

A vazopresszin szabályozó szerepe stresszben és stresszhez kapcsolódó kóros folyamatok során

MTA Doktori értekezés

Dr Zelena Dóra Tímea

Magyar Tudományos Akadémia,
Kísérleti Orvostudományi Intézet

„Theories don't have to be correct – only facts do.” (Selye János)

Budapest
2015

1. Bevezetés

Orvosi jelentősége miatt a stressz fogalma alatt általában a distresszt értjük, ami megvalósulhat a szervezet, de a sejtek szintjén is. Selye János felismerte a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely (HHM) jelentőségét a stressz-folyamatok szabályozásában, és a stressz-szindróma tüneteire a tengely véghormonjait, a glükokortikoidokat (GC) tette felelőssé. Ma a tengely hipotalamikus szabályozásában a kortikotropin elválasztást serkentő hormont (corticotropin-releasing hormone, CRH) tekintjük az elsődlegesnek, de történetileg az első felfedezett hasonló szerepű molekula a vazopresszin (arginine vasopressin, AVP) volt.

Kutatómunkám célja az AVP szerepének vizsgálata volt a stressz-tengely működésében az akut és krónikus stresszorok összehasonlítása révén, valamint a kor és nem függő különbségek feltérképezése. A stresszhez kapcsolódó kórképek közül a gyomorfekély, valamint pszichiátriai eltérések (szorongás, depresszió, patológiás agresszió) tanulmányozására került sor.

2. Irodalmi háttér

A stresszorok csoportosítása sok szempont alapján történhet. Kiindulhatunk a stressz időbeni fennállásából, ami alapján beszélhetünk **akut** és **krónikus** stresszről. További szempont, hogy vajon a stressz feldolgozásában magasabb előagyi struktúrák (pl. limbikus területek) részt vesznek-e vagy sem. A **fizikai stresszorok** esetén az agykérgi aktiváció minimális, az ingerület egyszerű, néhány neuronos pályákon keresztül jut el a HHM tengelyhez. **Pszichogén stresszorok** esetén sokkal összetettebben, a prefrontális kéreg, hippocampusz és amigdala közreműködésével valósul meg a HHM tengely aktiváció.

A stressz-adaptációban során a **HHM tengely** agyi komponenséhez, a hipotalamusz paraventriculáris magjának (PVN) hipofizeotróp kissejtes (parvocelluláris) neuronjaiba futnak be az információk. A feldolgozandó ingerek hatására ezek a sejtek CRH-t és AVP-t juttatnak az agyalapi mirigy portális keringésébe. A portális vérbe jutott CRH és AVP fokozza a hipofízis elülső lebeny (adenohipofízis, anterior lobe, AL) adrenokortikotróp hormonjának (adrenocorticotropin, ACTH) termelődését, mely végső soron a mellékvesék kéregállományában található sejtek GC szekrécióját fokozza.

Az ACTH képes serkenteni a mellékvesekéreg egy másik hormonjának, a só-víz háztartás szabályozásában résztvevő mineralokortikoid (MC) aldoszteronnak a termelődését is. Valamint a stresszreakcióban fontosak a mellékvesevelő katekolaminjai is, melyek a szimpatikus idegrendszer részét képezik (szimpatoadrenomedulláris rendszer, SAS). Nagy mennyiségben

érhetik el a kéregállományt, továbbá a kéreg a splanchnikus idegeken keresztül szimpatikus beidegzést is kap, így képesek lehetnek a GC elválasztás szabályozására.

A mellékvesekérgen túl GC-k lokálisan számos szervben is termelődhetnek, például az elsődleges limfoid szervekben, bélben, bőrben, agyban és feltehetően a szívben is. Funkciói több csoportba sorolhatjuk: a korai hatások közé tartoznak a (1) serkentő, védekezést fokozó folyamatok, míg a késői hatások között szerepelnek a (2) szupresszív, gátló hatások, melyek a hormonális „túllövést” akadályozzák meg, valamint a (3) preparatív és (4) permisszív hatások, melyek a következő stresszor előtt hatva, az arra való felkészülést segítik, a „rendelkezésre állást” biztosítják. A direkt hatásokon túl más hormonok, molekulák hatásait is kiterjedten befolyásolják. A homeosztatiszikus egyensúly értelmében a GC-knak van egy optimális szintje. A túl sok, de a túl kevés is betegségekhez vezethet. Néhány szerző úgy gondolja, hogy a GC-k pontos fiziológiás hatásának feltárása még várat magára.

A GC-k és MC-k lipid természetüknél fogva szabadon képesek a sejtek membránján átdiffundálni, fő hatásukat intracelluláris magreceptorokon keresztül fejtik ki (**II. típusú (glükokortikoid) receptor (GR)** és **I. típusú (mineralokortikoid) receptor (MR)**). A vesékben a **11- β -hidoxiszteroid-dehidrogenáz 2 (11 β HSD2)** inaktíválja a GC-kat, így fokozva az MC hatást az MR-eken. A GC-k (és MC-k is) néhány perc alatt bekövetkező, génexpressziótól független magatartási válaszokat is képesek kiváltani, amiket gyors, **nem-genomiális hatásoknak** nevezünk.

A HHM tengelyre vonatkozó fentebb vázolt elképzelések felnőtt alanyok vizsgálatából származnak, viszont világos, hogy a HHM tengely csak érési folyamaton átesve nyeri el felnőttkori formáját. Patkányoknál a HHM tengely már a késő magzati korban is működőképes. A születés körüli időszakban rágcásálóknál magas kortikoszteron szint mérhető, ami a világra jövetelt követő pár nap alatt lecsökken, majd két héten át alacsonyan marad. Mivel ezen időszak alatt a különféle stresszorok a felnőttben mérhető aktivációhoz képest csak mérsékelt HHM működést váltanak ki, így ezt az időszakot stressz hiporeszponzív periódusnak nevezik (**SHRP**). Az SHRP létrejöttében a hipotalamusz hormonjainak csökkent termelődése és transzportja is közrejátszhat, mivel hogy perinatálisan a CRH gén nem fejeződik ki a felnőtteknél látott mértékben. Ezzel ellentétesen az AVP gén kifejeződésének szabályozása meglehetősen korán éretté válik, ez pedig arra enged következtetni, hogy az SHRP alatt az AVP a fő faktor, amely az

ACTH termelődését és elválasztását szabályozza, de kísérleteink kezdetekor ennek bizonyítása még váratott magára.

A nemi kromoszómák, hormonok alapvetően befolyásolják minden egyes sejtünk aktivitását, így az idegsejteket is, ezért nem csoda, hogy egyes pszichiátriai betegségek is (mint például az egyik leginkább stressz-függő depresszió) erőteljes **nemi eltéréseket** mutatnak. Ez sürgetővé teszi az élettani folyamatok összehasonlítását a hím és nőstény egyedekben. Annál is inkább, mert a neuroendokrinológiai kutatásokban (de általában az állatkísérletekben is) elsődlegesen hím állatokat vizsgálunk, mivel a nőstényekben a ciklust is figyelembe kellene venni.

Egy speciális nőknél megfigyelhető állapot a **terhesség és szoptatás**, melyet a szervezet krónikus stressz állapotként él meg. Patkányokban a szülést követő időszakban a nyugalmi HHM aktivitás ugyanúgy fokozott, mint krónikus stressz során, ugyanakkor különböző stresszorok hatására bekövetkező HHM tengely-aktiválódás kisebb mértékű, mint a szűz nőstényeknél.

Krónikus stresszfolyamatok során felmerült, hogy a GC visszacsatolásra kevésbé érzékeny **AVP** venné át a CRH-tól a HHM tengely szabályozását, mivel az AVP-CRH koexpresszió mértéke a PVN-ben krónikus stressz során nő. Az AVP fő termelői a hipotalamusz parvo- és magnocelluláris neuroszekréciós sejtjei (PVN, nucleus supraopticus (SON), nucleus suprachiasmaticus (SCN)), de más agyterületek pl.: bed nucleus of stria terminalis (BNST) és a mediális amigdala sejtjei is előállítják. Néhány perifériás szervben is szintetizálódik, például a mellékvese kromaffin sejtjeiben, amik a velőben, vagy elszórva a kéregben, elősorban a zona glomerulosa-ban található. De AVP szintetizáló sejtek megtalálható a petefészekben, herékben és a gyomor-bél traktusban is.

Az AVP szerteágazó hatású molekula, legismertebb szerepe a vízvisszatartás a vesében, illetve nagy dózisban a simaizomok kontrakciója. A cirkadián ritmus szabályozásában is alapvető jelentőségű. A HHM tengely szabályozása szempontjából a PVN parvocelluláris sejtjeinek van kitüntetett szerepe, bár a többen a magnocelluláris AVP szabályozó szerepét is felvetették. Különösen a szómából és dendritekből ürülő AVP stresszhez kapcsolható magatartás befolyásolásában játszott szerepe látszik bizonyítottnak. Munkánk kezdetekor az AVP stresszre gyakorolt hatásáról ellentmondó adatok álltak rendelkezésre és fiziológiás szerepéről nem alakult ki egyöntetű kép. Viszont számos stresszel kapcsolatos betegséggel is összefüggésbe hozták.

