

FARMAKOLÓGIAILAG KEZELT RÁGCSÁLÓK VISELKEDÉSÉNEK ELEMZÉSE AUTOMATIZÁLT LAKÓKETRECEKBEN

Tézis füzet

Pelsőczy Péter

Semmelweis Egyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Lévay György CSc

Hivatalos bírálók:

Gyertyán István PhD

Halász József PhD

Szigorlati bizottság elnöke:

Szókó Éva DSc

Szigorlati bizottság tagjai:

Petschner Péter PhD, Felszeghy
Klára PhD

Budapest

2020

Bevezetés

Az automatizált lakóketrecek az elmúlt évtizedben jelentős figyelmet kaptak, mint a rágcsálók viselkedésének tanulmányozásának alapvetően új módja. Lehetővé teszik a betegségmodellek különböző viselkedési jellemzőinek tanulmányozását, vagy a farmakológiai kezelések utáni változások követését. Mivel a rágcsálókat szociális környezetben tartják, és saját cirkadián ritmusuk szerint élnek, ezért természetesebb és kevésbé stresszes válaszokat mutatnak a különböző feladatokra.

A térbeli tanulás régóta vizsgált rágcsáló viselkedés, amelyet különböző feladatokban használnak. Méréseivel feltételezhető a vizsgálati alany tanulási képessége és memóriakapacitása. Az Y-labirintusban végzett hagyományos helypreferencia-tanulási feladatban egy egércsoportot csak egyszer lehet mérni. Az automatizált házi ketrecekben, ahol az állatokat hosszabb ideig tartják, egyedi tervezésre van szükség e korlátozás leküzdéséhez.

Számos pszichiátriai rendellenesség tünete a demencia vagy a kognitív zavar, de ez leginkább az Alzheimer-kórban jelentkezik. A tanulási zavarok széles körben használt farmakológiai indukált rágcsálómodellje az akut szkopolamin-kezelés, amely egy antikolinerg vegyület.

Az autizmus spektrumzavar (ASD) az idegrendszer fejlődését befolyásoló állapot, amely ismétlődő viselkedéshez, károsodott szociális interakciókhoz és csökkent kommunikációs képességekhez vezet. Lehetséges okai lehetnek genetikai vagy környezeti eredetűek.

Korábban rágcsálókon különböző viselkedési vizsgálatokat alkalmaztak az autizmushoz hasonló tünetek mérésére. Ezek a tesztek általában a patkányok lakóketrecéből való kiemelésével járnak, ami az ember általi túlzott kezelés

és az új környezetnek való kitétség miatt megnövekedett stressz-szintet okozhat. Korábban számos módszer egy-egy viselkedési tulajdonság mérésére összpontosított, egyszerre csak egyetlen állatnál. A patkány, az emberhez hasonlóan, rendkívül szociális faj, ezért ebben a vizsgálatban arra törekedtünk, hogy a csoportdinamikára összpontosítsunk, nem pedig az egyes patkányokra, mivel a szociális viselkedés és struktúra az ASD-ben érintett. A patkányok megfigyelése a természetes cirkadián ciklusuk teljes időtartama alatt, valamint zavartalan viselkedésmintáik megfigyelése szociális környezetben kiemelt fontosságú volt, és az automatizált lakóketrecek használatával lehetővé vált. Ily módon rendkívül részletes információkat gyűjtöttek. A valproát vagy valproinsav (VPA) egy görcsoldó gyógyszer, amelynek a prenatális expozíció után késleltetett fejlődési hatásai vannak. Emellett autizmushoz hasonló tulajdonságokat - például csökkent szociális interakciót, fokozott ismétlődő viselkedést és szorongást - okoz a neki kitétt vemhes patkányok utódainál. A vemhes patkányok VPA-val való kezelése és utódaik viselkedésének értékelése ezért az ASD értékes, egyedi modelljét hozza létre.

