

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
ÉLETTANI, SZERVEZETTANI ÉS IDEGTUDOMÁNYI TANSZÉK

XXXI. OTDK BIOLÓGIA SEKCIÓ

Az új környezetben mutatott szorongás vizsgálata egereken: a buspiron hatása

Szögi Titanilla Zita

Biológus MSc szakos hallgató, II. évfolyam

Témavezető:

Dr. Szegedi Viktor
Tudományos munkatárs
Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémia Intézet

Belső konzulens: Dr. Farkas Tamás

egyetemi tanár
Természettudományi és Informatikai Kar,
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

Tartalomjegyzék

1	Rövidítésjegyzék	3
2	Bevezetés.....	4
2.1	A szorongás	4
2.2	Szorongás idegi mechanizmusai	4
2.3	A szorongásban szerepet játszó fő neurotranszmitterek, neuropeptidek és hormonok	6
2.3.1	Gamma-amino-vajsav.....	6
2.3.2	Dopaminerg és szerotonerg rendszer	6
2.3.3	Noradrenerg rendszer	6
2.3.4	Neuropeptid Y	7
2.3.5	Hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely	7
2.3.6	Szorongásoldók	7
2.4	A szorongás vizsgálatára szolgáló magatartástereszték	8
2.4.1	Nyílt porond teszt (OF).....	8
2.4.2	Emelt keresztpalló teszt (EPM).....	8
2.5	Megbirkózási (coping) stratégia.....	9
2.6	One-trial tolerance (OTT)	9
3	Célkitűzések	10
4	Anyagok és módszerek	11
4.1	Állatok.....	11
4.2	Kézhez szoktatás (handling).....	11
4.3	Kezelések	11
4.4	Magatartáskísérlet	11
4.5	Emelt keresztpalló teszt (Elevated plus maze).....	12
4.6	Új környezet (kontextus váltási teszt)	12
4.7	Statisztikai analízis	12
5	Eredmények	13
5.1	AX és nAX állattörzsek validálása emelt keresztpalló teszttel	13
5.2	Kontextus váltási teszt.....	14
5.3	Fordított kontextus váltási teszt.....	16
5.4	2,5 mg/ttkg dózisú bupiron kezelés hatása	17
5.5	2,5 mg/ttkg dózisú bupiron kezelés hatása, kontextus váltási tesztben	20
5.6	5,0 mg/ttkg dózisban injektált bupiron hatása az emelt keresztpalló tesztben.....	23
5.7	5,0 mg/ttkg dózisban injektált bupiron hatása kontextus váltási tesztben	26
6	Eredmények megvitatása	29
6.1	A bupiron hatása a megbirkózási stratégiákra	31
7	Konklúzió	33
8	Összefoglalás	34
9	Irodalomjegyzék	35
10	Köszönetnyilvánítás.....	38
11	Nyilatkozat	39

1 Rövidítésjegyzék

5-HT_{1A} – szerotonin _{1A} receptor

Amy – amygdala

Bus – buspiron

CRH – kortikotropint felszabadító hormon

EPM – emelt keresztpalló teszt

fMRI - funkcionális mágneses rezonancia

GABA – gamma-amino-vajsav

HP – hippocampusz

HPA – hipotalamusz –hipofízis- mellékvese tengely

LC – locus coeruleus

NPY – neuropeptid Y

OF – nyílt porond teszt

OTT – one-trial tolerance

PET – pozitron emissziós tomográfia

PFC – prefrontális kéreg

Thal – talamusz

2 Bevezetés

2.1 A szorongás

A szorongás érzelmeink egyik alaptípusa, mely fenyegető faktorok hatására alakul ki. A normál szorongás természetes evolúciós válasz a stresszes stimulusra, félelmi állapot, melyet egy reális, vagy elképzelt fenyegető szituáció, esemény idéz elő. Az ingerekre adott szorongásos válaszok szomatikus, kognitív, érzelmi és viselkedési komponensekből állhatnak, ezek együttes működése a túlélést szolgálják. Gyakran fizikai és pszichológiai tünetek is társulnak hozzá: motorikus feszültség (remegés, nyugtalanság, fáradékonyság, izomfeszültség), autonóm hiperaktivitás (légszomj, heves szívdobogás, hasmenés, gyakori vizeletürítés), kóros éberség, továbbá izgatottságérzés, túlzott ijedősség, koncentrálnálási problémák, elalvási és alvási zavarok, ingerlékenység (1). Kiváltó inger lehet egy új, vagy egy váratlan szituáció. Ide sorolhatjuk a hangos zajokat, a hirtelen mozgást, a magas helyeket, az idegenek jelenlétét, vagy állatok esetén a ragadozók szagát. Bizonyos körülmények és különböző stresszorok túlzott érzelmi és adott esetben szomatikus válaszokat válthatnak ki, ezek különböző szorongásos zavarokat okozhatnak. Megkülönböztetünk spontán szorongást, fóbiás szorongást, illetve pánikot, melyeket a kiváltó inger intenzitásának nagysága szab meg. Egerek és patkányok esetében is megfigyelhető az általános szorongászavar. A kutatások állatmodelleket használnak fel a szorongás tanulmányozására (1). A szorongásos viselkedés különböző magatartástereszték segítségével mérhető, ilyen az emelt keresztpalló teszt (elevated plus maze, EPM), a nyílt porond teszt (open field, OF), és a fény/sötét teszt.

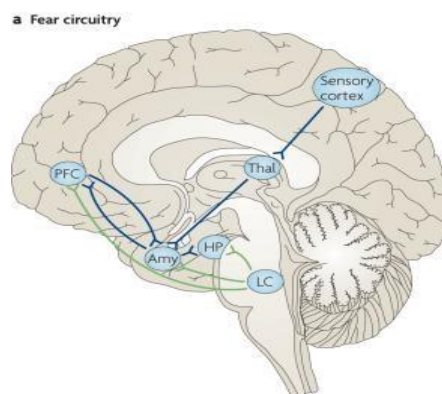
2.2 Szorongás idegi mechanizmusai

A szorongásos betegségek a leggyakoribbak a pszichiátriai zavarok közül. A normál szintű fiziológiai szorongás a változó környezet miatt szükséges az életben maradáshoz, ezzel szemben a generalizált szorongás, vagy a túlzott félelem ronthatja az életminőséget (8). A félelem és a szorongás magatartási gátlást válthat ki, amely visszatarthatja a beteget a mindennapi tevékenységektől (2). Normál esetben a szorongás hamar megszűnik, és egyensúlyi állapot jön létre, amely gátolja a felesleges veszélyek vállalását és biztosítja a magatartási folyamatok normális lefolyását.

A szorongási állapotot bonyolult idegi mechanizmusok szabályozzák. Az amygdala központi jelentőségű a szorongásban, felelős a szorongásos és félelmi reakciók

kialakulásáért, illetve érzékenysége megváltozhat, amennyiben hosszú távú félelemkeltő ingerek érik az állatot (2). A viscerális és a környezetből jövő ingerek által közvetített információk itt összegződnek. Az exteroceptív ingereket a talamusz és az agykéreg közvetíti az amygdala felé (2), míg a viscerális információk a locus coeruleus irányából érkeznek. A szorongásban szerepet játszó memórianyomok a szeptohippokampális pályán és a talamuszon keresztül jutnak el az amygdalába (2). A substantia grisea centralis a szorongási állapot fenntartása kapcsán emelhető ki. A locus coeruleus működése egyes adatok szerint serkenti, mások szerint csökkenti a szorongást (2). Míg a raphe magok (szerotonerg magcsoport) amygdala felé irányuló rostjai serkentik, addig a substantia grisea centralis felé tartó rostjai gátolják a szorongási állapotot (2).

A limbikus agyi területek fontos szerepet játszanak a félelemi rendszerek szabályzásában (6). Ezek a területek az agy monoaminerg rendszerei által erősen innerváltak. A hippocampusz kiemelkedő fontosságú a deklaratív memória kialakulásában, valamint az emóciók (félelem) és a viselkedés szabályzásában is szerepet játszik. A prefrontális kéreg az emócionális válaszokat szabályozza azáltal, hogy az amygdalára és a nucleus accumbensre is hatást fejt ki. A nucleus accumbens a félelmi stimulusokra, míg a hippocampusz a jutalmazó ingerekre adott válaszokat szabályozza. Ezen területek funkcionális épsége, nagy jelentőséggel bír a stresszes körülményekkel való megbirkózásban (6).



1. ábra: A félelem neuronális pályái. Thal: talamusz, PFC: prefrontális kéreg, Amy: amygdala, HP: hippocampusz, LC: locus coeruleus (6).

Képalkotó eljárásokkal, pl. pozitron emissziós tomográfia (PET) és funkcionális mágneses rezonancia (fMRI) segítségével orvosok megállapították, hogy a humán és az

állati szorongásban szerepet játszó idegközpontok egy része azonos (amygdala, substantia grisea centralis, hipotalamusz, hippocampusz, prefrontális kéreg) (2).

2.3 A szorongásban szerepet játszó fő neurotranszmitterek, neuropeptidek és hormonok

2.3.1 Gamma-amino-vajsav

A gamma-amino-vajsav (GABA) az emlős idegrendszerben fő gátló neurotranszmitter, nélkülözhetetlen a stressz adaptációban és a patológiai szorongásos betegségek ellen irányuló védelemben. Széles körben elfogadott, hogy azoknál a betegeknél, akik szorongásos tüneteket mutatnak, bizonyos agyi területeken csökken a benzodiazepám kötőhelyek száma, amely a GABA_A receptorok csökkent számára utal. A benzodiazepám szorongás csökkentő hatását a heteromer receptorok α_2 alegységei közvetítik (4). Továbbá a GABA rendszer fontosságára utal az is, hogy a szorongásos betegségek benzodiazepámmal történő kezelésének hatásfoka igen magas (4).

2.3.2 Dopaminerg és szerotonerg rendszer

A szerotonerg neuronok a raphe magokból széles körben projektálnak. Az akut stressz az agy számos pontján megváltoztatja a szerotonin szintet (6). A szerotonin modulálja a stresszre adott idegi válaszokat anxiolitikumként és anxiogenikumként egyaránt hathat (az érintett agyterülettől és receptor típustól függően) (6). A dopaminerg neuronok aktivációja jutalmazáskor történik, azonban az averzív stimulusok gátlóan hatnak a dopamint felszabadító idegsejtekre (6). Egyes D₂- és D₃-receptor antagonisták (benzodiazepinekhez szerkezetileg hasonló dibenzoxazepinek) gátolják a szorongást úgy, hogy közben a motoros funkciókat nem befolyásolják (2).

2.3.3 Noradrenerg rendszer

A stressz az agytörzs magjaiból noradrenalin felszabaduláshoz vezet, ezek közül a legfontosabb a locus coeruleus (6). A növekvő noradrenerg stimulációk hatására számos előagyi terület érintett az emocionális viselkedésben (amygdala, nucleus accumbens, prefrontális kéreg és a hippocampusz) (6).

2.3.4 Neuropeptid Y

A neuropeptid Y (NPY) az agy nagy részében megtalálható, rágsálókban szorongásoldó hatását is ismerjük. Feltételezett szerepe, hogy különböző stresszes szituációkkor erősíti a kogníciót és az éberséget, továbbá ellensúlyozza a kortikotropin felszabadulását serkentő hormon (CRH) szorongáskeltő hatását az amygdalában, hippokampuszban, hipotalamuszban és a locus coeruleusban (6). Tudományos kutatások arról számoltak be, hogy az agy NPY szintje befolyásolja a stresszszorral szembeni megbirkózásnak a sikerességét (6).

2.3.5 Hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely

A hipotalamuszból stressz válaszkor CRH szabadul fel, ez aktiválja a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese (HPA) tengelyt és a kortizol felszabadulását (6). A fiatalkori stressz az emberi és állati kísérletekben egyaránt összefüggést mutat a CRH krónikusan magas szintjével (6).

2.3.6 Szorongásoldók

A benzodiazepámot pszichiátriai betegségek (szorongásos betegségek, generalizált szorongás, szociális szorongásos betegségek) kezelésére alkalmazzák. Szorongásoldóként használnak barbiturátokat is, de a benzodiazepámokhoz képest alacsonyabb a terápiás indexük (32). Mindkét vegyület a GABA_A receptorok allosztérikus modulátorai, melyek a klorid-csatorna komplex területén kötnek be a receptorhoz. Mivel nem specifikusan kapcsolódnak a receptorokhoz, fokozzák a GABAerg neurotranszmissziót (33).

A buspiron szorongásoldó és antidepresszáns hatással egyaránt bír, így széles körben alkalmazzák a klinikumban szorongásos betegségek kezelésére (Buspar) (8). A buspiron nem okoz szedatív hatást és függőséget, kognitív és pszichomotoros gyengülést, vagy izom relaxációt, valamint nem kötődik a benzodiazepám GABA-receptor komplexhez (8). Azonban magas affinitással kapcsolódik a szerotonin 5-HT_{1A} receptorhoz, annak parciális agonistája, így hatékonyabbá teszi az 5-HT_{1A} receptorok működését. A raphe magban lévő preszinaptikus 5-HT_{1A} receptorok teljes agonistája, ahol gátolja a szerotonin neuronok tüzelését, valamint a szerotonin metabolizmusát (8). A buspiron hatást gyakorol a dopaminerg rendszerre az 5-HT_{1A} és a D₂-receptorokon keresztül egyaránt (8). Az irodalomból ismert az is, hogy a buspiron gyenge affinitással kötődik az 5-HT₂ receptorokhoz, továbbá állatkísérletben igazolták azt is, hogy a buspiron 0,01-2,5 mg/ttkg

dózishatárok között dózisfüggő hatással bír, az agyi szerotonin szintet csökkenti, míg a noradrenalin és a dopamin szintet növeli. A vegyület hatásmechanizmusa még pontosan nem ismert, azonban a fentebb említett állatkísérlet eredményéből arra lehet következtetni, hogy számos monoaminerg rendszert befolyásol (8).

