag magas specificitással rendelkezik az ACTH-ra. α-MSH-val való keresztreaktivitása 0,2%, ugyanakkor nem mutat szignifikáns keresztreakciót az γ-MSH, $ACTH_{11-24}$, $ACTH_{25-39}$; $ACTH_{1-14}$; $ACTH_{1-19}$ peptidekkel. Az egy kísérletből származó plazmamintákat mindig egy *assay*-ben mértük. A mérésen belüli szórás 5,8% volt.
2. A **kortikoszteron** szintek mérése során 10 μl plazmából határoztuk meg a hormonszinteket szintén RIA módszerrel. A specifikus ellenanyagot nyúlban termeltettük kortikoszteron-3-karboximetiloxim-bovin serum albumin konjugát ellen. I^{125} jelölt karboximetiloxim-tirozin metilésztert használtunk nyomjelzőként (tracer). A plazma transzkortin reaktivitását alacsony pH alkalmazásával zártuk ki. A kortikoszteron mérés szenzitivitása 1 pmol, a mérésen belüli szórás 7,5 % volt.
3. **AVP** hormonmérések esetében a nyúlból származó anit-AVP antitestet Dr. Vecsernyés Miklós (Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar) ajánlotta fel számunkra. A mérésen belüli szórás 10,7%, a mérések közötti szórás 17,7% volt. A kispatkányok genotipizálása során az AVP tartalmat a teljes hipofízisekből határoztuk meg. A dekapitálás után a hipofíziseket eltávolítottuk, majd 100μl 0,1N sósavban durván homogenizáltuk. Feldolgozásig -20°C-on tároltuk. Felolvasztás után 5 percig forraltuk a mintákat, majd ultrahangos homogenizálást végeztünk. 100-szoros hígítás után mértük meg a homogenátumok AVP tartalmát.
4. Az **OT** szinteket Münchenben mérték specifikus RIA-val. A plazma OT tartalmat 100μl minta extrahálását követően, a mikrodialízis mintákat liofilizálást követően határozták meg. A méréshatár 0,1pg/minta, más peptidekkel való keresztreakció <0,7% volt [145].

5. Az immunoreaktív **cAMP** szinteket Brooker módosított módszerével mértük [150, 151]. Az intézetünkben a 2-o-succinyl-cAMP-HSA ellen kecskében kifejlesztett antitest (No. 309) 0,00043 % keresztreakciót mutatott cGMP-vel, 0,00005 %-ot ATP-vel és 0,00034 %-ot AMP-vel, lehetővé téve a cAMP direkt meghatározását még magas ATP koncentrációk esetén is. Az antitestet 1:8000 végső hígításban használtuk. 2'0-szukcinil-cAMP tirozin metilésztert a *chloramine-T* módszerrel jódoztunk és ezt használtuk radioaktív ligandként. A kötött és szabad frakciók elkülönítése 1 ml jéghideg etanollal történt. Az assay érzékenysége 0,05 pmol/cső volt. Az intraassay variáció 7,1%. Egy kísérlet mintáit egy assay-ben mértük meg.

3.3.2. In situ hibridizáció

3.3.2.1. Szövetelőkészítés

Az agyakat, illetve a hipofízisek elülső lebenyét beágyazó médiumban azonnal, szárazjégen fagyasztottuk, majd a felhasználásig −70°C-on tároltuk. A szövetdarabokat kriosztátban -17°C-on metszettük. Az agyak koronális metszetei közül minden hatodik 16µm-es metszetet, a hipofízisek esetében a szerv legnagyobb keresztmetszetű részéből 4 párhuzamos sorozatban, lemezenként 6db 16µm-es metszetet szilánozott tárgylemezre vettünk fel. A hibridizációig a lemezeket −70°C-on tároltuk.

3.3.2.2. Hibridizáció

A lemezeket 4%-os paraformaldehid oldattal posztfixáltuk 60 percig, majd 2x5 percig steril kálium-foszfát pufferben (KPBS) mostuk. Mosás után egy éjszakán át vákuum-exszikkátorban szárítottuk. Szárítás után proteináz-K-val emésztettük (1 µg/ml 50 mM Tris-ben, pH 8, és 5 mM EDTA), acetiláltuk (0,25% ecet-anhidrid 0.1 M trietanolaminban pH 8), majd felszálló alkoholsorban dehidráltuk a szöveteket (50%-70%-96%-abszolút alkohol). Száradás után a ^{35}S-UTP-vel jelölt ribopróba (hibridizációs oldat:10^7 -10^9 dpm/ml; 50% formamid, 0,3M-os NaCl, 10nM TRIS, 2mM EDTA, 1x Denhardt oldat, 10% dextrán szulfát, 0,5 mg/ml élesztő tRNS, pH=8) 100 µl-ét a szövetekre pipettáztuk, majd a lemezeket, vigyázva arra, hogy a fedőlemez alá buborékok ne kerüljenek, lefedtük. A lemezekhez a fedőlemezt DEPEX segítségével rögzítettük, hogy a kiszáradásukat elkerüljük (nedves kamra létrehozása). A hibridizáció 58°C-on 12-16 órán keresztül zajlott.

A hibridizáció után a metszeteket 4x SSC-ben (saline-sodium citrate puffer) áztattuk mindaddig, amíg a fedőlemezek maguktól leváltak a tárgylemezről (1x SSC: 0,15M NaCl és 15mM trinátrium-citrát; pH=7). A nem hibridizálódott egyszálú ribonukleinsavakat ribonukleáz A-val emésztettük (20 mg/ml; TRIS-EDTA pufferben 0,5M NaCl). Fokozatosan csökkenő sókoncentrációjú mosások után (2x, 1x, 0,5x SSC) 65°C-on 0,1x SSC-ben 30 perces inkubáció következett.

A **CRH mRNS** mennyiségének meghatározás a [35S]UTP jelölt ribopróba használatával történt. Ez a próba a CRH gén exonszekvenciájával komplementer (a próba Dr D. Richter, University of Hamburg, Germany nagylelkű ajándéka volt). A hibridizációs eljárás után az exponálás imaging plate segítségével történt 72 órán keresztül. A plate-ek leolvasása fluorescens kép analizálóval történt (FLA 000, Fujifilm, a leolvasás felbontása 50 μm). A kapott radiogrammokat az internetről szabadon letölthető Image J szoftverrel értékeltük ki. A vizsgált régió területét körberajzoltuk, majd az átlagos szürkeséget a háttér értékével (egy szomszédos hipotalamikus terület átlagos szürkesége) korrigáltuk. A CRH mRNS-hez összegeztük a PVN (a mag anterior és a dorzális mediális parvocelluláris, illetve a periventrikuláris területeken) és az amigdala teljes kiterjedését (integrált denzitás= összegzett (terület * feketedés)) [152].

Az **AVP mRNS** szinteket [35S]UTP tartalmú ribopróbával határoztuk meg, ami az AVP exonszekvenciájával volt komplementer (a 1,2kb templát Dr. K. Majo (Northwestern University, USA) ajándéka volt). AVP mRNS esetében a hibridizált lemezeket Kodak NTB3 autoradiográfiás emulzióba merítettük, az exponálás ideje 3 nap volt. Az előhívás D-19-es előhívó (Kodak) oldattal történt. A PVN mikroszkópos képét digitalizáltuk (Sony CCD kamera), a feldolgozás ezekről a képekről történt. Az ezüst szemcsék által kibocsátott szignál optikai denzitását minden állat esetében 4-5 lemezen, összesen 50-60 egyedi sejt esetében határoztuk meg a PVN mediális, parvocelluláris régiója felett (lsd. [145]) Image J program segítségével. A mért értékeket a háttér értékével korrigáltuk (egy adott keretben a sejt mellett lévő nem vizsgált terület értéke). A vizsgált sejtek átlagos optikai denzitása jelezte a PVN parvocelluláris sejtjeinek AVP aktivitását.

A **POMC mRNS** szinteket a POMC gén exonszekvenciájával komplementer [35S]UTP-val jelzett ribopróbával vizsgáltuk (az 1,2kb templátot magába foglaló plazmid

Dr. J Eberwine ajándéka volt (University of Pennsylvania, USA)). Ehhez az állatok hipofíziseiből a 6 legnagyobb keresztmetszetű mintát vettük fel tárgylemezre és ezek esetében végeztük el a hibridizációs eljárást. A minták kiértékelése során a CRH mRNS esetében leírt metódust használtuk. A hibridizált metszetek digitalizált képén a szignál átlagos intenzitását határoztuk meg.

Az **OT mRNS** szint mérése a hipotalamikus PVN dorzális parvocelluláris, mediális parvocelluláris és posterior magnocelluláris régióiban történt (lsd. 26.ábra). Az agyminták metszésére és hibridizálására Magdeburgban, a kiértékelésre Magyarországon került sor. Az OT-ra specifikus DNS szekvenciát tartalmazó vektor Dr. Evita Mohr ajándéka volt (Institute of Cellular Biochemistry and Clinical Neurobiology, Hamburg-Eppendorf University, Hamburg, Germany). A metszetek hibridizációja az AVP-nél leírt módszerhez hasonlóan, emulzióba mártással történt. A kiértékeléshez az ImageJ szoftver "threshold" funkcióját használtuk, ahol az 5-nél több és 40-nél kevesebb pixelszámú küszöb feletti foltot tekintettük sejtmagnak. A program automatikusan kiértékeli a megadott területen előforduló sejtek számát. A mérést 3-3 jobb és baloldali metszeten végeztük el és a 6 mérés átlaga szolgált az állat jellemzésére.

3.3.3. A mellékvesék szövettani feldolgozása

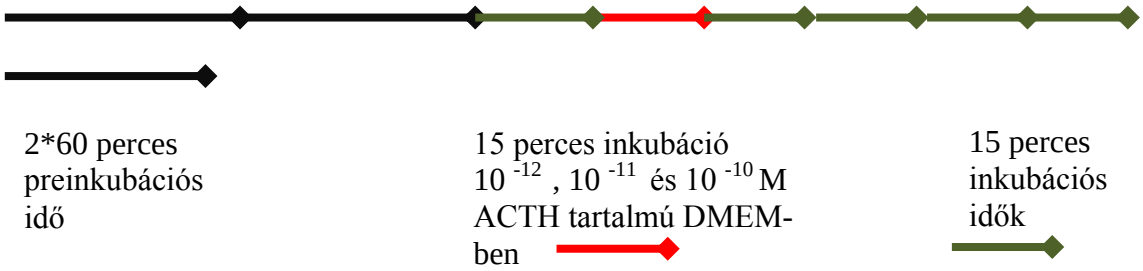
A paraffinba beágyazott mellékvesékből szánkamikrotómmal 15 μm-es metszeteket készítettünk, melyeket zselatinos tárgylemezre vettünk fel. A metszés után a lemezeket differenciáló hematoxilin-eosin festékekkel festettük. A megfestett lemezeket digitalizáltuk, majd ImageJ-vel határoztuk meg a metszeteken a mellékvesekéreg vastagságát. Körberajzoltuk a mellékvesék kerületét, majd a velőállományt és a két terület kivonásával kaptuk meg a kéreg területét.

3.3.4. Statikus inkubálás

A dekapitált állatok hipofízisét és mellékveséjét eltávolítottuk, majd 8 kisebb darabra vágtuk és 1 ml 37 ºC-os Dulbecco Minimal Essential Medium-ban (DMEM) (tartalmazott még: 2,5 g bovin serum albumin (BSA)/l, és gázkeveréket vezettünk bele: 95%O_2-5%CO_2) 2x1 óra időtartamban előinkubáltuk.

A 2 órás preinkubációs idő letelte után a hipofízist 20 percig CRH tartalmú DMEM-ben inkubáltuk. 20 perc után a szervekről a médiumot eltávolítottuk, centrifugáltuk (3000g, 5 perc), majd a felülúszót az ACTH szintek méréséig -20 ºC-on tároltuk. A szervdarabokat óvatosan összegyűjtöttük, majd 250µl 0,1M sósavban homogenizáltuk, centrifugáltuk (3000 g, 5 perc), a felülúszót a cAMP szintek méréséig -20 ºC-on tároltuk.

A mellékvesékről a preinkubációs idő után a médiumot 15 percenként összegyűjtöttük, majd frissre cseréltük összesen 6-szor. A második 15 perces szakaszban a szerveket ACTH tartalmú DMEM-ben inkubáltuk szintén 15 percig. Az egyes frakciók után a szervekről a médiumot eltávolítottuk, centrifugáltuk (3000g, 5 perc), majd a felülúszót a kortikoszteron szintek méréséig -20 ºC-on tároltuk (10. ábra).



10. ábra
A mellékvese inkubálás protokollja

3.3.5. Szuperfúzió

Ács és munkatársai [153] módosított módszerét használtuk [154]. A mellékvese darabokat perfúziós oszlopokra helyeztük és DMEM-mel mostuk. A előkészítő perfúzió során a darabokat 1 órán keresztül 100µl/perc sebességgel, majd egy további órán keresztül 200µl/perc sebességgel áramoltattuk át a stabil kortikoszteron szekréció elérése céljából. Ezután 5 perces frakciókat gyűjtöttünk (1ml/frakció). Az alapszekréciót az első 3 minta alapján határoztuk meg, majd a médiumhoz $2*10^{-10}$mol/l ACTH-t adtuk 5 percre. 60 perc kimosást követően újabb, 10^{-9}mol/l ACTH adására került sor. Mind a szövetmintákat tartalmazó oszlopok, mind az átáramló folyadék 37°C-on voltak tartva konstans gázáramlás mellett. A frakciókat jéghideg csövekbe gyűjtöttük és -20°C-on tároltuk a kortikoszteron szintek meghatározásáig.

3.4. Kísérleti protokollok

3.4.1. Akut stressz kísérletek

Az 1960-as években az AVP-t tekintették a HHM tengely legfőbb szabályozójának, de a CRH felfedezése, és az egy neuron=egy neurotranszmitter elv (Dale-elv) alapján kikerült az érdeklődés középpontjából. Új ismeretek, módszerek birtokában érdekesnek tűnt ismét felvetni azt a kérdést, milyen helyzetekben, milyen mértékben van szerepe az AVP-nek a HHM tengely szabályozásában. Ennek vizsgálatára a következő kísérleteket végeztük el [155]:

3.4.1.1. Újdonság stressz (Novelty)

Az állatokat egy, a tetején nyitott műanyag dobozba (40x36x20 cm) helyeztük 10 percre, mely doboz nagyobb, mint az előzőleg általuk megszokott állattartó ketrecek és előzetesen már több állat szagnyomaival szennyezett volt. Az egymást követő kísérletek során a dobozt nem takarítottuk, így azok vizelettel és széklettel szennyezettek voltak (az erősebb szorongás kiváltása érdekében). A kontroll állatokat a dobozukból kivéve, a stresszelt állatokat a 10 perces stressz után azonnal dekapitáltuk.

3.4.1.2. Szociális elkerülés (Social avoidance)

Ebben a tesztben a szorongást egy intézetünkben kidolgozott két kompartmentes módszerrel idéztük elő [156]. A berendezés két, összekötött kamrából áll, amely közül az egyikben egy ismeretlen Wistar patkány tartózkodik egy perforált plexi dobozba zárva. A tesztállatot 3 percre az üres térfélre helyezzük, majd a habituáció után kinyitva a két térfél közötti kaput további 5 percig megengedjük, hogy szabadon bejárja az egész berendezést. Az 5 perc végén az állatok farkából vért vettünk. A kontroll csoport tagjai az üres dobozba sem kerültek be.

3.4.1.3. Emelt keresztpalló teszt (Elevated plus maze (EPM))

Az emelt keresztpalló teszt az orvosi, biológiai kutatásokban az egyik leggyakrabban alkalmazott teszt. A teszt használata során az állatok új helyzetben mutatott szorongását mérjük. Az állatokat a keresztpalló (karhosszúság 50 cm, karszélesség 20 cm, a pallók magassága 70 cm) közepére helyeztük orral a zárt kar felé, majd az 5 perces teszt

után, a kontroll állatoktól a dobozukból való kivétel után azonnal vért vettünk a farokvéna megvágásával.

3.4.1.4. Lipopoliszacharid (LPS) injekció

A kísérlet során az állatok steril, fiziológiás só oldatban feloldott Escherichia Coli bakteriális lipopoliszacharidot (LPS, szerotípus 0111: B4) kaptak intraperitoneálisan (ip) 300µg/2ml/kg koncentrációban az immunrendszer aktivizálása érdekében. A kontroll állatok ip fiziológiás só injekciót kaptak. Az állatokat az injekció beadása után 1 óra múlva dekapitáltuk.

3.4.1.5. Éter inhaláció

Az állatokat egy éterrel átitatott, papírvattával bélelt, fedett üvegedénybe helyeztük 1 percre. Az üvegből kivéve őket, az orrukra éterrel átitatott vattát tartalmazó, kónikusan szűkülő csövet helyeztünk újabb 2 percig anesztéziában tartva az állatokat, majd visszahelyeztük őket a ketrecükbe. A kontroll állatokat a dobozukból kivéve azonnal, a stresszelt állatokat a kísérlet kezdetétől számított 10 perc múlva dekapitáltuk.

3.4.1.6. Hipertóniás só oldat injekciója

A krónikus vénás kanüllel felszerelt állatok hasüregébe 1,5 mólos NaCl oldatból 100g testtömegenként 1,5ml-t adtunk ip. Így a stressz tulajdonképpen kombinációja volt az ozmotikus, a térfogati és a fájdalom stimulusnak. Az állatoktól a hipertóniás só injekció előtt közvetlenül, majd utána 5, 15, 30, 60, és 120 perc múlva 0,4 ml vért vettünk a behelyezett juguláris kanülön keresztül. A kontroll állatok esetében fiziológiás só oldatot alkalmaztunk testtömegtől függő mennyiségben (1,5 ml/100g).

3.4.1.7. Anafilaktoid reakció

A vena jugularisba ültetett kanülön keresztül friss, szűrt, steril fiziológiás só oldatban feloldott tojásfehérjét (500 ml/1l só oldat) juttattunk be 1 ml/1 ttkg dózisban. A vérmintákat (0,4 ml/minta) a korábban ismertetett módon a beadás előtti percben, majd utána 5, 15, 30, 60, 90, 120 perccel vettük. A levett vér mennyiségét fiziológiás sóoldattal pótoltuk.

3.4.1.8. „Foot-shock” stressz (lábra mért áramütés)

A kísérlet során az állatokat egy 30x30x30 cm-es átlátszó dobozba tettük, melynek az alja rézrudakból áll. 5 percen keresztül minden 30. másodpercben az állatok elektromos sokkot kaptak (0,8 mA, 50Hz frekvencia, 1 másodpercig). A kontroll állatokat szintén ebbe a dobozba helyeztük, de elektromos sokkot nem kaptak. A stressz megkezdése előtti percben, majd utána 5, 15, 30, 60, 90, 120 perc múlva a juguláris vénába helyezett kanülön keresztül vérmintákat gyűjtöttünk (0,4 ml/minta).

3.4.1.9. Ulcerogén, hidegben történő immobilizáció

Az immobilizációs stressz során egy 4°C-os hideg helységben az állatok mind a négy végtagját rögzítettük. A vizsgálat során a juguláris vénából a 0., 30., 60., 120., 180., és 240. percben vért gyűjtöttünk (0,4 ml/minta). 4 órával a kísérlet kezdete után az állatok gyomrát kivettük, felnyitottuk és a kialakult fekélyeket megvizsgáltuk. Ebben a kísérletben a Brattleboro kontrollok mellett Wistar patkányokat is használtunk, hogy megvizsgáljuk, a heterozigóták részleges AVP hiányának hatásait is. A kontroll állatokat saját dobozukban tartottuk.

3.4.1.10. Mozgáskorlátozás (Restraint)

Ez a stressz a teljes immobilizációnál enyhébb mozgáskorlátozási forma. Az immobilizáció esetén az állat nem képes semmilyen mozgásra. Mozgáskorlátozás esetében az állatokat egy kónikusan szűkülő műanyag csőbe helyeztük 1 órára. A cső szűk végén az állat szabadon kapott levegőt, másik végét papírvattával szorosan kitömtük, így az állat megfordulni ugyan nem tudott, de kisebb mozgásokra képes volt. A stressz megkezdése előtt, majd a stressz időtartama alatt az 5., 15., 30., 60., és 120. percben a juguláris vénából vért vettünk (0,4 ml/minta). A kontroll állatokat saját dobozukban tartottuk.

3.4.1.11. Szociális „kudarc” teszt (Social defeat)

A teszt során az állatot egy nála nagyobb tömegű Brattleboro szülőpár (kicsinyek nélküli) ketrecébe helyezzük 10 percre. A hím állat megtámadta a nála kisebb betolakodót, azaz a tesztállatunkat. Sérülés esetén a kísérletet azonnal befejeztük, a tesztállatot eltávolítottuk és ezt az állatot kizártuk az értékelésből. A teszt megkezdése előtt majd, a

15., 30., 60., 120. percben a juguláris vénából vért vettünk (0,4 ml/minta). A kontroll állatokat saját dobozukban tartottuk.

3.4.1.12. Hipoglikémia

18 órás éheztetés után az állatoknál ip Actrapid (gyors hatású inzulin, 3NE/2ml/ ttkg; Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) injekcióval hipoglikémiát idéztünk elő, majd 1 óra múlva dekapitáltuk őket. A részleges AVP hiány befolyásoló hatását ebben a kísérletben +/+ állatok felhasználásával teszteltük. Az állatok vércukorszintjét egy kereskedelmi forgalomban kapható vércukorszint-mérő készülékkel mértük (D-Cont Personal, 77 Elektronika Kft., Budapest). A kontroll állatok éhezést követően ip fiziológiás sóoldatot kaptak.

3.4.1.13. Forszírozott úszás stressz (forced swim test (FST))

Egy 50 cm magas, 30 cm átmérőjű üveghengert 35 cm magasságig 24°C ± 1C° hőmérsékletű csapvízzel töltöttünk meg, majd az állatokat 10 percre a hengerbe helyeztük és a 0., 5., 15., 30., 60., 90. percben vérmintákat gyűjtöttünk. Ebben a kísérletben egy további kontroll csoportot is alkalmaztunk, hogy kizárjuk a perifériás AVP hiány hatásait. 10 nappal a kísérlet megkezdése előtt a di/di genotípusú állatok felének bőre alá dezmopresszinnel (DDAVP, V2 receptor agonista, Ferring Lieciva) feltöltött (200 µl; 1 mg/ml) Alzet ozmotikus minipumpát (1 µl/óra, 14 nap) helyeztünk. Az állatok másik fele (di/di és di/+ genotípus) áloperáción esett át. 8 nappal később az állatok jobb juguláris vénájába kanült helyeztünk, majd 2 nappal később elvégeztük az FST-t.

3.4.1.14. A CRH érzékenység vizsgálata

3.4.1.14.1. In vivo tesztelés

40 ng/kg CRH-t (Sigma) adtunk be vénásan a juguláris kanülön keresztül felnőtt hím Brattleboro patkányoknak és vérmintákat vettünk 0, 10, 20, 30, 45 és 60 perckor.

3.4.1.14.2. In vitro tesztelés: statikus inkubálás

Az adenohipofízis kivétele és feldarabolása utána a 3.3.4.-es pontban leírtaknak megfelelően jártunk el. 20 perc $5x10^{-8}$ M, illetve $5x10^{-11}$ M CRH stimulálás után a médiumból ACTH, míg a szövetdarabokból cAMP-t szinteket mértünk.

3.4.1.15. Mellékvese inkubálás

A mellékveséket a 3.3.4. pontban említett módon dolgoztuk fel. Az inkubálások során $10^{-12,}$ 10^{-11} és 10^{-10} M ACTH tartalmú DMEM-et alkalmaztunk.

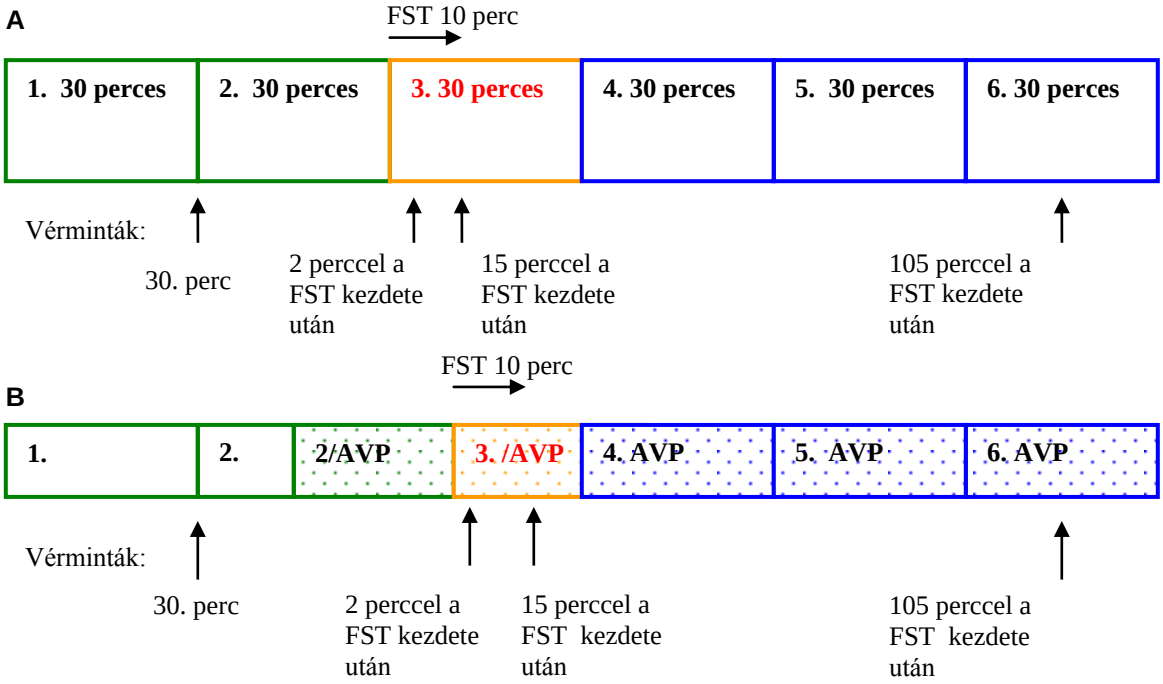
3.4.1.16 AVP retrodialízis a PVN-be [157]

Ezen kísérletek során a di/di állatainkat +/+ kontrollokhoz hasonlítottuk. A mikrodialízis módszere a félig áteresztő membránon való anyagáramlás (diffúzió) elvén alapul. A membránon keresztül történő diffúziót a membrán pórusnagysága, a két oldala közötti koncentráció gradiens, a hőmérséklet, és az áramoltatott mikrodialízis folyadék sebessége határozza meg. Abban az esetben, ha az extracelluláris térben egy anyag koncentrációja nagyobb, mint a dializáló folyadékban, akkor az adott anyag az extracelluláris tér felől a dializáló folyadék felé áramlik. Ha a koncentráció viszonyok fordítottak, akkor természetesen az agyagáramlás iránya is megfordul. Mivel a szöveti, extracelluláris terekben lévő anyagok koncentrációját dinamikus egyensúly jellemzi, melyet számtalan faktor befolyásol, így a koncentrációk megválasztása sarkalatos pontja a kísérletek megtervezésének [158]. A speciális U-alakú mikrodialízis mintavevők [158] beültetése a Brattleboro patkányok agyába mély anesztéziában történt, betartva a sterilitás szabályait. A patkányok fejéről a szőrt a célzott területen leborotváltuk, fertőtlenítettük, majd a koponyát sztereotaxiás készülékbe fogtuk (David Kopf Instruments; Tujunga CA). A fejbőr felnyitása után a területet a koponyacsontig megtisztítottuk, majd a célzott terület közelében egy-egy acél csavart rögzítettünk a falcsontban és a homlokcsontban. A két acélcsavar között egy elliptikus lyukat fúrtunk a koponyába a következő koordináták szerint: *a bregmá-tól hátra 1,5 mm, a középvonaltól (sutura saggitalis) laterálisan 1,6 mm* (jobb oldalra). Ezek után a mikrodialízis mintavevőt 10º szögben jobb oldalra megdöntve lassan, de folyamatosan (hogy a sinus saggitalis sérülését elkerüljük) a koponya felszínétől számított *8,8 mm mély*re süllyesztettük. A mikrodialízis mintavevőt a két acélcsavarhoz, valamint a koponyacsonthoz rögzítettük fényre keményedő fogászati cement segítségével (Vivadent Dual Cement, Schaan, Lichtenstein).

A jobb vena jugularisba a korábbiakban ismertetett módon kanült helyeztünk vérminták gyűjtése céljából. A kanült a behelyezés után heparinos, gentamicines (30.000 IU) fiziológiás só oldattal töltöttük fel.

A műtét után három nappal az állatokat előkészítettük a kísérlethez. A jugurális vénába ültetett kanült egy hosszú cső segítségével fecskendőhöz kapcsoltuk. A mikrodialízis mintavevőt pedig összekapcsoltuk a mintavételi Eppendorf csővel, illetve a mikrodializáló folyadékot áramoltató pumpával (11. ábra).

Az első kísérlet során vér és mikrodialízis mintákat gyűjtöttünk a 10 perces FST előtt, alatt és után a 11.A ábrának megfelelő időpontokban (vérminták), illetve időintervallumokban (a 100µl-es mikrodialízis mintákat 30 perc alatt gyűjtöttük). A második kísérletsorozat során vérminták gyűjtésére került sor a 11.B ábrán jelölt időpontokban, miközben az állatokba AVP (10 µg/ml; [deamino-Cys-Val-D-Arg]vasopressin; Sigma, Taufkirchen, Germany) vagy Ringer oldatot jutattunk retrodialízissel.



11. ábra
Forszírozott úszás tesztek és mintavételi protokoll

A. FST mintavételek. A nyilak a mikrodializátum és vérminták gyűjtésének időpontját jelölik,

B. AVP retrodialízis. A nyilak a vérminták gyűjtésének időpontját jelölik

3.4.1.17 Egyszeri morfin kezelés hatása [159]

Az állatokat a korábban említett módon a juguláris vénába helyezett kanüllel láttuk el a kísérlet megkezdése előtt 2 nappal. A kísérlet napján az állatok 10mg/kg/ 2 ml dózisban

egyszeri szubkután (sc) morfin injekciót kaptak. Az injekció előtt közvetlenül, majd az 5., 15., 30., 60., 90. percben az állatoktól vért vettünk (0,4 ml/minta).

3.4.2. Krónikus stressz kísérletek

3.4.2.1. Krónikus morfin kezelés utáni morfin megvonás hatása [159]

Korábbi tanulmányokat alapul véve [160, 161] az állatokat naponta kétszer, reggel hét és este hét órakor 16 egymást követő napon szubkután morfinnal oltottuk a következő séma szerint:

1. táblázat
A krónikus morfin kezelés protokollja

di/+ vagy di/di								
		Kontroll (KK)		Morfin (MK)		Morfin (MM)		
		7 óra	19 óra	7 óra	19 óra	7 óra	19 óra	
	1. nap	fiz. só.	fiz. só	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	
	2. nap	fiz. só.	fiz. só	20	20	20	20	
	3. nap	fiz. só.	fiz. só	30	30	30	30	
	4.-9. nap	fiz. só.	fiz. só	…+10 mg/kg/nap		…+10 mg/kg/nap		
	10.-16. nap	fiz. só.	fiz. só	100	100	100	100	
Dekapitáció	17. nap	fiz. só dekapitálás 11 órakor		fiz. só dekapitálás 11 órakor		100 mg dekapitálás 11 órakor		

Az állatok az első 10 napban, naponta 10 mg/kg-mal emelkedő dózisban kapták a morfint elérve így a 10. napra a 100 mg/kg-os dózist. A 11.-16. napig az állatok a megszokott időpontokban 100 mg/kg dózisban kaptak sc injekciót. A 17. napon, vagyis a dekapitáció reggelén az állatoktól a farokvénából (a lehető legkisebb stresszt okozva) vérmintát vettünk. Minden csoportban az állatokat az utolsó injekciót követő négy óra múlva, délelőtt 11 órakor dekapitáltuk. Utolsó injekcióként a morfin kezelt állatok fele reggel 7-kor a megszokott morfin helyett fiziológiás sóoldatot kapott (vagyis a morfin elvonás 16 órás; MK csoport), míg a csoport másik fele a szokott időben 100 mg/kg dózisban ismét morfint kapott (itt 4 órás a morfin elvonás; MM csoport).

3.4.2.2. 28 napos ismételt mozgáskorlátozás (repeated restraint) [162]

Az állatokat 28 egymást követő napon, naponta 1 órára egy kónikusan szűkülő műanyag csőbe helyeztük, az akut mozgáskorlátozás stressznél leírtak szerint. A stressz a

kísérlet időtartama alatt minden nap ugyan abban az időben következett be délelőtt 9 és 12 óra között. A 29. napon az állatok egyik felét kb. 24 órával az utolsó mozgáskorlátozás után dekapitáltuk, amihez kontrollként stresszeletlen állatok szolgáltak. Az akut reaktivitás vizsgálatához előzetesen stresszeletlen kontroll állatokat, illetve 28 mozgáskorlátozáson átesett állatokat a 29. napon egy 1 órás mozgáskorlátozás stressznek tettük ki és az 1 óra végén azonnal dekapitáltuk őket (29R).

2. táblázat

A 28 napos mozgáskorlátozásos kísérlet csoportjai

	di/+				di/di			
Krónikus kezelés	kontroll		28R		kontroll		28R	
Akut kezelés	kontroll	R	kontroll	R	kontroll	R	kontroll	R

Az akut stressznek ki nem tett állatokból a mellékveséket eltávolítottuk. Az egyik mellékvesét fixáltuk a mellékvese kéreg területének meghatározása céljából (lsd. 3.3.3.). A másikat feldaraboltuk, és in vitro szuperfúziós rendszerben megmértük az ACTH érzékenységét (3.3.5.).

3.4.2.3. Krónikus váltakozó, enyhe stressz [163]

A kísérlet 6 hete alatt naponta 2 alkalommal a felnőtt, hím Brattleboro patkányokat a következő enyhe stressz stimulusoknak tettük ki: *vízmegvonás, éheztetés, az izomerő mérésére használt „wire suspension"; a motoros koordinációt vizsgáló „rotarod"; emelt keresztpalló teszt, 30 illetve 60 perces mozgáskorlátozás farokvágással, forszírozott úszás, nedves, vagy megdöntött doboz, egerektől származó alom, a megszokottól elértő fényviszonyok alkalmazása, túlzsúfolás (3 állat egy dobozban) vagy egyedüli elhelyezés 2-48 órán keresztül*. Az utolsó héten követtük az állat magatartását (EPM, FST teszt). Az állatokat minimum 24 órával az utolsó stimulust követően dekapitáltuk. A szervsúlyok vizsgálata mellett vérmintákat gyűjtöttünk hormonszint mérés céljából, a hipofíziseken POMC mRNS szint meghatározást végeztünk.

3.4.2.4. Magatartás az emelt keresztpallón

Az akut stressznél leírt módon végeztük a vizsgálatot. Az állatokat 5 percre az EPM-re helyeztük, a viselkedésüket videóra rögzítettük és a magatartásukat a H77,

intézetünkben Haller József által fejlesztett elemző program segítségével később egy, a kezeléseket nem ismerő személy elemezte. A vizsgált paraméterek voltak: nyílt karban töltött idő (%), zárt kari belépések száma (mennyiség), mint a mozgékonyság mértéke, és a nyílt kari aktivitás (nyílt/(nyílt+zárt) kari belépések száma *100 (%)), ami a szorongás mozgékonyság független paramétere. Etológiailag fontos paraméterek közül a mosakodást (öngondozás az első mancsok segítségével, vagy a hátsó lábakkal vakarózás); a kockázatfelmérő magatartást (stretched attend postures, SAP; felderítő mozdulat, mikor az állat kinyúlik, majd visszahúzódik anélkül, hogy a végén valójában elmozdulna, a hátsó lába mindvégig a helyén marad) és a vertikális mozgás ágaskodó paraméterét elemeztük ki.

3.4.2.5. Magatartás az FST alatt

Az akut stressznél leírt módon folyt a vizsgálat. Az első nap az állatokat 15 percre helyeztük a vízzel telt hengerbe (depresszió-szerű állapot előidézése), de csak a másnapi, 5 perces úszást vettük videóra. Vizsgált paraméterek: lebegés (floating): nincs érzékelhető mozgás az egyensúlyozáson kívül; úszás (swimming): az állat mellső lábaival úszó mozdulatokat végez, de ez nem töri át a vízfelszínt; küzdés (struggling): az állat mellső lábaival áttöri a vízfelszínt; búvárkodás (diving): az állat feje a víz alá kerül.

