

A stressz-tengely korfüggő szabályozása vazopresszin hiányos Brattleboro patkányokban

Doktori értekezés

Varga János

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Gyertyán István kutatócsoport vezető, Ph.D.
Dr. Gacsályi István tudományos főmunkatárs, Ph.D.

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

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bartha Tibor egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Zachar Gergely tudományos
segédmunkatárs, Ph.D.

Budapest
2014

1. Tartalomjegyzék

1. TARTALOMJEGYZÉK.....	1
2. RÖVIDÍTÉSEK.....	6
3. IRODALMI HÁTTÉR.....	8
3. 1. Bevezetés.....	8
3. 2. A hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely.....	9
3. 2. 1. A hipotalamusz	10
3. 2. 1. 1. A hipotalamusz anatómiája	10
3. 2. 1. 2. A CRH	12
3. 2. 2. A hipofízis	13
3. 2. 2. 1. A hipofízis anatómiája.....	13
3. 2. 2. 2. Az ACTH és receptorai	13
3. 2. 3. A mellékvese	14
3. 2. 3. 1.. A mellékvese velőállománya.....	15
3. 2. 3. 1. 1. Katekolaminok és receptoraik	15
3. 2. 3. 2. A mellékvese kéregállománya.....	17
3. 2. 3. 2. 1. Glükokortikoidok	18
3. 2. 3. 2. 2. Mineralokortikoidok.....	19
3. 2. 3. 3. Glüko- és mineralokortikoid receptorok, glükokortikoid visszacsatolás	20
3. 3. A vazopresszin	23
3. 3. 1. A vazopresszin fő hatásai és receptorai.....	23
3. 3. 2. A vazopresszin szerepe a stressz-folyamatokban.....	26
3. 3. 3. A vazopresszin szerepe betegségekben	27
3. 3. 4. Vazopresszin hiányos Brattleboro patkányok	30
3. 3. 4. 1. A Brattleboro törzs eredete.....	30
3. 3. 4. 2. A stressz-tengely működése Brattleboro patkányokban.....	31
3. 3. 4. 3. A Brattleboro patkányok jellemzői	32

3. 4. Stressz perinatális korban	36
3. 5. ACTH – kortikoszteron disszociáció.....	39
4. CÉLKITŰZÉSEK	41
5. MÓDSZEREK	42
5. 1. Állatok	42
5. 2. Krónikus enyhe stressz felnőtt állatokban	43
5. 3. A HHM tengely szabályozásának korfüggő összehasonlítása	43
5. 3. 1. Lipopoliszacharid kezeléssel kiváltott HHM aktiváció.....	43
5. 3. 1. 1. Brattleboro patkányok	43
5. 3. 1. 2. V1b antagonistá	43
5. 3. 1. 3. AVP antiszérum perinatális korban	44
5. 3. 2. Inszulin-hipoglikémia által okozott HHM tengely aktiváció.....	44
5. 3. 2. 1. Brattleboro patkányok	44
5. 3. 3. Hipofízis CRH érzékenysége in vitro rendszerben.....	45
5. 4. ACTH független glükokortikoid szekréció	45
5. 4. 1. Eltérő időbeli lefutás – 10 perces anyai elválasztás	45
5. 4. 1. 1. Hormon szintek	45
5. 4. 1. 2. Ultrahang kibocsátás teszt	46
5. 4. 2. Transzkortin (CBG) szint mérések	46
5. 4. 3. ACTH érzékenység mérése	47
5. 4. 4. Mellékvese-velő katekolaminok szerepének vizsgálata	47
5. 4. 4. 1. β adrenerg antagonistá: in vivo mérések	47
5. 4. 4. 2. β adrenerg antagonistá: in vitro mérések.....	47
5. 4. 4. 3. Glükó- és mineralokortikoid szintek korfüggő összehasonlítása Brattleboro állatokban	48
5. 5. Glükó- és mineralokortikoidok szintek korfüggő összehasonlítása Wistar patkányokban	48

5. 5. 1. Lipopoliszacharid kezeléssel kiváltott immunválasz	48
5. 5. 2. Insulin kezeléssel kiváltott hipoglikémia	48
5. 5. 3. Kvantitatív PCR.....	48
5. 5. 3. 1. Primerek	49
5. 5. 4. Immuncitokémia.....	49
5. 6. Vér és szövetminták gyűjtése.....	50
5. 7. Hormonszint mérések	50
5. 8. Statisztikai elemzés	52
6. EREDMÉNYEK	53
6. 1. Krónikus enyhe stressz.....	53
6. 2. A HHM tengely szabályozásának korfüggő összehasonlítása	54
6. 2. 1. Lipopoliszacharid kezeléssel kiváltott HHM aktiváció.....	54
6. 2. 1. 1. Brattleboro patkányok	54
6. 2. 1. 2. V1b antagonistá	56
6. 2. 1. 3. AVP antiszérum.....	57
6. 2. 2. Insulin-hipoglikémia által okozott HHM tengely aktiváció.....	58
6. 2. 3. Hipofízis in vitro CRH érzékenysége.....	59
6. 3. Az ACTH független glükokortikoid szekréció	60
6. 3. 1. Eltérő időbeli lefutás – 10 perces anyai elválasztás	60
6. 3. 1. 1. Hormon szintek	60
6. 3. 1. 2. Ultrahang vokalizáció.....	61
6. 3. 2. Transzkortin szintek	63
6. 3. 3. ACTH érzékenység mérése	63
6. 3. 4. Mellékvese-velő katekolaminok.....	64
6. 3. 4. 1. β adrenerg antagonistá: in vivo mérések	64
6. 3. 4. 2. β adrenerg antagonistá: in vitro mérések.....	64
6. 3. 5. Glüko- és mineralkortikoid szintek korfüggő összehasonlítása Brattleboro állatokban	65

6. 4. Glüko- és mineralokortikoidok szintek korfüggő összehasonlítása Wistar patkányokban	66
6. 4. 1. Lipopoliszacharid kezeléssel kiváltott immunválasz	66
6. 4. 2. Inszulin kezeléssel kiváltott hipoglikémia	67
6. 4. 3. PCR mérések	68
6. 4. 3. 1. Glükokortikoid receptorok	68
6. 4. 3. 2. Mineralokortikoid receptorok.....	68
6. 4. 3. 3. 11- β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1.....	69
6. 4. 3. 4. 11- β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 2.....	69
6. 4. 4. Immunhisztokémiai vizsgálatok	70
7. MEGBESZÉLÉS	72
7. 1. AVP szerepe krónikus stressz során felnőtt korban	72
7. 2. Az AVP korfüggő szerepe a HHM tengely szabályozásában akut stressz során	73
7. 3. Az ACTH független glükokortikoid szekréció	77
7. 3. 1. Kizárandó jelenségek.....	77
7. 3. 1. 1. Eltérő időbeli lefutás.....	77
7. 3. 1. 2. CBG szintek.....	78
7. 3. 1. 3. Mellékvese érzékenység	79
7. 3. 2 ACTH független glükokortikoid szekréció	79
7. 3. 2. 1. Mellékvese katekolaminok	80
7. 3. 2. 2. Glüko- és mineralokortikoid szintek	81
7. 4. Glüko- és mineralokortikoidok szintek korfüggő összehasonlítása Wistar patkányokban	83
7. 5. Az ACTH egyéb hatásai	86
8. KÖVETKEZTETÉSEK.....	89
9. ÖSSZEFOGLALÁS	91

10. SUMMARY	93
11. IRODALOMJEGYZÉK	94
12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	133
12. 1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények	133
12. 2. A szerző egyéb közleményei	134
13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	135

2. Rövidítések

ACTH	adrenokortikotrop hormon
AVP	arginin vazopresszin
AVP+	vazopresszinnel rendelkező, heterozigóta állatok
AVP-	vazopresszin hiányos homozigóta állatok
BNST	bed nucleus of stria terminalis
CBG	corticosterone binding globuline
cDNS	„complementary” dezoxi-ribonukleinsav
CMS	krónikus enyhe stressz, chronic mild stress
CRH	kortikotróp felszabadító hormon, corticotropin-releasing hormone
DAG	diacilglicerol
EPM	emelt keresztpalló teszt
FST	erőltetett úszás teszt, forced swim test
FSH	follikust serkentő hormon
GAPDH	gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz
GH	growth hormone, növekedési hormon
GR	glükokortikoid receptorok
HHM	hipotalamo-hipofízis-mellékvese tengely
11- β -HSD1	hidroxi szteroid dehidrogenáz 1 (kortikoszteron aktiváló)
11- β -HSD2	hidroxi szteroid dehidrogenáz 2 (kortikoszteron inaktiváló enzim)
ip	intraperitoneális
IP3	inozitol trifoszfát
LH	luteinizáló hormon
LPS	lipopoliszacharid
LTH	luteotrop hormon, prolaktin
MBH	mediobazális hipotalamusz
MDD	unipoláris, major depresszió
MR	mineralokortikoid receptor
mRNS	messenger ribonukleinsav
MSH	melanocita stimuláló hormon
n.	nucleus, mag

NRS	normal rabbit serum, normál nyúlszérum
OT	oxitocin
PBS	phosphate saline buffer, foszfát puffer
PCR	polimeráz láncreakció
PKC	protein kináz C
PLC	foszfolipáz C
POMC	proopiomelanokortin
PTSD	poszttraumatikus stressz szindróma
PVN	nucleus paraventricularis hypothalami
RAS	renin-angiotenzin rendszer
REM	rapid eye movement, gyors szemmozgásos alvásfázis
RIA	radioimmunoassay
RNS	ribonukleinsav
SCN	nucleus suprachiasmaticus
SHRP	stressz hiporeszponzív periódus
SON	nucleus supraopticus
TRH	tireotropin elválasztást serkentő hormon
TSH	tireotropin, pajzsmirigyet serkentő hormon

3. Irodalmi háttér

3. 1. Bevezetés

Kutatómunkám fő kérdése a szervezet stressz-reakciójának szabályozása. Bár a „stressz” kifejezést gyakran halljuk a mindennapok során, ennek ellenére nincs általánosan elfogadott definíciója. Az emberek legtöbbször pszichés, vagy fizikai megerőltetést értik alatta, ami negatív következményekkel jár, betegségek kialakulásához vezethet. Valóban, rohanó világunkban a lakosság egyre nagyobb része szenved a stresszel összefüggő betegségektől, amik gyógyítása még ma is sok fejtörést okoz az orvostudomány számára. A folyamatosan fennálló stressz gyengíti az immunrendszert, fogékonyabbá tesz a fertőzésekre, közre játszhat asztma (Rimington és mtsai 2001), gyomorfekély (Spirt 2004), szív és érrendszeri zavarok (Albus 2010, Manenschijn és mtsai 2013), rákos megbetegedések (Chida és mtsai 2008, Lillberg és mtsai 2003), cukorbetegség (Black 2006, Crews 2007) elhízás (Bose és mtsai 2009, Roberts és mtsai 2014, Tryon és mtsai 2013) kialakulásában, de a reprodukcióra is káros hatással van (Hamilton és Meston 2013). A stressz mentális betegségekkel is összefüggésbe hozható. Depresszió (Juruena 2013, Staufenbiel és mtsai 2013), skizofrénia (Beaton és Simon 2011, Bradley és Dinan 2010, Walker és mtsai 2008), poszttraumatikus stressz szindróma (PTSD) (Donnelly 2012, Mitani és mtsai 2006, Raabe és Spengler 2013), pánik betegség (Esler és mtsai 2008) és egyéb szorongásos kórképek (Graver és White 2007, Hitchcock és mtsai 2009) is gyakrabban jelentkeznek a stressznek kitett személyeknél.

Fontos megemlítenünk azonban, hogy a stressz-fogalom eredeti megalkotója, Selye János a stresszt a szervezet bonyolult és összetett válaszának tekintette minden, a szervezetet érintő kihívásra, melynek célja az alkalmazkodás elősegítése (Selye 1985). Kísérletei során egymástól eltérő ingerek hatására hasonló elváltozásokat figyelt meg (mellékvesék megnagyobbodása, csecsemőmirigy visszafejlődése, fekélyek kialakulása a tápcsatorna egyes szakaszain stb.) (Selye 1946). A megfigyelt tünet együttest „*stressz-szindrómának*”, a kiváltó ingereket stresszoroknak nevezte. Elmélete, az „*általános adaptációs szindróma elmélet*” szerint az élő szervezet a külső-belső környezetből érkező különböző ingerekre azonos módon képes reagálni (Selye 1985). Az

általánosítás mellett fontosnak tartotta elkülöníteni az eustressz (pozitív stressz: erősítő hatású, megoldható, leküzdhető) és a distressz (negative stressz: belső egyensúly elvesztésével jár, megjósolhatatlan, befolyásolhatatlan) fogalmát is. Ha az egyén képes megbirkózni a kihívással, akkor ez megerősíti, ha viszont a stresszor túl erős, vagy hosszantartó, a szervezet kimerülhet, ami a fent említett betegségek kialakulásához vezethet. Selye János felismerte a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely (HHM) jelentőségét a stressz-folyamatok szabályozásában, és a stressz-szindróma tüneteinek a tengely véghormonjait, a glükokortikoid hormonokat tette felelőssé.

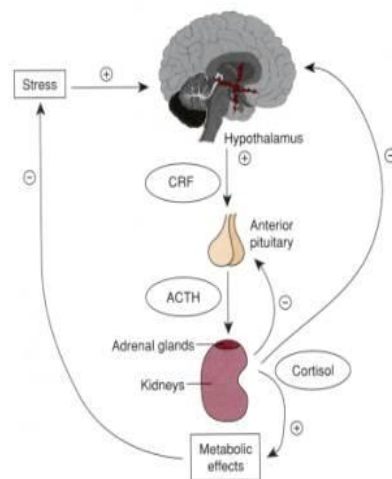
Az elmélet továbbgondolásaként Gerald Huether a stressz kérdését távolabbról, evolúciós szemszögből közelítette meg. A stresszel való megbirkózásra szelekciós tényezőként tekintett, amitől az egyed túlélési és reprodukciós esélyei erősen függenek. Nézete szerint minden élőlény rendelkezik egy alapvető stressz-válasszal (archaikus stressz-válasz), ami a törzsfajlódással párhuzamosan egyre bonyolultabbá vált, és az élettani folyamatokon túl a viselkedési mintázatoknak (pl. tanulási folyamatok) is jelentős szerep jut benne (Huether 1996).

Mindenesetre az élettudományok a stresszorokat, mint sajátos kórállapotokat, betegségeket kiváltó tényezőket tekinti és én is ebből a szemszögből fogom tárgyalni a stresszt a következőkben. Disszertációm egyik kiemelt célja a stressz-tengely működésében megfigyelhető korfüggő különbségek feltérképezése és vizsgálata. Hipotézisünk bizonyos értelemben Gerald Huether elméletének kiegészítése, mely szerint az archaikus stressz válasz nem csak fajonként, hanem egy fajon belül, az egyedek életkora szerint is változik.

3. 2. A hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely

Pszichogén stresszorok (pl.: lábsokk (footshock), bezártság, újdonság stressz) alkalmazása során az ingerek feldolgozása felsőbb agyi területek aktivációját is igényli. Kulcsfontosságú szerep jut a prefrontális agykéregnek (Diorio és mtsai 1993, McLaughlin és mtsai 2014), a hippokampusznak (Rubin és mtsai 1966, Sapolsky és mtsai 1984), az amigdalának (Herman és mtsai 2005, Swanson és Petrovich 1998, Wang és mtsai 2013) és laterális szeptumnak (Goel és mtsai 2011, Singewald és mtsai 2011). A **fizikai stresszorok** (pl.: immunológiai, metabolikus megterhelés) ettől eltérően, közvetlenül aktiválják az agytörzsi viszceroszenzoros központokat (Herman és

mtsai 2003, Herman és mtsai 1996). Végül mindkét útvonal a HHM tengely aktivációját eredményezi (1. ábra). A hipotalamusz paraventrikuláris magjában (nucleus paraventricularis, PVN) megnövekszik a kissejtes neuroszekréciós sejtek kortikotróp felszabadító hormon (corticotropin-releasing hormone (CRH)) és arginin vazopresszin (AVP) termelése. A hormonok az eminentia mediana területén a neuroszekréciós sejtek axonjaiból a fenesztrált falú portális kapillárisokba ürülnek. A vérben oldott állapotban jutnak el az agyalapi



1. ábra A hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely szabályozásának klasszikus sémája (<http://www.montana.edu/wwwai/imsd/alcohol/Vanessa/vwhpa.htm>).

mirigy elülső lebenyébe, ahol a kortikotróp sejtek adrenokortikotróp hormon (ACTH) termelését serkentik. Az ACTH a szisztémás keringésen át eljut a mellékvese-kéregbe, ahol a zona fasciculata sejtjeinek glükokortikoid termelését fokozza (Antoni 1993). A vérbe ürülő glükokortikoidok kötő fehérjékhez (corticosterone binding globuline (CBG)) kapcsolódva szállítódnak, majd a célszervekhez jutva fejtik ki hatásaikat, illetve negatív visszacsatolással (feedback) saját termelődésüket is korlátozzák (Dallman és mtsai 1987, Dayanithi és Antoni 1989, Herman és Cullinan 1997).

3. 2. 1. A hipotalamusz

3. 2. 1. 1. A hipotalamusz anatómiája

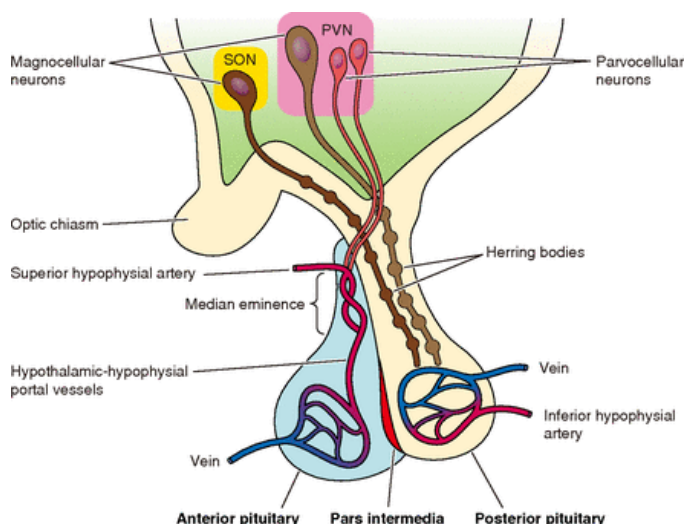
A hipotalamusz a köztiagy agyalapi részét képező, a talamusztól ventrálisan elhelyezkedő agyterület (2. ábra). Alapvetően kétféle, méret és funkció alapján is elkülönülő idegsejttypus alkotja: nagysejtes (magnocelluláris) és kissejtes (parvocelluláris) neuroszekréciós sejtek, amik magcsoportokba tömörülnek.

A stressz-folyamatok szabályozásában a PVN **kissejtes** része játszik központi szerepet (Engelmann és mtsai 2004). Ezek a sejtek a 3. agykamra falához közelebb, mediálisan és ventrálisan helyezkednek el. A hipofízis elülső lebenyére ható felszabadító hormonokat (pl.: CRH, tireotropin elválasztást serkentő hormon (TRH)) és gátló (szomatosztatin) hormonokat termelnek, melyek az axonokból az eminentia mediana területén felszabadulva a hipofízisnyél portális keringésén át jutnak az

adenohipofízisbe, és annak hormontermelését szabályozzák. Bár kezdetben feltételezték a kissejtes neuroszekrécíós sejtek monospecifitását, későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy egyszerre több hormon termelésére is képesek. Attól függően, hogy ezek közül melyik a domináns, több típus különíthető el. A stressz-

folyamatok szabályozásában a CRH termelő hipofizeotróp sejtek játszanak kulcsfontosságú szerepet, (Thorsell 2010), melyek AVP termelésre is képesek (Aguilera 1994, Aguilera és mtsai 1994, Dallman 1993), de pl. nesfatin-1-el is kolokalizálnak (Yoshida és mtsai 2010). Sejtjei direkt bemenetet kapnak más hipotalamikus magoktól (pl. nucleus tractus solitarius, nucleus parabrachialis, nucleus suprachiasmaticus (SCN), nucleus preopticus medialis (Silverman és mtsai 1981)), illetve számos, pszichogén stresszorok által aktivált magasabb agyi központtól (Herman és Cullinan 1997, Herman és mtsai 2003).

A PVN **magnocelluláris** sejtjei a 3. agykamrától távolabb, laterodorzálisan helyezkednek el, és főként két hormont, az AVP-t és az oxitocint (OT) termelik (Cunningham és Sawchenko 1991). Attól függően, hogy a két hormon közül melyik a domináns, vazopresszinerg és oxitocinerg sejteket különböztetünk meg, de mindkét magnocelluláris sejttípus további hormonokat is termel. Axonjaikon keresztül hormonjaikat a hipofízis hátsó lebenyébe juttatják, ahol tárolódnak.



2. ábra A hipotalamusz-hipofízis egység szagittális irányú metszetének sematikus ábrázolása (Koshimizu és mtsai 2012).

3. 2. 1. 2. A CRH

Emberben és rágcsálókban az ACTH termelés fő szabályozója a 41 aminosavból álló CRH (Vale és mtsai 1983). Termelődése során egy 196 aminosavas előmolekulából, a prepro-CRH-ból válik le enzimes hasítás útján, bár a folyamatot katalizáló enzim nem ismert. A termeléséért felelős sejtek a PVN mediális részén, a szomatosztatin és TRH termelő sejtektől laterálisan helyezkednek el (Rho és Swanson 1989). A PVN-en kívül a mediális preoptikus magban található parvocelluláris neuronok is képesek CRH termelésre (Arima és Aguilera 2000). Továbbá más agyterületeken pl.: agykéregben (Wong és mtsai 1995), amigdala centrális magjában (Kusnecov és mtsai 1999, Zhou és mtsai 2003), locus coeruleusban (Nagashima és mtsai 2003), kisagyban (Powers és mtsai 1987) és a dorzális rafé-ban (Matta és mtsai 1997), valamint perifériás szervekben pl.: bélben (Zheng és mtsai 2009), bőrben (Slominski és mtsai 2006), a mellékvesék velőállományában (Tillinger és mtsai 2013), a méhben (Zoumakis és mtsai 2009), herékben (Huang és mtsai 1997) és a petefészkekben (Kiapekou és mtsai 2010) is kimutatható CRH termelés.

Receptorai a „gut-brain” neuropeptid receptorok családjának tagjai. Két fő típusuk ismert:

Az 1-es típusú CRH receptorok (**CRH-R1**) adják a CRH receptorok 70%-át. Legnagyobb számban az agyalapi mirigy elülső lebenyében vannak jelen, de más agyterületek sejtjei is kifejezik (amigdala, agykéreg, kisagy). Nagy affinitással képesek megkötni a CRH-t (Giardino és mtsai 1996, Muller és mtsai 2001, Nigawara és mtsai 2003). A stressz által indukált HHM tengely aktivációban ez a receptor tölt be fontos szerepet. A CRH-R1 génkiütött egértörzsek csökkent HHM tengely működést mutatnak (Martinez-Laorden és mtsai 2014, Wang és mtsai 2012). Az elváltozások CRH-R1 antagonistákkal (pl.: antalarmin, NBI-30775, NBI-34041) kezelt állatok esetében is megfigyelhetők (Holsboer és Ising 2008, Ising és Holsboer 2007, Jaferi és Bhatnagar 2007).

A 2-es típusú CRH receptorok (**CRH-R2**) főleg a perifériás szervekből mutathatók ki, de előfordulnak a limbikus rendszerben és szubkortikálisan is. Az 1-es típusú CRH receptorokhoz viszonyítva kisebb affinitással kötik a CRH-t, és urokortin molekulák is képesek aktiválni őket (Muller és mtsai 2001, Pal és mtsai 2010).

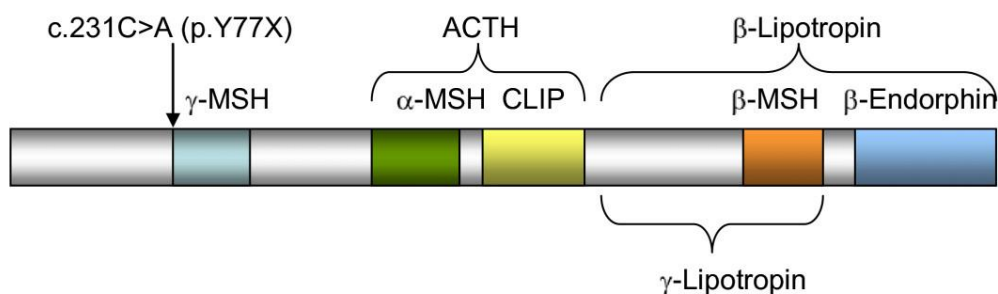
3. 2. 2. A hipofízis

3. 2. 2. 1. A hipofízis anatómiája

A hipofízis (agyalapi mirigy) az ékcsont üregében, a töröknyeregben (sella turcica) található. Eredet, morfológia és funkció szerint is 2 lebenyre tagolódik: az ektodermális eredetű neurohipofízisre (hátsó lebeny), és entodermális eredetű adenohipofízisre (elülső lebeny). A **hátsó lebeny** az egyedfejlődés során a harmadik agykamra kitüremkedéséből, a hipotalamusz kezdeményéből fejlődik ki, ezért a hipotalamusz nyúlványának is tekinthető. Bár sejtjei önálló hormontermeléssel nem rendelkeznek, itt végződnek a hipotalamusz magnocelluláris idegsejtjeinek axonjai, itt tárolódnak az általuk termelt hormonok (AVP, OT). Ezért a hipotalamusz-neurohipofízis kapcsolatot közvetlennek nevezzük. Az **adenohipofízis** a Raphe-tasakból fejlődik ki. A parvocelluláris idegsejtek a portális keringésen keresztül juttatják szekrétaikat az elülső lebenybe, így a hipotalamusz-adenohipofízis kapcsolat közvetett. A stressz-folyamatok hormonális szabályozásában az ACTH játszik jelentős szerepet (Stevens és White 2010), de az adenohipofízis egyéb hormonok termelésével (növekedési hormon (GH), pajzsmirigyet serkentő hormon (TSH), prolaktin (LTH), follikulust serkentő hormon (FSH), luteinizáló hormon (LH), és melanocita stimuláló hormon (MSH)) további fontos funkciókat is ellát (Kawauchi és Sower 2006).

3. 2. 2. 2. Az ACTH és receptorai

Az ACTH 39 aminosavból álló peptid. Előmolekulája, a 241 aminosavas proopiomelanokortin (POMC) enzimes bontási folyamatok során 3 részre hasad. Az N-terminális szakaszból további hasítások révén γ -melanotropin (γ -MSH) válik le, míg a C-terminális végéből a β -lipotropin, mely a γ -lipotropin, és a β -endorfin előmolekulája. A harmadik, középső szakaszból képződik az ACTH, mely szintén tovább hasadhat az N-terminális végen található 13 aminosavas α -MSH-ra és a C-terminális végen található kortikotropin szerű középső lebeny hormonra (CLIP) (3. ábra).



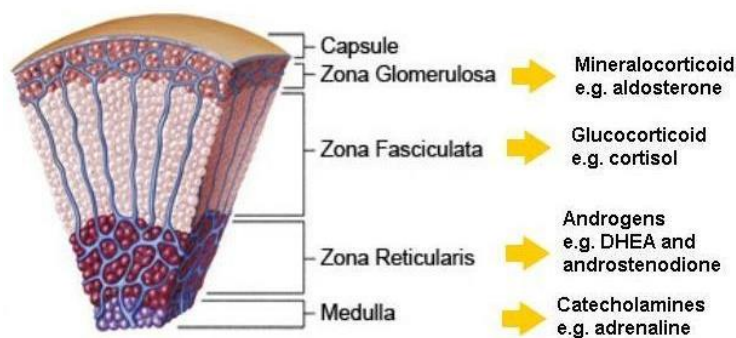
3. ábra A POMC molekula és a belőle kihasadó peptidek (Mendiratta és mtsai 2011).

A CRH/AVP stimuláló hatására felszabaduló ACTH a keringésén keresztül a mellékvesékbe jutva fokozza a zona fasciculata glükokortikoid elválasztását (4. ábra). Ezen kívül a mineralokortikoidok (zona glomerulosa), és az androgének (zona reticularis) termelődésére is serkentőleg hat. Megnöveli a koleszterin bejutását a mellékvese-kéreg sejtjeibe, így segítve elő a szteroid hormonok termelődését, továbbá katalizálja a szteroid szintézis első lépését, a koleszterin-pregnenolon átalakulást is. Hiánya (adenohipofízis műtéti eltávolítása) esetén a mellékvese-kéreg zona fasciculata és zona reticularis rétegei elsorvadnak.

Az ACTH kötéséért a 297 aminosavas 2. típusú melanokortin receptorok (**MC2R**) felelnek (Raikhinstein és mtsai 1994). Legnagyobb mennyiségben a mellékvese-kéreg zona fasciculata rétegében találhatók, de a zona glomerulosa és a zona reticularis rétegek sejtjeiben is kimutatható a jelenlétük. A mellékveséken kívül csontképző osteoblast sejtek is kifejezik a felületükön (Isales és mtsai 2010, Zhong és mtsai 2005), ahol a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor; VEGF) termelését fokozzák (Zaidi és mtsai 2010).

3. 2. 3. A mellékvese

A mellékvese páros szerv, a vese apikális pólusánál helyezkedik el, annak belső tokjával körülvéve. Eredet szerint két részre osztható: ektodermális



4. ábra A mellékvese szerkezete (<http://www.fastbleep.com/medical-notes/endocrine-and-breast/23/63/407>).

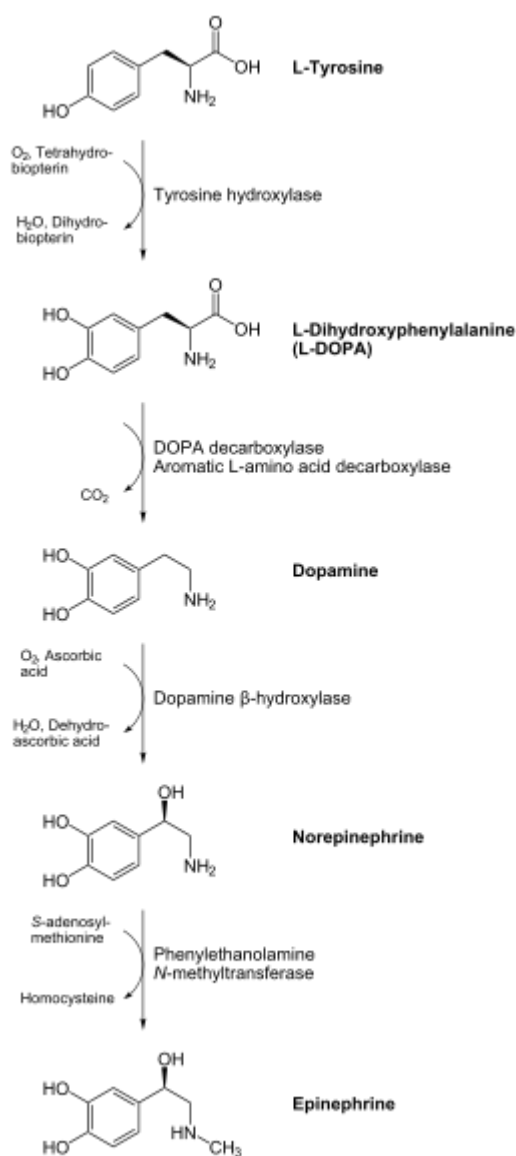
eredetű velő-állományra (medulla), illetve mezodermális eredetű kéreg-állományra (kortex) (4. ábra). Előbbi katekolaminokat (adrenalint és noradrenalint) állít elő, míg utóbbi szteroid hormonokat termel: mineralo-, glükokortikoidokat és szexuálisztroidokat.

3. 2. 3. 1.. A mellékvese velőállománya

A velőállományt kromaffin sejtek alkotják, melyek hálózatos gerendákat hoznak létre. A szimpatikus idegrendszer része, hormonjai hozzájárulnak a stressz-reakció első fázisának (a Cannon-féle vészreakciónak) az eseményeihez. A sejtek 80%-a adrenalint, míg a maradék 20% elsősorban noradrenalint választ el, de a szekréciónak egyéb molekulákat (chromogranin, ATP, enkefalin) is raktároznak. A kromaffin sejtek produktumai a gerendák közötti térbe (szinuszoidok) ürülnek, majd a vérkeringés útján a megfelelő célszervhez jutva fejtik ki hatásukat (Taugner és Hasselbach 1966).

3. 2. 3. 1. 1. Katekolaminok és receptoraik

Az **adrenalin**, vagy másik nevén epinefrin egyszerű aminosav-származék. Szerkezetének alapja fenil-etil-amin molekula, mely fenilalanin és tirozin aminosavak összekapcsolódásából jön létre (5. ábra). Hormon, neurotranszmitter és szimpatomimetikum, a szimpatikus idegrendszer hatását közvetíti. A szervezet tartalékainak mozgósítását katabolikus folyamatok serkentésével éri el. A májban és az izmokban fokozza a glikogénbontást, a



5. ábra Katekolaminok szintézise (http://foka.blog.hu/2009/12/04/adrenalin_es_turbulencia).

zsírszövetben pedig a lipolízist segíti elő (Large és mtsai 1997), növelve ezáltal a vércukorszintet és a vér zsírsav-koncentrációját. Adrenalin hatására a bőr és a belső szervek kisartériái összehúzódnak, míg a vázizomzat erei tágulnak, így biztosítva az izmok hatékonyabb vérellátását.

A mellékvese-velő másik hormonja a **noradrenalin**, vagy másnéven norepinefrin, mely szerkezetileg a N atomon lévő metil csoport hiányában tér el az adrenalintól (5. ábra). Az adrenalinhoz hasonlóan a noradrenalin is részt vesz a Canon-féle vészreakció kialakításában. Az adrenalinhoz hasonlóan elősegíti a glükóz felszabadulást, növeli az izomtónust, ugyanakkor alacsonyabb termelődése ellenére jobban szűkíti az ereket, és növeli a szívfrekvenciát. A noradrenalin jelentős a hangulat meghatározásában. Az alacsony noradrenalin termelődés depresszió, míg túltermelődés mánia kialakulását segíti elő.

A katekolaminok hatásaikat **adrenoceptorok** közvetítésével fejtik ki (Ahlquist 1948). Mindegyikük G protein kapcsolt, de másodlagos jelátviteli utak szerint két fő csoportba (α , β), és azon belül is további alcsoportokba (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , β_3) oszthatók. Míg a noradrenalin főleg az α_1 és α_2 receptorokon fejt ki hatásait, addig az adrenalin mind az 5 receptortípuson képes hatni. Az α_1 receptorokat legnagyobb mennyiségben a bőrben, bélrendszerben, vesében és az agyban találunk. Elsősorban a simaizom összehúzódásért felelősek. Az α_2 receptorok a hasnyálmirigyben, tápcsatornában és a központi idegrendszerben mutathatók ki nagy számban (Sagrada és mtsai 1987). Autoreceptorként is funkcionálnak, a preszinaptikus idegsejten a neurotranszmitter felszabadulását gátolják (Schmitz és mtsai 1981). A β receptorok növelik a szívizomsejtek összehúzódását (β_1) valamint a glükogenolízist és fokozzák a simaizom relaxációt (β_2).

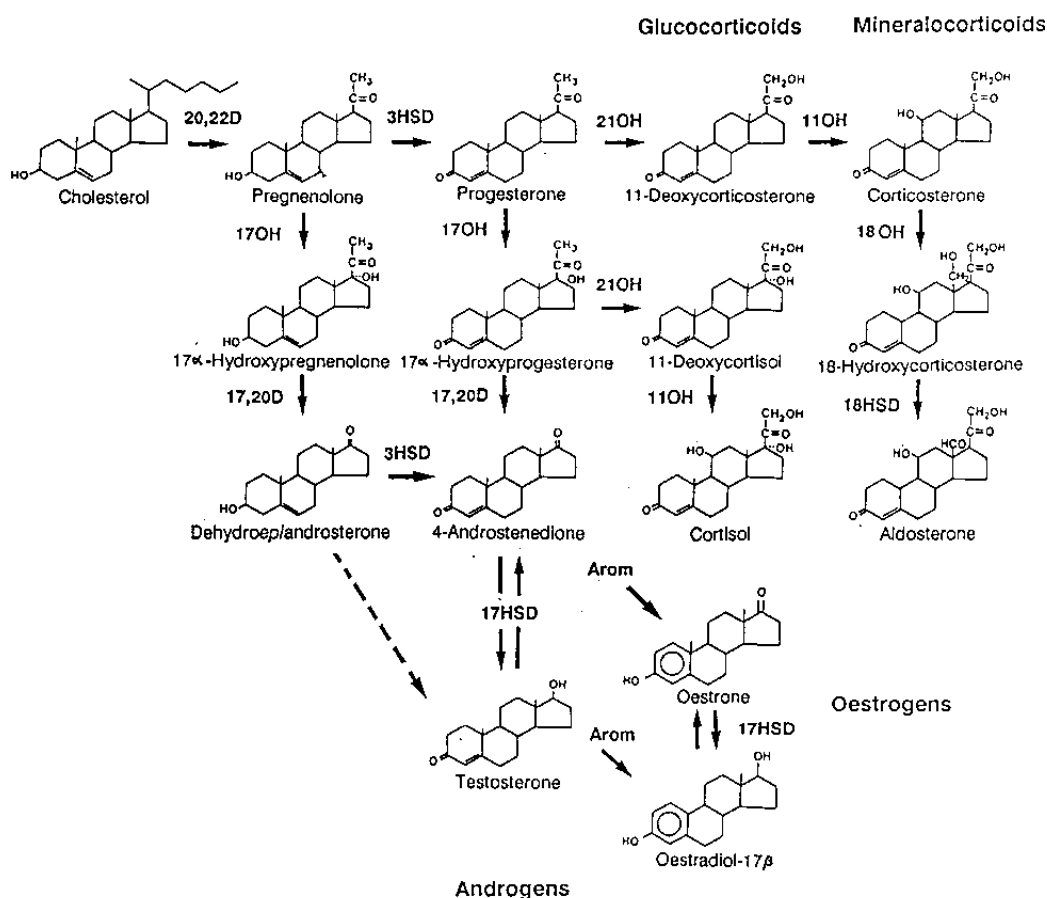
A mellékvese hormonjai nagy mennyiségben érhetik el a kéregállományt, valamint a kéreg a splanchnikus idegeken keresztül szimpatikus beidegzést is kap. Így a katekolaminok képesek lehetnek a glükokortikoid elválasztás szabályozására (Bornstein és mtsai 1990, Edwards 1997, Holzwarth és mtsai 1987). Ezt támasztja alá, hogy a mellékvese-kéregben mindegyik adrenoceptort kimutatták már (Holzwarth és mtsai 1987, Mazzocchi és mtsai 1997). Mivel az eddigi kísérletek in vitro rendszereket vagy agonistákat használtak, az endogén katekolaminok szerepe a folyamatban nem tekinthető tisztázottnak.

3. 2. 3. 2. A mellékvese kéregállománya

A mellékvese-kéreg a kötőszövetes toktól a velőállomány felé haladva 3 részre tagolódik (4. ábra). A külső **zona glomerulosa** termeli a só- és vízháztartásért felelős mineralokortikoidokat. A három réteg közül ez a legvékonyabb, mikroszkópos felépítése is eltér a másik kettőtől. Sejtjei fészkekbe rendeződnek és hormonjaik sejtszortokat körülvevő szinuszoid kapillárisokon keresztül jutnak a keringésbe (Lustyik és Szabo 1978).

A középső **zona fasciculata** a stressz-tengely véghormonjának tekintett glükokortikoidok termelését végzi. Ez a legvastagabb réteg, sejtjei sokszögűek, sejtszortosulások helyett a felszínre merőleges gerendákat képeznek. A megtermelt hormonok a gerendákkal párhuzamosan futó szinuszokban ürülnek (Long és Jones 1967).

A belső **zona reticularis** réteg szexuálisztteroidokat termel (elsősorban dehidroepiandrosteront és androszténdiont). Sejtjei hálózatos sejtkötegeket és közöttük futó szinuszokat alkotnak (Nussdorfer 1969).



6. ábra Szteroid szintézis lépései

(http://www.gfmer.ch/Books/Reproductive_health/Steroid_hormone_metabolism_Fig2.html).

3. 2. 3. 2. 1. Glükokortikoidok

A glükokortikoidok nevüket egyik elsőként leírt funkciójukról (glükóz anyagcsere szabályozása) kapták: glucose + cortex + steroid. A legfőbb glükokortikoid hormon emberben a kortizol, míg rágcsálókban a **kortikoszteron**, melyek előállítására a szteroidogenezis során valósul meg (6. ábra). A folyamat kiindulási molekulája a koleszterol, amiből a mitokondriumokban található koleszterol oldallánc hasító enzim progrenolont állít elő. Utóbbi molekulából az endoplazmatikus retikulum 3- β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz (3HSD) enzimének köszönhetően progeszteron képződik, amiből a 21-hidroziláz (21OH) enzim deoxi-kortikoszteront állít elő. Ebből a mitokondriumok 11- β -hidroxiláz (11OH) enzime segítségével kortikoszteron képződik. A kortizol csupán egy, a 17. szén atomhoz kapcsolódó hidroxil csoportban tér el a kortikoszterontól. Ezt a 17- α -hidroxiláz (17OH) enzim helyezi fel a progrenolon-ra 17- α -hidroxi-prognerolon-t képezve, amiből a kortikoszteron termelésénél említett 3 enzim segítségével 17- α -hidroxi-progeszteronon és 11-deoxikortizolon át kortizol képződik.