2.4 A szorongás vizsgálatára szolgáló magatartástesztek

2.4.1 Nyílt porond teszt (OF)

Az állatok magatartásának tanulmányozására számos jól beállított teszt áll a kutatók rendelkezésére. Az egyik ilyen teszt a nyílt porond teszt (OF), amely alkalmas a szorongás, félelem és többek között az általános aktivitás mérésére (12). A teszt egy közepén megvilágított kör, vagy négyzet alakú arénát használ, amelybe helyezve az állat az oldalfalak közelségét preferálja (tigmotaxis). Fellép ugyanakkor egy explorációs hajtóerő (drive) is, így az állat valamennyi időt a világos középső részben is eltölt. Ennek értelmében a nyílt porond teszt alkalmazásakor elkülönítünk egy belső (centrum) és egy külső (periféria) területet. A teszt során mérik az előre definiált két térrészben eltöltött időt és a centrumba történő belépések számát, továbbá vizsgálják az ágaskodással, vakaródzással és a mosakodással töltött időt is. Amennyiben az állat kevesebb időt tölt a belső arénában, vagy kevesebb alkalommal lép be a centrumba, arra következtethetünk, hogy az egyed erősebb szorongásos magatartásformával rendelkezik (3).

2.4.2 Emelt keresztpalló teszt (EPM)

Az emelt keresztpalló teszt (EPM) az egyik leggyakrabban használt tesztje a rágcsálók szorongással összefüggő magatartásainak (7, 18). A patkányok és az egerek is normális körülmények között kerülnek az EPM nyitott karjait, helyette a zárt karokban maradnak (13). Abban az esetben, ha az állatot kényszerítjük, hogy a nyílt karok valamelyikében maradjon, erőteljes félelmi reakciót láthatunk: intenzív székelés, megnövekszik a plazma kortikoszteron szintje, az állat lemerevedik (13). A jelenségnek többféle magyarázata lehet. Az egyik lehetőség, hogy az emelt keresztpalló a megszokottól eltérő környezetet jelent és averzív ingerként hat az állatra. Másik magyarázat, hogy az állat fél a magasságtól, ez pedig összefüggésben áll a nyitott karokkal (13). Egy harmadik feltételezés szerint a rágcsálókra szorongáskeltőként hat a nyitott karokat körülvevő szabad nyílt tér (13). A fentebb leírt lehetőségek közül néhány, vagy akár mindegyik faktor motiválhatja az állatot, hogy kerülje a nyitott karokat. Azonban ebben a tesztben is jelentkezik az explorációs hajtóerő, így a kezeletlen állat önmagától is eltölt némi időt a

nyílt karokban. Abban az esetben, amikor az állatokat egy számukra ismeretlen környezetbe helyeznek, egyfajta konfliktus helyzetbe kényszerülnek. Választaniuk kell a természetes felfedező ösztönük, és az újjal szembeni félelem, a potenciálisan jelenlévő veszély között, mely stressz választ idéz elő (16). A stressz okozta megváltozott magatartási mintázat mérhető a késlekedésben, a karokba lépések számában, és/vagy a felderítő viselkedés idejében, továbbá az emocionális válaszokban (székelés, lemerevedés, tisztálkodás) (16).

2.5 Megbirkózási (coping) stratégia

Abban az esetben, ha az embereket, vagy az állatokat stresszes esemény éri, megpróbálnak különböző megbirkózási stratégiákat alkalmazni az averzív inger leküzdésére (15). Egerek és patkányok esetében különböző coping válaszok figyelhetők meg. Az eltérő válaszok különböző szintű emocionális reakcióképességet idéznek elő (15). A megbirkózási stratégiákat (állatok esetében) kétféle módon különböztetik meg: proaktív, és reaktív coping. A proaktív típusba tartozó állatokra agresszív viselkedés, és alacsony adaptációs képesség jellemző, míg a reaktív állatok kevésbé agresszívak, és sokkal rugalmasabbak a változó környezeti hatásokra. Egy másik csoportosítás szerint a viselkedésmintázatok passzív, vagy aktív magatartást követnek (15).

2.6 One-trial tolerance (OTT)

File és mtsai. 1990-ben írták le először az emelt keresztpalló teszt egyik érdekes sajátosságát. Kísérleteikben azt tapasztalták, ha az állatokat egynél többször vetették alá (akár rövid időn belül, akár hosszú távon) az emelt keresztpalló tesztnek, erőteljesen csökkent az állatok nyitott karokban töltött ideje, ennek vonzataként pedig több időt töltöttek a zárt karokban. Ezt a jelenséget one-trial tolerance-nak (OTT) nevezték el (11). Az OTT okozta változás azonban a szorongásoldó gyógyszerek hatásában is érzékelhető. Az anxiolitikumként alkalmazott benzodiazepám hatását az újra tesztelés drámaian csökkenti (11). Több elképzelés is van az OTT okáról: az egyik szerint az állatban a második tesztre már fóbiás szorongás alakult ki a nyílt karban való tartózkodástól. A másik elképzelés viszont a tanulást helyezi előtérbe. E szerint az állat már felfedezte, explorálta a nyílt kart, így az már nem szolgál újdonsággal, elvesztette a motiváló hatását. A két hipotézis eltérő megbirkózási mintázatot feltételez: a kialakult fóbia miatt az állat passzívan reagál, fél kimenni a zárt karból, míg a már ismert nyitott kar esetén a zárt karban való tartózkodás oka az elvesztett explorációs motiváció (16, 11).

3 Célkitűzések

- Kísérleteink során arra kerestük a választ, vajon az eltérő szorongási szintű állatok eltérő megbirkózási viselkedési mintázatot alkalmaznak-e új környezetben?
- Továbbá szorongásoldó (buspiron) kezelés hatására történik-e változás a különböző törzsek által alkalmazott stratégiákban?

4 Anyagok és módszerek

4.1 Állatok

Kísérleteinkhez beltenyésztett, 30-35 gramm közötti 2,5-3 hónapos korú hím szorongó (AX) és nem szorongó (nAX) egereket használtunk. A két egértörzset az EGIS Gyógyszergyár Nyrt-ben Müller Géza kétirányú beltenyésztéssel hozta létre. Az állatházban állandó hőmérséklet és páratartalom mellett 12 órás (08:00-20:00) sötét/világos ciklusú mesterséges gyenge szórt fényű megvilágítást alkalmaztunk. A tesztek, és az injektlás alatt az állatokat egyenként, külön állatketrecekben tartottuk egy szellőztethető ketrecállványban, ahol mindig steril levegőhöz jutottak. Az egerek *ad libitum* juthattak standard komplex rágsáló táphoz és csapvízhez. Az állatházban halk zene szólt, az esetleges kívülről beszűrődő zajok tompítására. Kísérleteinket a vonatkozó állatkísérleti és állattartási törvények betartásával végeztük. Kísérleteinkben a 2010/63-as EU direktívában leírtak szerint jártunk el, a regionális Állategészségügyi és Élelmiszer-ellenőrzési Hivatal által kiadott XXXI/2012 engedély szám alatt.

4.2 Kézhez szoktatás (handling)

Hét, egymást követő napon, naponta egyszer kézhez szoktattuk az állatokat, úgy hogy az első napokon (1-2. nap) kézfejünket a dobozba helyeztük 5-6 percre (ismerkedési interakció), míg a többi napon törzsüket átfogva nyitott tenyerünkbe helyeztük az állatokat egyenként néhány percre (9).

4.3 Kezelések

A magatartásteresztet megelőzően állatainkat naponta, 4 héten át intraperitoneálisan kezeltük buspironnal két különböző dózisban (2,5 mg/ttkg, 5,0 mg/ttkg). Az állatokat a teszteket megelőzően egy órával injektáltuk.

4.4 Magatartáskísérlet

A magatartástereszt az állatházzal azonos helyiségben folyt. A kísérleti területet fekete színű függönnyel három oldalról körbekerítettük. Az így elválasztott másik térrészben monitoron keresztül figyeltük meg az állatok viselkedését. Az apparátus felett rögzített kamerával (Panasonic CCTV camera Model No.: WV-BP330/GE, Ultrak lens 3,5-8,0 mm F1,4) az egyes tesztekéről videofelvételt készítettünk. A magatartáselemzést EthoVision (Noldus Information Technology, Netherland 2002) programmal végeztük.

Az egy hetes napi rendszerességgel végzett kézhez szoktatást követően nyolc, egymást követő napon a szorongás mérésére alkalmas emelt keresztpalló tesztben (elevated plus maze, EPM) vizsgáltuk az állatok szorongási paramétereit. Mivel a szorongást fokozottan befolyásolja az állatok endogén hormonszintje (kortikoszteron, progeszteron, tesztoszteron), amely erősen függ a cirkadián ritmustól is (10), a teszteket minden nap azonos időben kezdtük. Az állatokat mindig ugyanúgy; nyitott tenyérből nekünk háttal a nyitott kar felé nézve helyeztük a centrumba (nyitott és zárt karok találkozásának pontja). Belépésnek számított, ha az állat mind a négy mancsával valamelyik karban tartózkodott. Az apparátus egyenletes megvilágítását két lámpa segítségével valósítottuk meg, mind a zárt (15-16 lux), mind a nyitott karokban (45-47 lux).

4.5 Emelt keresztpalló teszt (Elevated plus maze)

A teszt apparátus rozsdamentes acélból készült, belülről matt fekete festésű, kettő nyitott és kettő zárt karral rendelkezik. A két nyitott kart 1,5 cm magasságú perem szegélyezi, a zárt karok falmagassága 15 cm. A karok hossza egyenként 35 cm, szélességük 7 cm, az apparátus földtől mért magassága 50 cm. Minden állat után 20%-os etilalkohollal tisztítottuk ki. A teszt során az alábbi paramétereket vizsgáltuk: nyitott és zárt karokban eltöltött idő, a zárt és nyílt karokba történő belépések száma.

4.6 Új környezet (kontextus váltási teszt)

Azoknál az állatoknál, ahol az új környezet hatását vizsgáltuk, a magatartásteszt harmadik napjától megváltoztattuk az EPM környezetét. A normál fényű izzókat kicseréltük kék fényű izzókra. Az apparátus megvilágítási elrendezésén nem változtattunk a zárt karokban 12-14 lux, a nyitott karokban 36-40 lux fényerősséget mértünk. Az etilalkoholos tisztítás helyett pedig az apparátust enyhén mosószeres vízzel töröltük át minden állat után. Egy másik állatcsoportnál az első két napon kék fényt és mosószeres tisztítást alkalmaztunk, amelyet a kísérlet további részében felváltott a fehér fény és az etilalkoholos tisztítás.

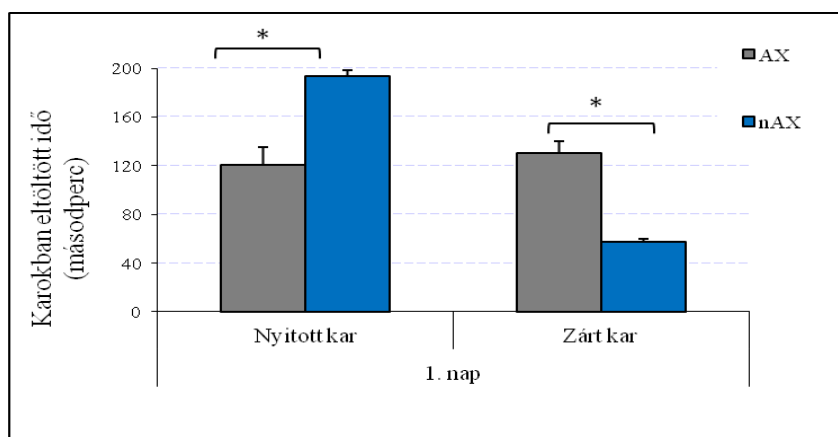
4.7 Statisztikai analízis

A grafikonokon a csoportonként átlagolt egyes karokban eltöltött időt ábrázoltuk. Adataink statisztikai kiértékeléséhez SPSS programot (Statistics 17.0.0; Release 2008 WINWRAP BASIC) és MS Office Excel 2007-et használtunk. Az értékeléshez független t-tesztet, páros t-tesztet és ismételt mérések ANOVA-t alkalmaztunk.

5 Eredmények

5.1 *AX és nAX állattörzsek validálása emelt keresztpalló tesztel*

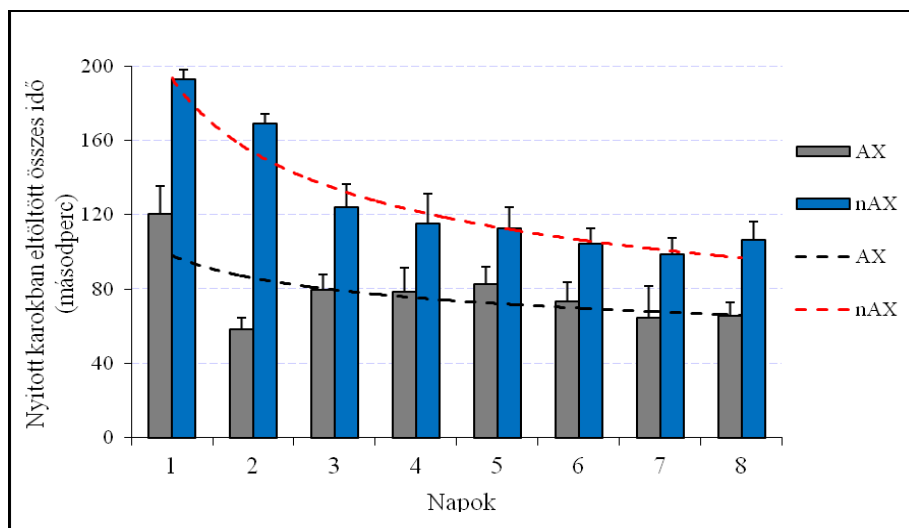
Kísérleteink kezdetén megvizsgáltuk, hogy az általunk használt két különböző szorongási fenotípussal rendelkező beltenyésztett egértörzs állatai között az emelt keresztpalló tesztben a zárt és nyitott karokban eltöltött időt figyelembe véve, tapasztalható-e különbség. Ehhez az EPM teszt első napját vettük figyelembe. Eredményeink azt mutatták, hogy a szorongó (AX) állatok szignifikánsan több időt töltöttek a zárt karokban, mint a nem szorongó (nAX) társaik ($t=-4,569$; $df=9,786$; $p=0,001$). Ezzel ellentétben az nAX egerek szignifikánsan többet tartózkodtak a nyitott karokban ($t=7,131$; $df=9,331$; $p<0,001$; 2. ábra).