3.4.3. Perinatális kor vizsgálata

3.4.3.1. Kispatkányok stressz reaktivitásának vizsgálata [164]

A szülőpárok kiválasztásakor a következő elveket alkalmaztuk: az anya mindig di/+, míg az apa di/di genotípusú. A megszülető utódok ezért vagy a di/+, vagy a di/di genotípust mutatták. Mivel az állatok vízfogyasztásának tesztelése csak az anyától való elválasztás (21 napos életkor) után lehetséges, e kor előtt csak az utólagos AVP szintmérés után sorolhattuk be a kölyköket a két genotípus valamelyikébe. Megjegyzendő még, hogy az almokban nagyobb számmal születtek di/+, mint di/di genotípusú állatok. A szülőket és a kölyköket specifikus patogén mentes (specific pathogen free, SPF) környezetben tartottuk kontrollált körülmények között (12 óra világos/12 óra sötét periódus, világos periódus kezdete reggel 7 óra; 23ºC± 1Cº; relatív páratartalom 50-70%). A kísérletek során az egy

alomban született összes kölyköt felhasználtuk, a nemek között különbséget nem tettünk. A következő vizsgálatokat végeztük:

a) Az egy alomba született kispatkányok felét 9 napos korukban 24 órára elválasztottuk az anyjuktól. A kispatkányok egy új, tiszta almot tartalmazó dobozba kerültek extra élelem, víz vagy melegítés nélkül. A kispatkányokat az elválasztási periódus után dekapitáltuk, a törzsvért K_2-EDTA tartalmú csövekbe fogtuk fel.

b) A 9 napos kispatkányokat az **a)** pontban leírtak szerint választottuk el az anyától, de a dekapitálás az elválasztás után 1, 4, 12 illetve 24 óra múlva történt.

c) 4, 9, 19 napos kispatkányokat választottunk el a fentebb leírt módon az anyjuktól és 24 óra múlva, vagyis 5, 10, 20 napos korukban dekapitáltuk őket.

d) A kísérlet során a kispatkányok stresszre adott válaszait vizsgáltuk. 10 napos korukban a kölyköket sc 1µl/ttg fentanil-fluanizon kombinációval kezeltük (Hypnorm, Janssen Pharmaceuticals, Grove, Oxford, UK; a fentanil, mint µ-ópiát receptor agonista gyakran alkalmazott szer a gyermeksebészetben). A kontroll állatok hasonló dózisban fiziológiás só oldatot kaptak. Az injekció után a kölykök visszakerültek az anya mellé, majd 60 perc elteltével az állatokat dekapitáltuk és a törzsvért csövekbe gyűjtöttük, az agyakat szárazjégen azonnal fagyasztottuk [165].

e) 5, 10, 20 napos korukban a kispatkányokat sc 1µl/ttg fentanil-fluanizon kombinációval kezeltük a **d)** pontban leírtak szerint. A kontroll állatok hasonló dózisban fiziológiás só oldatot kaptak. Az injekció után a kölykök visszakerültek az anya mellé, majd 30 perc elteltével az állatokat dekapitáltuk és a törzsvért csövekbe gyűjtöttük, az agyakat szárazjégen azonnal fagyasztottuk.

f) 10 napos kölykök mellékveséjét a 3.3.4. pontban leírtaknak megfelelően kezeltük. 10^{-13} M, 10^{-12} M és 10^{-11} M ACTH adására került sor (lsd. még 3.4.1.14. és 3.4.1.15.).

g) A 10 napos kispatkányoknál egyszeri 250 ng/ttg dózisú β1-24-kortikotropin (Synacthen, CIBA, Baden, Switzerland) sc injekciót alkalmaztunk. Az injekció után a kispatkányokat visszahelyeztük az anyjuk alá, majd 60 perc elteltével dekapitáltuk őket, a törzsvért hormonmérés céljából összegyűjtöttük. A kísérlet során használt dózis beállítása előzetes kísérleteink alapján történt. 2, 10, 50 ng/ttg

dózisú Synacthen nem okozott szignifikáns változást a kispatkányok ACTH szintjében 15 perc elteltével az injekció után. Ugyanakkor a 250 ng/ttg dózis után 15 perccel 2,5-szeres, 30 perccel később 2-szeres eltérés tapasztalható, majd 60 perc után az ACTH szint az alap értékekre csökken vissza. Hasonló változásokat figyelhettünk meg a kortikoszteron szintek esetén, ahol 15 perc után 1,6-szeres, 30 perc után 2,3-szeres, míg 60 perccel az injekció után 3-szoros különbség mutatkozik az alap állapotban mért kortikoszteron értékekhez képest.

3.4.3.2. Perinatális kor: Nemek közötti különbségek [166]

a) 9 napos kispatkányokat a korábbiakban ismertetett módon elválasztottunk az anyjuktól, majd 24 órával később 10 napos korukban dekapitáltuk őket. A hím és nőstény kispatkányokból származó mintákat külön kezeltük.

b) 10 napos kispatkányokat éter stressznek tettünk ki a következők szerint: A *kontroll* csoport állatait (mindkét nemből) az anyától való elvétel után rögtön dekapitáltuk. Az *egyszeres éter stresszelt* csoport kölykeit éterrel átitatott vattát tartalmazó 50ml-es centrifuga csőbe helyeztük 3 percre, majd 10 perccel a kísérlet kezdete után dekapitáltuk őket (3 perc stressz + 7 perc várakozás). A *kétszeres éter stresszelt* csoport állatait az első 3 perces stressz után az anyától elválasztva tartottuk, majd 60 perccel az első éter stressz megkezdése után újból 3 percre a csőbe kerültek. A kísérlet kezdetétől számított 70. percben dekapitáltuk őket.

3.5. Statisztika

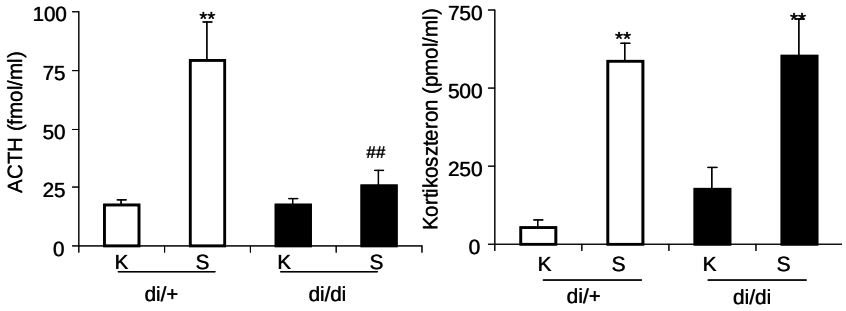
Az eredményeinket az átlag ± SEM feltüntetésével ábrázoltuk. Adatainkat az Statistica programcsomag (Tulsa, OK, USA) ANOVA/MANOVA moduljával értékeltük ki. Azoknál az eseteknél, ahol időpontok szerinti ismételt vérvétel történt „repeated measure” ANOVA analízist végeztünk (az idő hatása). Azoknál a kísérleteknél ahol egyetlen szempont szerinti összehasonlítás történt (pl. genotípus) az „egyutas” („one-way”) ANOVA-t használtunk. Több szempont szerinti összehasonlítás esetén a megfelelő ANOVA modul került kiválasztásra. Azokban az esetekben ahol elvégezhetőek voltak a „post-hoc” tesztek a Newman-Keuls módszert használtuk. (Ettől elérő eseteket a megfelelő kísérlet eredményeinél külön jelöltem.) A szignifikancia szintjét p=0,05-nél állapítottuk meg. A szövegben a fő hatások kerültek feltüntetésre, míg az ábrákon a „post-hoc” összehasonlítások eredménye szerepel (eltérő esetben az ábra-aláírásban jeleztük).

4. Eredmények

4.1. A felnőtt Brattleboro patkányok akut stresszreaktivitása

4.1.1. Újdonság stressz (Novelty stress)

Nyugalmi állapotban a hormonszintek között nincsen különbég a két genotípusban (12. ábra). AVP jelenlétében (di/+) mind az ACTH mind a kortikoszteron plazmaszintek megemelkednek a 10 perces újdonság stressz hatására (stressz hatás mindkét hormonra: $p<0,01$). Ezzel ellentétesen AVP hiányában („di/di") elmarad az ACTH szintek emelkedése (stressz és genotípus interakció: $p<0,05$). A stressz indukálta kortikoszteron szint emelkedés mindkét genotípusban azonos (nincs interakció).



12. ábra
Újdonság stressz. K=Kontroll, S=Stresszelt; ** $p< 0,01$ eltérés a kontrollhoz képest, ## $p<0,01$ eltérés a di/+-hoz képest

4.1.2. Szociális elkerülés (Social avoidence)

A 8 perces szociális elkerülés stressz hatására megemelkedő ACTH és kortikoszteron szintek nem különböztek a két genotípus között (3. Táblázat; stressz hatás: $p<0,05$).

4.1.3. Emelt keresztpalló teszt (EPM)

Az EPM kiváltotta ACTH szint emelkedés szignifikánsan alacsonyabb volt a „di/di"-s állatok esetében (3. Táblázat; stressz hatás: $p<0,05$; stressz és genotípus interakció: $p<0,05$). A kortikoszetron szintek esetén a genotípusnak nem volt hatása (stressz hatás: $p<0,05$).

3. Táblázat

Az ACTH és kortikoszteron szintek a stressz utáni egyetlen időpontban.

*p<0.05; **p<0.01 szignifikáns eltérés a kontroll csoporthoz képest; #p<0.05 szignifikáns eltérés a di/+ patkányokhoz képest

ACTH (fmol/ml)	Alap hormonszintek	Szociális elkerülés	Emelt keresztpalló teszt	LPS stressz	Éter stressz
di/+	23,9 ± 3,0 (n=136)	110,5 ± 17,6 (n=18)	209,2 ± 31,4 (n=6)	295,2 ± 106,1* (n=10)	1027,6 ± 75,8** (n=19)
di/di	21,0 ± 1,5 (n=135)	83,5 ± 22,7 (n=9)	121,6 ± 20,4# (n=14)	192,9 ± 98,7 (n=10)	999,8 ± 89,3** (n=16)

Kortiko-szteron (pmol/ml)	Alap hormonszintek	Szociális elkerülés	Emelt keresztpalló teszt	LPS stressz	Éter stressz
di/+	137,4 ± 17,6 (n=142)	339,5 ± 76,5 (n=7)	499,2 ± 61,4 (n=6)	962,9 ± 201,4** (n=10)	721,1 ± 64,1** (n=19)
di/di	175,2 ± 13,7 (n=140)	326,0 ± 50,4 (n=5)	534,7 ± 35,6 (n=14)	864,8 ± 270,5** (n=10)	791,8± 73,8** (n=16)

4.1.4. Lipopoliszacharid (LPS) injekció

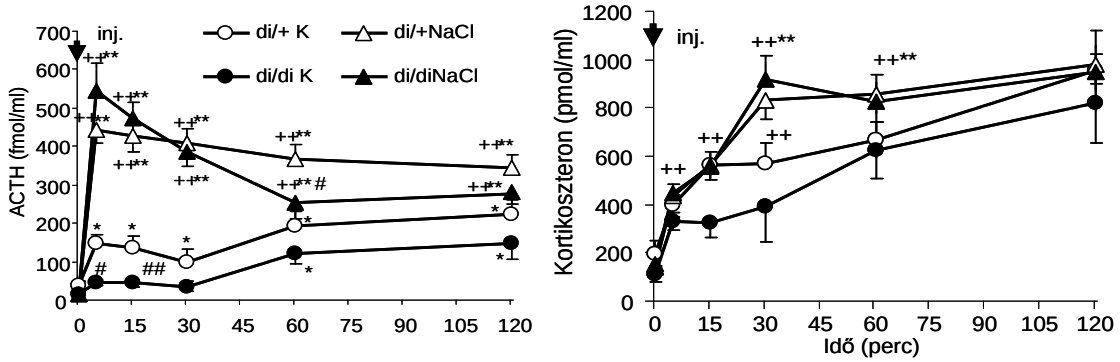
Egy órával az ip LPS injekció után szignifikáns ACTH és kortikoszteron szint emelkedést tapasztaltunk a di/+-os állatok esetében (stressz hatás mindkét hormonra: $p<0,01$). A di/di-s állatok esetében az ACTH szintje nem emelkedett (3. Táblázat; stressz és genotípus interakciója az ACTH esetén: $p<0,05$).

4.1.5. Éter inhaláció

10 perccel a stressz kezdte után mindkét genotípusban szignifikáns ACTH és a kortikoszteron szint emelkedést mértünk (3. Táblázat; stressz hatás: $p<0,01$; nincs genotípus hatás és interakció sem).

4.1.6. Hipertóniás só oldat injekciója

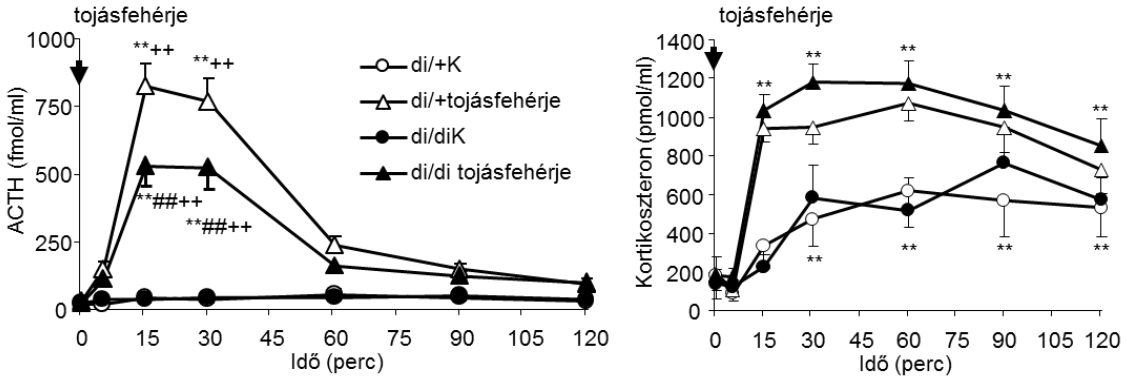
Az ip injekcióban alkalmazott hipertóniás só oldat mindkét genotípusban ACTH szint emelkedést váltott ki (13.A ábra; stressz hatás: p<0,01). Ha megfigyeljük a hormonszintek változásának időbeli lefutását láthatjuk, hogy mindkét genotípusban gyors ACTH válasz alakult ki az injekció hatására és emelkedett hormonszinteket figyelhettünk meg 2 órával az injekció után is (idő hatás: p<0,01). AVP hiányos állatokban a „60 perces" minta mutat csak eltérést a di/+ csoporthoz képest (genotípus hatás és stressz, idő, genotípus interakció: p<0,05). A kortikoszteron szintek esetében fokozatos szintbeli emelkedést figyeltünk meg (0. perctől a 30. percig), és ez az emelkedett szint marad meg a kísérlet végéig (stressz és idő hatás: p<0,01). A kortikoszteron választ az állatok genotípusa nem befolyásolta.



13. ábra
Hipertóniás só oldat
++ p< 0,01 eltérés a 0. perctől, * p<0,05 ** p<0,01 eltérés a kontroll csoporttól,
# p< 0,05 ## p< 0,01 eltérés a di/+-hoz képest

4.1.7. Anafilaktoid reakció

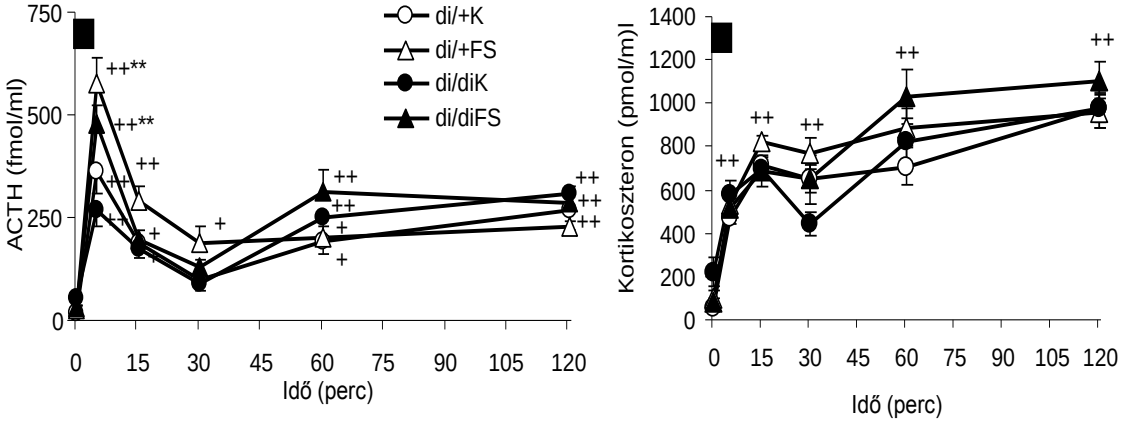
A vena jugularisba injektált tojásfehérje mindkét genotípusban igen erőteljes ACTH és kortikoszteron szint emelkedést váltott ki (14. ábra; stressz és idő hatás: p<0,01). Az ACTH csúcs a 15. és 30. perc között alakult ki. Ezt követően a di/+ állatoknál a 90. perc környékén, a „di/di" állatoknál már a 60. percre a hormon szintje az alapszint közelébe csökkent. AVP hiányában szignifikánsan kisebb az ACTH szint emelkedése (genotípus és interakciói hatása: p<0,05). Mindkét csoportban gyors kortikoszteron szint emelkedést figyeltünk meg (stressz és idő hatás: p<0,01). A kortikoszteron szintek esetében nincs genotípus hatás.



14. ábra
Anafilaktoid reakció
++ p< 0,01 eltérés a 0. perctől, **p<0,01 eltérés a kontroll csoporttól,
p< 0,01 eltérés a di/+-hoz képest

4.1.8. „Foot-shock" stressz

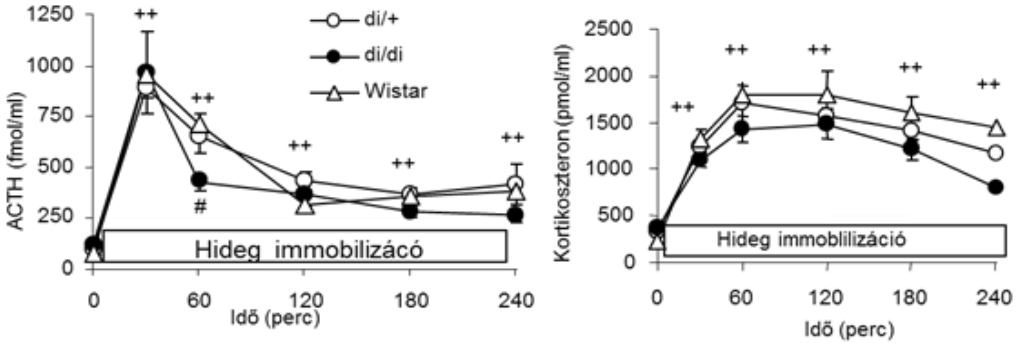
Az állatok behelyezése a „foot-shock" dobozba szignifikánsan, de genotípustól független módon emelte mind az ACTH, mind a kortikoszteron szinteket (di/+ K és di/di K csoport) (15. ábra; idő hatás: p<0,01). Egyszeri elektromos sokk képes volt tovább emelni az ACTH szintjét (stressz hatás: p<0,05), míg a kortikoszteron szintek esetén csak erre utaló tendenciát láthattunk (stressz hatás: p=0,08). Egyik hormon esetén se volt hatása a genotípusnak.



15. ábra
Foot-shock
+p<0,05 ++ p< 0,01 eltérés a 0. perctől, ** p<0,01 eltérés a kontroll csoporttól

4.1.9. Ulcerogén, hidegben történő immobilizáció

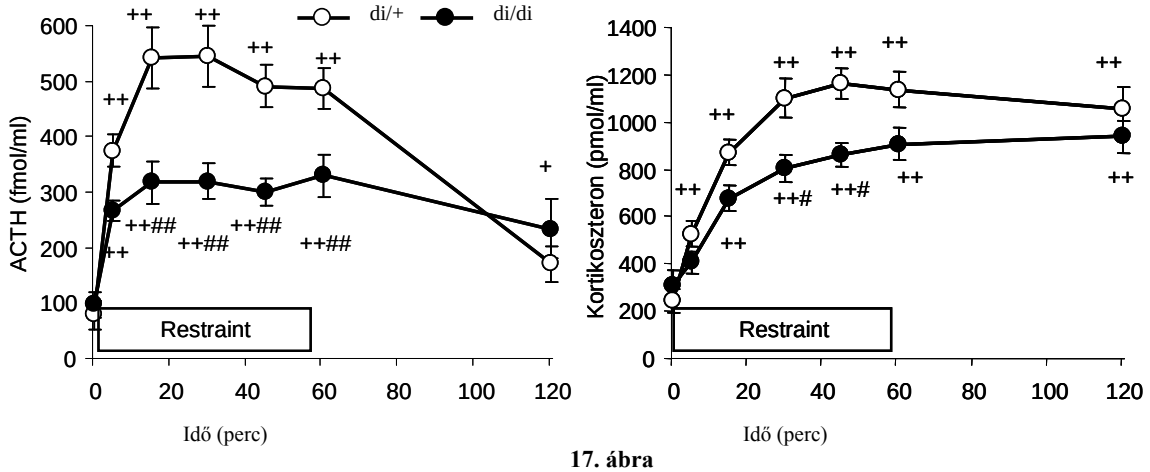
A kísérletben di/+ és di/di állatok mellett Wistar kontrollokat is használtunk (16. ábra). A stressz mindhárom csoportban erőteljes ACTH és kortikoszteron szint emelkedést váltott ki (idő hatás: p<0,01). A di/+ genotípusú állatokban és a Wistar patkányok esetében hasonló volt az emelkedés mértéke, míg a di/di állatok csökkent ACTH szint emelkedést mutattak a 60. percben (idő és csoport interakció: p<0,01). A kortikoszteron szintek esetén nem volt különbség a csoportok között.



16. ábra
Ulcerogén hideg immobilizációs stressz
++ p <0,01 eltérés a 0. perchez képest, # p<0,05 eltérés a di/+ csoporthoz képest

4.1.10. Mozgáskorlátozás (Restraint)

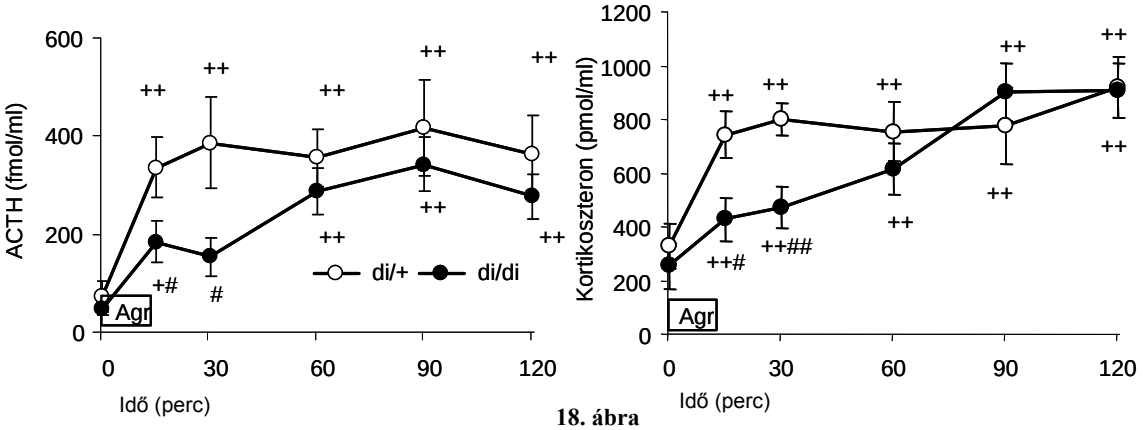
A mozgáskorlátozás kiváltotta ACTH szint emelkedés a csúcsát 15 percen belül érte el és a hormonszint a csúcs közelében maradt a stressz végéig, majd a kísérlet végére (120. perc) az alapszint közelébe esett vissza (17. ábra; idő hatás: p<0,01). A kortikoszteron szintek esetében fokozatos emelkedést figyeltük meg a stressz 60 perce alatt (idő hatás: p<0,01). A kortikoszteron csúcs hozzávetőlegesen a stressz 30. percére alakult ki, majd a kísérlet végéig tartósan magas szinten maradt. AVP hiányában a stressz által kiváltott ACTH és kortikoszteron szint emelkedés is csökkent mértékű volt (genotípus hatás és idő-genotípus interakció: p<0,01).



17. ábra
Restrain teszt
+ p< 0,05 ++ p< 0,01 eltérés a 0. perchez képest;
# p< 0,05 ## p< 0,01 eltérés a di/+ csoporthoz képest

4.1.11. Szociális „kudarc” teszt (Social defeat)

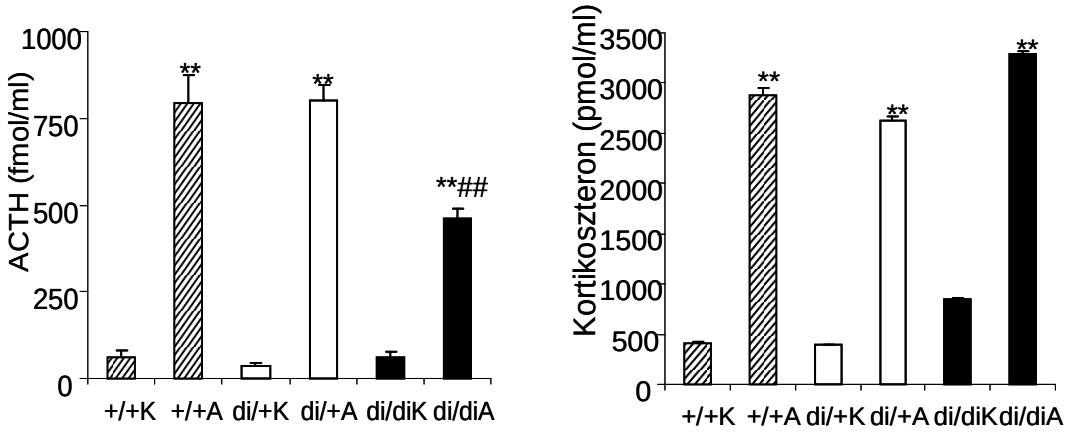
A 10 perces agresszív interakció elég erős stimulus volt ahhoz, hogy szignifikánsan emelkedett és hosszan tartó ACTH és kortikoszteron szint változásokat produkáljon (18. ábra; idő hatás: p<0,01). AVP hiányában csökkent mértékű a két hormon szintjének emelkedése (idő-genotípus interakció: p<0,01).



18. ábra
Szociális kudarc teszt
Agr- az agresszív kontaktus 10 perce; + p< 0,05 ++ p< 0,01 eltérés a 0. perchez képest; #
p< 0,05 ## p< 0,01 eltérés a di/+ csoporthoz képest

4.1.12. Hipoglikémia

A 18 órás éhezést követően mindhárom genotípusban hasonlóak voltak a vércukorszintek (+/+: 4,67±0,1 mmol/l; di/+: 4,62±0,2 mmol/l; di/di: 4,45±0,2 mmol/l; 19. ábra). Intraperitoneálisan alkalmazott Actrapid injekció szignifikánsan csökkentette mindhárom genotípusban a vércukorszintet (+/+: 2,48±0,05 mmol/l; di/+: 2,29±0,05 mmol/l; di/di: 2,00±0,1 mmol/l). Legnagyobb mértékű változást a di/di csoportban figyeltünk meg (genotípus hatása: $p<0,05$). A vércukorszint ilyen erőteljes csökkenése hatalmas ACTH és kortikoszteron szint emelkedést váltott ki (19. ábra; stressz hatás: $p<0,01$). AVP hiányában az ACTH szint emelkedése kevésbé kifejezett a +/+ és di/+ genotípusokhoz képest, ugyanakkor utóbbi két csoport között eltérést nem tapasztaltunk (genotípus hatás és stessz-genotípus interakció: $p<0,01$). A kortikoszteron szintek vonatkozásában nem tapasztaltunk genotípusok közötti különbséget.

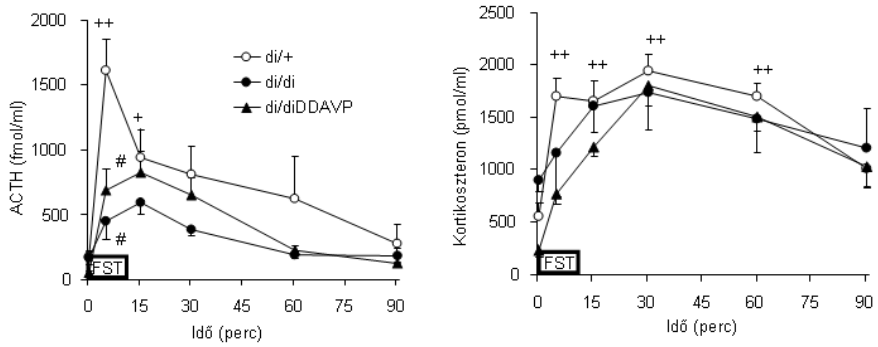


19. ábra
Hipoglikémia stressz
** $p< 0,01$ eltérés a kontroll csoporthoz képest;
$p< 0,01$ eltérés a +/+ és a di/+ csoporthoz képest, K=kontroll, A= Actrapid kezelt

4.1.13. Forszírozott úszás stressz (FST)

Az ozmotikus minipumpa útján visszapótolt AVP (DDAVP, dezmopresszin) szignifikánsan csökkentette a di/di genotípusú állatok vízfelvételét (di/di: 103,9±8,3 ml/ nap; di/di DDAVP: 32,6±1,9 ml/ nap). Az FST szignifikáns ACTH és kortikoszteron szint emelkedést váltott ki mindhárom csoportban (20. ábra; idő hatás: $p<0,01$). A centrális AVP

szerepét látszik bizonyítani az, hogy hiányában az ACTH szintje alacsonyabb emelkedést mutatott, illetve a perifériás AVP visszahelyezés a csökkent ACTH választ nem volt képes a normális szintre emelni (csoport hatás és idő-csoport interakció: $p<0,05$). A kortikoszteron szintek esetében szignifikáns különbséget nem figyeltünk meg a csoportok között.

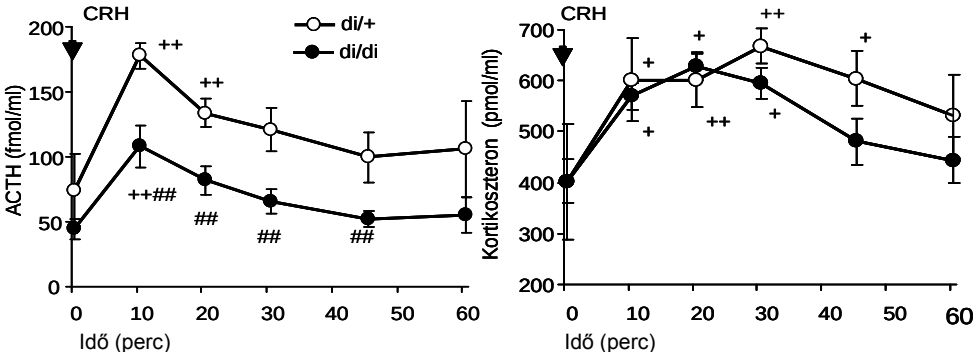


20. ábra
FST hatása. + p< 0,05 ++ p< 0,01 eltérés a 0. perchez képest;
# p< 0,05 eltérés a di/+ csoporthoz képest; DDAVP: dezmopresszin kezelt; FS: az úszás 10 perce

4.1.14. A hipofízis elülső lebeny CRH érzékenység vizsgálata

4.1.14.1. In vivo tesztelés

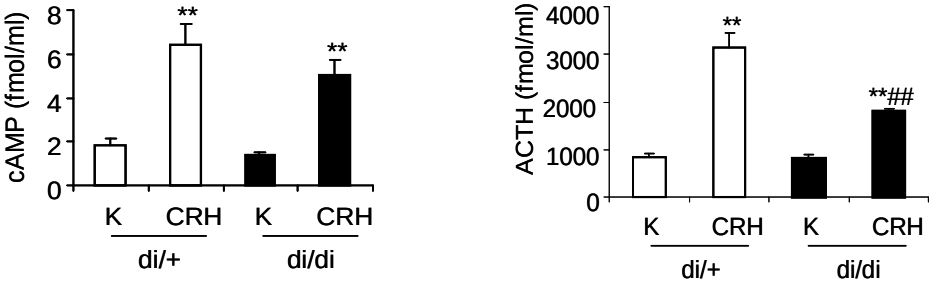
A *in vivo* CRH stimulus (40 ng/kg iv) szignifikáns ACTH és kortikoszteron szekréciót okozott (21. ábra; stimulus hatás: $p<0,01$). A di/di állatok ACTH termelése alacsonyabb, mint di/+-os társaiké (genotípus hatás: $p<0,01$), ugyanakkor a kortikoszteron szintek között eltérést nem tapasztalatunk.



21. ábra
CRH érzékenység in vivo vizsgálata Brattleboro patkányokban
+p<0,05, ++p<0,01 a 0 perchez képest; ##p<0,01 a di/+-hoz képest

4.1.14.2. In vitro tesztelés: statikus inkubálás

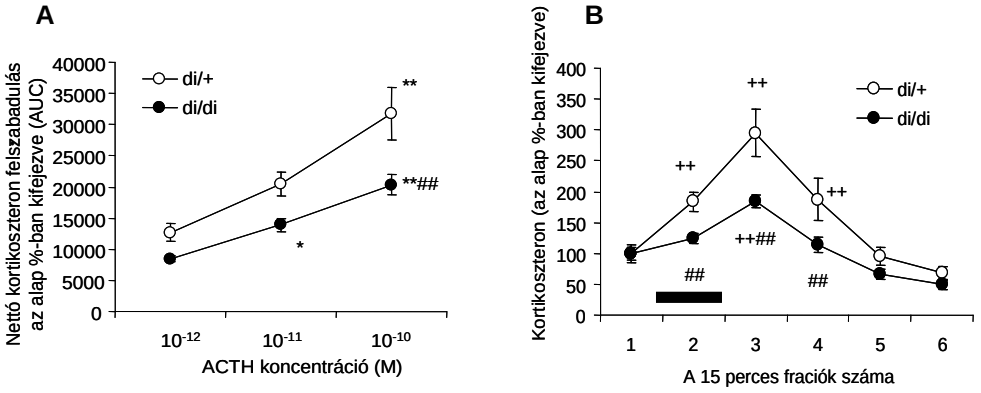
Amikor az adenohipofíziseket CRH tartalmú médiumban *in vitro* rendszerben inkubáltuk, szignifikánsan megemelkedett a szervdarabok cAMP és ACTH termelődése (22. ábra; stimulus hatás: p<0,01). AVP hiányában (di/di) az adenohipofízisek ACTH termelése szignifikánsan alacsonyabb volt (genotípus hatás: p<0,01), míg hasonló különbséget a cAMP szintek esetén ne figyelhettünk meg.



22. ábra
CRH érzékenység in vitro vizsgálata cAMP és ACTH méréssel adenohipofízis darabkákon
**p<0,01 a kontroll kezeléshez képest; ##p<0,01 a di/+-hoz képest

4.1.15. Mellékvese inkubálás

A mellékvesék kortikoszteron termelését az ACTH dózisfüggő mértékben emelte (23. ábra; dózis hatás: p<0,01). AVP hiányában a di/di genotípusú állatok mellékveséinek ACTH érzékenysége szignifikánsan alacsonyabb volt, mint di/+ genotípusú társaiké, amit a vizsgált teljes periódus alatt kibocsájtott összes ACTH mennyiségével jellemezhettünk (AUC; 23.A ábra; genotípus hatás: p<0,01).



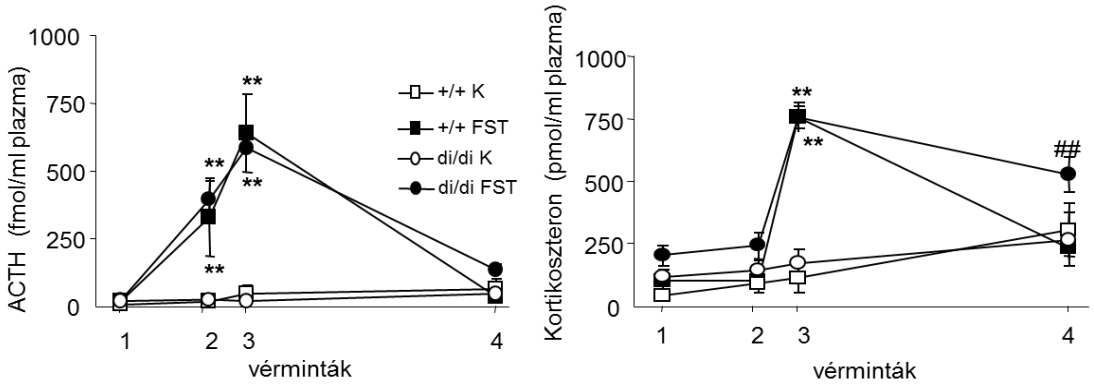
23. ábra
A mellékvese inkubálás eredményei
A: ** p< 0,01 * p<0,05 szignifikáns eltérés az 10^{-12} M ACTH-hoz képest; ## p< 0,01 szignifikáns eltérés a di/+ csoporthoz képest;
B: ++ p< 0,01 szignifikáns eltérés az első 15 perces frakcióhoz képest; ## p< 0,01 szignifikáns eltérés a di/+ csoporthoz képest

10^{-12} M ACTH tartalmú médium jelenlétében történő inkubálás időfüggő módon emeli a szervdarabok kortikoszteron termelését (idő hatás: p<0,01), de AVP hiányában szignifikánsan alacsonyabb mértékű ez az emelkedés (23. B ábra; genotípus hatás és idő-genotípus interakció: p<0,01).