Funkcióik között immunológiai és metabolikus hatások is vannak, de ezen túlmenően az egyedfejlődés (pl tüdő kialakulása) során is rendkívül fontosak (Samtani és mtsai 2006), valamint a csontképződést is csökkentik. A klinikumban kiterjedten használják az immunrendszert gátló hatásai miatt, így csökkentik az allergiás reakciókat, valamint antiflogisztikus (gyulladásgátló), illetve kilökődésgátló hatásuk is van (Chrousos 2010). Metabolikus szerepük a szervezet energiatartalékainak mozgósítása. Növelik a zsírok, zsírsavak bontását, gátolják a lipogenezist is. Továbbá növelik a sejtek fehérje bontó aktivitását, a fehérje építő folyamatokat csökkentik és a máj sejtjeiben fokozott aminosav mobilizáció is megfigyelhető. Így megfelelő mennyiségű aminosav szabadul fel a glükoneogenezishez, ami végsősoron a vér glükóz szintjének emelkedéséhez vezet (Pilkis és Granner 1992). A só- és vízháztartás szabályozásában, és ezen keresztül az artériás nyomás fenntartásában is fontos szerepet töltenek be (Grunfeld 1990).

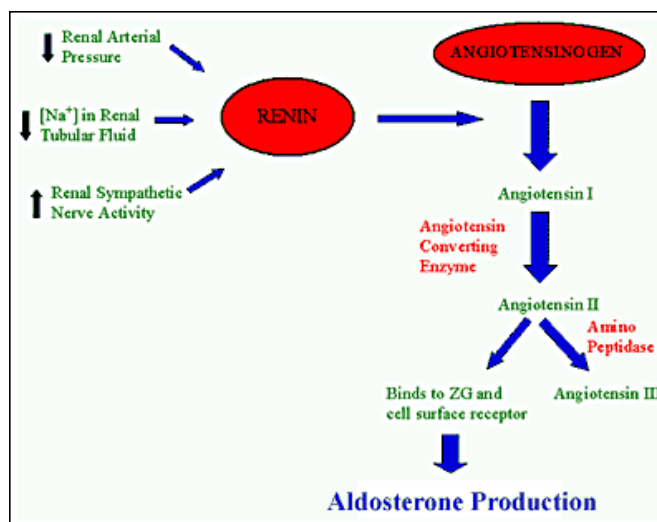
A HHM tengely működésének megfelelően a glükokortikoid elválasztás legfontosabb, tankönyvekben kizárólagosan említett **szabályozója** az ACTH. Kutatásaim egyik fő kérdése további lehetséges szabályozó faktorok feltárása.

3. 2. 3. 2. 2. Mineralokortikoidok

A mineralokortikoidok közül emberben és rágcsálókban az **aldoszteron** a legjelentősebb. Előállítás a glükokortikoidoknál bemutatott szteroidogenezis során kortikoszteronból történik aldoszteron szintáz enzim segítségével (Yamakawa és mtsai 1986) (6. ábra).

Ahogy neve is utal rá (mineral + cortex + szteroid) fő **funkciója** a víz és elektrolit háztartás szabályozása (Williams és Williams 2003). A vesék nefronjainak tubulusaiban, az összekötő szakaszon és a gyűjtőcsatornák kortikális szakaszán fokozza a Na^+ ionok visszaszívását, a disztális tubulusban a K^+ ürülést szabályozza. Mivel ezen funkciókat a Na^+/K^+ -pumpa fehérjék mennyiségének megnövelésével éri el, a hatás késleltetve jelentkezik (Funder 2010, Funder és Mihailidou 2009).

Az aldoszteron termelés elsődleges **szabályozása** a renin-angiotenzin rendszeren (RAS) keresztül történik (7. ábra). A vértérfogat csökkenése és a vérnyomás esés hatására a vese juxta glomeruláris apparátus sejtjei prorenint termelnek. Utóbbi aktivált formája, a renin, a májban termelődő angiotenzinogénből angiotenzin-I-et állít elő, amit az endotélsejtekben jelen lévő



7. ábra A renin-angiotenzin-rendszer
(<http://emsbasics.com/2011/07/02/drug-families-ace-inhibitors-and-arbs/renin-angiotensin-system-pic/>).

angiotenzin konvertáló enzim (ACE) angiotenzin-II-vé alakít. Az angiotenzin-II fokozza az aldoszteron elválasztást, rajta keresztül közvetve növelve a vérnyomást, illetve érösszehúzódot fokozó hatásával közvetlenül is elősegíti a homeosztatis egyensúly visszaállítását (Funder 2010, Zimmerman és Frohlich 1990). A fentiekből kifolyólag a RAS a szív és érrendszeri problémák (magas vérnyomás) esetén a kezelések kiváló célpontja (Funder és Reincke 2010, Ma és mtsai 2010).

Különböző stresszorok hatására glükokortikoidok mellett jelentős mennyiségű aldoszteron is felszabadul (Moncek és mtsai 2003). Akut és krónikus stressz során az aldoszteron felszabadításában az angiotenzin II-n túl az ACTH-nak is nagy szerep jut

(Hattangady és mtsai 2012, Messerli és mtsai 1976). ACTH hiányában a zona glomerulosa diszfunkciója és ezzel párhuzamosan az aldoszteron produkció jelentős csökkenése is megfigyelhető (Miyabo és mtsai 1989). Az aldoszteron szorongást és depressziót fokozó hatása is ismert (Hlavacova és mtsai 2010, Hlavacova és mtsai 2012).

3. 2. 3. 3. Glüko- és mineralokortikoid receptorok, glükokortikoid visszacsatolás

A glüko- és mineralokortikoidok egyaránt szabadon képesek a sejtek membránján átdiffundálni, fő hatásukat intracelluláris magreceptorokon keresztül fejtik ki (Reul és de Kloet 1985). Két receptortípus van, melyek egyaránt képesek glüko- és mineralokortikoidokat is megkötni, de affinitásuk, idegrendszeri eloszlásuk jelentősen eltér egymástól.

A **II. típusú (glükokortikoid) receptor (GR)** alacsony glükokortikoid affinitással rendelkezik (K_d 2,5-5 nM). Legnagyobb mennyiségben az agykéregben, hippokampuszban, amigdalában, laterális szeptumban, PVN-ben, locus coeruleusban, ráfemagvakban található, de az agytörzsben, kisagyban és a talamusz egyes területein is kifejeződik (Aronsson és mtsai 1988).

Az **I. típusú (mineralokortikoid) receptor (MR)** elsősorban aldoszteron megkötésére szolgál, de hatékonyan képes glükokortikoidokat is megkötni ($K_d \approx 0,5$ nM). Legnagyobb mennyiségben a vesékben található, ahol a só- és vízháztartás szabályozásában vesz részt. Az agyban a GR receptoroknál kisebb mennyiségben van jelen, elsősorban a limbikus rendszer elemeiben (amigdala, hippokampusz, laterális szeptum), míg a PVN-ben és a hipofízis elülső lebenyében egyáltalán nem mutatható ki (Arriza és mtsai 1988, Chao és mtsai 1989, Evans és Arriza 1989).

A két receptor alapszerkezete megegyezik, 3 fő doménnel rendelkeznek. A C terminális szakasz a ligand-kötőhely, a hormon-specifitásért felel. Az N terminális szakasz a transzkripció stimulálásában játszik szerepet. A kettő között a DNS-kötő domén helyezkedik el, mely konzervatív szekvenciájával a génspecifikus hormon-hatásért felel (Arriza és mtsai 1988, Evans és Arriza 1989). Alap állapotban hősokk fehérjék (Hsp 70, Hsp 90) kapcsolódnak hozzájuk, melyek inaktivált állapotban tartják a receptorokat. Hormon kapcsolódása esetén a hősokk fehérjék, amik önmaguk is

specifikus hatásokért felelősek, leválnak és a kialakult szteroid-receptor komplex bejut a sejtmagba. Foszforilálódás után két komplex homodimer formában összekapcsolódik, és a DNS megfelelő régiójához kötődve transzkripciósfaktorként szabályozza több ezer gén átíródását (Joels és de Kloet 1994, Nicolaidis és mtsai 2010, Webster és Cidlowski 1999). A glükokortikoid válasz sokszínűségét fokozza az egyetlen receptorgénből "alternatív splicing" révén keletkező termékek, valamint a poszttranszlációs módosulások hatására keletkező számos receptor-altípus jelenléte (Oakley és Cidlowski 2013).

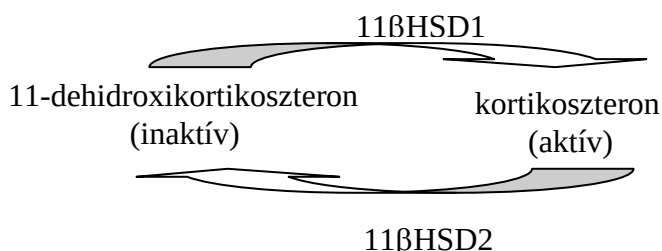
Az előbb említett mechanizmuson keresztül valósul meg a glükokortikoidok időigényes, genomiális hatása (Hallahan és mtsai 1973). A glükokortikoidok néhány perc alatt bekövetkező génexpressziótól független magatartási válaszokat is képesek kiváltani, amiket gyors, **nem-genomiális hatásoknak** nevezünk (Haller és mtsai 2008, Mikics és mtsai 2007, Sandi és mtsai 1996, Venero és Borrell 1999). Utóbbi mechanizmusa kevésbé ismert, de több lehetséges mediátort leírtak, melyek a glükokortikoidok nem-genomiális hatásainak közvetítésében részt vehetnek. Elképzelhető, hogy a genomiális mechanizmust is közvetítő receptorok rendelkezhetnek ezzel a hatással. Néhány kísérletben (pl. szignalizáció, AVP elválasztás vizsgálata) a GR receptorok gátlása a gyorsan megjelenő glükokortikoid hatásokat is blokkolta (Croxtall és mtsai 2000, Liu és mtsai 1995), viszont az esetek többségében gyors hatások megjelenése független volt a GR receptorok működésétől (Di és mtsai 2003). Utóbbi gyors hatások egy részéről beigazolódott, hogy Ca^{2+} jelenlététől függenek (Liu és mtsai 1995), míg más hatásokra ez nem érvényes (Venero és Borrell 1999). Egyes gyors hatások a szintetikus dexametazonnal is kiválthatók (Venero és Borrell 1999), de gyakran csak a szervezetben jelen lévő glükokortikoidok idézték elő (Chen és mtsai 1991).

A mineralokortikoidok vonatkozásában is leírtak hasonló, gyors, nem genomiális hatásokat (Dooley és mtsai 2012, Groeneweg és mtsai 2012, Kadmiel és Cidlowski 2013).

A vérben lévő glükokortikoidok mennyisége 2-3 nagyságrenddel is nagyobb lehet a mineralokortikoidokénál, de receptoraik közösek, ezért mineralokortikoid hatások csak akkor tudnak létrejönni, ha a glükokortikoidok mennyisége helyileg csökken. Valóban, a mineralokortikoid célszervekben (pl. vese) található **11- β -**

hidoxiszteroid-dehidrogenáz 2 (11- β -HSD2) inaktiválja a glükokortikoidokat, melyek így nem képesek MR receptorhoz kötődni (Naray-Fejes-Toth és mtsai 1998) (8. ábra). Ezzel szemben a **11- β -hidoxiszteroid-dehidrogenáz 1 (11- β -HSD1)** a glükokortikoidok aktiválását végzi, így fokozva a glükokortikoid célszervekben (pl.: máj) a kívánt hatást. A jelenséget prereceptor specificitásnak nevezzük (van Uum és mtsai 2004). Nagy mennyiségű kortizol jelenléte esetén (pl. Cushing kór) előfordulhat, hogy az enzim nem képes az összes molekulát inaktiválni, így a glükokortikoidok mineralokortikoid-szerű

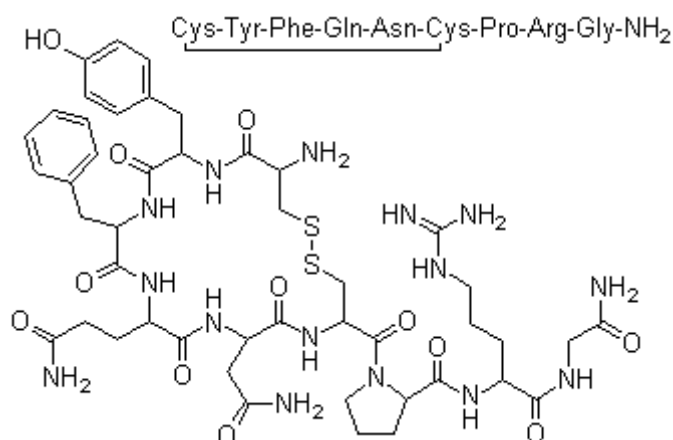
hatásokat is létrehozhatnak (Cincu és Agrawal 2006). Néhány publikáció alátámasztja, hogy egyes esetekben az aldoszteron is képes lehet GR receptoron keresztül hatásokat kifejteni (Gauer és mtsai 2007).



8. ábra Prereceptor specificitás (saját ábra).

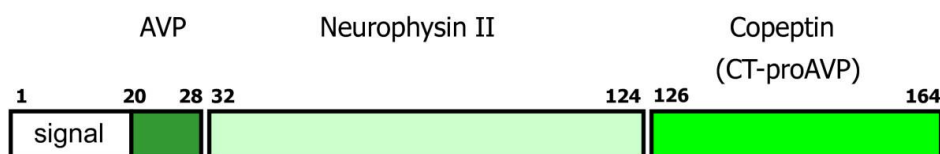
A GR és MR közötti lokalizációs és affinitás különbségek a glükokortikoid-elválasztás időbeli dinamikájában és a stresszre adott válaszreakciók kialakításában is kulcsfontosságú szerepet játszanak (Reul és de Kloet 1985). Normál, stressz mentes körülmények között a plazma kortizol szintje inaktív fázisban a legalacsonyabb, míg ébredés előtt a legmagasabb (Haller és mtsai 2000, Moore és Eichler 1972). Ekkor a MR-ok nagy része telített (70-90%-os telítettség), míg a GR-ek nagyfokú telítődése csak stressz során figyelhető meg (de Kloet és Sarabdjitsingh 2008, Ratka és mtsai 1989). Tehát a MR rendszer az alap glükokortikoid szintek beállításáért és a termelés cirkadián szabályozásáért felel, míg a GR rendszer elsősorban a stressz-folyamatok során kerül előtérbe (Reul és mtsai 1990). Utóbbi esetben a glükokortikoidok mennyiségüktől függően szabályozzák a HHM tengely aktivitását. Kezdeti alacsony szintjük mellett a HHM tengely fokozza termelésüket, míg elhúzódó stressz-válasz esetén magas szintjük negatív visszacsatolást vált ki, melynek korlátozza a PVN és az adenohipofízis hormon-termelését, és így a stressz-tengely működését (Dallman és mtsai 1987, Kovacs és mtsai 1986, Kovacs és Mezey 1987).

3. 3. A vazopresszin



9. ábra Az arginin-vazopresszin szerkezete (<http://www.buyersguidechem.com/struc/1/113-79-1.jpg>).

3. 3. 1. A vazopresszin fő hatásai és receptorai



10. ábra A vazopresszin gén (Nickel és mtsai 2012).

Az AVP nevét érösszehúzó hatásáról kapta, de a vízvisszatartó szerepe miatt antidiuretikus hormonnak (szomjúsághormon) is nevezik (Ring 2005). Az AVP 9 aminosavból álló polipeptid, melynek szerkezete mindössze 2 aminosavban tér el az OT-tól (9. ábra). Előállítása egy nagyobb méretű prekursor molekula, a preproresszofizin hasításával történik (10. ábra). Az előmolekulát kódoló gén 3 exonból áll. Az első exon kódolja a szignálpeptidet, az AVP-t és a neurofizin molekula N-terminális részét. A második exon kódolja a neurofizin II középső szakaszát, míg a harmadik exon a neurofizin C terminális részét és a C-terminális glikoproteint. A megtermelt preproresszofizin az endoplazmás retikulumon és a Golgi hálózaton keresztül vezikulumokba gyűlik, és axonális transzportja során keletkezik belőle AVP (Kim és Schrier 1998, Nagasaki és mtsai 1995).

Az AVP fő termelői a hipotalamusz parvo- és magnocelluláris neuroszekréciós sejtjei (PVN, SCN, nucleus supraopticus (SON)), de más agyterületek pl.: bed nucleus

of stria terminalis (BNST) (Marie-Luce és mtsai 2013), mediális és centrális amigdala (Arakawa és mtsai 2010) sejtjei is előállítják. A HHM tengely szabályozása szempontjából a PVN parvocelluláris sejtjeinek van kitüntetett szerepe (Aguilera és mtsai 1994). 1954-es leírását követően az AVP-t az ACTH felszabadulás fő szabályozójának tartották (Du Vigneaud 1954), míg fel nem fedezték a CRH-t. Mivel a régebben domináns Dale-elv szerint egy preszinaptikus sejt mindig csak egyféle ingerületátvivő anyagot termelhet (Dale 1935), a fő ACTH elválasztás szabályozó molekula, a CRH felfedezése után az AVP stressz-tengely szabályozásában betöltött szerepe háttérbe szorult. Később kiderült, hogy egy idegsejt számtalan neurotranszmittet is termelhet és Dallman és Aguilera később részletezett elmélete felvetette, hogy a betegségek kialakulása szempontjából lényeges krónikus stressz-folyamatok során az AVP lehet a HHM tengely fő hipotalamikus szabályozója (Aguilera 1994, Aguilera és mtsai 1994, Dallman 1993). Ennek hatására az AVP HHM tengely szabályozásában betöltött szerepe ismét előtérbe került.

Az AVP sokrétű **hatásait** három különböző receptor segítségével fejti ki. Közös jellemzőjük, hogy 7 transzmembrán doménnel rendelkező, G protein kapcsolt fehérjék, viszont szignalizációs út, lokalizáció, és funkció alapján jelentős eltéréseket mutatnak.

A **V2** receptor főleg a vesék gyűjtőcsatornáiban fordul elő, ahol segíti az aquaporin-2 csatornák beépülését a gyűjtőcsatorna sejtjeinek apikális membránjába, emellett az aquaporin-2 szintézisét is fokozza (DiGiovanni és mtsai 1994, Hayashi és mtsai 1994). Ezáltal a vízviasszaszívást serkenti a vesékben.

A másik két receptor a **V1a**, és az utolsóként leírt V1b hasonló szignalizációs útvonalon fejtik ki hatásukat. Előbbit legnagyobb számban az erek simaizomzatában, májban, szívben, vesékben, herékben, vérlemezkékben találjuk (Ostrowski és mtsai 1994), viszont a központi idegrendszerben is kimutatható jelenléte a következő agyterületeken: hippocampusz, amigdala, laterális szeptum, ventrális tegmentális area, szubsztancia nigra, dorzális rafe (Johnson és mtsai 1993, Szot és mtsai 1994). Az élettani dózisonál magasabb AVP a V1a receptorokon keresztül fokozza a bélperisztaltikát és az erek összehúzódását (Loichot és mtsai 2001). A májban metabolikus folyamatok szabályozásában van szerepe (Aoyagi és mtsai 2007, Montero és mtsai 2006). A fibroblaszt sejtek osztódását és miofibroblasztá váló differenciálódását elősegítő hatás is V1a receptorokon keresztül valósul meg (Serradeil-

Le Gal és mtsai 1994, Yan-Hong és mtsai 2010). Vélhetően a szívizomsejtekben található V1a receptorok is hasonló funkciót töltenek be, a kardiomiogenezis szabályozásában lehet szerepük (Gassanov és mtsai 2007). A vesékben lévő V1a receptorok a vérnyomás szabályozásban jelentősek, magas vérnyomás vizsgálatára tenyésztett patkány törzsekben V1a antagonistákkal kivédhető a hipertenzió (Burrell és mtsai 2013). Az AVP a vérlemezék aggregációjának segítségével a véralvadási folyamatokat is gyorsítja (Launay és mtsai 1987). A herékben az odóvezeték mioid sejteiben mutathatók ki V1a receptorok, így a hím termékenység (Howl és mtsai 1995), valamint a reprodukcióval kapcsolatos viselkedések szabályozásában is részt vesznek. Összefüggés mutatható ki az anyai gondviselés és a V1a receptor gén polimorfizmusa között (Avinun és mtsai 2012, Bisceglia és mtsai 2012), továbbá az AVP laterális szeptumba való juttatásával anyai magatartások válthatóak ki, míg a V1a antagonistákkal kezelt anyáknál utóbbiak mennyisége csökken (Wang és mtsai 1994). Szoptatás alatt megnövekedett AVP szintek mérhetők a SON és a PVN területén, aminek háttérében a prolactin AVP és OT termelést fokozó hatása állhat (Vega és mtsai 2010) és a só- és vízháztartás egyensúly fenntartás szempontjából lehet kiemelt jelentősége (Koehler és mtsai 1993).

V1b receptorokat legnagyobb számban az agyalapi mirigy elülső lebenyében találunk (Antoni és mtsai 1984), de jelen vannak a szaglógumókban, a hippocampusban, az SCN, a kisagy és az agykéreg területén is (Vaccari és mtsai 1998, Young és mtsai 2006). Az agyon kívül a hasnyálmirigy Langerhans-sziget sejteiben (Oshikawa és mtsai 2004), a mellékvesékben és a vesékben is kimutatható jelenlétük (Saito és mtsai 2000). Ez a receptor felel (a CRH-R1 mellett) az ACTH felszabadításért stressz-folyamatok során. Az AVP termoregulációra gyakorolt hatása is vélhetőleg V1b receptorokon keresztül valósul meg (Daikoku és mtsai 2007, Richmond 2003). Az AVP a szociális viselkedésre is hat. Az agresszió szabályozásában a hippocampus, mediális preoptikus és az anterior hipotalamikus területek nagyszámú V1b receptora játszik szerepet, amik antagonistákkal való blokkolása csökkenti az agresszív interakciók számát (Caldwell és mtsai 2008).

Az előbbi folyamatokon túl az AVP szerepet játszik a cirkadián ritmus kialakításában is az SCN-nen keresztül (Buijs és mtsai 2003, Nakagawa és Okumura 2010). Továbbá fájdalomcsillapító hatása is van (Koshimizu és Tsujimoto 2009). Az

agykamrákba adott AVP-vel a fájdalomküszöb emelkedése, míg a lokális AVP neutralizációval a fájdalomérzet fokozódása érhető el (Berson és mtsai 1983, Honda és Takano 2009, Yang és mtsai 2007). Az AVP a laterális szeptumhoz (Bielsky és mtsai 2005) és a hippokampuszhoz (Urban 1998) köthető memória és a tanulási folyamatokra is nagy hatással van. Jelentős a szociális interakcióknál kulcsszerepet játszó olfaktorikus memória kialakításában (Engelmann és mtsai 1996), de a térbeli tájékozódáshoz kapcsolható memória folyamatokban is részt vesz (Everts és Koolhaas 1999). A félelemhez köthető tanulási folyamatokban is fontos az AVP (Reed és mtsai 2013, Stoeckert és mtsai 1992), a lábra mért elektromos áramütéssel kiváltott passzív és aktív elkerülési tesztek során pozitívan hat a memóriára (Juszcak és mtsai 1999, Voskresenskaya és mtsai 1999).

3. 3. 2. A vazopresszin szerepe a stressz-folyamatokban

Bár nagy koncentrációban az AVP önmaga is képes ACTH elválasztást fokozására, fiziológiai szerepe a CRH hatásának erősítése (Antoni 1993, Turkelson és mtsai 1982). Az adenohipofízis V1b receptorain kötődő AVP a foszfolipáz C β – diacilglicerol / inozitoltrifoszfát - proteinkináz C (PLC β -DAG/IP3-PKC) útvonalon keresztül fejti ki hatását. Az IP3 sejten belül Ca^{2+} felszabadulást okoz, ami az ACTH ürülését eredményezi. Emellett a DAG – a CRH receptorokhoz hasonlóan – PKC enzimet is aktivál, ami szintén fokozza az ACTH elválasztást (Abou-Samra és mtsai 1987). Ugyanakkor, míg a CRH stressz során fokozza a POMC gének átíródását is, addig az AVP hasonló genomiális hatással nem rendelkezik (Zapletal és mtsai 2013).

Bár a PVN és a SON magnocelluláris sejtjei is nagy mennyiségben termelnek AVP-t, a stressz-folyamatokban elsősorban parvocelluláris neuroszekréciós sejteknek van jelentősége. A **magnocelluláris** sejtek által termelt AVP a szisztémás keringésbe jut, és a vesék működésére hat. Mivel stressz folyamatok során a plazma AVP-szint nem mutat jelentős változást, feltételezhető a centrális (parvocelluláris) és perifériás (magnocelluláris) AVP elválasztás disszociációja (Wotjak és mtsai 1998). Glükokortikoid receptoraik alacsony száma miatt ezen sejtek AVP termelését a glükokortikoid visszacsatolás nem befolyásolja (Laguna-Abreu és mtsai 2007).

A PVN **parvocelluláris** sejtjei elsősorban CRH-t termelnek, de a magon belül laterálisan és dorzálisan elhelyezkedő sejtcsoportok AVP-t is koexpresszálnak (Whitnall

és mtsai 1987). A két hormon egyazon szekréciós granulomokban tárolódik (Hisano és mtsai 1987). Patkányokban nyugalmi állapotban az AVP-t koexpresszáló és a kizárólag CRH-t termelő sejtek aránya 50-50%, ami stresszfolyamatoktól függően eltolódhat (Whitnall és mtsai 1987). Az AVP-nek az elhúzódó stresszfolyamatok szabályozásban lehet nagyobb jelentősége (Lightman és mtsai 2002, Ma és Lightman 1998, Scott és Dinan 1998). Krónikus stressz során az állatok szervezete állandóan magas kortikoszteron szinteket fenntartva készül fel az őt érő következő negatív ingerre. Ezzel párhuzamosan a hipotalamuszban a CRH:AVP arány eltolódik az AVP javára, mely kevésbé érzékeny a glükokortikoid negatív visszacsatolására (Aguilera 1994, Fuchsl és mtsai 2013, Ma és mtsai 1999, Sapolsky és mtsai 1984). Ez segít fenntartani a HHM tengely működését a krónikus stressz esetén megfigyelhető magas glükokortikoid plazma-szintek mellett is. Ez az elmélet mellékvese irtott (adrenalektomia, ADX) patkányokban megfigyelhető AVP - CRH koexpresszió fokozódáson alapult, mely eljárás a hiányzó negatív visszacsatolás miatt a krónikus stresszhez hasonlóan aktiválja a HHM tengelyt (Bondy és mtsai 1989). Később számos más krónikus stresszor alkalmazása során is megfigyelték ezt a jelenséget (Makara és mtsai 2004). A változások a PVN-be, vagy a hippocampusba juttatott GR agonistákkal visszafordíthatók voltak (Albeck és mtsai 1994, Kovacs és mtsai 1986). A hippocampusz-hipotalamusz kapcsolatok sérülése, átvágása szintén megnövekedett AVP termeléshez vezetett (Herman és mtsai 1992, Sapolsky és mtsai 1989).

3. 3. 3. A vazopresszin szerepe betegségekben

AVP hiányában diabetes insipidus alakul ki. Fő tünetei az erős szomjúságérzet (polydipsia) és fokozott vizeletürítés (poliuria), ami könnyen a szervezet dehidratálódásához vezet. Ritka betegség, gyakorisága 3:100.000 (Saborio és mtsai 2000). Kiváltó oka szerint két fő változata különíthető el: a renális (nefrogén) típus, melynél bár az AVP termelés normális, a nefronok hibás működése miatt jelentkeznek a tünetek, és a gyakoribb centrális diabetes insipidus, ami esetén az AVP termelődés szenved valamilyen okból károsodást. Az esetek két harmadában az ok a hipofízis nyél sérülése (fejsérülés, orvosi műhiba, tumor), míg az esetek negyedében örökletes, vagy autoimmun betegség áll a háttérben. Ritkábban kialakulhat túlzott alkoholizmus, vagy

drogfüggőség esetén is, de szülés után megjelenő formája is ismert (Kalelioglu és mtsai 2007).

Az AVP a stressz-tengely egyik központi szabályozójaként a stresszel kapcsolatos betegségekben is szerepet játszhat (Surget és Belzung 2008). A HHM tengely hiperaktív működése közrejátszhat az unipoláris **depresszió** (major depressive disorder, MDD) kialakulásában. Ezt erősíti, hogy a kórállapot gyakran alkalmazott preklinikai modellje különféle enyhe stresszorok hosszú időn keresztül történő ismétlése (krónikus enyhe stressz, chronic mild stress, CMS). A depresszó emberekben gyakran társul megemelkedett AVP plazma-szintekkel (de Winter és mtsai 2003, Inder és mtsai 1997, van Londen és mtsai 1997). Unipoláris depressziónál az AVP-t expresszáló sejtek száma is több a PVN-ben (Merali és mtsai 2006, Purba és mtsai 1996), megemelkedett AVP mRNS szintek mérhetők (Meynen és mtsai 2006) és az agyalapi mirigy is fokozott AVP érzékenységet mutat. Az unipoláris depresszió súlyosabb eseteinél, öngyilkossággal próbálkozó személyeknél a plazma AVP szintek korrelálnak a kortizol szintekkel (Brunner és mtsai 2002, Inder és mtsai 1997). A V1b receptor egyik egy pontos-nukleotid polimorfizmusa védő hatásának bizonyult a betegséggel szemben (van West és mtsai 2004). Ezen eredmények alapján kezdett el a Sanofi gyógyszergyár nem peptid V1b receptor antagonistát fejleszteni, mely szájon át alkalmazva is átjut a vér-agy gáton és képes központi idegrendszeri hatások kifejtésére (Griebel és mtsai 2012). Ez a vegyület (SSR149415) preklinikai vizsgálatok során felnőtt állatoknak egyszer adva is csökkentette a HHM tengely aktivációt (Serradeil-Le Gal és mtsai 2005) és valóban hatékonynak mutatkozott a depresszió tesztelésére széles körben alkalmazott magatartási tesztek során (Breuer és mtsai 2009, Overstreet és Griebel 2005).

Az emelt keresztpalló teszt (elevated plus maze, EPM) során mutatott viselkedés alapján tenyésztett LAB (low anxiety, kevésbé **szorongó**) és HAB (high anxiety, erősen szorongó) patkányok esetén a HAB állatok szorongás- és depresszió-szerű viselkedése V1a receptor antagonista alkalmazásával csökkenthető volt (Wigger és mtsai 2004). Továbbá kvantitatív PCR vizsgálatok igazolták, hogy HAB patkányokban az AVP gén túltermelődése figyelhető meg (Landgraf 2006), míg a LAB állatok esetében az AVP gén promóterében megjelenő kieséses pontmutáció eredményezi a csökkent AVP expressziót (Bunck és mtsai 2009). V1a receptor kiütött egerek esetén is csökkent szorongás figyelhető meg (Bielsky és mtsai 2004, Egashira és mtsai 2009), míg a

laterális szeptum területén a V1a receptor túltermelése fokozott szorongást eredményez (Bielsky és mtsai 2005). A laterális szeptumba adott V1a mRNS antisense oligonukleotid (Landgraf és mtsai 1995) és V1a antagonistá (Liebsch és mtsai 1996) a szorongás- és depresszió-szerű tüneteket is csökkentik (Ebner és mtsai 1999). Tehát a szorongást érintő fenotípusos különbségekre részben az eltérő AVP termelés lehet felelős.

Az unipoláris depresszió és szorongásos betegségek tünetei a **PTSD** tüneteivel is jelentős átfedést mutatnak, valamint a HHM tengely működése is hasonlóan változik bennük: a glükokortikoid visszacsatolás gátlása figyelhető meg (Yehuda és mtsai 2006). Újabb kutatások eredményei szerint a PTSD-ben szenvedő veteránok szignifikánsan magasabb plazma AVP szintekkel rendelkeznek, mint a PTSD-ben nem szenvedő veteránok és a háborús traumát át nem élő kontrollok (de Kloet és mtsai 2008).

Kényszerbetegségek esetén is emelkedett AVP szinteket figyeltek meg mind a vérplazmában, mind az agy-gerincvelői folyadékban (Altemus és mtsai 1992).

Bár unipoláris depresszió **Alzheimer kóros** betegekben is kialakul (Proitsi és Powell 2012, Starkstein és mtsai 2005), utóbbi betegség velejárójaként a csökkent AVP-termelés jellemző. Posztmortem vizsgálatok eredményei alapján Alzheimer kór következtében több agyterületen (agykéreg, hippocampus, nucleus accumbens) is AVP-szint csökkenés mérhető (Goudsmit és mtsai 1992, Mazurek és mtsai 1986). Vélhetőleg az amiloid- β plakkok mellett (és következtében) az alacsony AVP produkció is hozzájárul az Alzheimer kórral járó memóriadeficit kialakulásához. A centrálisan adott AVP állatkísérletek során védő hatásának bizonyult a amiloid- β fehérje indukálta memória romlással szemben (Pan és mtsai 2013).

Skizofrén betegek esetében az egészséges kontrollokhoz viszonyítva szintén alacsonyabb AVP szintek mérhetők (Elman és mtsai 2003), és a proAVP előmolekulából szintetizálódó neurofizin felszabadulása is kisebb (Linkowski és mtsai 1984). Skizofrén páciensekben diabetes insipidus is gyakrabban alakul ki, akár a betegek negyedénél is diagnosztizálható (Vergheze és mtsai 1996). Csökkent AVP termelés antipszichotikum kezelés alatt álló betegeknél is megfigyelhető (Sarai és Matsunaga 1989), és az ozmolalitás változásra válaszként adott AVP szekréciójuk is alacsonyabb, mint az egészséges csoportban (Ohsawa és mtsai 1993). Posztmortem vizsgálatok eredményei alapján a skizofrén betegek temporális agykérgében is alacsony

AVP szintek mérhetők (Frederiksen és mtsai 1991). A fenti eredményekre alapozva skizofrén betegeket AVP kezelésnek vetettek alá, ami csökkentette a pozitív tünetek (pszichotikus állapotok, hallucinációk) gyakoriságát (Bakharev és mtsai 1984). Az intramuszkulárisan 20 napon keresztül adott AVP javította a memória funkciókat, és egyéb negatív tüneteket (szociális visszahúzódás) is csökkentett (Brambilla és mtsai 1989).

3. 3. 4. Vazopresszin hiányos Brattleboro patkányok

3. 3. 4. 1. A Brattleboro törzs eredete

A **Brattleboro patkány**törzs több, mint 50 éve egy véletlen autoszómális recesszív mutáció révén alakult ki a Long Evans törzsből Nyugat-Brattleboróban (Sawyer és mtsai 1964, Valtin 1982). Az AVP gén neurofizin régiójában (10. ábra) a – G₃₂₆ –os pozícióban bekövetkező deléciónak miatt elcsúszik a leolvasási keret (Schmale és Richter 1984), a neurofizin és a C-terminális glikoprotein közötti hasítási hely eltűnik, és egy polilizin farok is kapcsolódik a prekursor molekula végére. Ilyen változások mellett a prepromolekula nem képes kijutni az endoplazmatikus retikulumból, az AVP nem vágódik ki, és a végeredmény a fiziológián aktív AVP hiánya (Schmale és mtsai 1984). A fokozott vízfogyasztás (diabetes insipidus) esetükben is megjelenik, így genotípusuk egyszerű vízméréssel megállapítható (Trinh-Trang-Tan és mtsai 1982). Ez a törzs az AVP más biológiai folyamatokban betöltött szerepének tanulmányozására is alkalmas (Zelena és mtsai 2003).

A Brattleboro patkányokon végzett kísérletek eredeti kontrolljai a Long Evans törzs egyedei voltak, viszont az eltelt több mint 50 év során a két törzs elválása miatt az AVP termeléstől független élettani-viselkedésbeli különbségek is megjelenhettek közöttük, melyek megnehezítik az ezen összehasonlításból származó eredmények helyes interpretációját. Bár AVP termelés szempontjából az AVP-hiányos homozigóta recesszív di/di állatok (AVP-) legmegfelelőbb kontrollja a homozigóta domináns +/+ genotípus, a gyakorlatban elterjedt a mutációt egyetlen recesszív allél formájában hordozó heterozigóta di/+ -os állatok kontrollként való használata (AVP+). Ugyan utóbbiak AVP szintje kicsit alacsonyabb, mint a homozigóta domináns egyedeké, ez is megfelelő só- és vízháztartást biztosít, és más fenotípusos eltérések sem figyelhetők meg a +/+ és di/+ genotípusok között. Előnyük, hogy megfelelő tenyésztés mellett

ugyanazon alomból származnak, mint az AVP-hiányos állatok (AVP-), így egyéb genetikai eltérések és eltérő anyai hatások nem befolyásolják az eredményeket (Bohus és de Wied 1998). Korábbi kísérleteink azt mutatták, hogy a normális AVP termelésű heterozigóta, és az AVP-hiányos nőstények anyai viselkedése, utódgondozása jelentősen eltér egymástól (Fodor és mtsai 2012), ami hatással lehet az utódok felnőttkori viselkedésére is (Zelena és mtsai 2004). Az AVP-hiányos anyák csökkent utódgondozásából adódó eltérések kiszűrése érdekében a kísérletek során használt AVP-hiányos Brattleboro patkányok heterozigóta anyá és homozigóta recesszív apa párosztatásából származnak, így az utódok 50%-a heterozigóta (AVP+), 50%-a AVP-hiányos homozigóta (AVP-). A felnőtt állatok genotípusának elkülönítése az állatok 5-6 hetes korában történik vízfogyasztás mérésével, ami az AVP- állatoknál jelentősen nagyobb (Trinh-Trang-Tan és mtsai 1982). Elválasztás előtti korban lévő állatoknál a vízfogyasztás mérésére nincs lehetőség, náluk a hipofízis AVP szintjének radioimmunoassay (RIA) mérése informatív.

A világon egyedülálló módon laboratóriumunkban hozzáférhetők $+/+$ állatok is, melyeket megfelelő tenyésztéssel alakítottunk ki. Két heterozigóta állatot összepárosztatva az AVP-hiányos utódok vízméréssel elkülöníthetők, míg a fennmaradó ismeretlen (kevert $+/+$ és $di/+$ genotípusú) egyedeket di/di állatokkal keresztezve, ha a kellően nagyszámú utód közt nincs egy di/di genotípusú állat se, akkor a vizsgált szülő $+/+$ genotípusú. A $+/+$ párokat külön tenyészvonalként tartjuk fenn, de minden tenyészpár frissítéskor visszakeresztezzük a heterozigóta vonallal. A V1b antagonistá és AVP antiszérumos vizsgálataink során ezeket a családokat használtuk.

3. 3. 4. 2. A stressz-tengely működése Brattleboro patkányokban

A Brattleboro patkányok az AVP krónikus stressz-folyamatok szabályozásában betöltött szerepének tanulmányozása céljából kerültek a laboratóriumunkba. Kísérleteink során azonban a Brattleboro patkányaink és a normál AVP termeléssel bíró kontrolljaik stressz-tengely működése nem különbözött egymástól számottevően (Makara és mtsai 2004). A különböző genotípusú egyedek hasonló testsúly, csecsemőmirigy és mellékvese méret csökkenést, POMC mRNS és kortikoszteron szint növekedést produkáltak mind mozgáskorlátozással (Zelena és mtsai 2004), mind morfin megvonással (Domokos és mtsai 2008), mind streptozotocin-indukálta

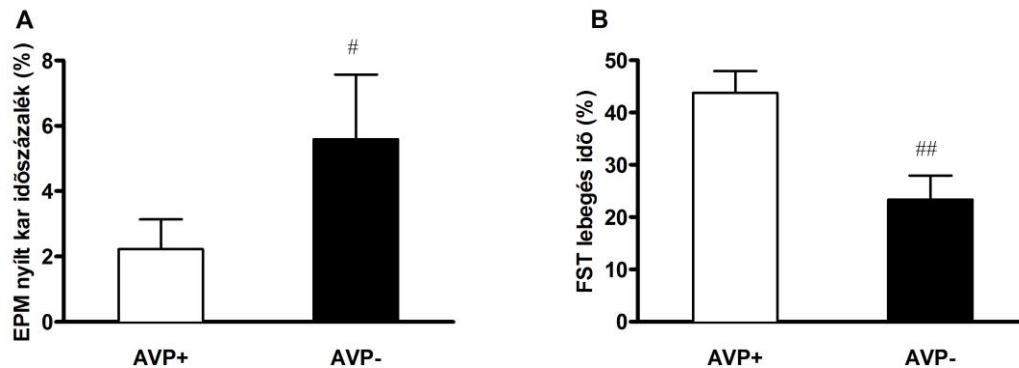
cukorbetegséggel (Zelena és mtsai 2006) előidézett 2 hétig tartó krónikus stressz esetén (Makara és mtsai 2012). Felmerülhet azonban a kérdés, hogy hosszabb ideig tartó stresszorok szükségesek az AVP hatásának előtérbe kerüléséhez, ezért első bemutatásra kerülő kísérlet sorozatunkban ezt a lehetőséget vizsgáltuk meg 5 héten keresztül végzett CMS alkalmazásával.