Az AVP stresszszabályozó szerepéből kiindulva azt gondolhatjuk, hogy elősegíti a **gyomorfekély** kialakulását. Valóban, László Ferenc és munkatársai számos kísérletben alátámasztották ezt a szerepet. Ezzel ellentétben számos további tanulmány az AVP gyomorfekélyt védő szerepéről számolt be. Összességében tehát megállapíthatjuk, hogy az AVP szerepe a gyomorfekély kialakulásában kérdéses, és egyáltalán nem vizsgálták a szerepét a fekély gyógyulására. Az ellentmondó eredmények hátterében - többek között - korfüggő változások állhatnak.

Kiterjedt irodalom mutatja az AVP **szorongásban és depresszióban** betöltött szerepét, ami alapján a HHM tengely szabályozásában résztvevő V1b AVP receptoron ható antagonistákat fejlesztettek. Sajnos az SSR149415 klinikailag hatástalannak mutatkozott, így további vizsgálatok tűntek szükségesnek más receptortípusok bevonásával.

Bár az **agresszió** praktikusán az összes élőlénynél előfordul és a túlélés záloga, patológiás formái veszélyeztethetik az emberi társadalmat. Munkacsoportunk kidolgozott két (kontrollált és impulzív) patológiás agresszió modellt is. Mindkét modell szoros összefüggést mutat a stresszel, habár a pontos mechanizmus még nem tisztázott. Nagy általánosságban az AVP az agresszió pozitív modulátorának tűnik, bár hatása agyterületenként változó lehet. Például a laterális szeptum AVP elválasztása serkenti, míg a BNST AVP elválasztása gátolja az agresszív viselkedés megjelenését. Másodsorban az AVP szerepe erősen függ attól is, hogy milyen fajta agresszióval állunk szemben. Például hörcsögben a pubertás kor alatt sorozatos vereségekkel fokozott agresszió az első hipotalamusz csökkent AVP tartalmával jár, annak ellenére, hogy felnőttben ugyanezen agyterületen az AVP szint fokozódását hozták összefüggésbe az agresszív viselkedés gyakoribb előfordulásával.

Az agresszióval szoros összefüggést mutat az **impulzivitás**, mely a környezet ingereire adott túlzó, sokszor inadekvát választ (döntési impulzivitás, choice impulsivity) és az ezen válaszok gátlásának képtelensége (motoros impulzivitás). Mivel az impulzivitás fontos kognitív karakterrel rendelkezik és az AVP szerepe ismert a tanulási és memória folyamatokban, ezért feltételezhetjük, hogy az AVP az impulzív viselkedést is befolyásolja, de ezt még soha nem tesztelték.

3. Célkitűzések

Átfogóbb képet kaphatunk, ha egyetlen modell esetén vizsgáljuk a különféle, intenzitásukban, modalitásukban eltérő stresszorok hatását, illetve a HHM tengely változásait összehasonlítjuk a betegség tünetek kialakulásával. Kísérleteinkhez az intézetünkben tartott és tenyésztett természetes mutációval AVP-hiányossá vált Brattleboro patkányok szolgáltak állatmodellként. Az állattörzset azért szereztük be, hogy bizonyítsuk az AVP fontos szabályozó szerepét krónikus stresszben. Mivel itt nem találtunk nagy eltéréseket, figyelmünk az akut stressz felé fordult. Az itt tapasztalt változások enyhe volta az élethosszig tartó AVP-hiány következménye lehet. Ezek kiküszöbölése miatt kezdtük el tanulmányozni a perinatális korú állatokat.

Az AVP szerepét a következő folyamatokban vizsgáltuk:

3.1. A HHM tengely működése

Krónikus stressz

1. Két hétig tartó krónikus stresszmodellek összehasonlítása
2. Az anya HHM tengelyének vizsgálata

Akut stressz

1. Különböző akut stresszorok hatása hím patkányok ACTH és kortikoszteron elválasztására
2. A szomato-dendritikus AVP elválasztás szerepe (mikrodialízis vizsgálatok)

Perinatális kor

1. Akut stresszorok hatása az ACTH és kortikoszteron elválasztásra
2. ACTH-kortikoszteron disszociáció (időgörbék, CBG, mellékvese érzékenység,

katekolaminok, mineralokortikoidok)

3.2. Patológia

Gyomorfekély - korfüggő hatások

Pszichiátriai eltérések

1. Szorongás- és depresszió-szerű tünetek hímelekben
2. Perifériás AVP szerepe a szorongás- és depresszió-szerű tünetek megjelenésében
3. Impulzivitás és agresszivitás nemi különbségei (hímelek és anyák)

4. Módszerek

4.1. Kísérleti állatok

A Brattleboro patkányok több, mint 50 éve egy véletlen autoszomális recesszív pontmutáció révén alakultak ki a Long Evans törzsből. Az elcsúszott leolvasási keret hatására képződött megváltozott preproAVP nem képes kijutni az endoplazmatikus retikulumból és a végeredmény a fiziológiásan aktív AVP hiánya. A perifériás szervekben az AVP más úton termelődik, így a Brattleboro állatok sajátosan csak centrális AVP hiányban szenvednek. A vérükből azonban hiányzik az AVP, így a fokozott vízfogyasztás (diabetes insipidus) esetükben is megjelenik. Ez alapján genotípusuk egyszerű vízméréssel megállapítható. Elválasztás előtti korban lévő állatoknál a hipofízis AVP szintjének radioimmunoassay (RIA) mérése informatív. Bár AVP termelés szempontjából az AVP-hiányos homozigóta recesszív állatok (di/di) legmegfelelőbb kontrollja a homozigóta domináns +/+ genotípus, a gyakorlatban elterjedt a mutációt egyetlen recesszív allél formájában hordozó heterozigóta (di/+) állatok kontrollként való használata is.

Ez a törzs az AVP biológiai folyamatokban, különösen stresszben betöltött szerepének tanulmányozására különösen alkalmas, hiszen az AVP-hiányhoz nem kell akut, önmagában is stresszelő beavatkozást végezni (pl. injekció). Az állatok pszichés állapotának megítélésére széles körben elterjedt magatartás vizsgálatok szolgálnak. Majdnem minden viselkedés alapját valamilyen hely vagy helyzetváltoztatás képezi, ezért a tesztek megítélésénél alapvető fontosságú az épp motoros rendszer, ami nem különbözött a vizsgált genotípusok közt, azaz az állatok magatartási tesztekben jól alkalmazhatók.

4.2. Alkalmazott módszerek

Krónikus vénás kanül beültetése a véna jugulárisba és sorozat vérvétel szabadon mozgó állaton.

Hormonszint mérések radioimmunoassay-vel.

A CBG kötő kapacitás mérése Shanks és Meaney Sephadex-LH-20-on alapuló módszerének módosított változatával.

Transzkardiális perfúzió, majd az agyminták szövettani vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel.

Dekapitálással nyert agymintán festés a műtét helyének pontos meghatározására, vagy in situ hibridizáció, vagy agyterületek homogenizálása és előírás szerinti feldolgozása után mRNS szintek mérése PCR-rel.

Mikrodialízis mintavevő beültetése az agyba sztereotaxikus keret segítségével, mintagyűjtés szabadon mozgó állatból.

Desmopresszin (DDAVP, V2 agonista) tartalmú Alzett ozmotikus minupumpa beültetése az állat hátbőre alá.

In vitro hormonszekréció vizsgálata statikus inkubálási rendszerben.

Gyomorfekély kialakulásának vizsgálata.

Szorongás-szerű tünetek vizsgálatára emelt keresztpalló teszt (EPM).

Depresszió-szerű tünetek vizsgálatára kényszerített úszás teszt (FST).

Az impulzivitás vizsgálata Skinner-boxokban, a késleltetés hatása a nagyjutalom preferenciára.

Az agresszió vizsgálata rezidens-betolakodó tesztben az állatok aktív (sötét) periódusának elején.

4.3. Kísérleti protokollok

1. táblázat A kísérletek, mért paraméterek és módszerek összefoglalása az ábrák számával és az eredeti cikk megjelölésével.

Speciális rövidítések: Kort: kortikoszteron, mv: mellékvese; a cikkek teljes hivatkozását lásd a tézisek végén

4.4. Statisztika

Az adatokat átlag + standard hiba (SEM) formában ábráztuk. Adatainkat az Statistica programcsomag (Tulsa, OK, USA) ANOVA/MANOVA moduljával értékeltük ki. Azoknál az eseteknél, ahol ismételt mintavétel 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.