4.1.16. A vazopresszin hiányos állatok forszírozott úszástesztben mutatott stressz reaktivitása AVP retrodialízises kísérletben

4.1.16.1. ACTH és kortikoszteron szintek változása

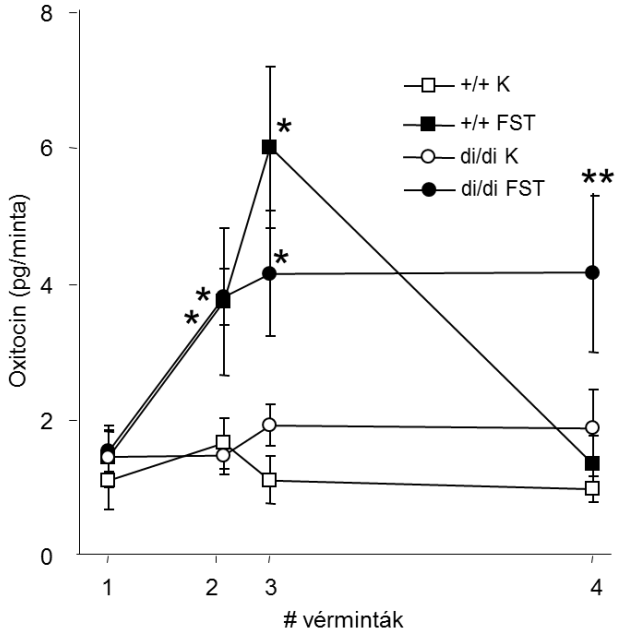
FST stressz hatására mindkét genotípusban megfigyelhető az ACTH és kortikoszteron szintek megemelkedése (24. ábra; stressz és idő valamint interakciójuk hatása: p<0,01). ACTH esetében már a második vérminta ACTH tartalma magasabb volt, és a harmadik vérvételre az ACTH szintje tovább emelkedett, de a genotípusnak nem volt az emelkedésre hatása. Ugyanakkor a kortikoszteron esetében csak a 3. vérminta esetében volt emelkedett a hormonszint, majd a negyedik minta hormontartalma már csökkent és ekkor a két genotípus között szignifikáns eltérés volt megfigyelhető (genotípus hatás: p=0,01).



24. ábra
FST hatása a plazma ACTH és kortikoszteron szintjére
** p<0,01 szignifikáns eltérés az első mintától; ## p<0,01 eltérés a +/+ genotípushoz képest.
1. minta 30 perccel a tesz előtt, 2. minta 2 perccel a 10 perces FST kezdete után,
3. minta 15 perccel a teszt megkezdése után, 4. minta 105 perccel a teszt megkezdése után lett véve

4.1.16.2. Oxitocin

A plazma OT szintjei hasonló változásokat mutattak a +/+ és di/di állatokban a 10 perces FST hatására (25. ábra; stressz és idő hatása: p<0,01). Azonban a 105. percben szignifikáns eltérést tapasztalhattunk a két genotípus között, a di/di állatok esetén magasabb OT szintekkel (stressz-idő-genotípus interakció: p=0,01).

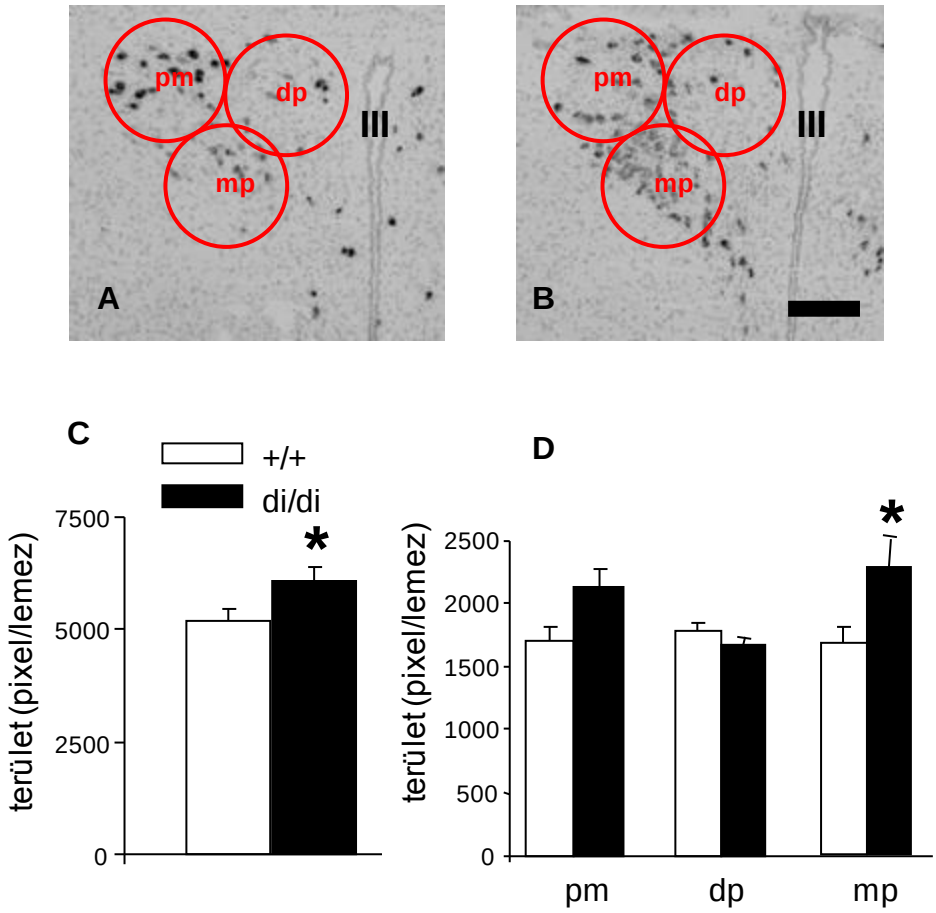


25. ábra

A plazma oxitocin szintjének változása 10 perc FST hatására.*p<0,05 **p<0,01 szignifikáns eltérés az első mintától. 1. minta 30 perccel a tesz előtt, 2. minta 2 perccel a 10 perces FST kezdete után, 3. minta 15 perccel a teszt megkezdése után, 4. minta 105 perccel a teszt megkezdése után lett véve

4.1.16.3. Oxitocin és CRH mRNS in situ hibridizáció a PVN-ben

A PVN egész területének vizsgálata során az AVP hiányos állatokban emelkedett OT mRNS szinteket mértünk (26. ábra; genotípus hatás: p<0,05). Ha az elemzést lebontottuk a PVN alrégióira, akkor kiderült, hogy a különbség a mediális parvocelluláris területnek volt köszönhető, míg a PVN többi vizsgált területén szignifikáns eltéréseket nem tapasztaltunk, bár tendencia volt megfigyelhető az emelkedett OT mRNS szintre a hátsó (posterior) magnocelluláris területeken is (26.D ábra; p=0,08). CRH mRNS esetében különbségeket nem mértünk a két genotípus között (+/+: 78,7±11,4 pixel/sejt; di/di: 89,9±2,7 pixel/sejt).



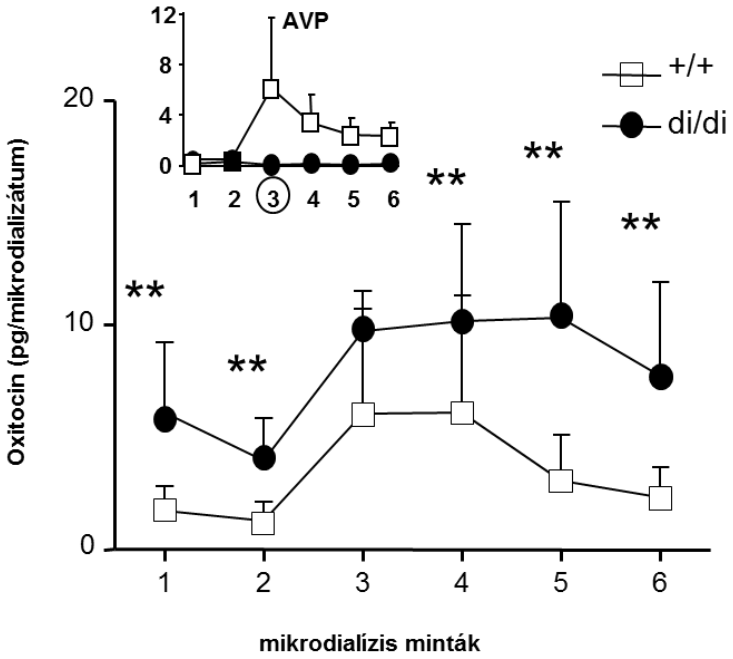
26. ábra

Oxitocin mRNS *in situ* hibridzáció a PVN ben

A: Oxitocin mRNS tartalmú sejtek a +/+ genotípusú állatokban; B: Oxitocin mRNS tartalmú sejtek a di/di genotípusú állatokban; C: Az oxitocin szignál összértéke a PVN-ben; D: A PVN egyes területein mért oxitocin szignál mértéke. pm: posterior magnocelluláris terület, dp: dorzális parvocelluláris terület, mp: mediális parvocelluláris terület. *p<0,05 eltérés a +/+ genotípushoz képest

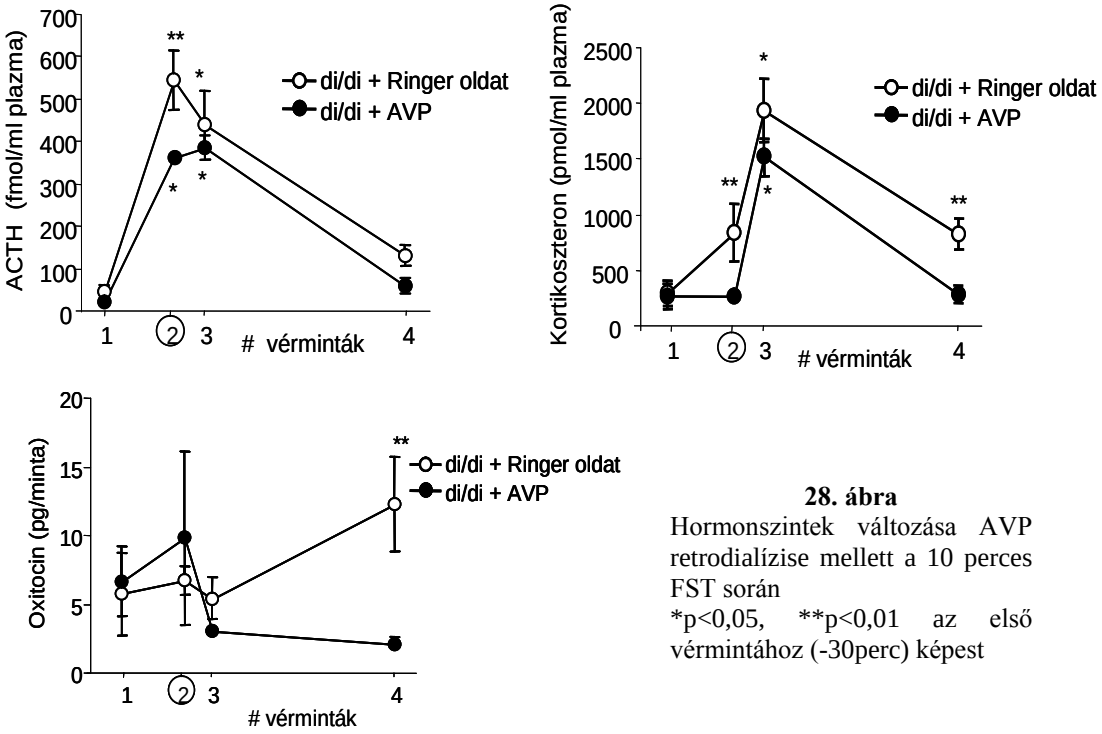
4.1.16.4. Az FST során a PVN-ből nyert mikrodialízis minták elemzése

Az FST előtt 60-30, 30-0 perccel, illetve közvetlenül a teszt megkezdése után (3. minta: 0-30 perc), majd 30-60, 60-90, 90-120 percekben gyűjtöttünk mikrodialízis mintákat, mindegyiket 30 percen keresztül (27.A ábra és 3.4.1.16.). Az AVP hiányos állatok mikrodializátumaiban szignifikánsan magasabb OT szinteket lehetett kimutatni egy időintervallum kivételével (genotípus hatás: $p<0,01$). Az AVP szintek vizsgálata során megfigyelhettük, hogy az FST hatására (3. minta) az AVP szintje emelkedik a kontroll +/+ állatokban (27.B ábra). Várakozásainknak megfelelően, a di/di genotípusú állatok mintáiban az AVP mennyisége a detektálhatósági határ alatt volt.



27. ábra
Az FST során gyűjtött mikrodialízis minták OT és AVP tartalma
**p<0,01 eltérés a +/+ genotípushoz képest; Fisher's LSD *post hoc* test

4.1.16.5. Szintetikus AVP retrodialízis hatásának vizsgálata FST alatt

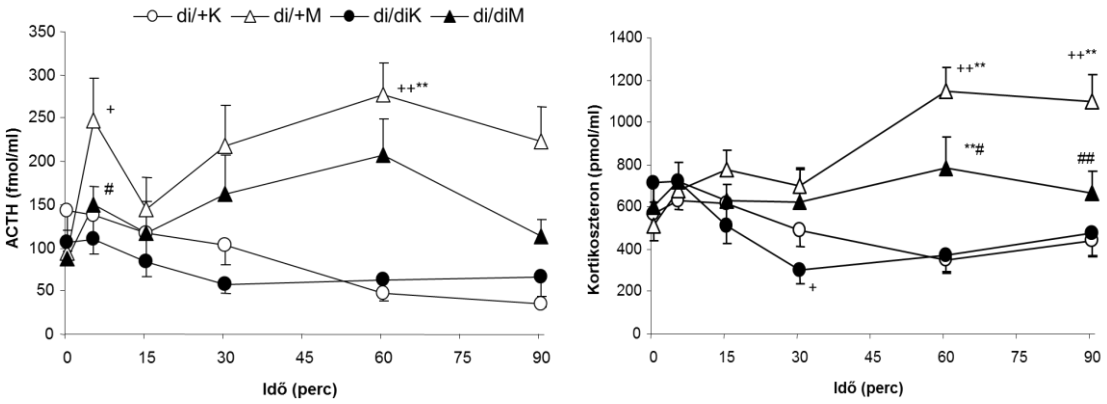


28. ábra
Hormonszintek változása AVP retrodialízise mellett a 10 perces FST során
*p<0,05, **p<0,01 az első vérmintához (-30perc) képest

Azon állatokhoz képest, amelyek csak Ringer oldatot kaptak (AVP vivőanyaga, az intracerebroventrikuláris folyadék összetételének megfelelő oldat) a PVN-be az AVP kezelés jelentősen csökkentette az FST hatására kialakuló ACTH és kortikoszteron szint emelkedéseket (28. ábra; kezelés és idő hatás: p=0,01). Ezen túlmenően az AVP kezelés a 105. percben mérhető plazma OT szinteket is jelentősen csökkenteni volt képes (kezelés hatás és kezelés-idő interakció: p<0,05).

4.1.17. Vazopresszin hiányos állatok vizsgálata akut morfin kezelés után

Egyszeri, akut morfin injekció jellegzetes bifázisos módon befolyásolta mind az ACTH, mind a kortikoszteron szintek változását (29. ábra; kezelés hatás és kezelés-idő interakció: p<0,01). ACTH esetében már az injekció utáni 5. percben szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető mindkét genotípusban. A gyors emelkedést gyors csökkenés követte (15. perc), majd a hormon szintje újra (a 60. percig) folyamatosan emelkedő tendenciát mutatott. A kortikoszteron szintek változása követte az ACTH szinteket, bár kisebb fluktuációkat mutatott. AVP hiányában a di/di-s állatokban mindkét hormon szintje kis mértékben ugyan, mégis szignifikánsan alacsonyabb volt (genotípus hatás p=0,05).

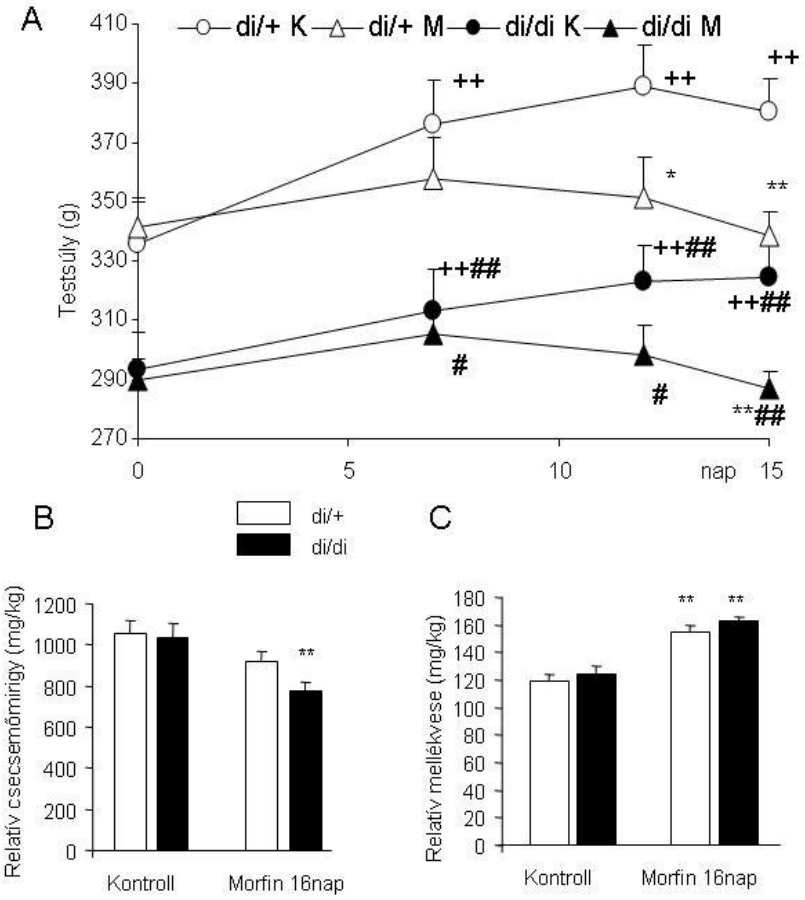


29. ábra
Egyszeri morfin kezelés hatása az ACTH és kortikoszteron szintekre
+p<0,05 ++p<0,01 eltérés a 0. perchez képest; **p<0,01 eltérés a fiziológiás sóval kezelt állatokhoz képest;
#p<0,05 ##p<0,01 eltérés a di/+ csoporthoz képest

4.2. A vazopresszin hiányos állatok krónikus stresszhelyzetekben mutatott stresszválaszának vizsgálata

4.2.1. Krónikus morfin kezelés utáni drogmegvonás hatása

4.2.1.1. Szomatikus változások



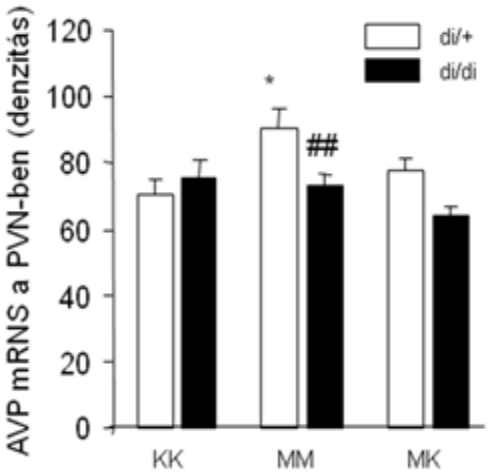
30. ábra
A krónikus morfin kezelés kiváltotta szomatikus változások
n=18-41; ++p<0,01 eltérés a kezdő testsúlyhoz képest; *p<0,05 **p<0,01 eltérés a fiziológiás sóval kezelt ugyanolyan genotípusú állatokhoz képest; #p<0,05 ##p<0,01 eltérés a di/+ csoporthoz képest.
A.=testsúlyváltozások, B= csecsemőmirigysúly változások, C=mellékvesesúly változások

Bár a di/di genotípusú állatok kiindulási testsúlya alacsonyabb volt, a fiziológiás sóoldatot kapott kontroll állatok természetesen elvárt testsúly emelkedése mindkét genotípus esetén kialakult (30.A ábra; idő hatás: p<0,01). A krónikus morfin kezelést

kapott állatok testsúlya - függetlenül az állat genotípusától - a kísérlet alatt csökkent (kezelés-idő interakció: p<0,01). Mindkét genotípusban a krónikus morfin kezelés hatására a relatív csecsemőmirigy (timusz) súlyok csökkentek (30.B ábra; kezelés hatása: p<0,01), míg a mellékvesék relatív súlya pedig nőtt (30.C ábra; kezelés hatása: p<0,01). A vazopresszin hiányos állatokban a relatív timusz súly csökkenése kifejezettebb volt.

4.2.1.2. AVP mRNS szintek változása a PVN-ben

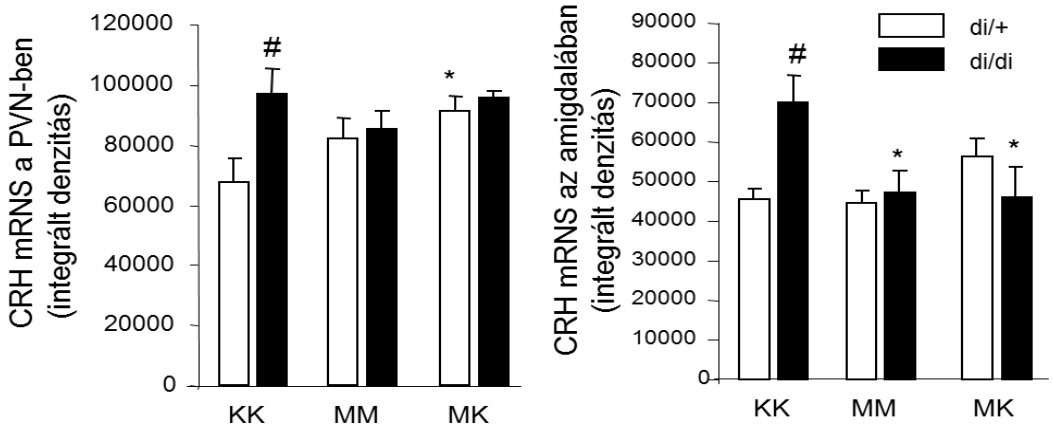
A morfinnal krónikusan kezelt di/+-os állatok esetében szignifikáns AVP mRNS szint emelkedést figyeltünk meg 4 órával az utolsó morfin injekció után (MM; 4 órás elvonás; 31. ábra). Hosszabb elvonási idő esetén az mRNS szint emelkedés eltűnik (MK; 16 órás elvonás: 16 órával az utolsó morfin és 4 órával az utolsó fiziológiás só injekció után). Várakozásunknak megfelelően az AVP hiányos állatokban a különféle kezelések nem befolyásolták az AVP mRNS mennyiségét, bár az alapszintek összemérhetően voltak a di/+ állatokban tapasztaltakkal (valószínűleg a mRNS próba felismeri a később funkcionálisan inaktív, de szekvenciájában nem sérült AVP részeket; genotípus hatás és kezelés-genotípus interakció: p<0,05).



31. ábra
A PVN parvocelluláris sejtjeiben mért AVP mRNS szint változás krónikus morfin kezelés hatására.
*p< 0,05 szignifikáns eltérés a fiziológiás sóval kezelt csoporthoz képest,
p< 0,01 szignifikáns eltérés a di/+ csoporthoz képest

4.2.1.3. CRH mRNS szintek változása

A kontroll állatok PVN-jében a CRH mRNS szintje fokozatosan emelkedett a krónikus morfin kezelés hatására (32.A ábra). A 4 órás elvonás (MM) hatására marginálisan, míg a 16 órás elvonás (MK) hatására erőteljes szignifikáns emelkedést figyelhettünk meg. Az AVP hiánya önmagában képes volt a CRH mRNS szintjét emelni és ezekben az állatokban a morfin kezelés, illetve a morfin elvonás már nem okozott további változásokat (genotípus hatás: $p<0,05$).



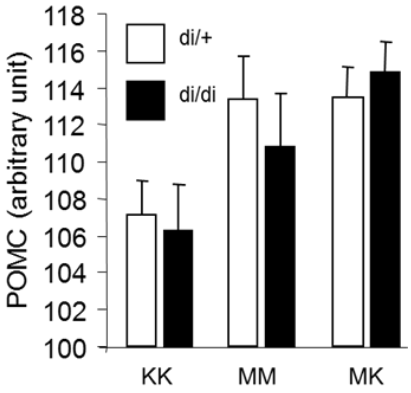
32. ábra
CRH mRNS szintek változása a PVN-ben és az amigdalában krónikus morfin kezelés hatására
*$p<0,05$ eltérés a fiziológiás sóval kezelt állatoktól; #$p<0,05$ eltérés a di/+ csoporttól

Az amigdala esetében a 16 órás elvonás (MK) hatására egy emelkedő tendencia volt megfigyelhető a di/+-os állatokban (32.B ábra). Ugyanakkor a CRH mRNS szintje alap állapotban (krónikus fiziológiás só kezelés, KK) szignifikánsan magasabb volt az AVP hiányos állatokban, mint di/+-os társaikban, és a morfin kezelés mind 4 (MM), mind 16 órával (MK) az utolsó injekció után a di/+ genotípusú kontroll állatokban mérhető szintre csökkentette azt (genotípus hatás és kezelés-genotípus interakció: $p<0,05$).

4.2.1.4. POMC mRNS szintek változása az adenohipofízisben

A krónikus morfin kezelés szignifikánsan emelte a POMC mRNS mennyiségét a hipofízis elülső lebenyében nemcsak 4, hanem 16 órával az utolsó morfin injekció után is

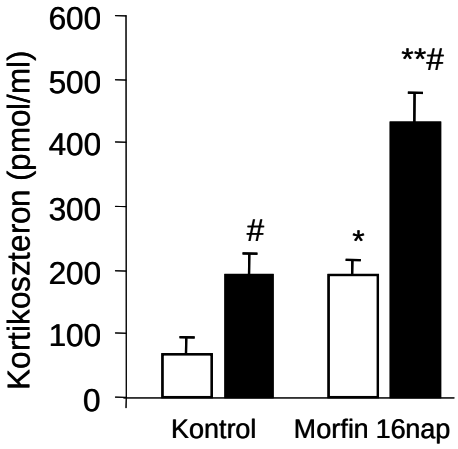
(33. ábra; kezelés hatás: p<0,01). Mindkét genotípusban azonosak voltak a POMC mRNS alap és a stressz után mért értékei.



33. ábra
POMC mRNS szintek változása az adenohipofízisben krónikus morfin kezelés hatására
**p<0,01szignifikáns eltérés a fiziológiás sóval kezelt csoporttól

4.2.1.5. Nyugalmi kortikoszteron szintek változása

Az AVP hiánya önmagában is emelkedett nyugalmi kortikoszteron szinteket okozott (34. ábra; genotípus hatás: p<0,01). A krónikus morfin kezelés mindkét genotípusban ugyanolyan mértékben emelte a kortikoszteron szinteket (kezelés hatása: p<0,01).



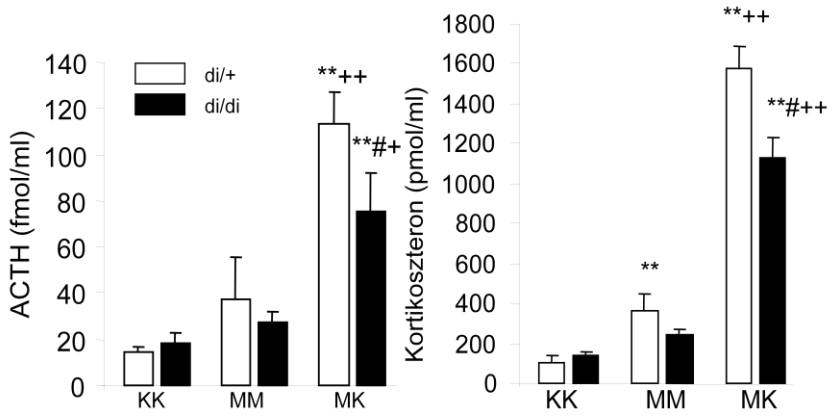
34. ábra
Nyugalmi kortikoszteron szintek, *p<0,05 **p<0,01 eltérés a fiziológiás sóval kezelt csoporthoz képest; #p<0,05 eltérés a di/+ csoporthoz képest

4.2.1.6. Krónikus morfin kezelést követő akut elvonás okozta hormonváltozások

A 4 órás morfin elvonás hatása egyik genotípusban sem okozott szignifikáns ACTH szint emelkedést, bár bizonyos mértékű emelkedő tendencia megfigyelhető volt (35. ábra).

A 16 órás elvonás számottevő, igen erőteljes hormonszint emelkedést okozott, ami kisebb értékű volt az AVP-hiányos állatokban (kezelés-genotípus interakció:p=0,05).

A 4 órás elvonás a di/+ csoportban szignifikánsan emelte a kortikoszteron szintet, de AVP hiányában a di/di csoportban ez az emelkedés nem volt megfigyelhető. A 16 órás elvonás már hatással volt a di/di csoportra is, de itt az emelkedés szignifikánsan kisebb volt, mint kontroll, di/+ társaikban (genotípus hatás és kezelés-genotípus interakció: p<0,01).



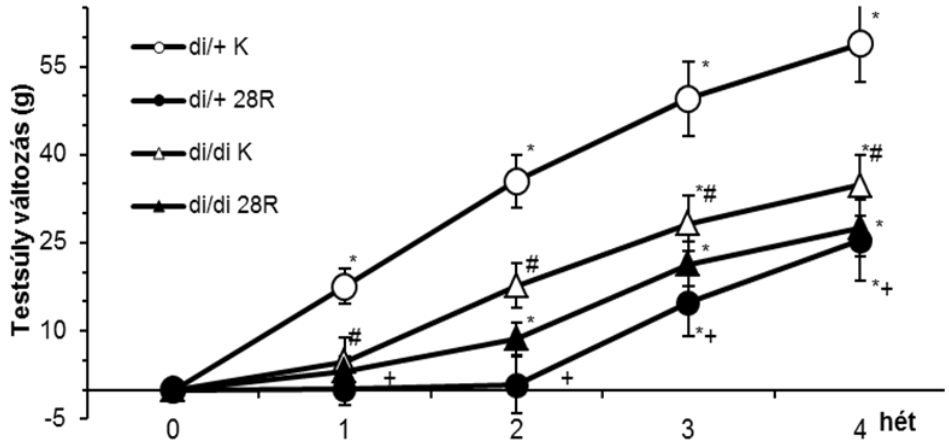
35. ábra
A krónikus morfin kezelést követő akut elvonás okozta hormon változások
**p< 0,01 szignifikáns eltérés a fiziológiás sóval kezelt csoporthoz képest; #p<0,05 szignifikáns eltérés a di/+ csoporthoz képest; +p<0,05 ++p<0,01 eltérés az 4 órás elvonáshoz képest

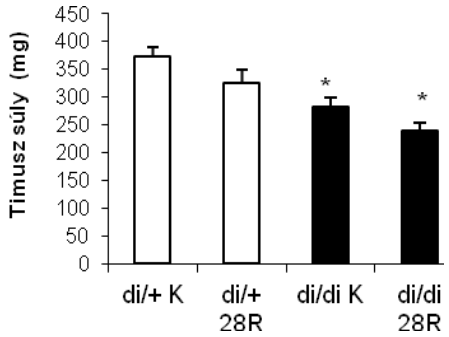
4.2.2. A vazopresszin szerepének vizsgálata a krónikus, 28 napos mozgáskorlátozás kísérletben

4.2.2.1. Testsúly és egyes szervsúlyok változásai

A di/di genotípusú állatok kiindulási testsúlya alacsonyabb volt, mint normál AVP szintű társaiké (di/+: 337±13g, di/di: 296±8g; n=39; p<0.01; 36. A ábra). A kontroll állatok testsúlya a kísérlet alatt folyamatos ütemben növekedett attól függetlenül, hogy melyik genotípusba tartoztak (időhatás: p<0,01). A krónikus stressz hatására elmaradt a testsúlygyarapodás (stressz hatás: p<0,01). A 28 nap mozgáskorlátozás testsúlycsökkentő hatása mindkét genotípusban megfigyelhető, de a di/+ állatoknál kifejezettebb (krónikus stressz-genotípus interakció: p<0,01).

A csecsemőmirigyek súlya mindkét genotípusban hasonló módon csökkent (36.B ábra; krónikus stressz hatása: $p<0.05$), annak ellenére, hogy a di/di genotípusú kontroll állatok esetén alacsonyabb volt a szervek kiindulási súlya (genotípus hatása: $p<0.01$).



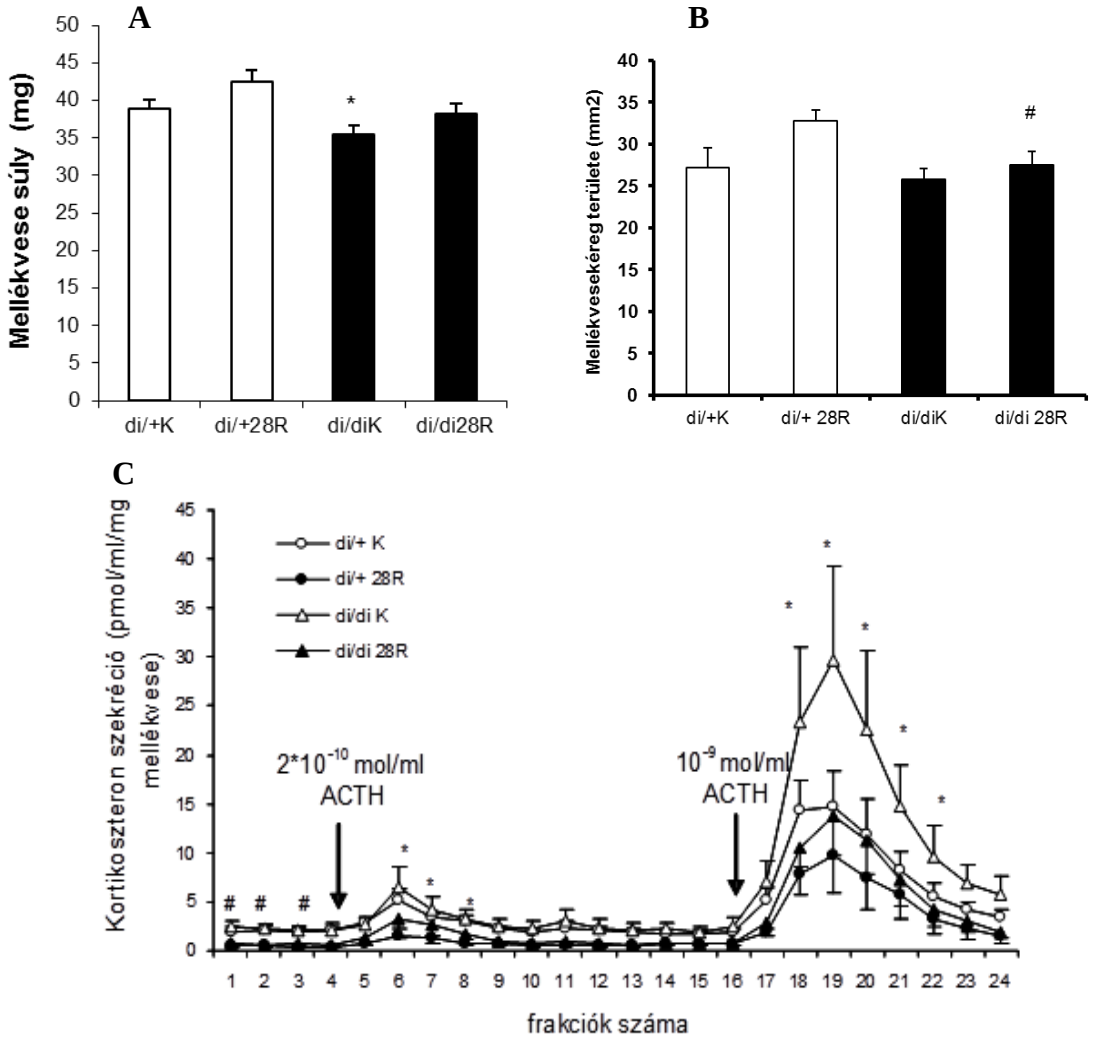


36. ábra
A testsúly változása 28 napos mozgáskorlátozás stressz hatására; *$p<0,05$ a 0. héthez képest; #$p<0,05$ a di/+-hoz képest; +$p<0,05$ a kontrollhoz képest; A csecsemőmirigy (thymus) súlyának változása 28 napos mozgáskorlátozás stressz hatására; *$p<0,05$ a di/+-hoz képest

4.2.2.2. Változások a mellékvesében

Az ismételt 28 napos mozgáskorlátozás stressz hatására a heterozigóta állatokban emelkedett a mellékvesék súlya (37.A ábra; krónikus stressz hatás: $p<0,05$). Annak ellenére, hogy a di/di genotípusú állatok kiindulási szervsúlya alacsonyabb volt, a változás ebben a genotípusban is megfigyelhető (nincs genotípus hatás, vagy interakció).