Bár a krónikus stresszben nem bizonyult fokozottan fontosnak az AVP szabályozó szerepe, de az ennek kapcsán vizsgált akut stresszorok esetén jelentős különbséget figyeltünk meg az AVP-hiányos és kontroll állatok HHM tengely aktivitásában (Domokos és mtsai 2008). Ezért szisztémásan megvizsgáltunk számos, egymástól számos jellemvonásában eltérő akut stresszort (Zelena és mtsai 2009) és azt találtuk, hogy az AVP stressz-tengely szabályozásában betöltött szerepe erősen stresszor függő. Az ACTH és kortikoszteron termelésük alapján az AVP-hiányos patkányok három különböző módon reagáltak az őket ért stresszorokra: morfin injekció, agresszív kontaktus, mozgáskorlátozás esetén mindkét hormon csökkent növekedést mutatott AVP+ egyedekhez képest. Újdonság stressz, EPM, erőltetett úszás teszt (forced swim, FST), hipoglikémia, lipopoliszacharid (LPS, a bakteriális fertőzés modellje) indukálta immunválasz, hipertóniás só oldat injekció és anafilaxiás sokk esetén bár az AVP-hiányos állatok csökkent az ACTH emelkedést mutattak a kontrollokhoz képest, a kortikoszteron növekedésük normális volt. Szociális elkerülés teszt, lábsokk és éter inhaláció esetén egyik hormon termelése sem különbözött az AVP- és AVP+ állatok között (Zelena és mtsai 2009). Ezen eredményekből azt a legfontosabb következtetést vonhatjuk le, hogy az AVP szabályozó szerepe nem bizonyult összeegyeztethetőnek a korábbi, általánosan elfogadott stresszor csoportosítási rendszerekkel (pl.: erős - gyenge; pszichológiai - fizikai, szisztémás - neurogén, interoceptív - exteroceptív).

3. 3. 4. 3. A Brattleboro patkányok jellemzői

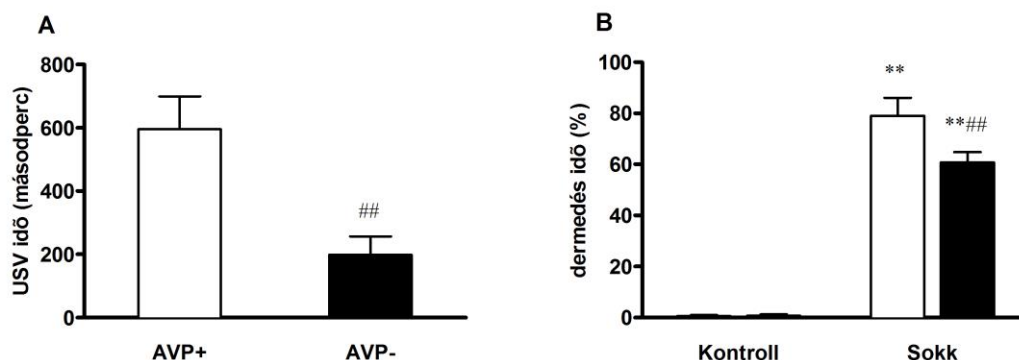
Az AVP HHM tengely szabályozásában (lsd. 3.2) és ezzel együtt az érzelmi zavarokban (lsd. 3.3) betöltött szerepével összhangban az AVP-hiányos Brattleboro patkányokban is kevésbé szorongó és depressziós fenotípus figyelhető meg. A **szorongás** mértékét, szorongás-csökkentő szerek hatékonyságát vizsgáló tesztekben (EPM, open field teszt) az AVP- állatok több időt töltenek a rendelkezésükre álló tér kevésbé védett részein, hasonlóan a szorongás-oldókkal kezelt állatokhoz (11. ábra, A

diagramm). Az FST teszt során (patkányokban a legelterjedtebb módszer gyógyszerek antidepresszáns hatásának tesztelésére) az AVP-hiányos állatok több időt töltenek aktív meneküléssel (küzdés, struggling), mint passzív lebegéssel (floating), mely eltolódás antidepresszánsokkal kezelt kontroll állatoknál is megfigyelhető (Mlynarik és mtsai 2007) (11. ábra, B diagramm).



11. ábra Brattleboro patkányok megemelt keresztpalló teszt során mutatott nyílt kari aktivitása, és erőltetett úszás teszt során mutatott viselkedése. A kettős kereszt az AVP+ csoporttól való eltérést ($\#p<0,05$, $##p<0,01$) jelzik.

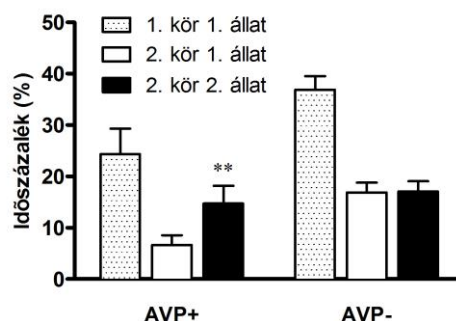
A PTSD modellezésére használt kondicionált félelem teszt (lábsokk) során az AVP-hiányos állatok kevesebb időt töltenek a félelmi reakciót jelző dermedt állapotban (freezing), mint a normális AVP termelésű kontroll társaik. Sokkolást követően a szorongást jelző ultrahangos vokalizációt is hamarabb fejezik be, és kezdik el explorálni környezetüket (12. ábra, A-B diagramm, saját, nem közölt adat) (Stoehr és mtsai 1993).



12. ábra Brattleboro patkányok közvetlenül sokkolás után mutatott ultrahangos vokalizációja, és másnap visszahelyezés során mutatott viselkedése. A csillagok a kontroll csoportoktól való eltérést ($**p<0,01$), a kettős kereszt az AVP+ csoporttól való eltérést ($##p<0,01$) jelzik.

A szorongás és depressziós viselkedést mérő tesztek eredményei arra utalnak, hogy az AVP- állatok szorult körülmények közé kerülve az aktív megküzdési startégiákat részesítik előnyben.

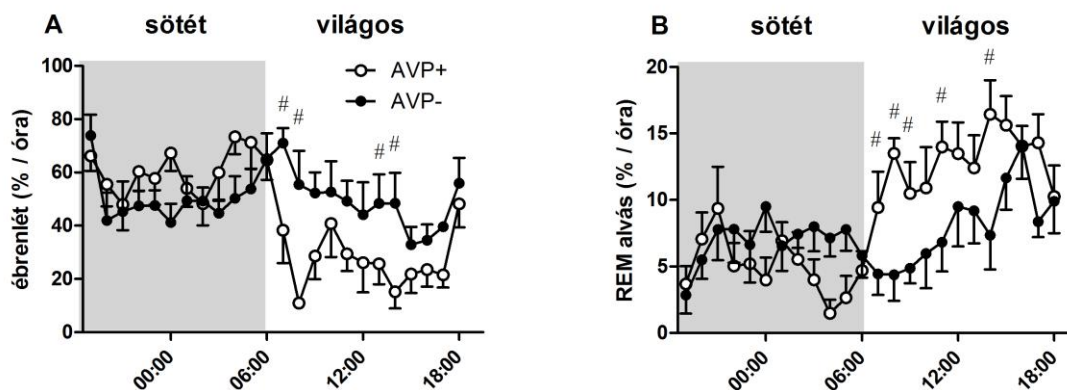
Azt is megállapíthatjuk, hogy az AVP-hiányos állatok összességében aktívabbak, többet mozognak a nyílt tér teszt során (Zelena és mtsai 2009). Ez a magatartás a **tanulás-memória** vizsgálatára irányuló tesztek értékelését is megnehezíti. A tanult tehetetlenség (shuttle box-ban végzett learned helplessness), világos-sötét doboz és a Flinch-ugrás tesztekben az AVP-hiányos állatok fokozott aktivitásuk miatt



13. ábra Brattleboro patkányok szociális diszkrimináció teszt során mutatott viselkedése (1. kör: tanulási fázis; 2. kör diszkrimináció az új (2.) és a korábban már látott (1.) fajtárs között) A csillagok az 1. fajtárral töltött időtől való eltérést jelzik a diszkriminációs fázisban (** $p < 0,01$) (Varga és mtsai 2014).

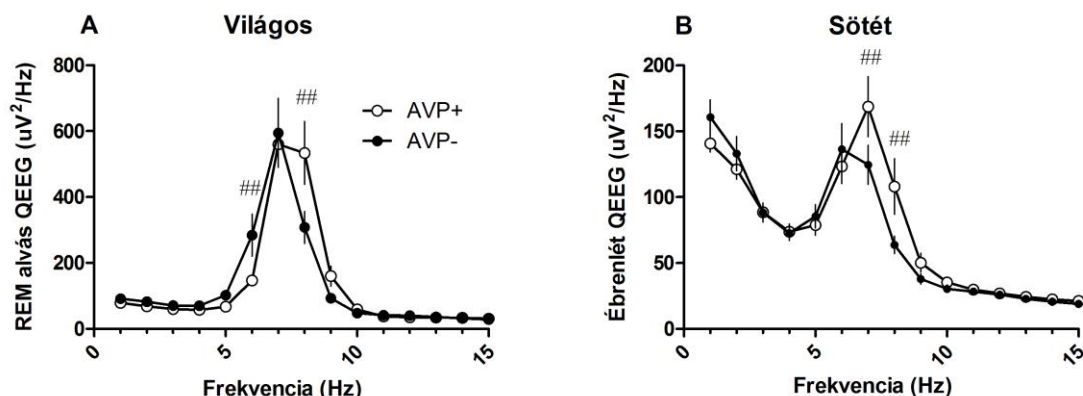
véletlenszerűen több helyes választ adnak kontroll társaiknál (Ambrogio Lorenzini és mtsai 1985, Carey és Miller 1982). Ugyanakkor saját eredményeink szerint az AVP-hiányos állatok menekülési hibája (escape failure) is nagyobb a tanult tehetetlenség modelljében, tehát esetükben a tanulás első kulcslépése (a negatív inger megszakíthatóságának felismerése) sem történik meg tökéletesen (Varga és mtsai 2014). A Brattleboro patkányok csökkent kognitív képességei akut, kevesebb stresszel járó tesztekben jobban szembetűnnek. A szociális diszkrimináció során, ahol a fiatal fajtársak megkülönböztetésében a látás és tapintás mellett a szaglásnak van elsősorban jelentősége, az AVP- állatok szintén gyengébben teljesítenek normális AVP termelésű alomtársaiknál (Varga és mtsai 2014) (13. ábra). A zavart működés microdialízis során a laterális szeptumba juttatott AVP alkalmazásával helyrehozható (Engelmann és Landgraf 1994), de antipszichotikum (pl. clozapine) kezelés is hatékony (Feifel és mtsai 2009).

Brattleboro patkányban az AVP hiány következtében az állatok **circadian ritmusa** is zavart szenved (Murphy és mtsai 1998). Az éjszakai aktív periódus alatt többet alszanak, míg a nappali nyugalmi periódus alatt többet vannak ébren (14. ábra, saját nem közölt EEG adat).



14. ábra Brattleboro patkányok napi ritmusa (Ébrenlét és gyors szemmozgásos alvás) A kettős kereszt az AVP+ csoporttól való eltérést ($\#p<0,05$) jelzik.

Az AVP- állatokban a gyors szemmozgásos alvással (rapid eye movement, REM) töltött idő is lecsökken (40-50%-al), ami AVP adásával helyreállítható (Danguir 1983).



15. ábra Brattleboro patkányok ébrenlleti és gyors szemmozgásos alvás teljesítménysűrűség elemzése (felszíni csavarelektrodák, fronto-parietális EEG elvezetés). A kettős kereszt az AVP+ csoporttól való eltérést ($\#\#p<0,01$) jelzik.

Mivel a REM alvás kulcsszerepet játszik a memória konszolidációban, csökkenésének köze lehet a fentebb részletezett memória zavar kialakulásában. Saját méréseink azt mutatják, hogy a REM alvás és az ébrenlét alatti theta aktivitás is lassulást mutat (15. ábra, saját nem közölt adat). Ez a hullámforma ébrenlét alatt elsősorban aktív viselkedés (felderítés, exploráció) során figyelhető meg. Azaz az AVP-hiányos állatok felderítő viselkedése – figyelme zavart szenved. Utóbbi szintén hozzájárulhat a csökkent tanulási képességekhez és a megfigyelt memória-deficithez. A

theta aktivitásnak a szorongásban is nagy szerepe van. Anxiogén anyagok (pl.: pilokarpin, pentiléntetrazol) növelik, míg anxiolitikus szerek, (pl.: diazepam, klórdiazepoxid) csökkentik a theta frekvenciát (Hoeller és mtsai 2013). Egyes nézetek szerint a theta aktivitás csökkenése a gyógyszerek anxiolitikus hatásának megbízható neurofiziológiai biomarkere (Yeung és mtsai 2013). Elmondhatjuk, hogy az ébrenlét alatt az AVP- állatoknál megfigyelt theta eltérés is egybevág a kevésbé szorongó fenotípussal.

3. 4. Stressz perinatális korban

Az a hit, mely szerint a stresszhez és szorongáshoz köthető anyai érzelmek negatívan hathatnak a magzat fejlődésére (pl.: fejlődési rendellenességek), a folklórban, és kulturális hagyományokban gyökereznek (Paarlberg és mtsai 1995). A tudomány megpróbált választ találni rá, hogy lehetnek-e valós alapjai ezeknek a hiedelmeknek, az anyai stressz és szorongás milyen mértékben befolyásolhatja a terhesség kimenetelét, a csecsemő későbbi fejlődését (Van den Bergh és mtsai 2005). Az eredmények, és a belőlük levont következtetések is sokrétűek. Egyes esetekben az anyai stressz látványosan károsítja a fejlődést (Copper és mtsai 1996, Sarfi és mtsai 2013), más kutatások szerint viszont megkönnyíti az utódok alkalmazkodáson alapuló fejlődését (Del Giudice 2012, DiPietro és mtsai 2006).

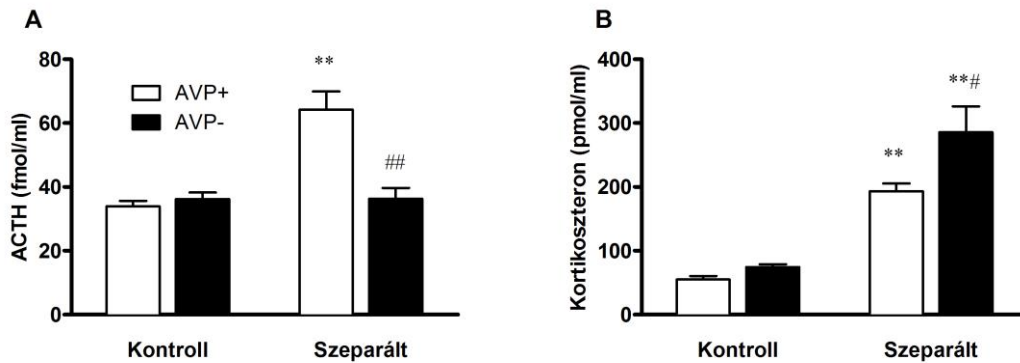
Az eredmények jobb megértéséhez szükséges a magzati és születés körüli (perinatális) stressz során lejátszódó élettani folyamatok, elsősorban a HHM tengely működésének alapos feltérképezése. A HHM tengely csak érési folyamaton átesve nyeri el a korábbi fejezetekben részletesen bemutatásra került felnőttkori formáját (Penke és mtsai 2001). Működése az egyedfejlődés során jelentősen változik, és érzékenységét a magzati, perinatális életesemények erősen befolyásolják.

Az anyát ért negatív hatások következtében fokozott magzati stressz-tengely aktivitás kisebb születési súlyt (Soberanes-Chavez és mtsai 2013, Wadhwa és mtsai 1993, Witt és mtsai 2014), fejlődési rendellenességet okozhat (Provost és mtsai 2013) és figyelmi zavarokat eredményezhet (Davis és Sandman 2010), de magas vérnyomás, hiperlipidémia és cukorbetegség kialakulásához is hozzájárulhat (Barker és Fall 1993,

Seckl 1997). A tartósan megemelkedett glükokortikoid szintek miatt a negatív visszacsatolás kapcsán érintett agyterületek GR és MR receptorai zavart szenvednek.

A születés körüli időszakban rágcsálóknál magas kortikoszteron szint mérhető a HHM tengely fokozott működése és az alacsony CBG szint miatt, ami a világra jövetelt követő pár nap alatt lecsökken, majd két héten át alacsonyan marad (Martin és mtsai 1977, Walker és mtsai 1986). Mivel ezen időszak alatt a különféle stresszorok a felnőttben mérhető aktivációhoz képest csak mérsékelt HHM működést váltanak ki, stressz hiporeszponzív periódus névvel (**SHRP**) illetik ezt az időszakot (Sapolsky és Meaney 1986, Walker és Vrana 1993). Hasonló jelenség csecsemőknél is megfigyelhető és fontos a szerepe a HHM tengely érésében (Gunnar és Donzella 2002). A csökkent stressz-reaktivitás idő és stresszor függő (Walker et al. 1991). Bár létrejöttének mechanizmusa nem pontosan tisztázott, de kialakulásában anyai gátló faktorok (Levine 2002), a születés előtt megemelkedett kortikoszteron szint gátló visszacsatolása (Sapolsky és Meaney 1986, Walker és mtsai 1986) és a hipotalamusz hormonjainak csökkent termelődése és transzportja is közrejátszik (Suchecki és mtsai 1993). Az utóbbit támasztja alá, hogy perinatálisan a CRH gén nem expresszálódik a felnőtteknél látott mértékben (Grino és mtsai 1989). PhD munkám során a hipofízis CRH érzékenységeinek korfüggő változásait is megvizsgáltuk. A CRH-val ellentétben az AVP expresszió nagyon korán érett formát mutat. Azaz az SHRP alatt az AVP lehet az ACTH elválasztás fő szabályozója.

Valóban, perinatálisan AVP hiányában nem figyelhető meg ACTH növekedés a stressz-folyamatok során (16. ábra) (Grino és Burgunderf 1992, Muret és mtsai 1992), tehát feltehető, hogy ekkor a stressz-tengely fő szabályozója az AVP (Avishai-Eliner és mtsai 1995, Levine 2002).



16. ábra 24 órás anyai elválasztás hatása perinatális korú Brattleboro patkány ACTH és kortikoszteron termelésére A csillagok a kontroll csoporttól való eltérést (*p<0,05, **p<0,01), a kettős keresztek az AVP+ csoporttól való eltérést (#p<0,05, ##p<0,01) jelzik. (Zelena és mtsai 2008)

Ez azért lényeges, mert a perinatális stresszoroknak is számos késői negatív következményük lehet. Például perinatális korban alkalmazott dexametozán kezelés (Poimenova és mtsai 2010), bakteriális fertőzés (Wynne és mtsai 2011) több agyi struktúrában is hosszú távú GR receptor csökkenést, és a megnövekedett stressz-tengely aktivitás következtében szorongó fenotípus megjelenését okozza. Mivel előző kísérletek során csak perinatális korú állatokat alkalmaztunk, így a korspecifikus hatás igazolásához hiányzott a direkt felnőtt-gyerek összehasonlítás ugyanazon stresszorok esetén, amit a PhD munkám során végeztünk el. Annak kizárására, hogy a Brattleboro patkányokban megfigyelhető speciális jelenségről lenne szó, farmakológiai kezeléssel (V1b antagonistá SSR149415), illetve AVP ellenanyag alkalmazásával is igazoltuk eredményeinket.

3. 5. ACTH – kortikoszteron disszociáció

A stressz-tengely működésének vizsgálata során több stresszor esetén is azt tapasztaltuk, hogy a kortikoszteron szintek nem minden esetben követik az ACTH szintek változásait (Zelena és mtsai 2011), ami perinatális korban a legszembetűnőbb (16. ábra).

Mivel az ACTH elválasztást a kortikoszteron növekedés némi késéssel követi, az esetek egy részénél a disszociáció hátterében csupán a mintavételezés időzítésének helytelen megválasztása állhat (Engeland és mtsai 1977). A HHM tengely különféle hormonjai emberekben is időbeli eltolódással mutatnak csúcsértékeket (Keenan és mtsai 2004). Ennek kizárása a különböző stresszorok esetén jelentkező hormon-szint változásokat nyomon követő időgörbe felállítására is sort kerítettünk felnőtt (Zelena és mtsai 2009), és perinatális korú (Zelena és mtsai 2008) állatoknál is. A legrövidebb vizsgált időpont azonban 1 óra anyai elválasztás volt, ami felvetette annak a lehetőségét, hogy egy még rövidebb behatási idő alatt láthattunk volna különbséget. PhD munkám során erre a kérdésre is kerestem a választ 10 perc anyai elválasztás alkalmazásával. Az anyai elválasztás kiterjedten használt a perinatális korú állatok szorongásának vizsgálatára (Millstein és Holmes 2007). Ezek a kis állatok elsősorban ultrahang kibocsátás útján kommunikálnak anyjukkal. Ahogy csecsemők esetén a sírás, kis patkányok esetén az ultrahang kibocsátás tölti be azt a funkciót, mellyel jelezik szükségletüket a szülők felé (fájdalom, hideg, éhség). Az ultrahang kibocsátás időtartama, és a szorongás mértéke között egyértelmű kapcsolat van: azonos idő alatt kevésbé szorongó, kevésbé stresszes állat kevesebb ultrahangot bocsát ki. Ezért a hormonszintekkel párhuzamosan a kibocsájtott ultrahang mennyiségét is tanulmányoztuk.

Az ACTH-kortikoszteron disszociáció témájában további mérés technikai probléma lehet, hogy az irodalomban általában alkalmazott módszerek az összes glükokortikoid szinteket mérik a hatékony szabad szintek helyett és a CBG szintek eltérései jelentős összeglükokortikoid szint különbségekhez vezethetnek a szabad szintek eltérései nélkül. Ezért összehasonlítottuk az AVP-hiányos és kontroll állatok CBG szintjeit is.

Elképzelhető, hogy az AVP- állatokban tapasztalható minimális ACTH-szint emelkedés a mellékvese-kéreg fokozott ACTH érzékenysége következtében ugyanolyan kortikoszteron választ képest kiváltani, mint kontroll, sokkal erőteljesebb ACTH szekréciót mutató társaikban. Ennek tanulmányozására in vitro mellékvese szekréciós vizsgálatokat végeztünk.

Ha kizárjuk a mérési módszerek következtében tapasztalható ACTH-kortikoszteron disszociációt, akkor fel kell tételeznünk egy ACTH független glükokortikoid szekréció meglétét (Bornstein és mtsai 2008). A glükokortikoid elválasztás serkentésére legkézenfekvőbbnek a stressz során szintén aktiválódó mellékvese-velőből származó katekolaminok tűnnek (Edwards 1997, Holzwarth és mtsai 1987). Valóban, valamennyi katekolamin receptor megtalálható a mellékvese-kéreg kortikoszteron termelő sejtjein (Sundaresan és mtsai 1987), de talán legjelentősebbnek a β receptorok tűnnek (Holzwarth és mtsai 1987, Mazzocchi és mtsai 1997). Mivel a 10 napos AVP-hiányos Brattleboro patkányban praktikusán ACTH elválasztás emelkedése nélkül valósul meg a stresszorok hatására létrejövő kortikoszteron-szint emelkedés (Zelena és mtsai 2008), a para-adenohipofízeális neuroendokrin szabályozás in vivo vizsgálatára nagyon jó modell-állatként szolgál (vonatkozó irodalmi adatok kizárólag in vitro kísérleteken alapulnak). Ha az ezen állatokban alkalmazott antagonist (pl β blokkoló propranolol) kivédi a stresszor okozta kortikoszteron emelkedést, akkor a tanulmányozott receptor részt vesz a kortikoszteron szekréció endogén fokozásában.

A glüko- és mineralokortikoidok nemcsak szerkezetileg nagyon hasonlóak és versengenek a kötőfehérjékért, hanem hatásukat is ugyanazokon a receptorokon keresztül képesek kifejteni. Felmerült ezért, hogy a glüko-és mineralokortikoidok együtt követhetik az ACTH szinteket. Ennek igazolására az ACTH és kortikoszteron szintek mellett egy stressz-kísérletben az aldoszteron szintjét is megmértük.

4. Célkitűzések

1. Hosszabb távú **krónikus stressz** (5 hét CMS) esetén bizonyítani az AVP HHM tengely szabályozásában betöltött szerepét felnőtt állatokon (lsd. 3.4.2.).
2. Direkt felnőtt-gyerek összehasonlításban kimutatni az AVP HHM tengely szabályozásában betöltött **korfüggő szerepét** (lsd. 4.)

A. Brattleboro patkányban (bakteriális fertőzés modellje - LPS, hipoglikémia).

B. V1b antagonistá segítségével

C. AVP antiszérum alkalmazásával

A hipofízis korfüggő CRH érzékenysége in vitro rendszerben.

3. Az **ACTH független glükokortikoid szekréció** (lsd. 5)

Kizárandó jelenségek:

A. Az ACTH és kortikoszteron szekréció eltérő időbeli lefutása (10 perces anyai elválasztás- szorongás vizsgálatára USV).

B. A szabad glükokortikoid szintek becsléséhez CBG mérés.

C. A mellékvese-kéreg ACTH érzékenységének in vitro összehasonlítása kor és genotípus szerint.

Lehetséges mechanizmusok:

A. Mellévesevelő katekolaminok, elsősorban β adrenoreceptor szerepének in vivo és in vitro vizsgálata.

B. Kortikoszteron- és aldoszteron-szintek korfüggő összehasonlítása AVP-hiányos és kontroll állatokban (hipoglikémia).

4. Mivel legutolsó eredményeink messze túlmutattak az AVP szabályozó szerepén, azért a stresszorok **glüko- és mineralokortikoid elválasztásra** gyakorolt **korfüggő** hatásait Wistar patkányokban vizsgáltuk tovább

A. Hormon-szint mérések két stresszor alkalmazása után (LPS, hipoglikémia)

B. Korfüggő eltérések vizsgálta a receptorok-enzimek szintjén (PCR, immuncitokémia).

5. Módszerek

5. 1. Állatok

Kísérleteinkhez saját tenyészetből (MTA Kísérleti Orvostudományi Intézet, a kolónia eredete: Harlan, Indianapolis, USA) származó Brattleboro (17. ábra) és a Charles Rivertől származó Wistar patkányokat használtunk (7-12 hetes felnőtt hímek, és 7-8, vagy 10 napos kölykök). Az állatokat standard körülmények között tartottuk (21-23 °C-os hőmérséklet, 50-70% páratartalom, 12 órás világos-sötét ciklusok mellett, fény



17. ábra Brattleboro patkányok.

bekapcsolása 07.00 órakor), patkánytáp (Charles River, Magyarország) és ivóvíz igény szerint állt rendelkezésükre. Az állatok ketrecét normálisan hetente almozzák, viszont az AVP- állatok fokozott vizeletürítése miatt ezt heti 3 alkalomra növeltük. A ciklusfüggő változások befolyásának elkerülése érdekében kizárólag hím állatokat használtunk.

Mivel a homozigóta recesszív genotípusú Brattleboro patkányok (AVP-) homozigóta domináns és heterozigóta (AVP+) társaiktól eltérően egy természetes mutáció következtében képtelenek az AVP termelésre, az AVP-hiány születésüktől kezdve életük végéig jelen van, így annak kialakítása nem igényel stresszel járó külön beavatkozást. (pl. AVP antagonisták, immunneutralizáció). Brattleboro patkányokon végzett stressz-kísérleteink során külön vizsgáltuk a kor, a genotípus és a stressz hatását (8 csoport). Mivel egyes korfüggő különbségek túlmutattak az AVP szabályozó szerepén, Wistar patkányokon is megvizsgáltuk a stresszorok korfüggő hatásait (4 csoport).

Állatházunk működtetését, és ott folyó kísérleteinket az Európai Unió állatkísérletekre vonatkozó 2010 szeptember 22-én hatályba lépett irányelvei szerint (2010/63/EU), a Fővárosi Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás engedélyével és a Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság felügyeletével végezzük.

Kísérletek során a statisztikai elemzések helyes elvégzéséhez nélkülözhetetlen minimális állatszámmal dolgoztunk.

5. 2. Krónikus enyhe stressz felnőtt állatokban

A CMS kialakítása során felnőtt AVP+ és AVP – állatokon különböző enyhe stresszorokat alkalmaztunk 5 héten keresztül napi 2 alkalommal. A stresszorok között szerepelt 30 illetve 60 perces mozgáskorlátozás, nedves/megdöntött doboz, egerektől származó alom, a szokásostól elért fényviszonyok alkalmazása, túlszűfoltás (3 állat egy dobozban), egyedüli elhelyezés 2-48 órán keresztül, vízmegvonás (18 óra), éheztetés (24 óra), wire suspension (izomerő mérésére használt teszt), rotarod (motoros koordináció mérésére szolgáló teszt); EPM, FST. Az állatok farkából a stresszelés megkezdése előtt vérmintát vettünk. Az állatokat 24 órával az utolsó stimulust követően dekapitáltuk. A vérmintákból ACTH és kortikoszteron szint mérést végeztünk RIA-val.

5. 3. A HHM tengely szabályozásának korfüggő összehasonlítása

5. 3. 1. Lipopoliszacharid kezeléssel kiváltott HHM aktiváció

5. 3. 1. 1. Brattleboro patkányok

A különböző korú (felnőtt és 10 napos) és genotípusú (AVP+ és AVP-) állatok random LPS (100 µg/1 ml/kg fiziológiás só oldatban; SIGMA, O55:B5, intraperitoneálisan (ip) adva) vagy kontroll (0,9%-os só oldat) kezelésben részesültek (Allen és mtsai 1994). A perinatális korú állatokat a kezelés után szagtalan filctollal történt jelölést követően dekapitalásig visszahelyeztük szüleik mellé az alomba. Az injekciót követő 120. percben az állatokat dekapitáltuk, a vérplazmából ACTH és kortikoszteron, renin és aldoszteron mérések, a hipofízis homogenizátumból AVP mérés történt.

5. 3. 1. 2. V1b antagonistá

Normál AVP-jű +/- állatokon V1b antagonistá előkezelést alkalmaztunk. 15 perccel az LPS kezelés előtt ip V1b antagonistá (SSR149415 10mg/1ml/kg), vagy kontroll (0,9%-os só oldat és pár csepp Tween 80) (Serradeil-Le Gal és mtsai 2002)

injekciót adtunk. Az injekciót követően a kicsiket szagtalan filctollal megjelöltük, és szüleik mellé visszahelyeztük. A mintagyűjtés és mérés az előző fejezetben leírtaknak megfelelően történt.

5. 3. 1. 3. AVP antiszérum perinatális korban

Normál AVP-jű +/- állatoknak 15 perccel az LPS kezelés előtt ip AVP antiszérum (20 µl 40 mg/ml oldatból) vagy kontroll (Normál nyúl szérum; NRS) injekciót adtunk (Nagy és mtsai 1991). Az injekciót követően a kicsiket szagtalan filctollal megjelöltük, és szüleik mellé visszahelyeztük. A mintagyűjtés és mérés az előző fejezetben leírtaknak megfelelően történt. Mivel az AVP antiszérum korlátozott mennyiségben állt rendelkezésre, felnőtt állatokat nem kezeltünk.

5. 3. 2. Inzulin-hipoglikémia által okozott HHM tengely aktiváció

Az inzulin indukálta hipoglikémia felnőtt korban is jól vizsgálható, a mindennapi életben is előforduló, természetes stresszor. A vele létrehozott élettani állapot humán betegségeknél is megfigyelhető (pl cukorbetegség), azok modellezésére alkalmas.

5. 3. 2. 1. Brattleboro patkányok

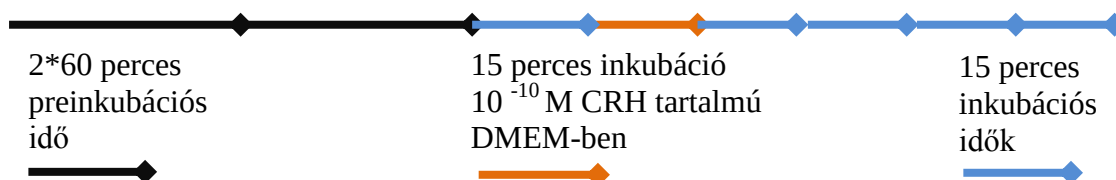
24h (felnőtt) illetve 4h (10 napos) éheztetést követően a kezelt állatok Actrapid injekciót (gyors hatású inzulin; 3NE/2ml/kg, ip), míg a kontroll állatok fiziológiás só oldat injekciót kaptak. Az Actrapid lecsökkenti a vér glükóz szintjét, ami hormonális stressz-választ vált ki (Muret és mtsai 1992).

A különböző genotípusú felnőtt és perinatális korú állatok a különböző kezelési csoportokba random lettek beosztva (összesen 8 csoport, 10-15 állat / csoport). A perinatális korú állatokat a kezelés után szagtalan filctollal történt jelölést követően dekapitálásig visszahelyeztük szüleik mellé az alomba. 90 perccel a kezelést követően dekapitáltuk az állatokat, a vérplazmából ACTH és kortikoszteront, kispatkány hipofízis homogenizátumból AVP-t mértünk.

5. 3. 3. Hipofízis CRH érzékenysége in vitro rendszerben

A felnőtt illetve 10 napos dekapitált állatok hipofízisét 4 darabra szeleteltük és 1 ml 2,5 g bovin szérum albumin-t (BSA) tartalmazó 37 °C-os Dulbecco Minimal Essential Medium-ban (DMEM) 95%O₂-5%CO₂ gázkeverék alkalmazása mellett 2x1 óra időtartamban előinkubáltuk.

A hipofízisekről a preinkubációs idő után a médiumot 15 percenként összegyűjtöttük, majd frissre cseréltük összesen 6-szor. A második 15 perces szakaszban a szerveket CRH (10⁻¹⁰M) tartalmú DMEM-ben inkubáltuk. Az egyes frakciók után a szervekről a médiumot eltávolítottuk, centrifugáltuk (3000g, 5 perc), majd a felülúszót az ACTH szintek méréséig -20 °C-on tároltuk (18. ábra).



18. ábra A mellékvese inkubálás protokollja.

5. 4. ACTH független glükokortikoid szekréció

5. 4. 1. Eltérő időbeli lefutás – 10 perces anyai elválasztás

5. 4. 1. 1. Hormon szintek

Kísérleteink során az egyazon alomból származó 7-8 napos AVP+ és AVP- állatokat 10 percre elválasztottuk szüleiktől, és egy magas falú alom nélküli üvegedénybe (2l-es főzőpohár) helyeztük őket, ahol a szülők és az alomtársak hiánya mellett az üveg hideg fala jelentette a fő stresszort. 10 perc után az állatokat dekapitáltuk, vérüket ACTH és kortikoszteron mérés, hipofízisüket genotípus meghatározás céljából (AVP szintek) Eppendorf csövekbe gyűjtöttük.

A kapott eredményeket V1b kezeléssel AVP+ állatokon is megerősítettük. 30 perccel az anyától való elválasztás előtt az állatokat ip V1b antagonistá (SSR149415 10mg/1ml/kg), vagy kontroll (0,9%-os só oldat és pár csepp Tween 80) (Serradeil-Le Gal és mtsai 2002) injekcióval kezeltük. Az injekciót követően a kicsiket szagtalan filctollal megjelöltük, és szüleik mellé visszahelyeztük. A mintagyűjtés és mérés az előzőek szerint történt.

5. 4. 1. 2. *Ultrahang kibocsátás teszt*

A kísérleteink alatt a 10 perces elválasztások során készítettünk felvételeket. Az ultrahang érzékelése frekvenciaosztásos ultrahang detektorral történik, mely az érzékelt ultrahangot frekvenciájának tized részére csökkentésével valós időben hallhatóvá alakítja. Az átalakított hangot egyszerű számítógépes hangkártya rögzíti, az Audacity nevű szabad felhasználású hangrögzítő program alkalmazásával. Mivel az állatok által kibocsátott ultrahangon túl zajok ultrahang komponensei is jelen lehetnek (ajtó nyitá-zárás, víz csobogása), a felvétel elkészítése után szűrést alkalmazunk, mely csak a 15 - 55 kHz közötti ultrahangot tartalmazó tartományt (kispatkány ultrahang frekvencia tartománya) hagyja meg. Az elemzésre kész felvételeket egy Visual Basic programozási környezetben megírt RatCallCounter nevű program segítségével elemeztük ki. A legfőbb számszerűsített paraméterek: impulzusok percenkénti száma (USV frequency (USV/min)), az összes impulzus száma (USV number), az impulzusok hosszának összege (USV duration (sec)), az egyes impulzusok átlagos hossza (USV average duration (msec)) és az impulzusok átlagfrekvenciája (USV spectral frequency (Hz)).

5. 4. 2. **Transzkortin (CBG) szint mérések**

A transzkortin kötés kapacitás meghatározására a módosított Sephadex-LH-20 alapú módszert használtunk (Shanks és Meaney 1994). Az endogén kortikoszteroidok eltávolításához 50 µl szérumot jégen hűtve 30 percen át inkubáltunk 1 ml dextrán charcoal hozzáadása mellett (500 mg dextran T-70 és 100 ml TEGM bufferben oldva 5 g Norit A (30mM TRIS.HCl, 1mM Na-EDTA, 10mM Na-molybdate, 10% (v/v) glycerine, pH 7,4)), majd lecentrifugáltuk (300g, 30 perc). A teljes kötés kapacitás meghatározásához 200 µl felülúszót inkubáltunk 24 órán át 4 °C-on 200 µl ³H-kortikoszteron (2,78 TNq/mmol, Amersham, Birmingham, UK; 3nM TEGM pufferben oldva) hozzáadása mellett. A nonspecifikus kötés kapacitás meghatározásához szintén 200 µl felülúszót inkubáltunk 24 órán át 4 °C-on 200 µl ³H-plus cold kortikoszteron (3 nM ³H-plus 16 µM cold kortikoszteron TEGM pufferben oldva). Sephadex-LH-20-t inkubálása 24 órán keresztül 4 °C-on történt 20% v/v TEGM pufferben. A mikrooszlopokat 1 ml-es pipetta hegyek és 1250 µl szuszpenzió felhasználásával alakítottuk ki, azokat 500 µl TEGM, majd 100 µl TEGMD (20 ml TEGM és 3mg DTT (DL-Dithiothreitol, Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA); aktivációs lépés)

pufferekkel mostunk át. Az oszlopot 100 µl TEGMD pufferrel mostuk (eluáltuk), majd 25 perccel később a megkötetlen radioaktivitást eltávolítottuk 500 µl TEGMD pufferrel. A specifikus és nem specifikus kötési kapacitást minden egyes minta esetében három párhuzamos mikrooszlopon mértük (n=7-8 / csoport). A mintafeltöltések során összegyűjtött eluátumból (1 ml) 50 µl-es egységeket (aliquot) vittünk át folyadék szcintillációs fiolákba, és egy számláló egység segítségével méréseket végeztünk (Wallace 1409 Liquid Scintillation Counter, GMI, Inc., Ramsey, MN, USA). A szérumban mért specifikus és nonspecifikus kötődést jelző radioaktivitási adatok $nM \pm SEM$ formájában kerültek megadásra.

5. 4. 3. ACTH érzékenység mérése

Az inkubálást a hipofízis ACTH termeléséhez hasonló módon végeztük. Ebben az esetben a mellékveséket 8 darabra szeleteltük, egy edénybe egy mellékvese került és a stimulálás $10^{-12}M$ ACTH-val történt, valamint a felülúszóból kortikoszteron meghatározást végeztünk.

5. 4. 4. Mellékvese-velő katekolaminok szerepének vizsgálata

5. 4. 4. 1. β adrenerg antagonisták: *in vivo* mérések

Ebben a sorozatban csak 10 napos AVP-hiányos állatokat alkalmaztunk. A hipoglikémiás stressz kiváltása az előző fejezetben bemutatott protokoll szerint történt, de kontroll és Actrapiddal (3NE/2ml/kg) kezelt csoportok mellett Propranolollal ($10^{-5}M$) és Actrapid (3NE/2ml/kg) + Propranolollal ($10^{-5}M$) kezelt csoportokat is kialakítottunk. A kezeléseket követően 90 perccel kortikoszteron meghatározáshoz dekapitálással vérmintákat gyűjtöttünk.

5. 4. 4. 2. β adrenerg antagonisták: *in vitro* mérések

A 10 napos +/- állatok mellékveséinek inkubálása az előző pontban (ld. 3.3.) részletezetten történt, de a második 15 perces inkubálási szakasz alatt ACTH ($10^{-10}M$) kezelés mellett kontroll, Propranolol ($10^{-5}M$) és ACTH ($10^{-10}M$) + Propranolol ($10^{-5}M$) kezeléseket is alkalmaztunk.

5. 4. 4. 3. *Glüko- és mineralokortikoid szintek korfüggő összehasonlítása Brattleboro állatokban*

A 3. 2. 1. –es pontban említett kísérlet során a plazmából aldoszteron mérések is történtek.

5. 5. Glüko- és mineralokortikoidok szintek korfüggő összehasonlítása Wistar patkányokban

5. 5. 1. Lipopoliszacharid kezeléssel kiváltott immunválasz

Bakteriális fertőzés modelljében a Brattleboro patkányoknál leírt (lisd. 3. 1. 1.) protokoll szerint jártunk el, azzal a különbséggel, hogy a két vizsgált változóból kifolyólag (kor (felnőtt és 10 napos), stresszor) összesen 4 csoportunk volt.

5. 5. 2. Inzulin kezeléssel kiváltott hipoglikémia

Hipoglikémiás stressz kialakítása során a Brattleboro patkányoknál leírt (lisd. 3. 2. 1.) protokoll szerint jártunk el, azzal a különbséggel, hogy a két vizsgált változóból kifolyólag (kor, stresszor) összesen 4 csoportunk volt.

5. 5. 3. Kvantitatív PCR

Nyugalmi állapotban végzett dekapitálás után a lefagyasztott mintákban kvantitatív PCR (polimeráz láncreakció) segítségével határoztuk meg a GR, MR, 11- β -HSD1 (aktiváló) és 11- β -HSD2 (inaktiváló) enzimek mRNS (hírvivő ribonukleinsav) mennyiségét. Első lépésként megterveztük a szükséges primereket a Primer express 3.0 program segítségével, majd szintetizáltattuk őket. Ezt követően Total RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) segítségével mintáinkból mRNS-t izoláltuk, majd nanodrop segítségével megmértük a kivont mRNS mennyiségét. High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Foster City, CA, USA) használatával a mRNS-t cDNS-é írtuk át. A cDNS mintákat mérések előtt csoportonként pool-oztuk. A génexpressziós különbségeket ABI StepOne Real Time PCR-el mértük Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) segítségével a gyártó útmutató szerint.