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. A részletesebb statisztikai adatokat (pl. szabadsági fokok, F értékek) lásd a vonatkozó cikkekben

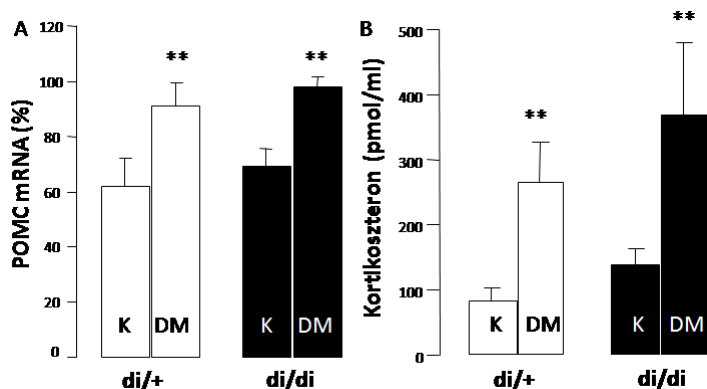
Kísérlet		Mérés	Mód-szer	Saját vonatkozó cikk	
HHM tengely					
<i>Krónikus stressz</i>					
Brattleboro	14R	POMC Kort	in situ RIA	Zelena és mtsai 2004 BRB	Makara és mtsai 2004 Annals
	Mo			Domokos és mtsai 2008 JEnd	
	DM			Zelena és mtsai 2006 AJP és BRB	
Anya		CRH Kort mv c-Fos	in situ RIA súly immun	Fodor és mtsai 2013 HormBehav Bundzikova és mtsai 2007 JPP	
<i>Akut stressz</i>					
Hímek		ACTH Kort	RIA	Zelena és mtsai 2003 JNeu, 2004 Annals; Makara és mtsai 2004 Annals, Zelena és mtsai 2005 BrainRes, Barna és mtsai 2009 EndReg, Zelena és mtsai 2009 JEndo	
		CRH	immun	Sterrenburg és mtsai, 2011 BrainRes	
Dialízis	PVN	Kort	RIA	Zelena és mtsai 2009 Endo	
	SON	OT	in situ immun RIA	Bundzikova és mtsai 2008 Annals, Zelena és mtsai 2013 JNeu	
<i>Perinatális stressz</i>					
Akut stresszor		ACTH Kort	RIA	Zelena és mtsai 2008 Endo, 2011 Stress, Makara és mtsai 2012 CEMN	
ACTH- Kort disszociáció	Idő	ACTH Kort	RIA	Zelena és mtsai 2008 Endo	
	Kort	CBG	gél	Zelena és mtsai 2011 Stress	
	mv <i>in vitro</i>	Kort	RIA	Zelena és mtsai 2008 Annals Zelena és mtsai 2011 Stress	
	symp	Adr Kort	ELISA RIA	Zelena és mtsai 2008 Annals Makara és mtsai 2012 CEMN	
	MC	Kort Aldo MR GR HSD1/2	RIA PCR	Varga és mtsai 2013 PlosOne	

Kísérlet	Összehasonlítás	Módszer	Saját vonatkozó cikk
Patológia			
<i>Gyomorfekély</i> 46. ábra	Kor	Fekély mérete	Zelena és Filaretova 2010 RegPep
<i>Szorongás és depresszió</i> 47. ábra	Hímek	EPM, FST	Mlynarik és mtsai 2007 HormBeh
			Fodor és mtsai 2012 HormBeh
<i>DDAVP</i> 48. ábra		EPM, FST	Balázsfi és mtsai 2014 PNeu
<i>Impulzivitás</i> 49. ábra	Hím-Anya	Operáns kondicionálás	Aliczki és mtsai 2014 HormBeh
<i>Agresszió</i> 50-51. ábra	Hím-Anya	RI	Fodor és mtsai 2014 PNeu

5. Eredmények

5.1. Krónikus stressz

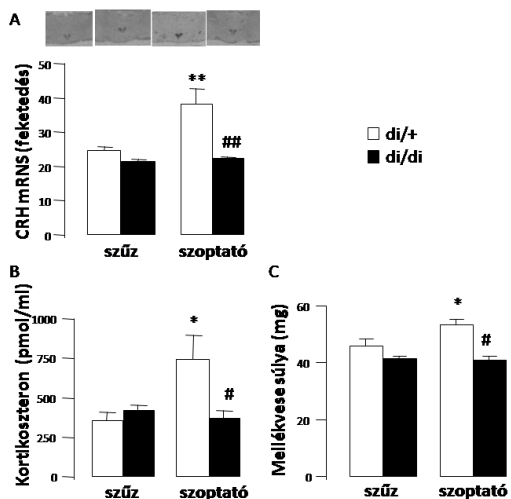
5.1.1. Két hét stressz hím Brattleboro állatokban



1. ábra Cukorbetegség Brattleboro patkányban. K: kontroll, DM: cukorbeteg. (n=6-11 (A); n=8-11 (B)) **p<0,01 vs kontroll (Zelena és mtsai, 2006)

A streptozotocin injekció a Brattleboro patkányokban is kialakította a cukorbetegséget (DM). A krónikus HHM tengely aktiváció jeleként az AL-ban a POMC mRNS megemelkedett (1. ábra A, stressz: p<0,01) és a plazma kortikoszteron szintek is megnöttek (1. ábra B, stressz: p<0,01). A két genotípus között azonban nem volt különbség sem alap állapotban, sem a krónikus stressz hatását illetően.

5.1.2. Krónikus HHM tengely aktivitás a szoptató Brattleboro patkányokban



2. ábra Szoptató Brattleboro patkányok szűz kontroll állatokhoz hasonlítva. (n=7 (A), n=11-18 (B), n=9-10 (C)) *p<0,05, **p<0,01 vs szűz, #p<0,05, ###p<0,01 vs di/+ (Fodor és mtsai, 2013)

A *CRH mRNS* szint a PVN-ben szignifikánsan megemelkedett a laktáló anyáknál a szüzekhez képest (2. ábra A, szoptatás: p<0,01), viszont ez az emelkedés valójában csak a kontroll, di/+ egyedekben jött létre (szoptatás és genotípus interakciója: p=0,01).

A *kortikoszteron* szintje a terhesség-szoptatás hatására megnőtt a di/+ állatokban, de ez az emelkedés az AVP-hiányos anyáknál elmaradt (2. ábra B, szoptatás és genotípus interakció: p=0,01).

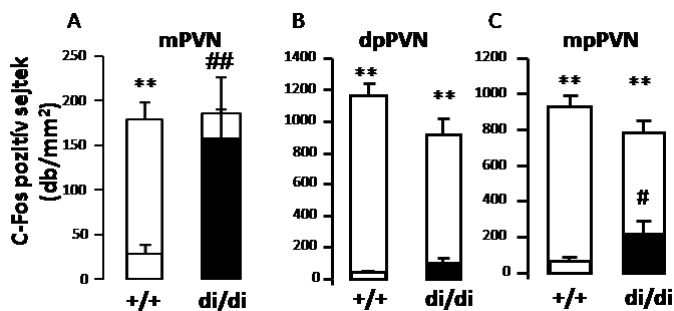
A *mellékvesék súlyát* a terhesség-szoptatás csak a kontroll állatokban növelte meg (2. ábra C, szoptatás és genotípus interakció: p<0,01).

5.1.2.1. Agyi aktivitási mintázat az anyákban: c-Fos

Az *mPVN* nyugalomban mért c-Fos aktivitásában a *di/di* patkányokban szignifikánsan magasabb szinteket észleltünk, mint a kontroll anyákban (3. ábra A, genotípus: $p < 0,01$). Talán éppen ezért 15 perc FST stressz hatására csak a kontroll állatokban volt szignifikáns az aktivitás emelkedés mértéke (stressz: $p < 0,01$).

A *dpPVN* bazális c-Fos aktivitására a genotípus csak marginálisan hatott (3. ábra B, genotípus: $p = 0,07$). Stressz hatására szignifikáns emelkedést lehetett kimutatni (stressz: $p < 0,01$). Bár a genotípusok közt nem volt szignifikáns különbség a stressz okozta emelkedésekben, de mégis elmondhatjuk, hogy a kontroll állatokban harmincszoros, míg a *di/di* csoportnál csak kilencszeres aktivitás emelkedés következett be FST hatására.

Az *mpPVN* bazális c-Fos aktivitása a *di/di* állatok esetén szignifikánsan magasabb volt a kontroll, *+/+* anyákhoz képest (3. ábra C, genotípus: $p < 0,05$), viszont ez a csoport kevésbé reagált a stresszre (négyeszeres vs. tizennégyeszeres emelkedés). Ezt mutatta az is, hogy ugyan az általános stressz-hatás jelentősnek bizonyult (stressz: $p < 0,01$), de a stressz és genotípus hatásának interakciója marginális szignifikanciát mutatott (genotípus és stressz interakció: $p = 0,055$).