Célkitűzések

Fő célunk az volt, hogy a rágcsálók viselkedésének elemzése során az IntelliCage-ben a hatalmas adatmennyiségek erejét kihasználjuk. Egy új szabványos módszertan létrehozására törekedtünk, amelyet új statisztikai eljárások kidolgozása kísért a megfelelő paraméterek elemzéséhez a viselkedési változások követéséhez. Először egy jutalomvezérelt helypreferencia-tanulási paradigma létrehozására törekedtünk egerekben. A kognitív károsodás egy már jól tanulmányozott és dokumentált egérmodelljét

tervezzük alkalmazni, amely egy antikolinerg szer, a szkopolamin segítségével zavarja a hosszú távú memória kialakulását. A kísérleti alanyok számára jelentkező kihívás fokozása érdekében szekvenciálisan tervezzük a reverzál tanulás bevezetését a jutalmazott sarok rendszeres változtatásának formájában. Ennek során nemcsak az egerek tanulási képességeit vizsgáljuk, hanem az általános aktivitást, a nospoke és az ivási viselkedést is. Egy külön vizsgálatban szeretnénk tovább jellemezni a patkány VPA modell, új berendezéssel és az adatgyűjtés és -elemzés új módjával, remélve, hogy eddig ismeretlen viselkedési formákat fedezünk fel, amelyeket potenciális új biomarkerekként hasznosíthatunk. Célunk az volt, hogy felfedezzük a viselkedési mintázatokat, amikor az állatokat szociális környezetben, viszonylag zavartalanul tartjuk, miközben természetes, zavartalan cirkadián ciklusuk alatt megfigyeljük őket. Úgy terveztük, hogy először a fenotípust jellemezzük hagyományos módszerekkel, amelyeket a patkányok autizmus spektrumzavarával (ASD) kapcsolatos különböző tünetek vizsgálatára használunk. A fenotípus adatok felhasználásával előzetesen kiválasztottunk egy állatcsoportot, és megterveztünk egy kísérletsorozatot az IntelliCages segítségével. A kommunikáció a szociális interakció és a szociális megismerés kulcsfontosságú része. Mivel ez utóbbi terület az ASD-ben nagymértékben érintett, az ASD-ben gyakran célzott vizsgálati terület. A felnőtt állatok kommunikációja azonban alig mérhető. A patkányok csoportján belüli hierarchia kialakításának folyamatát a szociális agonisztikus viselkedés alakítja. Ide tartozik a kergetőzés, boksolás, harapdálás, harapás, amelyek viselkedések minden bizonnyal az állatok közötti audiovizuális kommunikáció eredménye. A hierarchia mindezen agonisztikus interakciók halmozott eredményeként értelmezhető. A hierarchia dinamikáját tanulmányozva következtetni lehet az autista állatok kommunikációs készségeire. A kísérletet hosszabb ideig, viszonylag minimális kihívás mellett végeztük. A vizsgálat utolsó része egy felerősített versenyhelyzet volt,

részleges vízmegvonást alkalmazva, ami arra ösztönözte a patkányokat, hogy szigorú hierarchikus struktúrát alakítsanak ki az egyes csoportokon belül.

Módszerek

Vehikulummal és szkopolaminnal kezelt egércsoportokat használtunk a helypreferencia és a reverzál tanulás képességének vizsgálatára. Az egerekbe mikrochipeket ültettünk be, mielőtt az IntelliCage ketrecekbe helyeztük őket. A ketrecekben a víz csak a négy sarokban állt rendelkezésre, amelyeket egyszerre csak egy egyed látogathatott. A sarkok érzékelik a patkányok mikrochipjeit, majd azonosítják a kísérleti alanyokat. A szekvenciális training folyamat egy akklimatizációs periódussal kezdődött, amely lehetővé tette számukra, hogy korlátozás nélkül igyanak. Másodsor, az egereknek nosepoke-ot kellett végrehajtaniuk, hogy kinyissanak egy ajtót, amely mögött a palackok találhatóak, ahol 7 másodpercig ihatnak. A helypreferencia-tanulási feladatban csak egy sarok volt helyes, míg a többi három sarok helytelen volt. A helytelen sarkokban szintén lehetőségük volt 7 másodpercig inni, de egy averzív inger, egy gyors air-puff-ot is kaptak. Az egereket egyenletesen osztottuk el úgy, hogy 4 egér került ugyanabba a sarokba. Az utolsó, legnehezebb feladat egy fordított tanulási paradigma volt, amelyben a helyes sarok pozícióját naponta váltogattuk. Ebben a feladatban naponta 3 órán keresztül jutottak hozzá a feladat végrehajtásához, ami 21 órás vízmegvonást jelentett minden egyes ülés előtt. A látogatásokat, nosepoke-okat, ivásokat és azok időtartamát mértük, különböző paramétereket számoltunk ki és hasonlítottunk össze.