A 28 napos stressz hatására emelkedett a mellékvesekéreg keresztmetszeti területének nagysága is (37.B ábra; krónikus stressz hatás: $p<0,05$). AVP hiányában azonban az emelkedés kisebb mértékű volt (genotípus hatás: $p<0,05$).

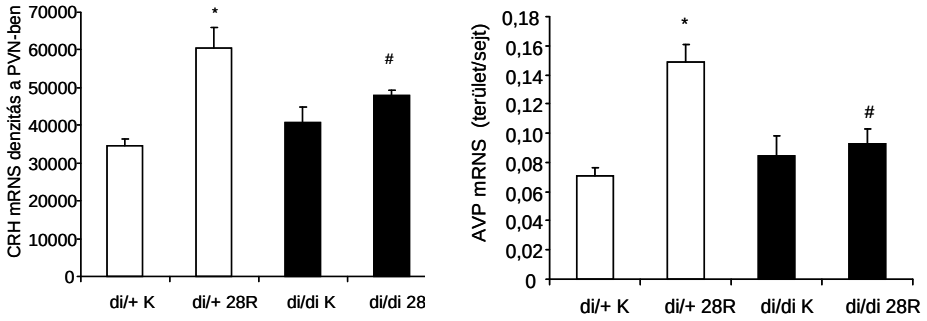


37. ábra
A=A mellékvesék súlyának változása 28 napos mozgáskorlátozásos stressz esetén. *p<0,01 di/+ K-tól
B=A mellékvesekéreg területének változása. #p<0,05 eltérés a di/+ 28R csoporttól
C=Különböző dózisú ACTH stimulusok hatása a naiv és a korábban krónikusan stresszelt állatok kortikoszteron elválasztására *in vitro* szuperfúziós teszt során *p<0,05 az alapszekréciótól, #p<0,05 a krónikus stressz hatása

A kortikoszteron alapszintű *in vitro* szekréciója a 28 napos mozgáskorlátozás után csökkent mértéket mutatott (37.C ábra; krónikus stressz hatás: p<0,01). Az előzetesen krónikusan stresszelt állatokban mind az első mind pedig a második ACTH stimulus kisebb kortikoszteron szekréciót indukált (idő-stressz interakció: p<0,05). A di/di genotípusú állatok esetében az ACTH indukálta kortikoszteron válasz magasabb volt, bár a különbség

a két genotípus között nem szignifikáns. Ugyanakkor a második stimulus hatására bekövetkező válasz időgörbéje már szignifikánsan eltérő a két genotípusban (idő-genotípus interakció: p=0,02).

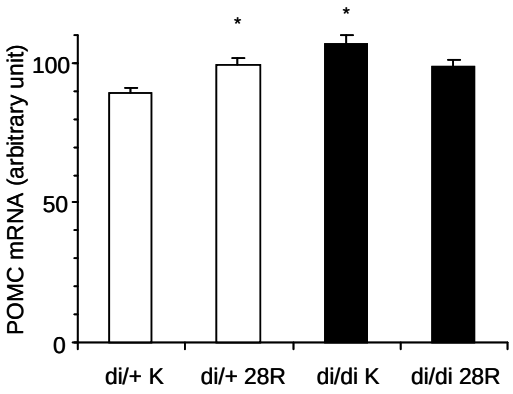
4.2.2.3. Változások az mRNS szintekben



38. ábra
CRH mRNS és AVP mRNS szintjeinek változása 28 napos mozgáskorlátozást követően Brattleboro patkányok PVN-jében
**p<0.0, *p<0.05 eltérés a kontroll csoporthoz képest, #p<0.05 eltérés di/+28R-tól

A naiv állatok esetében nem tapasztaltunk különbséget a két genotípus között a PVN CRH mRNS tartalmának vizsgálata során (38. ábra). A 28 napos mozgáskorlátozás stressz mindkét genotípusban a CRH mRNS szintjének emelkedését váltotta ki, AVP hiányos állatokban azonban az emelkedés kisebb mértékű volt (krónikus stressz-genotípus interakció: p<0,01).

Annak ellenére, hogy feltételezhető bizonyos eltérés az mRNS-ek eltérő bázissorrendje miatt (az AVP génjében végbement mutáció miatt), a PVN parvocelluláris neuronjaiban mért alapszintű AVP mRNS szintek vizsgálata során nem tapasztaltunk különbéget a di/+ és di/di genotípusú állatok között (lsd. 31. ábra is). 28 napos mozgáskorlátozás szignifikánsan megemelte ezen sejtekben az AVP mRNS mennyiségét, de ez az emelkedés csak a di/+ genotípus esetén figyelhető meg (krónikus stressz-genotípus interakció: p<0,01).



39. ábra
A POMC mRNS szintje a hipofízis első lebenyében 28 napos ismételt mozgáskorlátozást követően
*p<0,05 a di/+-hoz képest

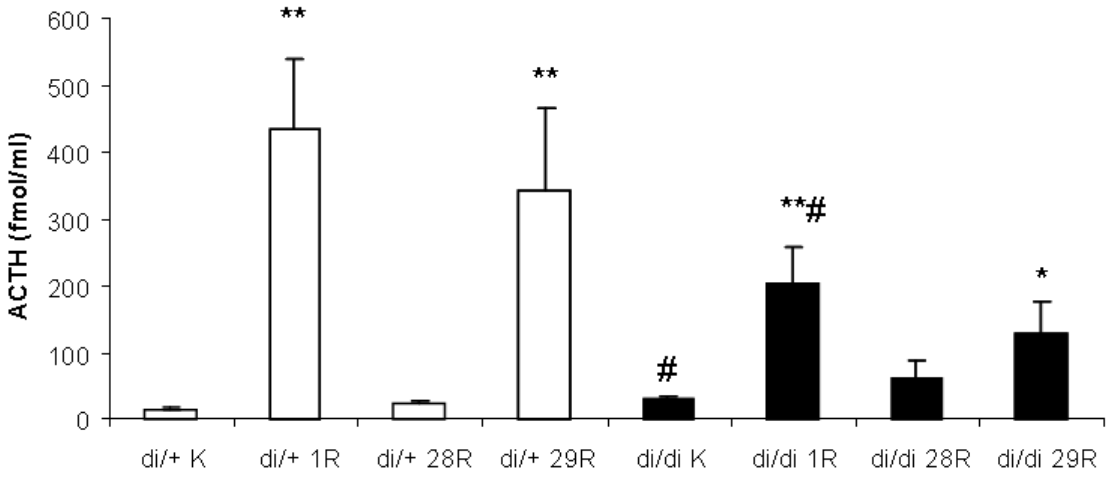
A hipofízis elülső lebenyében a POMC mRNS szintje a kontroll di/di állatokban magasabb volt, mint di/+ genotípusú társaikban (39. ábra). A krónikus stressz hatására a POMC mRNS szintje a di/+ állatokban szignifikánsan emelkedett, míg a di/di állatokban a stressz nem eredményezett további mRNS szint emelkedést (krónikus stressz-genotípus interakció: p<0,01). Habár az 1 óra mozgáskorlátozás nem optimális a POMC mRNS változásainak vizsgálata szempontjából, de mégis megfigyelhető volt, hogy az AVP hiánya az akut POMC mRNS emelkedést is kivédte (4. Táblázat; akut stressz-genotípus interakció: p<0,05).

4. Táblázat
POMC mRNS szintje a hipofízis elülső lebenyében

	POMC mRNS szintje a hipifízis elülső lebenyében (arbitrary unit)							
	di/+				**di/di**			
Krónikus kezelés	**kontroll**		**28R**		**kontroll**		**28R**	
Akut kezelés	**kontroll**	**R**	**kontroll**	**R**	**kontroll**	**R**	**kontroll**	**R**
	89,2±2,1	**99,6±2,7**	**99,4±2,2**	**103,4±3,6**	**106,6±3,3**	**101,2±4,7**	**98,7±2,7**	**99,4±2,0**

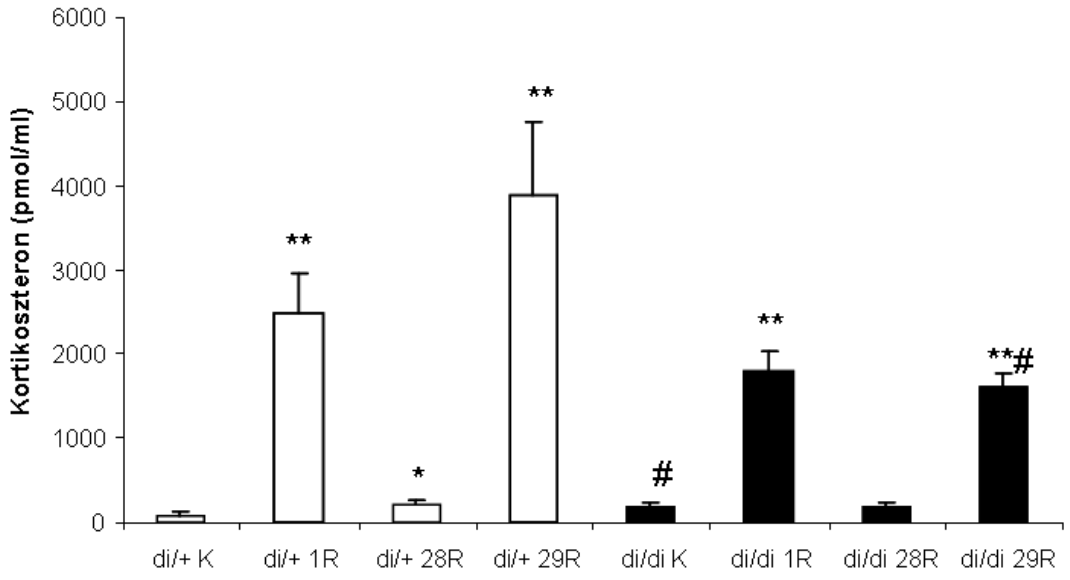
4.2.2.4. Változások a hormonszintekben

A nyugalmi ACTH szintek vizsgálata során magasabb hormonszinteket mértünk a di/di genotípusú állatokban (40. ábra). Egyszeri 1 órás mozgáskorlátozás stressz (R) mindkét genotípusban ACTH szint emelkedést okozott (akut stressz hatás: $p<0,01$), de AVP hiányában az emelkedés kisebb mértékű volt (akut stressz-genotípus interakció: $p<0,01$). 28 napos mozgáskorlátozás (28R) után ismételten megmértük az ACTH szintjét. A krónikus stressz nem volt szignifikáns hatással a hormonszintekre, bár - hasonlóan az akut stresszhez - a két genotípus között különbség fedezhető fel (genotípus hatás: $p<0,01$).



40. ábra
Plazma ACTH szintek a 28 nap mozgáskorlátozásos kísérlet 8 csoportjában
*$p<0,05$; **$p<0,01$ a kontroll, akut stresszen át nem esett csoportokhoz képest; #$p<0,05$ a di/+ csoporthoz képest

Az AVP hiányos állatokban a kortikoszteron alapszintje magasabb volt (41. ábra). A 28 napos mozgáskorlátozás (28R) hatására a hormon alapszintje a di/+ csoportban megemelkedett, ugyanakkor a di/di csoportban a krónikus stressz további hormonszint emelkedést nem váltott ki (krónikus stressz hatása: $p=0,05$). Egyszeres, egy órás mozgáskorlátozás (R) hatására mindkét genotípusban megemelkedett a kortikoszteron szintje (akut stressz hatás: $p<0,01$), és AVP hiányában az emelkedés kisebb mértékű volt (genotípus hatás és akut stressz-genotípus interakció: $p<0,01$). Hozzászokás ebben az esetben sem volt megfigyelhető, a krónikus stresszelés után bekövetkezett újabb mozgáskorlátozás hatására erőteljes kortikoszteron szint emelkedés következett be.

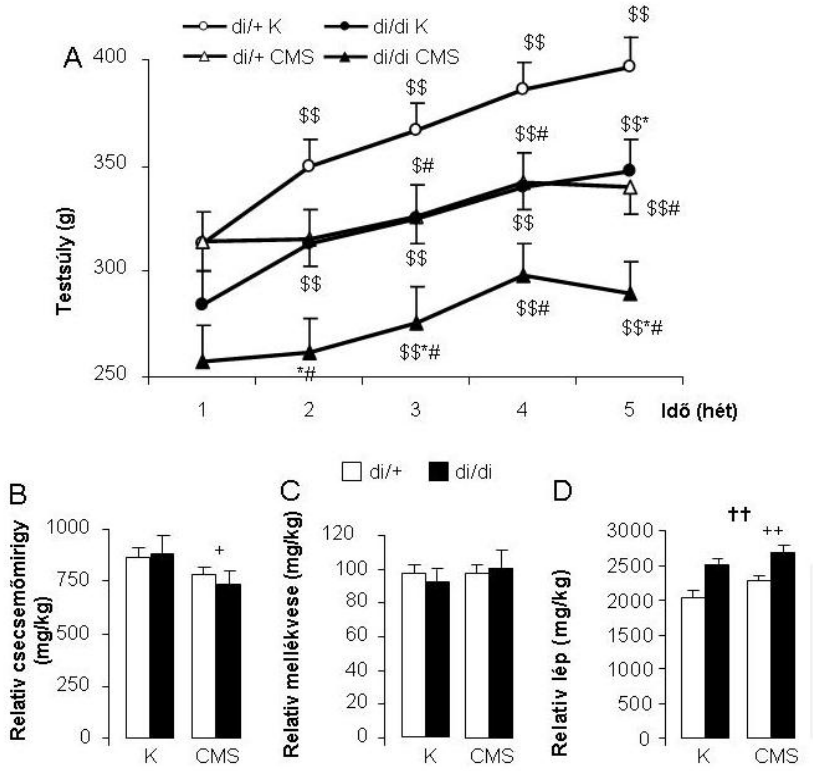


41. ábra
Plazma kortikoszteron szintek a 28 nap mozgáskorlátozásos kísérlet 8 csoportjában
*p<0,05; **p<0,01 a kontroll, akut stresszen át nem esett csoportokhoz képest; #p<0,05 a di/+ csoporthoz képest

4.2.3. Krónikus váltakozó enyhe stressz vizsgálata

4.2.3.1. Szomatikus paraméterek változásai

A di/di genotípusú állatok kiindulási testsúlya alacsonyabb volt, mint di/+-os társaiké (di/+: 288±11g; di/di: 261±13g, 42.A ábra). A CMS gátolta a testsúlynövekedést mindkét genotípusban (maximális hatás a 2. és a 3. hét között; CMS hatás és idő-CMS interakció: p<0,01). A kiindulási csecsemőmirigy és mellékvese súlyok esetében is megfigyelhető volt, hogy AVP hiányában azok kisebbek voltak (csecsemőmirigy: di/+ 341,6+/-21mg; di/di 299,8+/-23mg; mellékvese: di/+ 38,3+/-1,8mg; di/di 31,3+/-2,4mg). Ezért a krónikus hatások vizsgálatánál a relatív súlyokat vettük figyelembe. A krónikus stressz a csecsemőmirigy relatív súlyát képes volt csökkenteni (42.B ábra; CMS hatás: p=0,05), azonban a krónikus hatások esetében általában megfigyelt mellékvesesúly emelkedés nem volt látható (42.C ábra). A lép relatív súlya nemcsak a CMS hatására, de az AVP hiány miatt is magasabbnak mutatkozott (42.D ábra; genotípus és CMS hatás: p<0,01).



42. ábra
CMS hatására bekövetkező szomatikus változások $ p<0,05 és $$p <0,01 az 1 héthez képest *p <0.05 a di/+-hoz képest; #p <0,05 a nem stresszelt csoportokhoz képest, +p<0,05 és ++p<0,01 a CMS hatása; ††p<0,01 a genotípus hatása

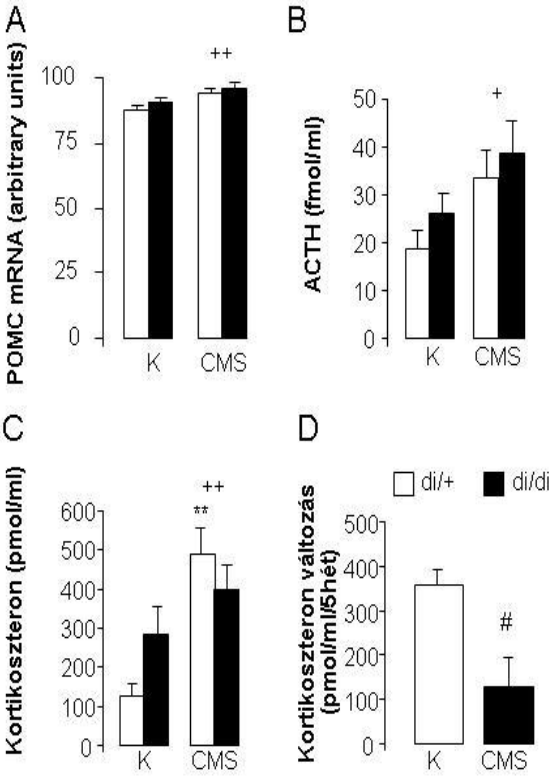
4.2.3.2. Változások a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengelyen

A hipofízis elülső lebenyében mért POMC mRNS szint a CMS hatására megemelkedett (43.A ábra; CMS hatás: p<0,01). Az AVP hiánya nem befolyásolta sem a nyugalmi szinteket, sem a stressz indukálta mRNS szint emelkedést.

Az ACTH nyugalmi szintje a 6 hetes krónikus stresszelés hatására szignifikánsan emelkedett mindkét genotípusban (43.B ábra; CMS hatás: p<0,05). A stressz indukálta hormonszintek között különbséget nem tapasztaltunk, a változás AVP hiányában és jelenlétében is azonos mértékű volt.

A kísérlet végén dekapitált vérmintákból meghatározott konrtikoszteron értékek esetén (43.C ábra) az alap kortikoszteron szint a di/di-s állatokban marginálisan magasabb volt, mint heterozigóta társaikban (genotípus hatás: p=0,07; lsd. 41. ábra is). A CMS után a

di/+ állatok nyugalmi kortikoszteron szintje szignifikánsan magasabb volt, mint a kiinduló érték (CMS hatás: p<0,01), míg a di/di állatok értékei nem változtak (CMS-genotípus interakció: p<0,05). Ezt alátámasztottuk azzal is, hogy ha ugyanazon állatok farokvér mintáinak kortikoszteron tartalmát a kísérlet első és utolsó hetében hasonlítottuk össze (43.D ábra), akkor a változás szignifikánsan alacsonyabb volt a di/di állatok esetén.

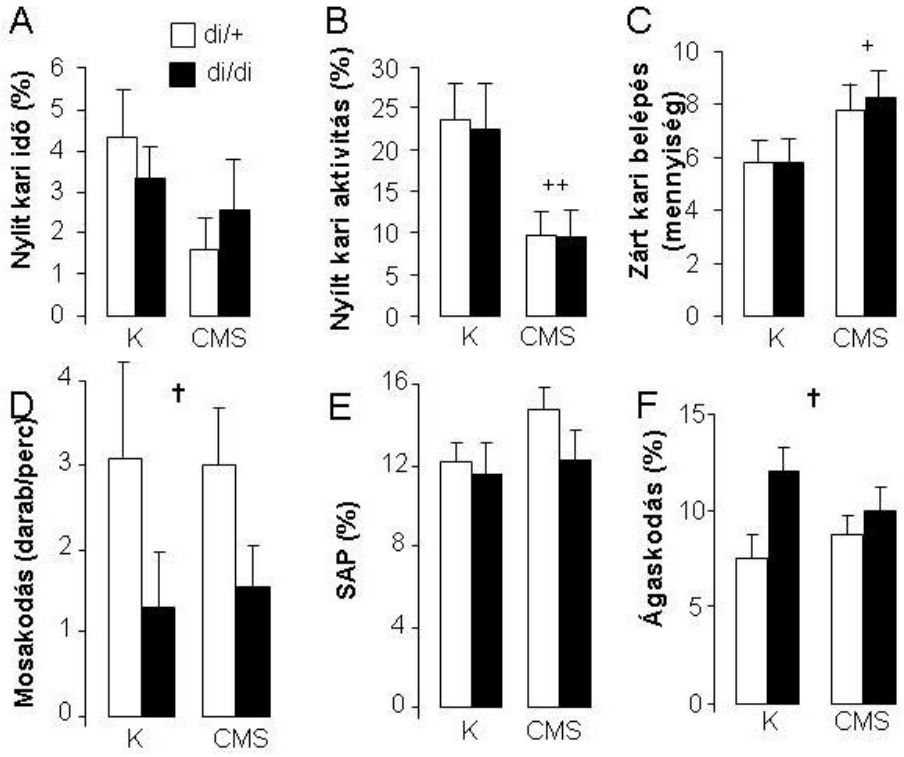


43. ábra
CMS hatása a HHM tengely paraméterekre
A= POMC mRNS az adenohipofizisben, B=plazma ACTH szint, C= Kortikoszteron szint a plazmában a 29. napon, D= Kortikoszteron szint változás a vizsgálati periódus alatt (farokvérből)
**p<0.01 a kontrollhoz képest, ++p<0.01 és +p<0.05 a CMS fő hatása, #p<0.01 di/+ -hoz képest

4.2.3.3. Emelt keresztpalló teszt a szorongás mérésére

A szorongás fő paraméterét tekintve (nyílt karban töltött idő) csak egy tendencia volt megfigyelhető: a CMS hatására kicsit kevesebb időt töltöttek az állatok a nyílt karban (CMS hatás: p=0,09; 44.A ábra).

Mivel a stresszelt állatok mozgékonyabbak voltak (44.C ábra; fokozott zárt kari belépés: $p<0,05$), érdemesnek tűnt megvizsgálni a nyílt kari aktivitást (nyílt/(nyílt+zárt) kari belépések száma; 44.B ábra). Ebben az esetben a CMS szignifikánsan csökkentette a szorongás mozgékonyság független paraméterét (CSM hatás: $p<0,01$), de ezt a hatást a genotípus nem befolyásolta.

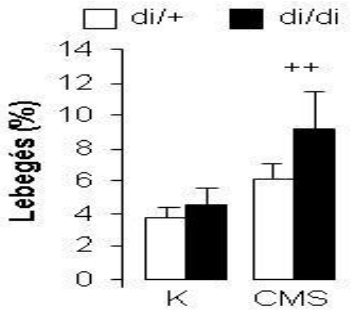


44. ábra
Az emelt keresztpallón mutatott viselkedés CMS hatására kontroll (di/+) és AVP hiányos (di/di) állatokban.
+$p<0,05$, ++$p<0,01$ a kontroll, nem stresszelt csoporthoz; †$p<0,05$ a di/+ genotípushoz (fő hatás)

Az etológiai szempontból fontos viselkedésmintákat tekintve a di/di állatok kevesebbet mosakodtak (44.D ábra; genotípus hatás: $p=0,05$). Az úgynevezett kockázatfelmérő magatartás (stretched attend postures, SAP) nem mutatott különbséget a csoportok közt (44.E ábra). Csak a vertikális, ágaskodó mozgásban tapasztalhattunk szignifikánsan fokozott aktivitást a di/di állatok részéről (44.F ábra; genotípus hatás: $p<0,05$).

4.2.3.4. Forszírozott úszás, a depresszió-szerű magatartás mérője

Az FST az antidepresszánsok preklinikai vizsgálatára kiterjedten alkalmazott módszer. Esetünkben a CMS növelte a lebegéssel töltött idő mennyiségét (45. ábra; CMS hatás: p=0,01), de erre a genotípus nem volt hatással. A többi paraméter (úszás, küzdés, búvárkodás) nem mutatott változást sem a CMS, sem az AVP hiány hatására (nem ábrázolt adatok).



45. ábra
FST során megfigyelhető lebegési magatartás mennyisége a 2. napi 5 perces tesztperiódus során.
++p<0,01 fő hatás a kontroll, nem stresszelthez képest.

4.3. A vazopresszin szerepének vizsgálata perinatális korban

4.3.1. Kispatkányok stressz reaktivitásának vizsgálata

Mivel a kispatkányok genotípusát csak az elválasztás után lehet a vízfogyasztás mérésével meghatározni, kísérleteinkben indirekt módon, a hipofízisek AVP tartalma alapján utólagosan határoztuk meg az egyes kölykök genotípusát (5. Táblázat). Így a kezeléseket teljesen random végeztük, a felmerülő beosztási bizonytalanság miatt az egyes csoportok elemszámát túlméreteztük. Abban az esetben, ha az AVP tartalom a kimutathatósági szint alatt maradt, vagy ahhoz közel volt, a di/di genotípusba soroltuk a kölyköt.

5. Táblázat

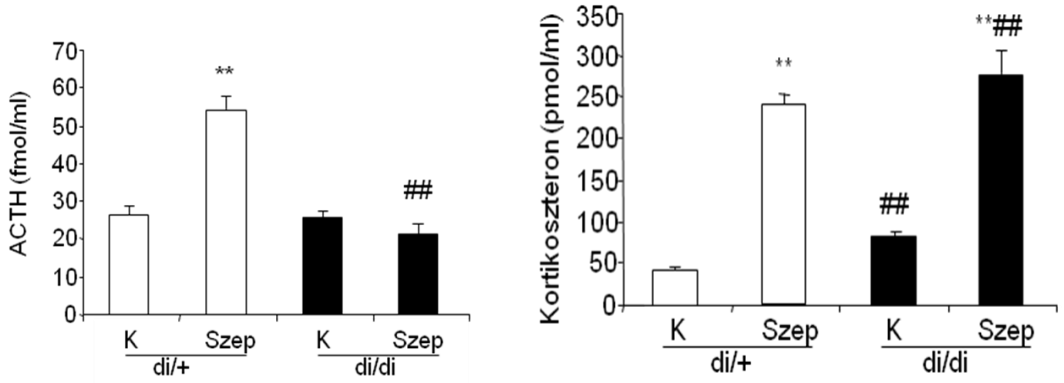
A hipofízis AVP tartalma 5-10-20 napos Brattleboro kispatkányban, ** p<0,01 eltérés az 5 napos kortól
##p<0,01 eltérés a di/+-tól

AVP (ng/szerv)	di/+		di	
életkor	kontroll	szeparált	kontroll	szeparált
5 nap	16,1±0,8	16,4±2	0,2±0,02##	0,2±0,02##
10 nap	42,5±3 **	39,9±3**	0,3±0,05##	0,4±0,13##
20 nap	41,4±4**	44,9±4**	0,4±0,04##	0,9±0,05##

4.3.1.1. HHM tengely aktiváció 24 órás anyai depriváció hatására 10 napos korban

Az anyjukkal maradó, kontroll kölykök nyugalmi ACTH szintjében nem volt különbég a két genotípus között (46.A ábra). A di/+-os kölykökben a 24 órás elválasztás közel kétszeresére emelte az ACTH szinteket a nyugalmi állapothoz képest (szeparáció hatása: $p<0,01$), ugyanakkor a di/di-s kölykökben ez az emelkedés elmaradt (genotípus hatás és szeparáció-genotípus interakció: $p<0,01$).

A kortikoszteron szintek esetében jelentősebbek a különbségek (46.B ábra). A kontroll állatok nyugalmi hormonszintjeit vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az AVP hiányos állatokban szignifikánsan magasabbak a hormonszintek, mint di/+-os társaik esetében (genotípus hatás: $p<0,01$). A 24 órás szeparáció mintegy 5-6-szoros emelkedést okozott mindkét genotípusban, de az emelkedés nem különbözött a genotípusokban (szeparáció hatása: $p<0,01$).

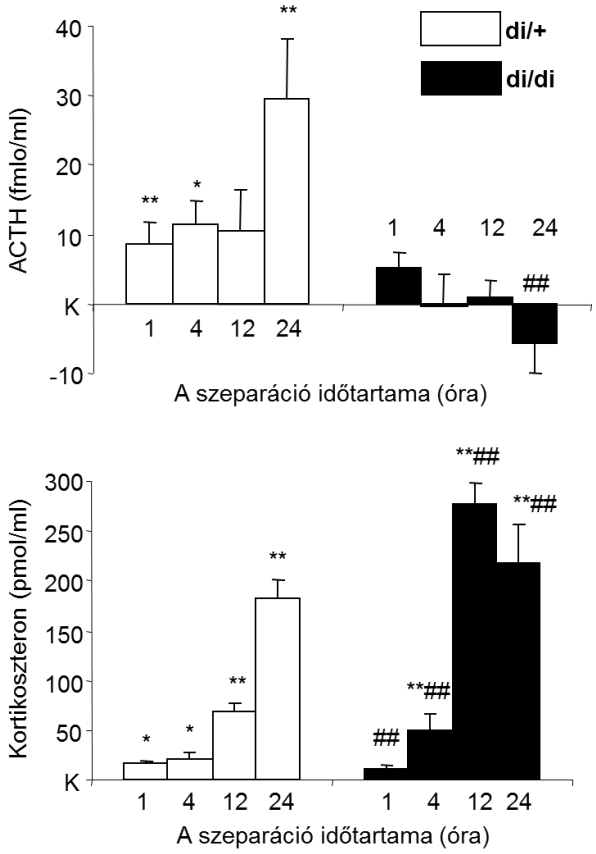


46. ábra

Az ACTH és kortikoszteron szintek változása 24 órás szeparáció hatására 10 napos patkányokban
** $p<0,01$ eltérés a kontroll csoporthoz képest, ## $p<0,01$ eltérés a di/+ genotípushoz képest.

4.3.1.2. HHM tengely aktiváció 1, 4, 12, 24 órás anyai deprivációra 10 napos korban

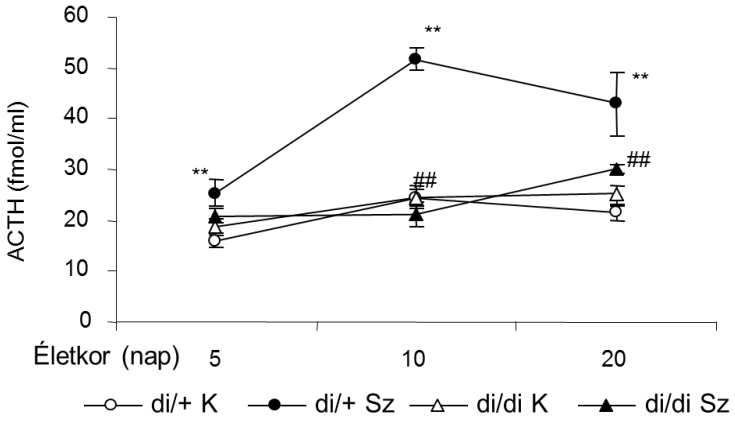
A di/+ genotípusú kölykök esetében mindegyik időtartamú anyai szeparáció ha csak kis mértékben is, de szignifikánsan emelte az ACTH szinteket (47.A ábra; szeparáció hatása: $p<0,01$), a maximális hatást, megközelítőleg kétszeres emelkedést a 24 órás szeparáció váltotta ki (idő hatás: $p<0,05$). Ezzel ellentétben az AVP hiányos állatokban nem volt kimutatható ACTH szint emelkedés, sőt a 24 órás szeparáció hatására csökkenést detektáltunk az anyjuk alatt tartott kontroll testvérekben mérhető értékhez képest (szeparáció-genotípus interakció: $p<0,01$).



47. ábra
HHM tengely válasz 1, 4, 12, 24 órás anyai depriváció hatására 10 napos korban
Az értékek a kontroll csoport állatokhoz viszonyított változásokat jelzik (lsd. 46. ábra)
*p<0,05 **p<0,01 eltérés a kontroll kölykökhöz képest, ##p<0,01 eltérés a di/+ csoporthoz képest

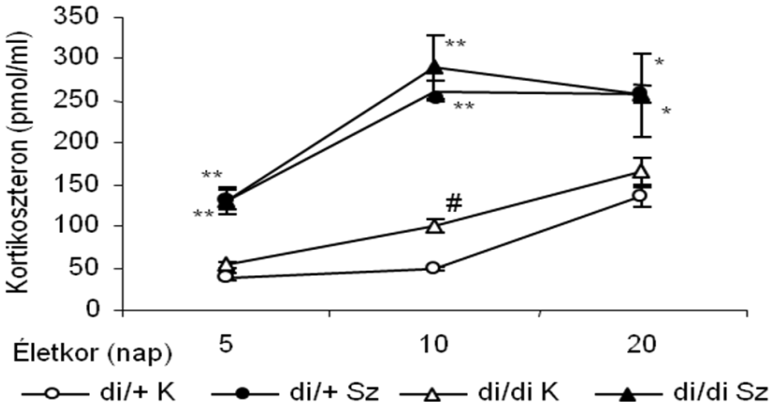
A kortikoszteron szintek esetén az elválasztás növekvő időtartama egyre nagyobb és nagyobb hormon-válaszokat váltott ki (47.B ábra; idő hatás: p<0,01). A legmagasabb emelkedés a 24 órás elválasztás esetén volt megfigyelhető. Az AVP hiányos állatok magasabb alapértékei voltak (lsd. 46. ábra) és bennük az 1 órás szeparáció még nem váltott ki szignifikáns emelkedést. A további időpontokban az emelkedés mértéke viszont nemcsak a kontroll, anyjuk alatt maradó kispatkányokhoz képest, hanem a di/+-os állatokban megfigyelhető szintekhez képest is magasabb volt (genotípus hatás, idő-genotípus és szeparáció-genotípus interakció: p<0,01).

4.3.1.3. A HHM tengely aktiváció fejlődése a perinatális korban



48. ábra
24 órás elválasztás kiváltotta ACTH szint változások különböző perinatális életkorokban
**p<0,01 eltérés a kontroll kölykökhöz képest; ##p<0,01 eltérés a di/+ kölykökhöz képest
K: Kontroll, Sz: Szeparált

A 24 órás anyai depriváció szignifikáns ACTH szint emelkedést váltott ki a posztnatális ötödik, tizedik, és huszadik napon is a di/+ genotípusú kispatkányokban (48. ábra; szeparáció hatása: p<0,01). A legkisebb mértékű emelkedés a születés után ötödik napon volt megfigyelhető (korhatás: p<0,01). Azonban az AVP hiányos kispatkányokban hasonló változásokat egyik életkorban sem tapasztaltunk (genotípus hatás: p<0,01).

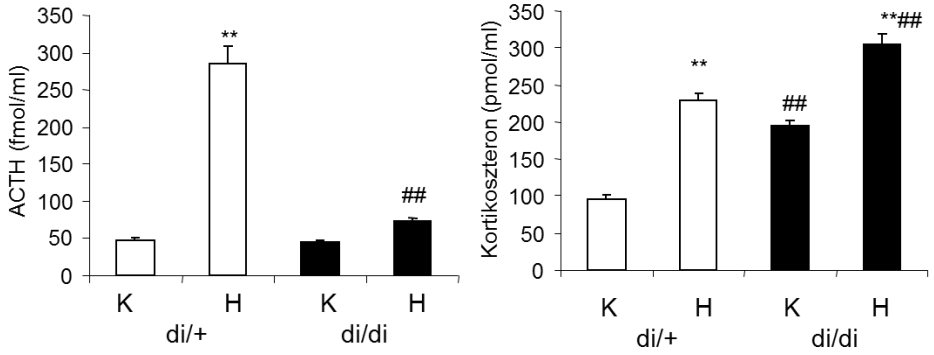


49. ábra
24 órás elválasztás kiváltotta kortikoszteron szint változások különböző perinatális életkorokban
*p<0,05, **p<0,01 eltérés a kontroll kölykökhöz képest; #p<0,05, ##p<0,01 eltérés a di/+ kölykökhöz képest

A nyugalmi kortikoszteron szintek az életkor előrehaladtával fokozatosan emelkedtek (49. ábra; korhatás: p<0,01). Az AVP hiányos kölykökben minden életkorban magasabb volt a szint, mint heterozigóta társaik esetében (nyugalmi értékekre genotípus hatás: p<0,01). A 24 órás anyai szeparáció mindkét genotípusban emelte a kortikoszteron szinteket (szeparáció hatás: p<0,01), a legnagyobb mértékű változást a 10 napos állatok esetében tapasztaltuk (kor-szeparáció interakció: p<0,01). Az anyai elválasztás hatására ugyanolyan mérvű kortikoszteron szekréció jött létre mindkét genotípusban.