3. ábra Szoptató Brattleboro patkányok c-Fos aktivitása a PVN-ben. A magasabb oszlopok 15 perc kényszerített úszás után mért értékek. mPVN: magnocelluláris, dpPVN: dorzális parvocelluláris, mpPVN: mediális parvocelluláris (n=5-9) ** $p < 0,01$ vs kontroll, nem stresszelt, # $p < 0,05$, ### $p < 0,01$ vs *di/+* (Fodor és mtsai, 2012)

5.2. Akut stressz

5.2.1. Különféle akut stresszorok alkalmazása hím Brattleboro állatokban

Különféle stresszorok hatására létrejövő ACTH és kortikoszteron válaszokat vizsgáltuk meg felnőtt hím állatokban, melyek alapján a stresszorokat 3 kategóriába sorolhatjuk:

- (1) az AVP-hiány nem hatott sem az ACTH, sem a kortikoszteron emelkedésekre;
- (2) az AVP-hiányában alacsonyabb ACTH emelkedés mellett változatlan kortikoszteron szekréció jött létre;
- (3) a *di/di* állatokban mind az ACTH, mind a kortikoszteron szekréció alacsonyabb volt.

	Stressz	Max. ACTH	ACTH di/di vs di/+	Max. kortikoszteron	Kortikoszteron di/di vs di/+
1	Szociális elkerülés	110,4±18	∅	339,5±76	∅
2	NMDA kezelés	339,7±48	∅	870,7±77	∅
3	Lábsokk doboz	360,2±51	∅	979,4±67	∅
4	Lábsokk	575,4±64	∅	961,1±76	∅
5	Éter stressz	1027,5±75	∅	721,1±94	∅
6	Újdonság	79,3±16	↓	596,6±102	∅
7	EPM	153,4±18	↓	534,7±36	∅
8	WIN 55,212-2 (CB1 agonista)	245,0±45	↓	1081,8±144	∅
9	LPS	295,2±106	(↓)	962,8±201	∅
10	Kainát kezelés	384,6±49	(↓)	1008,2±82	∅
11	Hipertóniás só	443,3±34	(↓)	977,9±80	∅
12	FST	602,3±45	(↓)	1943,9±152	∅
13	Hipoglikémia	802,9±45	↓	2622,5±232	∅
14	Anafilaktoid reakció	824,3±84	↓	1073,8±91	∅
15	Ulcerogén hideg stressz	887,1±53	(↓)	1701,8±221	∅
16	Térfogati stressz	146,3±25	↓	954,5±165	(↓)
17	Morfín kezelés	276,0±38	↓	1144,9±113	↓
18	Szociális kudarc	464,9±85	↓	918,0±114	↓
19	Mozgáskorlátozás	544,4±55	↓	1162,1±64	↓

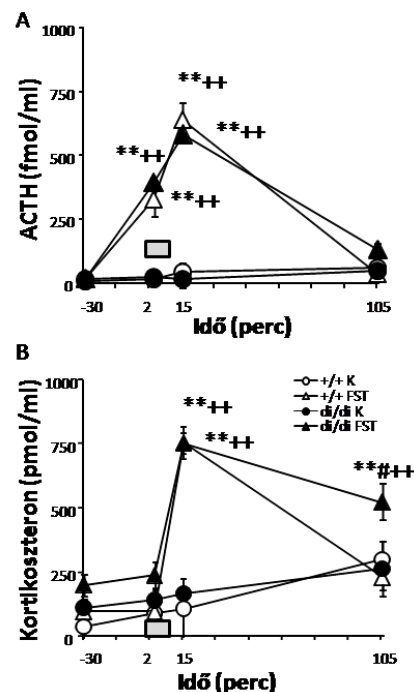
2. táblázat Különbféle akut stresszorok csoportosítása az ACTH és kortikoszteron válasz alapján

5.2.2. Mikrodialízis a PVN-ben

FST stressz hatására mindkét genotípusban megfigyelhető volt az ACTH és kortikoszteron szintek megemelkedése (4. ábra; stressz és idő valamint interakciójuk: $p < 0,01$). ACTH esetében a genotípusnak nem volt az emelkedésre hatása (A).

A kortikoszteron esetében 2 perccel az FST kezdete után nem, csak 15 perc múlva volt emelkedett a hormonszint. A 105 perces minta hormontartalma már csökkent a kontroll állatokban, de nem az AVP-hiányosokban (genotípus: $p = 0,01$).

4. ábra Hím Brattleboro patkányok vérének ACTH (A) és kortikoszteron (B) koncentrációja 10 perc kényszerített úszás (szürke négyzet) hatására. K: kontroll, nem stresszelt, FST: kényszerített úszás 0-10 perc között ($n = 5-8$) $**p < 0,01$ vs K, $\#p < 0,05$ vs +/+, $++p < 0,01$ vs -30 perc (Zelena és mtsai, 2009)



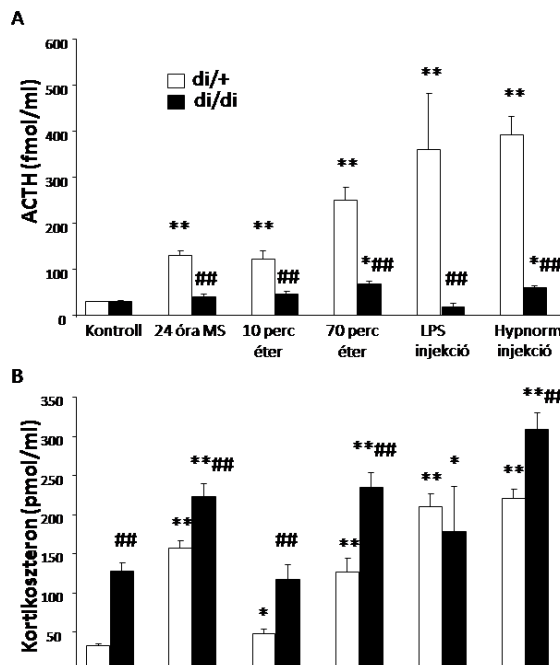
5.3. Perinatális stressz

5.3.1. Akut stresszorok

5.3.1.1. Akut stressz 10 napos Brattleboro patkányokban

A különféle stresszorok mindannyian emelték a 10 napos állatok plazma ACTH (5. ábra A, stressz: $p < 0,01$) és kortikoszteron (5. ábra B, stressz: $p < 0,01$) szintjeit.

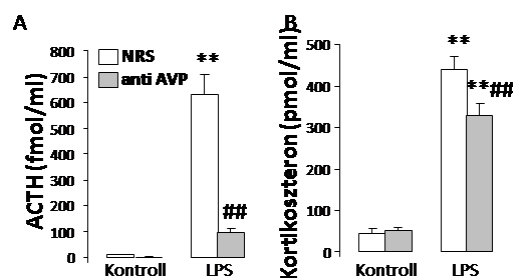
Az AVP-hiány praktikusán kivédte az ACTH szint emelkedéseket (az 5 vizsgált esetben 2-nél (70 perc éter stressz és Hypnorm injekció) volt csak kismértékű emelkedés a di/di állatban a kontroll, nem stresszelt értékekhez képest) (genotípus és stresszel való interakciója: $p < 0,01$). Ezzel ellenében a di/di állatok kortikoszteron szintjei már alap, stresszeten állapotban is magasabbak voltak a di/+ testvéreikhez képest és stressz hatására is magasabb emelkedéseket mutattak (genotípus hatása: $p < 0,01$).



5. ábra 10 napos Brattleboro patkányok akut stressz-reaktivitása. MS: anyai elválasztás, maternal separation; LSP: lipopoliszacharid injekció (n=14-48) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs kontroll, stresszeten; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs di/+ (Makara és mtsai, 2012)

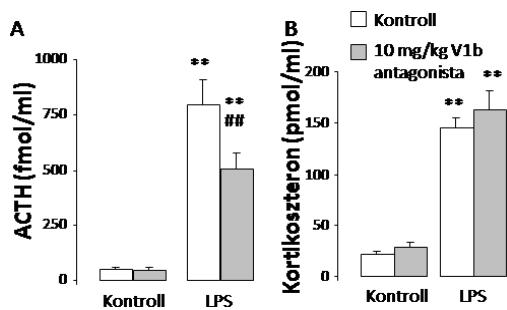
5.3.1.2. Immunneutralizálás 10 napos állatban

Az előző pontban bemutatott adatokkal összhangban az LPS injekció a 10 napos állatban szignifikánsan emelte mind az ACTH (6. ábra A, stresszor: $p < 0,01$), mind a kortikoszteron plazma szinteket (6. ábra B, stressz: $p < 0,01$). Ebben a modellben a 15 perccel korábban adott AVP antisavó szignifikánsan csökkentette mindkét hormon stressz-okozta emelkedéseit (szérum és stresszel való interakciója: $p < 0,01$).