A vemhes patkányok két csoportját vehikulummal vagy VPA-val injektáltuk. Az F1 generációt használtuk fel a későbbi kísérletekhez. Az alomban egy sor kísérletet végeztünk el az autisztikus tulajdonságok felmérésére. Pontozási rendszert alkalmaztunk egy közel homogén fenotípusú csoport kiválasztására. Ezután a patkányokba mikrochipeket ültettünk, mielőtt külön IntelliCage ketrecekbe helyeztük őket, az egyikbe VPA-s csoportot, a másikba pedig a kontroll patkányokat. Az egérkísérlethez hasonlóan a training folyamat az akklimatizációval kezdődött, amelyet a nosepoke tanulása, az oldalpreferencia és a reverzál tanulás, végül pedig a kompetíció követett. A vízhez való hozzáférés egyre jobban korlátozódott. A kompetícióban a patkányok szándékosan nem voltak egyenlően elosztva a sarkok között. Mindegyiküknek csak egy palackot jelöltünk ki, hogy növeljék a gyakori szociális interakciók esélyét. Két, egyenként 2 órás hozzáférési ablakuk volt. A látogatásokat, nosepoke-okat, ivást és ezek időtartamát mértük, különböző másodlagos paramétereket, mintákat és arányokat számoltunk ki és hasonlítottunk össze.

Eredmények

A szkopolamin különösen az első 20 percben növelte az egerek aktivitását (a látogatások számával mérve). A szkopolamin szignifikánsan növelte az nosepoke-ok számát látogatonként, és csökkentette a látogatások időtartamát. A szkopolamin drasztikusan csökkentette a nosepoke és az ivás időtartamát. A szkopolamin-csoport hibaaránya a reverzál tanulási feladatban szignifikánsan magasabb volt.

A fő viselkedési vizsgálatot megelőzően a VPA-patkányokat autizmushoz hasonló viselkedésmódok szempontjából vizsgáltuk. A kontroll

patkányokhoz képest csökkent rearing mozgásokat mutattak, valamint csökkent vokalizációt, amikor elválasztották őket az anyjuktól. A Von Frey-teszt szignifikáns emelkedést mutatott az érzékenységben.

Az akklimatizáció első 12 órájában a VPA-patkányok szignifikánsan csökkent kezdeti explorációt mutattak. A VPA-patkányok nem mutattak károsodott oldalpreferenciát vagy reverzál tanulást. A csökkent exploráció a kísérlet nagy részében jellemző maradt a VPA csoportra, kivéve a kompetícióban.

Az aktivitási mintázat elemzése cirkadián különbséget mutatott ki a csoportok között, ami a VPA csoport esetében a kontrollhoz képest kétórás késést jelentett a csúcstevékenységben. A *Cry1*, *Per1*, *Arntl*, *Npas2*, *Clock* és *Mtnr1a* génexpressziós szintek nem mutattak szignifikáns különbséget a csoportok között.