Végül a kapott adatok kiértékelése ABI StepOne Software v2.1 program felhasználásával történt.

A receptor és enzim mRNS szinteket az adott szervben lévő gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) mRNS szintekhez normalizáltuk. Az értékelés során a felnőtt AVP+ állatokat tekintettük kontrollnak, értékük 1. Ehhez viszonyítva adtuk meg a többi csoport szintjét.

5. 5. 3. 1. *Primerek*

GR: forward: 59-CAT CTT CAG AAC AGC AAA ATC GA-39,
reverse: 59-AGG TGC TTT GGT CTG TGG GAT A-39;
MR: forward: 59-CCA AGG TAC TTC CAG GAT TTA AAA AC-39,
reverse: 59-AAC GAT GAT AGA CAC ATC CAA GAA TAC T-39;
11-β-HSD1: forward: 59-CCT CCA TGG CTG GGA AAA T-39,
reverse: 59-AAA GAA CCC ATC CAG AGC AAA C-39;
11-β-HSD2: forward: 59-CGC CGC TTC CTA CAG AAC TT-39,
reverse: 59-TCC TGG GTT GTG TCA TGA ACA-39;
GAPDH: forward: 59-ACA GCC GCA TCT TCT TGT GC-39,
reverse: 59-GCC TCA CCC CAT TTG ATG TT-39.

5. 5. 4. **Immuncitokémia**

PCR méréseink megerősítésére immuncitokémiát is végeztünk, azaz az mRNS szintek mellett a termelődő fehérjékben mutatkozó különbségeket is ki szeretnénk volna mutatni. Az állatokat pentobarbitállal (50 mg/kg) altattuk, majd transzkardiálisan 2 percig só oldattal (0,9% NaCl), és 30 ml (perinatális), vagy 300 ml (felnőtt) jégben hűtött fixáló oldattal (4% paraformaldehid 8 pH-jú 0,1 M-os Borat pufferben oldva) perfundáltuk. Az agyakat eltávolítottuk, majd 3 órán keresztül fixáló oldatban utófixáltuk. Az ezt követő éjszakán át 4 °C –on 10% cukor tartalmú foszfát pufferben (PBS) tartottuk. Az ezt követő napon fagyasztott mikrotóm segítségével koronális síkban 30 µm-es szeletekre vágtuk, és -20 C-on fagyállóban tároltuk. A szeleteket először PBS-el (3x10 perc), majd az endogén peroxidázok blokkolása érdekében H₂O₂ oldattal és végül ismét PBS-el (3x5 perc) mostuk át. Ezt követően a mintákat 2%-os normál kecske szérumban (Vector, Burlingame, USA) inkubáltuk 1 órán keresztül. A

GR és MR immunfestése nyúlban termelt GR és MR elleni poliklonális antitestekkel (Santa Cruz Biotechnology, USA) történt 48 órán keresztül 4 °C-on. Ezt követte a biotinilált nyúl antiszérummal (1:500; Vector, Burlingame, USA) történő inkubálás. Az antigének láthatóvá tétele a konvencionális Avidin-Biotin-HRP technika (ABC, Vectastain; 1:1000 TRIS) 0,05%-os diaminobenzidines (DAB, Sigma) és 0,01% H₂O₂ oldatos továbbfejlesztett változatával történt. A szeleteket ezt követően zselatinos tárgylemezekre vittük fel, majd dehidratáltuk és lefedtük. A képeket digitális kamerával (NIKON, DMX 1200) ellátott fénymikroszkóppal (NIKON, Eclipse E400) készítettük 20x-os nagyítás mellett a hipotalamuszban (PVN, mediobazális hipotalamusz (MBH)) és a hippocampusz régiókban. A felvételek reprezentatívak.

5. 6. Vér és szövetminták gyűjtése

Kísérleteink végén dekapitálást követően az állatok vérért hűtött 10 ml-es centrifuga csövekbe, illetve 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe gyűjtöttük, majd centrifugálás (3000 rpm/min 20 percig) után a leszívott szérumot -20°C fokon tároltuk. Genotípus meghatározásához a perinatális korú állatok hipofízisét eltávolítottuk, azokat 100 µl 0,1 M HCl-et tartalmazó Eppendorf csövekbe gyűjtöttük. Hipoglikémiás stressz alkalmazása során a vércukor szint csökkenést kereskedelmi forgalomban kapható D-Cont Personal 77 (Elektronika Kft. Budapest) típusú vércukorszint mérő készülékkel detektáltuk.

A hormonok receptorokon kifejtett hatásának becsléséhez nyugalmi állapotban dekapitált felnőtt és 10 napos patkányok hipotalamuszát és hippocampuszát steril, RNáz mentes körülmények között eltávolítottuk, szárazjégen lefagyasztottuk és a mintákat -70°C fokon tároltuk az mRNS szintek PCR-rel történő meghatározásáig.

5. 7. Hormonszint mérések

Az ACTH koncentrációt 50µl szérumból közvetlenül határoztuk meg RIA módszer segítségével (Zelena és mtsai 1999). Az ACTH antitest (no. 8514) a h-ACTH₁₋₃₉ molekula középső része ellen lett kifejlesztve nyúlban a Kísérleti Orvostudományi Kutató Intézetben (Budapest). Erősen specifikus, 0,2% keresztreakciót mutat az α-

MSH-val és nem ad szignifikáns keresztreakciót a γ -MSH, CLIP, ACTH₁₋₁₄, ACTH₁₋₁₉, ACTH₁₁₋₂₄, és ACTH₂₅₋₃₉ molekulákkal.

A plazma kortikoszteron szintjének meghatározásra 10 μ l szérumból szintén RIA módszerrel kerítettünk sort a Kísérleti Orvostudományi Intézetben kifejlesztett specifikus antiszérum segítségével (Zelena és mtsai 2003). Az ACTH-hoz hasonlóan a kortikoszteron antiszérumot is nyulakban termeltettük kortikoszteron-3-karboximetiloxim-bovin szérum albumin ellen. Tracerként ¹²⁵I-jelölt karboximetiloxim-tirozinmetil észter-t használtunk. A transzkortinnal való interferenciát alacsony pH segítségével küszöböltük ki.

A plazma renin és aldoszteron szintjét nemzetközi kollaborációban Pozsonyban (Institute of Experimental Endocrinology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia) mértük RIA Aldosterone kit és Angiotensin I RIA kit (Immunotech, Franciaország) segítségével (Ansurudeen és mtsai 2007).

A 10 napos Brattleboro patkányok genotípusának megismeréséhez dekapitálást követően eltávolítottuk az állatok hipofízisét és a későbbi AVP méréshez 100 μ l 0,1N sósavat tartalmazó Eppendorf csőbe helyeztük. A lefagyasztott, -20 °C-on tárolt hipofíziseket kiolvasztás után forrásban lévő vízbe tettük 5 percre, majd ultrahangos homogenizálást végeztünk. Végül 3000 rpm-en 15 percig centrifugáltuk. Másnap a felolvadt homogenizált szerveket ismét lecentrifugáltuk 24 percig 10000 rpm-mel és a felülúszót üres Eppendorf csövekbe helyeztük. A mintákat -20 fokon tároltuk az AVP mérésig, amit specifikus RIA módszerrel végeztük nyúl anti-AVP antiszérummal (utóbbi dr. Vecsernyés Miklós adománya, Szent-Györgyi Orvostud. Egyetem, Szeged, Hungary).

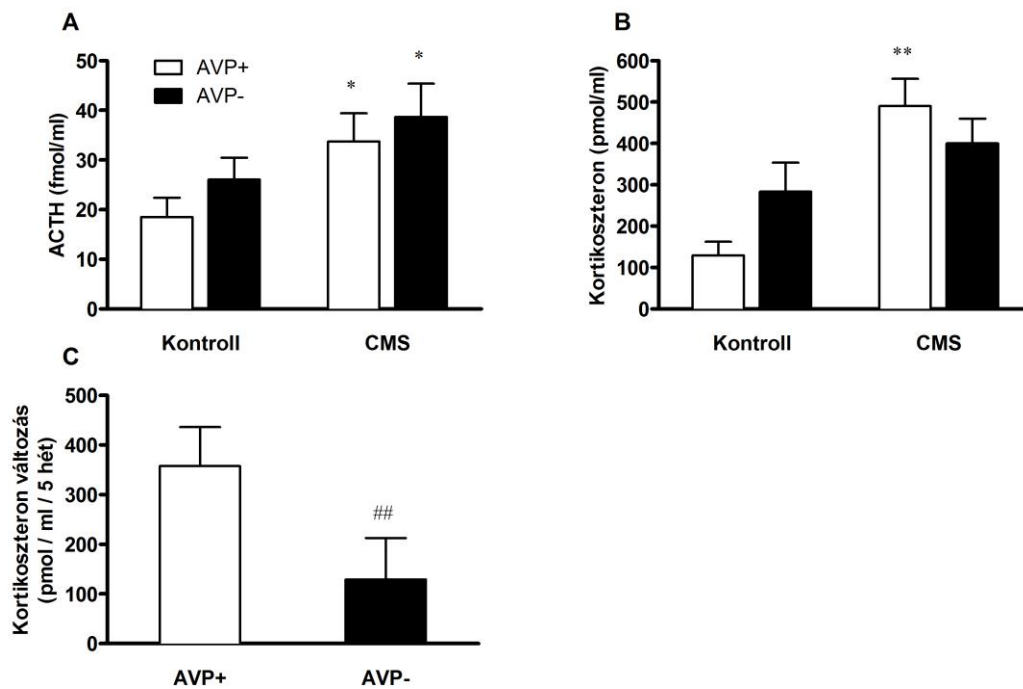
5. 8. Statisztikai elemzés

Az adatokat az oszlop diagrammoknál átlag + standard hiba, vonalas diagrammoknál átlag $\pm$ standard hiba formában ábrázoltuk. A Brattleboro patkányokon végzett kísérletekhez tartozó hormonszint mérésekből származó adatainkat három szempontos (three way) ANOVA elemzésnek (kor, genotípus, stressz) vetettük alá (StatSoft Inc. Tulsa, Okla, US). Receptor és enzim szint méréseknél, valamint a Wistar patkányok hormonszint méréseihez két szempontos (two way) ANOVA elemzést használtunk (kor, genotípus; illetve kor és stressz). A posthoc összehasonlításokat Newmann Keuls féle módszerrel végeztük és ennek eredményét tüntettük fel az ábrákon.

6. Eredmények

6. 1. Krónikus enyhe stressz

Bár a CMS-nek kitett állatok ACTH szintjei szignifikáns emelkedést mutattak kontroll társaikhoz képest (stresszor hatása: $F(1,44)=6,7$; $p<0,05$), az AVP hiány viszont hatástalan volt (19. ábra, A diagramm)



19. ábra Brattleboro patkányok krónikus enyhe stressz során mért ACTH és kortikoszteron változásai. A csillagok a kontroll csoportoktól való eltérést (* $p<0,05$ ** $p<0,01$), a kettős keresztek az AVP+ csoporttól való eltérést (## $p<0,01$) jelzik.

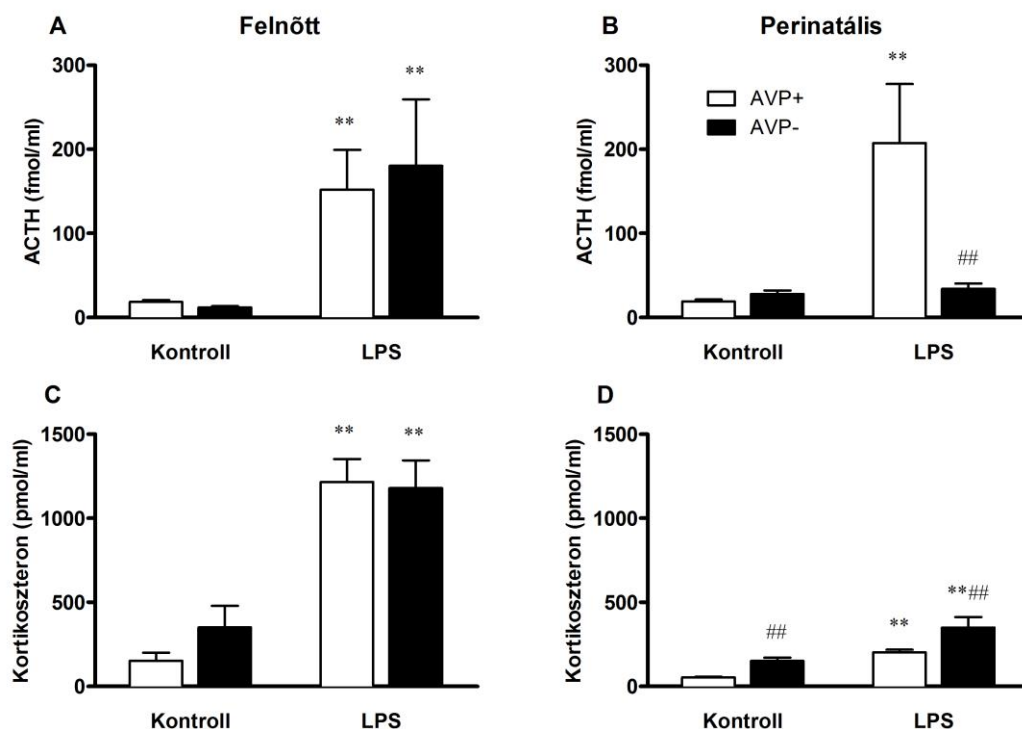
AVP-hiányos állatokban a kortikoszteron alapszintek enyhe emelkedést mutatnak, bár a különbség nem volt szignifikáns ($p=0,07$). A CMS hatására jelentős kortikoszteron növekedés figyelhető meg (stresszor hatása: $F(1,44)=16,6$; $p<0,01$), de a két genotípus jelentős különbségeket mutat (stresszor – genotípus interakció: $F(1,44)=4,3$; $p<0,05$; 19. ábra, B diagramm). A stresszelt AVP- állatok alacsonyabb kortikoszteron szinteket produkálnak AVP+ társaikhoz képest, és a megemelkedett alapszintek miatt a CMS hatása kisebb. A CMS folyamán (stresszelés előtt és stresszelés végén vett vérminták különbsége) mért kortikoszteron szint változás is szignifikánsan kisebb (stresszor hatása: $F(1,44)=4,3$; $p<0,05$; 19. ábra, C diagramm).

6. 2. A HHM tengely szabályozásának korfüggő összehasonlítása

6. 2. 1. Lipopoliszacharid kezeléssel kiváltott HHM aktiváció

6. 2. 1. 1. Brattleboro patkányok

Felnőtt állatokban az egyszeri LPS kezelés hatására mind az ACTH, mind a kortikoszteron szintek szignifikáns növekedést mutattak (stresszor hatása ACTH esetén: $F(1,22)=11,5$; $p<0,01$; kortikoszteron esetén: $F(1,22)=57,9$; $p<0,001$). Genotípusok között nem volt eltérés az emelkedésben, az ACTH és kortikoszteron szintek egyégesen az alapszint közel nyolcszorosára növekedtek (20. ábra, A, C diagramm).



20. ábra Felnőtt és perinatális korú Brattleboro patkányok LPS stressz során mért ACTH és kortikoszteron változásai. A csillagok a kontroll csoportoktól való eltérést (** $p < 0,01$), a kettős keresztek az AVP+ csoporttól való eltérést (## $p < 0,01$) jelzik.

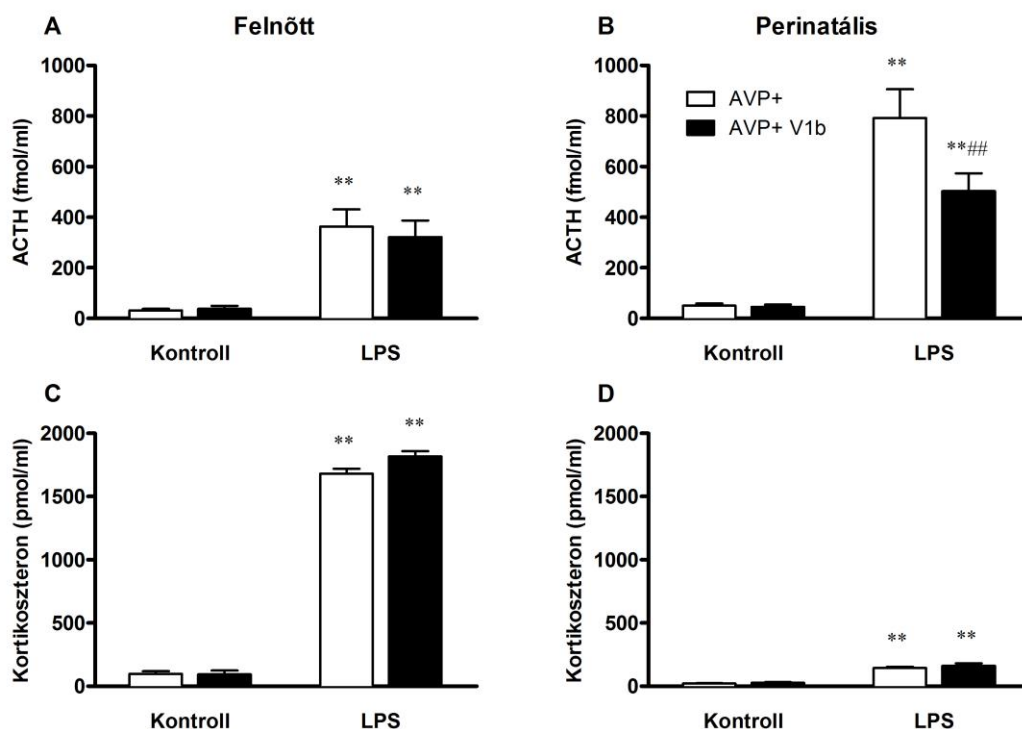
Perinatális korú állatoknál csak az AVP+ állatok mutatnak jelentős ACTH szint növekedést (stresszor hatása: $F(1,53)=9,14$; $p < 0,01$), ami összemérhető volt a felnőtt állatoknál megfigyelt értékekkel (20. ábra, B diagramm). Az AVP-hiányos állatokban LPS stresszor hatására nem figyelhető meg ACTH változás (genotípus hatása: $F(1,53)=6,54$; $p < 0,01$; stresszor – genotípus interakció: $F(1,53)=7,99$; $p < 0,01$). Ezzel szemben a kortikoszteron szintek stresszor hatására mindkét genotípusban szignifikánsan megemelkedtek (stresszor hatása: $F(1,53)=27,29$; $p < 0,001$), bár az emelkedés elmaradt a felnőttekben látottaktól (kor hatása: $F(1,75)=126,1$; $p < 0,001$). Genotípusok között is láthatók eltérések, az AVP-hiányos állatok alap és stresszelt szintjei is magasabbak (genotípus hatása: $F(1,53)=13,59$; $p < 0,001$; 20. ábra, D diagramm).

6. 2. 1. 2. V1b antagonistista

Felnőtt, normál AVP-vel rendelkező állatoknál az ACTH és kortikoszteron szintek az előző kísérletben látottakhoz hasonlóan megemelkedtek (stresszor hatása ACTH esetén: $F(1,29)=39,3$; $p<0,001$; kortikoszteron esetén: $F(1,29)=223,7$; $p<0,001$). A V1b antagonistista kezelés alapján nem volt különbség a csoportok között (21. ábra, A, C diagramm).

Perinatális korban a stresszor magasabb ACTH szinteket alakít ki, mint felnőttekben (stresszor hatása: $F(1,53)=85,3$; $p<0,001$; kor hatása: $F(1,82)=11,66$; $p<0,001$). A V1b antagonististával kezelt állatokban az ACTH kisebb mértékben emelkedett meg (V1b antagonistista hatása: $F(1,53)=5,11$; $p<0,05$, stresszor – V1b interakció: $F(1,53)=4,80$; $p<0,05$; 21. ábra, B diagramm).

Stresszor hatására a 10 napos állatokban mérhető kortikoszteron szintek is szignifikáns növekedést mutatnak (stresszor hatása: $F(1,53)=121,5$; $p<0,001$), bár ez a felnőtt kortikoszteron szintek töredéke (kor hatása: $F(1,80)=31,07$; $p<0,001$). A V1b kezelésnek nem volt hatása a kortikoszteron szintekre (21. ábra, D diagramm).

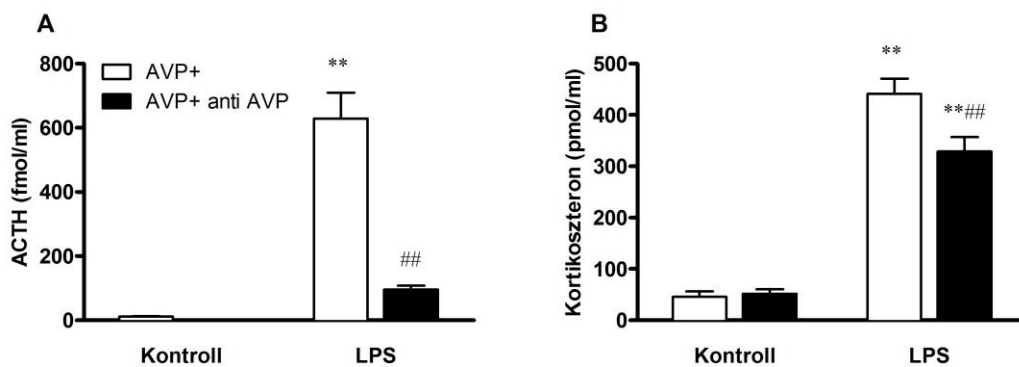


21. ábra Felnőtt és perinatális korú AVP+ Brattleboro patkányok LPS stressz során mért ACTH és kortikoszteron változásai V1b receptor antagonistista előkezelést követően. A csillagok a kontroll csoportoktól való eltérést (** $p<0,01$), a kettős keresztek az AVP+ csoporttól való eltérést (## $p<0,01$) jelzik.

6. 2. 1. 3. AVP antiszérum

Kispatkányokban LPS stresszor hatására csak az AVP+ csoportban volt megfigyelhető ACTH szint növekedés (stresszor hatása: $F(1,49)=79,36$; $p<0,001$), míg az AVP antiszérum ezt megakadályozta (AVP antiszérum hatása: $F(1,49)=46,37$; $p<0,001$; stresszor – AVP antiszérum interakció: $F(1,49)=42,96$; $p<0,001$; 22. ábra, A diagramm).

A kortikoszteron szintek mindkét csoportban megemelkedtek (stresszor hatása: $F(1,49)=232,17$; $p<0,001$), bár az AVP antiszérum kezelt csoportban az emelkedés szignifikánsan kisebb volt (AVP antiszérum hatása: $F(1,49)=5,88$; $p<0,05$; stresszor – AVP antiszérum interakció: $F(1,49)=7,16$; $p<0,05$; 22. ábra, B diagramm).



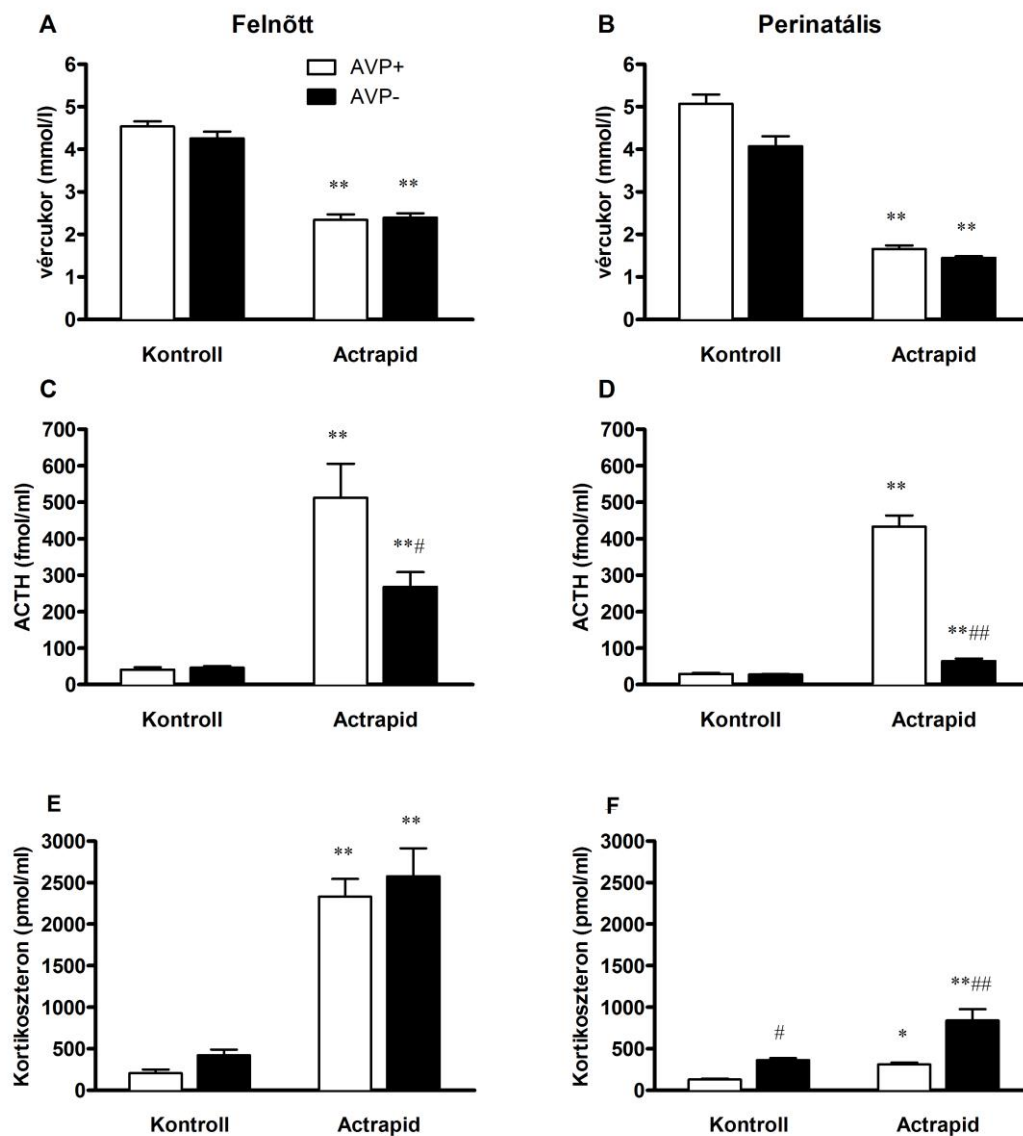
22. ábra Perinatális korú AVP+ Brattleboro patkányok LPS stressz során mért ACTH és kortikoszteron változásai AVP antiszérum előkezelést követően. A csillagok a kontroll csoportoktól való eltérést (** $p<0,01$), a kettős keresztek az AVP+ csoporttól való eltérést (## $p<0,01$) jelzik.

6. 2. 2. Inzulin-hipoglikémia által okozott HHM tengely aktiváció

Az Actrapid kezelés mind felnőtt (stresszor hatása: $F(1,35)=244,33$; $p<0,001$), mind perinatális korban (stresszor hatása: $F(1,36)=90,97$; $p<0,001$) genotípustól függetlenül lecsökkentette a vércukorszintet (23. ábra, A, B diagramm).

Hipoglikémiás stresszor hatására felnőtt állatokban mind az ACTH (stresszor hatása: $F(1,35)=52,94$; $p<0,001$), mind a kortikoszteron (stresszor hatása: $F(1,35)=111,97$; $p<0,001$) szintje jelentősen megnövekedett. Felnőtt AVP-hiányos állatok ACTH szint növekedése szignifikánsan kisebb volt (genotípus hatása: $F(1,35)=6,30$; $p<0,05$; stresszor – genotípus interakció: $F(1,35)=6,85$; $p<0,05$; 23. ábra, C diagramm), míg kortikoszteron szint növekedése nem tért el AVP+ társaikhoz viszonyítva (23. ábra, E diagramm).

A perinatális korú AVP+ állatok stresszor hatására a felnőttekhez hasonló ACTH szinteket mutattak (stresszor hatása: $F(1,36)=195,92$; $p<0,001$), míg AVP-hiányos társaik esetén az ACTH növekedés minimális mértékű volt (genotípus hatása: $F(1,36)=138,27$; $p<0,001$; stresszor – genotípus interakció: $F(1,36)=135,55$; $p<0,001$; kor hatása: $F(1,71)=9,94$; $p<0,01$; 23. ábra, D diagramm). Stresszor hatására a kortikoszteron szint növekedés a SHRP során AVP+ állatoknál alacsony (stresszor hatása: $F(1,36)=22,14$; $p<0,001$), míg AVP hiány hatására már sokkal jelentősebb (genotípus hatása: $F(1,36)=29,80$; $p<0,001$; genotípus – kezelés interakció: $F(1,36)=4,47$; $p<0,05$), a felnőtt értékek harmadát is elérheti (kor hatása: $F(1,71)=84,32$; $p<0,001$; 23. ábra, F diagramm).



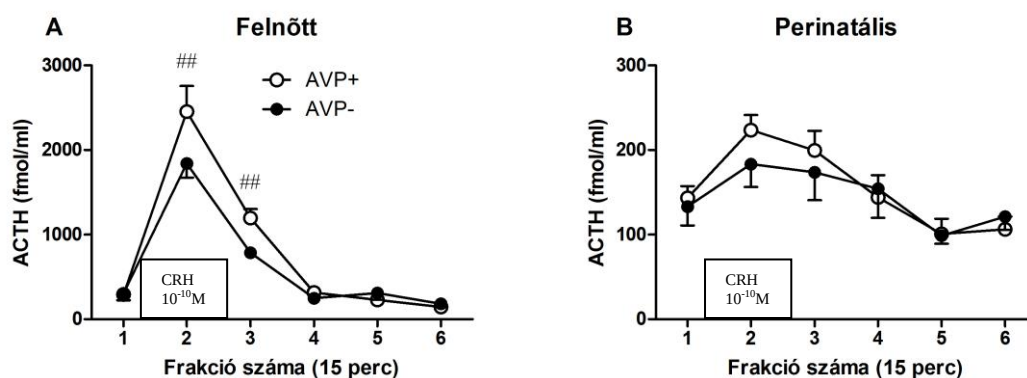
23. ábra Felnőtt és perinatális korú Brattleboro patkányok hipoglikémiás stressz során mért glükóz, ACTH és kortikoszteron változásai. A csillagok a kontroll csoportoktól való eltérést (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), a kettős keresztek az AVP+ csoporttól való eltérést (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$) jelzik.

6. 2. 3. Hipofízis in vitro CRH érzékenysége

Felnőtt állatokban 10^{-10} M CRH hozzáadása az inkubációs médiumhoz szignifikánsan emelte az első hipofízis lebeny ACTH elválasztását 10^{-10} M CRH hozzáadása az inkubációs médiumhoz szignifikánsan emelte az első hipofízis lebeny ACTH elválasztását (idő hatása: $F(5,100)=7,94$; $p < 0,001$; 24. ábra, B diagramm). Az emelkedés nemcsak a stimulus alatt, hanem az utána levő frakcióban is kimutatható volt. A genotípusnak is volt hatása a szekrécióra; az AVP-hiányos állatok

szignifikánsabb kisebb szekréciót mutattak, mint a kontroll társaik (idő hatása: $F(5,65)=104,5$; $p<0,001$; genotípus hatása: $F(1,13)=4,99$; $p<0,05$; idő és genotípus interakció: $F(5,65)=3,53$; $p<0,01$). Ez a szignifikáns különbség két frakcióban is mérhető volt, mind a CRH stimulus alatt, mind a következő 15 perces frakcióban. Ugyanez a különbség megmutatkozott a vizsgálati idő alatti teljes szekretált hormon-mennyiséget tekintve is (genotípus hatás: $F(1,13)=5,35$; $p<0,05$).

10 napos állatban sokkal kisebb ACTH emelkedés jött létre ugyanakkora CRH stimulusra, azaz bennük kb. kétszeres emelkedés volt kimutatható a felnőttekben megfigyelhető 4-5-szörös emelkedéshez képest (kor hatása: $F(1,33)=303,8$; $p<0,001$; 24. ábra, B diagramm). A felnőtt állatokkal ellentétben ebben a korban nem volt különbség a két genotípus között sem a frakciókat külön megvizsgálva, sem a vizsgálati idő alatti teljes szekretált hormon-mennyiséget tekintve.



24. ábra Felnőtt és perinatális korú Brattleboro patkányok hipofízisének ACTH termelése CRH hatására statikus inkubálás során. A kettős keresztek az AVP+ csoporttól való eltérést ($##p<0,01$) jelzik.

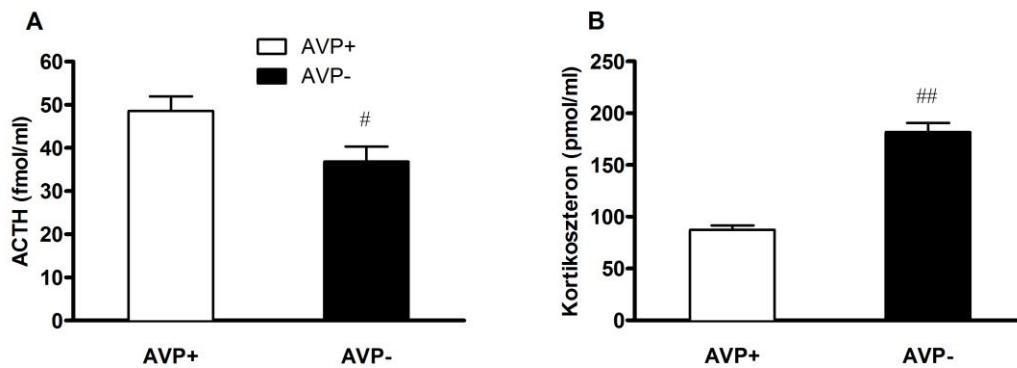
6. 3. Az ACTH független glükokortikoid szekréció

6. 3. 1. Eltérő időbeli lefutás – 10 perces anyai elválasztás

6. 3. 1. 1. Hormon szintek

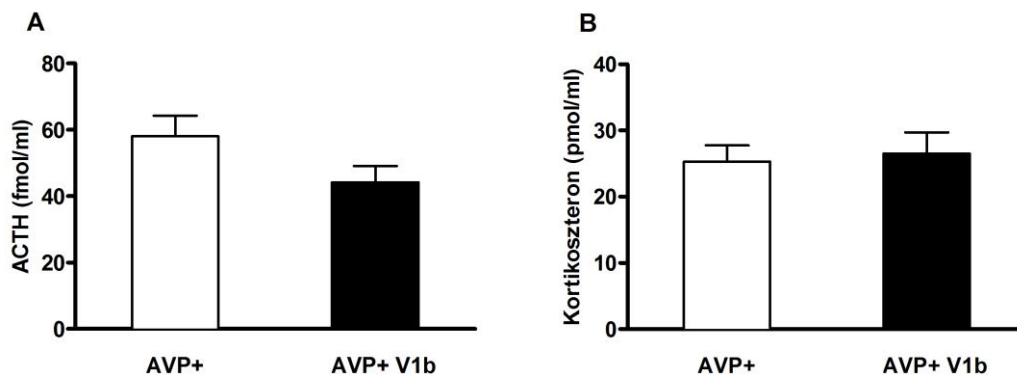
Már 10 perces anyai elválasztás esetén is sikerült igazolnunk az AVP ACTH szabályozásban betöltött szerepét. A teszt végén az AVP-hiányos állatok szignifikánsan kisebb ACTH szinteket mutattak AVP+ társaikhoz képest (genotípus hatása: $F(1,47)=5,76$; $p<0,05$; 25. ábra, A diagramm).

A kortikoszteron szintek ezzel ellentétes irányú különbséget mutattak, az AVP-állatok esetén nagyobb emelkedés volt megfigyelhető (genotípus hatása: $F(1,47)=105,59$; $p<0,001$; 25. ábra, B diagramm).



25. ábra Anyai elválasztás hatása Brattleboro patkányok ACTH és kortikoszteron szintjeire. A kettős keresztek az AVP+ csoporttól való eltérést ([#] $p<0,05$, ^{##} $p<0,01$) jelzik.

A V1b kezeléssel hasonló tendenciákat lehetett megfigyelni, de egyik vizsgált paraméter esetén se érte el a szignifikancia küszöböt a kontroll és V1b antagonistá kezelte csoport különbsége (ACTH: $F(1,43)=2,16$; $p=0,15$ és kortikoszteron: ($F(1,43)=0,62$; $p=0,43$; 26. ábra, A, B diagramm).

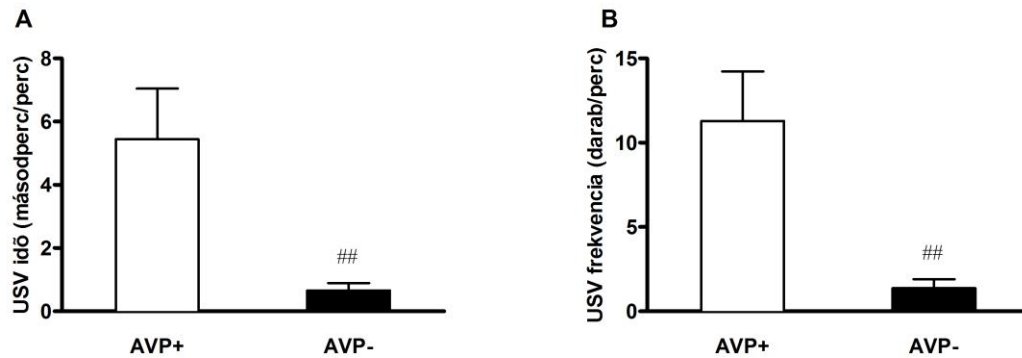


26. ábra Anyai elválasztás hatása AVP+ Brattleboro patkányok ACTH és kortikoszteron szintjeire V1b receptor antagonistá előkezelést követően. Nem figyelhető meg szignifikáns különbség.

6. 3. 1. 2. Ultrahang vokalizáció

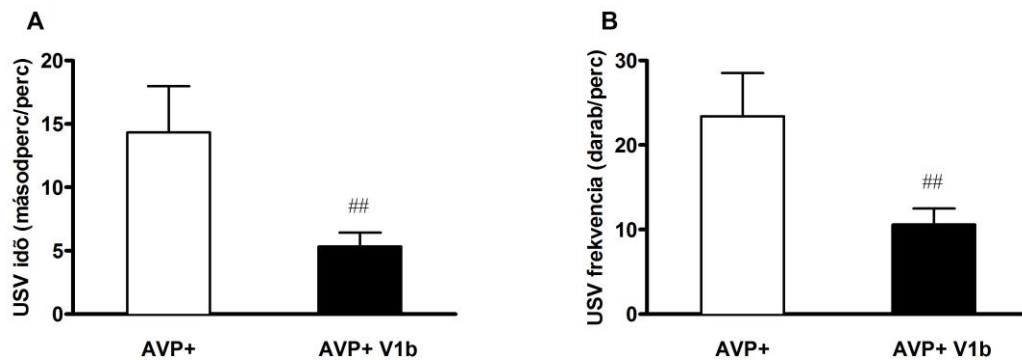
A perinatális szorongás jeleként a teszt során megvizsgáltuk a kibocsájtott USV-t is. 10 perces anyai elválasztás során az AVP-hiányos kicsik kevesebb időt töltöttek szüleik hívogatásával (genotípus hatása: $F(1,47)=6,57$; $p<0,05$), és ezzel párhuzamosan

az USV frekvencia is alacsonyabb volt (genotípus hatása: $F(1,47)=8,41$; $p<0,01$; 27. ábra, A, B diagramm).



27. ábra Anyai elválasztás hatása a Brattleboro patkányok ultrahang kibocsátására (ultrahang kibocsátással töltött idő, ultrahangok száma). A kettős keresztek az AVP+ csoporttól való eltérést ($##p<0,01$) jelzik.

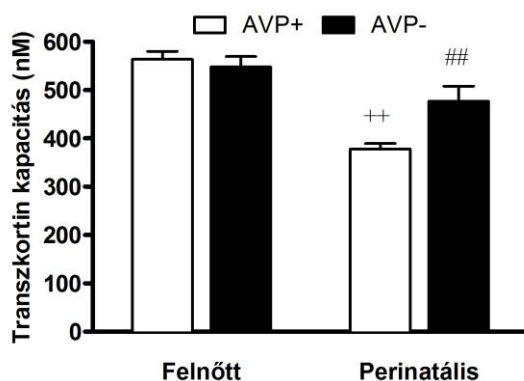
A kapott eredmények AVP+ állatokon V1b antagonistá alkalmazásával reprodukálhatók. A V1b kezelés csökkentette az USV időtartamát (kezelés hatása: $F(1,43)=5,45$; $p<0,05$), és frekvenciáját (genotípus hatása: $F(1,43)=5,35$; $p<0,05$; 28. ábra, A, B diagramm).



28. ábra Anyai elválasztás hatása AVP+ Brattleboro patkányok ultrahang kibocsátására V1b receptor antagonistá előkezelést követően (ultrahang kibocsátással töltött idő, ultrahangok száma). A kettős keresztek az AVP+ csoporttól való eltérést ($##p<0,01$) jelzik.