6. ábra 10 napos ++ állatok immunneutralizálása. NRS: normál nyúlszérum, normal rabbit serum; LSP: lipopoliszacharid injekció (n=13-14) ** $p < 0,01$ vs kontroll, stresszeten; ## $p < 0,01$ vs di/+ (Makara és mtsai, 2012)

5.3.1.3. V1b antagonistá kezelés 10 napos állatban



7. ábra 10 napos +/+ állatok V1b kezelése. LSP: lipopoliszacharid injekció (n=13-16) **p<0,01 vs kontroll, stresszeletlen; ##p<0,01 vs di/+ (Zelena és mtsai, 2011)

Az LPS injekció ezekben a +/+ os állatokban is ACTH (7. ábra A, stressz: p<0,01) és kortikoszteron szint (7. ábra B, stressz: p<0,01) emelkedéshez vezetett 2 órával a 100µg/2ml/kg oldat ip injekciója után. A 15 perccel korábban adott V1b receptor antagonistá (SSR149415) szignifikánsan csökkentette a plazma ACTH szinteit (V1b antagonistá és stressz inetrakciója: p<0,01), de a plazma kortikoszteron szinteket egyáltalán (sem alap, sem stresszel értékek esetén) nem befolyásolta.

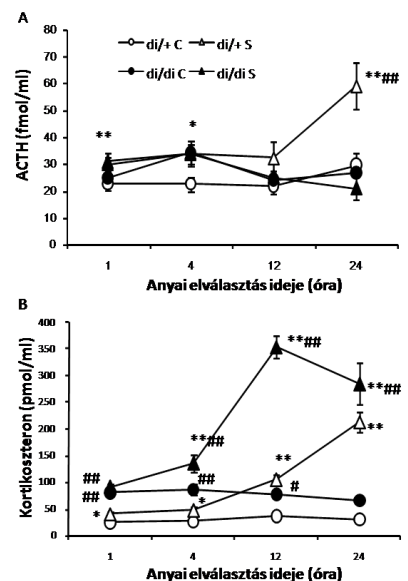
5.3.2. ACTH és kortikoszteron disszociáció

A 2. táblázatban bemutatott felnőtt állatok esetén is, de még szembetűnőbben a kispatkányokban a kortikoszteron szintek nem követték az ACTH változásokat. Először megpróbáltuk kizárni a technikai problémákból eredő esetleges látszólagos különbségeket. A bemutatott vizsgálatokban 10 napos kispatkányokat használtunk.

5.3.2.1. Az ACTH és kortikoszteron szintek időbeli lefutása

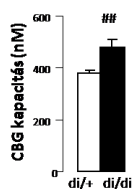
A di/+ genotípusú kölykök esetében mindegyik időtartamú anyai elválasztás (MS) szignifikánsan emelte az ACTH szinteket (8. ábra A, MS: p<0,01). Ezzel ellentétben az AVP hiányos állatokban nem volt kimutatható ACTH szint emelkedés (MS és genotípus interakció: p<0,01).

A kortikoszteron szintek esetén az elválasztás növekvő időtartama egyre nagyobb és nagyobb hormon-válaszokat váltott ki (8. ábra B, idő: p<0,01). Az AVP hiányos állatoknak magasabb alapértékei voltak. 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 valamint idővel és MS-el való interakciója: p<0,01).



8. ábra Különbféle időtartamú anyai elválasztás (MD) (n=9-32) *p<0,05, **p<0,01 vs kontroll, stresszeletlen; #p<0,05, ##p<0,01 vs di/+ (Zelena és mtsai, 2008)

5.3.2.2. Kortikoszteron kötő kapacitás

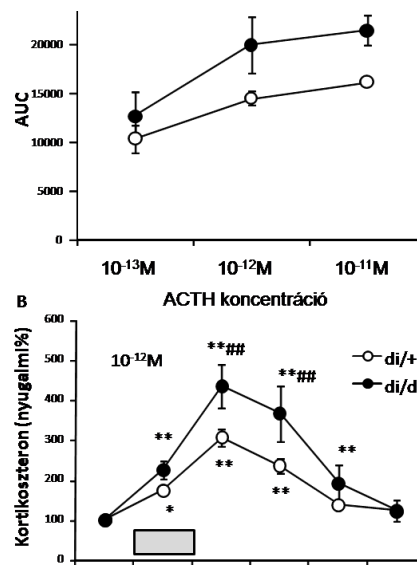


A 10 napos állatokban az AVP-hiány hatására fokozott CBG szintek alakultak ki (9. ábra, $p < 0,01$).

9. ábra Kortikoszteron kötő kapacitás (CBG) (n=7) $##p < 0,01$ vs di/+ (Zelena és mtsai, 2011)

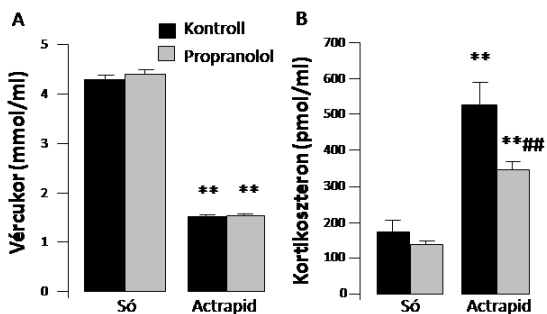
5.3.2.3. A mellékvese ACTH érzékenység in vitro mérése

A 10 napos állatok mellékveséi dóziszfüggő módon érzékenyek voltak ACTH hatására (10. ábra A, kezelés: $p < 0,01$). Az AVP-hiányos állatok mellékveséje ugyanakkora ACTH mennyiség hatására több kortikoszteron elválasztással reagált (genotípus: $p < 0,01$), de ez egyik dózis esetén sem jelentett a páros összehasonlítások során szignifikáns eltérést az AUC-ben. Ugyanakkor a 10^{-12} M ACTH alkalmazása esetén a 3. és 4. (kezelés utáni) frakciók is szignifikáns emelkedést mutattak a di/di állatok kortikoszteron szekréciójában.



10. ábra 10 napos Brattleboro patkányok mellékveséjének ACTH érzékenysége. AUC: görbealatti terület, area under the curve. (B) négyzet jelöli a hozzáadott ACTH időtartamát. (n=8-15) $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ vs 1-es frakció; $##p < 0,01$ vs di/+ (Zelena és mtsai, 2008)

5.3.2.4. Katekolaminok

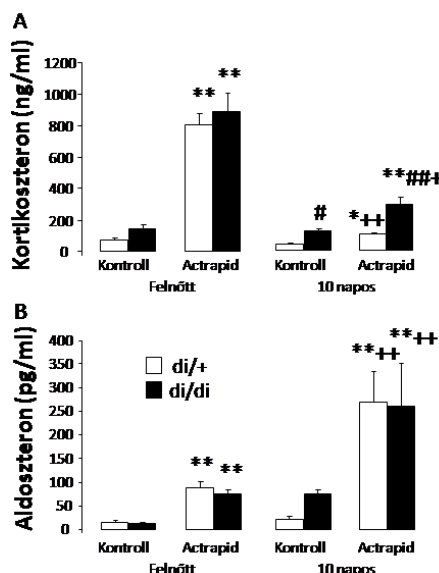


11. ábra 10 napos di/di Brattleboro patkányok hipoglikémiás stressz (Actrapid) hatására kialakuló vércukor és kortikoszteron plazmaszintjei β -adrenerg antagonist (propranolol) előkezelés után (n=13-16) $**p < 0,01$ vs stresszeten kontroll; $##p < 0,01$ vs propranolol kontroll (Makara és mtsai, 2012)

A kísérlethez csak AVP-hiányos állatokat használtunk. Actrapid (gyors hatású inzulin) hatására mind a kontroll, mind a β adrenerg antagonist előkezelést kapott di/di állatok vércukorszintje lecsökkent (11. ábra A, stresszor: $p < 0,01$). A Propranolol előkezelést kapott perinatális állatok kortikoszteron növekedése alacsonyabb volt a kontroll, sóval kezelt társaikhoz képest (11. ábra B, stressz és Propranolol: $p < 0,01$, interakciójuk: $p = 0,06$).

