

Szegedi Tudományegyetem  
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar  
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

**A szkizofrénia Wisket patkánymodelljének elektrofiziológiai és  
farmakológiai jellemzése**

A Ph.D. értekezés tézisei

**Adlan Leatitia Gabriella**

Élettani Intézet, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar  
Szegedi Tudományegyetem

Témavezetők: Prof. Dr. Horváth Gyöngyi

Dr. Kékesi Gabriella

**Szeged**

**2024**

## PUBLIKÁCIÓK

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

- I. Horvath, G., Kis, G., Kekesi, G., Büki, A., **Adlan, L. G.**, Szűcs, E., Heni, H. E., & Benyhe, S. (2021). Interaction of clozapine with metformin in a schizophrenia rat model. *Scientific reports*, 11(1), 16862. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96478-2>

IF: 4,379, D1

- II. **Adlan, L. G.**, Csordás-Nagy, M., Bodosi, B., Kalmár, G., Nyúl, L. G., Nagy, A., Kekesi, G., Büki, A., & Horvath, G. (2022). Sleep-wake rhythm and oscillatory pattern analysis in a multiple hit schizophrenia rat model (Wisket). *Frontiers in behavioral neuroscience*, 15, 799271. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.799271>

IF: 3,558, Q2

**Az értekezés alapjául szolgáló közlemények kumulatív impakt faktora: 7,937**

### Az értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó közlemény:

- 1) Horvath, G., Kertész, I., Nagy, T., **Adlan, L. G.**, Kekesi, G., Büki, A., Tuboly, G., & Trencsényi, G. (2022). Caffeine-induced acute and delayed responses in cerebral metabolism of control and schizophrenia-like Wisket rats. *International journal of molecular sciences*, 23(15), 8186. <https://doi.org/10.3390/ijms23158186>

IF: 6,208 Q1

**Az összes közlemény kumulatív impakt faktora: 14,145**

## 1. BEVEZETÉS

A szkizofrénia egy komplex, súlyos pszichiátriai kórkép, amely világszerte a lakosság 1%-át érinti. A betegséget pozitív (hallucinációk, téveszmék), negatív (alogia, apátia) és kognitív tünetek (figyelem-, tanulási és emlékezeti funkciók károsodása) jellemzik. A klasszikus tüneteken felül a szkizofrénianak vannak nem specifikus jellemzői is, mint amilyen a csökkent szenzoros kapuzás, a magasabb fájdalomküszöb és az alvás-ébrenlét ritmus zavarai, valamint elektroencefalográfiás (EEG) vizsgálatokban kimutatták az oszcillációs mintázatot érintő eltéréseket. Mindezen károsodások környezeti, fejlődéstani és genetikai tényezők kombinációjából eredhetnek. A szkizofrénia patomechanizmusában számos neurotranszmitter rendszer érintett, kiemelt jelentőségű a dopaminerg útvonalak zavara. A dopamin  $D_1$  receptor ( $D_1R$ ) fontos szerepet tölt be a kognitív funkciókban, így a receptor működésének hibái a szkizofréniaiban megfigyelhető kognitív zavarokhoz vezethetnek.

Tekintettel a tünetek különbözőségére és a számos neurotranszmitter rendszer érintettségére, a szkizofrénia kezelése nagy kihívást jelent. A szkizofréniaiban alkalmazott elsővonalbeli gyógyszerek az antipszichotikumok. A szkizofrénia jelenleg rendelkezésre álló gyógyszeres kezelésének számos korlátja van, úm., mérsékelt hatás a negatív és kognitív tünetek enyhítésében, és súlyos mellékhatások, mint például a metabolikus szindróma. A clozapine (CZP) egy második generációs antipszichotikum, amely főként a pozitív tünetek kezelésében hatásos, viszont az eredmények ellentmondásosak a CZP negatív és kognitív tüneteinek kezelését illetően. Ám az eredmények ellentmondásosak. Az antipszichotikumok olyan gyógyszerekkel való kombinációja, amelyek képesek csökkenteni a súlyos mellékhatásokat, klinikai jelentőséggel bírhat. A metformin (MTF) egy jól ismert, 2-es típusú diabetes kezelésére alkalmazott szer. Több vizsgálat igazolta az MTF neuroprotektív hatását egyes neurodegeneratív betegségekben, de a szkizofréniait illetően még nincsenek adatok. A komplex pszichiátriai betegségek (például szkizofrénia) neurológiai hátterének megismeréséhez és/vagy új gyógyszer-célpontok kijelöléséhez megfelelő állatmodellekre van szükség. Az állatmodellek mindegyikének három validitási kritériumnak kell megfelelnie: fenotípiás (tüneti hasonlóság), konstrukciós (patológiai és neurobiológiai okok reprodukciója) és prognosztikus (az állatmodell alkalmas legyen új információk megszerzésére a betegséget illetően és lehetséges terápiák feltárására) érvényesség. Megkülönböztetünk fejlődéstani, farmakológiai, genetikai és kombinációs szkizofrén állatmodelleket. Mivel a szkizofrénia etiológiája multifaktoriálisnak tekinthető, amely a genetikai és környezeti tényezők kölcsönhatásán alapszik, a kutatási eredmények azt sugallják, hogy a fenti faktorok kombinációja egy megbízhatóbb szkizofrénia

állatmodellt eredményezhet. Munkacsoportunk kifejlesztett egy Wisket elnevezésű kombinációs patkánymodellt a Wistar törzsből, amely ötvözi a fejlődési/környezeti (elválasztás utáni 4 hetes szociális izoláció), a farmakológiai (ketamin kezelés) és a genetikai (szelektív szaporítás a viselkedéses fenotípus alapján) tényezőket. Wisket állatainkban kimutattuk a csökkent fájdalomérzékenységet, információszűrést és lokomotoros aktivitást, kognitív deficitet, hőszabályozás és a pupilla fényreflexének eltéréseit, EEG-s mintázatok abnormalitását, valamint, az opioid, kannabinoid, D<sub>2</sub> receptor, GABA és oxytocinerg receptorok érintettségét. A közelmúltban leírtuk, hogy a koffein adagolása enyhítette a Wisket állatok kognitív károsodását, amely együtt járt az agyi anyagcsere változásaival. Tudomásunk szerint, nincs másik olyan kutatócsoport ahol a szociális izolációt, ketamin kezelést és viselkedési fenotípus szerinti szelektív szaporítást kombinálják.