6. 3. 2. Transzkortin szintek

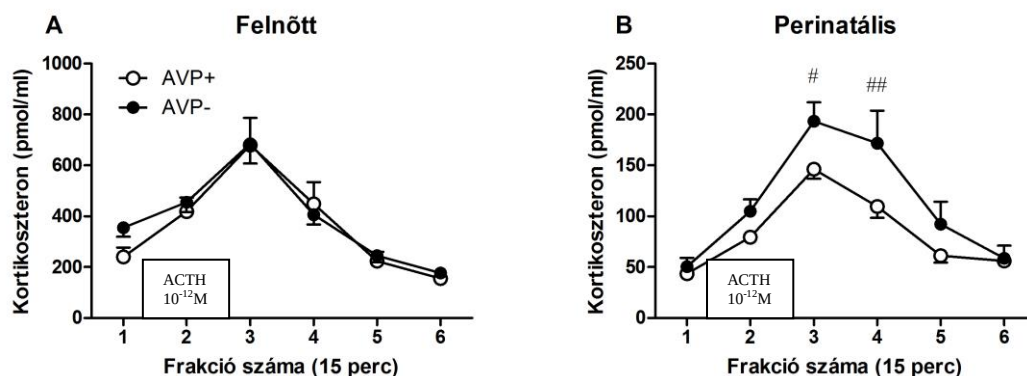
A felnőtt állatok vérplazmájában szignifikánsan nagyobb transzkortin szint volt mérhető, mint a 10 napos állatokban (kor hatása: $F(1,26)=36,0$; $p<0,001$; 29. ábra). Az AVP hiányának csak perinatális korban volt szignifikáns hatása (kor – genotípus interakció: $F(1,26)=7,32$; $p=0,01$), az AVP-állatok magasabb transzkortin szinteket produkáltak.



29. ábra Felnőtt és perinatális korú Brattleboro patkányok transzkortin kapacitása. A keresztek a felnőtt csoporttól való eltérést ($++p<0,01$), a kettős keresztek az AVP+ csoporttól való eltérést ($##p<0,01$) jelzik.

6. 3. 3. ACTH érzékenység mérése

ACTH hatására felnőtt korban szignifikáns kortikoszteron növekedés volt mérhető (ACTH (idő) hatása: $F(5,90)=46,5$; $p<0,001$; 30. ábra, A diagramm). Mivel perinatális korban a mellékvesék mérete jelentősen elmarad a felnőtt koritól, és inkubálás során az inkubáló folyadék mennyisége egységesen 1 ml, a különböző korú állatok kortikoszteron méréseit érdemes külön kezelni. Bár a perinatális kori értékek kisebbek, az ACTH hatására megfigyelt növekedés a felnőttekhez hasonlóan háromszoros (ACTH (idő) hatása: $F(5,85)=71,5$; $p<0,001$). Míg felnőtt korban az AVP-hiálynak nem volt hatása, perinatális korban a mellékvesék minimálisan nagyobb (+25%) ACTH érzékenységet mutatnak (ACTH – genotípus interakció: $F(5,85)=4,0$; $p<0,01$; 30. ábra, B diagramm).

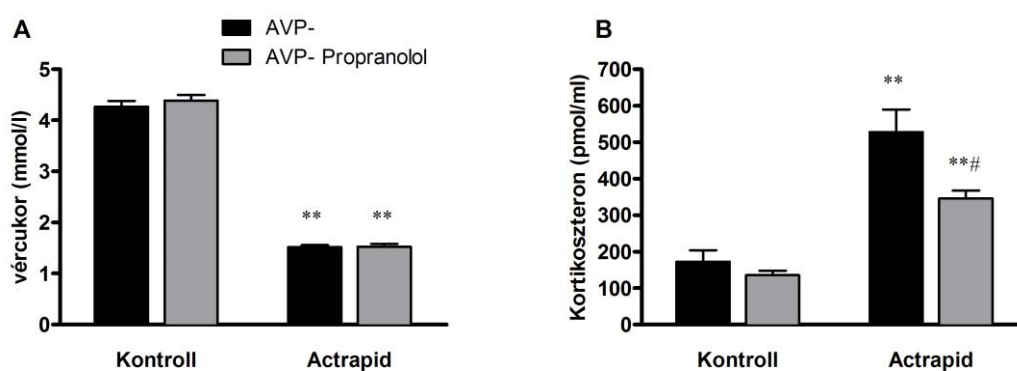


30. ábra Felnőtt és perinatális korú Brattleboro patkányok mellékveséinek kortikoszteron termelése ACTH hatására statikus inkubálás során. A kettős keresztek az AVP+ csoporttól való eltérést ($\#p<0,05$, $##p<0,01$) jelzik.

6. 3. 4. Mellékvese-velő katekolaminok

6. 3. 4. 1. β adrenerg antagonisták: *in vivo* mérések

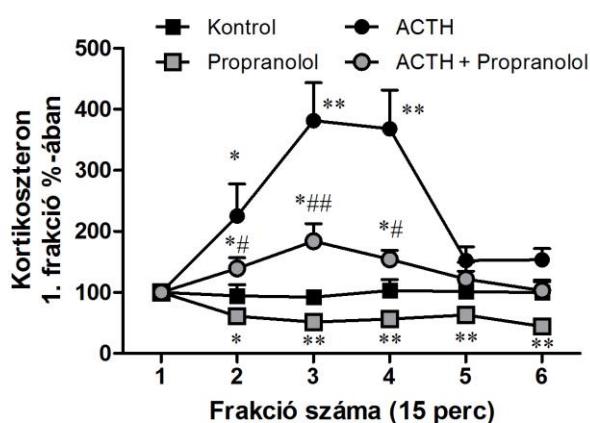
Actrapid hatására mind a kontroll, mind a β adrenerg antagonisták előkezelést kapott AVP- állatok vércukorszintje lecsökkent (stresszor hatása: $F(1,55)=1213,80$; $p<0,001$; 31. ábra, A diagramm). A Propranolol előkezelést kapott perinatális korú állatok kortikoszteron növekedése felére csökkent (stresszor hatása: $F(1,55)=54,73$; $p<0,001$; Propranolol előkezelés hatása: $F(1,55)=8,25$; $p<0,01$; stresszor – Propranolol előkezelés interakció: $F(1,55)=3,63$; $p=0,06$; 31. ábra, B diagramm).



31. ábra Perinatális korú AVP- Brattleboro patkányok hipoglikémiás stressz során mért glükóz és kortikoszteron változásai β adrenerg antagonisták előkezelését követően. A csillagok a kontroll csoportoktól való eltérést (** $p<0,01$), a kettős kereszt az AVP+ csoporttól való eltérést (# $p<0,05$) jelzik.

6. 3. 4. 2. β adrenerg antagonisták: *in vitro* mérések

Az adrenalin kortikoszteron termelésre gyakorolt direkt hatásának igazolására 10 napos +/- állatok mellékveséjét inkubáltuk Propranolol jelenlétében. ACTH hatására a kortikoszteron termelés jelentősen megnőtt, míg Propranolol és ACTH együttes adásával jelentősen kisebb növekedés volt megfigyelhető.

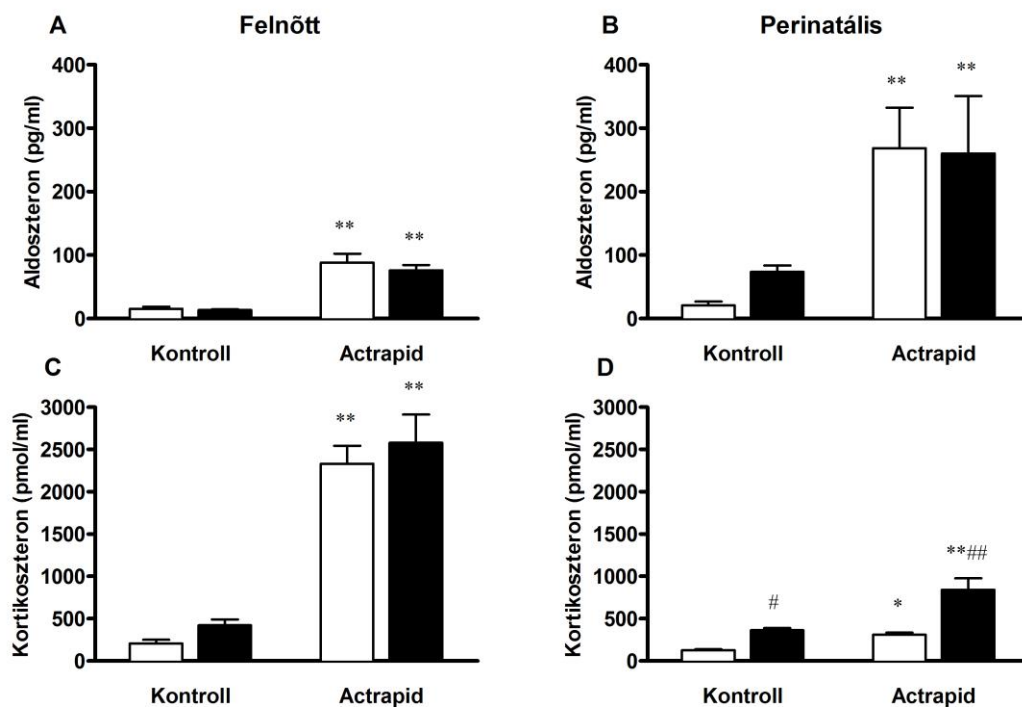


32. ábra Perinatális korú AVP+ Brattleboro patkányok mellékveséinek kortikoszteron termelése ACTH és β adrenerg antagonisták hatására statikus inkubálás során. A csillagok a kontrolcsoporttól való eltérést (* $p<0,05$, ** $p<0,01$), a kettős kereszt az ACTH kezelést kapott csoporttól való eltérést (# $p<0,05$, ## $p<0,01$) jelzik.

Propranolol ACTH nélküli adása a kontroll értékek alá csökkentette a kortikoszteron szinteket (ACTH hatása: $F(1,14)=38,09$; $p<0.001$; Propranolol hatása: $F(1,14)=16,16$; $p<0.01$) (32. ábra).

6. 3. 5. Glüko- és mineralkortikoid szintek korfüggő összehasonlítása Brattleboro állatokban

Hipoglikémiás stressz során aldoszteron szint mérésekre is sort kerítettünk. Bár stresszor hatására felnőtt állatokban is jelentős növekedés volt megfigyelhető (stresszor hatása: $F(1,35)=73,28$; $p<0,001$; 33. ábra, A diagramm), a perinatális kori emelkedés ezt akár háromszorosan is meghaladta (stresszor hatása: $F(1,36)=13,63$; $p<0,001$; kor hatása: $F(1,71)=13,52$; $p<0,001$). A genotípus nem befolyásolta a hormonszint változást (33. ábra, B diagramm).

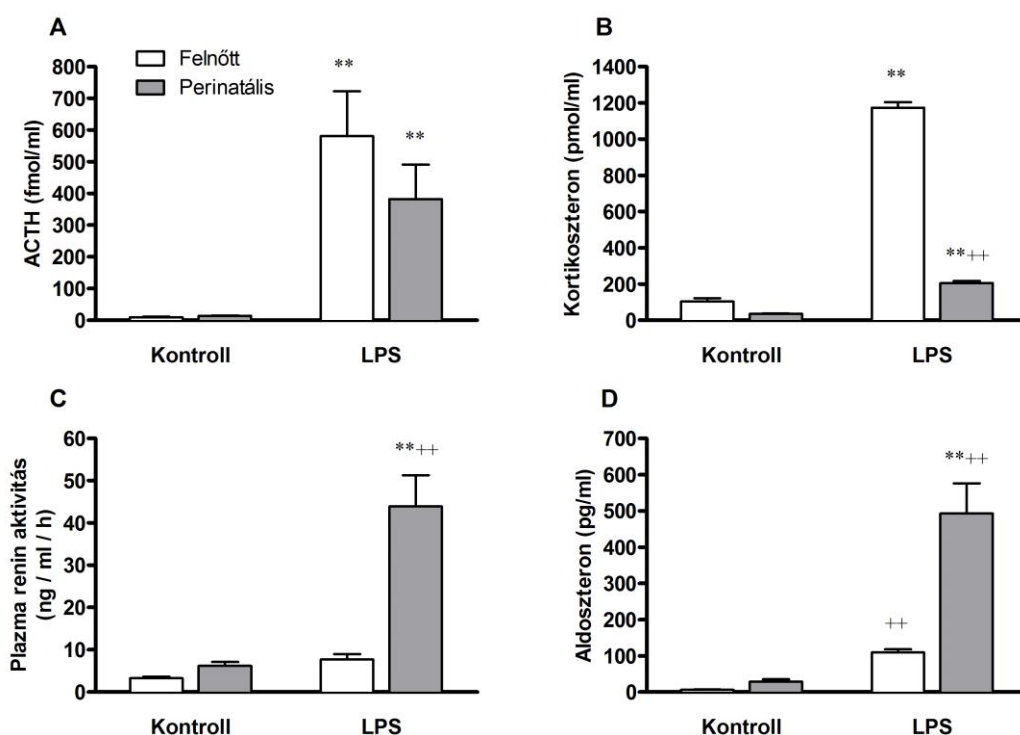


33. ábra Felnőtt és perinatális korú Brattleboro patkányok hipoglikémiás stressz során mért aldoszteron és kortikoszteron változásai. A kortikoszteron adatok a 23. ábrán is szerepelnek. A csillagok a kontroll csoportoktól való eltérést (* $p<0,05$, ** $p<0,01$), a kettős keresztek az AVP+ csoporttól való eltérést (# $p<0,05$, ## $p<0,01$) jelzik.

6. 4. Glüko- és mineralokortikoidok szintek korfüggő összehasonlítása Wistar patkányokban

6. 4. 1. Lipopoliszacharid kezeléssel kiváltott immunválasz

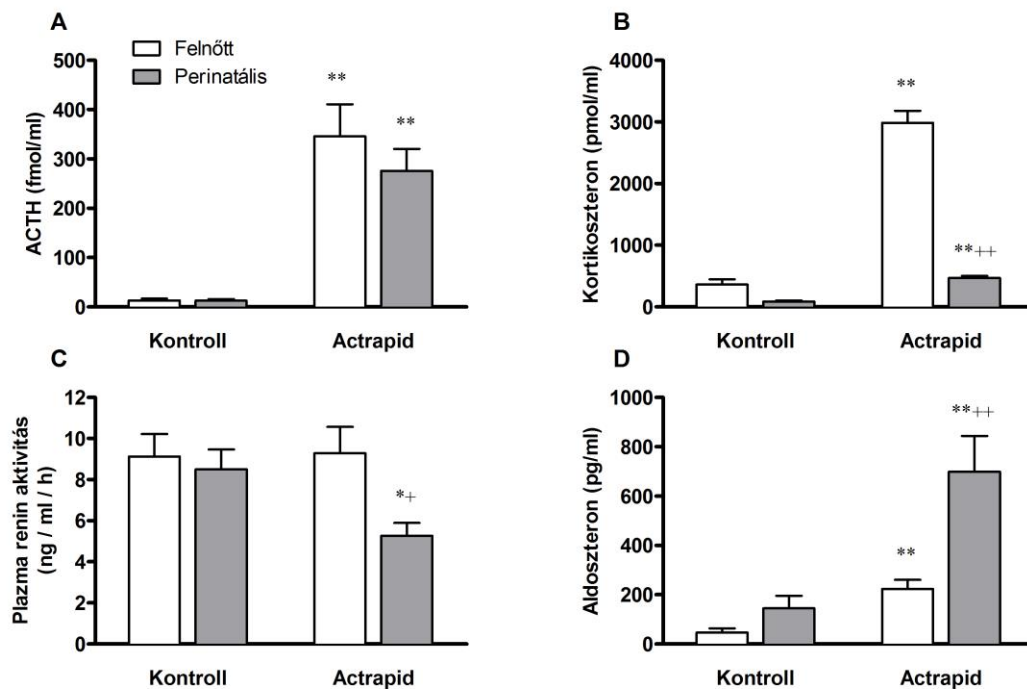
Bakteriális fertőzés modellezése során a Wistar patkányok hormonszintjei az AVP+ Brattleboro patkányoknál (2. 1. 1.) látottaknak megfelelően változtak. Stresszor hatására kortól függetlenül egyforma ACTH növekedés volt megfigyelhető felnőtt és perinatális állatokban is (stresszor hatása: $F(1,33)=31,90$; $p<0,01$; 34. ábra, A diagramm). A kortikoszteron szintek szintén megemelkedtek, de a perinatális kori növekedés jelentősen elmaradt a felnőtt korban látottól (stresszor hatása: $F(1,33)=1120,68$; $p<0,01$; kor hatása: $F(1,33)=784,84$; $p<0,01$; stresszor – kor interakció: $F(1,33)=592,04$; $p<0,01$; 34. ábra, B diagramm). Bár stresszor hatására az aldoszteron szintek mind felnőtt, mind perinatális korban szignifikánsan megemelkedtek (34. ábra, D diagramm), a növekedés perinatális korban jóval kifejezettebb (stresszor hatása: $F(1,33)=60,64$; $p<0,01$; kor hatása: $F(1,33)=30,96$; $p<0,01$; stresszor – kor interakció: $F(1,33)=24,55$; $p<0,01$). A plazma renin aktivitás az aldoszteron szintekhez hasonlóan alakult (stresszor hatása: $F(1,33)=41,74$; $p<0,01$; kor hatása: $F(1,33)=36,10$; $p<0,01$; stresszor – kor interakció: $F(1,33)=26,12$; $p<0,01$; 34. ábra, C diagramm).



34. ábra Felnőtt és perinatális korú Wistar patkányok LPS stressz során mért ACTH, kortikoszteron, plazma renin és aldoszteron aktivitás változásai. A csillagok a kontroll csoportoktól való eltérést (**p<0,01), a keresztek a felnőtt csoporttól való eltérést (++p<0,01) jelzik.

6. 4. 2. Inszulin kezeléssel kiváltott hipoglikémia

Wistar patkányokban az Actrapid kezelés hatására a Brattleboro-knál látottakhoz hasonlóan (23. ábra) mindkét korcsoportban egyforma mértékben lecsökkentek a vércukorszintek (stresszor hatása: $F(1,49)=524,0$; $p<0,01$; nem bemutatott adat) és az ACTH szintek megemelkedtek (stresszor hatása: $F(1,49)=58,04$; $p<0,01$; 35. ábra, A diagramm). A kortikoszteron növekedés korfüggést mutatott, a perinatális emelkedés kisebb volt (stresszor hatása: $F(1,49)=233,80$; $p<0,01$; kor hatása: $F(1,49)=202,63$; $p<0,01$; stresszor – kor interakció: $F(1,49)=130,70$; $p<0,01$; 35. ábra, B diagramm). Az aldoszteron szintek stresszor hatására korfüggő módon változtak, viszont a kortikoszteron esetén látottól eltérően a perinatális értékek háromszorosan felülmúlták a felnőtt kori értékeket (stresszor hatása: $F(1,49)=16,95$; $p<0,01$; kor hatása: $F(1,49)=10,46$; $p<0,01$; stresszor – kor interakció: $F(1,49)=4,51$; $p<0,05$; 35. ábra, D diagramm). A plazma renin aktivitás változások nem magyarázták az aldoszteron szintek változásait, a perinatális kori stresszelt szintek csökkenését mutattak (kor hatása: $F(1,49)=5,59$; $p<0,05$; 35. ábra, C diagramm).



35. ábra Felnőtt és perinatális korú Wistar patkányok hipoglikémiás stressz során mért ACTH, kortikoszteron, plazma renin aktivitás és aldoszteron változásai. A csillagok a kontroll csoportoktól való eltérést (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), a keresztek a felnőtt csoporttól való eltérést (+ $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$) jelzik.

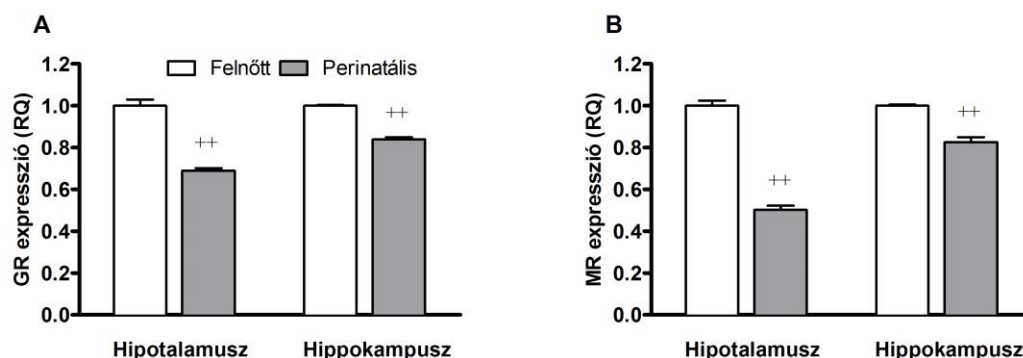
6. 4. 3. PCR mérések

6. 4. 3. 1. Glükokortikoid receptorok

Perinatális korban a GR szintek alacsonyabbak a felnőtt állatokban tapasztalható értékekhez képest mind a hipotalamuszban (kor hatása: $F(1,4)=155,27$; $p < 0,01$), mind a hippocampuszban (kor hatása: $F(1,4)=329,69$; $p < 0,01$; 36. ábra, A diagramm).

6. 4. 3. 2. Mineralokortikoid receptorok

Perinatális kori MR szint csökkenés szintén megfigyelhető mindkét agyterületen (hipotalamusz kor hatása: $F(1,4)=385,75$; $p < 0,01$; hippocampusz kor hatása: $F(1,4)=74,04$; $p < 0,01$; 36. ábra, B diagramm).



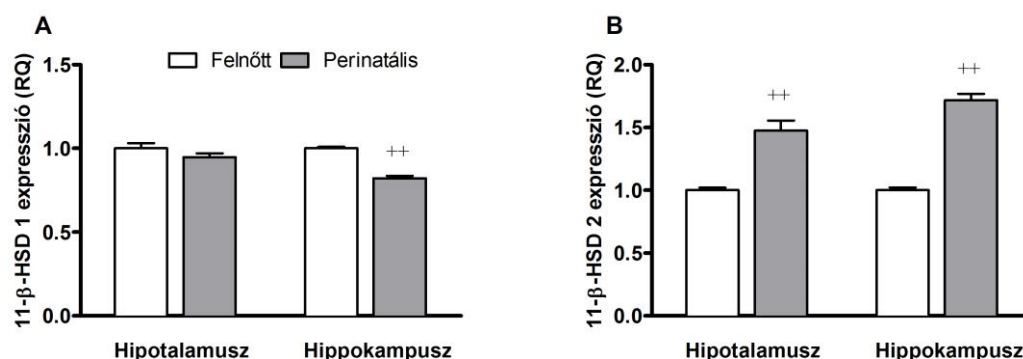
36. ábra Felnőtt és perinatális korú Wistar patkányok glükó- és mineralokortikoid receptor mRNS eltérései. A keresztek a felnőtt csoporttól való eltérést ($++p<0,01$) jelzik.

6. 4. 3. 3. 11- β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1

A hipotalamuszban nem találtunk különbséget a két korcsoport között, míg a hippocampuszban a perinatálisán mérhető 11- β -HSD1 szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a felnőtt értékeknél (kor hatása: $F(1,4)=168,39$; $p<0,01$; 37. ábra, A diagramm).

6. 4. 3. 4. 11- β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 2

A Wistar patkányok hipotalamuszában (kor hatása: $F(1,4)=50,98$; $p<0,01$) és hippocampuszában (kor hatása: $F(1,4)=249,61$; $p<0,01$) mért 11- β -HSD2 szintek korfüggést mutattak; a perinatális korú állatok értékei 50-75%-al magasabbak voltak felnőtt társaikénál (37. ábra, B diagramm).



37. ábra Felnőtt és perinatális korú Wistar patkányok 11- β -HSD 1-2 kortikoszteron aktiváló – inaktiváló enzim mRNS eltérései. A keresztek a felnőtt csoporttól való eltérést ($++p<0,01$) jelzik.

6. 4. 4. Immunhisztokémiai vizsgálatok

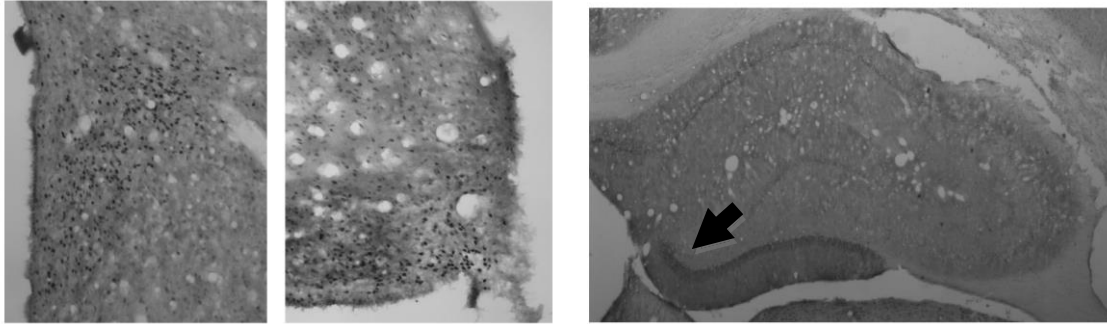
Glükokortikoid receptorok

Felnőtt

PVN

MBH

hippokampusz

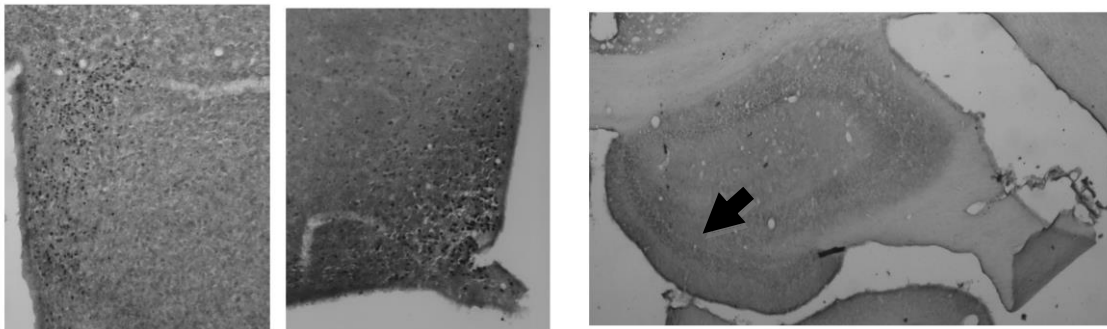


Perinatális

PVN

MBH

hippokampusz

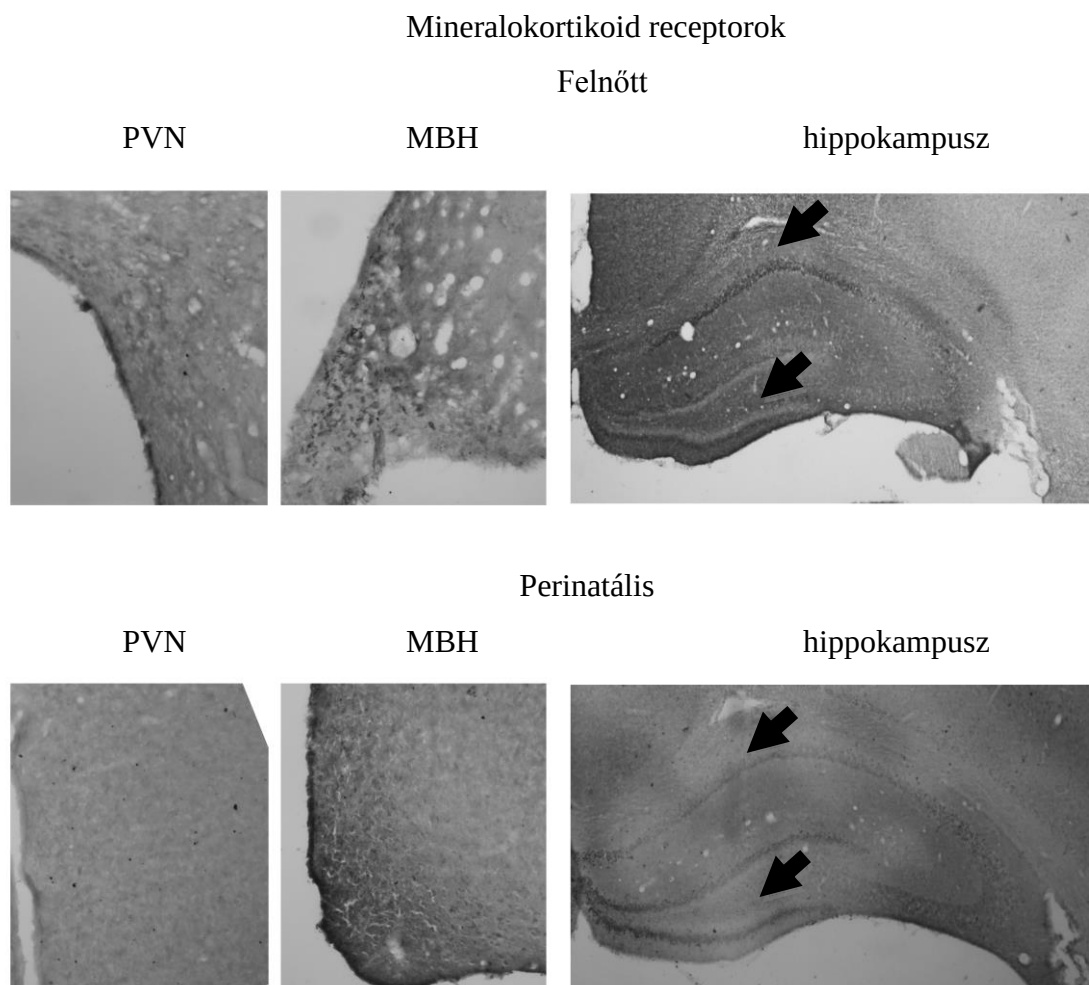


38. ábra Reprezentatív ábrák a felnőtt és perinatális korú Wistar patkányok glükokortikoid receptor eloszlásáról immunfestéssel hipotalamuszban (PVN, MBH) és a hippocampuszban. Hippokampusz esetén a nyílak a különböző intenzitással festődő területeket jelzik.

A kvantitatív PCR során kapott korfüggő mRNS különbségek megerősítésére kiegészítő vizsgálatként Wistar patkányokban receptor fehérje szint méréseket is végeztünk.

A szemléltető ábrákon megfigyelhető, hogy a PCR mRNS mérésekkel egybevágóan a perinatális korú állatok PVN-jében és MBH-jában kevesebb GR pozitív sejtmag található. A hippocampusz esetén a dentate gyrus területén látunk alacsonyabb szinteket a perinatális állatok mintáiban (38. ábra).

Alacsonyabb MR festődés figyelhető meg a fiatal állatok MBH és a hippocampusz CA1 régiójában is. Ezzel szemben a dentate gyrus területén magasabb MR festődést látunk (39. ábra).



39. ábra Reprezentatív ábrák a felnőtt és perinatális korú Wistar patkányok mineralokortikoid receptor eloszlásáról immunfestéssel hipotalamuszban (PVN, MBH) és a hippocampuszban. Hippokampusz esetén a nyilak a különböző intenzitással festődő területeket jelzik.

7. Megbeszélés

7. 1. AVP szerepe krónikus stressz során felnőtt korban

Korábbi feltételezések szerint krónikus stressz során a stressz-tengely fokozott működésének fenntartásában a megnövekedett AVP elválasztás játszik kulcsszerepet (Aguilera 1994, Aguilera és Rabadan-Diehl 2000, Dallman 1993). Ennek ellenére 2 héten keresztül alkalmazott stresszorok esetén sem Brattleboro patkányokban (lsd bevezetés), sem V1b antagonistá kezelés esetén (Chen és mtsai 2008) nem sikerült igazolni az AVP fokozott szerepét a HHM tengely szabályozásában. A bemutatásra került 5 hetes CMS alkalmazása során kapott eredményeink valamennyire alátámasztják az AVP krónikus stressz-folyamatok során betöltött kritikus szerepét. Ugyan a genotípusnak nem volt hatása a CMS során mért ACTH szint növekedésre, de a CMS hatására kialakuló kortikoszteron-szint változás AVP hiány esetén elmaradt. Ezzel összefüggésben előző kísérletsorozatunkban a 4 hetes ismételt mozgáskorlátozás során megfigyelhető számos szomatikus (testsúly csökkenés, csecsemőmirigy beolvadás) és HHM tengely paraméter (CRH mRNS a PVN-ben, POMC mRNS az első lebenyben, nyugalmi kortikoszteron-szint emelkedés) változás az AVP-hiányos állatokban nem alakult ki (Zelena és mtsai 2007).

Mivel az AVP-hiányos állatok vízfogyasztása fokozott, felmerül a kérdés, hogy a CMS stressz egyik elemeként használt víz depriváció nem jelent-e erősebb distresszt számukra (Valtin és Schroeder 1964). A várakozással ellentétben 48 órás vízmegvonás hatására bekövetkező ozmolaritás változások és a szerotonin bioszintézishez nélkülözhetetlen triptofán hidroxiláz változások AVP-hiányos állatokban kisebbek voltak, mint Wistar patkányban (Popova és mtsai 2002). Továbbá amennyiben a vízmegvonás AVP-hiányos állatokban erősebb stimulus lett volna, meg kellett volna nőjön a vízfogyasztásuk a CMS kísérlet ideje alatt, viszont ezzel ellentétesen víz fogyasztás csökkenést sikerült megfigyelnünk (Varga és mtsai 2011).

Mivel az ACTH szintekben nem találtunk különbségeket, felvetődik **kompensációs mechanizmusok** megjelenésének a lehetősége is. Egyik ilyen szabályozó molekula lehet a CRH, de a kísérlet során a PVN-ben mért CRH mRNS szintek bár szignifikánsan különböztek, az AVP-hiányos állatok mutattak csökkent

értékeket (AVP+: $60,5 \pm 1,4$, AVP-: $54,1 \pm 1,01$, genotípus hatása: $F(1,5)=11,9$, $p=0,01$). Korábbi vizsgálatok nem találtak sem fokozott CRH immunoreaktivitást (Burlet és mtsai 1983), sem fokozott CRH termelést (Tannahill és mtsai 1988) az AVP-hiányos állatok hipofízisében. Tehát az AVP hiányt nem kompenzálja CRH termelődés változás.

Szerkezeti hasonlóságai miatt az OT is átveheti az AVP szabályozó szerepét. Az OT képes a V1b receptorokhoz is kötődni és ott AVP-szerű hatásokat kiváltani (Lee és mtsai 1995, Schlosser és mtsai 1994), így elképzelhető, hogy az OT kompenzáló hatása maszkírozza el az AVP hiányból fakadó hatásokat. RIA méréseink viszont mind a hipofízis (AVP+: $184,1 \pm 12,8$ ng, AVP-: $88,7 \pm 14,4$ ng, $F(1,14)=24,6$, $p<0,01$) mind a hipotalamusz (AVP+: $6120,0 \pm 396$ ng, AVP-: 1677 ± 162 ng, $F(1,14)=107,5$, $p<0,01$) esetén az AVP-hiányos állatok csökkent OT peptid termelését mutatják. Eredményeink alátámasztják a korábbi megfigyeléseket, melyek szintén nem találtak OT kompenzációt (Tannahill és mtsai 1988). Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy korábbi munkánk során megemelkedett OT mRNS szinteket sikerült kimutatni AVP-hiányos állatok PVN-jében (Zelena és mtsai 2009).

Összességében megállapíthatjuk, hogy sem a CRH, sem az OT nem kompenzálja a Brattleboro állatokban az AVP hiányát. Igazán hosszan tartó (min 4 hetes) krónikus stresszelés szükséges az AVP HHM tengely szabályozásában betöltött szerepének megjelenéséhez, mely ekkor is csak a tengely bizonyos részeit érinti.

7. 2. Az AVP korfüggő szerepe a HHM tengely szabályozásában akut stressz során

A stresszorok egy jelentős részét azok jellegéből kifolyólag csak az egyik korosztályon lehet hatékonyan alkalmazni (pl. krónikus stressz, anyai elválasztás), ami részben magyarázhatja az egymásnak ellentmondó eredményeket. Hogy ezt kiküszöböljük, olyan stresszorokat választottunk, melyek mind felnőtt, mind perinatális korban egyformán alkalmazhatók (ld. bakteriális fertőzés modellje - LPS, hipoglikémia).

Korábbi eredményeink arra utaltak, hogy az AVP szabályozó szerepe **felnőtt korban** erősen stresszor-függő (Zelena és mtsai 2009). A disszertációban bemutatott mindkét stresszor (LPS kezelés és hipoglikémia) esetén is hasonló következtetést

vonhatunk le. Azaz az AVP-hiányos felnőtt állatok kortikoszteron válasza nem tért el a normál AVP termelésű társaikhoz képest, ugyanakkor míg ACTH termelésük LPS injekciónál nem különbözött, addig hipoglikémiás stressznél 50 %-al alacsonyabb értékek voltak kimutathatóak az AVP-hiányos állatokban, mint AVP+ társaikban. Az alkalmazott V1b receptor antagonistá mennyiség (10mg/kg, irodalomban sokszor alkalmaznak 30mg/kg-os mennyiséget is, de itt egy kisebb, esetleg 10 napos állatban még ható dózis alkalmazására törekedtünk (Hodgson és mtsai 2007)) sem befolyásolta a felnőtt állatok LPS injekcióra létrejövő ACTH és kortikoszteron emelkedését se. Az AVP ACTH elválasztás szabályozásában betöltött szerepét tekintve jelen eredményeink egybevágnak számos más módszerrel tett megfigyelésekkel. Felnőtt állatokban AVP immunneutralizálás (Muret és mtsai 1992, Tilders és mtsai 1985), V1b receptor KO egereken végzett vizsgálatok (Tanoue és mtsai 2004) és V1b receptor antagonisták alkalmazása (Serradeil-Le Gal és mtsai 2002) során is hasonló, az AVP-nek az ACTH elválasztás szabályozásában betöltött részleges szerepéről számoltak be. Azaz kijelenthetjük, hogy felnőtt patkányokban az AVP stressz-tengely szabályozásában betöltött szerepe erősen kontextus függő, és nem követ egyetlen ismert stresszor csoportosítási rendszert sem (pl erős-gyenge; fizikai-pszichogén; szisztémás-neurogén, interoceptív-exteroceptív). Bár egyes korábbi elképzelések szerint az AVP-nek elsősorban a pszichogén stresszorokra adott válasz során van szerepe (Angelucci és Scaccianoce 1990), megfigyeléseink ezt sem támasztották alá.

Az SHRP teóriája szerint **perinatális korban** a stressz-reaktivitás csökken. Ezzel ellentétben az általunk alkalmazott stresszorok (LPS, hipoglikémia) esetén normál AVP termelésű 10 napos Brattleboro patkányoknál (és később Wistar patkányoknál is) a felnőttekével összemérhető ACTH szintek alakultak ki. Viszont a kortikoszteron szintek vonatkozásában tényleg kimutatható a csökkent reaktivitás. Ezért arra következtethetünk, hogy az SHRP a glükokortikoid szintek alakulására vonatkozik.

Perinatális korban az elülső hipofízis leány CRH érzékenysége is erősen csökkent, ugyanaz a CRH stimulus kicsikben 50%-os, míg felnőttekben 600-800%-os ACTH növekedést indukál. Tehát perinatális korban egy másik hipotalamikus faktor, vélhetőleg az AVP felel az ACTH válasz kialakításáért (Avishai-Eliner és mtsai 1995). Valóban, a perinatális korú AVP-hiányos Brattleboro patkányok minden vizsgált stresszor esetén alacsonyabb ACTH növekedést mutattak. LPS stresszor esetén ezt az

eredményt V1b előkezelés és AVP antiszérum alkalmazásával is sikerült megerősítenünk, ami egy génhiányos állatban (jelen esetben a Brattleboro patkányban) előfordulható minden lehetséges kompenzáció befolyásoló szerepét kizárja. Eredményeinket alátámasztja, hogy az AVP jelentősen nagyobb mennyiségben szekretálódik perinatális korban, mint felnőtt állatokban (Levine 2001, Muret és mtsai 1992). Kísérleteink során tehát megerősítést nyert, hogy az SHRP alatt az AVP az ACTH elválasztás fő szabályozója és ez a hatás stresszor-független. Összhangban azzal a ténnyel, hogy a nyugalmi ACTH elválasztás az SHRP alatt relatíve független a hipotalamikus faktoroktól (Walker és mtsai 1997), az AVP szabályozó szerepe is csak a stressz-indukálta változásokra korlátozódik.

Az AVP direkt ACTH termelésére gyakorolt közvetlen hatásán túl elképzelhető, hogy hiánya indirekt módon is befolyásolja a stressz-tengely működését. A hipotalamusz működését amigdaláris és hippokampális központok is szabályozzák, melyek sejtjei V1b receptorokat is nagy mennyiségben fejeznek ki (Young és mtsai 2006). Ezek a felsőbb agyi központok az SHRP fenntartását szolgáló anyai szignálok továbbításában és a stresszor indukálta stimulusok hipotalamuszhoz való juttatásában is fontos szerepet töltenek be (Schmidt és mtsai 2005). Így a hipotalamusz csökkent idegi stimulációja szintén hozzájárulhat a csökkent ACTH válaszhoz genetikai, farmakológiai vagy akár immunológiailag létrehozott AVP hiány esetén is.

Érdekes megfigyelés, hogy perinatális korban az AVP-hiányos állatok mindkét vizsgált stresszor (LPS, hipoglikémia) alkalmazása során magasabb kortikoszteron szinteket produkáltak normál AVP termelésű társaiknál, ami felveti annak a lehetőségét, hogy az erősebb kortikoszteron negatív visszacsatolás is hozzájárulhat a csökkent ACTH termeléshez. Ugyanakkor a V1b antagonistával és immunneutralizációval végzett kísérleteink esetén mért alacsonyabb kortikoszteron szintek nem támasztják alá ezt az elképzelést.