5.3.2.5. Mineralokortikoidok

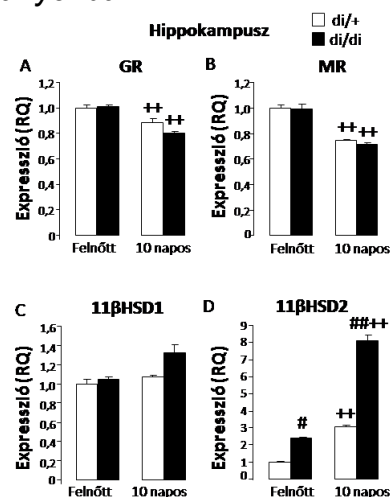
5.3.2.5.1. Hipoglikémia felnőtt és 10 napos Brattleboro patkányban



12. ábra Felnőtt és 10 napos Brattleboro patkányok hormonszintjei hipoglikémiás stresszor (Actrapid) hatására (n=10) *p<0,05, **p<0,01 vs stresszeletlen kontroll; #p<0,05, ##p<0,01 vs di/+, ++p<0,01 vs felnőtt (vonatkozó adatok Wistar patkányokon: Varga és mtsai 2013)

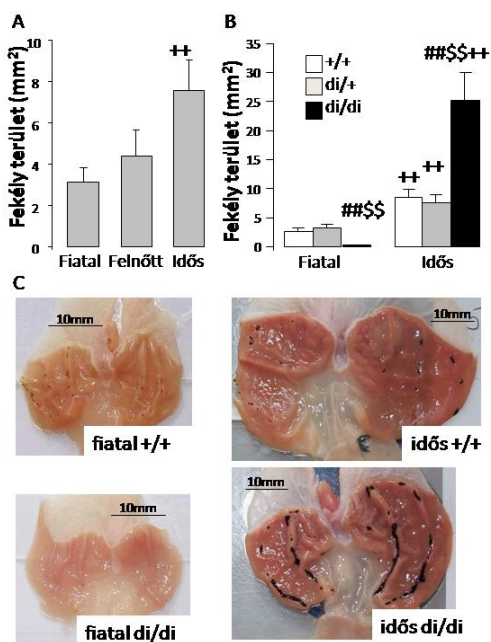
5.3.2.5.2. PCR mérések felnőtt és 10 napos Brattleboro patkányokban

A hippokampuszban mérhető mRNS szintek tekintetében jelentős korhatást találtunk a GR és MR szintekben a 10 napos állatok alacsonyabb szintjeivel (13. ábra A és B, kor: p<0,01). A 11 β HSD2, kortikoszteron lebontó enzim szintje pedig szignifikánsan magasabb volt a kispatkányokban mint a felnőttekben (13. ábra D, kor: p<0,01), míg az aktiváló 11 β HSD1 enzim szintje csak marginális korhatást mutatott (13. ábra C, kor: p=0,07). A genotípus viszont csak egyetlen esetben, a 11 β HSD2-nél volt hatással a mért paraméterekre. Még hozzá az AVP-hiányos állatok magasabb szintekkel rendelkeztek (genotípus: p<0,01), és a 10 napos állatokban ez a különbség még kifejezettebb volt (genotípus és kor interakció: p<0,01).



13. ábra Felnőtt és 10 napos Brattleboro patkányok mRNS szintjei. RQ: relatív mennyiség, quantity (n=5) * #p<0,05, ##p<0,01 vs di/+, ++p<0,01 vs felnőtt (vonatkozó adatok Wistar patkányokon: Varga és mtsai 2013)

5.4. Gyomorfekély Brattleboro patkányban



14. ábra Indometacin indukálta gyomorfekély különböző korú Brattleboro patkányokban C. reprezentatív képek (n=10-13) ##p<0,01 vs +/+; \$\$p<0,01 vs di/+, ++p<0,01 vs fiatal (Zelena és mtsai, 2010)

Fiatal és felnőtt di/+ állatokban kb. ugyanakkora lézió alakult ki indometacin beadás hatására, míg az idős állatok fokozott fekélyképződést mutattak (14. ábra A, kor: p<0,05).

Az AVP hatását tekintve a fiatal állatokban az AVP-hiány csökkentette az erózió méretét, míg az idős patkányokban fokozta (14. ábra B,C, genotípus és koraival való interakciója: p<0,01). A di/+ állatok megegyező értékeket mutattak a +/+ csoporttal.

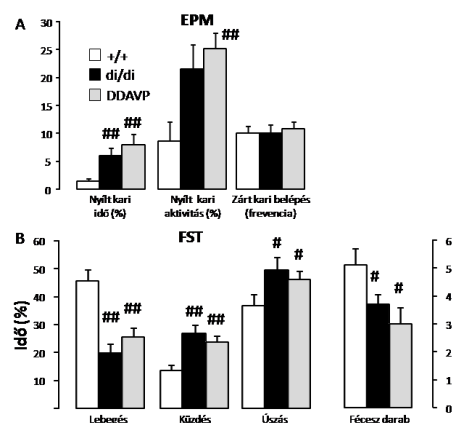
Amikor a kísérletet nem fejeztük be 4 órával az indometacin beadása után (gyomorfekély kialakulása), hanem megpróbáltuk nyomonkövetni a gyógyulást is, azt tapasztaltuk, hogy a gyomorfekély gyógyulásával párhuzamosan az állatok belében fekélyek jelentek meg, amik akár az állat halálához is vezethettek. Meglepő módon ebben az esetben a fiatal di/di állatoknál az AVP-

hiány fokozta a mortalitást (4-ből 8 di/di állat halt meg 3 napon belül, míg a +/+ állatokból 1 a 10-ből), míg az idős állatoknál az AVP-hiány védő hatású volt (+/+ állatoknál 6-ból 3 állat elpusztult 3 napon belül, míg mind a 6 di/di-s életben maradt).

5.5. Szorongás- és depresszió-szerű tünetek

5.5.1. Felnőtt hím Brattleboro patkányok- Perifériás AVP hatása

Amikor az AVP-hiányos állatok szorongás-szerű magatartását hasonlítottuk össze +/+ társaikkal szignifikáns különbségeket találtunk a csoportok között (15. ábra A, nyílt kari idő: p<0,01 és aktivitás: p<0,05). Pontosabban a di/di állatok több időt töltöttek a nyílt karban, és ezt a hatást a perifériás AVP DDAVP-vel történő pótlása sem szüntette



15. ábra Perifériás AVP pótlás (DDAVP ozmótikus minipumbában) hatása a magatartásra. (n=10) #p<0,05, ##p<0,01 vs +/+ (Balázsfi és mtsai, 2014)

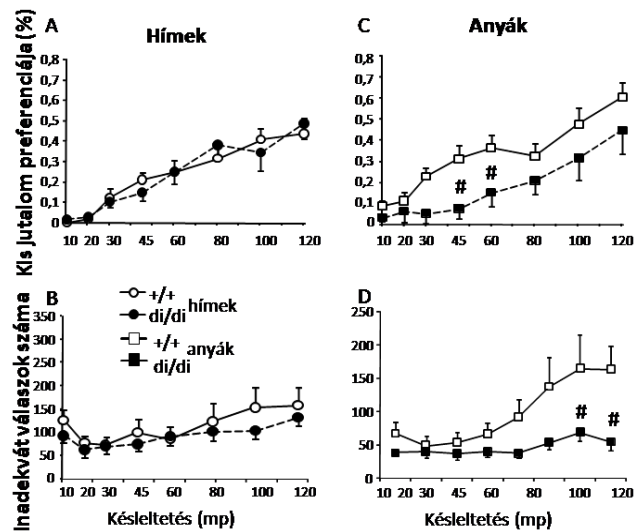
meg.

Hasonlóan a 10 perces FST teszt során is szignifikáns csoporthatásokat tapasztaltunk (15. ábra B, lebegés és küzdés: $p < 0,01$ és fécesz: $p < 0,05$). Ebben az esetben is csökkent a passzívan, lebegéssel töltött idő a di/di állatokban és nőtt a küzdés és úszás időtartama. A DDAVP kezelés egyik vizsgált paramétert sem normalizálta, azaz a DDAVP kezelt állatok pont úgy viselkedtek, mint a kezeletlen di/di állatok.

5.6. Impulzivitás

A tanulási fázis alatt a nagy jutalom preferenciája szignifikánsan nőtt minden állatnak ($p < 0,01$), de nem találtunk különbséget a két genotípus között sem a hímek sem az anyák esetében (nem közölt adat).

A teszt fázis napjai folyamán az állatok kis jutalom preferenciája nőtt mindkét vizsgált (hím és anya) csoportban (16. ábra A,C, késleltetés: $p < 0,01$). A hímek esetén nem találtunk különbséget a genotípusok között, míg az anyák esetén az AVP-hiányos laktáló anyák kis jutalom preferenciája alacsonyabb volt, mint az AVP-t expresszálóknak (genotípus: $p < 0,05$), vagyis a döntési impulzivitás szintje alacsonyabbnak mutatkozott. Az inadekvát válaszok száma a teszt fázis folyamán a hímekben nagyjából állandó maradt (16. ábra



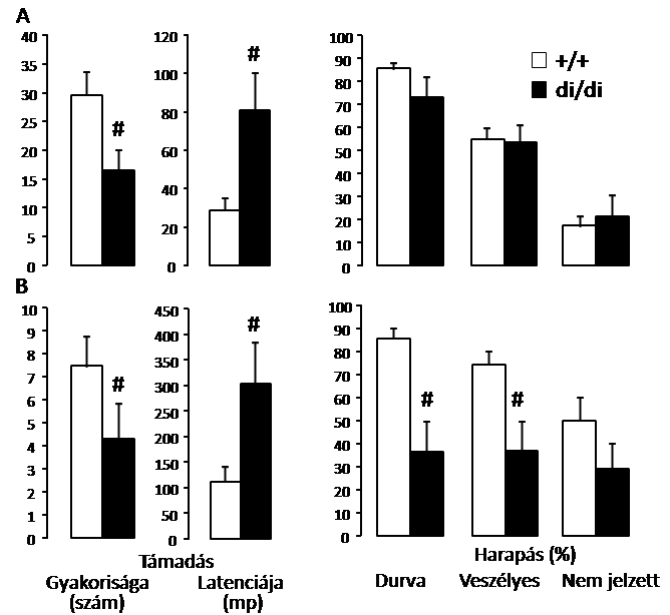
16. ábra Impulzivitás a késleltetett operáns kondicionálás tesztben. (n=10) # $p < 0,05$ vs +/+ (Aliczki és mtsai, 2014)

B), míg az anyákban a késleltetés növelésével szignifikánsan növekedett (49. ábra D, késleltetés: $p < 0,01$). Ezen paraméter, vagyis a motoros impulzivitás esetén szignifikáns interakció mutatkozott a genotípus és a késleltetés között ($p < 0,01$). Azaz az inadekvát válaszok számának növekedése nagyobb volt a kontroll állatokban, mint az AVP-hiányos egyedekben.