4.3.1.4. *Hypnorm* kezelés hatása 10 napos korban

Az előző kísérletekkel összhangban az AVP hiánya nem befolyásolta az ACTH nyugalmi szintjét (50.A ábra). A Hypnorm kezelés hatására a di/+ genotípusú kölykökben az ACTH szintje 60 perc alatt közel a 6-szorosára emelkedett (kezelés hatása: p<0,01). AVP hiányában az ACTH szint emelkedése azonban elmaradt (kezelés-genotípus interakció: p<0,01).



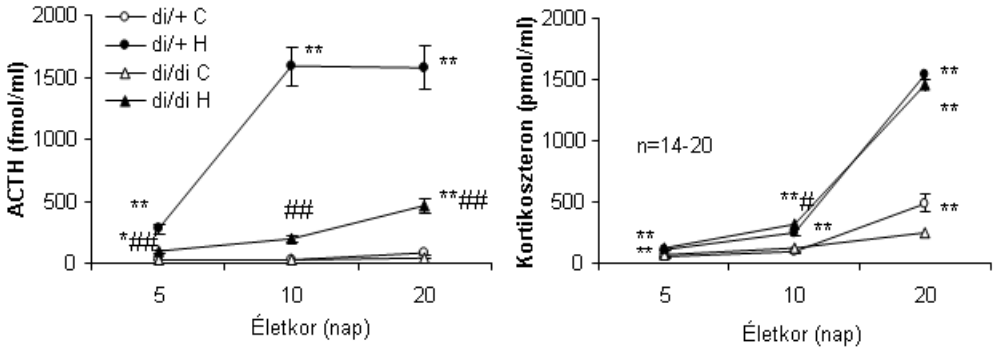
50. ábra
Hypnorm kezelés hatása 10 napos kispatkányokban
**p<0,01 eltérés a fiziológiás sót kapott kontrollokhoz képest, ##p<0,01 eltérés a di/+ kölykökhöz képest

A nyugalmi kortikoszteron szintek – szintén az előzőekben megfigyeltekkel összhangban – az AVP hiányos állatokban szignifikánsan magasabbak voltak (genotípus hatás: p<0,01). AVP jelenlétében 60 perc alatt a kortikoszteron szint emelkedés hozzávetőlegesen 2,4-szeres volt (kezelés hatás: p<0,01). AVP hiányában azonban a kortikoszteron emelkedés nem volt nagyobb, mint a di/+-ban tapasztalható változás (nincs interakció a kezelés és a genotípus között), ellentétben az anyai elválasztás okozta hormonszint változásokkal (lsd. 4.3.1.2.) .

4.3.1.5. A *Hypnorm* kezelés hatása 5, 10, és 20 napos kispatkányokban

A Hypnorm injekció 5 napos korban közel 10-szeres ACTH szint emelkedést váltott ki a di/+-os kölykökben (51.A ábra). A 10 és 20 napos patkányokban az emelkedés mértéke már megközelítőleg 50-szeres (korhatás és kezelés-kor interakció: p<0,01). Az AVP hiányos állatokban az ACTH szint változások szignifikánsan alacsonyabbak voltak mindegyik életkorban (genotípus hatás és minden interakciója: p<0,01).

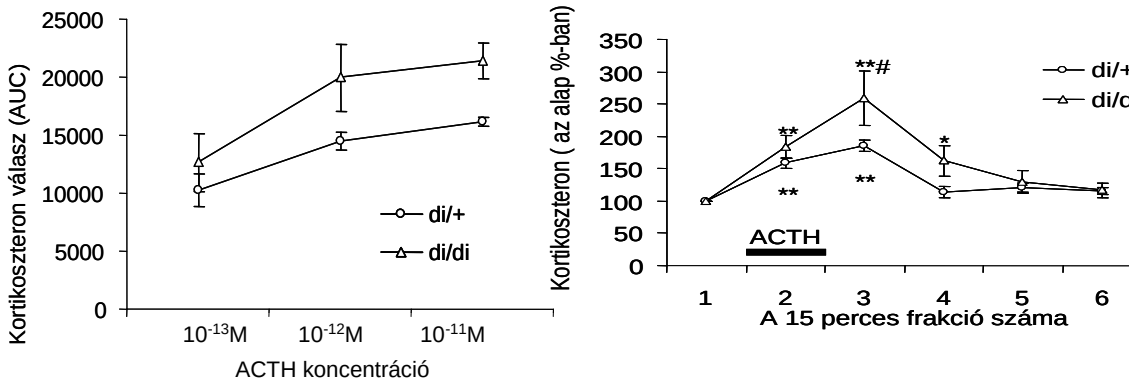
A plazma kortikoszteron szintje a Hypnorm injekció hatására 5 és 10 napos korban közel a duplájára, 20 napos korban már a 3-szorosára emelkedett (51.B ábra; kezelés, kor és interakciójuk: p<0,01). Ebben az esetben az AVP hiánya nem befolyásolta a hormonszinteket.



51. ábra
A *Hypnorm* kezelés hatása az ACTH és kortikoszteron szintekre 5, 10, és 20 napos kispatkányokban
*p<0,05, **p<0,01 eltérés a fiziológiás sót kapott saját genotípushoz képest;
#p<0,05, ##p<0,01 eltérés a di/+ csoporthoz képest

4.3.1.6. A mellékvesék ACTH érzékenységének vizsgálata

Az ACTH dózisfüggően emelte a mellékvesék kortikoszteron termelését (52. ábra, lsd. felnőttben 23. ábra; kezelés hatása: p<0,01). Az emelkedés AVP hiányában nagyobb mértékű volt (genotípus hatása: p<0,01). A legalacsonyabb ACTH dózis (10^{-13} M) alkalmazása a kezelés után 15 perccel váltja ki a legnagyobb kortikoszteron szekréciót. Nem csak az összegzett hormonelválasztás (AUC, area under the curve), hanem a 3. frakcióban, azaz az 15 perces ACTH kezelést követően is szignifikáns különbség mutatkozott a genotípusok között, a di/di állatok fokozott hormonszekréciót mutattak (idő-genotípus interakció: p<0,05).

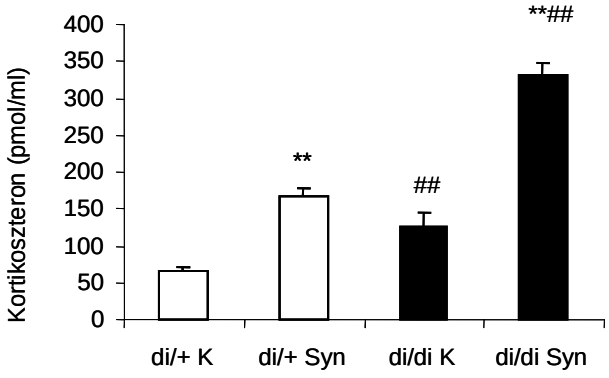


52. ábra

In vitro mérhető mellékvese érzékenység 10 napos kispatkányokban.
A= A vizsgáltat ideje alatt mérhető összes hormonelválasztás (AUC= area under the curve, görbe alatti terület); B= A 10^{-13}M ACTH stimulus hatására bekövetkező kortikoszteron elválasztás
*p<0,05; **p<0,01 az alap frakcióhoz képest,#p<0,05 eltérés a di/+ csoporthoz képest

4.3.1.7. Exogén ACTH iránti érzékenység: Synacten kezelés 10 napos patkányban

Szintetikus ACTH (Synacten 250ng/ttg) sc adását követően 60 perccel jelentős kortikoszteron emelkedés volt kimutatható a di/+ állatokban (53. ábra, kezelés hatása: p<0,01). Mint előző kísérleteink során, itt is emelkedett nyugalmi kortikoszteron szinteket mértünk az AVP hiányos kispatkányokban (genotípus hatás: p<0,01). A különféle stresszekkel (anyai szeparáció, Hypnorm) összhangban az AVP hiányos állatok stimulus utáni kortikoszteron szint értékei magasabbak voltak, mint a di/+-os testvéreikben mérhető szintek, de az emelkedés mértéke hasonló volt a két genotípusban (di/+: 153±20%; di/di: 162±12%).



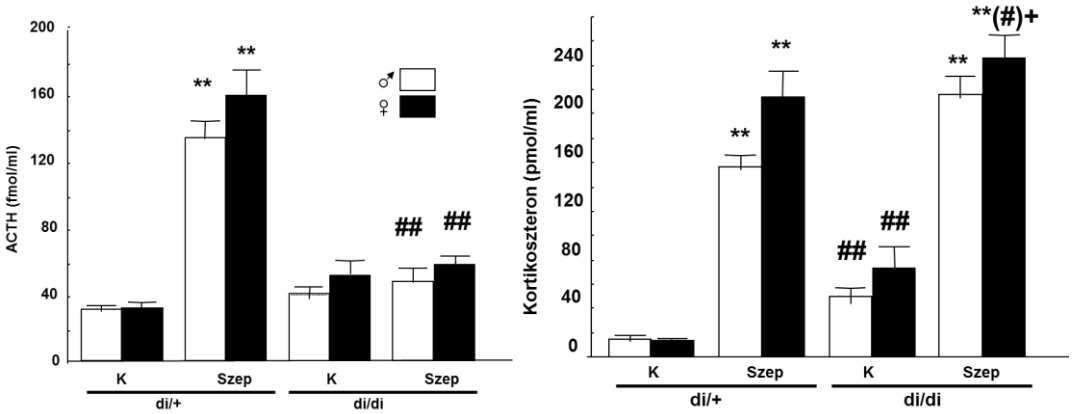
53. ábra

Kortikoszteron plazma szintek 60 perccel 250ng/g Synacten beadását követően.
**p<0,01 a kontroll, fiziológiás só injekciót kapott állatokhoz képest; ##p<0,01 a di/+ állatokhoz viszonyítva

4.3.2. Különböző nemű kispatkányok stressz reaktivitásának vizsgálata

4.3.2.1. 24 órás anyai szeparáció

A 24 órás anyai szeparáció hatására 10 napos kispatkányokban az ACTH szintje igen erőteljesen megemelkedett AVP jelenlétében (54. ábra, lsd. 46.A ábra is; szeparáció hatsáa: p<0,01). AVP hiányos állatokban ez az emelkedés nem volt megfigyelhető (genotípus hatás és szeparáció-genotípus interakció: p<0,01). Nőstény kölykök esetében a hormonszint emelkedés magasabb volt, mint hímekben (ivar hatása: p= 0,05).

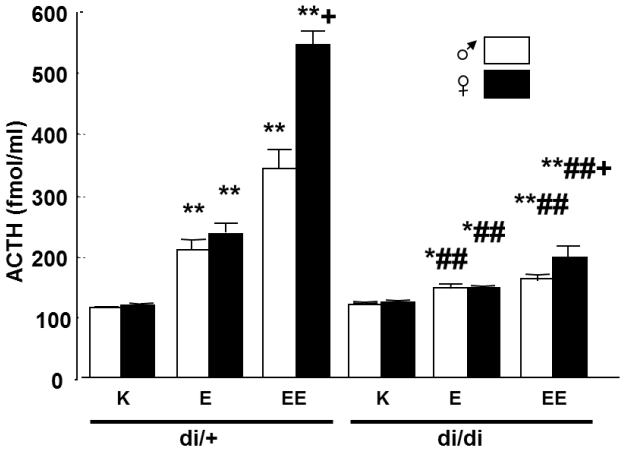


54. ábra
24 órás anyai szeparáció hatása különböző nemű kispatkányok ACTH és kortikoszteron szintjeire
** p< 0,01 eltérés a kontroll kölykökhöz képest, # p= 0,057 ## p< 0,01 eltérés a di/+ genotípushoz képest , + p< 0,05 eltérés a hímekhez képest.

A kortikoszteron szintek vizsgálata során megfigyelhettük, hogy stressz hatására mindkét genotípusban emelkedett a hormonszint (55. ábra, lsd. még 46.B ábra; szeparáció hatása: p<0,01). Mind a nyugalmi szintek, mind pedig a stressz indukálta hormonszint emelkedés magasabb volt AVP hiányos állatokban (genotípus és szeparáció-genotípus interakció: p<0,01). A nőstények kortikoszteron értékei magasabbak voltak (ivar hatás: p<0,01).

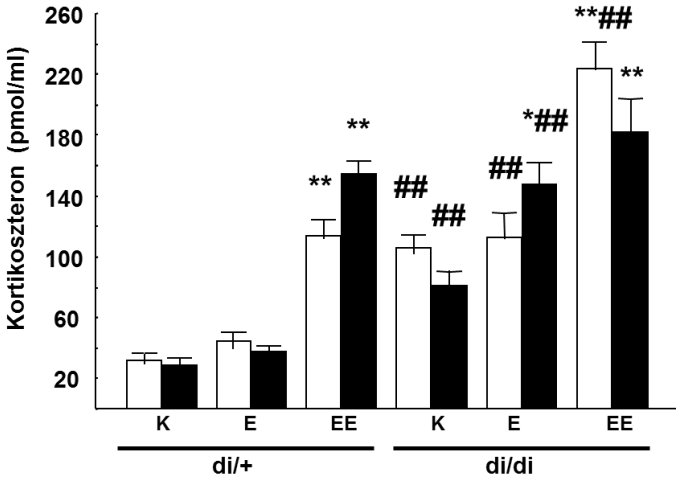
4.3.2.2. Ismételt éter stressz

Éter stressz alkalmazása során mintegy kétszeresére emelkedett a plazma ACTH szintje a di/+ állatokban és ismételt éter stressz további emelkedést váltott ki (56. ábra; stressz hatás: p<0,01). AVP hiányában a stressz indukálta ACTH szint emelkedés szignifikánsan kisebb mértékű volt (genotípus hatás és stressz-genotípus interakció: p<0,01). A nőstény állatok esetében a hormonszintek magasabb voltak, mint a hímek esetében (ivar hatása p<0,01).



55. ábra
ACTH szintek változása egyszeres és ismételt éter stressz hatására *p<0,05 **p<0,01 eltérés a kontroll csoporthoz képest; ##p<0,01 eltérés a di/+ csoporttól; +p<0,05 eltérés a hímektől
K=kontroll
E= egyszeri éter belélegzés,
EE= kétszeri éter belélegzés

A plazma kortikoszteron szintje nyugalmi állapotban a di/di genotípusú állatokban magasabb volt (57. ábra; genotípus hatás és stressz-genotípus interakció: p<0,01). Egyszeres éter stressz kizárólag az AVP hiányos nőstények esetében okozott szignifikáns hormonszint emelkedést (stressz-genotípus-ivar interakció: p=0,05). Az ismételt stressz esetében már mindkét genotípusban megfigyelhetőek voltak a stressz indukálta változások.



56. ábra
A kortikoszteron szintek változása egyszeri (E) és kétszeri (EE) éter belélegzés hatására 10 napos kispatkányokban. *p<0,05 **p<0,05 eltérés a kontroll csoporthoz képest; ##p<0,01 eltérés a di/+ csoporttól

5. Megbeszélés

5.1. A vazopresszin szerepének vizsgálata akut stresszhelyzetekben

5.1.1. Különféle akut stresszhelyzetek hatása

Akut stresszhelyzetekben az AVP-nek fontos, **stresszorspecifikus szerep** jut az ACTH szekréciójának szabályozásában.

3 különböző stresszválasz típust figyeltünk meg az *AVP hiányos állatokban*:

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 (szociális elkerülés, foot-shock, éter belélegzés stressz).

Feltételezhető, hogy a különböző stresszorok kiváltotta stresszválaszok különböző neuronális útvonalakon keresztül valósulnak meg, melyek közül egyesek AVP tartalmú idegsejteket is érintenek, míg mások nem [167]. A bevezető részben már tárgyalásra került a stresszorok csoportosításának problémája. Jelen esetben az általunk felvázolt 3 stresszválasz-lehetőség nem illeszthető tökéletesen az ott említett egyik csoportosításhoz sem. Így azt mondhatjuk, hogy az AVP az egyes stresszorok vonatkozásában (esetleg azok só-víz háztartást befolyásoló szerepével némileg összefüggésben) eltérő fajsúllyal vesz részt a HHM tengely aktivációjában az esetleges kategóriáktól függetlenül.

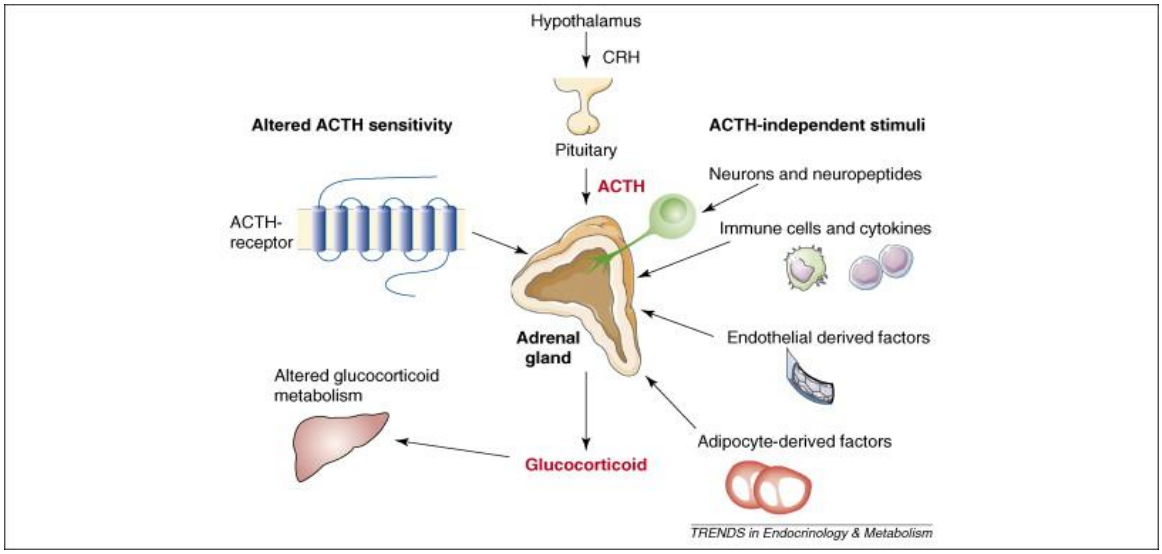
Jelentős megfigyelésünk az is, hogy a kortikoszteron szintek változása a vérben nem mindig tükrözi az ACTH szintjének változását (6. táblázat). Az összefoglaló táblázatból kiolvasható, hogy a stresszorok mintegy 70%-a esetén (18-ból 13 stresszor) megfigyelhető a di/di genotípusú állatok csökkent ACTH válasza. Ebből a 13 esetből, azonban csak 4 esetében figyeltünk meg csökkent kortikoszteron elválasztást. Ez a jelenség nem magyarázható pusztán azzal, hogy az ACTH csúcs korában jelentkezik, mint a kortikoszteron csúcs (lsd. időgörbék). Esetlegesen magyarázható lenne a jelenség a

mellékvesék fokozott ACTH érzékenységével, de felnőtt AVP hiányos állatokban az ACTH érzékenység *csökkenését* figyeltük meg (23. ábra; további hasonló tapasztalatok: in vitro vizsgálatok: [168], in vivo vizsgálatok: [169]), így ez sem ad magyarázatot az ACTH és kortikoszteron válaszok disszociációjára. Az ACTH és kortikoszteron stresszválasz közötti disszociáció megfigyelhető volt V1b receptor antagonistákkal kezelt Sprague–Dawley patkányokban [170], illetve a V1b receptor kiütött egerekben is [171]. Ez rávilágít arra, hogy a jelenség nem jellemző kizárólagosan egyetlen fajra, illetve törzsre, esetünkben a Brattleboro patkányokra. Létezhetnek olyan közvetítő molekulák a szervezetben, melyek közvetlenül a mellékvesén hatva befolyásolják a glükokortikoidok elválasztását (58. ábra). Valóban, Bornstein és munkatársai számos ilyen lehetséges molekulát foglaltak össze és a **splanchnikus beidegzésnek** tulajdonították a legnagyobb jelentőséget [172]. Eredményeink is alátámasztják az úgynevezett paraadenohipofízeális neuroendokrin szabályozás elméletét [173], ugyanakkor további vizsgálatok elvégzését teszik szükségessé.

6. Táblázat

Különféle akut stresszorok ACTH és kortikoszteron emelő hatásának összefoglalása

	Stressz	**Vérvétel módja**	**ACTH változás di/di-ben**	**Kort. Változás di/di-ben**
1	Újdonság	dekapitálás	**#:** szignifikánsan alacsonyabb, mint di/+-ban	nincs változás
2	Szociális elkerülés	farokvágás	nincs változás	nincs változás
3	EPM	farokvágás	#	nincs változás
4	LPS	dekapitálás	**(#)**	nincs változás
5	Éter stressz	iv	nincs változás	nincs változás
6	Térfogati stressz	iv	#	# 15 percnél
7	Hipertóniás só	iv	#	nincs változás
8	Anafilaktoid reakció	iv	#	nincs változás
9	Foot-shock doboz	iv	nincs változás	nincs változás
10	Foot-shock	iv	nincs változás	nincs változás
11	Mozgáskorlátozás	iv	#	#
12	Szociális kudarc	iv	#	#
13	Ulcerogén hideg stressz	iv	# 60 percnél	nincs változás
14	Hipoglikémia	dekapitálás	#	nincs változás
15	FST	iv	# 5 percnél	nincs változás
16	Morfin kezelés	iv	#	#
17	NMDA kezelés	iv	nincs változás	nincs változás
18	Kainát kezelés	iv	# 5 percnél	nincs változás



57. ábra

A mellékvese glükokortikoid elválasztásának lehetséges fokozói

Trends in Endocrinology and Metabolism

A magnocelluláris eredetű AVP-nek rendkívül fontos szerep jut a szervezet vízháztartásának szabályozásában. Ugyanakkor **ozmotikus stimulusok** hatására a parvocelluláris neuronokban is gyorsan változik az AVP mRNS szintje [174]. Kísérleteinkben azt vártuk, hogy az AVP-nek erőteljes szerepe lesz a HHM tengely szabályozásában ozmotikus stimulust jelentő stresszhelyzetekben. A vizsgálatok eredménye azonban nem erősítette meg a feltételezéseinket és Brattleboro patkányok esetében a korábbi vízmegvonásos kísérletek hasonló eredményeket hoztak [175]. Az egyik lehetséges magyarázat az lehet, hogy az OT az, amely AVP hiányában az ozmotikus rendszert érintő változások, stresszhelyzetek során átveszi a szabályozást [176]. Valóban, a dialízis vizsgálatok során emelkedett OT szinteket sikerült kimutatnunk a di/di állatok PVN-jében (lsd. 4.2.3.; 26. és 27. ábra) és ismert, hogy az OT képes az AVP receptorokhoz kötődni [176]. Megfigyeléseink szerint a „térfogati” terhelésre (1,5ml/100g az i.p. hipertóniás só oldat kísérlet kontroll kezelést kapott állatai) a HHM tengely aktivációja jelentősen kisebb volt az AVP hiányos állatoknál (csak kontroll állatoknál genotípus hatás: p=0,01). Ez az

eredmény egybehangzik azzal, hogy a „ térfogati” változások (pl. vérveszteség) AVP szint emelkedést okoz [177, 178].

Az alkalmazott stresszorok közül az **immun**rendszer aktiválása és a hipoglikémiás stimulus esetén figyelhettük meg az AVP ACTH elválasztás szabályozásában betöltött jelentős szerepét a kortikoszteron szintekre gyakorolt hatás nélkül. Előbbiek esetében erőteljes aktiváció figyelhető meg a PVN-ben, különösen az AVP tartalmú neuronok esetében [179], bár az aktiváció nem kizárólagosan a parvocelluláris neuronokra korlátozódik. A tojásfehérje stressz esetében igen erőteljes volt a genotípusok közötti különbség, míg az enyhébb ACTH emelkedést okozó LPS stimulusnál csak a di/+ állatokban volt megfigyelhető ACTH emelkedés, a di/di állatoknál nem. Ezen eredmények összecsengenek V1b receptor kiütött egereken [18], és V1b antagonistákkal végzett vizsgálatok eredményeivel [170] és alátámasztják az AVP szerepét az immunrendszert (is) aktiváló stresszorokra adott válaszok esetében.

Az inzulin indukálta **hipoglikémia** esetében az AVP felszabadulás a hipofízis portális keringésébe meghaladta a CRH felszabadulását [180]. Az AVP szerepét a V1b receptor kiütött egerek tanulmányozásával is sikerült bizonyítani, nemcsak a vércukorszint szabályozás [181], hanem a HHM tengely aktiváció tekintetében is [18, 181]. Saját kísérleteink eredményeiből arra következtettünk, hogy az AVP-nek erőteljes, bár nem kizárólagos szerep jut az ACTH elválasztás szabályozásában az inzulin indukálta hipoglikémia során. A V1b receptor génkiütött állatokkal végzett kísérlet eredményeivel szemben a Brattleboro patkányokban az ACTH szint csökkenést nem követte változás a kortikoszteron szintekben.

Az AVP szerepe a **HHM tengely alapszint**ű aktivitásának fenntartásában (az ACTH és a kortikoszteron elválasztásában) nem kellően támogatott sem saját vizsgálataink [159, 182, 183], sem diabetes insipidusban szenvedő páciensekkel végzett vizsgálatok eredményei alapján [184]. Mind in vivo, mind pedig in vitro vizsgálatok rámutattak arra, hogy a CRH kezelés hatására bekövetkező ACTH elválasztás kisebb mértékű AVP hiányos állatokban [185]. Ezen eredmények alátámasztják, hogy az AVP elsősorban a CRH ACTH szekretagóg hatását erősítheti [114, 174, 186].

Magától adódik az a feltételezés, hogy a Brattleboro patkányokban néhány molekula, mint „AVP hiányt kompenzáló anyag” lehet jelen. Nyugalmi körülmények között a **CRH mRNS** szintje magasabb di/di genotípusú állatainkban [128] (lsd. 32. ábra, bár az emelkedés nem nagyon markáns, csak az egész magra vonatkoztaott integrált denzitás értékekben jelenik meg; 4.1.16.3. esetén nincs lsd. később). Ennek ellentmondanak Krajer és munkatársainak vizsgálatai [187]. Megfigyeléseik szerint sem a hipotalamuszban sem pedig a portális vérben nem változik a CRH szintje az AVP hiányos Brattleboro patkányokban. Amennyiben a kompenzáló anyagokról beszélünk egyértelmű, hogy az AVP-vel nagy szerkezeti hasonlóságot mutató **OT**-ról is beszélnünk kell (lsd. fentebb). Saját megfigyeléseink szerint bár a PVN-ben megfigyelhető és mérhető az OT mRNS mennyiségének emelkedése, ugyanakkor funkcionálisan a helyettesítés nem tökéletes (egyébként soha nem látnánk csökkent ACTH és/vagy kortikoszteron szinteket) [157]. Brattleboro patkányok esetében a stresszválaszok szabályozásban szintén nagyon fontos **szimpato-adrenomedullaris tengely** aktivitása magasabb az AVP hiányos, di/di genotípusú állatokban [188]. Az OT mellett számos más, eddig ismeretlen, vagy ismert, de kevésbé kutatott anyag létezhet, amelyek az AVP hiányos állatokban átvehetik a hiányzó AVP HHM tengely szabályozó szerepét. Így tanulmányok mutatnak rá, hogy a atriális nátriuretikus peptid szintje di/di állatokban emelkedett [189], és összefüggést találtak a hipotalamikus hisztaminerg és AVP rendszer között is [190].

A kísérletek során felvetődhet az a kérdés, hogy vajon a heterozigóta állatok megfelelő kontrollként szolgálnak-e. A kérdés megválaszolására egyes stressz kísérleteink során a megszokott heterozigóta kontrollok mellett további kontroll csoportokat (Wistar patkányok, +/+ genotípusú Brattleboro patkányok) használtunk [147, 148]. Vizsgálataink alátámasztották korábbi megfigyelésinket. Már egyetlen tökéletesen funkcionáló allél elég ahhoz, hogy az AVP termelés normál szintet érjen el és a HHM tengely aktivációja (pl. ulcerogén-hideg stressz) ne szenvedjen zavart. A perifériás AVP hiányában kialakuló diabetes insipidus már önmagában krónikus stressz állapotot eredményezhet, ennek következtében csökkent stresszreaktivitás alakulhat ki további stresszorokkal szemben [30]. Hogy kísérleteink során kizárjuk a perifériás AVP hatását egy kísérletünkben (FST)

DDAVP tartalmú ozmotikus minipumpát alkalmaztunk, s bizonyítottuk, hogy a bekövetkezett változások esetében a centrális AVP hiánynak volt szerepe.

Az AVP hiánya elsősorban az **ACTH** szinteket befolyásolta, sokkal kevésbé volt hatással a kortikoszteron szint emelkedésekre. Alapvetően elfogadott tény, hogy a HHM tengely „végterméke" a kortikoszteron, ez felelős a hatásokért. Ugyanakkor az ACTH és kortikoszteron elválasztás nem feltétlenül mutat kapcsoltságot. Mi lehet tehát az „értelme" az ACTH szintek szabályozásának? Amellett, hogy jól ismert módon a glükokortikoidok felszabadítását serkenti a mellékvese kéregből, nem elhanyagolható más mellékvese kérgi sejtekre gyakorolt hatása sem. Többek között befolyásolja ezen sejtek koleszterin felvételét. Hatással van a szteroidok szintézisében résztvevő enzimeket kódoló gének működésére, így a mineralokortikoidok révén közvetve részt vesz a só-vízháztartás szabályozásban. A szexuálszteroidok elválasztásának befolyásolásával pedig a nemi érésben is fontos szerepet játszik [191]. ACTH receptorok jelenléte egyértelmű a mellékvese kérgi sejtjeiben [192], ugyanakkor megtalálhatóak még a zsírsejteken [193], bőrsejteken [194], illetve megtalálták még őket a szimpatikus ganglionokban is [195]. Egyes vizsgálatok az ACTH-t mint lehetséges immunmodulátort tartják számon [196].

5.1.2. Mikrodialízis vizsgálatok

Az ehhez a sorozathoz tartozó kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a veleszületett AVP hiány nem csökkentette a 10 perces FST hatására bekövetkező ACTH és kortikoszteron elválasztást a kezdeti időpontokban. Viszont míg a +/+ genotípusú állatokban 105 perccel az úszás teszt megkezdése után a plazma OT és kortikoszteron szintjei az alap értékekhez tértek vissza, a di/di állatokban ezen hormonok szintje emelkedett maradt. Amennyiben a PVN-ben megvizsgáljuk az OT mRNS, illetve az extracelluláris folyadék OT szintjét, szintén magasabb értékeket mértünk a di/di állatokban a stressz előtt, alatt és után, mint a normál AVP szintű állatokban.

Szintetikus AVP retrodialízis során az FST hatására mind az ACTH, mind pedig a kortikoszteron esetében hasonló szekréciós mintázatot figyelhettünk meg a kontroll és AVP kezelt di/di állatokban, bár a kezelés hatására jelentősen csökkent az összes szekréció. A kezelés elősegítette a plazma OT szintjének hamarabbi lecsengését is.

Korábbi tanulmányok arról számolnak be, hogy 10 perces FST már röviddel a teszt után csökkenti a vérplazma **fagyáspont**ját [124]. A vérplazma laktát szintjének és ionösszetételének német kutatópartnerünk által végzett vizsgálatai alapján azt feltételezhetjük, hogy a plazma fagyáspont csökkenése nem a plazma megemelkedett ozmolalitásának az egyértelmű eredménye. A csökkent fagyáspont inkább magyarázható a magas laktát szintekkel, mint az ionösszetétel (Na^+ és K^+ ion szint) változásával, amelyek korábbi, nem publikált adatok szerint nem emelkednek meg a FST hatására. Jelen kísérletben tapasztalt eredmények nem magyarázhatóak tehát egyszerűen a +/+ és di/di genotípusú állatok vérplazmáinak eltérő ozmolalitásával. Ezt az is alátámasztja, hogy az alap hormonszintek nem különböztek a két genotípus közt, annak ellenére hogy a plazmák ozmolalitásában (+/+: 307.2±4 mOsm/kgH_2O; di/di: 330.8±3 mOsm/kgH_2O; genotípus hatása: $p<0.01$) és Na^+ ion koncentrációjukban (+/+: 136.8±2.1mmol/l; di/di: 148.3±0.9mmol/l; genotípus hatása: $p<0,01$) különbségek figyelhetők meg [197].

Némileg meglepő volt, hogy ebben a kísérletben az FST alatt, illetve röviddel utána az **ACTH és kortikoszteron** szintekben nem volt különbség a két genotípus között. Az előző kísérletsorozatban alkalmazott FST esetén a víz hőmérséklete és mélysége is eltérő volt (24±1°C, a jelenlegi 21±1°C-szal szemben), illetve az előző kísérletben 5 perces mintavétel történt, míg itt 2. és 15. perckor vettünk mintákat. Valamint ott di/+, itt +/+ (agyi műtéten is átesett) állatok szolgáltak kontrollként. Az anya genotípusának befolyásoló hatását kizárhatjuk [148], mivel mindkét kísérletben a di/di tesztállatok di/+ anyáktól származtak. Az előző fejezetben részletesen tárgyaltuk a lehetséges kompenzáló faktorokat. Ebben a kísérletben a CRH mRNS szintekben nem találtunk változásokat. Ez egy módszertani finomítás következménye is lehet, mivel az előző sorozatban (Budapesten végzett vizsgálatok, MTA-KOKI) az integrált denzitást, míg ebben a kísérletben az emulziós előhívást követő legnagyobb keresztmetszeten történő elemzést alkalmaztuk (német kutatópartnerünknél végzett vizsgálatok, Otto von Güricke Universität Magdeburg). Az integrált denzitás érzékenyebb módszer, mert a jel erősségében és kiterjedésben bekövetkező változásokat összegzi, ugyanakkor alaposabb (minden meghatározott számú metszetet fel kell venni) és több munkát (állatonként 1 lemez helyett 4-5 lemez) igényel. A másik kézenfekvő kompenzációs molekula az OT. Ennek vonatkozásában már egyértelmű

eredményt kaptunk nemcsak az mRNS szintjén tekintve, hanem az extracelluláris térbe az idegsejtek szómájából és a dendtritekből ürülő (mikrodialízis segítségével mérhető) peptidre vonatkoztatva is [198, 199].

A centrális és perifériás hormonszintek disszociációját ebben a kísérletben is megfigyelhettük [124]: a di/di állatokban a magasabb centrális **OT** szintek ellenére a **plazma** szintek nem különböztek sem nyugalmi állapotban, sem a stressz után közvetlenül. Ellenben 105 perccel a 10 perces FST kezdete után mérhető OT értékek az AVP hiányos állatokban nem „csengtek le", hasonlóan a kortikoszteron szintekhez. Ez az új adat még árnyaltabbá teszi a HHM tengely szabályozásáról kialakult képet, bár továbbra is nehéz magyarázatot találni az elnyújtott OT válaszra. Korábbi tanulmányok arra világítanak rá, hogy az FST **gyors** (2 percen belüli) és **átmeneti**, gyorsan lecsengő AVP felszabadulást vált ki a plazmába [124, 200]. A két eredmény összegzése alapján nem mondhatjuk azt, hogy az elhúzódóan magas OT szint csupán az AVP hiányt kompenzáló mechanizmus (hiszen ekkor gyors OT felszabadulást és gyors hormonszint csökkenést várnánk). Itt érdemes megjegyezni, hogy a különböző stresszorok hatására szekretálódó OT fő forrása a PVN magnocelluláris sejtjei [201]. Véleményünk szerint az FST során a PVN intracelluláris terébe jutó AVP lehet a kulcs az OT plazma-szintek gyorsabb „lecsengésében". Úgy tűnik, hogy a felnőtt Brattleboro állatokban nem kompenzálódik teljes mértékig az AVP hiánya, s ez vezet a 105. percben megfigyelhető magas OT szintekhez. Ez a magas plazma OT szint lehet a felelős az ugyanazon vérmintában mérhető magasabb kortikoszteron-szintekért. Bár van néhány adat arra vonatkozóan, hogy az OT-nak közvetlen hatása van a mellékvesék kortikoszteron termelésére [202], további vizsgálatok szükségesek annak bizonyítására, hogy ezek az útvonalak a Brattleboro patkányokban is működnek, azaz kielégítően magyarázzák a kapott eredményeket.