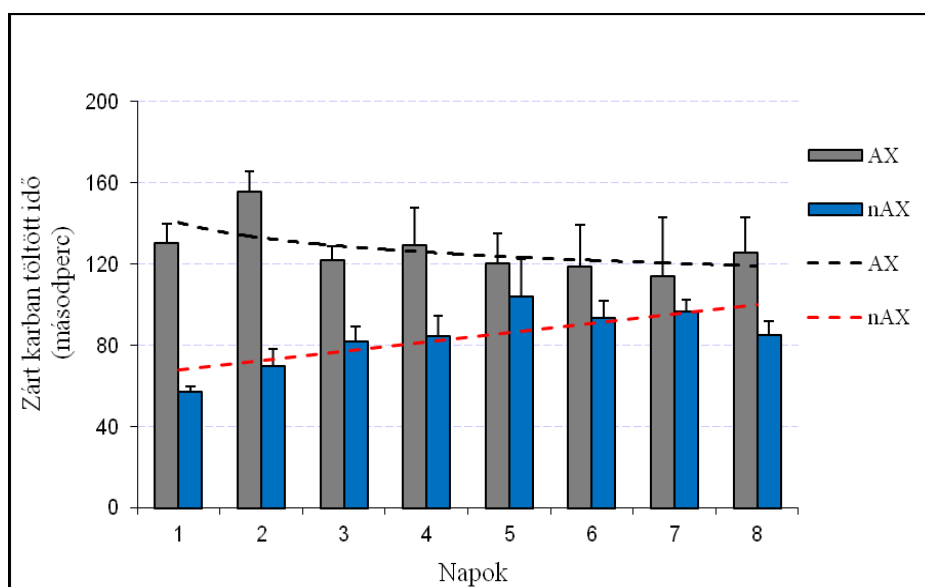
2. ábra: AX (n=9) és nAX (n=10) állatok első teszt napi teljesítményét ábrázoltuk a nyitott és a zárt karokban eltöltött átlagolt idő $\pm$ SEM függvényében.

A nyolc egymást követő teszt nap során a második naptól tapasztaltuk az irodalomban is leírt OTT hatást. Az AX és az nAX egerek is kevesebbet tartózkodtak a nyitott karokban, a zárt karokban eltöltött idejük pedig megnőtt. Az AX ($t=4,434$; $df=8$; $p=0,002$) és az nAX ($t=4,283$; $df=9$; $p=0,002$) állatok a második napon szignifikánsan kevesebb időt töltöttek a nyitott karokban, mint az azt megelőző napon. A zárt karokban töltött idő a második napra csak az AX törzs esetében adódott szignifikánsnak ($t=-2,555$; $df=8$; $p=0,034$), az nAX törzsbe tartozó egereknél statisztikailag különbséget nem tudtunk kimutatni ($t=-1,579$; $df=9$; $p=0,149$).

A nyolc napon át tartó teszt során az nAX és az AX állatok nyitott és a zárt karokban töltött ideje folyamatosan csökkent (nyitott karokban: $F_1=27,591$; $p<0,001$; zárt karokban: $F_1=12,223$; $p=0,003$; 3. ábra, 4. ábra).



3. ábra: Összesített grafikon, a nyitott és a zárt karokban eltöltött átlagolt idő $\pm$ SEM naponkénti ábrázolása a két egértörzs esetében; AX (n=9) és nAX (n=10).

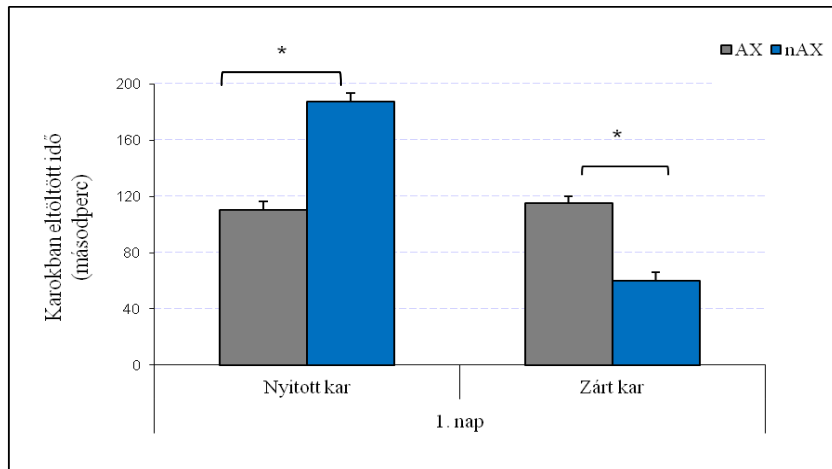


4. ábra: AX (n=9) és nAX (n=10) egértörzs állatiainak összehasonlítása a nyitott és a zárt karokban eltöltött idő $\pm$ SEM naponkénti átlagolásában.

5.2 Kontextus váltási teszt

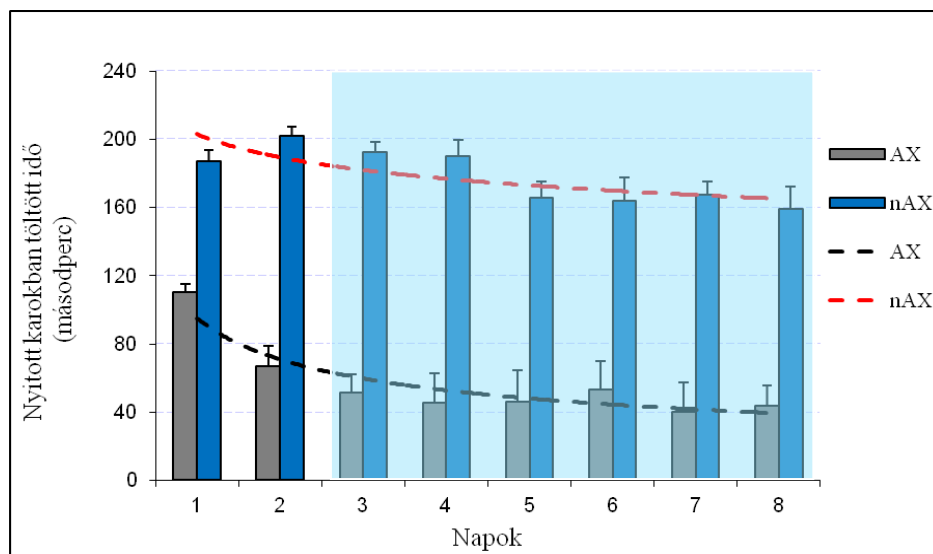
Annak kiderítésének érdekében, vajon az OTT hatás hátterében megnövekedett szorongási szint, vagy (hosszú idejű teszt kitettség okozta) motiváció csökkenés állhat, új kontextusba helyeztük az emelt keresztpalló tesztet. Ehhez egerek egy másik csoportját újabb teszt sorozatnak vetettük alá, megvizsgálva az első napon nyújtott teljesítményüket is. A szorongó állatok ebben a tesztben is szignifikánsan kevesebb időt töltöttek a nyitott karokban, ezzel párhuzamosan pedig több, mint kétszer annyit időztek a zárt karokban,

mint az nAX törzs egerei (nyitott karok: $t=-8,860$; $df=16$; $p<0,001$; zárt karok: $t=6,705$; $df=16$; $p<0,001$; 5. ábra).

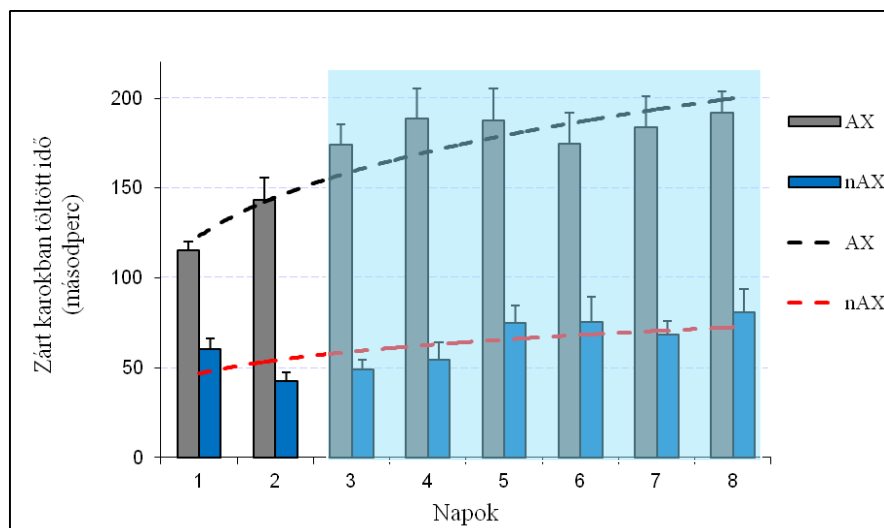


5. ábra: Szorongó (AX $n=8$) és nem szorongó (nAX $n=10$) állatok első tesztnapon mért teljesítménye a nyitott és a zárt karokban. Szórás: $\pm$ SEM.

A teszt harmadik napjától megváltoztattuk az apparátus környezetét (kék színű fény, valamint eltérő illatú tisztítószer használata). A megváltozott környezeti viszonyok hatására az nAX törzs egerei a tesztidő legnagyobb részét a nyitott karokban töltötték, amely a két törzs állatainak összehasonlításakor szignifikánsnak adódott (nyitott karok: $F_1=103,444$; $p<0,001$). A szorongó törzs állatai majdnem a teljes tesztidő alatt a zárt karokban tartózkodtak, a nyitott karokat alig látogatták (zárt karok: $F_1=88,625$; $p<0,001$; 6-7 ábra).



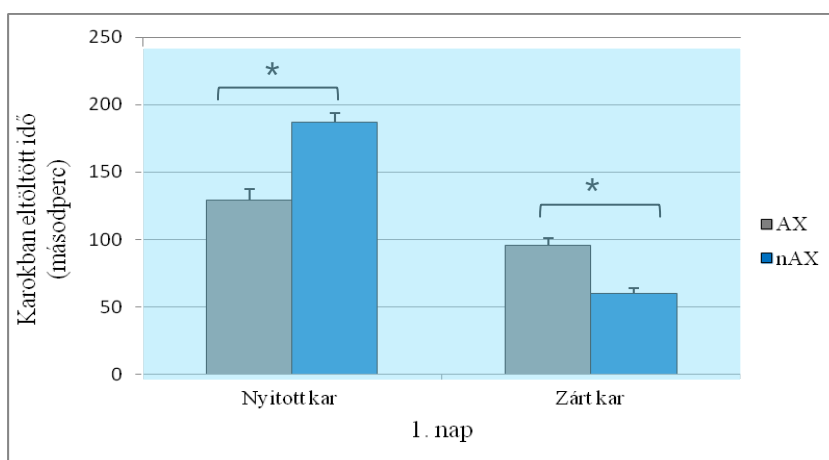
6. ábra: Az AX ($n=8$) és az nAX ($n=10$) állatok nyitott karokban eltöltött idejének átlagát ábrázoltuk a nyolc tesztnapra kivetítve. Hibasáv: $\pm$ SEM.



7. ábra: A zárt karokban eltöltött összes idő átlagát ábrázoltuk a két egértörzs esetében mind a nyolc napon. Hibasáv: $\pm$ SEM; AX (n=8), nAX (n=10).

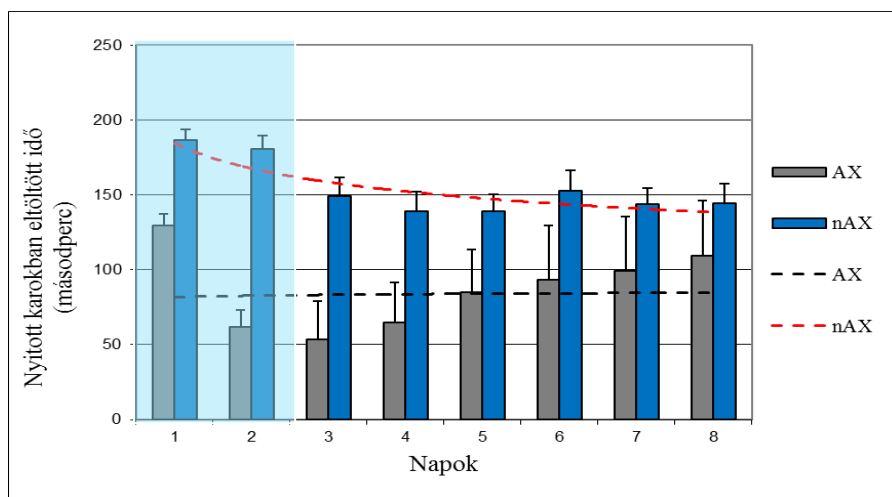
5.3 Fordított kontextus váltási teszt

Az AX törzs egeirenél tapasztalt megnövekedett zárt karokban töltött idő felvetette a kérdést, hogy az általunk használt kék színű fény nem hat-e túlzott stresszorként a szorongó törzs állataira. Ennek vizsgálatára egy újabb kísérletben megfordítottuk az alkalmazott kontextusok sorrendjét. A teszt sorozat elején alkalmaztuk a kék fényt, valamint az eltérő illatú tisztítószer, így is megvizsgálva a két törzs teljesítményét az EPM első napján. A mért adatok alapján, az nAX egértörzsbe tartozó állatok szignifikánsan többet tartózkodtak a nyitott karokban, valamint szignifikánsan kevesebb időt töltöttek a zárt karokban, mint szorongó társaik (nyitott karok: $t=-4,684$; $df=11$; $p<0,001$; zárt karok: $t=4,216$; $df=11$; $p<0,001$; 8. ábra).