5.7. Agresszió

A szoptató anyákban a harapások száma a laktáció elején (5-6. nap) extrém magas volt (30 harapás/10 perc), ennek megfelelően a latencia pedig alacsony (17. ábra A, idő: $p < 0,01$). Az arány azonban a 18-19. napra megfordult (7-8 harapás/10 perc) (17. ábra B). AVP hiányában az anyák szignifikánsan kevesebbet haraptak mindkét időpontban, mint a másik csoport tagjai (genotípus: $p < 0,05$), interakció nem mutatkozott a két hatás között. A harapások latenciája ezzel fordított arányban változott (idő: $p < 0,01$; genotípus: $p < 0,05$).

A harapások minőségi tanulmányozása során interakciót találtunk a genotípus és az idő között a durva harapások és a sérülékeny területekre történő harapások részarányát tekintve ($p < 0,05$). Mindkét paraméternél az AVP-hiányos anyák csak a későbbi időpontban mutattak csökkenést az AVP-vel rendelkezőkhöz képest. A nem jelzett harapásokra csak az idő volt szignifikáns hatással ($p < 0,05$).



17. ábra Agresszió nőtény Brattleboro anyákban (A) 5-6 és (B) 18-19 nappal a szülés után. (n=10-13) # $p < 0,05$ vs +/+ (Fodor és mtsai, 2014)

6. Következtetések

Eredményeink tükrében a következő főbb következtetéseket vonhatjuk le (dőlt betűvel az AVP szerepén túlmutató általános megállapítások):

1. Hím patkányokban az **AVP** nem lényeges a HHM tengely nyugalmi aktivitásának fenntartásában. Ugyanakkor a laktáló állatokban a krónikusan fokozott nyugalmi HHM tengely aktivitás fenntartásában alapvető jelentőségű.
2. Cáfoltuk azt a korábbi állítást, hogy patkányokban krónikus stressz során az AVP fontos szerepet töltene be a HHM tengely szabályozásában.
3. Akut stresszben az AVP-hiány stresszorfüggő módon csökkenti az ACTH és kortikoszteron elválasztást, ami nem esik egybe egyik ismert kategorizálással sem.
4. Akut stressz során az agyban extracellulárisan felszabaduló AVP lokális gátló hatása révén segíti a stressz-hormonok szintjének lecsengését.
5. A Brattleboro állatokban a normális stresszreaktivitás fenntartása érdekében nem CRH, hanem OT emelkedés figyelhető meg, viszont a funkcionális kompenzáció nem teljes. Általános szabály, hogy *az mRNS és fehérje változások nem jelzik egyértelműen egy adott molekulának centrális, vagy perifériás ürülését*, így csak az adott lokális kompartment vonatkozásában értelmezhetők.
6. A korai posztnatális életkorban az AVP lehet a kulcsszignál az ACTH elválasztás akut stressz alatti emelkedésében, de nincs hatással a nyugalmi szintekre.
7. Létezik *ACTH-független GC szabályozás* az akut stressz alatt. Ebben a folyamatban a SAS (katekolaminok, β adrenoceptor) fontos, de nem kizárólagos szerepet töltenek be.
8. *Perinatálisan a HHM-tengely egyik véghormonjának az aldoszteron is tekinthető*, hiszen ekkor szintje akut stresszre jobban megemelkedik, mint a kortikoszteroné.
9. **Patológias** vonatkozásban az AVP korfüggő módon befolyásolja a gyomorfekély képződést.
10. Az AVP szorongásban kevésbé játszik szerepet, míg hiánya csökkenti a depresszió-szerű tünetek előfordulását, de ebben a vonatkozásban a támadáspontja nem a HHM tengely.
11. Laktáló anyákban az AVP szerepe fontos lehet az anyai agresszióban, hiánya gátolja az anyákra jellemző impulzív, agresszív viselkedés megjelenését.

7. Saját publikációk az értekezés témájában

Újságcikkek

2003

1. Zelena D, Mergl Zs. Makara GB Maternal genotype influences stress reactivity of Brattleboro rats genetically lacking vasopressin. *J Neuroend* (2003) 15: 1105-1110.

2004

2. Zelena D, Földes A, Mergl Zs, Barna I, Kovács KJ, Makara GB Effects of repeated restraint stress on hypothalamo-pituitary-adrenocortical function in vasopressin deficient Brattleboro rat. *Brain Research Bulletin* (2004) 63:521-530.
3. Makara GB, Zelena D, Mergl Zs The role of vasopressin in hypothalamo-hypophysis-adrenal axis activation during stress: an assessment of the evidence. *Ann Rev NYAcad Sci* (2004) 1018: 151-61.
4. Zelena D, Mergl Zs, Makara GB Maternal genotype can influence the outcome of a study on mutant animals. *Ann Rev NYAcad Sci* (2004) 1018: 477-9.

2005

5. Zelena D, Mergl Zs, Makara GB Glutamate agonists activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis through hypothalamic paraventricular nucleus but not through vasopressinerg neurons. *Brain Res* (2005) 1031 (2):185-193.

2006

6. Zelena D, Filaretova L, Mergl Z, Barna I, Toth ZE, Makara GB Nucleus paraventricularis hypothalami but not vasopressin participates in chronic hyperactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2006) 290: E243-E250.
7. Zelena D, Mergl Zs, Makara GB The role of vasopressin in diabetes mellitus-induced hypothalamo-pituitary-adrenal axis activation: studies in Brattleboro rats. *Brain Res Bull* (2006) 69:48-56.

2007

8. Mlynarik M, Zelena D, Bagdy Gy, Makara GB, Jezova D Signs of attenuated depression-like behaviour in vasopressin deficient Brattleboro rats. *Hormones and Behav* (2007) 51:395-405.

2008

9. Domokos A, Mergl Z, Barna I, Makara GB, Zelena D Congenital vasopressin deficiency and acute and chronic opiate effects on hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity in Brattleboro rats. *J Endocrinol* (2008) 196:113-21.
10. Zelena D, Domokos A, Barna I, Mergl Z, Haller J, Makara GB Control of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the neonatal period: adrenocorticotropin and corticosterone stress responses dissociate in vasopressin-deficient Brattleboro rats. *Endocrinology* (2008) 149:2576-83.

11. Zelena D The Role of Vasopressin in Affective Disorders: Possible Targets of Intervention. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* (2008) 8:275-285.
12. Bundzikova J, Pirnik Z, Zelena D, Mikkelsen JD, Kiss A Response of Substances Co-Expressed in Hypothalamic Magnocellular Neurons to Osmotic Challenges in Normal and Brattleboro Rats. *Cell Mol Neurobiol* (2008) 28(8):1033-47.
13. Zelena D, Barna I, Csabai K, Orlando GF, Makara GB, Engelmann M Response of the adrenomedullary system to early postnatal stress in the Brattleboro rat. *Ann NY Acad Sci* (2008) 1148:456-61.
14. Makara GB, Domokos A, Mergl Z, Csabai K, Barna I, Zelena D Gender-specific regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and the role of vasopressin during the neonatal period. *Ann NY Acad Sci* (2008) 1148:439-45.
15. Bundzikova J, Pirnik Z, Mikkelsen JD, Zelena D, Kiss A Activity of oxytocinergic neurons in the supraoptic nucleus under stimulation of alpha2-adrenoceptors in Brattleboro rats. *Ann NY Acad Sci* (2008) 1148:154-60.

2009

16. Zelena D, Langnaese K, Domokos A, Pintér O, Landgraf R., Makara GB, Engelmann M Vasopressin administration into the PVN normalizes plasmaoxytocin and corticosterone levels in Brattleboro rats *Endocrinology* (2009) 150(6):2791-8.
17. Bundzikova J, Pirnik Z, Zelena D, Mikkelsen JD, Kiss A α 2-adrenergic stimulation of oxytocinergic neurons in the hypothalamic magnocellular neurons is influenced by its antagonists in Brattleboro rats. *Cell Mol Neurobiol* (2009) 29:1015-23.
18. Zelena D, Domokos A, Jain S, Jankord R, Filaretova L The stimuli-specific role of vasopressin in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response to stress. *J Endocrinol* (2009) 202:263-78.
19. Zelena D Yin-Yang Neuropeptides In Depression *Frontiers in Neuroscience* (2009) 3:251-252.
20. Barna I, Csabai K, Makara GB, Zelena D Cannabinoid-mediated regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in rats: age dependent role of vasopressin. *Endocr Regul* (2009) 43(1):13-21.