Az a hipotézisünk, hogy a PVN-ben helyileg felszabaduló AVP gátló hatású lenne az OT plazmába történő ürítésére, magyarázza a mikrodialízis kísérletekben kapott eredményeinket is. Nevezetesen a di/di állatok **extracelluláris** terében mérhető magasabb **OT** szinteket. Az in situ hibridizációs vizsgálataink is emelkedett OT **mRNS** szinteket mutattak, de nemcsak a PVN magno-, hanem a parvocelluláris részében is. Mivel ez a parvocelluláris rész beékelődött magnocelluláris sejteket is tartalmaz [203], az is

elképzelhető, hogy elsősorban ezek a sejtek járultak hozzá az mRNS szint emelkedéséhez [204]. Fontos megemlítenünk, hogy az AVP hiányos állatok magasabb extracelluláris OT koncentrációja nemcsak nyugalmi állapotban, de akut FST stressz alkalmazása esetén is megfigyelhető volt. Mint korábban említettük, ez a stressz nemcsak az OT, hanem az AVP intra-PVN elválasztásának emelkedését is okozza [124]. Előző vizsgálatok arra utaltak, hogy a stressz hatására a PVN-ben felszabaduló AVP nemcsak autokrin, hanem parakrin szabályozó faktor is lehet. Feltehetőleg a parvocelluláris sejtek CRH termelését szabályozza, s ezáltal a HHM tengely centrális komponensét befolyásolja [205]. Feltételezhetjük, hogy a di/di állatok PVN-jének extracelluláris terében mérhető magasabb OT szint az AVP parakrin szerepének kompenzálására alakul ki. Valóban, a hipotalamusz szintjén az OT gátolja a HHM tengely működését [206, 207]. Továbbá nagy koncentrációjú OT a PVN-ben megtalálható V1a [208] és V1b receptorokhoz [209] is képes kötődni, legalábbis *in vitro* körülmények között. Azaz a PVN megemelkedett extracelluláris OT szintje hozzájárulhat ahhoz, hogy jelen kísérletben nem találtunk különbséget az FST hatására megemelkedő ACTH és kortikoszteron szintekben.

A **retrodialízis kísérlet** során kapott ACTH, kortikoszteron és OT plazma szintek lefutása a kontroll, Ringer oldatot kapott állatokban nagyon hasonló volt a **mikrodialízis kísérlet**ben tapasztalathoz. Az AVP inverz mikrodialízissel történő beadásának következtében (amivel megpróbáltuk modellezni az AVP stresszre bekövetkező endogén elválasztását) kisebb ACTH (2. perckor) és kortikoszteron (15. és 105. perckor) szint emelkedések jöttek létre a 10 perc FST hatására. Több, mint 10 éve feltételezték, hogy az akut stresszorok hatására a PVN-ben termelődő és az extracelluláris térbe jutó AVP gátló hatással bír a HHM tengely működését tekintve [205]. Ezt jelen eredményeink is alátámasztják. A HHM tengelyen való hatáson túl az AVP retrodialízis hatására az OT plazma szintjének lefutása is normalizálódott (105 perces érték). Ezek az eredmények azért is különösen érdekesek, mert a retrodialízis csak az egyik oldali PVN-be történt, így feltételezhetjük, hogy a kétoldali kezelésnek még nagyobb hatása lett volna. Retrodialízis kísérleteink eredményei igazolják előzetes feltevésünket és kiterjesztik azzal a megállapítással, hogy az AVP a PVN-ben nemcsak a CRH termelő parvocelluláris, hanem az OT termelő magnocelluláris sejtek működését is befolyásolja.

Összegzésként megállapíthatjuk, hogy a PVN-ben felszabaduló AVP parakrin szignálként elősegíti a plazma OT- és kortikoszteron-szintek normalizálódását akut stresszt követően. Az AVP hiányos állatokban a magasabb OT szintek részben kompenzálhatják az AVP HHM tengelyre gyakorolt hatását (legalábbis az FST vonatkozásában).

5.1.3. A vazopresszin hiányos állatok vizsgálata akut morfin kezelés után

Rágcsálókkal végzett kísérletek alapján ismert, hogy egyetlen morfin kezelés is a HHM tengely aktivációját okozza (pl.[210]). A morfin megvonás együtt jár a HHM tengely stimulálásával és fokozza a HHM tengely mindhárom szintjén a hormonok elválasztását [161, 211]. Kísérletünk során egyetlen, 10 mg/kg dózisú sc morfin injekció kétfázisú ACTH és kortikoszteron szint emelkedést váltott ki a patkányokban. Feltételezhetően az első hormonszint emelkedés a morfin injekció által kiváltott fájdalom miatt következett be. A második fázis már a morfin fiziológiás hatásával magyarázható. A kísérlet eredményeiből látszik, hogy már az egyszeri morfin injekció is elnyújtott változásokat eredményez, amennyiben a plazma ACTH- és kortikoszteron-szintjeit vizsgáljuk, összehasonlítva a fiziológiás só oldatot kapott kontroll állatokkal. A morfin injekció által kiváltott ACTH emelkedés első fázisban az 5. percben, majd második fázisban a 60. percben éri el a csúcsot mindkét genotípusban.

Az AVP hatása az egész kísérleti periódus alatt felfedezhető, hiszen annak hiányában a morfin indukálta hormonszint emelkedések kisebb mértékűek. Ez rávilágít arra, hogy az AVP szükséges ugyan, de nem kizárólagos szerepű a morfin indukálta HHM tengely aktivációban. Itt említenénk meg azt is, hogy a di/di állatok esetében tapasztalt OT szint emelkedés részben kompenzálhatta a centrális AVP hiányt.

5.2. Vazopresszin szerepe krónikus stresszben

5.2.1. Krónikus morfin kezelés utáni megvonás

Az általunk is alkalmazott tartós morfin kezelés (valószínűleg az ismételt rövid morfin megvonások hatására) krónikusan aktiválja a HHM tengelyt [160, 161]. Annak ellenére, hogy az AVP-nek jelentős szerepet tulajdonítottak a krónikus stressz által kiváltott

HHM tengely aktivációban [30, 32], előzetes kísérleteink már utaltak rá, hogy az AVP hiányos Brattleboro patkányokban a krónikus stressz (2 hét ismételt mozgáskorlátozás [183], vagy streptozotocin indukálta cukorbetegség [182]) által kiváltott változások nem maradnak el. Valóban, jelen kísérletünkben sem láttuk, hogy az AVP hiánya befolyásolta volna a krónikus stresszre létrejövő szomatikus változásokat. Ugyanakkor hormonszintek tekintetében mi a morfin elvonás okozta változásokra helyeztük a hangsúlyt, ellentétben korábbi tanulmányokkal, melyek az ismételt morfin kezelés hatásaira koncentrálnak [160, 161]. AVP hiányában a drogmegvonás kiváltotta hormonszint emelkedések kisebb mértékűek voltak.

Ellentmondásosnak tűnhet, hogy a di/di genotípusú állatokban mérhető az **AVP mRNS** szintje a PVN parvocelluláris neuronjaiban. Jól ismert, hogy a homozigóta „beteg" állatok pontmutáció révén hibás AVP génjéről történik átírás mRNS-re, de az mRNS „beragad" az endoplazmatikus retikulumba [146], valamint a génexpresszió mértéke az életkor előrehaladtával csökken [146]. Az in situ hibridizáció során felhasznált AVP ribopróba szekvenciája olyan, hogy képes a mutáns AVP mRNS-hez is kötődni. Így a di/di állatok PVN-jének parvocelluláris sejtjeiben az AVP mRNS szintje normálisnak mérhető, bár nem szabályozódik. Nincs adat arra vonatkozóan, hogy ez egy állandó "készlet"-e vagy némileg szabályozott a szintje.

A di/+ genotípusú, kontroll állatokban az AVP mRNS szintje igen hamar, már 4 órával az utolsó morfin injekció után emelkedik. Érdekes, hogy a hosszabb időtartamú, 16 órás elvonás esetében már nem tapasztalunk mRNS szint emelkedést, a folyamat a periódus végére „lecseng". Ez a megfigyelés alátámasztja korábbi feltevésünket, miszerint az AVP-nek inkább a rövid, mint a hosszú távú HHM tengely aktivációban, illetve annak szabályozásában lehet szerepe. Houshyard és munkatársai [211] cikkükben arról számolnak be, hogy hosszabb időn keresztül végzett morfin adagolás nem volt hatással a PVN-ben mért AVP mRNS szintjére, illetve Zhou és munkatársai [212] tanulmányában láthatjuk, hogy az amigdalában mért AVP mRNS szint emelkedés csak a heroin elvonás korai szakaszában volt figyelhető meg.

Az általános vélekedéssel [30] összhangban, a krónikus morfin kezelés hatására saját kísérletünkben is megemelkedett a PVN-ben a **CRH mRNS** szintje. Igen fontos

megfigyelés, hogy a CRH mRNS szintjének változásai mintegy ellentétét képezték az AVP mRNS szintekben megfigyelteknek. A 4 órás elvonás nem [174], de a 16 órás már képes volt emelni az mRNS szintjét, ez pedig azt sejteti, hogy az AVP-vel ellentétben a CRH inkább a HHM tengely hosszabb távú változásainak szabályozásában vesz részt. Az AVP hiányos állatokban emelkedett a CRH mRNS bazális szintje - ez feltehetően egy a lehetséges kompenzatórikus mechanizmusok közül - azt azonban nem tudjuk egyértelműen megmagyarázni, hogy a 16 órás elvonás miért nem vált ki további CRH mRNS szint emelkedést. Lehetséges, hogy a di/di állatok emelkedett nyugalmi CRH mRNS szintje már egy maximális szintet képvisel és további emelkedés nem lehetséges.

Az ópiátok kiváltotta hatások kialakításában nem kizárólag a HHM tengely elemei, hanem extrahipotalamikus területek, illetve mediátorok is részt vehetnek [213]. Ilyen agyi terület lehet például az opioid elvonás esetén a centrális **amigdala** (CeA) amely gazdag endogén opioid vegyületeket termelő sejtekben. Továbbá korábbi tanulmányokból ismert, hogy az opioid, AVP és CRH rendszer között funkcionális kapcsolat áll fenn [212, 214]. Ennek ellenére nem tapasztaltunk szignifikáns CRH mRNS szint emelkedést a morfin kezelt állatok CeA-jában, amit Houshyard és munkatársai [211] is alátámasztottak. Másfelől azonban az opioid elvonás gátolta az amigdala CRH expresszióját az AVP hiányos állatokban [215].

Az ACTH prekurzor **POMC mRNS**-nek a szintje lassan emelkedett az elszenvedett kezelések hatására, azaz ez is a hosszútávú hatásokat tükrözi, ahogyan már mások is megállapították morfin [216] és heroin [212] függő patkányokban. Kísérleteinkben mind a rövid, mind pedig a hosszabb időtartamú morfin elvonás hatására mérhetően emelkedett a POMC mRNS szintje a hipofízis első lebenyében, de ez az emelkedés nem függött a genotípustól. Tehát esetünkben az AVP hiány nem befolyásolta sem az alap, sem pedig a stressz által indukált emelkedést.

A stressz **krónikus**sá válását jelzik a testsúlyok csökkenése, a mellékvese hipertrófiája, a csecsemőmirigy beolvadása, valamint az emelkedett kortikoszteron alapszintek [217]. Mindezen elváltozások megfigyelhetők a morfin-függő állatainknál, vagyis az általunk is alkalmazott kezelési protokoll valóban krónikus stressz-szerű állapotot hozott létre [211, 217]. Habár a kiinduló hipotézisünket kénytelenek vagyunk elvetni, mivel

az AVP hiánya egyik felsorolt paraméter változását sem befolyásolta. A di/di állatok kisebbek, állandó ivási kényszerük van, így feltehető, hogy „nyugalmi” körülmények között is krónikus stressz állapotban vannak. Ezt alátámasztja a magasabb „nyugalmi” kortikoszteron szintjük is. Ennek megfelelően feltehetjük, hogy bennük további, krónikus stresszre utaló elváltozások nem képesek kifejlődni. Ennek ellentmond, hogy az AVP hiányában még fokozottabb csecsemőmirigy beolvadás jött létre.

Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy az AVP-nek fontos szerepe van a morfin elvonás által kiváltott hormonális változások szabályozásában, ugyanakkor nem tulajdonítható neki szerep a HHM tengely krónikus hiperaktivitásának a kialakulásában.

5.2.2. Mozgáskorlátozás 28 napig

Eltérő időtartamú mozgáskorlátozásos kísérleteink rávilágítottak arra, hogy már akár 8 nap, napi egy órás mozgáskorlátozás hatására is kialakulnak a krónikus stresszt jelző szomatikus paraméterváltozások [183]. Az AVP hiánya nem befolyásolta sem a szomatikus változásokat, sem pedig a hipofízis elülső lebenyében mért POMC mRNS szint emelkedést, akárcsak a kortikoszteron alapszintjének enyhe emelkedését. Felmerült ugyanakkor, hogy akár 14 nap is kellően krónikusnak tekinthető-e (lsd. 1.2.). Ezért ebben a kísérletben 28 napos, napi egy órás mozgáskorlátozást alkalmaztunk.

Az összes eddigi vizsgálatunk arra utalt, hogy a **nyugalmi hormonszintek** fenntartásában nincs szerepe az AVP-nek. Több vizsgálat is beszámol arról hogy az AVP önmagában is képes az ACTH szekrécióját stimulálni [218], ezáltal a kortikoszteron alapszintjének szabályozásában is részt vehet. Amennyiben ez a hatás érvényesül, a di/di genotípusú állatokban inkább alacsonyabb, mint magasabb ACTH és kortikoszteron szinteket kellett volna mérnünk. Laulin és munkatársainak [219] eredményei is kérdésessé teszik az AVP nyugalmi stressz-hormon szekréciót fenntartó szerepét, bár az irodalomban több ellentmondó adatot is találunk. Az ellentmondások magyarázata lehet a nem megfelelő kontrollok használata [147], vagy az anya genotípusának hibás megválasztása [148]. Ahhoz, hogy ennek a faktornak a szerepét minimalizáljuk a kísérleteinkben di/+ és di/di genotípusú állatokat használtunk, melyek di/+ genotípusú anyától és di/di genotípusú apától származtak. Lehetséges magyarázat az is, hogy az AVP hiánya a cirkadián ritmus eltolódást

eredményezi, vagyis egy adott vizsgálati időpontban a két genotípusban azonosak vagy eltérőek is lehetnek a hormonszintek. Az élő szervezetek „endogén órájának” vizsgálata régóta kedvelt témája a neurobiológiának. A kutatások eredményeiből tudjuk, hogy ez az „endogén óra” az SCN, ahol nagy mennyiségben találhatóak vazopresszinerg sejtek [220]. Ezek alapján feltételezhető, hogy az AVP hiánya befolyásolhatja az egész SCN működését vagyis a melatonin termelés ritmikussága is esetleg zavart szenved [221]. Bár a di/di állatok ACTH termelésének ritmikussága hasonlónak bizonyult más fajokhoz, ugyanakkor a fluktuáció amplitúdója nagyobb volt [222].

A **krónikus stressz** egyik alapkérdése, hogy milyen szabályozási folyamatoknak köszönhető a HHM tengely aktivitásának fennmaradása a tartósan magas plazma glükokortikoid szintek ellenére. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy ilyen körülmények között emelkedett AVP elválasztás figyelhető meg [30, 32]. Összehasonlítva a 14 és 28 napos mozgáskorlátozás stressz eredményeit azt láttuk, hogy a hosszabb időtartamú stresszelés alatt hozzászokás alakult ki az állatokban. A di/+ és di/di genotípusú kontroll állatokban a testsúly növekedése egyenletes volt, a növekedési görbék párhuzamosan futnak. Ezzel ellentétesen a stresszelt társaikban az első két hétben a súlynövekedés elmarad, ám genotípustól függetlenül a 3. héten ismét megindul, majd a kísérlet befejezéséig egyenletes növekedés volt megfigyelhető. A HHM tengely hipotalamikus komponensét vizsgálva Ma és munkatársai [223] vizsgálataikban nem tapasztalták a CRH mRNS szint emelkedést 14 napi mozgáskorlátozás hatására, ellentétben Makino és csoportja [224] igen. A 28 nap mozgáskorlátozás emelte a CRH mRNS mennyiségét a PVN-ben. A CRH és AVP mRNS alapszintekben a két genotípus között nem volt különbség. A 28 napos stressz okozta mRNS emelkedések a di/di állatokban nem voltak kimutathatóak. Bár a krónikus stressz hatására létrejövő CRH mRNS szint emelkedés nem volt nagyon erőteljes, de már a mérsékelten emelkedett CRH elválasztás is képes hatékonyan serkenteni a POMC termelődését [30]. Ebben a kísérletben a hipofízis elülső lebenyében mért POMC mRNS alapszintje magasabb volt a di/di állatokban, mint a di/+-os testvéreikben. A krónikus morfin kezeléses kísérletnél a kontroll állatok is kaptak sorozatos injekciókat, amik befolyásolhatták a mért „nyugalmi” és stresszelt szinteket. A di/+ genotípusban a 28 nap stressz POMC mRNS szint emelkedést kiváltott ki, de nem

növelte tovább a di/di állatokban mért értékeket. Feltételezhető, hogy a di/di állatokban a magasabb POMC mRNS szint már maximális, ezt pedig a stressz nem képes tovább emelni. A kortikoszteron alapszintjének vizsgálata során az eredményeink hasonlóak voltak.

28 nap mozgáskorlátozás hatására kialakult testsúly és a HHM tengely mindhárom szintjének (CRH mRNS, POMC mRNS, kortikoszteron) változásai kisebb mértékűek voltak az AVP hiányos állatokban, ezért arra következtethetünk, hogy elnyújtott stressz során az AVP szerepe válik fontossá a HHM tengely aktivitásának fenntartásában, különös tekintettel a krónikus stressz állapotok késői fázisának kialakulására. Aguilera cikkében bár elismeri a CRH lehetséges szerepét, krónikus stresszben inkább a PVN parvocelluláris sejtjei által termelt AVP-t tekinti elsődlegesnek a stresszre adott válaszok kialakításával kapcsolatban. Megfigyeléseink alátámasztják véleményét, hiszen az AVP mRNS esetében nagyobb mértékű emelkedést tapasztaltunk, mint CRH mRNS esetében (112±17% és 74±16% emelkedés).

A kifejezett HHM tengely változásokkal ellentétben a **szomatikus paraméterek** (csecsemőmirigy beolvadás, mellékvese megnagyobbodás) nem mutattak ilyen egyértelmű hatásokat. A két genotípus közti különbségek nagyrészt elhanyagolhatóak voltak, bár a testsúlyok esetén láttunk némi különbséget, és a mellékvese kéreg vastagságának megnövekedése egyértelműen hiányzott az AVP hiányos állatokból. Feltételezhetően a krónikus stresszre jellemző szomatikus paraméterváltozások nem kizárólagosan egyetlen, hanem egy komplex rendszer szabályozása alatt állnak. Bár alapvetően ezeknek a változásoknak a kialakításában a glükokortikoidoknak tulajdonítanak szerepet [225], ám számos más faktor hatását is számításba kell vennünk.

Feltételezhető lenne, hogy egy adott stresszor hosszabb időn keresztüli alkalmazása **habituáció**t eredményez [30], de esetünkben a 28 napos krónikus stressz állapotban akut stresszre bekövetkező hormonszint emelkedések nem különböztek az egyszeri akut stressz hatásától. Igaz, mindkét esetben jelentősnek mutatkozott az AVP hiány hatása: mind az ACTH-, mind a kortikoszteron szint emelkedése kisebb volt a di/di patkányokban. A habituáció jeleként a 28 napos krónikus mozgáskorlátozás stressz után végzett mellékvese szuperfúziós kísérleteink eredménye azt mutatta, hogy krónikus stressz hatására a szervek

ACTH érzékenysége csökkent. Ez az eredmény szükségessé teszi további vizsgálatok elvégzését annak megválaszolására, hogy a csökkent ACTH érzékenység ellenére miért nem tapasztalunk habituációt a plazmaszintekben. Továbbá, munkánk azt mutatja, hogy az AVP hiányos állatok mellékveséinek ACTH érzékenysége valamivel magasabb volt, mint di/+-os testvéreiké (hasonlóan a 10 napos állatokhoz; lsd. 52. ábra). Ez ellentmond Wiley és munkatársai megfigyelésének, akik csökkent érzékenységet tapasztaltak a Brattleboro patkányokban [168], illetve saját korábbi tapasztalatainknak is (lsd. 23. ábra). A módszertani különbségen túl (statikus inkubálás és szuperfúzió) az alkalmazott ACTH dózisa a második, emelkedett érzékenységet mutató felnőtt állatokon végzett kísérleteinkben nagyobb volt. Ezen ellentmondás rávilágít az irodalmi és saját adataink megerősítésének fontosságára. A statikus inkubálás kétségtelen előnyein túl (egyszerűbb kivitelezni, kevesebb mintát generál) talán a szuperfúziós módszer jobban modellezi a szervezetünkben a mirigyekhez áramlás révén jutó molekulák hatását.

Az **AVP mRNS** szintek vizsgálata megmutatja azt, hogy a di/di genotípusú állatok esetében az mRNS szint normális a parvocelluláris sejtekben a PVN-ben, ugyanakkor a szint szabályozása nem valósul meg. A magnocelluláris vazopresszin részvétele a stresszfolyamatok szabályozásában a mai napig vitatott, csoportunk nem tudta megerősíteni ennek szerepét. Az irodalomban azonban fellelhető olyan cikk, mely beszámol arról, hogy ismételt mozgáskorlátozás hatására egyfajta strukturális átalakulás figyelhető meg a magnocelluláris sejtekben [226]. Krónikusan stresszelt állatokban a hipofízis középső lebenyének AVP tartalma csökkent, ugyanakkor a magnocelluláris sejtek mRNS tartalma változatlan maradt. Magyarázhatjuk ezt azzal, hogy a hormonszekréció ugyan fokozódik, de a szintézis nem tud lépést tartani a fokozott ürüléssel.

Összefoglalva az AVP nem játszik szerepet az alapszintű ACTH és kortikoszteron szekréció fenntartásában, de az elnyújtott (28 napos) krónikus stresszre jellemző állapot kialakításában már fontos. Két hetes stressz esetében nem mutatkoztak az AVP szerepének jelei. Feltételezhető, hogy az AVP szerepe a stresszreaktivitás fenntartásában a stressz időtartamának megnyúlásával változik, és ezek a változások több mint két hét alatt alakulnak ki.

5.2.3. Krónikus váltakozó enyhe stressz (CMS) vizsgálata

Hogy korábbi eredményeinket más kísérleti felépítésben is igazoljuk, a korábbiaktól eltérő és időben is hosszabb kísérletsorozatot terveztünk. A CMS nemcsak stressz, de a depresszió modellezésére is széles körben használt, így a HHM tengellyel párhuzamosan az állatok depresszió-szerű magatartás mintáit is tudtuk tanulmányozni. A 6 hetes kísérletsorozat eredményei igazolták (szomatikus paraméterek változása és a HHM tengely változásai: POMC mRNS az adenohipofízisben, nyugalmi ACTH és kortikoszteron szint emelkedések), hogy a stressz krónikus volt. A szorongás (megnőtt zárt kari aktivitás az EPM-en) és depresszió-szerű (több lebegéssel töltött idő az FST-ben) magatartás is megfigyelhető volt a di/+ állatokban a 6 hetes CMS hatására. Az AVP hiányos állatokban megfigyelt változások nagyon hasonlóak voltak a di/+ genotípusú kontrollokban megfigyeltekkel (kivéve a hiányzó nyugalmi kortikoszteron emelkedést és némi tendenciát a táplálékfelvétel és a szorongás befolyásolására), mely arra enged következtetni, hogy a CMS indukálta változások kialakulása független az AVP-től.

Korábbi 2 hetes krónikus stressz vizsgálataink során nem sikerült igazolnunk az AVP szerepét a **krónikus stressz** állapot kialakításában [159, 182, 183], de 28 nap során a szerepe sokkal fontosabbá vált. Éppen ezért volt meglepő a jelen eredményünk. Bár azt is mondhatjuk, hogy a HHM tengely „végrehajtó” molekulája, a kortikoszteron érzékeny az AVP jelenlétére. Gyakran látható megemelkedett „nyugalmi” kortikoszteron szint a következő stimulus várható időpontjában. A CMS esetünkben is létrehozta ezt a „nyugalmi emelkedést”, de AVP hiányában ez nem jött létre. Már említettük, hogy az ACTH szintek nem feltétlenül futnak párhuzamosan a kortikoszteron-szintekkel. Kísérletünkben a látszólagos különbség ellenére az ACTH és kortikoszteron szintek közötti korreláció erősen szignifikáns volt. Továbbá a mellékvesék fokozott kortikoszteron elválasztásának következtében kialakuló tünetek (pl. csecsemőmirigy beolvadás) mindkét genotípus esetében hasonló mértékben voltak megfigyelhetőek. Meglepő módon a fokozott elválasztás mellett sem tapasztaltunk mellékvese hipertrófiát, mely a krónikus stressz egyik jellemző tünete és háttérül szolgálhat az emelkedett nyugalmi kortikoszteron elválasztáshoz is. Feltehetőleg az általunk alkalmazott stresszorok nem voltak elég erősek ahhoz, hogy mérhető változásokat indukáljanak a mellékvesékben, annak ellenére, hogy a

hiperkorticizmus fennállt (a plazma vizsgálatok alapján), ami pedig erőteljes változásokat indokolt volna. Lehetséges, hogy a mellékvese szerkezetének sajátos átrendeződése áll a jelenség hátterében: a zona fasciculata esetleges kiszélesedése a többi réteg beolvadása mellett. Az is elképzelhető, hogy ugyan a "nyugalmi" kortikoszteron szint kisebb a di/di állatban, de a stresszreakció lecsengése elhúzódóbb (lsd. Mikrodialízis kísérlet) így az átlagos kortikoszteron kínálat ugyanolyan lesz a di/di, mint a di/+ állatban.

Ismert, hogy a stressznek, a stressz hormonoknak és különösen a glükokortikoidoknak fontos szerepe van az állatok viselkedésének szabályozásában [227, 228]. Mivel az AVP hiány, valamint a CMS procedúra nem befolyásolta az izomerőt vagy a mozgáskoordinációt, ezért további, az állatok valamilyen mozgását feltételező vizsgálatok értelmezhetőek voltak. A **szorongás** klasszikus mércéjéül szolgáló nyíltkari aktivitás CMS hatására erőteljesen lecsökkent az EPM-en, alátámasztva egy szorongóbb fenotípus kialakulását. Számos korábbi vizsgálat utalt az AVP lehetséges szorongáscsökkentő szerepére (pl. [134, 138, 229]). Ezért azt gondoltuk, hogy a di/di állatokban fokozott nyíltkari aktivitást tudunk majd megfigyelni. Ezzel ellentétben sem alap állapotban, sem CMS után nem sikerült az AVP szerepét bizonyítani a fő paraméterek vonatkozásában. Habár a részletes vizsgálat szerint a CMS csak a di/+ állatokban eredményezett kevesebb nyílt karban töltött időt, arra utalva, hogy az AVP-nek mégis lehet szorongáscsökkentő szerepe. Griebel és munkatársai [127] bizonyították egérben, hogy a CMS hatására csökkent a nyílt kari belépések száma, és ezt a csökkenést V1b receptor antagonistával sikerült kivédeniük. Arra gondolhatunk, hogy az AVP élethosszig tartó hiánya a Brattleboro patkányokban befolyásolhatja az AVP szorongáscsökkentő szerepét (másodlagos elváltozások pl. a dopamin rendszerben [230]). A fokozott mozgékonyság, amit a fokozott zárt kari belépéssel mértünk, szintén a CMS szorongásfokozó hatására utalhat [231], bár számos kísérletben nem találtak hasonló változást krónikus stresszelések után [232]. Mindenesetre az AVP erre a paraméterre sem hatott. A mosakodási magatartás csökkent előfordulása a Brattleboro patkányokban azonban egyértelműen a csökkent szorongást jelzi. A mosakodás egy stressz-csökkentő sztereotíp viselkedés [233, 234]. Korábban azt találták, hogy a fokozott mosakodás erősen összefügg a nyílt kar csökkent

felderítésével és szorongáscsökkentő kezelés csökkenti [233, 235-237]. Az AVP hatással ellentétben a CMS esetünkben nem befolyásolta ezt a paramétert.

A **depresszió**-szerű viselkedés vizsgálatához az FST-t alkalmaztuk. A depresszió a HHM tengely krónikus hiperaktivitásával jár együtt [238] és egyes agyterületeken emelkedett AVP szintek figyelhetőek meg [239]. Várakozásunknak megfelelően a CMS hatására megnőtt a lebegéssel töltött idő. Sajnálatos módon nem sikerült bizonyítanunk az AVP védő szerepét sem alap, sem stressz utáni állapotban, bár egy előzetes kísérletsorozatunk nem stresszelt állatok esetében pozitív eredményre vezetett [128]. Irodalmi adatok is arra utalnak, hogy a V1b antagonista kezelés csökkenti az egerek lebegéssel töltött idejét [127]. Úgy tűnik, hogy az AVP érzékeny a környezeti faktorokra, mivel előző, pozitív kísérletünkben 30cm, míg ebben a kísérletben 45cm-es vízmélységet használtunk.

Összefoglalva, jelen, AVP hiányos Brattleboro patkányokkal végzett vizsgálataink azt mutatják, hogy az AVP hiánya nem véd a CMS hatására kialakuló HHM tengely és magatartási változásoktól. Elképzelhető, hogy az élethosszú AVP hiány kompenzálódik, de ebben a kísérletben a PVN CRH mRNS szintek a di/di állatokban inkább alacsonyabban, mint magasabbak voltak (legnagyobb átmérő; di/+: 60,5±1,4 illetve di/di: 54,1±1,01 arbitrary unit). Feltehető, hogy krónikus stressz során a stressz szabályozásában fontos három neuropeptid (CRH, AVP, OT) egyensúlyának felbomlása az, mely végül a kimenet (HHM tengely vagy magatartás) megváltozásához vezet [240]. Valószínűnek tűnik, hogy az egyes tényezők kölcsönhatása és nem egyetlen faktor az, ami befolyásolja a magatartást, illetve a betegségek patogenezisét. A kezelés tervezésénél az egész komplex rendszert figyelembe kell vennünk.

5.3. Stressz reaktivitás a perinatális korban

5.3.1. A vazopresszin hatása a kispatkányok stresszreaktivitására

Kísérleteinkben a HHM tengely aktivitását vizsgáltuk az SHRP alatt [66, 241]. Legfőbb megfigyelésünk, hogy az AVP hiányában a di/di állatokban a stressz kiváltotta ACTH válasz csökken, az esetek nagy részében egyáltalán nem jelenik meg. Ezek alapján a

perinatális korban az AVP lehet a kulcs szignál az ACTH elválasztás szabályozásában, legalábbis patkányokban. Ezzel ellentétben az AVP hiánya a kortikoszteron választ nem befolyásolta. Ez nem magyarázható meg egyértelműen azzal, hogy az ACTH és a kortikoszteron elválasztásának időgörbéje eltérő, illetve azzal is csak részben oldható fel az ellentmondás, hogy a di/di kispatkányok mellékveséjének ACTH érzékenysége fokozott volt.

Eredményeink azt mutatják, hogy a kortikoszteron szintje meglehetősen alacsony, bár mérhető szinten van a neonatális periódusban, ugyanakkor közel háromszorosára emelkedett a születés utáni 20. napra [66, 242]. 24 órás anyai depriváció és Hypnorm injekció hatására a plazma ACTH és kortikoszteron szintje megemelkedett mindegyik vizsgált életkorban. A di/+ genotípusú állatokban az életkor előrehaladtával a stresszválaszok egyre erőteljesebbek lettek, ami szintén a HHM tengely **érés**ét mutathatja. Felnőtt állatokban egyszeri akut stressz 4 órával a stressz alkalmazása után CRH mRNS szint emelkedést vált ki és ez az szint közel 24 órán keresztül fennmarad [243]. A 10 napos kispatkányokban az anyai depriváció nem váltott ki CRH mRNS szint emelkedést, mely alátámasztja azt a feltételezést miszerint a CRH szekréció szabályozása éretlen és az AVP szabályozó szerepe kerül előtérbe.

Ellentétben a felnőtt egyedekkel, akikben a CRH a fő ACTH szekretagóg hormon [244], addig a fiatal állatokban az AVP számottevően nagyobb mennyiségben termelődik, mint a CRH [72, 245]. Ugyanakkor az AVP szerepe korlátozottnak is tűnik, hiszen jelenléte vagy hiánya az ACTH **alapszint**jét nem befolyásolta. Korábbi eredmények is ezt támaszthatják alá: az ACTH alapszintjének szabályozása független a hipotalamuszba beérkező ingerektől [246]. A **stressz-indukált** hormonszint emelkedések tekintetében azonban az AVP szerepének fontosságát támasztja alá a 8 napos kispatkányok passzív AVP elleni immunizálása, amikor az AVP hiányában a hipoglikémia indukálta ACTH szint emelkedés elmaradt [72]. Ezzel ellentétben a CRH elleni immunizálás hatástalan volt. Bár a passzív CRH immunizálás hatására eltűnt a hideg-stressz indukálta kortikoszteron válasz az SHRP idején [247] és hasonló kezelés az uretán indukálta ACTH szint emelkedést is csökkentette [65]. Ez alapján az AVP szerepe stresszorspecifikusnak tűnik [73, 248] (és lsd. felnőtt állatok akut stresszválasza). Eredményeink részben támogatják ezen feltételezéseket,

mivel az anyai depriváció hatására az ACTH válasz az AVP hiányos állatokban teljes mértékben elmaradt, de a Hypnorm injekció hatására ugyanezen genotípusú állatokban enyhe ACTH aktiváció még megfigyelhető volt.

A legérdekesebb és egyben talán legmegdöbbentőbb tapasztalat az **ACTH és a kortikoszteron szekréciójának teljes elkülönülése** az AVP hiányos kisállatokban. Normális esetben az ACTH szekréciója megelőzi a kortikoszteron elválasztását és utóbbi szekréciója szoros korrelációban van az előbbiével. Ezzel az általános képpel szemben az anyai depriváció hatására bekövetkező változások közül az ACTH válasz hiányzik az AVP hiányos állatokban míg a kortikoszteron elválasztása sokkal erőteljesebb. Eredményeink kizárják annak a lehetőségét, hogy a jelenség oka a két esemény időbeli eltolódása lenne. Hiszen míg az egyre hosszabb szeparációs idők esetén a di/di genotípusú állatokban az anyai depriváció a plazma kortikoszteron szintjét fokozatosan emelte, addig az ACTH válaszok teljes egészében elmaradtak. Hasonló (bár nem magyarázott) jelenséget olvashatunk Walker és munkatársai cikkeiben [73, 248], ahol 10 napos Sprague Dawley kispatkányoknál az anyai deprivációt követő 8 és 12 órában erőteljes kortikoszteron elválasztás mellett csak kismértékű ACTH szint emelkedés tapasztaltak. Korábbi vizsgálatok szerint a mellékvesék glükokortikoid szekrécióját befolyásolhatja a táplálás elmaradása, ami pedig az anyai depriváció értelemszerű velejárója [73, 248]. Éppen ezért volt fontos egy másik stimulus (Hypnorm injekció) alkalmazása, ahol szintén disszociált ACTH és kortikoszteron választ tapasztaltunk. Az ebben az esetben alkalmazott 30, illetve 60 perces szünet a táplálásban nem befolyásolhatta az eredményeket, ez természetes esemény. Szükséges megjegyeznünk, hogy az injekció beadása után mindegyik kispatkány vissza lett helyezve az anyaállat mellé (bár kétségtelen, hogy az anya gondozó-tápláló magatartását megzavartuk).

A szakirodalom egyes feltételezései szerint az ACTH és a kortikoszteron szekréciójának disszociációja a **mellékvesék emelkedett ACTH érzékenységével** magyarázhatóak. Mivel az AVP gátolhatja az ACTH/kortikoszteron szignáltranszdukciót [249], az emelkedett mellékvese érzékenység annak lehet a következménye, hogy az AVP gátló hatása hiányzik a di/di kispatkányokban. Ez a jelenség feltehetően csak egy azok közül, amelyek a mellékvesék ACTH érzékenységét fokozzák a di/di állatokban. Az előbb

említetteknek megfelelően ezekben az állatokban már kismértékű ACTH szint emelkedés is magas kortikoszteron szekréciót eredményezne. Összhangban ezzel a feltételezéssel, az in vitro kísérletekben mért mellékvese ACTH érzékenység 87,9 %-kal nagyobb, amennyiben 10^{-13} M, 62,2 %-kal nagyobb, ha 10^{-12} M és 57,6%-kal ha 10^{-11} M koncentrációjú ACTH-val kezeltük a szerveket (a di/+ és a di/di állatokban mért értékek egymáshoz viszonyított százalékos aránya). Amennyiben az alap kortikoszteron szintekhez viszonyítottuk az emelkedéseket a következő eredményeket kaptuk (7.táblázat):

7. táblázat
ACTH érzékenység vizsgálata

	Genotípus	
ACTH koncentráció	**di/+**	**di/di**
10^{-13} M	85,5%	158,9%
10^{-12} M	206,5%	335,2%
10^{-11} M	212,4%	334,9%

A di/di genotípusban a mellékvesék érzékenysége emelkedett volt minden koncentráció esetében. Az ACTH válasz teljes hiánya az anyai depriváció esetében irrelevánssá teszi jelen helyzetben a mellékvesék érzékenységének kérdését. Habár a Hypnorm injekció alkalmazása során kismértékű ACTH választ kialakult a di/di kölykökben, a mellékvesék érzékenységének kisfokú növekedése nem lehet magyarázat arra hatalmas ellentmondásra, mely az ACTH és a kortikoszteron elválasztás mintázatában tapasztalható. 10 napos di/+-os kölykök esetében az Hypnorm kezelés megemelte az ACTH és a kortikoszteron szinteket is (236,8 fmol/ml és 132,7 pmol/ml) vagyis egy fmol ACTH szekrécióhoz 0,56 pmol kortikoszteron köthető. Amennyiben a számokat a di/di genotípusban vizsgáljuk akkor a következő eredményekre jutunk: Az ACTH szint az injekció után 28,2 fmol/ml volt, míg a kortikoszteron szint a kezelés után 109,1 pmol/ml volt. Vagyis ebben az esetben az arány lényegesen eltér, hiszen egyetlen fmol ACTH szekréciója 3,87 pmol kortikoszteron elválasztását eredményezi. Vagyis hasonló mennyiségű ACTH a di/di genotípusban közel

7-szer nagyobb kortikoszteron szekréciót vált ki, míg az érzékenység növekedés kb. másfélszeres volt.