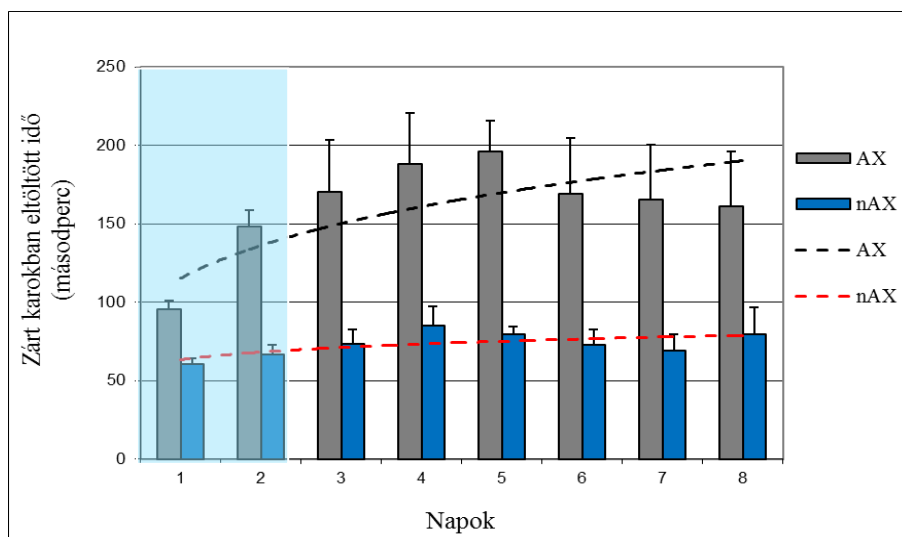


8. ábra: A két egértörzs (AX n=7, nAX n=6) állatainak teljesítménye a fordított kontextus váltási tesztben. Az oszlopok az átlagolt zárt és nyitott karokban töltött időt ábrázolják. Szórás: $\pm$ SEM.

A teszt sorozat harmadik napjától normál fényű izzókat használtunk, továbbá etilakohollal tisztítottuk ki az apparátust minden állat után. A fordított kontextus váltási tesztben a szorongó állatok idejük meghatározó részét töltötték a zárt karokban, mintegy hatszor több időt töltöttek a zárt karokban, mint az nAX törzsbe tartozó társaik. Ezzel szemben az nAX egerek továbbra is a nyílt karok felfedezését részesítették előnyben (nyílt karok: $F_1=43,696$; $p<0,001$; zárt karok: $F_1=32,040$; $p<0,001$; 9. ábra, 10. ábra).



9. ábra: AX (n=7) és nAX (n=6) egerek nyílt karokban töltött ideje oszlopdiagramon ábrázolva a fordított kontextus váltási tesztben. Hibasáv: $\pm$ SEM.

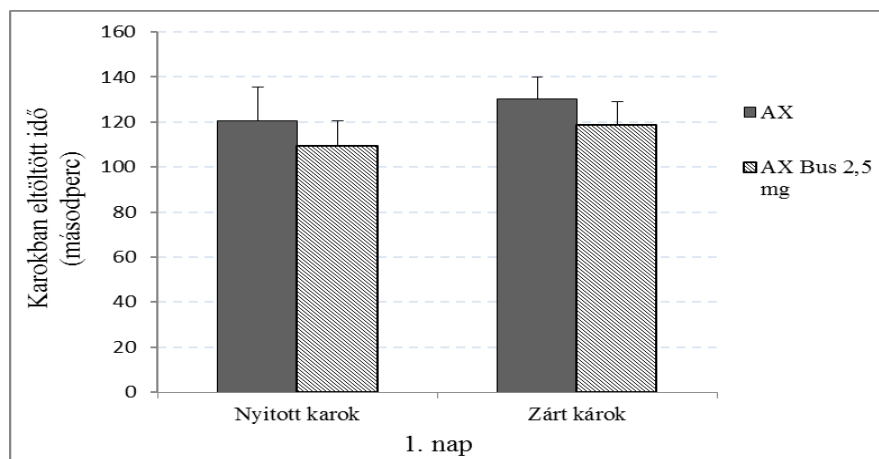


10. ábra: A grafikonon a két egértörzs zárt karokban eltöltött összes idejének átlagát ábrázoltuk. Hibasáv: $\pm$ SEM; AX (n=7), nAX (n=6).

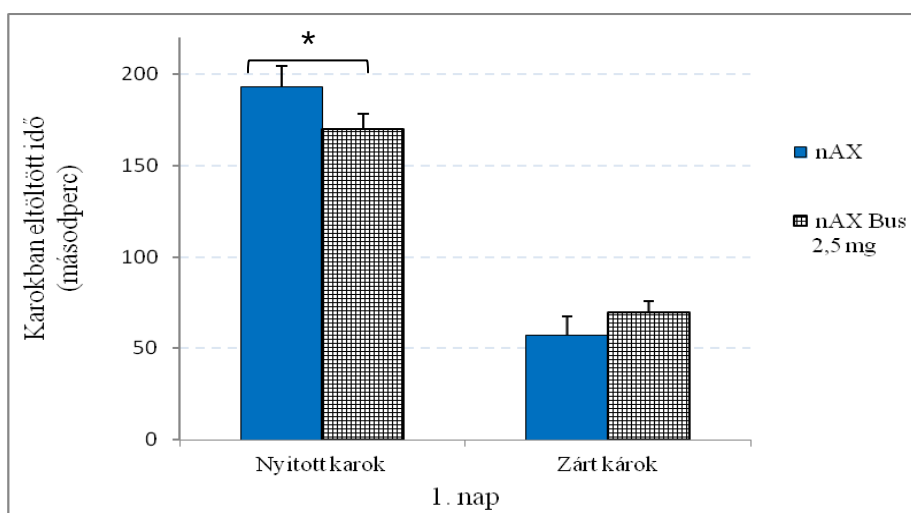
5.4 2,5 mg/ttkg dózisú buspiron kezelés hatása

Kísérleteink validálásához egy, a klinikumban is alkalmazásban lévő szorongásoldó gyógyszert (buspiron) adagoltunk intraperitoneálisan napi rendszerességgel az állatoknak.

A 2,5 mg/ttkg dózisú bupiron hatására az EPM teszt első napján a bupironnal kezelt szorongó törzs egerei mind a zárt ($t=-0,321$; $df=15$; $p=0,753$), mind a nyílt karokban ($t=0,571$; $df=15$; $p=0,576$) közel azonos időt tartózkodtak. Az nAX törzs egerei esetében a nyitott karokban szignifikáns különbséget találtunk a kezeletlen és a 2,5 mg/ttkg dózisú bupironnal kezelt állatok között ($t=2,369$; $df=18$; $p=0,029$), azonban a zárt karokban a két egértörzs között nem tapasztaltunk különbséget ($t=-1,777$; $df=18$; $p=0,093$; 11. ábra, 12. ábra).



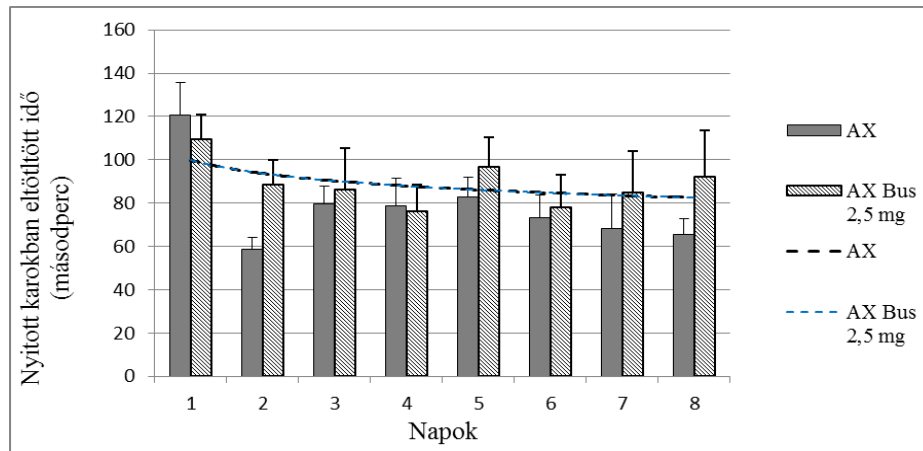
11. ábra: AX (n=9) kezeletlen és AX (n=6) Bus 2,5 mg/ttkg dózisban injektált egerek nyitott és zárt karokban töltött idejének összehasonlítása. Szórás: $\pm$ SEM.



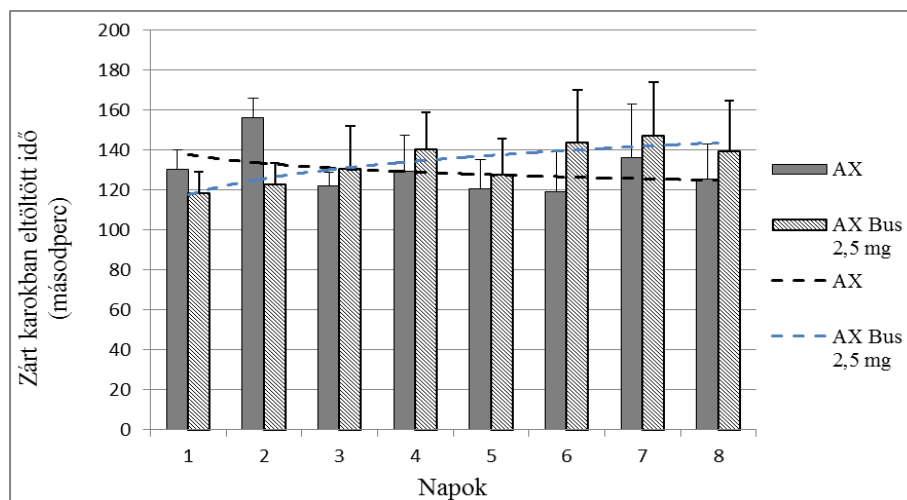
12. ábra: nAX (n=10) kezeletlen és nAX (n=6) Bus 2,5 mg/ttkg dózisban injektált egerek nyitott és zárt karokban töltött idejének összehasonlítása. Szórás: $\pm$ SEM.

A szorongó törzs egereinél, a nyolc napos tesztorozatban vizsgált 2,5 mg/ttkg dózisú bupiron hatásában a nyitott és a zárt karokban eltöltött összes időt figyelembe véve nem

figyelhető meg szignifikáns különbség (nyitott karok: $F_1=0,653$; $p=0,432$; zárt karok: $F_1=0,102$; $p=0,754$; 13. ábra, 14. ábra).

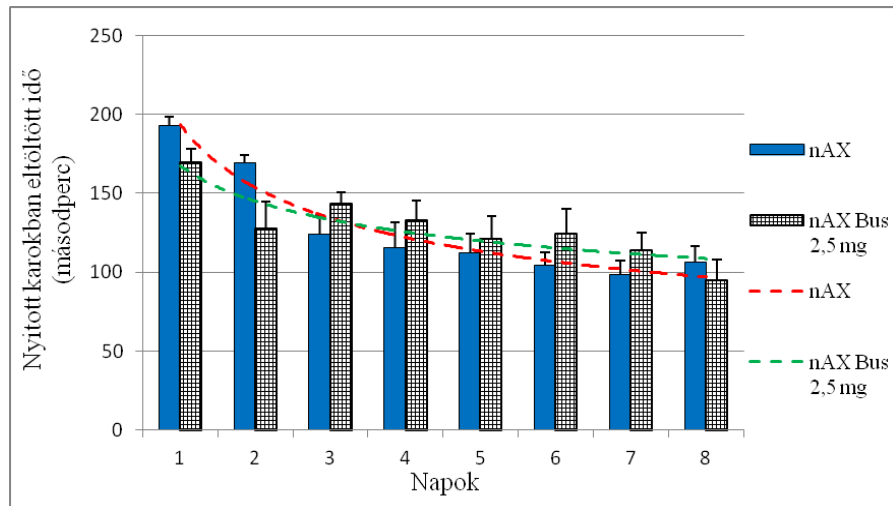


13. ábra: Kezeletlen és Bus 2,5 mg/ttkg kezelt szorongó egerek által eltöltött összes idő átlagát ábrázoltuk a nyitott karokban a tesztorozat nyolc napjára vetítve. Hibasáv: $\pm$ SEM, AX n=9, AX Bus 2,5 mg/ttkg n=6.



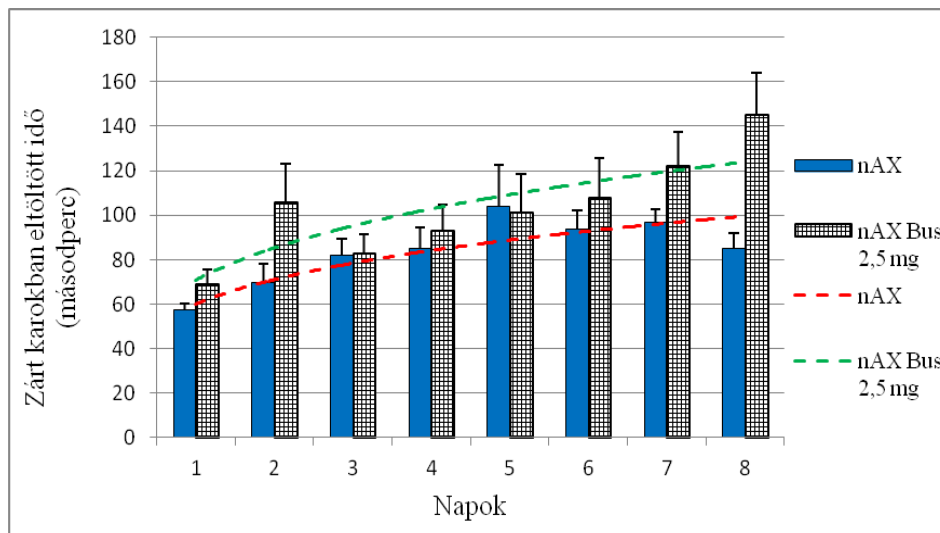
14. ábra: Kezeletlen, és Bus 2,5 mg/ttkg kezelt szorongó egerek által eltöltött összes idő átlagát ábrázoltuk a zárt karokban. Hibasáv: $\pm$ SEM, AX n=9, AX Bus 2,5 mg/ttkg n=6.