Fontos, hogy az AVP-hiányos állatok nyugalmi kortikoszteron szintjei magasabbak a kontroll állatokhoz képest, különösen perinatálisan. A megemelkedett szintek nem járnak együtt nyugalmi ACTH-szint emelkedéssel, azaz kialakításukat a szervezet a hipofízis megkerülésével éri el. A megemelkedett szintek hatása csak részben kompenzálódik, pl perinatálisan az AVP-hiányos állatok megnövekedett CBG szintjeivel. A tartósan magas glükokortikoid szintek az általános elképzelés szerint

viszont káros hatásúak nemcsak a fejlődő állatokra nézve (pl.: 10 napos állatok testsúlya AVP+: $18,28 \pm 0,81$ g; AVP-: $14,32 \pm 0,90$ g), hanem a felnőtt állatokban is, illetve emberben Cushing betegség kialakulásához vezetnek (Horio és mtsai 1981). Felmerül a kérdés, hogy lehet-e mégis előnyös élettani funkciója a magas kortikoszteron szintnek, ami miatt alig kompenzálódik.

A **glükokortikoid pozitív élettani hatását** támasztja alá, hogy mellékvese-irtott állatok kortikoszteronpótlás nélkül hosszú távon életképtelenek (Perretti és mtsai 1991). Továbbá a glükokortikoidok adaptív hatásának alátámasztására Szent Pétervár-i partnerünk, Ludmilla Filaretova számos kísérletben igazolta a kortikoszteron gasztroprotektív hatását is. Saját AVP-hiányos állatainkban feltételezhetjük, hogy a fokozott kortikoszteron termelés a hiányzó AVP valamely kiesett élettani hatását/hatásait pótolja. Bár az AVP fő hatása a só- és vízháztartásra, míg a kortikoszteroné elsősorban az energia háztartásra terjed ki, találhatunk közös élettani hatásokat is. Például mindkét hormon esetén kimutattak érösszehúzó hatást is (AVP: (Beaulieu 2013, Johnston 1985); glükokortikoidok indirekt, katekolamin érzékenységet fokozó (Yang és Zhang 2004) vagy nitrogénmonoxid szintet csökkentő (Whitworth és mtsai 2000) hatáson keresztül). Ezért a vérnyomás szabályozás lehet az egyik homeosztatikus paraméter, amit AVP hiányában a megemelkedett kortikoszteron szintek látnak el. Ismert, hogy felnőtt Brattleboro patkányok artériás vérnyomása alacsonyabb (Parry és mtsai 1998, Pencheva és Gindeva 1991), és deoxikortikoszteron kezelés hatására is lassabban emelkedik meg kontroll társaikhoz képest (Intengan és mtsai 1999). Perinatális korú Brattleboro patkányok vérnyomás változásait nem vizsgálták, viszont Wistar kispatkányban AVP blokkolóval (alfa 1 adrenoceptor antagonist és angiotenzin 2 receptor antagonist jelenléte mellett) vérnyomás csökkenést lehet elérni (Blumberg és mtsai 2001). Humán vizsgálatok arra utalnak, hogy az alacsony születési súllyal világra jött gyerekeknél a gyakori hipotenzió AVP-vel és agonistáival jól kezelhető (Kaga és mtsai 2013). Mindezek alapján elképzelhető, hogy az AVP hiányában megjelenő fokozott kortikoszteron termelés a vérnyomás fenntartására irányul, bár teljes mértékben nem tudja kompenzálni a kieső hatást.

7. 3. Az ACTH független glükokortikoid szekréció

A kísérletek során megfigyelhettük, hogy bár az AVP tekinthető az ACTH elválasztás fő szabályozójának perinatális korban, de a kortikoszteron szintekre nincs ugyanilyen befolyással. Mielőtt tovább gondolnánk az ACTH-glükokortikoid szekréció disszociációját fontosnak tűnik kizárni a mérési módszereinkből, érzékenység különbségekből adódó eltéréseket.

7. 3. 1. Kizárandó jelenségek

7. 3. 1. 1. *Eltérő időbeli lefutás*

Fontos kérdés a mintavételezés **időzítése**. Mivel a stresszorokra adott kortikoszteron válasz késve követi az ACTH választ (Engeland és mtsai 1977), a két amplitudó időben elcsúszik egymástól, így a mintavételezés idejének helytelen megválasztása ellentmondásokhoz vezethet. Mivel a perinatális korban általunk eddig alkalmazott legrövidebb stresszorunk 1 óra tartamú volt (anyai elválasztás), ezért kritikusnak tűnt megvizsgálni ennél rövidebb idejű stresszort is (10 perces anyai elválasztás). Már ebben a nagyon korai időpontban is megfigyelhetjük, hogy az AVP-hiányos állatok csökkent ACTH választ nem követik alacsonyabb kortikoszteron szintek, azaz a két hormon szintjének disszociációja nem magyarázható eltérő időbeli lefutással. Ugyan a V1b receptor antagonistá alkalmazása esetén csak egy tendenciát láttunk csökkent ACTH szintekre, de ebben az esetben feltételezhetjük, hogy hosszabb időre lett volna szükség a teljes hatás kifejlődéséhez. A komplexebb hatást, magasabb agyi struktúrák érintettségét is igazolja az AVP ACTH elválasztásra gyakorolt hatásában az, hogy a V1b receptor antagonistá USV-re gyakorolt hatása már ennyi idő alatt is kifejlődött, ellentétben a HHM tengelyre gyakorolt hatással.

USV eredményeink alátámasztják továbbá az AVP **szorongásban** betöltött szerepét, mely már egész perinatális korban is megfigyelhető, nemcsak a felnőtt állatokban (lsd. Bevezetés). Eredményeink megerősítenek néhány korábbi megfigyelést, melyek AVP szubkután adását követően USV emelkedésről számoltak be (Winslow és Insel 1993). Lin és mtsai korábbi munkái (Lin és mtsai 2013) is azt mutatták, hogy egy 2 perces megfigyelési idő alatt a vokalizációk közötti időtartam szignifikánsan nagyobb volt

AVP-hiányos állatokban, de ők nem találtak különbséget a vokalizációk frekvenciájában. V1b receptor antagonistával végzett korábbi kísérletek is arra utaltak, hogy hosszabb időtartamú mérés és/vagy nagyobb dózis lehet szükséges szignifikáns hatások kimutatásához (Hodgson és mtsai 2007, Iijima és Chaki 2005). Mivel még a nagyobb, 30mg/kg-os SSR149415 beadás után se mutattak a kisállatok szedatív mellékhatást (fokozott latencia a hasrafordulási és negatív geotaxis tesztekben) megállapíthatjuk, hogy az AVP antagonizmus anxiolitikus hatású perinatálisan is. Bár egy másik modellben, a V1b receptor knockout egérben nem találtak különbséget az USV-ben alap állapotban, de ismételt anyai elválasztásra normálisan bekövetkező USV fokozódás a V1b receptorral nem rendelkező állatokban nem alakult ki (anyai potencírozású USV (Scattoni és mtsai 2008)). Ugyan az SSR149415 az agyalapimirigy V1b receptorain keresztül, a HHM tengely befolyásolásával van hivatva kifejteni a hatását (Aguilera és mtsai 2008, Serradeil-Le Gal és mtsai 2003), de jelen eredményeink (korreláció hiánya az ACTH és a magatartás között) nem támasztják alá ezt az elképzelést. Azaz nem hipofízeális, hanem más centrális (vagy perifériás) V1b receptorok játszhatnak szerepet az AVP szorongáskeltő hatásában (Gallo-Payet és Guillon 1998). Mostanában publikált vizsgálatok is az SSR149415 szorongásra gyakorolt extra-hipotalamikus támadáspontjára utalnak, mivel a CRH és AVP antagonisták nem erősítették egymás magatartási hatását, ellentétben a HHM tengelyre gyakorolt additív hatásukkal (Ramos Ade és mtsai 2014).

7. 3. 1. 2. CBG szintek

Egy általánosan alkalmazott savanyítási lépés a RIA mérés során leválasztja a glükokortikoidokat a kötő fehérjéről. Ezáltal elkerülhető, hogy a minta kezelése során bekövetkező kötődési változások miatt kapjunk téves eredményeket. Ugyanakkor ezáltal nem a biológiailag aktív, hanem az össz glükokortikoid mennyiséget (szabad + CBG-hez + egyéb fehérjéhez kötött) mérjük. Mivel logikusnak tűnik feltételezni, hogy a szabad (és nem az összes) kortikoszteron szintek követik az ACTH szint változásokat (Bornstein és mtsai 2008), a CBG szinteket is megmértük. A perinatális korú állatok kb 30%-al alacsonyabb CBG szinteket mutattak, mint a felnőttek, ami önmagában nem elégséges a csökkent kortikoszteron szintek (kb 65-75%-al alacsonyabb nyugalmi szintek) kompenzálására (Zelena és mtsai 2011). Felnőtt állatok kontroll és AVP-

hiányos genotípusai között a CBG szintek nem mutatnak különbséget, így az AVP-hiányos állatok relative (csökkent ACTH szintekhez viszonyított) fokozott kortikoszteron termelésére ez nem magyarázat. Ugyanakkor perinatális korban az AVP-hiányos állatok magasabb, a felnőttekét megközelítő CBG szinteket mutattak, ami kis mértékben ellensúlyozza az AVP hiányában perinatális korban látott abnormálisan magas kortikoszteron szinteket.

7. 3. 1. 3. Mellékvese érzékenység

Felmerült az a lehetőség is, hogy a mellékvese-kéreg kor és genotípusok szerint eltérő ACTH érzékenysége miatt egyes állatokban (pl 10 napos AVP-hiányos patkányok) kis ACTH változások is nagy glükokortikoid szint változásokat eredményezhetnek (O'Connell és mtsai 2000, Ulrich-Lai és mtsai 2006). Ezt a kérdést in vitro, statikus inkubálási rendszerben vizsgáltuk. Bár kísérleteink során a perinatális korú állatok mellékveséje jóval kevesebb kortikoszteront választott el a médiumba, de ez adódhat abból is, hogy mindkét korcsoport méretileg igen különböző (4mg vs 40mg) mellékveséjét ugyanolyan mennyiségű tápfolyadékban inkubáltuk. Mindenesetre az ACTH kezelés hatására mért kortikoszteron termelés változás (amplitúdó) nem különbözött a két korosztály között. Várakozásainknak megfelelően perinatális korban az AVP-hiányos állatok mellékveséi fokozottabb kortikoszteron elválasztással válaszoltak az ACTH-ra, de a növekedés alig 25-30%-os, így ez önmagában csak részben magyarázhatja az in vivo kísérletek során látott disszociációt (Zelena és mtsai 2011). Az AVP hiányos állatok mellékvese kérgének fokozott ACTH érzékenysége megmagyarázza, hogy a normál AVP termelő állatok miért nem mutattak fokozott kortikoszteron szinteket V1b antagonistá kezelést követően. Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy a perinatálissal ellentétben felnőtt állatokban egyáltalán nem láttunk különbséget a mellékvese-kéreg ACTH érzékenységében a két genotípus között.

7. 3. 2 ACTH független glükokortikoid szekréció

Brattleboro patkányokban AVP hiány hatására kis ACTH szintekhez nagy kortikoszteron szintek társulhatnak. Felnőtt AVP-hiányos állatok esetén egyes stresszorok (pl. hipoglikémia) hatására bár kisebb ACTH válasz jelentkezik, de a kortikoszteron szintekben a két genotípus nem mutat különbséget. V1b antagonistával

(Spiga és mtsai 2009) és V1b receptor génkiütött egereken (Stewart és mtsai 2008) végzett kísérletek is hasonló eredményekről számolnak be. Perinatális korban a disszociáció még nagyobb méreteket ölt, az AVP-hiányos kicsikben ACTH növekedés elmaradása mellett figyelhetünk meg magas kortikoszteron szinteket. Fontos megemlíteni, hogy V1b antagonistá és AVP antiszérum alkalmazásával végzett kísérleteink során az abnormálisan magas kortikoszteron szint növekedés perinatális korban elmaradt, bár az alacsonyabb ACTH-szintekhez ezekben az esetekben is relatíve magas kortikoszteron szintek társulnak. Mivel a CBG szint mérések és a fokozott mellékvese érzékenység felnőtt korban egyáltalán nem, perinatális korban csak részlegesen adtak magyarázatot a disszociáció jelenségére, ezért megállapíthatjuk, hogy létezik ACTH független glükokortikoid elválasztás is (Bornstein és mtsai 2008).

7. 3. 2. 1. *Mellékvese katekolaminok*

A stressz-reakció első fázisa során az alarm, vagy Cannon-féle vészreakció alatt a mellékvese-velőből kiáramló katekolaminok (elsősorban adrenalin) játszanak fontos szerepet (Cannon és De La Paz 1911, Goldstein 2003). Az adrenalin felszabadulása a mellékvese-kéreg közvetlen közelében történik, így nagy koncentrációban éri el a glükokortikoid termelés helyszínét, valamint felszabadulása időben is megelőzi a glükokortikoid elválasztás fokozódását a stressz-reakció folyamatában. Ezen túl a mellékvesekéreg splanchnikus beidegzést is kap, ami elsősorban noradrenalin felszabaduláson keresztül szabályozza a működését (Edwards 1997, Holzwarth és mtsai 1987). Mindezek hatására a lehetséges szabályozó faktorok közül a katekolaminokra, azon belül is a β adrenoreceptorokra koncentráltunk.

Ismert, hogy AVP-hiányos Brattleboro patkányokban a katekolaminok mennyisége az agyban (Holzbauer és mtsai 1980) és a plazmában is (Kvetnansky és mtsai 1990) magasabb normál AVP termelésű társaikénál. Ez hozzájárulhat a sokszor már nyugalmi állapotban is magasabb kortikoszteron szintek kialakulásához, illetve a stressz-reakció során -legalábbis az ACTH-hoz képest- fokozott glükokortikoid elválasztáshoz. Bár in vitro számos szerző vizsgálta különféle faktorok hatását, in vivo, az endogén hatások feltérképezésére nem volt igazán jó modell. A 10 napos AVP-hiányos állatok segítségével (ahol ACTH válasz hiánya mellett figyelhető meg fokozott kortikoszteron elválasztás) in vivo körülmények között igazoltuk, hogy a

mellékvesékből felszabaduló adrenalin hatással van a kortikoszteron termelésre β adrenoreceptorokon keresztül. In vitro kísérleteink alátámasztják, hogy ez a hatás közvetlen. Tehát stressz folyamatok során a szimpatoadrenomedulláris tengelynek is kulcsfontosságú szerep jut a kortikoszteron felszabadulásban (Elifanov és mtsai 1988, Makara és mtsai 2012). A β adrenoreceptor antagonistá azonban nem törölte el teljesen a kortikoszteron választ, így feltételezhető más szabályozó faktorok szerepe is.

Számos egyéb faktorról (neuropeptidek, neurotranszmitterek, opioidok, növekedési faktorok, citokinek, adipokinek, bakteriális ligandok) ismert, hogy képes szabályozni a glükokortikoidok felszabadulását (Ehrhart-Bornstein és mtsai 2000, Engstrom és mtsai 2008, Lamounier-Zepter és Ehrhart-Bornstein 2006, Schinner és Bornstein 2005, Zacharowski és mtsai 2006). Ezen kívül zsírszövetből és az érfalból származó faktorok glükokortikoid termelést fokozó hatását is leírták (Ansurudeen és mtsai 2007). Továbbá az intraadrenális parakrin szabályozás is jelentősen hozzájárul a mellékvese-kéreg működéséhez (Nussdorfer 1996). Ezek a molekulák a stresszor fajtájától függően jelen lehetnek és befolyásolhatják a kortikoszteron felszabadulását.

Teoretikusan az is elképzelhető, hogy SHRP során és/vagy AVP hiányában a POMC enzimátikus hasítása változik meg, melynek eredményeként ACTH helyett egyéb kortikoszteroid termelést elősegítő molekulák képződnek. Persze ez azt is feltételezi, hogy perinatális korban az AVP-hiányos és normál AVP termelésű állatok nyugalmi állapotban is eltérő ACTH fragmentumokat szintetizálnak, mely különbség később felnőtt korra csökken. Továbbá az ACTH fragmentumok kortikoszteron termelést stimuláló hatása messze elmarad (kb 70-szeres különbség) az ACTH hatásától (Feuilloley és mtsai 1990), így az esetlegesen megváltozott proteolitikus hasítás önmagában aligha magyarázza az ACTH – kortikoszteron disszociációt.

7. 3. 2. 2. *Glüko- és mineralokortikoid szintek*

A glüko- és mineralokortikoidok szerkezeti hasonlósága, receptoraik átfedése vezetett minket arra az elképzelésre, hogy perinatálisan az ACTH a kortikoszteronon kívül esetleg más szteroid hormonok termelődését is serkentheti, melyek képesek lehetnek akár glükokortikoid-szerű hatások kiváltására is. Ezen elképzelés szerint a glüko- és mineralokortikoidok együttes termelődése jobban korrelálhat az ACTH szintekkel, mint a glükokortikoid szintek önmagukban, így aldoszteron mérésekre is

sorot kerítettünk. Brattleboro patkányokban vizsgálva hipoglikémiás stressz során perinatális korban nagyobb aldoszteron emelkedést detektáltunk, mint felnőtt korban.

		Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Ozmol. (smosm/l)
Felnőtt	di/+	138,6±1,35	6,71±0,13	98,2±0,95	303±1,54
	di/di	148,3±0,86##	6,5±0,17	107±0,6##	324,8±1,58##
Perinatális	di/+	130±1,02++	7,6±0,14	94,4±0,34++	285,3±1,37++
	di/di	148,5±3,23##	12,98±2,31####	116,1±0,78####	336,2±3,03####

1. Táblázat Felnőtt és perinatális korú Brattleboro patkányok alap állapotban mért ozmolaritás, Na⁺, K⁺, és Cl⁻ ion szintjei. A kettős keresztek az AVP+ csoporttól való eltérést (##p<0,01), a keresztek a felnőtt csoporttól való eltérést (++p<0,01) jelzik.

Mivel a genotípusok között nem találtunk különbséget aldoszteron termelés szempontjából, a hipotézisünk, mely szerint a mellékvesék együttes glüko- és mineralokortikoid termelése jobban korrelál az ACTH szintekkel, mint a kortikoszteron szintek önmagukban, csak részben állta meg a helyét. A különböző genotípusú állatok stresszorra adott hasonló aldoszteron válasza azért is meglepő, mert az AVP hiányos állatok só- és vízháztartásának sérüléséből kifolyólag joggal lett volna várható, hogy az aldoszteron, mint a fenti folyamat szabályozásában részt vevő molekula termelődésének módosulásával igyekszik kompenzálni az AVP hiányt. Bár a vérplazma ozmolaritása és az ennek kialakításáért elsősorban felelős Na⁺ és Cl⁻ ionok szintje jelentős kor és genotípus függő eltéréseket mutatott (1. Táblázat), az aldoszteron termelést alapvetően meghatározó K⁺ alapszintek jól korreláltak a nyugalmi aldoszteron szintekkel (AVP-kicsikben mutatott egyedül szignifikáns emelkedést).

Meglepő új eredményként a kispatkányok stressz hatására ugyan kisebb kortikoszteron, de magasabb aldoszteron szint emelkedéssel reagáltak, mint a felnőttek, ami felveti a két molekula stressz-folyamat során betöltött relatív fontosságának kor függő változását. Mivel az eredmények túlmutattak az AVP szabályozó szerepén, Wistar patkányban is végeztünk méréseket.

7. 4. Glüko- és mineralokortikoidok szintek korfüggő összehasonlítása Wistar patkányokban

	Felnőtt	Gyerek
ACTH	12x	14x
Kortikoszteron	12x	2,5x
Aldoszteron	6x	13x

2. táblázat Hipoglikémia hatására bekövetkező hormonszint emelkedések mértéke felnőtt és 10 napos kispatkányokban.

Wistar patkányokon végzett kísérleteink két, egymástól jellegében erősen különböző stresszor (LPS, hipoglikémia) esetén is igazolták egy másik patkánytörzsből kapott eredményeinket. Pontosabban mind a bakteriális fertőzés modelljében, mind hipoglikémiás stressz során magasabb aldoszteron szint növekedést mértünk perinatálisan a 10 napos kispatkányokban, mint felnőtt korban, míg a kortikoszteron szintek emelkedése ellentétes irányú korfüggő változást mutatott (2. táblázat).

Perinatális korban hipoxia során mások is figyeltek meg korábban aldoszteron szint emelkedést (Raff és mtsai 1999). Esetükben, míg a kortikoszteron szint változás csupán 2-szeres, az aldoszteron szint a 10-szeresére nőtt. Humán vizsgálatok is hasonló megfigyelésekről számolnak be. 3-4 hónapos csecsemőkben ACTH kezelés hatására 3-szoros aldoszteron szint növekedés váltható ki, míg a kortikoszteron szint növekedés mindössze 1,5-szörös (Jezova és mtsai 1987). Továbbá ismert tény, hogy gyerekkorban a nyugalmi aldoszteron szintek is magasabbak, és csak később csökkennek a felnőtt korra jellemző szintekre (Dotsch és mtsai 2000, Fiselier és mtsai 1983, Sippell és mtsai 1980).

A kispatkányokban LPS stresszor alkalmazása mellett a **RAS rendszer** fokozott aktiválódása is megfigyelhető volt. Mivel az aldoszteron-szintek követték a renin aktivitás változásokat, feltételezhető, hogy az ACTH csak a stressz-folyamatok során és ekkor is a RAS rendszerrel együttműködve vesz részt az aldoszteron elválasztás szabályozásában (Hattangady és mtsai 2012). Az LPS kezelés során kapott értékekhez képest a hipoglikémiás stressz esetén általánosan magasabb renin aktivitás értékeket kaptunk, mely háttérében a kísérlet gondos kivitelezéséhez nélkülözhetetlen előzetes éheztetés állhat (Darlington és mtsai 1989). Ugyanakkor hipoglikémiás stressz során az aldoszteron szintek nem korreláltak a renin aktivitás mérések eredményeivel. Mind

állatkísérletek, mind humán vizsgálatok azt mutatják, hogy ezen stresszor alkalmazása esetében sem a plazma renin aktivitás, sem a noradrenalin szintek nem mutatnak jelentős emelkedést (Jezova és mtsai 1987, Radikova és mtsai 2003). Saját eredményünk szerint viszont az aldoszteron szintek jól követték az ACTH-szintek változásait. Tehát hipoglikémia során az ACTH fontosabb szerepet tölthet be az aldoszteron szintek szabályozásában, mint az angiotenzin II. Ennek némileg ellentmond, hogy in vitro kísérletek során a perinatális korú állatok mellékveséje nem mutatott fokozottabb aldoszteron termelést ugyanakkora ACTH hatására a felnőttekhez képest (Varga és mtsai 2013). Elképzelhető, hogy más peptidek, mint a leptin (Malendowicz és mtsai 1998) és Homer I (Grinevich és mtsai 2011, Grinevich és mtsai 2012) állnak a perinatális korú állatok fokozott aldoszteron termelésének hátterében, de ennek pontos mechanizmusa ismeretlen.

Mivel a hormonszintek alakulása csak utal a lehetséges hatásra, ezért a hatás kifejlődéséhez nélkülözhetetlen receptor/enzim készlet (GR, MR, 11- β -HSD1/2) vizsgálatát is elvégeztük. Ezek során több agyterületen (hipotalamusz, hippocampusz) is csökkent GR, MR és 11- β -HSD1, valamint emelkedett 11- β -HSD2 szinteket találtunk. Tehát perinatális korban a csökkent kortikoszteron szintek a 11- β -HSD2 enzim hatására lokálisan még alacsonyabbak és a kevesebb receptoron kisebb hatást tudnak kifejteni, ami tovább erősíti az aldoszteron funkcionális jelentőségét. A GR és MR receptorok esetén végzett immunhisztokémiai vizsgálataink megerősítették eredményeink hitelességét.

Perinatális korban a **11- β -HSD2** agyban ellátott elsődleges feladata az éretlen, mitotikusan aktív agy sejtjeinek védelme lehet a kortikoszteron károsító hatásaitól (Holmes és Seckl 2006, Wyrwoll és mtsai 2011). A fejlődés során a 11- β -HSD2 mind génexpressziós szinten, mind aktivitásában csökken (Brown és mtsai 1996, Robson és mtsai 1998, Wan és mtsai 2002). Ez hozzájárulhat a glükokortikoidok hatásának korfüggő növekedéséhez (Dotsch és mtsai 2000).

Az agyi **GR** születés utáni növekedését emberben (Sinclair és mtsai 2011), egérben (Schmidt és mtsai 2003) és patkányban is leírták (van Eekelen és mtsai 1991, Yi és mtsai 1994). Érdekes módon öreg korban is alacsony GR receptor számok figyelhetők meg patkányban (Mizoguchi és mtsai 2009). Tehát a posztnatális fejlődés

során az öregedéssel ellentétes irányú változások mennek végbe, melyek közrejátszhatnak pl. a memória funkciók alakításában.

Az agyi **MR** receptorok fő funkciója a glükokortikoidok negatív visszacsatolásának biztosítása (Berardelli és mtsai 2013). Az MR mRNS szintek egérben (Schmidt és mtsai 2003) és az MR immunreaktivitás patkányban (saját adat) is fejlődésfüggő változásokat mutat, melyek a hippokampusz egyes részeit eltérő mértékben érintik. De MR receptorok az agyon kívül számos egyéb szervben (szív, vérerek, zsírszövet, makrofágok) is nagy mennyiségben megtalálhatóak (Nguyen Dinh Cat és Jaisser 2012). Legújabb elképzelések szerint a nagy népességet érintő metabolikus szindróma kialakulásában is szerepet játszhatnak (Marzolla és mtsai 2014). Az aldoszteron hatásait a vesében is ez a receptortípus közvetíti köszönhetően a helyileg magas 11- β -HSD2, glükokortikoid lebontó enzim koncentrációnak. Spirolaktonnal (aldoszteron antagonist) végzett vizsgálatokkal kimutatták, hogy a mineralokortikoidok perinatális korban a szívizom sejtek proliferációjára, apoptózisára is nagy hatással vannak, befolyásolva ezzel a szív növekedését és fejlődését (Sohn és mtsai 2010).

A perinatális kori glükokortikoid szintek alacsonyan tartásának jótékony hatásai már régóta ismertek (Barker és mtsai 1992, Seckl 1997). Tehát a perinatális korú állatok szervezete igyekszik megelőzni a fokozott kortikoszteront termelésből adódó rendellenességeket. Ugyanakkor az is belátható, hogy nagyobb mennyiségű hormonnal és egy aktívabb szabályozó rendszer (11- β -HSD1/2) segítségével jóval finomabb szabályozás érhető el. Lehetséges, hogy emiatt előnyös a szervezet számára aldoszteronról kortikoszteronra váltani a kor előrehaladtával, amikor utóbbi egyedfejlődésre gyakorolt káros hatása már nem jelent számottevő problémát. Ugyanakkor a fejlődő szervezetben a fokozott aldoszteron aktivitás fontos, akár pozitív glükokortikoid-szerű funkciókat láthat el (Hlavacova és Jezova 2008). Egyre több adat áll rendelkezésre például a metabolizmusra kifejtett glükokortikoid-szerű hatásáról (Marzolla és mtsai 2014). Bár az aldoszteron elsődlegesen az MR receptorokon keresztül fejti ki hatását, azokon akár GR hatások közvetítésére is képes (Oitzl és mtsai 2010), és néhány irodalmi adat alapján GR receptorokon is képes lehet hatni (Gauer és mtsai 2007). GR receptor hiányos egerekben (amelyek csak néhány napig képesek túlélni) mind a renin, mind az aldoszteron szint megemelkedik, ami szintén a hiányzó

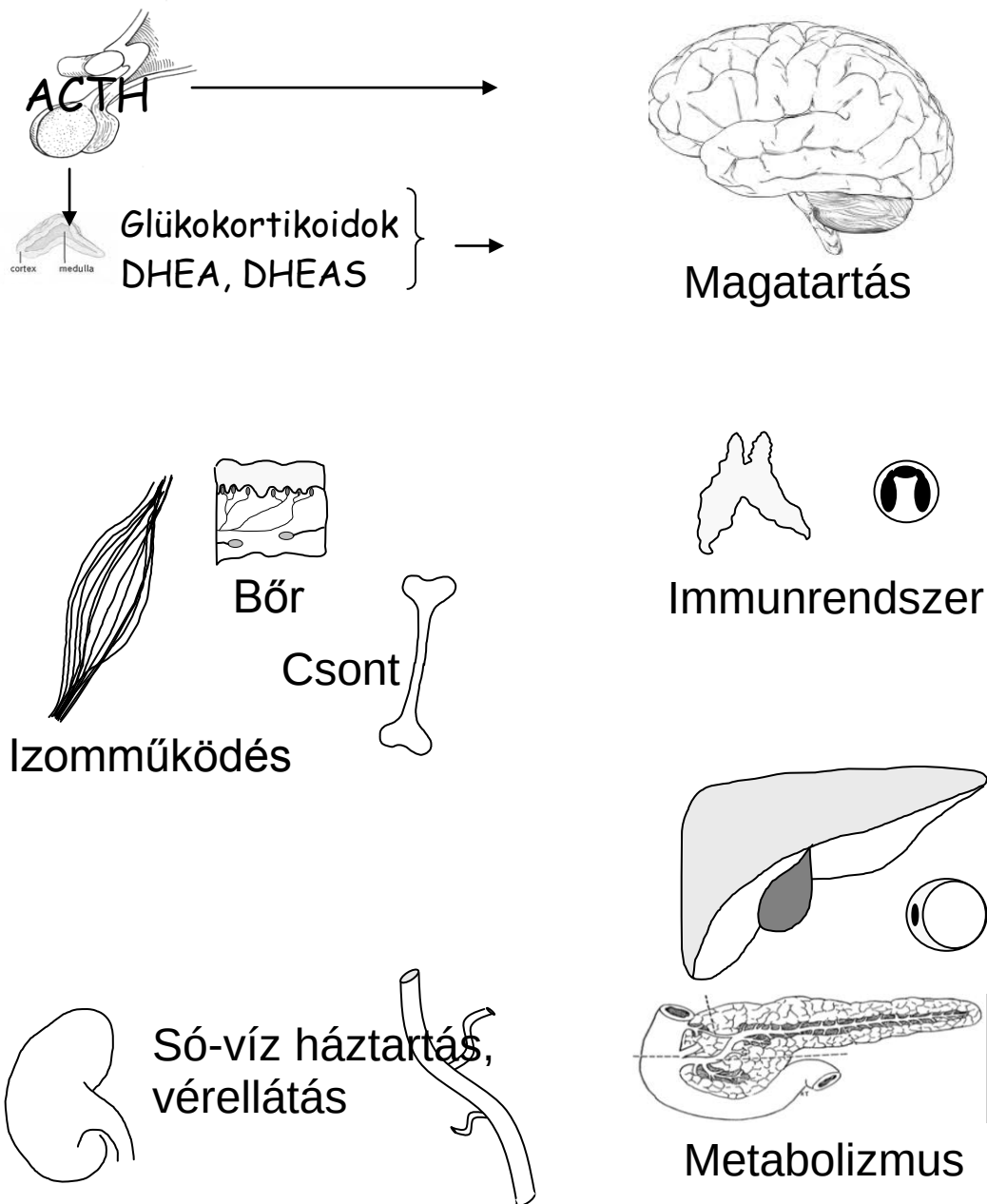
glükokortikoidok pótlásának jele lehet (Berger és mtsai 1996). Sajnos több kísérletünk, mely során az aldosteron glükokortikoid-szerű hatását kerestük, értékelhetetlennek bizonyult (negatív visszacsatolás, glükóz anyagcsere). Az is elképzelhető, hogy a perinatálisan fokozott aldosteron reaktivitás elsődleges szerepe a só- és vízháztartás egyensúlyának fenntartása (Raff és mtsai 1999). A vértérfogot szabályozása perinatálisan egyértelműen nagyobb igénybevételt jelent a szervezet számára, mint felnőtt korban (Low és mtsai 1993). További fontos megfigyelés, hogy perinatális korban az aldosteron nem genomiális mechanizmusokon keresztül védelmet nyújt a sejtek térfogat növekedése ellen a vesében és tüdőödéma esetén is (Logvinenko és mtsai 2006, Logvinenko és mtsai 2008, Olivera és mtsai 2000).

Összességében feltételezhetjük, hogy perinatálisan a HHM tengely véghormonjának az aldosteron tekinthető, mely GR receptorokon keresztül megvalósuló hatásokat is szabályozhat ebben a korban. Eredményeink megalapozottságát fokozza, hogy két patkánytörzsben és kétféle, egymástól hatásmechanizmusában nagyon különböző stresszor esetén is sikerült bizonyítani a korosztályok közötti különbségeket.

7. 5. Az ACTH egyéb hatásai

A HHM tengely véghormonja a kortikoszteron, így feltételezhető, hogy a stresszhez való alkalmazkodás legfontosabb paramétereként a HHM tengely egyéb hormonjainak szintjei is az ő szabályozásának céljából változnak. AVP-hiányos állapotokban az ACTH - kortikoszteron disszociáció azon esetét láthattuk, mely során alacsony ACTH szintek mellett relative magas kortikoszteron szintek figyelhetők meg. Ezzel szemben SHRP során normál ACTH termelés mellett ennek ellenkezője tapasztalható: LPS injekció és hipoglikémia hatására alig jelentkezik kortikoszteron emelkedés. Így felmerül a kérdés, hogy ha perinatális korban a stressz-folyamatok során megemelkedett ACTH nem a kortikoszteron szintek szabályozásában vesz részt, milyen más funkciót tölthet be (40. ábra).

Az ACTH hatások összefoglalása



40. ábra Az ACTH hatásainak összefoglalása.

A nyugalmi ACTH szint nem csak a **mellékvese** működésének fenntartásában, hanem annak fejlődése szempontjából is kiemelt fontossággal bír. A stressz által kiváltott ACTH növekedés a glükokortikoid hormonok szintézisén és felszabadításán túl a mellékvese mineralokortikoid és androgén hormonjainak termelődésére is hatással van. A szteroid hormon szintézis fokozására a mellékvesén kívül más szteroidogén szövetekben is képes (Horvath és mtsai 1986, Varga és mtsai 1986).

Ezzel összefüggésben intézetünkben folyó kutatások már a 60-as években igazolták, hogy az ACTH a petefészkek vérellátásának szabályozásában is jelentős szerepet vállal (Stark és Varga 1968). **Szív és érrendszeri** hatásai közé tartozik még a vérnyomás növelő hatás (Bertolini 1995), a lokális véráramlás fokozása (Stark és Varga 1968), és a só- és vízháztartás szabályozása a nátriurézisen keresztül (Gruber és mtsai 1984).

A glükokortikoidokhoz hasonlóan az ACTH is rendelkezik **direkt gyulladásgátló** hatással. Mind a keringő limfociták, mind a csecsemőmirigy működését képes befolyásolni (Brod és Hood 2011, Catania és mtsai 2010, Montero-Melendez és mtsai 2011). A szénhidrát és lipid **anyagcseré**re gyakorolt hatásait agyban, májban, hasnyálmirigyben és barna zsírszövetben is tanulmányozták (Lesault és mtsai 1991, Lewis és Matthews 1968, Spirovski és mtsai 1975). Az ACTH direkt szerepet játszik a hőszabályozásban, és szintje a táplálékfelvételre is hatással van (Schulz és mtsai 2010). Ezen kívül enyhe hatást gyakorol az **izomműködésre**, és a **csontképződésre** is, és az α -MSH-hoz hasonlóan a **bőr** pigmentáltságára is hatással van. Utóbbi háttere, hogy az α -MSH az ACTH első 13 aminosava. Exogén melanokortinok erős hatást gyakorolnak a viselkedésre, bár endogén hatásuk kevésbé bizonyított (Bertolini és mtsai 2009) (41. ábra).

Az ACTH fent bemutatott mellékvesén kívüli hatásai nem csak kutatási, hanem diagnosztikai és terápiás használat szempontjából is érdekesnek ígérkeznek pl. csecsemőkori görcsökben (Mikati és mtsai 2002), epilepsziában (Gayatri és mtsai 2007), és lipid csökkentő hatása miatt (Thorisdottir és mtsai 2009).

8. Következtetések

Kísérleti eredményeink tükrében a következő következtetéseket vonhatjuk le:

1. Az AVP HHM tengely szabályozásában betöltött szerepe elnyújtott stresszfolyamatok (pl. 5 hét CMS) során kerül előtérbe.
2. Felnőtt és 10 napos patkányok összehasonlításával közvetlenül is sikerült bizonyítanunk, hogy perinatálisan az AVP tekinthető az ACTH elválasztás fő szabályozójának. Eredményeinket AVP-hiányos Brattleboro patkányokon, V1b receptor antagonistá alkalmazásával és AVP antiszérum adásával megerősítettük. A 10 napos állatok hipofízise kevésbé érzékeny CRH adásra, ami szintén az AVP szerepét hangsúlyozza.
3. Az ACTH – glükokortikoid disszociáció
 - 3/1. A 10 perc anyai elválasztás esetén is azt tapasztaltuk, hogy az AVP-hiányos állatok csökkent ACTH elválasztása magasabb kortikoszteron szintekkel jár együtt, így bizonyos, hogy a tapasztalt ACTH-kortikoszteron disszociációért nem a két hormon eltérő időbeli lefutása a felelős.
 - 3/2. A felnőtt állatokban egyáltalán nem, a kispatkányokban is csak részben magyarázhatók az emelkedett CBG szinttel az AVP-hiányos állatok magasabb glükokortikoid szintjei.
 - 3/3. A felnőtt állatokban egyáltalán nem, a kispatkányokban is csak részben magyarázhatók az emelkedett mellékvese ACTH érzékenységgel az AVP-hiányos állatok magasabb glükokortikoid szintjei.
 - 3/4. In vivo és in vitro mérésekkel is sikerült igazolnunk a katekolaminok direkt glükokortikoid elválasztásra gyakorolt pozitív hatását a β adrenoceptorokon keresztül.
 - 3/5. Bár hipotézisünkkel ellentétben az ACTH szintek változásait az együttes glükó- és mineralokortikoid szintek sem követték, de meglepő eredményként a mineralokortikoid reaktivitás mind a kortikoszteron reaktivitásnál, mind a felnőttben mérhető értékekhez képest jelentősen nagyobb volt a kispatkányokban.

4. Más patkánytörzsben és jellegében eltérő két különféle stresszor alkalmazásával is sikerült megerősítenünk, hogy perinatálisan az aldoszteron tekinthető a fő stresszhormonnak. Perinatálisan a glükokortikoidok hatásait a szervezet a GR és MR receptorok és 11- β -HSD1 felépítő enzim szintjeinek alacsonyan és a 11- β -HSD2 lebontó enzim szintjének magasan tartásával is igyekszik csökkenteni.

9. Összefoglalás

A stressz-tengely korfüggő szabályozása vazopresszin hiányos Brattleboro patkányokban

Egyes elméletek szerint a vazopresszin (AVP) krónikus stressz-folyamatok során a stressz-tengely fő szabályozójává válik, amit előző, 2 hetes stresszorok alkalmazásával nem sikerült alátámasztani, de elnyújtott stresszorok (pl 5 hét krónikus enyhe stressz) során a szabályozó szerepe megjelent. Felnőtt és perinatális korú patkányok összehasonlításával különböző stresszorok (hipoglikémia és bakteriális infekció modellek) alkalmazásával alátámasztottuk, hogy perinatálisan az AVP végzi az ACTH elválasztás szabályozását. AVP-hiányos Brattleboro patkányokon megfigyelt eredményeinket V1b receptor antagonistá SSR149415 és AVP antiszérum alkalmazásával is megerősítettük. Szintén az AVP szerepét hangsúlyozza in vitro inkubálással tett megfigyelésünk, mely során a perinatális korú állatok hipofízise kevésbé volt érzékeny CRH adásrai. Az eredmények azt mutatták, hogy a stresszorok jó részének alkalmazása során az AVP-hiányos állatok csökkent ACTH szintjeit nem követte alacsonyabb kortikoszteron szekréció. Először a méréstechnikai problémákat kellett kizárnunk. Az ACTH és kortikoszteron csúcs egymáshoz képesti időbeli eltolódása miatt a mintavételezés időzítése kulcsfontosságú. Mivel az AVP-hiányos állatok csökkent ACTH elválasztásához már 10 perc anyai elválasztás esetén is magasabb kortikoszteron szintek jártak, így nem valószínű, hogy a két hormon eltérő időbeli lefutása állna a tapasztalt ACTH-kortikoszteron disszociáció hátterében. Elméletileg kortikoszteron kötő fehérje szint különbségek is állhatnak a disszociáció hátterében, méréseink során viszont csak perinatális korban találtunk különbségeket, melyek mértéke alig 20-30%-os, így kispatkányok esetén is csak minimális mértékben magyarázzák az ACTH-kortikoszteron eltéréseket. Mellékvese ACTH érzékenység mérésre is sort kerítettünk, mely a felnőtt állatokban egyáltalán nem, a kispatkányokban is csak részben magyarázták az AVP-hiányos állatok magasabb glükokortikoid szintjeit. Miután megállapítottuk, hogy létezik ACTH-független glükokortikoid elválasztás szabályozás, a lehetséges mechanizmusokat vizsgáltuk. β adrenoreceptor antagonistá segítségével in vivo és in vitro mérések során is igazoltuk a katekolaminok

kortikoszteron elválasztást serkentő direkt hatását. Feltételezésünk, mely szerint a glükó- és mineralokortikoid szintek együttese jobban követhetik ACTH szintek változásait, mint a kortikoszteron szintek önmagukban nem állta meg ahelyét, de meglepő eredményként a mineralokortikoid reaktivitás mind a kortikoszteron reaktivitásnál, mind a felnőttben mérhető értékekhez képest jelentősen nagyobb volt a perinatális korú állatokban. A korábban alkalmazott stresszorokkal Wistar patkányokban is sikerült megerősítenünk, hogy SHRP alatt az aldoszteron tekinthető a fő stressz-hormonnak. Perinatális korban a glükokortikoidok hatásait a szervezet a glükó- és mineralokortikoid receptorok és 11- β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1 (felépítő) enzim szintjeinek alacsonyan és a 11- β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 2 (lebontó) enzim szintjének magasán tartásával is igyekszik csökkenteni.