2010

21. Zelena D, Filaretova L Age-dependent role of vasopressin in susceptibility of gastric mucosa to indomethacin-induced injury. *Regul Pept* (2010) 161:15-21.
22. Bundzikova J, Pirnik Z, Zelena D, Mikkelsen JD, Kiss A The alpha(2)-adrenoceptors do not modify the activity of tyrosine hydroxylase, corticoliberine, and neuropeptide Y producing hypothalamic magnocellular neurons in the Long Evans and Brattleboro rats. *J Physiol Pharmacol* (2010) 61:391-8.
23. Zelena D, Jain SK Another Side of the Antidiuretic Hormone, Vasopressin: Its Role in Stress Regulation. *Journal of Experimental Sciences* (2010) 1: No9.

2011

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

25. Pintér O, Domokos Á, Mergl Zs, Mikics É, Zelena D Do stress hormones connect environmental effects with behavior in the forced swim test? *Endocrine Journal* (2011) 58(5):395-407.
26. Sterrenburg L, Borch A, Peeters BW, Pintér O, Zelena D, Roubos EW, Kozicz T Acute ether stress differentially affects corticotropin-releasing factor and urocortin 1 in the Brattleboro rat. *Brain Res* (2011) 1398:21-9.
27. Filaretova LP, Bagaeva TR, Morozova OY, Zelena D The healing of NSAID-induced gastric lesion may be followed by small intestinal and cardiovascular side effects. *J Physiol Pharmacol* (2011) 62(6):619-25.

2012

28. Makara GB, Varga J, Barna I, Pintér O, Klausz B, Zelena D The vasopressin deficient Brattleboro rat: Lessons for the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation. *Cellular and Molecular Neurobiology* (2012) 32(5):759-766.
29. Zelena D Vasopressin in health and disease with a focus on affective disorders. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* (2012) 12(4):286-303.
30. Fodor A, Klausz B, Pintér O, Daviu N, Rabasa C, Rotllant D, Balazsfi D, Kovacs KB, Nadal R, Zelena D Maternal neglect with reduced depressive-like behavior and blunted c-fos activation in Brattleboro mothers, the role of central vasopressin. *Hormones and Behavior* (2012) 62:539-51.

2013

31. Zelena D, Pintér O, Langnaese K, Richter K, Landgraf R, Makara GB, Engelmann M. Oxytocin in Brattleboro Rats: Increased Synthesis is Contrasted by Blunted Intrahypothalamic Release From Supraoptic Nucleus Neurones. *J Neuroendocrinol* (2013) 25:711-8.
32. Fodor A, Pintér O, Domokos A, Langnaese K, Barna I, Engelmann M, Zelena D Blunted HPA axis response in lactating, vasopressin-deficient Brattleboro rats. *J Endocrinol* (2013) 219(2):89-100.
33. Varga J, Ferenczi S, Kovács KJ, Garafova A, Jezova D, Zelena D Comparison of Stress-Induced Changes in Adults and Pups: Is Aldosterone the Main Adrenocortical Stress Hormone during the Perinatal Period in Rats? *PLoS One*. (2013) 8(9):e72313

2014

34. Fodor A, Zelena D The Effect of Maternal Stress Activation on the Offspring during Lactation in Light of Vasopressin. *The Scientific World Journal* (2014) 2014:265394.
35. Fodor A, Barsvári B, Aliczki M, Balogh Z, Zelena D, Goldberg SR, Haller J The effects of vasopressin deficiency on aggression and impulsiveness in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* (2014) 47:141-50.
36. Aliczki M, Fodor A, Balogh Z, Haller J, Zelena D The effects of lactation on impulsive behavior in vasopressin-deficient. Brattleboro rats *Horm Behav* (2014) 66:545-551.

2015

37. Balázsfi D, Pintér O, Klausz B, Kovács KB, Fodor A, Török B, Engelmann M, Zelena D Restoration of peripheral V2 receptor vasopressin signaling fails to correct behavioral changes in Brattleboro rats. *Psychoneuroendocrinology* (2015) 51:11-23.
38. Zelena D The Janus Face of Stress on Reproduction: From Health to Disease. *International Journal of Endocrinology Volume 2015* (2015), Article ID 458129, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/458129>
39. Zelena D, Makara GB. Szteroidok: A glükokortikoidok élettani és gyógyszerterapeutikai hatásai. *Orvosi Hetilap* (2015) 156:1415-25.
40. Zelena D, Pintér O, Balázsfi D, Langnaese K, Richter K, Landgraf R, Makara GB, Engelmann M. Vasopressin signaling at brain level controls stress hormone release: The vasopressin-deficient Brattleboro rat as a model. *Amino Acids* (2015)

Könyvfejezetek

1. Zelena D, Jain SK Oxytocin and Vasopressin in Stress and Stress-Related Diseases: Yin/Yang Counterparts or Substitutes? Nova Publisher, In: *Handbook of Oxytocin Research* Editor: Hugo Jastrow and Daniela Feuerbach (2009) 1:1-34.
2. Zelena D, Makara GB The role of adrenocorticotropin beyond the glucocorticoid horizon. Nova Publisher, In *Advances in Medicine and Biology* (2012) 43 (III) 109-138.
3. Zelena D, Morozova OYu, Filaretova LP Age-dependent role of vasopressin in susceptibility of gastric mucosa to indomethacin-induced injury. In *Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/ Organoprotection in the Gastrointestinal Tract - Mechanisms, Prevention & Treatment*, *Frontiers of Gastrointestinal Research*, Editor: C. Sakamoto Karger (2012) 30: 219-229.
4. Fodor A, Zelena D The behavior of the mother and vasopressin. Nova Publisher, in *Hormones and Behavior* (2013) 2:29-66.
5. Varga J, Zelena D An unfairly undervalued participant of the stress processes: the vasopressin. in *Vasopressin: Mechanisms of Action, Physiology and Side Effects*. Nova Publisher (2013) 1:1-28.

8. Köszönetnyilvánítás

Őszinte hálával tartozom örök mentoromnak, Makara Gábornak, aki munkám kezdetén megismertetett a természettudományos kutatás iránti mély és alázatos tisztelettel és tanácsaival sokszor átlendített (és még lendít ma is) a nehézségeken.

Nagyon köszönöm Haller Józsefnek, hogy bevezetett a magatartáskutatás alapjaiba és mindig támogatta egyéni elképzeléseim megvalósítását.

Szeretném megköszönni a több mint 20 év munka alatt a KOKI-ban, elsősorban a Magatartásélettan és Stressz kutatócsoportban, de egyéb intézményekben is együttműködő munkatársaim szeretetét, támogatását, kitartó munkáját. A teljesség igénye nélkül köszönöm Mergl Zsuzsa, Till Ibolya, Ács Zsuzsa, Barna István, Do Thank Kim és Bekóné Hajni közreműködését a pályám kezdeti szakaszában. Későbbi KOKI-ban dolgozó kollégáim közül ki kell emelnem Fekete Ágnes, Klausz Barbara és Bakosné Niki asszisztenseim áldozatos munkáját, valamint Domonkos Ágnes, Pintér Ottó, Varga János, Fodor Anna és Balázsfi Dia közvetlen munkatársaimat a cikkek anyagának összegyűjtésében, és az eredmények interpretálásában nyújtott segítségért.

Sokat köszönhetek a csoport minden tagjának, hiszen egy olyan közegben dolgozhattam velük, ami szakmailag inspiráló, emberileg támogató volt.

Köszönöm Kovács Krisztának, Ferenczy Szilamérnek (MTA KOKI Molekuláris Neuroendokrinológia Kutatócsoport) és Várnainé Tóth Zsuzsának (SOTE Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet) az évek során folytatott inspiráló beszélgetéseket és a közös munkát.

Külföldi kollégáim közül nem lehetek elég hálás Ludmilla Filaretovának (Pavlov Intézet, Szent Pétervár, Oroszország) és Daniela Jezovának (Slovak Academy of Sciences Institute of Experimental Endocrinology Bratislava, Slovakia), akik mindig támogatólag léptek fel irányomban. Mario Engelmann (Otto vo Guericke Institute, Magdeburg, Németország) közösen kivitelezett kutatási projekttel is segítette munkámat. Roser Nadal-lal (Barcelona, Spanyolország) való együttműködésem eredménye az anyai magatartás vizsgálatának megvalósulása, valamint az impulzivitás teszttel való közelebbi megismerkedésem is. Subodh Jain (Sagar, India) látóköröm szélesítéséhez járult hozzá.

Köszönet illeti a családomat is, akik mindig támogatták elképzeléseim megvalósulását.