Az nAX egértörzs állatai esetében a buspironnal kezelt csoport (2,5 mg/ttkg) nyitott karokban töltött összes idejét tekintve szintén nem tapasztalható szignifikáns különbség ($F_1=0,007$; $p=0,937$; 15. ábra).



15. ábra: Az nAX kezeletlen és kezelt állatok nyitott karokban eltöltött összes idejének átlagát tüntettük fel. Hibasáv: $\pm$ SEM, nAX n=10, nAX Bus 2,5 mg/ttkg n=6.

Az nAX bupironnal (2,5 mg/ttkg) kezelt állatok zárt karokban töltött ideje a harmadik naptól folyamatosan nőtt. A nyolcadik napon közel kétszer annyi időt töltöttek a zárt karokban, mint kezeletlen társaik. Ismételt mérés ANOVA-val szignifikáns különbséget sikerült kimutatnunk a kezelt és a kezeletlen nAX egereknél ($F_1=4,447$; $p=0,049$; 16. ábra).

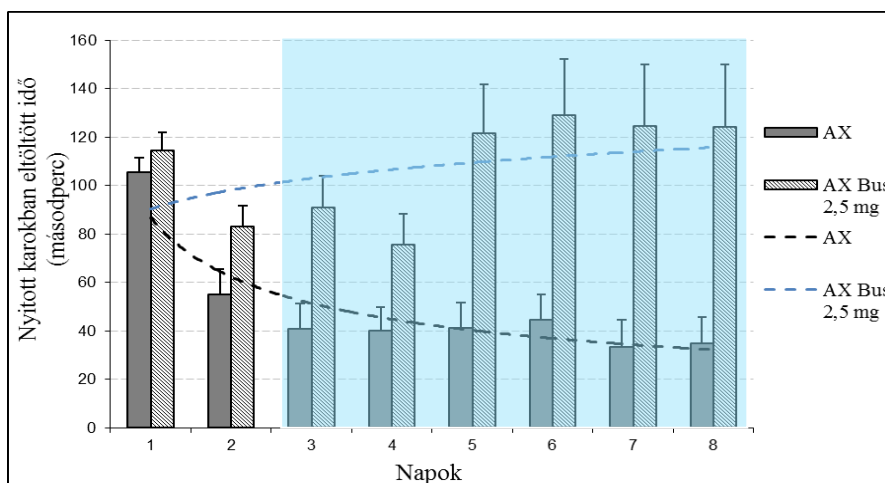


16. ábra: A grafikonon az nAX kezeletlen és Bus kezelt állatok zárt karokban eltöltött összes idejének átlagát vizsgáltuk. Szórás: $\pm$ SEM, nAX n=10, nAX Bus 2,5 mg/ttkg n=6.

5.5 2,5 mg/ttkg dózisú bupiron kezelés hatása, kontextus váltási tesztben

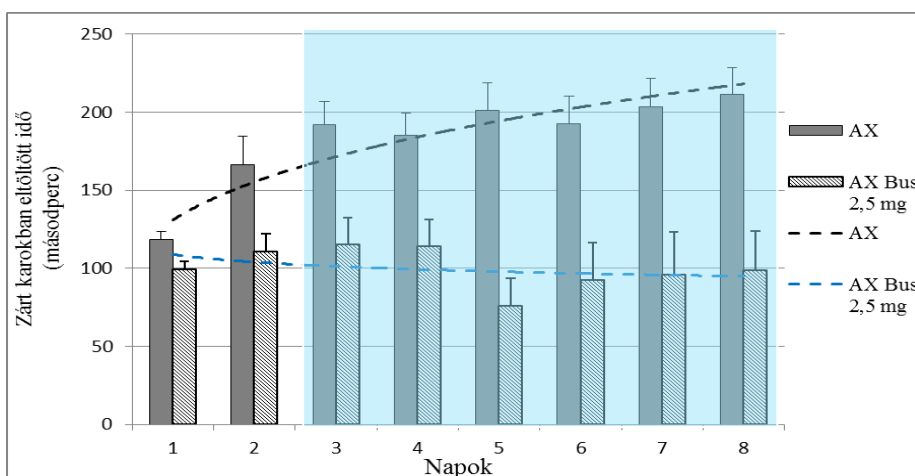
A két különböző szorongásos fenotípust mutató egértörzs állatainál, új környezetben vizsgáltuk az alacsonyabb dózisban alkalmazott szorongásoldó hatását.

Kísérletünkben azt tapasztaltuk, hogy a kontroll AX egerekhez képest a 2,5 mg/ttkg dózisú buspironnal kezelt állatok szignifikánsan több időt töltöttek a nyitott karokban. Ez a különbség azonban az ötödik naptól ugrásszerűen megnőtt és a tesztorozat végéig megfigyelhető volt. Az adatok statisztikai analízise után szignifikáns különbséget találtunk ($F_1=19,250$; $p<0,001$) a szorongó Bus 2,5 mg/ttkg kezelt, és a kezeletlen szorongó állatok között (17. ábra).



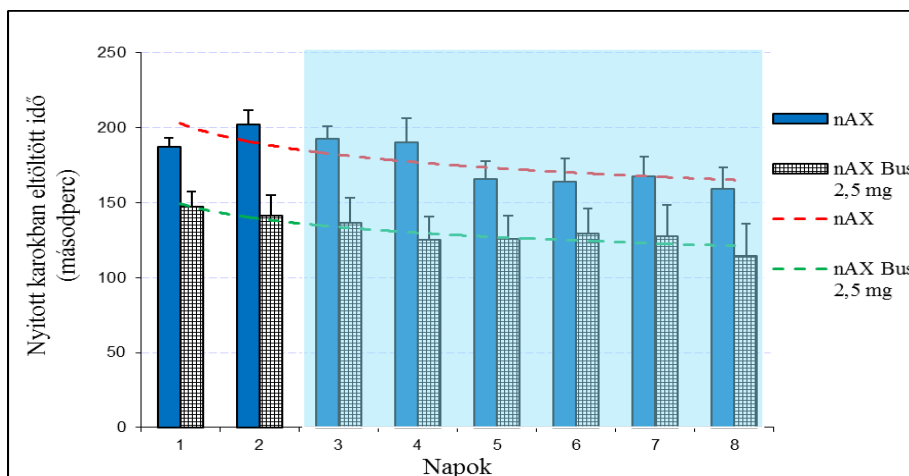
17. ábra: A szorongó kontroll és a szorongó buspironnal (2,5 mg/ttkg) kezelt egerek nyílt karokban eltöltött összes idejének átlagát ábrázoltuk. Szórás: $\pm$ SEM, AX n=11, AX Bus 2,5 mg/ttkg n=10.

A 18. ábra grafikonján a zárt karokban töltött idő látható. A tesztorozat összes napja során a buspironnal kezelt szorongó állatok közel azonos időt töltöttek a zárt karokban, ez pedig a kezeletlen törzzsel történő összehasonlítás során szignifikánsnak bizonyult ($F_1=29,290$; $p<0,001$; 18. ábra).



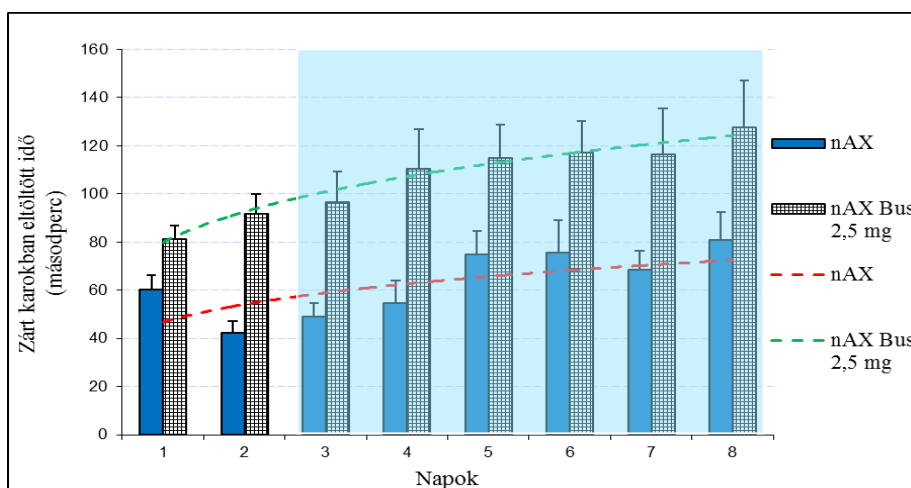
18. ábra: Az AX törzshe tartozó kezeletlen, illetve kezelt állatok által eltöltött összes idő átlagát ábrázoltuk az új környezetben. Szórás: $\pm$ SEM, AX n=11, AX Bus 2,5 mg/ttkg n=10.

Az nAX egértörzsbe tartozó buspiron kezelésnek alávetett állatok a teljes nyolc napos teszt sorozat során rendre kevesebb időt töltöttek a nyitott karokban, a kezeletlen csoport egereihez képest. A különbség szignifikánsnak adódott: ($F_1=7,649$; $p=0,013$; 19. ábra).



19. ábra: Az nAX törzsbe tartozó Bus 2,5 mg/ttkg kezelt és kezeletlen egerek által a nyitott karokban eltöltött összes idejének átlagát tüntettük fel. Hibasáv: $\pm$ SEM, nAX n=10, nAX Bus 2,5 mg/ttkg n=10.

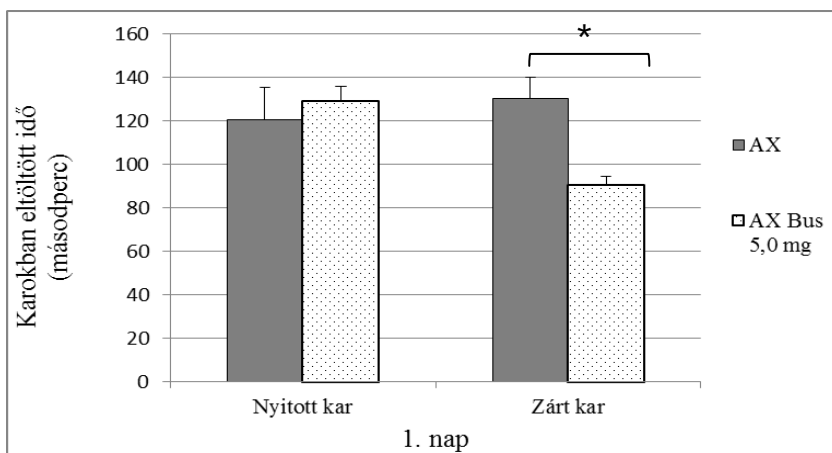
Továbbá vizsgáltuk, hogy a zárt karokban eltöltött idő, hogyan alakul az nAX törzs Bus kezelt és kezeletlen egerei között. A 2,5 mg/ttkg dózisban Bus anxiolitikummal injektált állatok esetében folyamatosan nő a zárt karokban eltöltött idő. A kezeletlen csoportba tartozó egerek teljesítménye azonosnak mondható, habár a zárt karokban eltöltött idő a nyolc napos teszt során enyhén növekszik ($F_1=10,739$; $p=0,004$; 20. ábra).



20. ábra: A grafikonon nAX kezeletlen és Bus kezelt egerek zárt karokban eltöltött összes idejének átlagát ábrázoltuk. Hibasáv: $\pm$ SEM. nAX n=10, nAX Bus 2,5 mg/ttkg n=10.

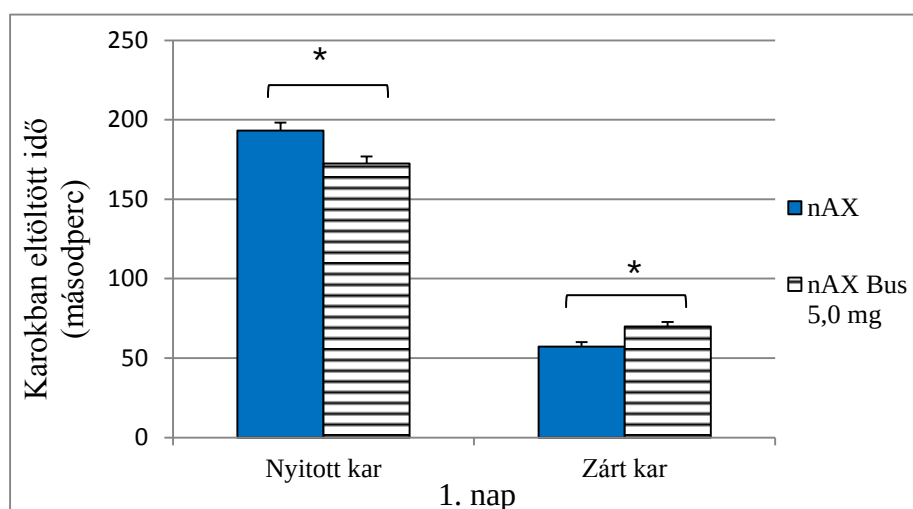
5.6 5,0 mg/ttkg dózisban injektált bupiron hatása az emelt keresztpalló tesztben

A 2,5 mg/ttkg dózisban alkalmazott bupiron adminisztrációs kísérleteink eredményét figyelembe véve úgy döntöttünk, hogy egerek egy másik csoportját nagyobb dózisú (5,0 mg/ttkg) anxiolitikummal való kezelésnek is alávetjük. Az EPM teszt sorozat első napján az AX egértörzs esetében kizárólag a zárt karokban töltött időben tudtunk kimutatni szignifikáns különbséget a kezelt és a kezeletlen állatok között (zárt karok: $t=3,729$; $df=10,577$; $p=0,004$; nyitott karok: $t=-0,597$; $df=21$; $p=0,557$; 21. ábra).