10. Summary

Age related regulation of the hypothalamic pituitary adrenocortical axis in vasopressin deficient Brattleboro rats

According to some theory during chronic stress vasopressin (AVP) becomes the main regulator of the stress axis. Our previous work did not confirm this using two weeks stressors, but during prolonged stimulation (e.g. 5 weeks chronic mild stress) the regulatory role of AVP came into highlight. We established that during the perinatal period AVP is the main regulator of the ACTH secretion with direct comparison of adult and 10-day-old rats using two different stressor (lipopolysaccharide, hypoglycaemia). The results were confirmed in AVP-deficient Brattleboro rats and with pharmacological (V1b antagonist SSR149415) and immunological (AVP antiserum) blockade. The hypophysis of 10-day-old animals were less sensitive to CRH stimulation emphasizing the regulatory role of AVP. In most cases the reduced ACTH secretion in AVP-deficient rats was not accompanied by smaller corticosterone secretion. First we wanted to close out technical problems. Already during 10 min maternal separation the reduced ACTH secretion of AVP-deficient rat pups were accompanied by higher corticosterone levels. This suggest that the different timecurve of the two hormones cannot be responsible for the discrepancies. The enhanced corticosterone binding globuline levels are also not responsible for the ACTH-corticosterone discrepancies in adult AVP-deficient rats and only partly explain it in pups. Similarly, changes in adrenal gland ACTH sensitivity can explain only part of the discrepancies in pups but not in adults. As we established that there is an ACTH-independent glucocorticoid secretion we examined some possible mechanisms. We confirmed both in vivo and in vitro that catecholamine regulates glucocorticoid secretion at the level of the adrenal gland. Although our hypothesis that gluco- and mineralocorticoid together follow the ACTH secretion failed, but a surprising result suggested a major role of mineralocorticoid in perinatal stress reaction.

4. In an other rat strain (Wistar) with two different stressor we confirmed that during the perinatal period aldosterone is the main stresshormone. During this period the body keeps the effect of glucocorticoids on a minimum level by low GR and MR receptor and 11- β -HSD1 and high 11- β -HSD2 (degrading enzyme) level.

11. Irodalomjegyzék

- Abou-Samra AB, Harwood JP, Manganiello VC, Catt KJ, Aguilera G. (1987) Phorbol 12-myristate 13-acetate and vasopressin potentiate the effect of corticotropin-releasing factor on cyclic AMP production in rat anterior pituitary cells. Mechanisms of action. *J Biol Chem*, 262:1129-36.
- Aguilera G. (1994) Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol*, 15:321-50.
- Aguilera G, Pham Q, Rabadan-Diehl C. (1994) Regulation of pituitary vasopressin receptors during chronic stress: relationship to corticotroph responsiveness. *J Neuroendocrinol*, 6:299-304.
- Aguilera G, Rabadan-Diehl C. (2000) Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. *Regul Pept*, 96:23-9.
- Aguilera G, Subburaju S, Young S, Chen J. (2008) The parvocellular vasopressinergic system and responsiveness of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress. *Progress in brain research*, 170:29-39.
- Ahlquist RP. (1948) A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol*, 153:586-600.
- Albeck DS, Hastings NB, McEwen BS. (1994) Effects of adrenalectomy and type I or type II glucocorticoid receptor activation on AVP and CRH mRNA in the rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res*, 26:129-34.
- Albus C. (2010) Psychological and social factors in coronary heart disease. *Ann Med*, 42:487-94.
- Allen CA, Ferry DM, Chadwick VS. (1994) Anti-inflammatory effects of LPS, MDP and FMLP on carrageenan pleurisy in the rat. *Agents Actions*, 41:53-6.
- Altemus M, Pigott T, Kalogeras KT, Demitrack M, Dubbert B, Murphy DL, Gold PW. (1992) Abnormalities in the regulation of vasopressin and corticotropin releasing factor secretion in obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 49:9-20.
- Ambrogio Lorenzini C, Bucherelli C, Giachetti A. (1985) Active and passive avoidance learning in homozygous D.I. Brattleboro rats. *Arch Ital Biol*, 123:185-93.
- Angelucci L, Scaccianoce S. (1990) Mechanisms in the control of stress responsiveness. *Ann Ist Super Sanita*, 26:75-8.

- Ansurudeen I, Kopprasch S, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Willenberg HS. (2007) Endothelial cell-mediated regulation of aldosterone release from human adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol*, 265-266:150-6.
- Antoni FA. (1993) Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. *Front Neuroendocrinol*, 14:76-122.
- Antoni FA, Holmes MC, Makara GB, Kerteszi M, Laszlo 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*, 5:519-22.
- Aoyagi T, Birumachi J, Hiroshima M, Fujiwara Y, Sanbe A, Yamauchi J, Tanoue A. (2007) Alteration of glucose homeostasis in V1a vasopressin receptor-deficient mice. *Endocrinology*, 148:2075-84.
- Arakawa H, Arakawa K, Deak T. (2010) Oxytocin and vasopressin in the medial amygdala differentially modulate approach and avoidance behavior toward illness-related social odor. *Neuroscience*, 171:1141-51.
- Arima H, Aguilera G. (2000) Vasopressin and oxytocin neurones of hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei co-express mRNA for Type-1 and Type-2 corticotropin-releasing hormone receptors. *J Neuroendocrinol*, 12:833-42.
- Aronsson M, Fuxe K, Dong Y, Agnati LF, Okret S, Gustafsson JA. (1988) Localization of glucocorticoid receptor mRNA in the male rat brain by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85:9331-5.
- Arriza JL, Simerly RB, Swanson LW, Evans RM. (1988) The neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response. *Neuron*, 1:887-900.
- Avinun R, Ebstein RP, Knafo A. (2012) Human maternal behaviour is associated with arginine vasopressin receptor 1A gene. *Biol Lett*, 8:894-6.
- 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*, 192:49-52.
- Bakharev VD, Tikhomirov SM, Papsuevich OS, Chipens GI. (1984) [Use of vasopressin the treatment of the paranoid form of schizophrenia]. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova*, 84:88-92.

- Barker DJ, Fall CH. (1993) Fetal and infant origins of cardiovascular disease. *Arch Dis Child*, 68:797-9.
- Barker S, Laird SM, Ho MM, Vinson GP, Hinson JP. (1992) Characterization of a rat adrenocortical inner zone-specific antigen and identification of its putative precursor. *J Mol Endocrinol*, 9:95-102.
- Beaton EA, Simon TJ. (2011) How might stress contribute to increased risk for schizophrenia in children with chromosome 22q11.2 deletion syndrome? *J Neurodev Disord*, 3:68-75.
- Beaulieu MJ. (2013) Vasopressin for the treatment of neonatal hypotension. *Neonatal Netw*, 32:120-4.
- Berardelli R, Karamouzis I, D'Angelo V, Zichi C, Fussotto B, Giordano R, Ghigo E, Arvat E. (2013) Role of mineralocorticoid receptors on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in humans. *Endocrine*, 43:51-8.
- Berger S, Cole TJ, Schmid W, Schutz G. (1996) Analysis of glucocorticoid and mineralocorticoid signalling by gene targeting. *Endocr Res*, 22:641-52.
- Berson BS, Berntson GG, Zipf W, Torello MW, Kirk WT. (1983) Vasopressin-induced antinociception: an investigation into its physiological and hormonal basis. *Endocrinology*, 113:337-43.
- Bertolini A. (1995) The opioid/anti-opioid balance in shock: a new target for therapy in resuscitation. *Resuscitation*, 30:29-42.
- Bertolini A, Tacchi R, Vergoni AV. (2009) Brain effects of melanocortins. *Pharmacol Res*, 59:13-47.
- 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*, 47:503-13.
- 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*, 29:483-93.
- Bisceglia R, Jenkins JM, Wigg KG, O'Connor TG, Moran G, Barr CL. (2012) Arginine vasopressin 1a receptor gene and maternal behavior: evidence of association and moderation. *Genes Brain Behav*, 11:262-8.

- Black PH. (2006) The inflammatory consequences of psychologic stress: relationship to insulin resistance, obesity, atherosclerosis and diabetes mellitus, type II. *Med Hypotheses*, 67:879-91.
- Blumberg MS, Knoot TG, Kirby RF. (2001) Neural and hormonal control of arterial pressure during cold exposure in unanesthetized week-old rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281:R1514-21.
- 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*, 119:555-73.
- Bondy CA, Whitnall MH, Brady LS, Gainer H. (1989) Coexisting peptides in hypothalamic neuroendocrine systems: some functional implications. *Cell Mol Neurobiol*, 9:427-46.
- Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA, Pfeiffer EF, Holst JJ. (1990) Effects of splanchnic nerve stimulation on the adrenal cortex may be mediated by chromaffin cells in a paracrine manner. *Endocrinology*, 127:900-6.
- Bornstein SR, Engeland WC, Ehrhart-Bornstein M, Herman JP. (2008) Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends Endocrinol Metab*, 19:175-80.
- Bose M, Olivan B, Laferriere B. (2009) Stress and obesity: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in metabolic disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 16:340-6.
- Bradley AJ, Dinan TG. (2010) A systematic review of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in schizophrenia: implications for mortality. *J Psychopharmacol*, 24:91-118.
- Brambilla F, Bondiolotti GP, Maggioni M, Sciascia A, Grillo W, Sanna F, Latina A, Picotti GB. (1989) Vasopressin (DDAVP) therapy in chronic schizophrenia: effects on negative symptoms and memory. *Neuropsychobiology*, 20:113-9.
- Breuer ME, van Gaalen MM, Wernet W, Claessens SE, Oosting RS, Behl B, Korte SM, Schoemaker H, Gross G, Olivier B, Groenink L. (2009) SSR149415, a non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, has long-lasting antidepressant effects in the olfactory bulbectomy-induced hyperactivity depression model. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 379:101-6.

- Brod SA, Hood ZM. (2011) Ingested (oral) ACTH inhibits EAE. *J Neuroimmunol*, 232:131-5.
- Brown RW, Diaz R, Robson AC, Kotelevtsev YV, Mullins JJ, Kaufman MH, Seckl JR. (1996) The ontogeny of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor gene expression reveal intricate control of glucocorticoid action in development. *Endocrinology*, 137:794-7.
- Brunner J, Keck ME, Landgraf R, Uhr M, Namendorf C, Bronisch T. (2002) Vasopressin in CSF and plasma in depressed suicide attempters: preliminary results. *Eur Neuropsychopharmacol*, 12:489-94.
- Buijs RM, la Fleur SE, Wortel J, Van Heyningen C, Zuiddam L, Mettenleiter TC, Kalsbeek A, Nagai K, Nijima A. (2003) The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J Comp Neurol*, 464:36-48.
- Bunck M, Czibere L, Horvath C, Graf C, Frank E, Kessler MS, Murgatroyd C, Muller-Myhsok B, Gonik M, Weber P, Putz B, Muigg P, Panhuysen M, Singewald N, Bettecken T, Deussing JM, Holsboer F, Spengler D, Landgraf R. (2009) A hypomorphic vasopressin allele prevents anxiety-related behavior. *PLoS One*, 4:e5129.
- Burlet A, Tonon MC, Tankosic P, Coy D, Vaudry H. (1983) Comparative immunocytochemical localization of corticotropin releasing factor (CRF-41) and neurohypophysial peptides in the brain of Brattleboro and Long-Evans rats. *Neuroendocrinology*, 37:64-72.
- Burrell LM, Risvanis J, Dean RG, Patel SK, Velkoska E, Johnston CI. (2013) Age-dependent regulation of renal vasopressin V(1A) and V(2) receptors in rats with genetic hypertension: implications for the treatment of hypertension. *J Am Soc Hypertens*, 7:3-13.
- Caldwell HK, Wersinger SR, Young WS, 3rd. (2008) The role of the vasopressin 1b receptor in aggression and other social behaviours. *Prog Brain Res*, 170:65-72.
- Cannon WB, De La Paz D. (1911) Emotional stimulation of adrenal gland secretion. . *Am J Physiol*, 28:64-70.
- Carey RJ, Miller M. (1982) Absence of learning and memory deficits in the vasopressin-deficient rat (Brattleboro strain). *Behav Brain Res*, 6:1-13.

- Catania A, Lonati C, Sordi A, Carlin A, Leonardi P, Gatti S. (2010) The melanocortin system in control of inflammation. *ScientificWorldJournal*, 10:1840-53.
- Chao HM, Choo PH, McEwen BS. (1989) Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in rat brain. *Neuroendocrinology*, 50:365-71.
- Chen J, Young S, Subburaju S, Sheppard J, Kiss A, Atkinson H, Wood S, Lightman S, Serradeil-Le Gal C, Aguilera G. (2008) Vasopressin does not mediate hypersensitivity of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress. *Ann N Y Acad Sci*, 1148:349-59.
- Chen YZ, Hua SY, Wang CA, Wu LG, Gu Q, Xing BR. (1991) An electrophysiological study on the membrane receptor-mediated action of glucocorticoids in mammalian neurons. *Neuroendocrinology*, 53 Suppl 1:25-30.
- Chida Y, Hamer M, Wardle J, Steptoe A. (2008) Do stress-related psychosocial factors contribute to cancer incidence and survival? *Nat Clin Pract Oncol*, 5:466-75.
- Chrousos GP. (2010) Stress and sex versus immunity and inflammation. *Sci Signal*, 3:pe36.
- Cincu C, Agrawal A. (2006) Cushing's Syndrome : an overview. *JNMA J Nepal Med Assoc*, 45:375-80.
- Copper RL, Goldenberg RL, Das A, Elder N, Swain M, Norman G, Ramsey R, Cotroneo P, Collins BA, Johnson F, Jones P, Meier AM. (1996) The preterm prediction study: maternal stress is associated with spontaneous preterm birth at less than thirty-five weeks' gestation. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Am J Obstet Gynecol*, 175:1286-92.
- Crews DE. (2007) Composite estimates of physiological stress, age, and diabetes in American Samoans. *Am J Phys Anthropol*, 133:1028-34.
- Croxtall JD, Choudhury Q, Flower RJ. (2000) Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br J Pharmacol*, 130:289-98.
- Cunningham ET, Jr., Sawchenko PE. (1991) Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. *Trends Neurosci*, 14:406-11.

- Daikoku R, Kunitake T, Kato K, Tanoue A, Tsujimoto G, Kannan H. (2007) Body water balance and body temperature in vasopressin V1b receptor knockout mice. *Auton Neurosci*, 136:58-62.
- Dale H. (1935) The Harveian Oration on SOME EPOCHS IN MEDICAL RESEARCH. *Br Med J*, 2:771-7.
- Dallman MF. (1993) Stress update Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic stress. *Trends Endocrinol Metab*, 4:62-9.
- Dallman MF, Akana SF, Jacobson L, Levin N, Cascio CS, Shinsako J. (1987) Characterization of corticosterone feedback regulation of ACTH secretion. *Ann N Y Acad Sci*, 512:402-14.
- Danguir J. (1983) Sleep deficits in rats with hereditary diabetes insipidus. *Nature*, 304:163-4.
- Darlington DN, Keil LC, Dallman MF. (1989) Potentiation of hormonal responses to hemorrhage and fasting, but not hypoglycemia in conscious adrenalectomized rats. *Endocrinology*, 125:1398-406.
- Davis EP, Sandman CA. (2010) The timing of prenatal exposure to maternal cortisol and psychosocial stress is associated with human infant cognitive development. *Child Dev*, 81:131-48.
- Dayanithi G, Antoni FA. (1989) Rapid as well as delayed inhibitory effects of glucocorticoid hormones on pituitary adrenocorticotrophic hormone release are mediated by type II glucocorticoid receptors and require newly synthesized messenger ribonucleic acid as well as protein. *Endocrinology*, 125:308-13.
- de Kloet CS, Vermetten E, Geuze E, Wiegant VM, Westenberg HG. (2008) Elevated plasma arginine vasopressin levels in veterans with posttraumatic stress disorder. *J Psychiatr Res*, 42:192-8.
- de Kloet ER, Sarabdjitsingh RA. (2008) Everything has rhythm: focus on glucocorticoid pulsatility. *Endocrinology*, 149:3241-3.
- de Winter RF, van Hemert AM, DeRijk RH, Zwinderman KH, Frankhuijzen-Sierevogel AC, Wiegant VM, Goekoop JG. (2003) Anxious-retarded depression: relation with plasma vasopressin and cortisol. *Neuropsychopharmacology*, 28:140-7.

- Del Giudice M. (2012) Fetal programming by maternal stress: Insights from a conflict perspective. *Psychoneuroendocrinology*, 37:1614-29.
- Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG. (2003) Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci*, 23:4850-7.
- DiGiovanni SR, Nielsen S, Christensen EI, Knepper MA. (1994) Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:8984-8.
- Diorio D, Viau V, Meaney MJ. (1993) The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci*, 13:3839-47.
- DiPietro JA, Novak MF, Costigan KA, Atella LD, Reusing SP. (2006) Maternal psychological distress during pregnancy in relation to child development at age two. *Child Dev*, 77:573-87.
- 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*, 196:113-21.
- Donnelly E. (2012) Work-related stress and posttraumatic stress in emergency medical services. *Prehosp Emerg Care*, 16:76-85.
- Dooley R, Harvey BJ, Thomas W. (2012) Non-genomic actions of aldosterone: from receptors and signals to membrane targets. *Mol Cell Endocrinol*, 350:223-34.
- Dotsch J, Hohenberger I, Peter M, Sippell W, Dorr HG. (2000) Evidence for change of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity during infancy and childhood. *Pediatr Res*, 48:697-700.
- Du Vigneaud V. (1954) Hormones of the posterior pituitary gland: oxytocin and vasopressin. *Harvey Lect*, 50:1-26.
- 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*, 11:997-1002.
- Edwards AV. (1997) Aspects of autonomic and neuroendocrine function. *Equine Vet J Suppl*, 109-17.

- Egashira N, Mishima K, Iwasaki K, Oishi R, Fujiwara M. (2009) New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: role of the vasopressin receptor in psychological and cognitive functions. *J Pharmacol Sci*, 109:44-9.
- Ehrhart-Bornstein M, Haidan A, Alesci S, Bornstein SR. (2000) Neurotransmitters and neuropeptides in the differential regulation of steroidogenesis in adrenocortical-chromaffin co-cultures. *Endocr Res*, 26:833-42.
- Elifanov AV, Polenov AL, Belen'kii MA, Kuzik VV. (1988) [Morphofunctional research on the interrenal gland of the frog *Rana temporaria* following arginine vasotocin administration]. *Zh Evol Biokhim Fiziol*, 24:740-4.
- Elman I, Lukas S, Shoaf SE, Rott D, Adler C, Breier A. (2003) Effects of acute metabolic stress on the peripheral vasopressinergic system in schizophrenia. *J Psychopharmacol*, 17:317-23.
- Engeland WC, Shinsako J, Winget CM, Vernikos-Danellis J, Dallman MF. (1977) Circadian patterns of stress-induced ACTH secretion are modified by corticosterone responses. *Endocrinology*, 100:138-47.
- Engelmann M, Landgraf R. (1994) Microdialysis administration of vasopressin into the septum improves social recognition in Brattleboro rats. *Physiol Behav*, 55:145-9.
- Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT. (2004) The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol*, 25:132-49.
- Engelmann M, Wotjak CT, Neumann I, Ludwig M, Landgraf R. (1996) Behavioral consequences of intracerebral vasopressin and oxytocin: focus on learning and memory. *Neurosci Biobehav Rev*, 20:341-58.
- Engstrom L, Rosen K, Angel A, Fyrberg A, Mackerlova L, Konsman JP, Engblom D, Blomqvist A. (2008) Systemic immune challenge activates an intrinsically regulated local inflammatory circuit in the adrenal gland. *Endocrinology*, 149:1436-50.
- Esler M, Eikelis N, Schlaich M, Lambert G, Alvarenga M, Dawood T, Kaye D, Barton D, Pier C, Guo L, Brenchley C, Jennings G, Lambert E. (2008) Chronic mental stress is a cause of essential hypertension: presence of biological markers of stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 35:498-502.

- Evans RM, Arriza JL. (1989) A molecular framework for the actions of glucocorticoid hormones in the nervous system. *Neuron*, 2:1105-12.
- Everts HG, Koolhaas JM. (1999) Differential modulation of lateral septal vasopressin receptor blockade in spatial learning, social recognition, and anxiety-related behaviors in rats. *Behav Brain Res*, 99:7-16.
- Feifel D, Mexal S, Melendez G, Liu PY, Goldenberg JR, Shilling PD. (2009) The brattleboro rat displays a natural deficit in social discrimination that is restored by clozapine and a neurotensin analog. *Neuropsychopharmacology*, 34:2011-8.
- Feuilloley M, Stolz MB, Delarue C, Fauchere JL, Vaudry H. (1990) Structure-activity relationships of monomeric and dimeric synthetic ACTH fragments in perfused frog adrenal slices. *J Steroid Biochem*, 35:583-92.
- Fiselier TJ, Lijnen P, Monnens L, van Munster P, Jansen M, Peer P. (1983) Levels of renin, angiotensin I and II, angiotensin-converting enzyme and aldosterone in infancy and childhood. *Eur J Pediatr*, 141:3-7.
- Fodor A, Klausz B, Pinter O, Daviu N, Rabasa C, Rotllant D, Balazsfi D, Kovacs KB, Nadal R, Zelena D. (2012) Maternal neglect with reduced depressive-like behavior and blunted c-fos activation in Brattleboro mothers, the role of central vasopressin. *Horm Behav*, 62:539-51.
- Frederiksen SO, Ekman R, Gottfries CG, Widerlov E, Jonsson S. (1991) Reduced concentrations of galanin, arginine vasopressin, neuropeptide Y and peptide YY in the temporal cortex but not in the hypothalamus of brains from schizophrenics. *Acta Psychiatr Scand*, 83:273-7.
- Fuchsl AM, Langgartner D, Reber SO. (2013) Mechanisms Underlying the Increased Plasma ACTH Levels in Chronic Psychosocially Stressed Male Mice. *PLoS One*, 8:e84161.
- Funder JW. (2010) Aldosterone and mineralocorticoid receptors in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis*, 52:393-400.
- Funder JW. (2010) Minireview: Aldosterone and mineralocorticoid receptors: past, present, and future. *Endocrinology*, 151:5098-102.
- Funder JW, Mihailidou AS. (2009) Aldosterone and mineralocorticoid receptors: Clinical studies and basic biology. *Mol Cell Endocrinol*, 301:2-6.

- Funder JW, Reincke M. (2010) Aldosterone: a cardiovascular risk factor? *Biochim Biophys Acta*, 1802:1188-92.
- Gallo-Payet N, Guillon G. (1998) Regulation of adrenocortical function by vasopressin. *Horm Metab Res*, 30:360-7.
- Gassanov N, Jankowski M, Danalache B, Wang D, Grygorczyk R, Hoppe UC, Gutkowska J. (2007) Arginine vasopressin-mediated cardiac differentiation: insights into the role of its receptors and nitric oxide signaling. *J Biol Chem*, 282:11255-65.
- Gauer S, Segitz V, Goppelt-Struebe M. (2007) Aldosterone induces CTGF in mesangial cells by activation of the glucocorticoid receptor. *Nephrol Dial Transplant*, 22:3154-9.
- Gayatri NA, Ferrie CD, Cross H. (2007) Corticosteroids including ACTH for childhood epilepsy other than epileptic spasms. *Cochrane Database Syst Rev*, CD005222.
- Giardino L, Puglisi-Allegra S, Ceccatelli S. (1996) CRH-R1 mRNA expression in two strains of inbred mice and its regulation after repeated restraint stress. *Brain Res Mol Brain Res*, 40:310-4.
- Goel N, Plyler KS, Daniels D, Bale TL. (2011) Androgenic influence on serotonergic activation of the HPA stress axis. *Endocrinology*, 152:2001-10.
- Goldstein DS. (2003) Catecholamines and stress. *Endocr Regul*, 37:69-80.
- Goudsmit E, Neijmeijer-Leloux A, Swaab DF. (1992) The human hypothalamo-neurohypophyseal system in relation to development, aging and Alzheimer's disease. *Prog Brain Res*, 93:237-47; discussion 247-8.
- Graver CJ, White PM. (2007) Neuropsychological effects of stress on social phobia with and without comorbid depression. *Behav Res Ther*, 45:1193-206.
- Griebel G, Beeske S, Stahl SM. (2012) The vasopressin V(1b) receptor antagonist SSR149415 in the treatment of major depressive and generalized anxiety disorders: results from 4 randomized, double-blind, placebo-controlled studies. *J Clin Psychiatry*, 73:1403-11.
- Grinevich V, Jezova D, Gambaryan S, Illarionova A, Kolleker A, Seeburg PH, Schwarz MK. (2011) Hypertrophy and altered activity of the adrenal cortex in Homer 1 knockout mice. *Horm Metab Res*, 43:551-6.

- Grinevich V, Seeburg PH, Schwarz MK, Jezova D. (2012) Homer 1 - a new player linking the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity to depression and anxiety. *Endocr Regul*, 46:153-9.
- 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*, 124:2686-92.
- Grino M, Burgunderf JM. (1992) Ontogeny of expression and glucocorticoid regulation of the arginine vasopressin gene in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol*, 4:71-7.
- Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joels M. (2012) Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol Cell Endocrinol*, 350:299-309.
- Gruber KA, Klein MC, Hutchins PM, Buckalew VM, Jr., Lymangrover JR. (1984) Natriuretic and hypertensive activities reside in a fragment of ACTH. *Hypertension*, 6:468-74.
- Grunfeld JP. (1990) Glucocorticoids in blood pressure regulation. *Horm Res*, 34:111-3.
- Gunnar MR, Donzella B. (2002) Social regulation of the cortisol levels in early human development. *Psychoneuroendocrinology*, 27:199-220.
- Hallahan C, Young DA, Munck A. (1973) Time course of early events in the action of glucocorticoids on rat thymus cells in vitro. Synthesis and turnover of a hypothetical cortisol-induced protein inhibition of glucose metabolism and of a presumed ribonucleic acid. *J Biol Chem*, 248:2922-7.
- Haller J, Halasz J, Mikics E, Kruk MR, Makara GB. (2000) Ultradian corticosterone rhythm and the propensity to behave aggressively in male rats. *J Neuroendocrinol*, 12:937-40.
- 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*, 29:273-91.
- Hamilton LD, Meston CM. (2013) Chronic stress and sexual function in women. *J Sex Med*, 10:2443-54.

- Hattangady NG, Olala LO, Bollag WB, Rainey WE. (2012) Acute and chronic regulation of aldosterone production. *Mol Cell Endocrinol*, 350:151-62.
- Hayashi M, Sasaki S, Tsuganezawa H, Monkawa T, Kitajima W, Konishi K, Fushimi K, Marumo F, Saruta T. (1994) Expression and distribution of aquaporin of collecting duct are regulated by vasopressin V2 receptor in rat kidney. *J Clin Invest*, 94:1778-83.
- Herman JP, Cullinan WE. (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*, 20:78-84.
- 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*, 592:228-38.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE. (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*, 24:151-80.
- Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H. (2005) Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 29:1201-13.
- Herman JP, Prewitt CM, Cullinan WE. (1996) Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. *Crit Rev Neurobiol*, 10:371-94.
- 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*, 249:497-507.
- Hitchcock CA, Chavira DA, Stein MB. (2009) Recent findings in social phobia among children and adolescents. *Isr J Psychiatry Relat Sci*, 46:34-44.
- Hlavacova N, Bakos J, Jezova D. (2010) Eplerenone, a selective mineralocorticoid receptor blocker, exerts anxiolytic effects accompanied by changes in stress hormone release. *J Psychopharmacol*, 24:779-86.
- Hlavacova N, Jezova D. (2008) Chronic treatment with the mineralocorticoid hormone aldosterone results in increased anxiety-like behavior. *Horm Behav*, 54:90-7.

- Hlavacova N, Wes PD, Ondrejckova M, Flynn ME, Poundstone PK, Babic S, Murck H, Jezova D. (2012) Subchronic treatment with aldosterone induces depression-like behaviours and gene expression changes relevant to major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*, 15:247-65.
- Hodgson RA, Higgins GA, Guthrie DH, Lu SX, Pond AJ, Mullins DE, Guzzi MF, Parker EM, Varty GB. (2007) Comparison of the V1b antagonist, SSR149415, and the CRF1 antagonist, CP-154,526, in rodent models of anxiety and depression. *Pharmacol Biochem Behav*, 86:431-40.
- Hoeller AA, Duzzioni M, Duarte FS, Leme LR, Costa AP, Santos EC, de Pieri CH, dos Santos AA, Naime AA, Farina M, de Lima TC. (2013) GABA-A receptor modulators alter emotionality and hippocampal theta rhythm in an animal model of long-lasting anxiety. *Brain Res*, 1532:21-31.
- Holmes MC, Seckl JR. (2006) The role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases in the brain. *Mol Cell Endocrinol*, 248:9-14.
- Holsboer F, Ising M. (2008) Central CRH system in depression and anxiety--evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists. *Eur J Pharmacol*, 583:350-7.
- Holzbauer M, Sharman DF, Godden U, Mann SP, Blatchford D, Lavery R, Jarvis LG. (1980) Observations on pituitary and cerebral catecholamines in Brattleboro rats. *Med Biol*, 58:25-32.
- Holzwarth MA, Cunningham LA, Kleitman N. (1987) The role of adrenal nerves in the regulation of adrenocortical functions. *Ann N Y Acad Sci*, 512:449-64.
- Honda K, Takano Y. (2009) New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: involvement of vasopressin V1a and V1b receptors in nociceptive responses and morphine-induced effects. *J Pharmacol Sci*, 109:38-43.
- Horio S, Funahashi H, Mizuno S. (1981) [Plasma steroid hormones in Cushing's syndrome: their relation to cause and clinical manifestations (author's transl)]. *Nihon Naibunpi Gakkai Zasshi*, 57:807-25.
- Horvath E, Varga B, Stark E. (1986) Stimulation of progesterone production by adrenocorticotrophic hormone and prostaglandin E2 in rat luteal cells. *Biol Reprod*, 35:44-8.

- Howl J, Rudge SA, Lavis RA, Davies AR, Parslow RA, Hughes PJ, Kirk CJ, Michell RH, Wheatley M. (1995) Rat testicular myoid cells express vasopressin receptors: receptor structure, signal transduction, and developmental regulation. *Endocrinology*, 136:2206-13.
- Huang BM, Stocco DM, Norman RL. (1997) The cellular mechanisms of corticotropin-releasing hormone (CRH)-stimulated steroidogenesis in mouse Leydig cells are similar to those for LH. *J Androl*, 18:528-34.
- Huether G. (1996) The central adaptation syndrome: psychosocial stress as a trigger for adaptive modifications of brain structure and brain function. *Prog Neurobiol*, 48:569-612.
- Iijima M, Chaki S. (2005) Separation-induced ultrasonic vocalization in rat pups: further pharmacological characterization. *Pharmacol Biochem Behav*, 82:652-7.
- Inder WJ, Donald RA, Prickett TC, Frampton CM, Sullivan PF, Mulder RT, Joyce PR. (1997) Arginine vasopressin is associated with hypercortisolemia and suicide attempts in depression. *Biol Psychiatry*, 42:744-7.
- Intengan HD, Park JB, Schiffrin EL. (1999) Blood pressure and small arteries in DOCA-salt-treated genetically AVP-deficient rats: role of endothelin. *Hypertension*, 34:907-13.
- Isales CM, Zaidi M, Blair HC. (2010) ACTH is a novel regulator of bone mass. *Ann N Y Acad Sci*, 1192:110-6.
- Ising M, Holsboer F. (2007) CRH-sub-1 receptor antagonists for the treatment of depression and anxiety. *Exp Clin Psychopharmacol*, 15:519-28.
- Jaferi A, Bhatnagar S. (2007) Corticotropin-releasing hormone receptors in the medial prefrontal cortex regulate hypothalamic-pituitary-adrenal activity and anxiety-related behavior regardless of prior stress experience. *Brain Res*, 1186:212-23.
- Jezova D, Kvetnansky R, Kovacs K, Oprsalova Z, Vigas M, Makara GB. (1987) Insulin-induced hypoglycemia activates the release of adrenocorticotropin predominantly via central and propranolol insensitive mechanisms. *Endocrinology*, 120:409-15.

- Joels M, de Kloet ER. (1994) Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol*, 43:1-36.
- 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*, 622:9-16.
- Johnston CI. (1985) Vasopressin in circulatory control and hypertension. *J Hypertens*, 3:557-69.
- Juruena MF. (2013) Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. *Epilepsy Behav*,
- Juszczak M, Appenrodt E, Guzek JW, Schwarzborg H. (1999) Effects of oxytocin and vasopressin on retrieval of passive avoidance response in melatonin-treated and/or pinealectomized male rats. *Neuro Endocrinol Lett*, 20:77-81.
- Kadmiel M, Cidlowski JA. (2013) Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci*, 34:518-30.
- Kaga M, Matsuda T, Watanabe T, Onodera S, Watanabe S, Usuda H, Ito S. (2013) Renal vasodilatory action of arginine vasopressin in extremely low birth weight infants. *Tohoku J Exp Med*, 231:159-64.
- Kalelioglu I, Kubat Uzum A, Yildirim A, Ozkan T, Gungor F, Has R. (2007) Transient gestational diabetes insipidus diagnosed in successive pregnancies: review of pathophysiology, diagnosis, treatment, and management of delivery. *Pituitary*, 10:87-93.
- Kawauchi H, Sower SA. (2006) The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis. *Gen Comp Endocrinol*, 148:3-14.
- Keenan DM, Roelfsema F, Veldhuis JD. (2004) Endogenous ACTH concentration-dependent drive of pulsatile cortisol secretion in the human. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287:E652-61.
- Kiapekou E, Zapanti E, Mastorakos G, Loutradis D. (2010) Update on the role of ovarian corticotropin-releasing hormone. *Ann N Y Acad Sci*, 1205:225-9.

- Kim JK, Schrier RW. (1998) Vasopressin processing defects in the Brattleboro rat: implications for hereditary central diabetes insipidus in humans? *Proc Assoc Am Physicians*, 110:380-6.
- Koehler EM, McLemore GL, Tang W, Summy-Long JY. (1993) Osmoregulation of the magnocellular system during pregnancy and lactation. *Am J Physiol*, 264:R555-60.
- Koshimizu TA, Nakamura K, Egashira N, Hiroyama M, Nonoguchi H, Tanoue A. (2012) Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiol Rev*, 92:1813-64.
- Koshimizu TA, Tsujimoto G. (2009) New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: vasopressin and pain perception. *J Pharmacol Sci*, 109:33-7.
- Kovacs 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*, 44:229-34.
- Kovacs KJ, Mezey E. (1987) Dexamethasone inhibits corticotropin-releasing factor gene expression in the rat paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*, 46:365-8.
- Kusnecov AW, Liang R, Shurin G. (1999) T-lymphocyte activation increases hypothalamic and amygdaloid expression of CRH mRNA and emotional reactivity to novelty. *J Neurosci*, 19:4533-43.
- Kvetnansky R, Jezova D, Oprsalova Z, Foldes O, Michajlovskij N, Dobrakovova M, Lichardus B, Makara GB. (1990) Regulation of the sympathetic nervous system by circulating vasopressin. *Adv Exp Med Biol*, 274:113-34.
- 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*, 10:332-41.
- Lamounier-Zepter V, Ehrhart-Bornstein M. (2006) Fat tissue metabolism and adrenal steroid secretion. *Curr Hypertens Rep*, 8:30-4.
- Landgraf R. (2006) The involvement of the vasopressin system in stress-related disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 5:167-79.
- 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*, 15:4250-8.
- Large V, Hellstrom L, Reynisdottir S, Lonnqvist F, Eriksson P, Lannfelt L, Arner P. (1997) Human beta-2 adrenoceptor gene polymorphisms are highly frequent in obesity and associate with altered adipocyte beta-2 adrenoceptor function. *J Clin Invest*, 100:3005-13.
- Launay JM, Vittet D, Vidaud M, Rondot A, Mathieu MN, Lalau-Keraly C, Cantau B, Chevillard C. (1987) V1a-vasopressin specific receptors on human platelets: potentiation by ADP and epinephrine and evidence for homologous down-regulation. *Thromb Res*, 45:323-31.
- Lee B, Yang C, Chen TH, al-Azawi N, Hsu WH. (1995) Effect of AVP and oxytocin on insulin release: involvement of V1b receptors. *Am J Physiol*, 269:E1095-100.
- Lesault A, Elchinger B, Desbals B. (1991) Circadian variations and extraadrenal effect of ACTH on insulinemia in rabbit. *Horm Metab Res*, 23:461-4.
- Levine S. (2001) Primary social relationships influence the development of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis in the rat. *Physiol Behav*, 73:255-60.
- Levine S. (2002) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behavior. *Neurotox Res*, 4:557-564.
- Lewis GP, Matthews J. (1968) The mobilization of free fatty acids from rabbit adipose tissue in situ. *Br J Pharmacol*, 34:564-78.
- Liebsch G, Wotjak CT, Landgraf R, Engelmann M. (1996) Septal vasopressin modulates anxiety-related behaviour in rats. *Neurosci Lett*, 217:101-4.
- Lightman SL, Windle RJ, Ma XM, Harbuz MS, Shanks NM, Julian MD, Wood SA, Kershaw YM, Ingram CD. (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal function. *Arch Physiol Biochem*, 110:90-3.
- Lillberg K, Verkasalo PK, Kaprio J, Teppo L, Helenius H, Koskenvuo M. (2003) Stressful life events and risk of breast cancer in 10,808 women: a cohort study. *Am J Epidemiol*, 157:415-23.
- Lin RE, Ambler L, Billingslea EN, Suh J, Batheja S, Tatard-Leitman V, Featherstone RE, Siegel SJ. (2013) Electroencephalographic and early communicative abnormalities in Brattleboro rats. *Physiol Rep*, 1:e00100.

- Linkowski P, Geenen V, Kerkhofs M, Mendlewicz J, Legros JJ. (1984) Cerebrospinal fluid neurophysins in affective illness and in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci*, 234:162-5.
- Liu X, Wang CA, Chen YZ. (1995) Nongenomic effect of glucocorticoid on the release of arginine vasopressin from hypothalamic slices in rats. *Neuroendocrinology*, 62:628-33.
- Logvinenko NS, Solenov EI, Ivanova LN. (2006) A rapid nongenomic effect of aldosterone on intracellular sodium concentration in the distal nephron segment of the rat. *Dokl Biochem Biophys*, 406:7-10.
- Logvinenko NS, Solenov EI, Ivanova LN. (2008) Effect of aldosterone on the regulation of the volume of principal cells of rat cortical collecting duct epithelium in early postnatal development. *Dokl Biol Sci*, 423:385-8.
- Loichot C, Anjuere J, Nisato D, De Jong W, Imbs JL, Barthelmebs M. (2001) Renal vascular reactivity to vasopressin in rats with diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol*, 431:321-9.
- Long JA, Jones AL. (1967) Observations on the fine structure of the adrenal cortex of man. *Lab Invest*, 17:355-70.
- Low JA, Froese AB, Galbraith RS, Smith JT, Karchmar EJ. (1993) Middle cerebral artery blood flow velocity in the newborn following delivery. *Clin Invest Med*, 16:29-37.
- Lustyik G, Szabo J. (1978) Determination of the numerical density of spherical and ellipsoidal particles in the adrenal zona glomerulosa, based on distribution measurements. I. Methods. *Exp Pathol (Jena)*, 15:260-70.
- Ma TK, Kam KK, Yan BP, Lam YY. (2010) Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. *Br J Pharmacol*, 160:1273-92.
- Ma XM, Lightman SL. (1998) The arginine vasopressin and corticotrophin-releasing hormone gene transcription responses to varied frequencies of repeated stress in rats. *J Physiol*, 510 (Pt 2):605-14.
- Ma XM, Lightman SL, Aguilera G. (1999) Vasopressin and corticotropin-releasing hormone gene responses to novel stress in rats adapted to repeated restraint. *Endocrinology*, 140:3623-32.