A VPA-patkányok szignifikánsan megnövekedett óránkénti ivási számot és látogatásonkénti ivási időtartamot mutattak minden kísérleti fázisban. A szerológiai adatok, az aldosteron, az antidiuretikus hormon és a glükóz szintje nem különbözött szignifikánsan a csoportok között. A versenyben az óránkénti ivási szám eloszlása drasztikusan eltérő alakot mutatott: a kontroll állatok adatai logaritmikus görbével illeszkedtek, míg a VPA-patkányok eloszlása "tört pácás" modellel volt illeszthető a legjobban. A Pielou-féle egyenletességi index nem mutatott különbséget a csoportok között az akklimatizációs és a nospoke-tanulási fázisban. Az oldalpreferencia és a fordított tanulási paradigmákban a VPA csoport enyhe, de szignifikáns növekedést mutatott a kontroll csoportéhoz képest. A VPA csoport drasztikusan magasabb és szignifikáns egyenletességet mutatott a kontrollcsoportéhoz képest. Az átlagonkénti maximális újbóli belépések sokkal nagyobb számban fordultak elő, amikor a víz korlátozott volt (oldalpreferencia és reverzál tanulási paradigmák és kompetíció) a

kontrollcsoportban. Ehhez képest, amikor a víz sokkal kevésbé volt korlátozott (akklimatizációs és nospoke tanulás), ezek az újbóli belépések szignifikánsan alacsonyabbak voltak a kontrollcsoportban. A VPA-patkányoknál nem volt különbség az újbóli látogatások száma között, amikor a víz kevésbé vagy jobban korlátozott volt.

Következtetések

Automatizált lakóketrecek segítségével a pszichiátriai rendellenességek különböző rágsálómodelljeit hoztuk létre a mögöttes mechanizmusok tanulmányozására. Az összegyűjtött hatalmas mennyiségű adatot kifinomult, egyedi statisztikai megközelítéssel elemeztük. Két rágsálófajon is új viselkedési tesztek hoztunk létre, amelyek lehetővé teszik a különböző pszichiátriai betegségmodellek tüneteinek enyhítésére szolgáló vegyületek vizsgálatát. Ezek az eredmények tovább validálják eredményeinket, és lehetőséget nyitnak arra, hogy saját szintetizált vegyületeinket közepes átmenő teljesítményű, robusztus viselkedési módszerekkel teszteljük, amelyek nagy transzlációs értékkel bírnak. Úttörő munkát végeztünk a rágsálók viszonylag stresszmentes környezetének és az automatizált lakóketrecek által lehetővé tett szubjektív torzításmentes adatgyűjtés előnyeinek kihasználására a farmakológiai vizsgálatokban.

A jelölt publikációinak irodalomjegyzéke

Pecze, L., Pelsoczi, P., Kecskés, M., Winter, Z., Papp, A., Kaszás, K., Letoha, T., Vizler, C., & Oláh, Z. (2009). Resiniferatoxin mediated ablation of TRPV1+ neurons removes TRPA1 as well. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 36(2), 234–241. <https://doi.org/10.1017/s0317167100006600>

Pelsőczi, P., & Lévy, G. (2017). Effect of Scopolamine on Mice Motor Activity, Lick Behavior and Reversal Learning in the IntelliCage. *Neurochemical Research*, 42(12), 3597–3602. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2408-4>

Pelsőczi, P., Kelemen, K., Csölle, C., Nagy, G., Lendvai, B., Román, V., & Lévy, G. (2019). Disrupted Social Hierarchy in Prenatally Valproate-Exposed Autistic-Like Rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13, 295. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00295>

Lévy G., (2020). Autism spectrum disorder and social hierarchy in rats *Research OUTREACH*. (117). DOI: 10.32907/RO-117-3437

Lili Veronika Nagy, Zsolt Kristóf Bali, Gábor Kapus, Péter Pelsőczi, Bence Farkas, Balázs Lendvai, György Lévy, and István Hernádi (2020): "Converging evidence on D-amino acid oxidase-dependent enhancement of hippocampal firing activity and passive avoidance learning in rats" *International Journal of Neuropsychopharmacology*, <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyaa095>

Szabadalmak

Patent application pending (equal inventor share): György Lévy, Viktor Román, Kristóf Kelemen, Péter Pelsőczi File number: P1900442.
Submitted: 20th December 2019