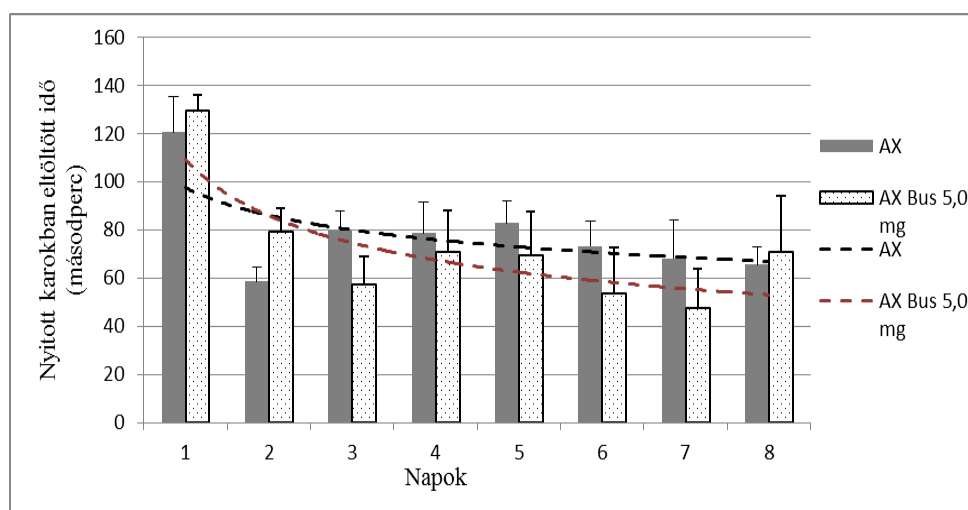
21. ábra: Az AX törzsbe tartozó Bus 5,0 mg/ttkg dózisban kezelt és kezeletlen egerek nyitott és zárt karokban eltöltött idejét ábrázoltuk, az EPM teszt első napján. Szórás: $\pm$ SEM, AX $n=9$, AX Bus 5,0 mg/ttkg $n=14$.

Az nAX egértörzs Bus 5,0 mg/ttkg kezelt állatok a teszt első napján kevesebb időt töltöttek a nyitott karokban és többet a zárt karok felfedezésével, mint kezeletlen társaik. E törzs vizsgálatakor a csoportok között szignifikáns különbséget tudtunk kimutatni mind a nyitott karokban ($t=2,968$; $df=26$; $p=0,006$), mind a zárt karokban ($t=-2,913$; $df=26$; $p=0,007$; 22. ábra).



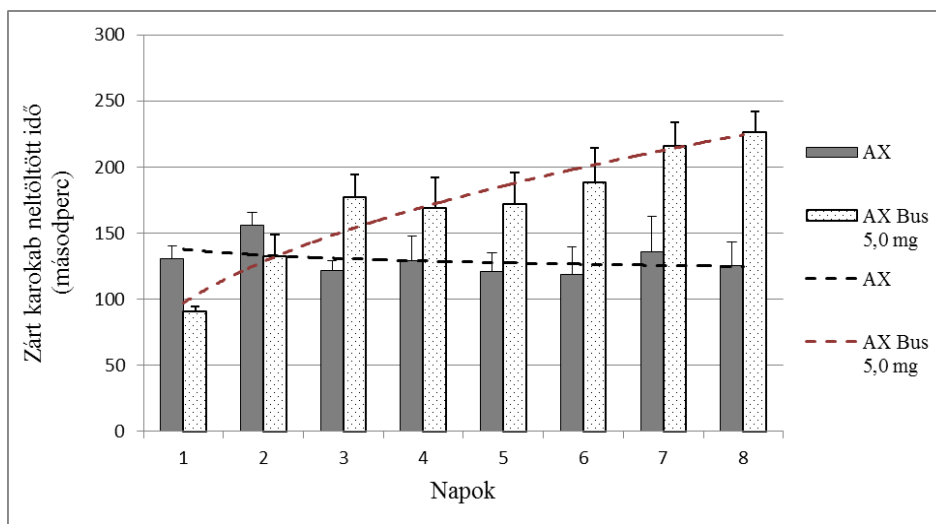
22. ábra: Az nAX törzsbe tartozó Bus 5,0 mg/ttkg dózisban kezelt és kezeletlen egerek nyitott és zárt karokban eltöltött idejét ábrázoltuk, az EPM teszt első napján. Szórás: $\pm$ SEM, nAX n=10, nAX Bus 5,0/ttkg mg n=18.

A nyolc egymást követő napon át tartó EPM tesztben a szorongó kezeletlen egerek a nagyobb dózisban injektált AX állatokhoz képest kevesebb időt töltöttek a nyitott karokban, bár ez nem volt szignifikáns ($F_1=0,543$; $p=0,469$; 23. ábra).



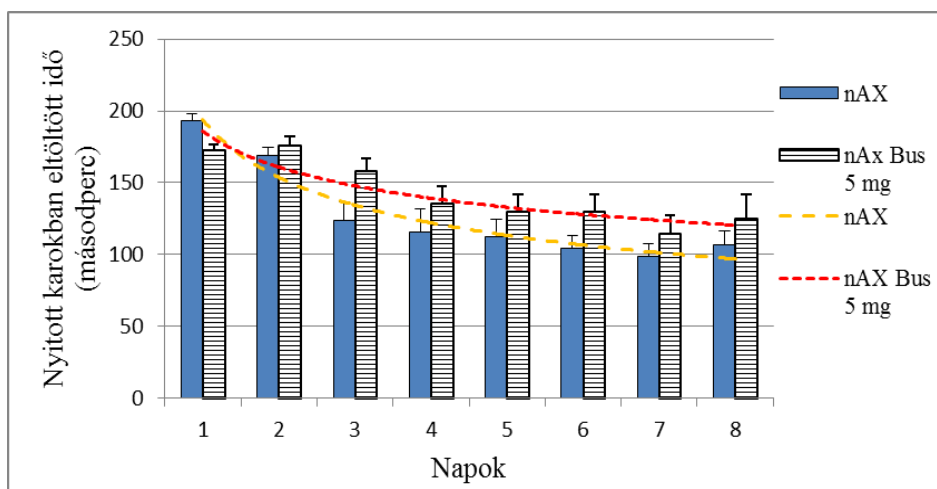
23. ábra: Nyitott karokban eltöltött összes időt ábrázoltuk szorongó kezeletlen, és bupiroonnal (5,0 mg/ttkg) kezelt egerek esetében. Hibasáv: $\pm$ SEM, AX n=9, AX Bus 5,0 mg/ttkg n=14.

A zárt karokban eltöltött idő vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a nagyobb dózisú bupiroonnal kezelt állatok több időt töltenek a zárt karokban a tesztsorozat harmadik napjától, amely a hatodik naptól lassú emelkedésbe tér át ($F_1=3,930$; $p=0,061$; 24. ábra).



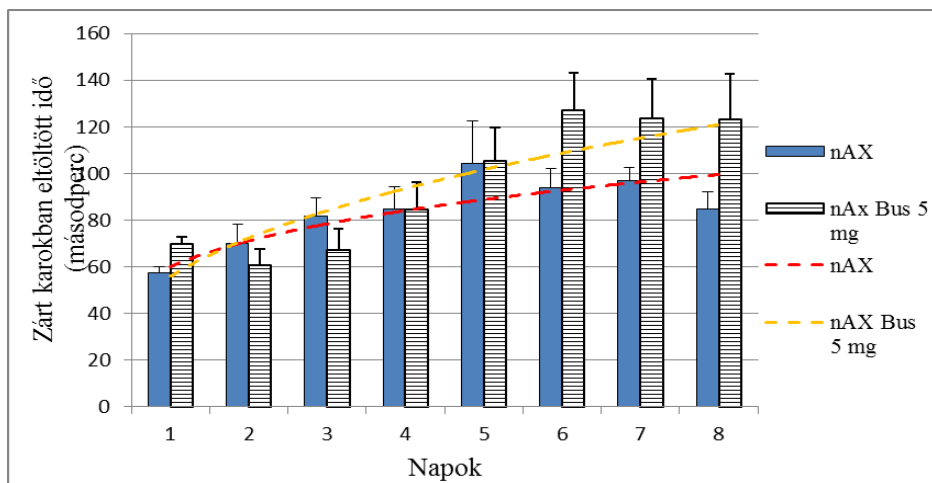
24. ábra: Zárt karokban eltöltött összes időt ábrázoltuk kontroll szorongó és buspiroonnal (5,0 mg/ttkg) kezelt szorongó egerek esetében. Hibasáv: $\pm$ SEM, AX $n=9$, AX Bus 5,0 mg/ttkg $n=14$.

Az nAX kezeletlen állatokat összehasonlítva az nAX 5,0 mg/ttkg dózisban buspiroonnal kezelt egerekkel láthatjuk, hogy az utóbbi csoport állatai több időt tartózkodnak a nyitott karokban, ez a különbség azonban nem jelentős ($F_1=1,182$; $p=0,287$; 25. ábra).



25. ábra: Nyitott karokban eltöltött összes időt ábrázoltuk kontroll szorongó és buspiroonnal (5,0 mg/ttkg) kezelt szorongó egerek esetében. Hibasáv: $\pm$ SEM, nAX $n=10$, nAX Bus 5,0 mg/ttkg $n=18$.

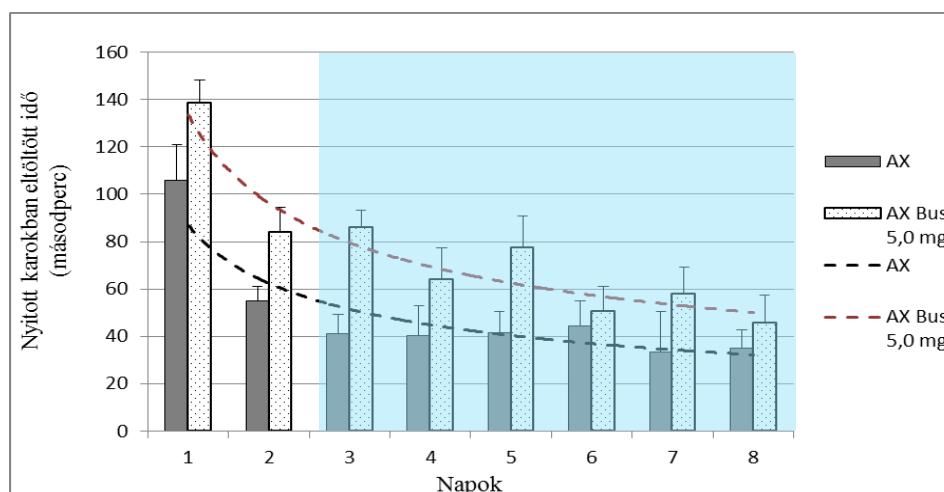
Az nAX állattörzs egereinek zárt karokban töltött idejének vizsgálatakor az EPM teszt ötödik napjáig hasonló magatartást láthatunk a kezelt és a kezeletlen állatokat összehasonlítva. Azonban a hatodik naptól a Bus 5,0 mg/ttkg kezelt csoport egerei több időt töltöttek a zárt karokban ($F_1=0,577$; $p=0,455$; 26. ábra).



26. ábra: A grafikonon a zárt karokban eltöltött összes időt ábrázoltuk az nAX törzs kezeletlen és buspironnal (5,0 mg/ttkg) injektált egerei esetében. Hibasáv: $\pm$ SEM, nAX n=10, nAX Bus 5,0 mg/ttkg n=18.

5.7 5,0 mg/ttkg dózisban injektált buspiron hatása kontextus váltási tesztben

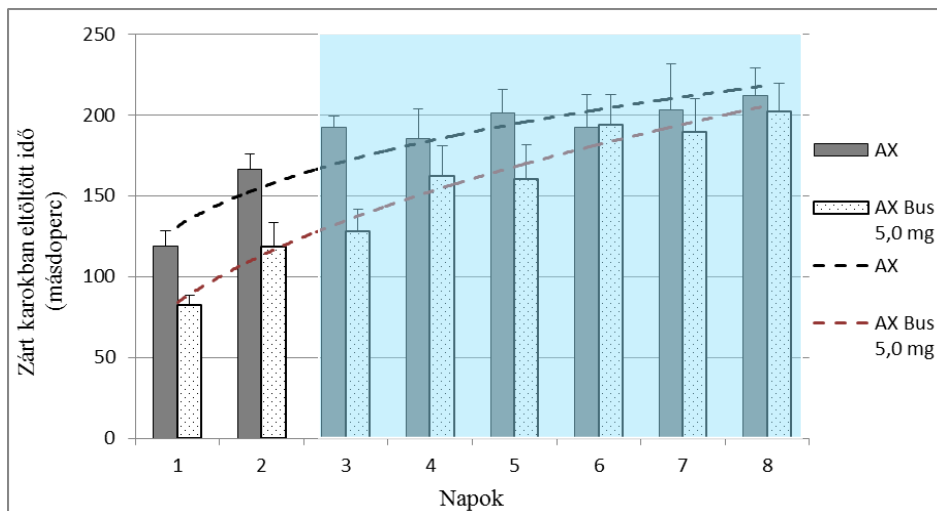
Az 5,0 mg/ttkg dózisban injektált buspiron hatását mindkét törzs állatainál a megváltoztatott környezetben is megvizsgáltuk. Az AX törzs buspironnal kezelt állatai a nyitott karokban -mind a nyolc nap alatt- szignifikánsan több időt tartózkodtak, összehasonlítva a szorongó kezeletlen egerekkel ($F_1=4,831$; $p=0,042$; 27. ábra).



27. ábra: Az AX kontroll és az AX buspironnal (5,0 mg/ttkg) kezelt állatok nyílt karokban eltöltött idejét ábrázoltuk a fényváltást szimbolizáló kék háttérrel. Hibasáv: $\pm$ SEM, AX n=8, AX Bus 5,0 mg/ttkg n=9.