- Makara GB, Mergl Z, Zelena D. (2004) The role of vasopressin in hypothalamo-pituitary-adrenal axis activation during stress: an assessment of the evidence. *Ann N Y Acad Sci*, 1018:151-61.
- Makara GB, Varga J, Barna I, Pinter O, Klausz B, Zelena D. (2012) The vasopressin-deficient Brattleboro rat: lessons for the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation. *Cell Mol Neurobiol*, 32:759-66.
- Makara M, Horvath G, Gervain J, Par A, Szalay F, Telegdy L, Tornai I, Ujhelyi E, Hunyady B. (2012) [Hungarian consensus guideline for the diagnosis and treatment of B, C, and D viral hepatitis]. *Orv Hetil*, 153:375-94.
- Malendowicz LK, Macchi C, Nussdorfer GG, Nowak KW. (1998) Acute effects of recombinant murine leptin on rat pituitary-adrenocortical function. *Endocr Res*, 24:235-46.
- Manenschijn L, Schaap L, van Schoor NM, van der Pas S, Peeters GM, Lips P, Koper JW, van Rossum EF. (2013) High long-term cortisol levels, measured in scalp hair, are associated with a history of cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 98:2078-83.
- Marie-Luce C, Raskin K, Bolborea M, Monin M, Picot M, Mhaouty-Kodja S. (2013) Effects of neural androgen receptor disruption on aggressive behavior, arginine vasopressin and galanin systems in the bed nucleus of stria terminalis and lateral septum. *Gen Comp Endocrinol*, 188:218-25.
- Martin CE, Cake MH, Hartmann PE, Cook IF. (1977) Relationship between foetal corticosteroids, maternal progesterone and parturition in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 84:167-76.
- Martinez-Laorden E, Garcia-Carmona JA, Baroja-Mazo A, Romecin P, Atucha NM, Milanes MV, Laorden ML. (2014) Corticotropin-releasing factor (CRF) receptor-1 is involved in cardiac noradrenergic activity observed during naloxone-precipitated morphine withdrawal. *Br J Pharmacol*, 171:688-700.
- Marzolla V, Armani A, Feraco A, De Martino MU, Fabbri A, Rosano G, Caprio M. (2014) Mineralocorticoid receptor in adipocytes and macrophages: A promising target to fight metabolic syndrome. *Steroids*,
- Matta SG, Valentine JD, Sharp BM. (1997) Nicotinic activation of CRH neurons in extrahypothalamic regions of the rat brain. *Endocrine*, 7:245-53.

- Mazurek MF, Beal MF, Bird ED, Martin JB. (1986) Vasopressin in Alzheimer's disease: a study of postmortem brain concentrations. *Ann Neurol*, 20:665-70.
- Mazzocchi G, Gottardo G, Nussdorfer GG. (1997) Catecholamines stimulate steroid secretion of dispersed fowl adrenocortical cells, acting through the beta-receptor subtype. *Horm Metab Res*, 29:190-2.
- McLaughlin RJ, Hill MN, Gorzalka BB. (2014) A critical role for prefrontocortical endocannabinoid signaling in the regulation of stress and emotional behavior. *Neurosci Biobehav Rev*,
- Mendiratta MS, Yang Y, Balazs AE, Willis AS, Eng CM, Karaviti LP, Potocki L. (2011) Early onset obesity and adrenal insufficiency associated with a homozygous POMC mutation. *Int J Pediatr Endocrinol*, 2011:5.
- Merali Z, Kent P, Du L, Hrdina P, Palkovits M, Faludi G, Poulter MO, Bedard T, Anisman H. (2006) Corticotropin-releasing hormone, arginine vasopressin, gastrin-releasing peptide, and neuromedin B alterations in stress-relevant brain regions of suicides and control subjects. *Biol Psychiatry*, 59:594-602.
- Messerli FH, Nowaczynski W, Honda M, Genest J, Kuchel O. (1976) Effects of ACTH on steroid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*, 42:1074-80.
- Meynen G, Unmehopa UA, van Heerikhuize JJ, Hofman MA, Swaab DF, Hoogendijk WJ. (2006) Increased arginine vasopressin mRNA expression in the human hypothalamus in depression: A preliminary report. *Biol Psychiatry*, 60:892-5.
- Mikati MA, Lepejian GA, Holmes GL. (2002) Medical treatment of patients with infantile spasms. *Clin Neuropharmacol*, 25:61-70.
- Mikics E, Bارسy B, Haller J. (2007) The effect glucocorticoids on aggressiveness in established colonies of rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32:160-70.
- Millstein RA, Holmes A. (2007) Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains. *Neurosci Biobehav Rev*, 31:3-17.
- Mitani S, Fujita M, Nakata K, Shirakawa T. (2006) Impact of post-traumatic stress disorder and job-related stress on burnout: a study of fire service workers. *J Emerg Med*, 31:7-11.

- Miyabo S, Minami M, Inazu T, Tamai T, Aoyagi N, Miyanaga K, Ooya E, Kishida S, Nakai T. (1989) Normoreninemic hypoaldosteronism in a case of isolated ACTH deficiency. *Horm Res*, 31:163-8.
- Mizoguchi K, Ikeda R, Shoji H, Tanaka Y, Maruyama W, Tabira T. (2009) Aging attenuates glucocorticoid negative feedback in rat brain. *Neuroscience*, 159:259-70.
- Mlynarik M, Zelena D, Bagdy G, Makara GB, Jezova D. (2007) Signs of attenuated depression-like behavior in vasopressin deficient Brattleboro rats. *Horm Behav*, 51:395-405.
- Moncek F, Aguilera G, Jezova D. (2003) Insufficient activation of adrenocortical but not adrenomedullary hormones during stress in rats subjected to repeated immune challenge. *J Neuroimmunol*, 142:86-92.
- Montero-Melendez T, Patel HB, Perretti M. (2011) Role of melanocortin receptors in the regulation of gouty inflammation. *Curr Rheumatol Rep*, 13:138-45.
- 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* (1985), 100:1902-9.
- Moore RY, Eichler VB. (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*, 42:201-6.
- Muller MB, Preil J, Renner U, Zimmermann S, Kresse AE, Stalla GK, Keck ME, Holsboer F, Wurst W. (2001) Expression of CRHR1 and CRHR2 in mouse pituitary and adrenal gland: implications for HPA system regulation. *Endocrinology*, 142:4150-3.
- 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*, 130:2725-32.
- Murphy HM, Wideman CH, Nadzam GR. (1998) The role of vasopressin in modulating circadian rhythm responses to phase shifts. *Peptides*, 19:1191-208.
- Nagasaki H, Ito M, Yuasa H, Saito H, Fukase M, Hamada K, Ishikawa E, Katakami H, Oiso Y. (1995) Two novel mutations in the coding region for neurophysin-II

- associated with familial central diabetes insipidus. *J Clin Endocrinol Metab*, 80:1352-6.
- 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*, 23:21-8.
- Nagy GM, Gorcs TJ, Halasz B. (1991) Attenuation of the suckling-induced prolactin release and the high afternoon oscillations of plasma prolactin secretion of lactating rats by antiserum to vasopressin. *Neuroendocrinology*, 54:566-70.
- Nakagawa H, Okumura N. (2010) Coordinated regulation of circadian rhythms and homeostasis by the suprachiasmatic nucleus. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 86:391-409.
- Naray-Fejes-Toth A, Colombowala IK, Fejes-Toth G. (1998) The role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in steroid hormone specificity. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 65:311-6.
- Nguyen Dinh Cat A, Jaisser F. (2012) Extrarenal effects of aldosterone. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 21:147-56.
- Nickel CH, Bingisser R, Morgenthaler NG. (2012) The role of copeptin as a diagnostic and prognostic biomarker for risk stratification in the emergency department. *BMC Med*, 10:7.
- Nicolaidis NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E. (2010) The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids*, 75:1-12.
- Nigawara T, Horiba N, Tozawa F, Kasagi Y, Uchida K, Iwasaki Y, Suda T. (2003) Regulation of corticotropin releasing hormone receptor (CRH-R) in the rat anterior pituitary as assessed by radioimmunoassay. *Pituitary*, 6:67-73.
- Nussdorfer GG. (1969) [Histophysiology of the zona reticularis of the rat adrenal cortex. I. Fine structure]. *Boll Soc Ital Biol Sper*, 45:581-2.
- Nussdorfer GG. (1996) Paracrine control of adrenal cortical function by medullary chromaffin cells. *Pharmacol Rev*, 48:495-530.
- O'Connell IP, Barton RN, Horan MA, Maycock PF. (2000) Disrupted cortisol-ACTH relationships in elderly women given corticotrophin-releasing hormone two weeks after proximal femur fracture. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 52:51-9.

- Oakley RH, Cidlowski JA. (2013) The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*, 132:1033-44.
- Ohsawa H, Kishimoto T, Shimayoshi N, Matsumura K, Tahara K, Kitera K, Higashiura N, Noriyama Y, Matsumoto H, Hirai M, et al. (1993) Atrial natriuretic peptide and arginine vasopressin secretion in schizophrenic patients. *Acta Psychiatr Scand*, 88:130-4.
- Oitzl MS, Champagne DL, van der Veen R, de Kloet ER. (2010) Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neurosci Biobehav Rev*, 34:853-66.
- Olivera WG, Ciccolella DE, Barquin N, Ridge KM, Rutschman DH, Yeates DB, Sznajder JI. (2000) Aldosterone regulates Na,K-ATPase and increases lung edema clearance in rats. *Am J Respir Crit Care Med*, 161:567-73.
- Oshikawa S, Tanoue A, Koshimizu TA, Kitagawa Y, Tsujimoto G. (2004) Vasopressin stimulates insulin release from islet cells through V1b receptors: a combined pharmacological/knockout approach. *Mol Pharmacol*, 65:623-9.
- Ostrowski NL, Lolait SJ, Young WS, 3rd. (1994) Cellular localization of vasopressin V1a receptor messenger ribonucleic acid in adult male rat brain, pineal, and brain vasculature. *Endocrinology*, 135:1511-28.
- Overstreet DH, Griebel G. (2005) Antidepressant-like effects of the vasopressin V1b receptor antagonist SSR149415 in the Flinders Sensitive Line rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 82:223-7.
- Paarlberg KM, Vingerhoets AJ, Passchier J, Dekker GA, Van Geijn HP. (1995) Psychosocial factors and pregnancy outcome: a review with emphasis on methodological issues. *J Psychosom Res*, 39:563-95.
- Pal K, Swaminathan K, Xu HE, Pioszak AA. (2010) Structural basis for hormone recognition by the Human CRFR2{alpha} G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, 285:40351-61.
- Pan YF, Jia XT, Wang XH, Chen XR, Li QS, Gao XP, Qi JS. (2013) Arginine vasopressin remodels the spontaneous discharges disturbed by amyloid beta protein in hippocampal CA1 region of rats. *Regul Pept*, 183C:7-12.

- Parry LJ, Wilson BC, Poterski RS, Summerlee AJ. (1998) The cardiovascular effects of porcine relaxin in Brattleboro rats. *Endocrine*, 8:317-22.
- Pencheva T, Gindeva R. (1991) [The effect of the intracerebroventricular administration of vasopressin on the arterial pressure and heart rate of Brattleboro and Long-Evans rats]. *Eksp Med Morfol*, 30:7-10.
- Penke Z, Felszeghy K, Fernet B, Sage D, Nyakas C, Burlet A. (2001) Postnatal maternal deprivation produces long-lasting modifications of the stress response, feeding and stress-related behaviour in the rat. *Eur J Neurosci*, 14:747-55.
- Perretti M, Mugridge KG, Becherucci C, Parente L. (1991) Evidence that interleukin-1 and lipoxygenase metabolites mediate the lethal effect of complete Freund's adjuvant in adrenalectomized rats. *Lymphokine Cytokine Res*, 10:239-43.
- Pilkis SJ, Granner DK. (1992) Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol*, 54:885-909.
- Poimenova A, Markaki E, Rahiotis C, Kittraki E. (2010) Corticosterone-regulated actions in the rat brain are affected by perinatal exposure to low dose of bisphenol A. *Neuroscience*, 167:741-9.
- 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*, 444:372-7.
- Powers RE, DeSouza EB, Walker LC, Price DL, Vale WW, Young WS, 3rd. (1987) Corticotropin-releasing factor as a transmitter in the human olivocerebellar pathway. *Brain Res*, 415:347-52.
- Proitsi P, Powell JF. (2012) Missense substitutions associated with behavioural disturbances in Alzheimer's disease (AD). *Brain Res Bull*, 88:394-405.
- Provost PR, Boucher E, Tremblay Y. (2013) Glucocorticoid metabolism in the developing lung: adrenal-like synthesis pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 138:72-80.
- Purba JS, Hoogendijk WJ, Hofman MA, Swaab DF. (1996) Increased number of vasopressin- and oxytocin-expressing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in depression. *Arch Gen Psychiatry*, 53:137-43.

- Raabe FJ, Spengler D. (2013) Epigenetic Risk Factors in PTSD and Depression. *Front Psychiatry*, 4:80.
- Radikova Z, Penesova A, Jezova D, Kvetnansky R, Vigas M, Macho L, Koska J. (2003) Body position and the neuroendocrine response to insulin-induced hypoglycemia in healthy subjects. *Arch Physiol Biochem*, 111:399-405.
- Raff H, Jankowski BM, Bruder ED, Engeland WC, Oaks MK. (1999) The effect of hypoxia from birth on the regulation of aldosterone in the 7-day-old rat: plasma hormones, steroidogenesis in vitro, and steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acid. *Endocrinology*, 140:3147-53.
- Ramos Ade T, Homem KS, Suchecki D, Tufik S, Troncone LR. (2014) Drug-induced suppression of ACTH secretion does not promote anti-depressive or anxiolytic effects. *Behav Brain Res*, 265:69-75.
- 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*, 50:117-23.
- Reed MD, Price KE, Archbold J, Moffa A, Febo M. (2013) Predator odor-evoked BOLD activation in the awake rat: modulation by oxytocin and V(1)a vasopressin receptor antagonists. *Brain Res*, 1494:70-83.
- Reul JM, de Kloet ER. (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117:2505-11.
- 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*, 274:243-56.
- Rho JH, Swanson LW. (1989) A morphometric analysis of functionally defined subpopulations of neurons in the paraventricular nucleus of the rat with observations on the effects of colchicine. *J Neurosci*, 9:1375-88.
- Richmond CA. (2003) The role of arginine vasopressin in thermoregulation during fever. *J Neurosci Nurs*, 35:281-6.
- Rimington LD, Davies DH, Lowe D, Pearson MG. (2001) Relationship between anxiety, depression, and morbidity in adult asthma patients. *Thorax*, 56:266-71.
- Ring RH. (2005) The central vasopressinergic system: examining the opportunities for psychiatric drug development. *Curr Pharm Des*, 11:205-25.

- Roberts CJ, Campbell IC, Troop N. (2014) Increases in weight during chronic stress are partially associated with a switch in food choice towards increased carbohydrate and saturated fat intake. *Eur Eat Disord Rev*, 22:77-82.
- Robson AC, Leckie CM, Seckl JR, Holmes MC. (1998) 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the postnatal and adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 61:1-10.
- Rubin RT, Mandell AJ, Crandall PH. (1966) Corticosteroid responses to limbic stimulation in man: localization of stimulus sites. *Science*, 153:767-8.
- Saborio P, Tipton GA, Chan JC. (2000) Diabetes insipidus. *Pediatr Rev*, 21:122-9; quiz 129.
- Sagrada A, Fargeas MJ, Bueno L. (1987) Involvement of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in the postlaparotomy intestinal motor disturbances in the rat. *Gut*, 28:955-9.
- 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*, 401:289-96.
- Samtani MN, Pyszczyński NA, Dubois DC, Almon RR, Jusko WJ. (2006) Modeling glucocorticoid-mediated fetal lung maturation: I. Temporal patterns of corticosteroids in rat pregnancy. *J Pharmacol Exp Ther*, 317:117-26.
- Sandi C, Venero C, Guaza C. (1996) Novelty-related rapid locomotor effects of corticosterone in rats. *Eur J Neurosci*, 8:794-800.
- Sapolsky RM, Armanini MP, Sutton SW, Plotsky PM. (1989) Elevation of hypophysial portal concentrations of adrenocorticotropin secretagogues after fornix transection. *Endocrinology*, 125:2881-7.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. (1984) Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81:6174-7.
- Sapolsky RM, Meaney MJ. (1986) Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res*, 396:64-76.

- Sarai M, Matsunaga H. (1989) ADH secretion in schizophrenic patients on antipsychotic drugs. *Biol Psychiatry*, 26:576-80.
- Sarfi M, Sundet JM, Waal H. (2013) Maternal stress and behavioral adaptation in methadone- or buprenorphine-exposed toddlers. *Infant Behav Dev*, 36:707-16.
- Sawyer WH, Valtin H, Sokol HW. (1964) Neurohypophysial Principles in Rats with Familial Hypothalamic Diabetes Insipidus (Brattleboro Strain). *Endocrinology*, 74:153-5.
- Scattoni ML, McFarlane HG, Zhodzishsky V, Caldwell HK, Young WS, Ricceri L, Crawley JN. (2008) Reduced ultrasonic vocalizations in vasopressin 1b knockout mice. *Behav Brain Res*, 187:371-8.
- Schinner S, Bornstein SR. (2005) Cortical-chromaffin cell interactions in the adrenal gland. *Endocr Pathol*, 16:91-8.
- 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*, 135:2058-63.
- Schmale H, Ivell R, Breindl M, Darmer D, Richter D. (1984) The mutant vasopressin gene from diabetes insipidus (Brattleboro) rats is transcribed but the message is not efficiently translated. *EMBO J*, 3:3289-93.
- Schmale H, Richter D. (1984) Single base deletion in the vasopressin gene is the cause of diabetes insipidus in Brattleboro rats. *Nature*, 308:705-9.
- Schmidt MV, Enthoven L, van der Mark M, Levine S, de Kloet ER, Oitzl MS. (2003) The postnatal development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the mouse. *Int J Dev Neurosci*, 21:125-32.
- Schmidt MV, Levine S, Oitzl MS, van der Mark M, Muller MB, Holsboer F, de Kloet ER. (2005) Glucocorticoid receptor blockade disinhibits pituitary-adrenal activity during the stress hyporesponsive period of the mouse. *Endocrinology*, 146:1458-64.
- Schmitz JM, Graham RM, Sagalowsky A, Pettinger WA. (1981) Renal alpha-1 and alpha-2 adrenergic receptors: biochemical and pharmacological correlations. *J Pharmacol Exp Ther*, 219:400-6.

- Schulz C, Paulus K, Lobmann R, Dallman M, Lehnert H. (2010) Endogenous ACTH, not only alpha-melanocyte-stimulating hormone, reduces food intake mediated by hypothalamic mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298:E237-44.
- Scott LV, Dinan TG. (1998) Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. *Life Sci*, 62:1985-98.
- Seckl JR. (1997) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action? *Front Neuroendocrinol*, 18:49-99.
- Seckl JR. (1997) Glucocorticoids, feto-placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and the early life origins of adult disease. *Steroids*, 62:89-94.
- Selye H. (1946) The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Clin Endocrinol Metab*, 6:117-230.
- Selye H. (1985) The nature of stress. *Basal Facts*, 7:3-11.
- Serradeil-Le Gal C, Bourrie 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*, 47:633-41.
- Serradeil-Le Gal C, Derick S, Brossard G, Manning M, Simiand J, Gaillard R, Griebel G, Guillon G. (2003) Functional and pharmacological characterization of the first specific agonist and antagonist for the V1b receptor in mammals. *Stress*, 6:199-206.
- Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, 3rd, Tonnerre B, Roux R, Garcia G, Griebel G, Aulombard A. (2005) An overview of SSR149415, a selective nonpeptide vasopressin V(1b) receptor antagonist for the treatment of stress-related disorders. *CNS Drug Rev*, 11:53-68.
- Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Simiand J, Griebel G, Lacour C, Guillon G, Barberis C, Brossard G, Soubrie 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*, 300:1122-30.

- Shanks N, Meaney MJ. (1994) Hypothalamic-pituitary-adrenal activation following endotoxin administration in the developing rat: a CRH-mediated effect. *J Neuroendocrinol*, 6:375-83.
- Silverman AJ, Hoffman DL, Zimmerman EA. (1981) The descending afferent connections of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). *Brain Res Bull*, 6:47-61.
- Sinclair D, Webster MJ, Wong J, Weickert CS. (2011) Dynamic molecular and anatomical changes in the glucocorticoid receptor in human cortical development. *Mol Psychiatry*, 16:504-15.
- Singewald GM, Rjabokon A, Singewald N, Ebner K. (2011) The modulatory role of the lateral septum on neuroendocrine and behavioral stress responses. *Neuropsychopharmacology*, 36:793-804.
- Sippell WG, Dorr HG, Bidlingmaier F, Knorr D. (1980) Plasma levels of aldosterone, corticosterone, 11-deoxycorticosterone, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, cortisol, and cortisone during infancy and childhood. *Pediatr Res*, 14:39-46.
- Slominski A, Zbytek B, Zmijewski M, Slominski RM, Kauser S, Wortsman J, Tobin DJ. (2006) Corticotropin releasing hormone and the skin. *Front Biosci*, 11:2230-48.
- Soberanes-Chavez P, Lopez-Rubalcava C, de Gortari P, Cruz SL. (2013) Exposure to toluene and stress during pregnancy impairs pups' growth and dams' lactation. *Neurotoxicol Teratol*, 40:9-16.
- Sohn HJ, Yoo KH, Jang GY, Lee JH, Choi BM, Bae IS, Yim HE, Son CS, Lee JW. (2010) Aldosterone modulates cell proliferation and apoptosis in the neonatal rat heart. *J Korean Med Sci*, 25:1296-304.
- Spiga F, Harrison LR, MacSweeney CP, Thomson FJ, Craighead M, Lightman SL. (2009) Effect of vasopressin 1b receptor blockade on the hypothalamic-pituitary-adrenal response of chronically stressed rats to a heterotypic stressor. *J Endocrinol*, 200:285-91.
- Spirovski MZ, Kovacev VP, Spasovska M, Chernick SS. (1975) Effect of ACTH on lipolysis in adipose tissue of normal and adrenalectomized rats in vivo. *Am J Physiol*, 228:382-5.

- Spirit MJ. (2004) Stress-related mucosal disease: risk factors and prophylactic therapy. *Clin Ther*, 26:197-213.
- Stark E, Varga B. (1968) Effect of ACTH on target-organ blood flow, with special reference to an extra-adrenal effect. *Acta Med Acad Sci Hung*, 25:367-81.
- Starkstein SE, Jorge R, Mizrahi R, Robinson RG. (2005) The construct of minor and major depression in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry*, 162:2086-93.
- Staufenbiel SM, Penninx BW, Spijker AT, Elzinga BM, van Rossum EF. (2013) Hair cortisol, stress exposure, and mental health in humans: a systematic review. *Psychoneuroendocrinology*, 38:1220-35.
- Stevens A, White A. (2010) ACTH: cellular peptide hormone synthesis and secretory pathways. *Results Probl Cell Differ*, 50:63-84.
- Stewart LQ, Roper JA, Young WS, 3rd, O'Carroll AM, Lolait SJ. (2008) The role of the arginine vasopressin Avp1b receptor in the acute neuroendocrine action of antidepressants. *Psychoneuroendocrinology*, 33:405-15.
- Stoehr JD, Cheng SW, North WG. (1993) Homozygous Brattleboro rats display attenuated conditioned freezing responses. *Neurosci Lett*, 153:103-6.
- Stoehr JD, Cramer CP, North WG. (1992) Oxytocin and vasopressin hexapeptide fragments have opposing influences on conditioned freezing behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 17:267-71.
- Suchecki D, Rosenfeld P, Levine S. (1993) Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. *Brain Res Dev Brain Res*, 75:185-92.
- Sundaresan PR, Guarnaccia MM, Izzo JL, Jr. (1987) Adrenal medullary regulation of rat renal cortical adrenergic receptors. *Am J Physiol*, 253:F1063-7.
- Surget A, Belzung C. (2008) Involvement of vasopressin in affective disorders. *Eur J Pharmacol*, 583:340-9.
- Swanson LW, Petrovich GD. (1998) What is the amygdala? *Trends Neurosci*, 21:323-31.
- Szot P, Bale TL, Dorsa DM. (1994) Distribution of messenger RNA for the vasopressin V1a receptor in the CNS of male and female rats. *Brain Res Mol Brain Res*, 24:1-10.

- Tannahill LA, Dow RC, Fairhall KM, Robinson IC, Fink G. (1988) Comparison of adrenocorticotropin control in Brattleboro, Long-Evans, and Wistar rats. Measurement of corticotropin-releasing factor, arginine vasopressin, and oxytocin in hypophysial portal blood. *Neuroendocrinology*, 48:650-7.
- 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*, 113:302-9.
- Taugner G, Hasselbach W. (1966) [On the mechanism of catecholamine storage in the chromaffine granules of the adrenal medulla]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol Exp Pathol*, 255:266-86.
- Thorisdottir S, Johannsson M, Olafsdottir E, Arnadottir M. (2009) Search for the optimal dose interval of adrenocorticotrophic hormone (ACTH(1-24)) with regard to the lipid-lowering effect. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 104:273-5.
- Thorsell A. (2010) Brain neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone in mediating stress and anxiety. *Exp Biol Med (Maywood)*, 235:1163-7.
- 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*, 44:155-60.
- Tillinger A, Nostramo R, Kvetnansky R, Serova L, Sabban EL. (2013) Stress-induced changes in gene expression of urocortin 2 and other CRH peptides in rat adrenal medulla: involvement of glucocorticoids. *J Neurochem*,
- Trinh-Trang-Tan MM, Sokol HW, Bankir L, Valtin H. (1982) Homozygous Brattleboro rats lack normal nephron heterogeneity as a consequence of their urine concentrating defect. *Ann N Y Acad Sci*, 394:524-8.
- Tryon MS, Carter CS, Decant R, Laugero KD. (2013) Chronic stress exposure may affect the brain's response to high calorie food cues and predispose to obesogenic eating habits. *Physiol Behav*, 120:233-42.
- 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*, 3:111-3.

- Ulrich-Lai YM, Arnhold MM, Engeland WC. (2006) Adrenal splanchnic innervation contributes to the diurnal rhythm of plasma corticosterone in rats by modulating adrenal sensitivity to ACTH. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290:R1128-35.
- Urban IJ. (1998) Effects of vasopressin and related peptides on neurons of the rat lateral septum and ventral hippocampus. *Prog Brain Res*, 119:285-310.
- Vaccari C, Lolait SJ, Ostrowski NL. (1998) Comparative distribution of vasopressin V1b and oxytocin receptor messenger ribonucleic acids in brain. *Endocrinology*, 139:5015-33.
- Vale W, Vaughan J, Smith M, Yamamoto G, Rivier J, Rivier C. (1983) Effects of synthetic ovine corticotropin-releasing factor, glucocorticoids, catecholamines, neurohypophysial peptides, and other substances on cultured corticotropic cells. *Endocrinology*, 113:1121-31.
- Valtin H. (1982) The discovery of the Brattleboro rat, recommended nomenclature, and the question of proper controls. *Ann N Y Acad Sci*, 394:1-9.
- Valtin H, Schroeder HA. (1964) Familial Hypothalamic Diabetes Insipidus in Rats (Brattleboro Strain). *Am J Physiol*, 206:425-30.
- Van den Bergh BR, Mulder EJ, Mennes M, Glover V. (2005) Antenatal maternal anxiety and stress and the neurobehavioural development of the fetus and child: links and possible mechanisms. A review. *Neurosci Biobehav Rev*, 29:237-58.
- van Eekelen JA, Bohn MC, de Kloet ER. (1991) Postnatal ontogeny of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor gene expression in regions of the rat tel- and diencephalon. *Brain Res Dev Brain Res*, 61:33-43.
- van Londen L, Goekoop JG, van Kempen GM, Frankhuijzen-Sierevogel AC, Wiegant VM, van der Velde EA, De Wied D. (1997) Plasma levels of arginine vasopressin elevated in patients with major depression. *Neuropsychopharmacology*, 17:284-92.
- van Uum SH, Lenders JW, Hermus AR. (2004) Cortisol, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases, and hypertension. *Semin Vasc Med*, 4:121-8.
- van West D, Del-Favero J, Aulchenko Y, Oswald P, Souery D, Forsgren T, Sluijs S, Bel-Kacem S, Adolfsson R, Mendlewicz J, Van Duijn C, Deboutte D, Van

- Broeckhoven C, Claes S. (2004) A major SNP haplotype of the arginine vasopressin 1B receptor protects against recurrent major depression. *Mol Psychiatry*, 9:287-92.
- Varga B, Stark E, Horvath E. (1986) Direct effects of ACTH on the ovary. *Acta Physiol Hung*, 67:3-11.
- 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*, 84:45-52.
- Varga J, Ferenczi S, Kovacs KJ, Garafova A, Jezova D, Zelena D. (2013) Comparison of stress-induced changes in adults and pups: is aldosterone the main adrenocortical stress hormone during the perinatal period in rats? *PLoS One*, 8:e72313.
- Varga J, Klausz B, Domokos A, Kalman S, Pakaski M, Szucs S, Garab D, Zvara A, Puskas L, Kalman J, Timar J, Bagdy G, Zelena D. (2014) Increase in Alzheimer's related markers preceeds memory disturbances: studies in vasopressin-deficient Brattleboro rat. *Brain Res Bull*, 100:6-13.
- Vega C, Moreno-Carranza B, Zamorano M, Quintanar-Stephano A, Mendez I, Thebault S, Martinez de la Escalera G, Clapp C. (2010) Prolactin promotes oxytocin and vasopressin release by activating neuronal nitric oxide synthase in the supraoptic and paraventricular nuclei. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 299:R1701-8.
- Venero C, Borrell J. (1999) Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in the hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats. *Eur J Neurosci*, 11:2465-73.
- Vergheze C, de Leon J, Josiassen RC. (1996) Problems and progress in the diagnosis and treatment of polydipsia and hyponatremia. *Schizophr Bull*, 22:455-64.
- Voskresenskaya OG, Titov SA, Kamenskii AA, Golubovich VP, Ashmarin IP. (1999) The effects of analogs of the C-terminal fragment of arginine-vasopressin on the dynamics of development of a conditioned active avoidance response in rats. *Neurosci Behav Physiol*, 29:205-10.
- Wadhwa PD, Sandman CA, Porto M, Dunkel-Schetter C, Garite TJ. (1993) The association between prenatal stress and infant birth weight and gestational age at birth: a prospective investigation. *Am J Obstet Gynecol*, 169:858-65.

- 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*, 118:1445-51.
- 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*, 9:25-41.
- Walker E, Mittal V, Tessner K. (2008) Stress and the hypothalamic pituitary adrenal axis in the developmental course of schizophrenia. *Annu Rev Clin Psychol*, 4:189-216.
- Walker SJ, Vrana KE. (1993) Pituitary corticotroph function during the stress hyporesponsive period in neonatal rats. *Neuroendocrinology*, 57:1003-10.
- Wan SL, Liao MY, Sun K. (2002) Postnatal development of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the rat hippocampus. *J Neurosci Res*, 69:681-6.
- Wang Q, Verweij EW, Krugers HJ, Joels M, Swaab DF, Lucassen PJ. (2013) Distribution of the glucocorticoid receptor in the human amygdala; changes in mood disorder patients. *Brain Struct Funct*,
- Wang XD, Labermaier C, Holsboer F, Wurst W, Deussing JM, Muller MB, Schmidt MV. (2012) Early-life stress-induced anxiety-related behavior in adult mice partially requires forebrain corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Eur J Neurosci*, 36:2360-7.
- 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*, 91:400-4.
- Webster JC, Cidlowski JA. (1999) Mechanisms of Glucocorticoid-receptor-mediated Repression of Gene Expression. *Trends Endocrinol Metab*, 10:396-402.
- 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*, 45:420-4.
- Whitworth JA, Mangos GJ, Kelly JJ. (2000) Cushing, cortisol, and cardiovascular disease. *Hypertension*, 36:912-6.

- Wigger A, Sanchez 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*, 29:1-14.
- Williams JS, Williams GH. (2003) 50th anniversary of aldosterone. *J Clin Endocrinol Metab*, 88:2364-72.
- Winslow JT, Insel TR. (1993) Effects of central vasopressin administration to infant rats. *Eur J Pharmacol*, 233:101-7.
- Witt WP, Cheng ER, Wisk LE, Litzelman K, Chatterjee D, Mandell K, Wakeel F. (2014) Maternal stressful life events prior to conception and the impact on infant birth weight in the United States. *Am J Public Health*, 104 Suppl 1:S81-9.
- Wong ML, Loddick SA, Bongiorno PB, Gold PW, Rothwell NJ, Licinio J. (1995) Focal cerebral ischemia induces CRH mRNA in rat cerebral cortex and amygdala. *Neuroreport*, 6:1785-8.
- 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*, 85:1209-22.
- Wynne O, Horvat JC, Kim RY, Ong LK, Smith R, Hansbro PM, Clifton VL, Hodgson DM. (2011) Neonatal respiratory infection and adult re-infection: effect on glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in the hippocampus in BALB/c mice. *Brain Behav Immun*, 25:1214-22.
- Wyrwoll CS, Holmes MC, Seckl JR. (2011) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases and the brain: from zero to hero, a decade of progress. *Front Neuroendocrinol*, 32:265-86.
- Yamakawa M, Ezumi K, Shiro M, Nakai H, Kamata S, Matsui T, Haga N. (1986) Relationships of the molecular structure of aldosterone derivatives with their binding affinity for mineralocorticoid receptor. *Mol Pharmacol*, 30:585-9.
- Yan-Hong F, Hui D, Qing P, Lei S, Hai-Chang W, Wei Z, Yan-Jie C. (2010) Effects of arginine vasopressin on differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol*, 55:489-95.

- Yang J, Yang Y, Chen JM, Wang G, Xu HT, Liu WY, Lin BC. (2007) Periaqueductal gray knockdown of V2, not V1a and V1b receptor influences nociception in the rat. yj6676@yahoo.com. *Neurosci Res*, 57:104-11.
- Yang S, Zhang L. (2004) Glucocorticoids and vascular reactivity. *Curr Vasc Pharmacol*, 2:1-12.
- Yehuda R, Yang RK, Buchsbaum MS, Golier JA. (2006) Alterations in cortisol negative feedback inhibition as examined using the ACTH response to cortisol administration in PTSD. *Psychoneuroendocrinology*, 31:447-51.
- Yeung M, Dickson CT, Treit D. (2013) Intrahippocampal infusion of the Ih blocker ZD7288 slows evoked theta rhythm and produces anxiolytic-like effects in the elevated plus maze. *Hippocampus*, 23:278-86.
- Yi SJ, Masters JN, Baram TZ. (1994) Glucocorticoid receptor mRNA ontogeny in the fetal and postnatal rat forebrain. *Mol Cell Neurosci*, 5:385-93.
- Yoshida N, Maejima Y, Sedbazar U, Ando A, Kurita H, Damdindorj B, Takano E, Gantulga D, Iwasaki Y, Kurashina T, Onaka T, Dezaki K, Nakata M, Mori M, Yada T. (2010) Stressor-responsive central nesfatin-1 activates corticotropin-releasing hormone, noradrenaline and serotonin neurons and evokes hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Aging (Albany NY)*, 2:775-84.
- 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*, 143:1031-9.
- Zacharowski K, Zacharowski PA, Koch A, Baban A, Tran N, Berkels R, Papewalis C, Schulze-Osthoff K, Knuefermann P, Zahringer U, Schumann RR, Rettori V, McCann SM, Bornstein SR. (2006) Toll-like receptor 4 plays a crucial role in the immune-adrenal response to systemic inflammatory response syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:6392-7.
- Zaidi M, Sun L, Robinson LJ, Tourkova IL, Liu L, Wang Y, Zhu LL, Liu X, Li J, Peng Y, Yang G, Shi X, Levine A, Iqbal J, Yaroslavskiy BB, Isales C, Blair HC. (2010) ACTH protects against glucocorticoid-induced osteonecrosis of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107:8782-7.

- Zapletal E, Kraus O, Cupic B, Gabrilovac J. (2013) Differential expression of proopiomelanocortin (POMC) transcriptional variants in human skin cells. *Neuropeptides*, 47:99-107.
- Zelena D, Barna I, Pinter O, Klausz B, Varga J, Makara GB. (2011) Congenital absence of vasopressin and age-dependent changes in ACTH and corticosterone stress responses in rats. *Stress*, 14:420-30.
- Zelena D, Domokos A, Barna I, Csabail K, Bagdy G, Makara GB. (2007) The role of vasopressin in chronic stress studied in a chronic mild stress model of depression. *Ideggyogy Sz*, 60:196-200.
- 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*, 149:2576-83.
- 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*, 202:263-78.
- Zelena D, Foldes A, Mergl Z, Barna I, Kovacs KJ, Makara GB. (2004) Effects of repeated restraint stress on hypothalamo-pituitary-adrenocortical function in vasopressin deficient Brattleboro rats. *Brain Res Bull*, 63:521-30.
- 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*, 24:333-43.
- Zelena D, Mergl Z, Makara GB. (2003) Maternal genotype influences stress reactivity of vasopressin-deficient brattleboro rats. *J Neuroendocrinol*, 15:1105-10.
- Zelena D, Mergl Z, Makara GB. (2004) Maternal genotype can influence the outcome of a study on mutant animals. *Ann N Y Acad Sci*, 1018:477-9.
- Zelena D, Mergl Z, Makara GB. (2006) The role of vasopressin in diabetes mellitus-induced hypothalamo-pituitary-adrenal axis activation: studies in Brattleboro rats. *Brain Res Bull*, 69:48-56.

- Zheng PY, Feng BS, Oluwole C, Struiksma S, Chen X, Li P, Tang SG, Yang PC. (2009) Psychological stress induces eosinophils to produce corticotrophin releasing hormone in the intestine. *Gut*, 58:1473-9.
- Zhong Q, Sridhar S, Ruan L, Ding KH, Xie D, Insogna K, Kang B, Xu J, Bollag RJ, Isales CM. (2005) Multiple melanocortin receptors are expressed in bone cells. *Bone*, 36:820-31.
- Zhou Y, Spangler R, Ho A, Kreek MJ. (2003) Increased CRH mRNA levels in the rat amygdala during short-term withdrawal from chronic 'binge' cocaine. *Brain Res Mol Brain Res*, 114:73-9.
- Zimmerman RS, Frohlich ED. (1990) Stress and hypertension. *J Hypertens Suppl*, 8:S103-7.
- Zoumakis E, Kalantaridou SN, Makrigiannakis A. (2009) CRH-like peptides in human reproduction. *Curr Med Chem*, 16:4230-5.

12. Saját publikációk jegyzéke

12. 1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

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):45-52.

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

Makara G. B, Varga J, Barna I, Pintér O, Klausz B, Zelena D. (2012) The vasopressin deficient Brattleboro rat: Lessons for the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation. *Cell Mol Neurobiol.* 32(5):759-66.

Varga J, Zelena D. (2012) Chapter title: An unfairly undervalued participant of stress processes: the vasopressin. Chapter ID: _11470_ Book title: Vasopressin: Mechanisms of Action, Physiology and Side Effects. Book ID: _1975

Varga J, Ferenczi Sz, Kovács K, Garafova A, Jezova D, Zelena D. (2013) Comparison of stress-induced changes in adults and pups: is aldosterone the main adrenocortical stress hormone during the perinatal period in rats? *Plos One*, 8(9):e72313.

Varga J, Klausz B, Domokos Á, Kálmán S, Pákáski M, Szűcs S, Garab D, Zvara Á, Puskás L, Kálmán J, Tímár J, Bagdy G, Zelena D. (2014) Increase in Alzheimer's related markers preceeds memory disturbances: studies in vasopressin-deficient Brattleboro rat. *Brain Res Bull.* 100:6-13.

12. 2. A szerző egyéb közleményei

Varga J. (2010) Részlegesen albínó foltosszalamandra-lárva észlelése Magyarországon. Állattani Közlemények. 95(2): 305–309.

Könczöl K, Pintér O, Ferenczi S, Varga J, Kovács K, Palkovits M, Zelena D, Tóth ZE. (2012) Nesfatin-1 exerts long-term effect on food intake and body temperature. Int J Obes (Lond). 36(12):1514-21.

Aliczki M, Zelena D, Mikics E, Varga ZK, Pinter O, Bakos NV, Varga J, Haller J. (2013) Monoacylglycerol lipase inhibition-induced changes in plasma corticosterone levels, anxiety and locomotor activity in male CD1 mice. Horm Behav. 63(5):752-8.

Kantor S, Szabo L, Varga J, Cuesta M, Morton AJ. (2013) Progressive sleep and electroencephalogram changes in mice carrying the Huntington's disease mutation. Brain. 136(Pt 7):2147-58.

13. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Zelena Dórának, aki lehetővé tette, hogy az MTA KOKI Magatartásélettan és Stressz Kutatócsoportjában egyetemi hallgatóként megkezdett TDK munkámat PhD keretein belül folytathassam. Iránymutatása határozta meg eddigi tudományos pályafutásomat, az elért tudományos eredményeimet is közös együttműködésünknek köszönhetem. Az elmúlt öt évben nyújtott segítsége, és támogatása nélkül a disszertációm sem készülhetett volna el. Biztató, kedves szavai még a kisebb - nagyobb botlások után is reményt adtak, kitartásra és munkáim folytatására ösztönöztek.

Hálával tartozom Haller Józsefnek, aki csoportvezetőként minden feltételt biztosított hatékony munkavégzésemhez, beszélgetéseinknek köszönhetően elsajátíthattam az eredményes kutatáshoz nélkülözhetetlen kritikán alapuló gondolkozást.

Köszönet illeti a MTA KOKI Magatartás Élettan és Stressz Kutatócsoport valamennyi jelenlegi és volt munkatársát, akikkel volt lehetőségem együtt dolgozni. Külön kiemelném Aliczki Manót, Tulogdi Áront, Mikics Évát és Tóth Mátét, akik beinvitáltak a csoport munkájába. Köszönettel tartozom Pintér Ottónak és Klausz Barbarának, akik a legtöbb tudományos project kivitelezésében segítségemre voltak. A volt diákkörös, jelenleg PhD hallgatók közül Fodor Annának és Balázsfi Diánának tartozom hálával a közös munka során nyújtott segítségért.

Köszönöm Kovács Krisztának és Ferenczy Szilamérnek (MTA KOKI Molekuláris Neuroendokrinológia Kutatócsoport) a kvantitatív PCR módszer betanítását, és Daniela Jezovának (Slovak Academy of Sciences Institute of Experimental Endocrinology Bratislava, Slovakia) az aldoszteron és renin aktivitás mérésekben, nyújtott segítséget.

Köszönöm édesanyámnak és édesapámnak, hogy támogattak elképzeléseim, álmaim megvalósításában.