Mivel az *in vitro* kísérleti modellekben a természetes környezetből érkező külső és belső ingerek hiányoznak [250], így kísérletünket *in vivo* modellben is megismételtük. Ebben az esetben az *in vitro* tapasztalt emelkedett mellékvese érzékenységet nem tudtuk bemutatni (ugyanolyan mértékű kortikoszteron emelkedés jött létre a di/+, mint a di/di állatokban). Az vitro és in vivo kísérletek együttesen arra mutatnak rá, hogy a mellékvesék ACTH érzékenysége nem lehet kizárólagos magyarázata a disszociált ACTH és kortikoszteron szekréciónak.

A két hormon közötti disszociáció korábban már számos tanulmány tárgya volt. Walker és munkatársai munkájában [248] Sprague Dawley patkányok esetében mutatták be, hogy az anyai depriváció és a hipoxia kiváltotta kortikoszteron válasszal párhuzamosan nem volt megfigyelhető az ACTH szint emelkedése. Birkák esetében a magzati korban alkalmazott hipoxia szintén erőteljes kortikoszteron szint emelkedést váltott ki, de az ACTH szint változása elmaradt [251]. Ezekben az állatokban a kortikoszteron szint emelkedése a mellékvesék nervus splanchnicus általi beidegzésétől függ. Összességében arra következtethetünk, hogy a kortikoszteron elválasztása nem vagy csak gyengén függ az ACTH-tól az egyedfejlődés korai szakaszában. Ugyanakkor Bornstein cikkében [252] arról olvashatunk, hogy felnőtt egyedekben is létezik a kortikoszteron elválasztásának ACTH független módja.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az AVP szükséges ugyan az ACTH stresszválaszok érési folyamatában, de sem az AVP sem pedig az ACTH nem szükséges a kortikoszteron stressz válaszok kialakulásában. A neonatális korban induló érési folyamatok és a stresszválaszok szabályozásának tanulmányozása további kísérletek elvégzését igénylik.

5.3.2. Különböző nemű kispatkányok stresszreaktivitásának vizsgálata

Bár a perinatális korban a szexuális hormonok szintje nem tér el a két nemben, kíváncsiak voltuk, hogy a stressztengely szabályozásban sincs-e különbség. Ehhez az

előzőekben is alkalmazott 24 órás anyai szeparációt, valamint egy további új stresszort, az éter belélegzést alkalmaztuk.

Korábbi tanulmányok beszámolnak arról, hogy a születést követő időben bekövetkező események különbözőképpen befolyásolja a **hím és a nőstény** serdülő, illetve felnőtt egyedek stresszreaktivitását. Mozgáskorlátozás stressz hatására a HHM tengely aktivitása hímekben csökkent, míg a nőstényekben emelkedett a perinatális manipuláció késői következményeként [253]. Bár a késői következmények merőben mások lehetnek, a saját kísérleteinkben a perinatális stimulusra ugyanolyan irányú, csak fokozott amplitúdójú stresszválaszt figyelhettünk meg a nőstényekben a hímekkel összehasonlítva. Hasonló eredményeket tapasztaltak abban az esetben is, amikor endotoxin indukálta változásokat vizsgáltak: nőstény kölykökben emelkedett volt a HHM tengely aktivitása [254]. Az ivarszervek eltávolítását követően ezen szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a nemi különbségek alapja valamilyen gonadális hatás lehet, ami hímekben gátló, nőstényekben pedig serkentő. Arra következtethetünk, hogy a HHM tengely szabályozásának fő mechanizmusai azonosak a két nemben, az alkalmazott stresszorok hatékony ACTH és kortikoszteron emelőnek bizonyultak és az AVP hiány is mind a hímeknél, mind a nőstényeknél csökkentette az ACTH elválasztást. Habár a rendszer érzékenysége másképp van beállítva, ami a nőstények magasabb stresszhormon emelkedésében nyilvánul meg. Mint másodlagos szignál, a magasabb glükokortikoid szintek befolyásolhatják a későbbi fejlődést.

Ebben a kísérletsorozatban is sikerült bizonyítanunk (ráadásul két, merőben eltérő stressz alkalmazásával) az **AVP ACTH** szabályozásban elfoglalt kitüntetett helyét a neonatális időszak alatt. Tulajdonképp AVP hiányában nem jött létre mérhető ACTH emelkedés sem az előzőleg már alkalmazott 24 órás anyai szeparáció, sem az éter (egyszeri, vagy kétszeri) belégzés hatására. AVP kötőhelyek már a prenatális 20. naptól kimutathatók mind a szeptumban, mind a laterális retikuláris magban. A perinatális 20. és a posztnatális 15. nap között az AVP kötőhelyek mindazon agyterületeken megjelennek, ahol felnőttben is megtalálhatók. Jelen kísérleteink is megerősítik, hogy perinatálisan az AVP tekinthető az ACTH elválasztás fő szabályozójának. Az előzőekkel összhangban ez a szabályozó szerep azonban csak a stressz okozta emelkedésekre, és nem az alapaktivitás fenntartására

vonatkozik. Muret és munkatársai [72] inzulin hipoglikémiás, valamint Levine [73] és Avishai-Eliner [74] anyai szeparációs munkái szintén alátámasztják az AVP szabályozó szerepét. Érdemes megemlíteni, hogy a 10 napos CRH-R1 génkiütött egerekben a 24 órás anyai szeparáció okozta ACTH emelkedés nem változott, habár a kortikoszteron válasz fokozott volt, ami a CRH perinatális gátló szerepére utalhat (valószínűleg az előagyi és limbikus területekről) csökkent CRH mRNS és emelkedett AVP mRNS szinteket eredményezve az állat PVN-jében [255]. Néhány vizsgálat a CRH perinatális szabályozó szerepét is alátámasztja. Újszülöttekben a hideg stressz hatására megemelkedett a CRH mRNS szintje a PVN-ben és mind a hideg [247], mind az uretán belégzés [68] hatására létrejövő kortikoszteron választ a CRH elleni immunizálás kivédte. Ugyan kézenfekvő magyarázat lenne a stresszorspecifikus hatás, de a disszertációban három, egymástól alapjaiban különböző stresszor esetében (anyai elválasztás, Hypnorm injekció, éter belégzés) is sikerült bizonyítani az AVP ACTH szabályozásban betöltött szerepét. Elképzelhető, hogy az AVP hiányos állatok hipotalamusza több CRH-t tartalmaz, mint ahogy ezt a felnőtt állatok esetén bizonyítottuk. Ezzel összhangban az AVP toxikus kiirtása az újszülöttek PVN-jében CRH mRNS emelkedést okozott [246], habár ez inkább fokozott, mint csökkent ACTH válaszokat okozna.

Az előző kísérletekkel összhangban itt is **ACTH nélküli kortikoszteron** választ tapasztaltunk. Egy lehetséges magyarázat lehet az is, hogy az AVP a mellékvesék szintjén gátolja a kortikoszteron elválasztást, azaz hiányban kis ACTH is hatalmas kortikoszteron választ képes kiváltani. Habár ez a magyarázat nem tűnik kézenfekvőnek, mivel az anyai szeparáció esetén semminemű ACTH szint emelkedés nem volt kimutatható. Az is lehetséges lenne, hogy a di/di állatok megemelkedett „nyugalmi” kortikoszteron szintjei gátolják a további stresszre létrejövő ACTH elválasztást. Ez a kérdés még további vizsgálatokat igényel.

6. Következtetések

A vazopresszin szerepe akut stresszben

1. Akut stresszhelyzetekben az AVP-nek stresszorspecifikus szerep jut a HHM tengely szabályozásában, mely szerepe nem köthető egyértelműen egyik előzőleg felállított kategóriához sem.
2. Az ACTH és kortikoszteron szekréció disszociál, az AVP szerepe fontos az ACTH, de kevésbé jelentős a glükokortikoid elválasztás szabályozásában.
3. A PVN-ben helyileg felszabaduló AVP gátló hatása segíti az OT plazmaszintek stressz (FST stressz) utáni normalizálódását. A plazma OT szintjének változása befolyásolhatja a mellékvese kortikoszteron elválasztását is.
4. Az AVP fontos, de nem kizárólagos a morfin injekció hatására létrejött HHM tengely aktivációban, mind az ACTH, mind a kortikoszteron vonatkozásában.

A vazopresszin szerepének vizsgálata krónikus stresszhelyzetekben

1. Az AVP-nek fontos szerepe van a morfin elvonás által kiváltott hormonális változások szabályozásában, ugyanakkor nem tulajdonítható neki szerep a HHM tengely krónikus hiperaktivitásának, azaz a morfin-függőségnek a kialakulásában (2 hetes vizsgálat).
2. A krónikus stressz 14 napról 28 napra való kiterjesztése során felszínre került az AVP HHM tengely alapaktivitásának fenntartásában betöltött szerepe.
3. Az AVP elnyújtott stresszben betöltött szerepe azonban nem általános, inkább az azonos stimulus ismétlődésére vonatkozik, mivel az AVP hiánya nem véd a 6 hetes CMS hatására kialakuló HHM tengely és magatartási változásoktól.

A HHM tengely szabályozása a perinatális korban

1. A perinatális korban az AVP lehet a kulcs szignál az ACTH elválasztás szabályozásában, legalábbis patkányokban.
2. A kortikoszteron elválasztása nem, vagy csak gyengén függ az ACTH-tól az egyedfejlődés korai szakaszában.
3. Bár a korai fejlődés során jelentős hormonális eltérés nincs a nemek között, és a HHM tengelyük működésének szabályozó mechanizmusai is hasonlóak, de a nőstények már ekkor is stressz-érzékenyebbek.

7. Összefoglalás

A vazopresszin fontos szerepet játszik a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese (stressz) tengely szabályozásában. Kísérleteink elvégzése előtt az volt az általános vélekedés, hogy a krónikus stresszfolyamatok során nő meg a molekula szerepe. Természetes mutáció révén vazopresszin hiányos állatokban vizsgáltuk a hormon szerepét. Az állattörzs lehetőséget teremtett arra, hogy a stresszorok modalitásbeli és intenzitásbeli sokféleségét vizsgálhassuk anélkül, hogy a különféle beavatkozások (pl. antagonista kezelés, agyi léziók stb.) extra stresszének tennénk ki az állatokat. Kísérleteink során az akut és krónikus stressz szerepét vizsgáltuk felnőtt és perinatális korban. Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a vazopresszinnek az akut stresszorok esetében az eddig ismert stresszkategóriáktó független stresszorspecifikus szerepe van. A krónikus stressz kísérleteink eredményei alapján arra következtethetünk, hogy a vazopresszinnek inkább az akut, mint a krónikus stressz során lezajló változásokban lehet szerepe. Perinatális korban a stressz által kiváltott adrenokortikotropin (ACTH, a stressztengely hipofizeális komponense) és a kortikoszteron (a tengely mellékvese komponense) stresszválasz teljes disszociációját figyeltük meg: vazopresszin hiányában elmarad az ACTH stresszválasz, de a kortikoszteron válasz jelentős. Arra következtettünk, hogy perinatális korban a vazopresszin az az anyag, amely az ACTH elválasztását szabályozza, a kortikoszteron elválasztásában pedig az ACTH-n kívül más anyagok is nagy szerepet kaphatnak. További kutatások tárgya, hogy a vazopresszinnek a szervezeten belüli modulációja miképpen lehet segítségünkre a tartós stressz kiváltotta szomatikus és mentális betegségek kezelésében.

7. Summary

Vasopressin plays an important role in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation as well as in stress-related disorders. A common view suggested that the role of vasopressin is especially important during chronic stress. We used the naturally vasopressin mutant Brattleboro rat as a model organism. This strain is a good choice for stress studies as we could examined the role of vasopressin without any extra, stressful treatment. The role of vasopressin was studies in the hypothalamo-pitutary-adrenocortical axis regulation after different acute and chronic stimuli as well as during the perinatal period. After a big experiment with 18 acute stressors we concluded that vasopressin has a stressor specific role in acute changes of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical (stress) axis. The chronic stress studies lead to the conclusion that vasopressin may play a role in acute rather than chronic stress changes. We observed that stress-induced adrenocorticotropin (ACTH, the hypophyseal level of the stress axis) and corticosterone (the adrenal component) stress response completely dissociated during the perinatal period. In vasopressin deficient Brattleboro pups the ACTH stress response was missing but significant corticosterone response was visible. Based on our results we concluded that during the perinatal period vasopressin is the main hypothalamic secretagogue of the ACTH secretion and corticosterone secretion could be regulated by other substances. Further studies required on the modulation of the vasopressinerg system, which might bring us closer to the treatment of stress-related somatic and mental diseases.

8. Irodalomjegyzék

1. Simonton, O.C., Matthews-Simonton S. (1981) Cancer and stress: counselling the cancer patient. Med J Aust, 1(13): p. 679, 682-3.
2. Lam SK, Hui WM, Shiu LP, Ng MM. (1995) Society stress and peptic ulcer perforation. J Gastroenterol Hepatol 10(5): p. 570-6.
3. Sparrenberger F, Cichelero FT, Ascoli AM, Fonseca FP, Weiss G, Berwanger O, Fuchs SC, Moreira LB, Fuchs FD. (2009) Does psychosocial stress cause hypertension? A systematic review of observational studies. J Hum Hypertens,. 23(1): p. 12-9.
4. Lehman CD, Rodin J, McEwen B, Brinton R. (1991) Impact of environmental stress on the expression of insulin-dependent diabetes mellitus. Behav Neurosci,. 105(2): p. 241-5.
5. Demyttenaere K, Nijs P, Evers-Kiebooms G, Koninckx PR. (1991) Coping, ineffectiveness of coping and the psychoendocrinological stress responses during in-vitro fertilization. J Psychosom Res,. 35(2-3): p. 231-43.
6. Checkley S. (1996) The neuroendocrinology of depression and chronic stress. Br Med Bull, 52(3): p. 597-617.
7. Bradley AJ, Dinan TG. (2010) A systematic review of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in schizophrenia: implications for mortality. J Psychopharmacol, 24(4 Suppl): p. 91-118.
8. Cohen CI. (1993) Poverty and the course of schizophrenia: implications for research and policy. Hosp Community Psychiatry, 44(10): p. 951-8.
9. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/.
10. Ambrus, Z. and Varsányi T. (2011) Az egészség és az életmód regionális különbségei. Területi Statisztika, 0018-7828.,. 14/3: p. 227-244. .
11. Selye H. (1985) The nature of stress. Basal Facts, 7(1): p. 3-11.
12. Munck, A, Guyre PM. (1986) Glucocorticoid physiology, pharmacology and stress. Adv Exp Med Biol, 196: p. 81-96.
13. McEwen BS. (1998) Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. Ann N Y Acad Sci, 840: p. 33-44.
14. Huether G. (1996) The central adaptation syndrome: psychosocial stress as a trigger for adaptive modifications of brain structure and brain function. Prog Neurobiol, 48(6): p. 569-612.
15. Oitzl MS, Champagne DL, van der Veen R, de Kloet ER. (2010) Brain development under stress: Hypotheses of glucocorticoid actions revisited. Neurosci Biobehav Rev, 34(6):853-66
16. Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day TA. (2001) Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. Eur J Neurosci, 14(7): p. 1143-52.
17. Carrasco, G.A., Van de Kar L.D.(2003) Neuroendocrine pharmacology of stress. Eur J Pharmacol 463(1-3): p. 235-72.

18. Lolait SJ, Stewart LQ, Jessop DS, Young WS 3rd, O'Carroll AM. (2007) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to stress in mice lacking functional vasopressin V1b receptors. Endocrinology, 148(2): p. 849-56.
19. Sawchenko PE, Li HY, Ericsson A. (2000) Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. Prog Brain Res, 122: p. 61-78.
20. Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH. (2001) The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. Physiol Behav, 74(4-5): p. 683-701.
21. Brunton PJ, Russell JA. (2008) Attenuated hypothalamo-pituitary-adrenal axis responses to immune challenge during pregnancy: the neurosteroid opioid connection. J Physiol, 586(2): p. 369-75.
22. Harding JW, Jensen LL, Hanesworth JM, Roberts KA, Page TA, Wright JW. (1992) Release of angiotensins in paraventricular nucleus of rat in response to physiological and chemical stimuli. Am J Physiol, 262(1 Pt 2): p. F17-23.
23. Morimoto A, Murakami N, Sakata Y. (1988) Changes in hypothalamic temperature modulate the neuronal response of the ventral thalamus to skin warming in rats. J Physiol, 398: p. 97-108.
24. Chaouloff F, Hémar A, Manzoni O. (2007)Acute stress facilitates hippocampal CA1 metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. J Neurosci,. 27(27): p. 7130-5.
25. Chen JX, Tang YT, Yang JX. (2008) Changes of glucocorticoid receptor and levels of CRF mRNA, POMC mRNA in brain of chronic immobilization stress rats. Cell Mol Neurobiol, 28(2): p. 237-44.
26. Hunter RG, Bellani R, Bloss E, Costa A, Romeo RD, McEwen BS. (2007) Regulation of CART mRNA by stress and corticosteroids in the hippocampus and amygdala. Brain Res,. 1152: p. 234-40.
27. McLaughlin KJ, Gomez JL, Baran SE, Conrad CD. (2007) The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: an evaluation of chronic restraint paradigms. Brain Res, 1161: p. 56-64.
28. Scribner KA, Walker CD, Cascio CS, Dallman MF. (1991) Chronic streptozotocin diabetes in rats facilitates the acute stress response without altering pituitary or adrenal responsiveness to secretagogues. Endocrinology, 129(1): p. 99-108.
29. Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. (1987) Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. Psychopharmacology (Berl), 93(3): p. 358-64.
30. Aguilera G. (1994) Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. Front Neuroendocrinol,. 15(4): p. 321-50.
31. Aguilera G, Rabadan-Diehl C. (2000) Regulation of vasopressin V1b receptors in the anterior pituitary gland of the rat. Exp Physiol, 85 Spec No: p. 19S-26S.
32. Dallman, M.F. (1993) Stress update Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic stress. Trends Endocrinol Metab, 4(2): p. 62-9.
33. Mezey E, Kiss JZ. (1991) Coexpression of vasopressin and oxytocin in hypothalamic supraoptic neurons of lactating rats. Endocrinology,. 129(4): p. 1814-20.

34. Ceccatelli S, Eriksson M, Hokfelt T. (1989) Distribution and coexistence of corticotropin-releasing factor-, neurotensin-, enkephalin-, cholecystokinin-, galanin- and vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine-like peptides in the parvocellular part of the paraventricular nucleus. Neuroendocrinology, 49(3): p. 309-23.
35. Antoni, FA. (1986) Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. Endocr Rev, 7(4): p. 351-78.
36. Nagashima H, Asakura M, Hishinuma T, Tanaka D, Fujii S. (2003) Reduction and sensitization of CRH neuron in rat hypothalamic and extrahypothalamic regions after chronic variable stress. Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi, 23(1): p. 21-8.
37. Zoumakis E, Makrigiannakis A, Margioris A, Stournaras C, Gravanis A. (1996) Corticotropin releasing hormone (CRH) in normal and pregnant uterus: physiological implications. Front Biosci, 1: p. e1-8.
38. Lee KH, Bishop GA, Tian JB, Jang YJ, Bui BC, Nguyen Tle X, Ahn JY, King JS. (2007) Cellular localization of the full-length isoform of the type 2 corticotropin releasing factor receptor in the postnatal mouse cerebellar cortex. J Neurosci Res, 85(9): p. 1996-2005.
39. Fekete EM, Zhao Y, Li C, Sabino V, Vale WW, Zorrilla EP. (2009) Social defeat stress activates medial amygdala cells that express type 2 corticotropin-releasing factor receptor mRNA. Neuroscience, 162(1): p. 5-13.
40. Behan DP, Grigoriadis DE, Lovenberg T, Chalmers D, Heinrichs S, Liaw C, De Souza EB. (1996) Neurobiology of corticotropin releasing factor (CRF) receptors and CRF-binding protein: implications for the treatment of CNS disorders. Mol Psychiatry, 1(4): p. 265-77.
41. Wong ML, al-Shekhlee A, Bongiorno PB, Esposito A, Khatri P, Sternberg EM, Gold PW, Licinio J. (1996) Localization of urocortin messenger RNA in rat brain and pituitary. Mol Psychiatry, 1(4): p. 307-12.
42. Müller MB, Landgraf R, Preil J, Sillaber I, Kresse AE, Keck ME, Zimmermann S, Holsboer F, Wurst W. (2000) Selective activation of the hypothalamic vasopressinergic system in mice deficient for the corticotropin-releasing hormone receptor 1 is dependent on glucocorticoids. Endocrinology, 141(11): p. 4262-9.
43. Müller MB, Zimmermann S, Sillaber I, Hagemeyer TP, Deussing JM, Timpl P, Kormann MS, Droste SK, Kühn R, Reul JM, Holsboer F, Wurst W. (2003) Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. Nat Neurosci,. 6(10): p. 1100-7.
44. Preil J, Müller MB, Gesing A, Reul JM, Sillaber I, van Gaalen MM, Landgrebe J, Holsboer F, Stenzel-Poore M, Wurst W. (2001) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in mice deficient for CRH receptors 1 and 2. Endocrinology, 142(11): p. 4946-55.
45. Chida D, Nakagawa S, Nagai S, Sagara H, Katsumata H, Imaki T, Suzuki H, Mitani F, Ogishima T, Shimizu C, Kotaki H, Kakuta S, Sudo K, Koike T, Kubo M, Iwakura Y. (2007) Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland

development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(46): p. 18205-10.
46. Gláz, E., Klinikai Endokrinologia I-II.1981, Budapest: Medicina Könyvkiadó.
47. Patel PD, Lopez JF, Lyons DM, Burke S, Wallace M, Schatzberg AF. (2000) Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in squirrel monkey brain. J Psychiatr Res, 34(6): p. 383-92.
48. Charles Groves, D.B., Nicholas J. Marshall, Essential endocrinology 2001: p. 11-34.
49. Haller J., Mikics E., Makara GB. (2008) The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. Front Neuroendocrinol, 29(2): p. 273-91.
50. Mikics, E., Barsy B., Haller J. (2007) The effect glucocorticoids on aggressiveness in established colonies of rats. Psychoneuroendocrinology, 32(2): p. 160-70.
51. Dallman MF, Akana SF, Cascio CS, Darlington DN, Jacobson L, Levin N. (1987) Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. Recent Prog Horm Res, 43: p. 113-73.
52. McEwen BS. (1977) Adrenal steroid feedback on neuroendocrine tissues. Ann N Y Acad Sci, 297: p. 568-79.
53. Reul JM, Sutanto W, van Eekelen JA, Rothuizen J, de Kloet ER. (1990) Central action of adrenal steroids during stress and adaptation. Adv Exp Med Biol, 274: p. 243-56.
54. Ratka A, Sutanto W, Bloemers M, de Kloet ER. (1989) On the role of brain mineralocorticoid (type I) and glucocorticoid (type II) receptors in neuroendocrine regulation. Neuroendocrinology, 50(2): p. 117-23.
55. Hillhouse EW, Jones MT. (1976) Effect of bilateral adrenalectomy and corticosteroid therapy on the secretion of corticotrophin-releasing factor activity from the hypothalamus of the rat in vitro. J Endocrinol, 71(1): p. 21-30.
56. Kovács K, Kiss JZ, Makara GB. (1986) Glucocorticoid implants around the hypothalamic paraventricular nucleus prevent the increase of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin immunostaining induced by adrenalectomy. Neuroendocrinology, 44(2): p. 229-34.
57. Kovacs KJ, Mezey E. (1987) Dexamethasone inhibits corticotropin-releasing factor gene expression in the rat paraventricular nucleus. Neuroendocrinology, 46(4): p. 365-8.
58. Tornello S, Orti E, De Nicola AF, Rainbow TC, McEwen BS. (1982) Regulation of glucocorticoid receptors in brain by corticosterone treatment of adrenalectomized rats. Neuroendocrinology, 35(6): p. 411-7.
59. Herman JP, Cullinan WE, Young EA, Akil H, Watson SJ. (1992) Selective forebrain fiber tract lesions implicate ventral hippocampal structures in tonic regulation of paraventricular nucleus corticotropin-releasing hormone (CRH) and arginine vasopressin (AVP) mRNA expression. Brain Res. 592(1-2): p. 228-38.
60. Sapolsky RM, Armanini MP, Sutton SW, Plotsky PM. (1989) Elevation of hypophysial portal concentrations of adrenocorticotropin secretagogues after fornix transection. Endocrinology, 125(6): p. 2881-7.

61. Lajtha, A., ed. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Behavioral neurochemistry and neuroendocrinology. 3rd Edition ed., ed. J.D.B. Abel Lajtha 2007, Springer: New York. 520-522.
62. Scott, LV, Dinan TG. (1998) Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. Life Sci, 62(22): p. 1985-98.
63. de Kloet, ER. (2003) Hormones, brain and stress. Endocr Regul, 37(2): p. 51-68.
64. Martin CE, Cake MH, Hartmann PE, Cook IF. (1977) Relationship between foetal corticosteroids, maternal progesterone and parturition in the rat. Acta Endocrinol (Copenh), 84(1): p. 167-76.
65. Walker CD, Perrin M, Vale W, Rivier C. (1986) Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. Endocrinology, 118(4): p. 1445-51.
66. Sapolsky RM, Meaney MJ. (1986) Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. Brain Res, 396(1): p. 64-76.
67. Gunnar, MR, Donzella B. (2002) Social regulation of the cortisol levels in early human development. Psychoneuroendocrinology, 27(1-2): p. 199-220.
68. Walker CD, Sapolsky RM, Meaney MJ, Vale WW, Rivier CL. (1986) Increased pituitary sensitivity to glucocorticoid feedback during the stress nonresponsive period in the neonatal rat. Endocrinology, 119(4): p. 1816-21.
69. Henning, SJ. (1978) Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. Am J Physiol, 235(5): p. E451-6.
70. Suchecki D, Mozaffarian D, Gross G, Rosenfeld P, Levine S. (1993) Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat. Neuroendocrinology, 57(2): p. 204-12.
71. Grino M, Burgunder JM, Eskay RL, Eiden LE. (1989) Onset of glucocorticoid responsiveness of anterior pituitary corticotrophs during development is scheduled by corticotropin-releasing factor. Endocrinology, 124(6): p. 2686-92.
72. Muret L, Priou A, Oliver C, Grino M. (1992) Stimulation of adrenocorticotropin secretion by insulin-induced hypoglycemia in the developing rat involves arginine vasopressin but not corticotropin-releasing factor. Endocrinology, 130(5): p. 2725-32.
73. Levine, S. (2002) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behavior. Neurotox Res, 4(5-6): p. 557-564.
74. Avishai-Eliner S, Yi SJ, Newth CJ, Baram TZ. (1995) Effects of maternal and sibling deprivation on basal and stress induced hypothalamic-pituitary-adrenal components in the infant rat. Neurosci Lett, 192(1): p. 49-52.
75. Buijs RM. (1978) Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord. Cell Tissue Res,. 192(3): p. 423-35.
76. Dogterom J, Snijdewint FG, Buijs RM. (1978) The distribution of vasopressin and oxytocin in the rat brain. Neurosci Lett,. 9(4): p. 341-6.

77. Johnson AE, Audigier S, Rossi F, Jard S, Tribollet E, Barberis C. (1993) Localization and characterization of vasopressin binding sites in the rat brain using an iodinated linear AVP antagonist. Brain Res, 622(1-2): p. 9-16.
78. Antoni FA, Holmes MC, Makara GB, Kárteszi M, László FA. (1984) Evidence that the effects of arginine-8-vasopressin (AVP) on pituitary corticotropin (ACTH) release are mediated by a novel type of receptor. Peptides, 5(3): p. 519-22.
79. Young WS, Li J, Wersinger SR, Palkovits M. (2006) The vasopressin 1b receptor is prominent in the hippocampal area CA2 where it is unaffected by restraint stress or adrenalectomy. Neuroscience, 143(4): p. 1031-9.
80. Saito M, Tahara A, Sugimoto T, Abe K, Furuichi K. (2000) Evidence that atypical vasopressin V(2) receptor in inner medulla of kidney is V(1B) receptor. Eur J Pharmacol, 401(3): p. 289-96.
81. Michell RH, Kirk CJ, Billah MM. (1979) Hormonal stimulation of phosphatidylinositol breakdown with particular reference to the hepatic effects of vasopressin. Biochem Soc Trans, 7(5): p. 861-5.
82. Jard S, Barberis C, Audigier S, Tribollet E. (1987) Neurohypophyseal hormone receptor systems in brain and periphery. Prog Brain Res, 72: p. 173-87.
83. Kato Y, Igarashi N, Hirasawa A, Tsujimoto G, Kobayashi M. (1995) Distribution and developmental changes in vasopressin V2 receptor mRNA in rat brain. Differentiation, 59(3): p. 163-9.
84. Zelena, D. (2008) The Role of Vasopressin in Affective Disorders: Possible Targets of Intervention. Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry, 8: p. 275-285.
85. Serradeil-Le Gal C, Bourrié B, Raufaste D, Carayon P, Garcia C, Maffrand JP, Le Fur G, Casellas P. (1994) Effect of a new, potent, non-peptide V1a vasopressin antagonist, SR 49059, on the binding and the mitogenic activity of vasopressin on Swiss 3T3 cells. Biochem Pharmacol, 47(4): p. 633-41.
86. Montero S, Mendoza H, Valles V, Lemus M, Alvarez-Buylla R, de Alvarez-Buylla ER. (2006) Arginine-vasopressin mediates central and peripheral glucose regulation in response to carotid body receptor stimulation with Na-cyanide. J Appl Physiol, 100(6): p. 1902-9.
87. Richmond, CA. (2003) The role of arginine vasopressin in thermoregulation during fever. J Neurosci Nurs, 35(5): p. 281-6.
88. Caldwell HK, Lee HJ, Macbeth AH, Young WS 3rd. (2008) Vasopressin: behavioral roles of an "original" neuropeptide. Prog Neurobiol, 84(1): p. 1-24.
89. Buijs RM, van Eden CG, Goncharuk VD, Kalsbeek A. (2003) The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. J Endocrinol, 177(1): p. 17-26.
90. Yang J, Yang Y, Chen JM, Xu HT, Liu WY, Wang CH, Lin BC. (2007) Arginine vasopressin is an important regulator in antinociceptive modulation of hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. Neuropeptides, 41(3): p. 165-76.
91. Yang J, Chen JM, Liu WY, Song CY, Lin BC. (2006) Through V2, not V1 receptor relating to endogenous opiate peptides, arginine vasopressin in periaqueductal gray regulates antinociception in the rat. Regul Pept, 137(3): p. 156-61.

92. Ferris CF, Potegal M. (1988) Vasopressin receptor blockade in the anterior hypothalamus suppresses aggression in hamsters. Physiol Behav, 44(2): p. 235-9.
93. Blanchard RJ, Griebel G, Farrokhi C, Markham C, Yang M, Blanchard DC. (2005) AVP V1b selective antagonist SSR149415 blocks aggressive behaviors in hamsters. Pharmacol Biochem Behav, 80(1): p. 189-94.
94. Wersinger SR, Caldwell HK, Christiansen M, Young WS 3rd. (2007) Disruption of the vasopressin 1b receptor gene impairs the attack component of aggressive behavior in mice. Genes Brain Behav, 6(7): p. 653-60.
95. Wersinger SR, Caldwell HK, Christiansen M, Young WS 3rd. (2007) Vasopressin 1a receptor knockout mice have a subtle olfactory deficit but normal aggression. Genes Brain Behav, 6(6): p. 540-51.
96. Insel TR, Wang ZX, Ferris CF. (1994) Patterns of brain vasopressin receptor distribution associated with social organization in microtine rodents. J Neurosci,. 14(9): p. 5381-92.
97. Wang Z, Ferris CF, De Vries GJ. (1994) Role of septal vasopressin innervation in paternal behavior in prairie voles (Microtus ochrogaster). Proc Natl Acad Sci U S A, 91(1): p. 400-4.
98. Tobin VA, Hashimoto H, Wacker DW, Takayanagi Y, Langnaese K, Caquineau C, Noack J, Landgraf R, Onaka T, Leng G, Meddle SL, Engelmann M, Ludwig M. (2010) An intrinsic vasopressin system in the olfactory bulb is involved in social recognition. Nature, 464(7287): p. 413-7.
99. Engelmann M, Landgraf R. (1994) Microdialysis administration of vasopressin into the septum improves social recognition in Brattleboro rats. Physiol Behav, 55(1): p. 145-9.
100. Wersinger SR, Kelliher KR, Zufall F, Lolait SJ, O'Carroll AM, Young WS 3rd. (2004) Social motivation is reduced in vasopressin 1b receptor null mice despite normal performance in an olfactory discrimination task. Horm Behav, 46(5): p. 638-45.
101. De Wied D. (1965) The influence of the posterior and intermediate lobe of the pituitary and pituitary peptides on the maintenance of a conditioned avoidance response in rats. Int J Neuropharmacol, 4: p. 157-67.
102. Alescio-Lautier B, Rao H, Paban V, Devigne C, Soumireu-Mourat B. (1995) Inhibition of the vasopressin-enhancing effect on memory retrieval and relearning by a vasopressin V1 receptor antagonist in mice. Eur J Pharmacol,. 294(2-3): p. 763-70.
103. Aarde SM, Jentsch JD. (2006) Haploinsufficiency of the arginine-vasopressin gene is associated with poor spatial working memory performance in rats. Horm Behav, 49(4): p. 501-8.
104. Turkelson CM, Thomas CR, Arimura A, Chang D, Chang JK, Shimizu M. (1982) In vitro potentiation of the activity of synthetic ovine corticotropin-releasing factor by arginine vasopressin. Peptides, 3(2): p. 111-3.
105. Abou-Samra AB, Harwood JP, Catt KJ, Aguilera G. (1987) Mechanisms of action of CRF and other regulators of ACTH release in pituitary corticotrophs. Ann N Y Acad Sci,. 512: p. 67-84.

106. Hisano S, Tsuruo Y, Katoh S, Daikoku S, Yanaihara N, Shibasaki T. (1987) Intragranular colocalization of arginine vasopressin and methionine-enkephalin-octapeptide in CRF-axons in the rat median eminence. Cell Tissue Res, 249(3): p. 497-507.
107. Whitnall MH, Key S, Gainer H. (1987) Vasopressin-containing and vasopressin-deficient subpopulations of corticotropin-releasing factor axons are differentially affected by adrenalectomy. Endocrinology, 120(5): p. 2180-2.
108. Ma XM, Levy A, Lightman SL. (1997) Rapid changes in heteronuclear RNA for corticotrophin-releasing hormone and arginine vasopressin in response to acute stress. J Endocrinol, 152(1): p. 81-9.
109. Bartanusz V, Jezova D, Bertini LT, Tilders FJ, Aubry JM, Kiss JZ. (1993) Stress-induced increase in vasopressin and corticotropin-releasing factor expression in hypophysiotrophic paraventricular neurons. Endocrinology, 132(2): p. 895-902.
110. Holmes MC, Antoni FA, Aguilera G, Catt KJ. (1986) Magnocellular axons in passage through the median eminence release vasopressin. Nature, 319(6051): p. 326-9.
111. Whitnall MH, Smyth D, Gainer H. (1987) Vasopressin coexists in half of the corticotropin-releasing factor axons present in the external zone of the median eminence in normal rats. Neuroendocrinology, 45(5): p. 420-4.
112. Laguna-Abreu MT, Margatho L, Germano CM, Antunes-Rodrigues J, Elias LL, de Castro M. (2007) The effect of adrenalectomy on Fos expression in vasopressinergic and oxytocinergic neurons in response to stress in the rat. Stress, 10(4): p. 332-41.
113. Tilders FJ, Berkenbosch F, Vermes I, Linton EA, Smelik PG. (1985) Role of epinephrine and vasopressin in the control of the pituitary-adrenal response to stress. Fed Proc, 44(1 Pt 2): p. 155-60.
114. Ono N, Bedran de Castro J, Khorram O, McCann SM. (1985) Role of arginine vasopressin in control of ACTH and LH release during stress. Life Sci, 36(18): p. 1779-86.
115. Tanoue A, Ito S, Honda K, Oshikawa S, Kitagawa Y, Koshimizu TA, Mori T, Tsujimoto G. (2004) The vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions. J Clin Invest, 113(2): p. 302-9.
116. Lolait SJ, Stewart LQ, Roper JA, Harrison G, Jessop DS, Young WS 3rd, O'Carroll AM. (2007) Attenuated stress response to acute lipopolysaccharide challenge and ethanol administration in vasopressin V1b receptor knockout mice. J Neuroendocrinol, 19(7): p. 543-51.
117. Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Simiand J, Griebel G, Lacour C, Guillon G, Barberis C, Brossard G, Soubrié P, Nisato D, Pascal M, Pruss R, Scatton B, Maffrand JP, Le Fur G. (2002) Characterization of (2S,4R)-1-[5-chloro-1-[(2,4-dimethoxyphenyl)sulfonyl]-3-(2-methoxy-phenyl)-2-oxo- 2,3-dihydro-1H-indol-3-yl]-4-hydroxy-N,N-dimethyl-2-pyrrolidine carboxamide (SSR149415), a selective and orally active vasopressin V1b receptor antagonist. J Pharmacol Exp Ther, 300(3): p. 1122-30.