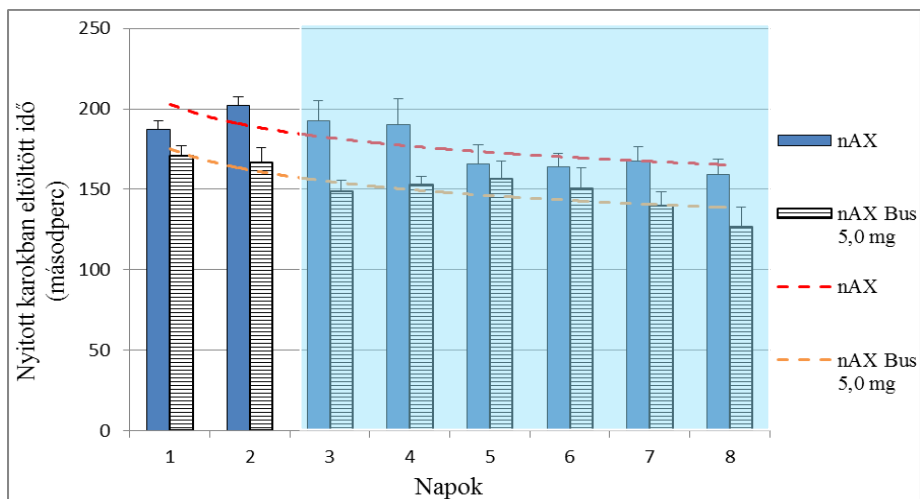
A 28. ábra grafikonján a szorongó kezelt és kezeletlen egerek zárt karokban töltött idejét ábrázoltuk. A fényváltást követő teszt napokon a két csoport állatai közötti különbség

folyamatosan csökkent, a hatodik naptól a csoportok közötti különbségek eltűntek ($F_1=2,428$; $p=0,138$; 28. ábra).



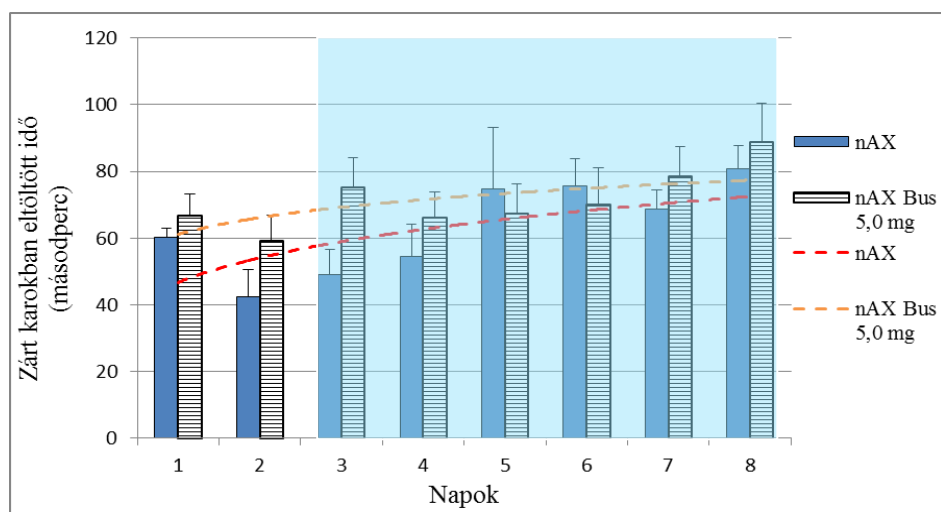
28. ábra: A szorongó kontroll és a szorongó 5,0 mg/ttkg buspironnal kezelt állatok zárt karokban eltöltött idejét ábrázoltuk. Hibasáv: $\pm$ SEM, AX $n=8$, AX Bus 5,0 mg/ttkg $n=9$.

Az nAX állatorzs kezeletlen és Bus 5,0 mg/ttkg dózisban kezelt állatai a teljes tesztorozat alatt a tesztidő 50%-át töltötték a nyitott karokban, mely szignifikánsnak adódott ($F_1=5,755$; $p=0,028$). A különbség a kezelt és a kezeletlen csoport egerei között a kontextus váltás napján (harmadik, negyedik) a legszembetűnőbb (29. ábra).



29. ábra: Az nAX kontroll és az nAX buspironnal kezelt állatok nyitott karokban eltöltött összes idejének átlagát ábrázoltuk a kontextus váltási tesztben. Hibasáv: $\pm$ SEM, nAX $n=10$, nAX Bus 5,0 mg/ttkg $n=9$.

Az nAX egerek kezelt és kezeletlen csoportjának elemzése során megfigyelhető az új környezetben mutatott folyamatosan növekvő zárt karban töltött idő. A két csoport között azonban nem tudtunk kimutatni szignifikáns különbséget ($F_1=0,871$; $p=0,364$; 30. ábra).



30. ábra: nAX kezeletlen és buspironnal (5,0 mg/ttkg) kezelt állatok zárt karokban eltöltött összes idejét ábrázoltuk az új környezetben. Hibasáv: $\pm$ SEM, nAX n=10, nAX Bus 5,0 mg/ttkg n=9.

6 Eredmények megvitatása

Az emelt keresztpalló teszt az egyik legmegbízhatóbb és legáltalánosabban használt teszt rágcsálók anxiétás mérésének vizsgálatára (7,11,14,15,18,20). Munkánk kezdetén célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, vajon az eltérő szorongási szintű állatok eltérő megbirkózási viselkedési mintázatot alkalmaznak-e új környezetben? Ehhez először megvizsgáltuk, hogy az általunk alkalmazott két egértörzs (AX, nAX) hogyan viselkedik az emelt keresztpalló tesztben. Eredményeink azt mutatták, hogy a szorongó törzs (AX) egerei szignifikánsan kevesebb időt töltöttek a nyitott karokban ($p=0,001$), valamint szignifikánsan több időt tartózkodtak a zárt karokban ($p<0,001$), mint az nAX törzs állatai (2. ábra, 5. ábra, 8. ábra). Következtetésképpen az AX és az nAX egértörzs állatai eltérő kezdeti szorongási szinttel rendelkeztek, így alkalmasnak mutatkoztak további anxiétás vizsgálatokra. A nyolc napos teszt sorozat alatt mindkét általunk alkalmazott kísérleti törzsnél csökkent nyitott kari explorációt figyeltünk meg, mely az nAX törzs esetében fokozottabban érvényesült; itt a nyitott karokban töltött idő erőteljes csökkenését láthattuk (3-4. ábra). Az irodalomból ismeretes, hogy a rágcsálók első teszt napon szerzett tapasztalata meghatározóan befolyásolja az újratesteléskor mutatott viselkedésüket (14, 11, 23), esetünkben a nyolc napos teszt második napjától az AX és az nAX törzs állatai is kevesebb időt tartózkodtak a nyitott karokban. Ezt a jelenséget one trial tolerance (OTT) hatásként ismerjük (14, 11). Számos tudományos munka foglalkozik az OTT hatásának vizsgálatával (11, 14, 24, 25) és próbál magyarázatot találni a jelenségre. Ezt a törekvést azonban nehezítik az irodalomban található kutatásokban alkalmazott módszerek (tesztek között eltelt idő, a teszt időtartama, az apparátus magassága), - melyek számos variációban fellelhetőek - és eredmények, melyek ellentmondóak (25, 26, 11). Egy hipotézis szerint a hatásért az emóciókban bekövetkező változás felelős, amely feltételezések szerint abból eredhet, hogy az állat az első teszthelyzetben megtanulja elkerülni a számára averzív nyitott karokat (13, 25, 11, 23). Mások úgy gondolják, hogy az OTT a második teszt esemény hatására kialakuló felfedező kedv, kíváncsiság hiányára vezethető vissza, mivel az állat már előtte feltérképezte az apparátust (27).

Calzavara és mtsai. (2005) cikkükben arról számoltak be, hogy a környezeti változások, például a fényviszonyok változtatása, az apparátus helyzete, anyaga, a 24 órás újratestelés nem befolyásolja az OTT hatását. Shneider és mtsai. (2011) kutatásukban

következtetésként írják le, hogy az OTT hatás csökkenthető, illetve kivédhető, amennyiben 28 nappal az első teszt után, másik teszthelységben végezzük el az újratesztelést (11).

Az OTT hatás vizsgálatára kísérleteinkben bevezettük a kontextus váltási tesztet, mely módszertanilag a harmadik naptól alkalmazott, az apparátus takarítására használt eltérő illatú tisztítószer, valamint a megváltozott fényviszonyokat (kék fény) foglalja magába. Azonban az új környezet, egyben stresszt is jelent, félelmi válaszokat generál az állatokban (16). A negatív stimulusok leküzdésére az állatok különböző megbirkózási (coping) stratégiával válaszolnak, amely törzs és fajfüggő lehet (15). Állatkísérletek bizonyítják, hogy az eredménytelen coping típusok (passzív coping) összefüggésben állnak a szorongásos fenotípusokkal (16). Ezt kísérleteink is alátámasztják, mivel a kontextus váltási tesztben a két törzs egerei eltérően reagáltak a megváltozott, stresszes környezetre. Míg az AX törzs állatai az új kontextusra emelkedett zárt karokban töltött idővel reagáltak, tehát passzív megbirkózási stratégiát alkalmaztak, addig az nAX egértörzsbe tartozó állatok motivációja visszatért, tesztidejük nagy részét a nyitott karok felfedezésével töltötték (6-7. ábra). Az alkalmazott stratégia nagyban befolyásolja és segíti az állatok adaptációs és túlélési képességeit (8).

Más szemszögből vizsgálva, a nyolc egymást követő napon elvégzett EPM tesztben az nAX egerek folyamatosan csökkent nyitott karokban eltöltött ideje, a kontextus váltás hatására megemelkedett nyitott kari felfedezésre változott (amely fennmaradt a teszt teljes időtartama alatt), tehát az nAX törzs egerei aktív coping stratégiájuknak köszönhetően adaptálódtak az új környezethez, míg ez nem figyelhető meg az AX törzs állatainál. Az AX állatoknál tapasztalható explorációs kedv hiányát, az emelkedett szorongási szint okozhatja.

További kísérleteink előtt azonban minden kétséget kizárólag meg kellett győződnünk arról, hogy a két törzs között az új környezetben jelentkező viselkedésbeli sajátságokat nem maga a kék fény okozza, ezért az egerek egy másik csoportjával elvégeztük a fordított kontextus váltási tesztet. Ebben a kísérleti felállásban az első két napon alkalmaztuk a kék színű megvilágítást, a harmadik naptól pedig normál fényű izzókra váltottunk és etilalkohollal töröltük át az apparátust minden állat után. A kísérlet kiértékelésekor hasonló eredményeket kaptunk, mint a kontextus váltási tesztben (9-10. ábra), ez pedig bizonyítja, hogy maga az új környezet okozza a viselkedési mintázatok megváltozását. Ezek az

eredmények arra engednek következtetni, hogy az eltérő kezdeti szorongási szintű állatok eltérő viselkedésmintázatot alkalmaznak új környezet esetén.

6.1 *A buspiron hatása a megbirkózási stratégiákra*

A buspiron a klinikumban szorongásoldóként alkalmazott nem szedatív jellegű gyógyszer molekula (8). Széles körben használják különböző pszichiátriai betegségek kezelésére (depresszió, szociális fóbiák, figyelmi zavarokkal járó betegségek). Teljes hatásmechanizmusát még nem sikerült feltárni, azonban azt már tudjuk, hogy farmakológiája az 5-HT_{1A} receptorokon keresztül mediált (8). Számos állatokkal foglalkozó tanulmány számol be arról, hogy az alacsony dózisban injektált (1,0 mg/ttkg) buspiron csökkenti a szerotonin metabolizmusa közötti egyensúlyi állapotot (8, 34). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a buspiron alacsony dózisban képes stimulálni az 5-HT_{1A} receptorokat, amely pedig gátlóan befolyásolja a dopaminerg neurotranszmissziót (8, 28). Valóban, a legelfogadottabb nézet szerint a buspiron az 5-HT_{1A} receptor szelektív parciális agonistája (8).

Az affektív zavarok preklinikai vizsgálatának egyik nagy ellentmondása, hogy pl. bizonyos szorongásoldók és az antidepresszánsok akut alkalmazás során hatékonynak mutatkoznak állatkísérletekben, addig a klinikumban néhány hét krónikus kezelés után jelentkeznek a pozitív hatásai. Kísérleteinkben alacsony dózisú (2,5 mg/ttkg) krónikus buspiron kezelést alkalmaztunk. A kezelés hatására az AX törzsbe tartozó egerek nyitott és zárt karokban töltött ideje nem változott a kezeletlen állatokhoz képest (11. ábra, 13. ábra, 14. ábra). Ellenben az nAX egerek elemzésekor meglepő eredményeket kaptunk. Az EPM teszt első napján, az alacsony dózissal kezelt nAX állatok szignifikánsan kevesebb ($p=0,029$) időt töltöttek a nyitott karokban (12. ábra). A nyolc napos EPM teszt vizsgálatakor pedig a zárt karokban töltött időt vizsgálva láthatunk különbséget: a buspiroonnal kezelt nAX egerek szignifikánsan több időt töltenek a zárt karokban, mint a kezeletlen társaik ($p=0,049$; 16. ábra). A fenti eredményekből arra lehet következtetni, hogy míg az alacsony (2,5 mg/ttkg) dózisban injektált buspiron az AX törzs állatainak viselkedésére nem volt szignifikáns hatással, addig az nAX törzsbe tartozó egereknél láthatólag anxiogénikusként viselkedett. Az egerek egy másik csoportját nagyobb (5,0 mg/ttkg) dózisban injektáltunk krónikusan. A kezelés hatására a szorongó állatok zárt karokban töltött ideje szignifikánsan ($p=0,004$) kevesebb volt, mint kezeletlen társaiké (21. ábra). Az nAX törzs állatai azonban a nagyobb buspiron dózissal -az alacsony dózisú teszthez hasonló, ám annál jóval erőteljesebb-

szorongással válaszoltak. A nyitott karok felfedezésével töltött idejük szignifikánsan csökkent ($p=0,006$), míg a zárt karokban töltött idő szignifikánsan megnőtt ($p=0,007$; 22. ábra). A szorongó 5,0 mg/ttkg koncentrációval kezelt állatok a harmadik naptól fogva tendenciózusan több időt töltöttek a zárt karokban ($p=0,061$). Ugyanez az emelkedett zárt kari exploráció megfigyelhető az nAX törzsbe tartozó egereknél is, azonban ebben az esetben a különbség a 6. 7. és 8. napon válik szembetűnővé. A két dózis eltérő hatását az EPM tesztben magyarázhatja az 5-HT_{1A} receptorok aktivációja, mely törzstől függően anxiogenikus és anxiolitikus válaszokat is generálhat az állatokban (29). Az 5-HT_{1A} receptorok pre- és poszt-szinaptikusan is előfordulnak, ezzel pedig eltérően befolyásolják a szerotonin szignalizációját (30, 31). Sandra E. és mtsai (1996) munkájuk során bizonyították, hogy a preszinaptikus 5-HT_{1A} receptorok stimulációjával anxiolitikus választ tudtak kiváltani, míg a poszt-szinaptikus receptorok ingerlésekor anxiogenikus hatást figyeltek meg. Cikkükben arról is beszámoltak, hogy a dorzális hippokampuszban csökkent szerotonin neurotranszmisszió anxiolitikus hatású, ami magyarázhatja a krónikusan adagolt 5-HT_{1A} receptor agonista vegyületeket relatív alacsony szorongásoldó hatását (31).

Az EPM tesztek követően mindkét buspiron koncentráció (2,5 mg/ttkg, illetve 5,0 mg/ttkg) hatását megvizsgáltuk a kontextus váltási tesztekben. A 2,5 mg/ttkg dózisban injektált anxiolitikum a szorongó egereknél szignifikánsan növelte a nyitott karokban töltött időt ($p<0,001$) és szignifikánsan csökkentette a zárt karok felfedezésével telt időt ($p<0,001$) az új környezetben, a kezeletlen állatokhoz képest (17-18. ábrák). Azonban az nAX törzs állatainál fordított hatást figyeltünk meg. A nyolc napos új kontextusban végzett tesztek hatására az nAX állatok szignifikánsan több időt tartózkodtak a zárt karokban ($p=0,004$) és szignifikánsan kevesebb ideig explorálták a nyitott karokat ($p=0,013$), mint a kezeletlen társaik (19-20. ábrák).

A nagyobb koncentrációban injektált csoportoknál csak a nyitott karokban töltött időben tudtunk kimutatni szignifikáns különbséget. Az 5,0 mg/ttkg dózisban injektált AX törzs egerei szignifikánsan több időt töltöttek a nyitott karokban ($p=0,042$), addig az nAX kezelt egerek szignifikánsan ($p=0,028$) kevesebb ideig tartózkodtak a nyitott karokban (29. ábra, 30. ábra).

7 Konklúzió

A két dózisban alkalmazott buspiron kezelés meglepő eredményekkel szolgált. A legszembevetőbb és érdekesebb mindközül, hogy az anxiolitikummal történő kezelés hatása a két általunk használt beltenyésztett egértörzsben (AX, nAX) különböző viselkedési mintázatok indukált. Azoknál az AX állatoknál, amelyeknél alacsonyabb dózisú buspiron kezelést alkalmaztunk, fokozott nyitott kari aktivitást figyelhetünk meg az új környezetben. Ezzel ellentétben az nAX állatok a nyolc napos tesztben emelkedett szorongási szinttel reagáltak az új kontextusban. A két dózis összehasonlításakor egyértelműen kitűnik, hogy a 2,5 mg/ttkg koncentrációban injektált buspiron jóval hatékonyabb a kontextus váltási tesztben, mint a nagyobb dózis. További kérdéseket vet fel az is, hogy miért csak az új környezetben mutatkozott a buspiron hatása, mi állhat a háttérben, amely miatt a nyolc napig tartó, már ismerős környezetben elvégzett EPM tesztrel nem tudtunk kimutatni gyógyszerhatást. Erre magyarázatként szolgálhat, hogy az alacsonyabb dózisban injektált buspiron az új környezetben az állatok megbirkózási stratégiáját megváltoztatja. Mint láthattuk, az új kontextusban az nAX egerek nagyobb preferenciát mutatnak a zárt karok iránt (passzív coping stratégiát feltételez), míg a szorongó állatoknál egy megnövekedett felfedezési kedv alakult ki (aktív megbirkózási stratégia). Ez azonban ellentétben áll a kezeletlen AX (passzív coping) és nAX (aktív coping) törzseknél az új környezetben mutatott megbirkózási viselkedési mintázatokkal.

Következtetésként úgy gondoljuk, hogy a szerotonin rendszer, és az 5-HT_{1A} receptorok stimulációja központi szerepet tölthet be az új környezethez való megbirkózási stratégiák kiválasztásában. Eredményeink pedig fontosak lehetnek azoknak a pszichológiai betegségeknek a megértésében és gyógyításában, ahol a betegek fóbiásan, illetve pánikszerűen félnek az új környezettől, valamint a változásoktól.

8 Összefoglalás

A szorongásos megbetegedések, és a szorongással kapcsolatos kutatások napjainkban mind inkább kezdenek teret nyerni, mivel az emberi populáció egyre nagyobb hányada szenved valamilyen depressziós betegségben (17). A szorongásos kórképek kialakulásának oka a félelemre adott válaszok szabályozásáért felelős rendszerek diszfunkciója. A túlzott félelmi válaszok patológiás szorongáshoz vezethetnek, melynek oka lehet az alkalmazkodást elősegítő idegi folyamatok károsodása, hibás működése. Laborunkban kétirányú beltenyésztéssel létrehozott magas, és alacsony szorongási reakciót mutató (AX és nAX) egerek új környezetben mutatott viselkedési válaszait vizsgáltuk emelt keresztpalló tesztben (EPM) (18, 3, 19, 20, 21, 22). Ezen dolgozat keretein belül a magatartáskutatásra (emelt keresztpalló teszt), és szorongásoldó (buspiron) hatásának vizsgálatára reflektáltunk. A szorongást vizsgáló magatartástesztetek közül a széles körben használt és elfogadott emelt keresztpalló tesztet alkalmaztuk nyolc egymást követő napon keresztül. Az általános teszt paramétereit vizsgálva (centrumban töltött idő, nyitott/zárt karokban töltött idő, nyitott/zárt karokba lépések száma) (18), a karokban eltöltött összes időt tekintve különbséget tudtunk kimutatni a két egértörzs között. Az nAX egerek kezdeti magasabb nyílt karokban töltött ideje a nyolc napon át tartó teszt során folyamatosan csökkent, amit okozhatott a szorongás növekedése, vagy a nyitott karokba való belépési motiváció csökkenése (OTT hatás). Egy újabb kísérletsorozatban a teszt harmadik napján megváltoztattuk az EPM környezetét, melynek hatására az nAX állatok nyitott karokban töltött ideje megnőtt, míg az AX egerek megnövekedett szorongási szinttel reagáltak. Egy, a klinikumban is használt szorongásoldó (buspiron) krónikus (2,5 mg/ttkg és 5,0 mg/ttkg, i.p, négy hétig tartó injektlás) hatását vizsgáltuk az AX és az nAX egereken. Kérdés volt, hogy a kezelés vajon befolyásolja-e a két törzs stresszes szituációkban alkalmazott megbirkózási stratégiáját? Eredményeink szerint, az AX egerek az új környezetben buspiron 2,5 mg/ttkg dózisú krónikus kezelés következtében aktív megbirkózási stratégiát alkalmaztak, ezzel ellentétben az nAX egerek passzívan reagáltak a kontextus váltásra. Eredményeink megmutatják, hogy a két állattörzs eltérő megküzdési stratégiát (aktív, vagy passzív) alkalmaz a már ismert és az új környezetben, melyet szorongásoldóval történő kezeléssel megváltoztathatunk.

Kulcsszavak: szorongás, EPM, AX, nAX, buspiron

9 Irodalomjegyzék

1. Reneau Z. Peurifoy (1998) Szorongás, fóbiák, pánik *Medicina Könyvkiadó* 1-6
2. Budai Béla, Kopp Mária, Nagy Emese (2001) Magatartástudományok *Medicina Könyvkiadó* 55-57; 378-380
3. Jen-Chuang Kung, Tsung-Chieh Chen, Bai-Chuang Shyu, Sigmund Hsiao and Andrew Chih Wei Huang (2010) Anxiety- and depressive-like responses and c-fos activity in preproenkephalin knockout mice: Oversensitivity hypothesis of enkephalin deficit-induced posttraumatic stress disorder *J. Biomed. Sci.* 17:29
4. R. Bruce Lydiard (2003) The role of GABA in anxiety disorders *J. Clin. Psychiatry* 64 (suppl 3):21-27
5. Fonyó Attila, Ligeti Erzsébet (2008) Az orvosi élettan tankönyve *Medicina Könyvkiadó* 73-74
6. Adriana Feder, Eric J. Nestler, and Dennis S. Charney (2009) Psychobiology and molecular genetics of resilience *Nat. Rev. Neurosci.* 10(6): 446–457
7. Sharon Pellow, Sandra E. File (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus maze: a novel test of anxiety in the rat *Pharmacol., Biochem. and Behav.* Vol. 24, pp 525-529
8. C. Loane, M. Politis (2012) Buspirone: What is it all about? *Brain Res.* 1461, 111-118
9. Jane L Hurst, Rebecca S West (2010) Taming anxiety in laboratory mice *Nat. Methods* Vol.7 No. 10 825- 828
10. Peroutka, S.J. (1988) 5-hydroxytryptamine receptor subtypes: molecular, biochemical and psychological characterization *Trends. Neurosci.* 11, 496-500
11. Peggy Schneider, Ying-Jui Ho, Rainer Spanagel, Cornelius Rainer Pawlak (2011) A novel elevated plus-maze procedure to avoid the one-trial tolerance problem *Behav. Neurosci.* Vol. 5, 43
12. Katarzyna Nosek, Kristen Dennis, Brian M. Andrus, Nasim Ahmadiyeh, Amber E. Baum, Leah C. Solberg Woods, Eva E. Redei (2008) Context and strain-dependent behavioral response to stress *Behav. and Brain Funct.* 4:23
13. Dallas Treit, Janet Menard, Cary Royan (1993) Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze *Pharmacol., Biochem. and Behav.,* Vol. 44, 463-469

14. Lucas Albrechet-Souza, Karina G. Borelli, Marcus L. Brandao (2008) Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlines one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze *J. Neurosci. Meth.* 169, 109-118
15. C. Ducottet, C. Belzung (2004) Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice *Physiol. and Behav.* 81, 417-429
16. Thierry Steimer, Peter Driscoll (2003) Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioural, neuroendocrine and developmental aspects *Stress* Vol. 6 (2), 87-100
17. Kopp M, Skrabski Á. (1995) Magyar lelkiállapot, 2. kiadás. Corvinus Kiadó, Budapest)
18. Alicia A Walf, Cheryl A Frye (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents *Nat. Protoc.* Vol.2, No. 2 322-32
19. Masatoshi Tanaka (2000) Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies *Eur. J. Pharmacol.* 405 (2000) 397–406
20. C. A. J. Stern, F. H. M. Do Monte, L. Gazarini, A. P. Carobrez, L. J. Bertoglio (2010) Activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus maze retest *Neuroscience* 170, 214-222
21. Jacqueline N. Crawley (2006) What's wrong with my mouse? Second Edition *Science* 310: 1880-1885
22. Hirotaka Shoji, Kazushige Mizoguchi (2010) Acute and repeated stress differentially regulates behavioral, endocrine, neural parameters relevant to emotional and stress response in young and aged rats *Behav. Brain. Res.* 211, 169-177
23. Lister R. G. (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse *Psychopharmacology* 92 (2):180-5
24. R. J. Rodgers, J. K. Shepherd (1993) Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice *Psychopharmacology* Vol. 113, Issue 2, pp 237-242
25. File S.E. (1990) One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze *Psychopharmacology* 100 (2):281-2

26. M.B. Calzavara (2005) Role of learning of open arm avoidance in the phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in mice *Life Sci.* Vol. 76, Issues 19
27. File S. E. (1993) The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze *Behav. Brain. Res.* Vol. 58, Issues 1-2, p 199-202
28. Shireen E., Haleem D.J. (2005) Motor effects of buspirone: Relationship with dopamine and serotonin in striatum *J. Coll. Physicians Surg. Pak* 15 (12):753-6
29. Bouwknecht J.A., Paylor R. (2002) Behavioral and physiological mouse assays for anxiety: a survey in nine mouse strains *Behav. Brain. Res.* 136 (2):489-501
30. Hillegaart V.A. (1996) Evidence of specific involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/C} receptors in the expression patterns of spontaneous motor activity of the rat *Eur. J. Pharmacol.* 295 (2-3):155-61
31. File S.E. (1996) Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests *J. Neurosci.* 16 (15):4810-4815
32. Stephanie C. Licata (2008) Abuse and dependence liability of benzodiazepine-type drugs: GABA_A receptor modulation and beyond *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90 (1):74-89
33. B. Dell'osso, M. Lader (2012) Do benzodiazepines still deserve a major role in the treatment of psychiatric disorders? A critical reappraisal *Eur. Psychiatric.*
34. Michael Maes (2002) The serotonin hypothesis of major depression *Neuropsychopharmacology*

10 Köszönetnyilvánítás

Külön köszönöm témavezetőm, Dr. Szegedi Viktor segítségét, aki a téma feldolgozását és a szakdolgozat megírását folyamatosan segítette. Köszönetet mondok Dr. Penke Botond Professzor Úrnak, hogy laborjában dolgozhattam, és munkámhoz rendelkezésemre bocsátotta a kísérletekhez szükséges eszközöket, és anyagokat.

Köszönöm Dr. Farkas Tamásnak a támogató segítségét. Borbély Emőkének köszönöm a szakmai útmutatását és figyelmes munkáját.

Köszönöm fáradhatatlan munkáját Horváth Jánosnak, aki a szakirodalmak felkutatásában, a kísérletek elvégzésében és kivitelezésében, illetve az értékelésében mérhetetlen segítséget nyújtott.

11 Nyilatkozat

Szögi Titanilla Zita, Biológus MSc II. évfolyamos hallgató kijelentem, hogy a szakdolgozatban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel. A dolgozatban leírt valamennyi kísérletben és a hozzájuk tartozó egyéb feladatokban (állatok kezelése, magatartásteszték, az eredmények kiértékelése) részt vettem.

.....

Szögi Titanilla Zita