118. Ramos AT, Troncone LR, Tufik S. (2006) Suppression of adrenocorticotrophic hormone secretion by simultaneous antagonism of vasopressin 1b and CRH-1 receptors on three different stress models. Neuroendocrinology, 84(5): p. 309-16.
119. Valtin H, Schroeder HA. (1964) Familiar hypothalamic diabetes insipidus in rats (Brattleboro strain). Am J Physiol, 206: p. 425-30.
120. Lolait SJ, Markwick AJ, McNally M, Abraham J, Smith AI, Funder JW. (1986) Anterior pituitary cells from Brattleboro (di/di), Long-Evans and Sprague-Dawley rats contain immunoreactive arginine vasopressin. Neuroendocrinology, 43(5): p. 577-83.
121. Surget A, Belzung C. (2008) Involvement of vasopressin in affective disorders. Eur J Pharmacol, 583(2-3): p. 340-9.
122. El Yacoubi M, Vaugeois JM. (2007) Genetic rodent models of depression. Curr Opin Pharmacol, 7(1): p. 3-7.
123. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. (1978) Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. Eur J Pharmacol, 47(4): p. 379-91.
124. Wotjak CT, Ganster J, Kohl G, Holsboer F, Landgraf R, Engelmann M. (1998) Dissociated central and peripheral release of vasopressin, but not oxytocin, in response to repeated swim stress: new insights into the secretory capacities of peptidergic neurons. Neuroscience, 85(4): p. 1209-22.
125. Ebner K, Wotjak CT, Holsboer F, Landgraf R, Engelmann M. (1999) Vasopressin released within the septal brain area during swim stress modulates the behavioural stress response in rats. Eur J Neurosci, 11(3): p. 997-1002.
126. Ebner K, Wotjak CT, Landgraf R, Engelmann M. (2002) Forced swimming triggers vasopressin release within the amygdala to modulate stress-coping strategies in rats. Eur J Neurosci, 15(2): p. 384-8.
127. Griebel G, Simiand J, Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Pascal M, Scatton B, Maffrand JP, Soubrie P. (2002) Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. Proc Natl Acad Sci U S A, 99(9): p. 6370-5.
128. Mlynarik M, Zelena D, Bagdy G, Makara GB, Jezova D. (2007) Signs of attenuated depression-like behavior in vasopressin deficient Brattleboro rats. Horm Behav, 51(3): p. 395-405.
129. Schank, JC. (2009) Early locomotor and social effects in vasopressin deficient neonatal rats. Behav Brain Res, 197(1): p. 166-77.
130. Keck ME, Welt T, Müller MB, Uhr M, Ohl F, Wigger A, Toschi N, Holsboer F, Landgraf R. (2003) Reduction of hypothalamic vasopressinergic hyperdrive contributes to clinically relevant behavioral and neuroendocrine effects of chronic paroxetine treatment in a psychopathological rat model. Neuropsychopharmacology, 28(2): p. 235-43.
131. Wigger A, Sánchez MM, Mathys KC, Ebner K, Frank E, Liu D, Kresse A, Neumann ID, Holsboer F, Plotsky PM, Landgraf R. (2004) Alterations in central neuropeptide expression, release, and receptor binding in rats bred for high anxiety: critical role of vasopressin. Neuropsychopharmacology, 29(1): p. 1-14.

132. Cryan JF, Slattery DA. (2007) Animal models of mood disorders: Recent developments. Curr Opin Psychiatry, 20(1): p. 1-7.
133. Landgraf R, Kessler MS, Bunck M, Murgatroyd C, Spengler D, Zimbelmann M, Nussbaumer M, Czibere L, Turck CW, Singewald N, Rujescu D, Frank E. (2007) Candidate genes of anxiety-related behavior in HAB/LAB rats and mice: focus on vasopressin and glyoxalase-I. Neurosci Biobehav Rev, 31(1): p. 89-102.
134. Bielsky IF, Hu SB, Szegda KL, Westphal H, Young LJ. (2004) Profound impairment in social recognition and reduction in anxiety-like behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. Neuropsychopharmacology, 29(3): p. 483-93.
135. Egashira N, Tanoue A, Matsuda T, Koushi E, Harada S, Takano Y, Tsujimoto G, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M. (2007) Impaired social interaction and reduced anxiety-related behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. Behav Brain Res, 178(1): p. 123-7.
136. Bielsky IF, Hu SB, Ren X, Terwilliger EF, Young LJ. (2005) The V1a vasopressin receptor is necessary and sufficient for normal social recognition: a gene replacement study. Neuron, 47(4): p. 503-13.
137. Amico JA, Vollmer RR, Karam JR, Lee PR, Li X, Koenig JI, McCarthy MM. (2004) Centrally administered oxytocin elicits exaggerated grooming in oxytocin null mice. Pharmacol Biochem Behav, 78(2): p. 333-9.
138. Landgraf R, Gerstberger R, Montkowski A, Probst JC, Wotjak CT, Holsboer F, Engelmann M. (1995) V1 vasopressin receptor antisense oligodeoxynucleotide into septum reduces vasopressin binding, social discrimination abilities, and anxiety-related behavior in rats. J Neurosci, 15(6): p. 4250-8.
139. Liebsch G, Wotjak CT, Landgraf R, Engelmann M. (1996) Septal vasopressin modulates anxiety-related behaviour in rats. Neurosci Lett, 217(2-3): p. 101-4.
140. Appenrodt E, Schnabel R, Schwarzberg H. (1998) Vasopressin administration modulates anxiety-related behavior in rats. Physiol Behav, 64(4): p. 543-7.
141. Caldwell HK, Stewart J, Wiedholz LM, Millstein RA, Iacangelo A, Holmes A, Young WS 3rd, Wersinger SR. (2006) The acute intoxicating effects of ethanol are not dependent on the vasopressin 1a or 1b receptors. Neuropeptides, 40(5): p. 325-37.
142. Stemmelin J, Lukovic L, Salome N, Griebel G. (2005) Evidence that the lateral septum is involved in the antidepressant-like effects of the vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415. Neuropsychopharmacology, 30(1): p. 35-42.
143. Salomé N, Stemmelin J, Cohen C, Griebel G. (2006) Differential roles of amygdaloid nuclei in the anxiolytic- and antidepressant-like effects of the V1b receptor antagonist, SSR149415, in rats. Psychopharmacology (Berl), 187(2): p. 237-44.
144. de Bree FM, Burbach JP. (1998) Structure-function relationships of the vasopressin prohormone domains. Cell Mol Neurobiol, 18(2): p. 173-91.
145. Schmale H, Richter D. (1984) Single base deletion in the vasopressin gene is the cause of diabetes insipidus in Brattleboro rats. Nature, 308(5961): p. 705-9.

146. Schmale H, Borowiak B, Holtgreve-Grez H, Richter D. (1989) Impact of altered protein structures on the intracellular traffic of a mutated vasopressin precursor from Brattleboro rats. Eur J Biochem, 182(3): p. 621-7.
147. Bohus B, de Wied D. (1998) The vasopressin deficient Brattleboro rats: a natural knockout model used in the search for CNS effects of vasopressin. Prog Brain Res, 119: p. 555-73.
148. Zelena D, Mergl Z, Makara GB. (2003) Maternal genotype influences stress reactivity of vasopressin-deficient brattleboro rats. J Neuroendocrinol, 15(12): p. 1105-10.
149. Zelena D, Kiem DT, Barna I, Makara GB. (1999) Alpha 2-adrenoreceptor subtypes regulate ACTH and beta-endorphin secretions during stress in the rat. Psychoneuroendocrinology, 24(3): p. 333-43.
150. Brooker G, Harper JF, Terasaki WL, Moylan RD. (1979) Radioimmunoassay of cyclic AMP and cyclic GMP. Advances in cyclic nucleotide research, 10: p. 1-33.
151. Mergl Z, Acs Z, Makara GB. (1995) Growth hormone secretion and activation of cyclic AMP by growth hormone releasing hormone and gamma-aminobutyric acid in the neonatal rat pituitary. Life Sci, 56(8): p. 579-85.
152. Barna I, Bálint E, Baranyi J, Bakos N, Makara GB, Haller J. (2003) Gender-specific effect of maternal deprivation on anxiety and corticotropin-releasing hormone mRNA expression in rats. Brain Res Bull, 62(2): p. 85-91.
153. Acs Z, Szabó B, Kapócs G, Makara GB. (1987) gamma-Aminobutyric acid stimulates pituitary growth hormone secretion in the neonatal rat. A superfusion study. Endocrinology, 120(5): p. 1790-8.
154. Barna I, Zelena D, Arszovszki AC, Ledent C. (2004) The role of endogenous cannabinoids in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation: in vivo and in vitro studies in CB1 receptor knockout mice. Life Sci, 75(24): p. 2959-70.
155. Zelena D, Domokos A, Jain SK, Jankord R, Filaretova L. (2009) The stimuli-specific role of vasopressin in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis response to stress. J Endocrinol, 202(2): p. 263-78.
156. Haller J, Leveleki C, Baranyi J, Mikics E, Bakos N. (2003) Stress, social avoidance and anxiolytics: a potential model of stress-induced anxiety. Behav Pharmacol, 14(5-6): p. 439-46.
157. Zelena D, Langnaese K, Domokos A, Pintér O, Landgraf R, Makara GB, Engelmann M. (2009) Vasopressin administration into the paraventricular nucleus normalizes plasma oxytocin and corticosterone levels in Brattleboro rats. Endocrinology, 150(6): p. 2791-8.
158. Horn TF, Engelmann M. (2001) In vivo microdialysis for nonapeptides in rat brain--a practical guide. Methods,. 23(1): p. 41-53.
159. Domokos A, Mergl Z, Barna I, Makara GB, Zelena D. (2008) Congenital vasopressin deficiency and acute and chronic opiate effects on hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity in Brattleboro rats. J Endocrinol, 196(1): p. 113-21.
160. Houshyar H, Cooper ZD, Woods JH. (2001) Paradoxical effects of chronic morphine treatment on the temperature and pituitary-adrenal responses to acute restraint stress: a chronic stress paradigm. J Neuroendocrinol, 13(10): p. 862-74.

161. Houshyar H, Galigniana MD, Pratt WB, Woods JH. (2001) Differential responsivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to glucocorticoid negative-feedback and corticotropin releasing hormone in rats undergoing morphine withdrawal: possible mechanisms involved in facilitated and attenuated stress responses. J Neuroendocrinol, 13(10): p. 875-86.
162. Zelena, D., A. Domokos,Z. Mergl, The Role of Vasopressin in Chronic Stress-induced Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Hyperactivity: Studies on Brattleboro Rats with repeated restraint. . in Neuropeptide Research Trends, Nova Publishers, 2007. Chapter VII.: p. 189-212.
163. Varga J, Domokos A, Barna I, Jankord R, Bagdy G, Zelena D. (2011) Lack of vasopressin does not prevent the behavioural and endocrine changes induced by chronic unpredictable stress. Brain Res Bull, 84(1): p. 45-52.
164. Zelena D, Domokos A, Barna I, Mergl Z, Haller J, Makara GB. (2008) Control of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the neonatal period: adrenocorticotropin and corticosterone stress responses dissociate in vasopressin-deficient brattleboro rats. Endocrinology, 149(5): p. 2576-83.
165. Barna I, Acs Z, Koenig JI. (1993) Effects of Hypnorm (fentanyl) on ACTH/beta-endorphin levels in plasma, pituitary and brain of 10-day old rats. Life Sci, 52(17): p. 1417-24.
166. Makara GB, Domokos A, Mergl Z, Csabai K, Barna I, Zelena D. (2008) Gender-specific regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and the role of vasopressin during the neonatal period. Ann N Y Acad Sci, 1148: p. 439-45.
167. Herman JP, Prewitt CM, Cullinan WE. (1996) Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. Crit Rev Neurobiol,. 10(3-4): p. 371-94.
168. Wiley MK, Pearlmutter AF, Miller RE. (1974) Decreased adrenal sensitivity to ACTH in the vasopressin-deficient (Brattleboro) rat. Neuroendocrinology, 14(5): p. 257-70.
169. Brudieux R, Krifi MN, Laulin JP. (1986) Release of aldosterone and corticosterone from the adrenal cortex of the Brattleboro rat in response to administration of ACTH. J Endocrinol, 111(3): p. 375-81.
170. Spiga F, Harrison LR, Wood S, Knight DM, MacSweeney CP, Thomson F, Craighead M, Lightman SL. (2009) Blockade of the V(1b) receptor reduces ACTH, but not corticosterone secretion induced by stress without affecting basal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. J Endocrinol, 200(3): p. 273-83.
171. Stewart LQ, Roper JA, Young WS 3rd, O'Carroll AM, Lolait SJ. (2008)Pituitary-adrenal response to acute and repeated mild restraint, forced swim and change in environment stress in arginine vasopressin receptor 1b knockout mice. J Neuroendocrinol, 20(5): p. 597-605.
172. Bornstein SR, Engeland WC, Ehrhart-Bornstein M, Herman JP. (2008) Dissociation of ACTH and glucocorticoids. Trends Endocrinol Metab, 19(5): p. 175-80.
173. Elifanov AV, Polenov AL, Belen'kiĭ MA, Kuzik VV. (1988) Morphofunctional research on the interrenal gland of the frog Rana temporaria following arginine vasotocin administration. Zh Evol Biokhim Fiziol, 24(5): p. 740-4.

174. Lightman SL, Young WS 3rd. (1988) Corticotrophin-releasing factor, vasopressin and pro-opiomelanocortin mRNA responses to stress and opiates in the rat. J Physiol, 403: p. 511-23.
175. Popova NK, Naumenko KS, Maslova LN, Amstislavskaya TG, Melidi NN, Bulygina VV, Ivanova LN. (2002) Hypothalamic tryptophan hydroxylase and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical response to water deprivation and hydration in vasopressin-deficient and normal rats. Pflugers Arch, 444(3): p. 372-7.
176. Schlosser SF, Almeida OF, Patchev VK, Yassouridis A, Elands J. (1994) Oxytocin-stimulated release of adrenocorticotropin from the rat pituitary is mediated by arginine vasopressin receptors of the V1b type. Endocrinology,135(5): p. 2058-63.
177. Lewandowska A, Głowacka A, Guzek JW. (1992) The vasopressin and oxytocin neurohypophysial content as influenced by bleeding or dehydration: effect of cholecystokinin octapeptide. J Physiol Pharmacol, 43(2): p. 153-63.
178. Lipińska S, Foryś S, Lipińska J. (2004) The post-haemorrhagic vasopressin release into the blood. J Physiol Pharmacol, 55(1 Pt 1): p. 73-83.
179. Földes A, Némethy Z, Szalay O, Kovács KJ. (2000) Anaphylactoid reactions activate hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis: comparison with endotoxic reactions. Brain Res Bull, 52(6): p. 573-9.
180. Plotsky PM, Bruhn TO, Otto S. (1985) Central modulation of immunoreactive arginine vasopressin and oxytocin secretion into the hypophysial-portal circulation by corticotropin-releasing factor. Endocrinology, 116(4): p. 1669-71.
181. Fujiwara Y, Hiroyama M, Sanbe A, Aoyagi T, Birumachi J, Yamauchi J, Tsujimoto G, Tanoue A. (2007) Insulin hypersensitivity in mice lacking the V1b vasopressin receptor. J Physiol, 584(Pt 1): p. 235-44.
182. Zelena D, Filaretova L, Mergl Z, Barna I, Tóth ZE, Makara GB. (2006) Hypothalamic paraventricular nucleus, but not vasopressin, participates in chronic hyperactivity of the HPA axis in diabetic rats. Am J Physiol Endocrinol Metab, 290(2): p. E243-50.
183. Zelena D, Földes A, Mergl Z, Barna I, Kovács KJ, Makara GB. (2004) Effects of repeated restraint stress on hypothalamo-pituitary-adrenocortical function in vasopressin deficient Brattleboro rats. Brain Res Bull, 63(6): p. 521-30.
184. Itagaki E, Ozawa S, Yamaguchi S, Ushikawa K, Tashiro T, Katahira H, Takizawa M, Yoshimoto K, Murakawa S, Ishida H. (2001) Increases in plasma ACTH and cortisol after hypertonic saline infusion in patients with central diabetes insipidus. J Clin Endocrinol Metab, 86(12): p. 5749-54.
185. Buckingham JC. (1981) The influence of vasopressin on hypothalamic corticotrophin releasing activity in rats with inherited diabetes insipidus. J Physiol, 312: p. 9-16.
186. Buckingham JC, Leach JH. (1980) Hypothalamo-pituitary-adrenocortical function in rats with inherited diabetes insipidus. J Physiol, 305: p. 397-404.
187. Kjaer A, Knigge U, Bach FW, Warberg J. (1993) Impaired histamine- and stress-induced secretion of ACTH and beta-endorphin in vasopressin-deficient Brattleboro rats. Neuroendocrinology, 57(6): p. 1035-41.
188. Kvetnansky R, Mikulaj L. (1970) Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. Endocrinology, 87(4): p. 738-43.

189. Burgess LH, Handa RJ. (1992) Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. Endocrinology, 131(3): p. 1261-9.
190. Correa FM, Saavedra JM. (1983) High histamine levels in specific hypothalamic nuclei of Brattleboro rats lacking vasopressin. Brain Res, 276(2): p. 247-52.
191. Saez JM, Begeot M, Durand P. (1989) [ACTH receptors]. Ann Endocrinol (Paris), 50(5): p. 409-17.
192. Voisey J, Carroll L, van Daal A. (2003) Melanocortins and their receptors and antagonists. Curr Drug Targets, 4(7): p. 586-97.
193. Boston BA, Cone RD. (1996) Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line. Endocrinology, 137(5): p. 2043-50.
194. Kapas S, Hagi-Pavli E, Brown DW, Chhajlani V, Farthing PM. (1998) Direct effects of corticotrophin on oral keratinocyte cell proliferation. Eur J Biochem, 256(1): p. 75-9.
195. Nankova B, Kvetnansky R, Hiremagalur B, Sabban B, Rusnak M, Sabban EL. (1996) Immobilization stress elevates gene expression for catecholamine biosynthetic enzymes and some neuropeptides in rat sympathetic ganglia: effects of adrenocorticotropin and glucocorticoids. Endocrinology, 137(12): p. 5597-604.
196. Weigent DA, Blalock JE. (1987) Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors. Immunol Rev, 100: p. 79-108.
197. Murphy HM, Wideman CH. (1982) Basic alterations in serum levels of several chemical substances in Brattleboro rats. Ann N Y Acad Sci, 394: p. 270-4.
198. Horn AM, Robinson IC, Fink G. (1985) Oxytocin and vasopressin in rat hypophysial portal blood: experimental studies in normal and Brattleboro rats. J Endocrinol, 104(2): p. 211-24.
199. Edwards BR, LaRochelle FT Jr. (1984) Antidiuretic effect of endogenous oxytocin in dehydrated Brattleboro homozygous rats. Am J Physiol, 247(3 Pt 2): p. F453-65.
200. Engelmann M, Ludwig M. (2004) The activity of the hypothalamo-neurohypophysial system in response to acute stressor exposure: neuroendocrine and electrophysiological observations. Stress,. 7(2): p. 91-6.
201. Jezová D, Michajlovskij N, Kvetnanský R, Makara GB. (1993) Paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus are not equally important for oxytocin release during stress. Neuroendocrinology, 57(5): p. 776-81.
202. Stachowiak A, Macchi C, Nussdorfer GG, Malendowicz LK. (1995) Effects of oxytocin on the function and morphology of the rat adrenal cortex: in vitro and in vivo investigations. Res Exp Med (Berl), 195(5): p. 265-74.
203. Swanson LW, Kuypers HG. (1980) The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. J Comp Neurol, 194(3): p. 555-70.
204. Wotjak CT, Naruo T, Muraoka S, Simchen R, Landgraf R, Engelmann M. (2001) Forced swimming stimulates the expression of vasopressin and oxytocin in magnocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. Eur J Neurosci,. 13(12): p. 2273-81.

205. Wotjak CT, Kubota M, Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Neumann I, Landgraf R. (1996) Release of vasopressin within the rat paraventricular nucleus in response to emotional stress: a novel mechanism of regulating adrenocorticotropic hormone secretion? J Neurosci, 16(23): p. 7725-32.
206. Neumann ID, Krömer SA, Toschi N, Ebner K. (2000) Brain oxytocin inhibits the (re)activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in male rats: involvement of hypothalamic and limbic brain regions. Regul Pept, 96(1-2): p. 31-8.
207. Neumann ID, Wigger A, Torner L, Holsboer F, Landgraf R. (2000) Brain oxytocin inhibits basal and stress-induced activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in male and female rats: partial action within the paraventricular nucleus. J Neuroendocrinol, 12(3): p. 235-43.
208. Loichot C, Krieger JP, De Jong W, Nisato D, Imbs JL, Barthelmebs M. (2001) High concentrations of oxytocin cause vasoconstriction by activating vasopressin V1A receptors in the isolated perfused rat kidney. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 363(4): p. 369-75.
209. Vaccari C, Lolait SJ, Ostrowski NL. (1998) Comparative distribution of vasopressin V1b and oxytocin receptor messenger ribonucleic acids in brain. Endocrinology, 139(12): p. 5015-33.
210. Buckingham JC, Cooper TA. (1984) Differences in hypothalamo-pituitary-adrenocortical activity in the rat after acute and prolonged treatment with morphine. Neuroendocrinology, 38(5): p. 411-7.
211. Houshyar H, Gomez F, Manalo S, Bhargava A, Dallman MF. (2003) Intermittent morphine administration induces dependence and is a chronic stressor in rats. Neuropsychopharmacology, 28(11): p. 1960-72.
212. Zhou Y, Leri F, Cummins E, Hoeschele M, Kreek MJ. 2008 Involvement of arginine vasopressin and V1b receptor in heroin withdrawal and heroin seeking precipitated by stress and by heroin. Neuropsychopharmacology,. 33(2): p. 226-36.
213. Coventry TL, Jessop DS, Finn DP, Crabb MD, Kinoshita H, Harbuz MS. (2001) Endomorphins and activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. J Endocrinol, 169(1): p. 185-93.
214. Maldonado R, Stinus L, Gold LH, Koob GF. (1992) Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. J Pharmacol Exp Ther, 261(2): p. 669-77.
215. McNally GP, Akil H. (2002) Role of corticotropin-releasing hormone in the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in the behavioral, pain modulatory, and endocrine consequences of opiate withdrawal. Neuroscience, 112(3): p. 605-17.
216. Höllt V, Haarmann I. (1985) Differential alterations by chronic treatment with morphine of pro-opiomelanocortin mRNA levels in anterior as compared to intermediate pituitary lobes of rats. Neuropeptides, 5(4-6): p. 481-4.
217. Zelena D, Mergl Z, Makara GB. (2005) Glutamate agonists activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis through hypothalamic paraventricular nucleus but not through vasopressinerg neurons. Brain Res, 1031(2): p. 185-93.
218. Buckingham JC. (1987) Vasopressin receptors influencing the secretion of ACTH by the rat adenohypophysis. J Endocrinol, 113(3): p. 389-96.

219. Laulin JP, Ezzarani EA, Brudieux R. (1985) Production of corticosterone in male homozygous Brattleboro rats. Horm Metab Res, 17(7): p. 342-5.
220. Reghunandanan V, Reghunandanan R, Marya RK. (1991) Vasopressin: its possible role in circadian time keeping. Chronobiologia, 18(1): p. 39-47.
221. Schröder H, Stehle J, Henschel M. (1988) Twenty-four-hour pineal melatonin synthesis in the vasopressin-deficient Brattleboro rat. Brain Res, 459(2): p. 328-32.
222. Tankosic P, Burlet A, Jegou S, Chateau M, Vaudry H, Burlet C, Boulangé M. (1982) Fetal and postnatal maturation of corticotrope function in the vasopressin-deficient rat (Brattleboro strain): a radioimmunological, immunocytochemical, and morphometric study. Ann N Y Acad Sci, 394: p. 560-73.
223. Ma XM, Lightman SL, Aguilera G. (1999) Vasopressin and corticotropin-releasing hormone gene responses to novel stress in rats adapted to repeated restraint. Endocrinology, 140(8): p. 3623-32.
224. Makino S, Smith MA, Gold PW. (1995) Increased expression of corticotropin-releasing hormone and vasopressin messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamic paraventricular nucleus during repeated stress: association with reduction in glucocorticoid receptor mRNA levels. Endocrinology, 136(8): p. 3299-309.
225. Reul JM, Labeur MS, Wiegers GJ, Linthorst AC. (1998) Altered neuroimmunoendocrine communication during a condition of chronically increased brain corticotropin-releasing hormone drive. Ann N Y Acad Sci,. 840: p. 444-55.
226. Miyata S, Itoh T, Matsushima O, Nakashima T, Kiyohara T. (1994) Not only osmotic stress but also repeated restraint stress causes structural plasticity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus. Brain Res Bull, 33(6): p. 669-75.
227. Gregus A, Wintink AJ, Davis AC, Kalynchuk LE. (2005) Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. Behav Brain Res, 156(1): p. 105-14.
228. Korte SM. (2001) Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. Neurosci Biobehav Rev,. 25(2): p. 117-42.
229. Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Valette G, Garcia G, Pascal M, Maffrand JP, Le Fur G. (2002) Nonpeptide vasopressin receptor antagonists: development of selective and orally active V1a, V2 and V1b receptor ligands. Prog Brain Res, 139: p. 197-210.
230. Cilia J, Gartlon JE, Shilliam C, Dawson LA, Moore SH, Jones DN. (2010) Further neurochemical and behavioural investigation of Brattleboro rats as a putative model of schizophrenia. J Psychopharmacol, 24(3): p. 407-19.
231. McCormick CM, Smith C, Mathews IZ. (2008) Effects of chronic social stress in adolescence on anxiety and neuroendocrine response to mild stress in male and female rats. Behav Brain Res, 187(2): p. 228-38.
232. Gameiro GH, Gameiro PH, Andrade Ada S, Pereira LF, Arthuri MT, Marcondes FK, Veiga MC. (2006) Nociception- and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress. Physiol Behav, 87(4): p. 643-9.
233. Homberg JR, van den Akker M, Raasø HS, Wardeh G, Binnekade R, Schoffelmeer AN, de Vries TJ. (2002) Enhanced motivation to self-administer cocaine is

predicted by self-grooming behaviour and relates to dopamine release in the rat medial prefrontal cortex and amygdala. Eur J Neurosci, 15(9): p. 1542-50.
234. van Erp AM, Kruk MR, Meelis W, Willekens-Bramer DC. (1994) Effect of environmental stressors on time course, variability and form of self-grooming in the rat: handling, social contact, defeat, novelty, restraint and fur moistening. Behav Brain Res, 65(1): p. 47-55.
235. Bagdy G, Graf M, Anheuer ZE, Modos EA, Kantor S. (2001) Anxiety-like effects induced by acute fluoxetine, sertraline or m-CPP treatment are reversed by pretreatment with the 5-HT2C receptor antagonist SB-242084 but not the 5-HT1A receptor antagonist WAY-100635. Int J Neuropsychopharmacol, 4(4): p. 399-408.
236. Homberg JR, Arends B, Wardeh G, Raasø HS, Schoffelmeer AN, de Vries TJ., (2004) Individual differences in the effects of serotonergic anxiolytic drugs on the motivation to self-administer cocaine. Neuroscience,. 128(1): p. 121-30.
237. Moody TW, Merali Z, Crawley JN. (1988) The effects of anxiolytics and other agents on rat grooming behavior. Ann N Y Acad Sci, 525: p. 281-90.
238. Scott LV, Dinan TG. (2002) Vasopressin as a target for antidepressant development: an assessment of the available evidence. J Affect Disord, 72(2): p. 113-24.
239. Landgraf R, Wigger A. (2003) Born to be anxious: neuroendocrine and genetic correlates of trait anxiety in HAB rats. Stress, 6(2): p. 111-9.
240. Zelena, D. (2009) Yin-Yang Neuropeptides In Depression. Frontiers in Neuroscience, 3: p. 250-251.
241. Schapiro S. (1962) Pituitary ACTH and compensatory adrenal hypertrophy in stress-non-responsive infant rats. Endocrinology, 71: p. 986-9.
242. Walker CD, Dallman MF. (1993) Neonatal facilitation of stress-induced adrenocorticotropin secretion by prior stress: evidence for increased central drive to the pituitary. Endocrinology, 132(3): p. 1101-7.
243. Drolet G, Rivest S. (2001) Corticotropin-releasing hormone and its receptors; an evaluation at the transcription level in vivo. Peptides, 22(5): p. 761-7.
244. Antoni FA. (1993) Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. Front Neuroendocrinol, 14(2): p. 76-122.
245. Levine S. (2001) Primary social relationships influence the development of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis in the rat. Physiol Behav, 73(3): p. 255-60.
246. Walker CD, Tankosic P, Tilders FJ, Burlet A. (1997) Immunotargeted lesions of paraventricular CRF and AVP neurons in developing rats reveal the pattern of maturation of these systems and their functional importance. J Neuroendocrinol, 9(1): p. 25-41.
247. Yi SJ, Baram TZ. (1994) Corticotropin-releasing hormone mediates the response to cold stress in the neonatal rat without compensatory enhancement of the peptide's gene expression. Endocrinology, 135(6): p. 2364-8.
248. Walker CD, Scribner KA, Cascio CS, Dallman MF. (1991) The pituitary-adrenocortical system of neonatal rats is responsive to stress throughout development in a time-dependent and stressor-specific fashion. Endocrinology, 128(3): p. 1385-95.

249. Payet N, Lehoux JG. (1982) Aldosterone and corticosterone stimulation by ACTH in isolated rat adrenal glomerulosa cells: interaction with vasopressin. J Physiol (Paris), 78(3): p. 317-21.
250. Ulrich-Lai YM, Engeland WC. (2002) Adrenal splanchnic innervation modulates adrenal cortical responses to dehydration stress in rats. Neuroendocrinology, 76(2): p. 79-92.
251. McDonald TJ, Nathanielsz PW. (1998) The involvement of innervation in the regulation of fetal adrenal steroidogenesis. Horm Metab Res, 30(6-7): p. 297-302.
252. Bornstein SR, Chrousos GP. (1999) Clinical review 104: Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. J Clin Endocrinol Metab, 84(5): p. 1729-36.
253. Park MK, Hoang TA, Belluzzi JD, Leslie FM. (2003) Gender specific effect of neonatal handling on stress reactivity of adolescent rats. J Neuroendocrinol, 15(3): p. 289-95.
254. Shanks N, McCormick CM, Meaney MJ. (1994) Sex differences in hypothalamic-pituitary-adrenal responding to endotoxin challenge in the neonate: reversal by gonadectomy. Brain Res Dev Brain Res, 79(2): p. 260-6.
255. Schmidt MV, Deussing JM, Oitzl MS, Ohl F, Levine S, Wurst W, Holsboer F, Müller MB, de Kloet ER. (2006) Differential disinhibition of the neonatal hypothalamic- pituitary-adrenal axis in brain-specific CRH receptor 1-knockout mice. Eur J Neurosci, 24(8): p. 2291-8.

9. Saját publikációk jegyzéke

9.1 A disszertácó alapjául szolgáló közlemények, könyvfejezet

1: Zelena D, Domokos A, Barna I, Csabai K, Bagdy Gy, Makara GB. (2007) The role of vasopressin in chronic stress studied in a chronic mild stress model of depression. Ideggyogy Sz. 30;60(3-4):196-200.

2: Domokos A, Mergl Z, Barna I, Makara GB, Zelena D. (2008),Congenital vasopressin deficiency and acute and chronic opiate effects on hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity in Brattleboro rats. J Endocrinol. 196(1):113-21.

3: Zelena D, Domokos A, Barna I, Mergl Z, Haller J, Makara GB. (2008) Control of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the neonatal period: adrenocorticotropin and corticosterone stress responses dissociate in vasopressin-deficient brattleboro rats. Endocrinology. 149(5):2576-83.

4: Makara GB, Domokos A, Mergl Z, Csabai K, Barna I, Zelena D. (2008) Gender-specific regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and the role of vasopressin during the neonatal period. Ann N Y Acad Sci. 1148:439-45.

5: Zelena D, Langnaese K, Domokos A, Pintér O, Landgraf R, Makara GB, Engelmann M. (2009) Vasopressin administration into the paraventricular nucleus normalizes plasma oxytocin and corticosterone levels in Brattleboro rats. Endocrinology 150(6):2791-8.

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

7: Varga J, Domokos A, Barna I, Jankord R, Bagdy Gy, Zelena D. (2011) Lack of vasopressin does not prevent the behavioural and endocrine changes induced by chronic unpredictable stress. Brain Res Bull. 15;84(1):45-52.

Könyvfejezet:

1: Zelena D., Domokos A., Mergl Zs., The Role of Vasopressin in Chronic Stress-induced Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Hyperactivity: Studies on Brattleboro Rats with repeated restraint. in Neuropeptide Research Trends, Nova Publishers, (2007) Chapter VII. pp. 189-212

9.2 . Egyéb- nem az értekezés témájában megjelent- közlemények:

1: Pákáski M, Hugyecz M, Sántha P, Jancsó G, Bjelik A, Domokos A, Janka Z, Kálmán J. (2009) Capsaicin promotes the amyloidogenic route of brain amyloid precursor protein processing. Neurochem Int. 54(7):426-30.

2: Ádori C, Zelena D, Tímár J, Gyarmati Zs, Domokos Á, Sobor M, Fürst Zs, Makara G, Bagdy Gy. (2010) Intermittent prenatal MDMA exposure alters physiological but not mood related parameters in adult rat offspring. Behav Brain Res. 20;206(2):299-309.

3: Kálmán S, Pákáski M, Szücs S, Garab D, Domokos Á, Zvara A, Puskás L, Bagdy Gy, Zelena D, Kálmán J. (2009) The transcription of the amyloid precursor protein and tryptophan 2,3-dioxygenase genes are increased by aging in the rat brain. Ideggyogy Sz. 30;62(9-10):326-32. Hungarian.

4: Szücs S, Pákáski M, Domokos Á, Kálmán J Jr, Kálmán S, Garab D, Penke B, Szabó G, Janka Z, Kálmán J. (2010) The effects of duloxetine on beta-actin stress response in rat brain. Neuropsychopharmacol Hung. 12(1):301-7. Hungarian.

5: Pintér O, Domokos Á, Mergl Z, Mikics É, Zelena D. (2011) Do stress hormones connect environmental effects with behavior in the forced swim test? Endocr J.;58(5):395-407.

10. Köszönetnyilvánítás

Őszinte hálával tartozom Makara Gábor Tanár Úrnak, aki munkám kezdetén megismertetett a természettudományos kutatás iránti mély és alázatos tisztelettel.

Tisztelet és mérhetetlen köszönet illeti témavezetőmet Zelena Dórát, hiszen a türelme és oktató szavai nélkül ma ez a dolgozat nem létezhetne. Köszönöm, hogy hitt bennem és intő szavaival visszaterelt ehhez a dolgozathoz.

Mergl Zsuzsa és Bekóné Hajni bátorító és oktató szavai is sok nehéz pillanaton lendítettek keresztül. Köszönöm a sok apró ötletet és segítségüket, mellyel munkámat könnyebbé tették.

Köszönet illeti Barna Istvánt az *in situ hibridizációk* során nyújtott segítségéért.

Sokat köszönhetek a Magatartásélettan és Stressz kutatócsoport minden tagjának, hiszen egy olyan közegben dolgozhattam velük, ami szakmailag inspiráló, emberileg támogató volt.

Köszönet illeti Édesanyámat, Kislányomat és Nővéremet, akik a legnehezebb időszakban is kitartottak mellettem és sok terhet vettek le a vállamról, hogy a dolgozatom nyugodt körülmények között megszülethessen.