## **2. CÉLKITŰZÉSEK**

Célul tűztük ki, a szkizofrénia Wisket állatmodelljének további prognosztikus és fenotípiás validálását újabb technikákkal:

1. összehasonlítani, hogy a krónikus CZP vagy MTF monoterápia és kombinációjuk hogyan hat a lokomotoros, explorációs, és kognitív paraméterekre,
2. megvizsgálni a D<sub>1</sub>R mediált szignalizációt, ligand kötést, és mRNS expressziót az agy különböző régióiban,
3. leírni a D<sub>1</sub>R mediált szignalizáció, ligand kötés, és mRNS expresszió változásait az agy különböző struktúráiban, krónikus CZP, MTF monoterápia és kombinációs kezelés után,
4. elemezni az alvás-ébrenlét ritmust,
5. meghatározni az elektroencefalográfiás oszcillációs mintázatot.

## **3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **3.1. Állatok**

Kísérleteinkben hím, 4-6 hónapos Wistar (kontroll) és Wisket patkányokat használtunk. Valamennyi kísérletet az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács engedélyével (nyilvántartási szám: XIV/1248/2018), valamint a magyar kormány által az állatkísérletekre vonatkozóan

meghatározott irányelvekkel és az EU 2010/63EU irányelvvel összhangban végeztük. Az állatokat ellenőrzött hőmérsékleten ( $23\pm 1^\circ\text{C}$ ) és páratartalomban ( $55\pm 10\%$ ), 12 órás világos/sötét ciklusban tartottuk. A viselkedési teszteket reggel 8 és délután 4 óra között végeztük, alacsony megvilágítás mellett. Az állatok testsúlyát a kísérlet teljes időtartama alatt nyomon követtük.

## **3.2. Viselkedési tesztek**

### **3.2.1. Tail-flick (farokelrántási) teszt**

Az állatok akut fájdalomérzékenységét a tail-flick (TF) teszttel határoztuk meg. Az állatok farkának disztális 5 cm-ét forró vízbe ( $48^\circ\text{C}$ ) merítve a fark elrántásáig eltelt reakció időt mértük (cut off idő: 20 s vagy 40 s 3 és 9 hetes korban). TF latenciát négyszer határoztuk meg (30 percenként), hogy ezeket átlagolva meghatározzuk az állatok fájdalomküszöbét.

### **3.2.2. Ambitus teszt**

Az Ambitus (négyzetű folyosó) egy jutalmazáson alapuló tanulási teszt, amely patkányok explorációs és lokomotoros aktivitásának, valamint tanulási képességének detektálására fejlesztettünk ki. Az Ambitus külső és belső oldalfalaiban 2-2 egyforma méretű ( $5\times 5\times 5$  cm) oldalkamra található (összesen 16 db), ide helyeztük a jutalomfalatokat (puffasztott rizs: 20 mg). Az állatok 5 percig szabadon fedezhetik fel a folyosót és gyűjthetik össze a jutalmakat. Az elfogyasztott jutalomfalatok mennyiségét minden próba végén megszámloltuk. A tanulmány során az állatoknak 3 különböző feladatot kellett teljesíteniük. Az első feladatban (1. és 2. próba, alap mérések alatt) mindegyik kamra (külső és belső) tartalmazott jutalomfalatot (összesen 16), a második feladatban (3. és 4. próba, alap mérések alatt és a 3-4 napon, a 4 napos kísérlet során, az első kísérleti sorozatban) csak a belső (8 db), a harmadik feladatban csak a külső (8 db) kamrák tartalmaztak jutalmat (1-2 nap, 4 napos kísérlet esetében). Minden patkány 2 sorozatot végzett el a feladatokból (2 próba/sorozat, 1 perc különbséggel) naponta, az elsőt reggel, míg a másodikat, 3 órával később (összesen 4 próba/nap).

### **3.2.3. Szenzoros gátlás teszt (prepulse inhibition, PPI)**

Az akusztikus megijedési (*startle*) válasz gátlását (PPI) a Startle and Fear Conditioning System (Panlab, S.L., Harvard Apparatus, Barcelona, Spanyolország) segítségével mértük. A patkányokat 7,5 percig habituáltuk 60 dB háttérzajhoz. Ezt követően az állatok kétféle ingeret kaptak 20-20 alkalommal, random sorrendben: (1) inger 115 dB-es 40 ms-os fehérzaj önmagában (inger), (2) előinger–ingerpár, ahol az előinger (20 ms, 85 dB) 150 ms-mal

megelőzte az ingeret. A stimulusok közti idő 7-13 s között változott. A következő képletet használtuk a PPI százalékos értékre történő átszámításához:  $\% PPI = 1 - (\text{startle válasz mértéke az előinger-ingerpárra}) / (\text{startle válasz mértéke az ingerre}) \times 100$ .

### 3.3. Első kísérletsorozat

#### 3.3.1. Kísérleti paradigma

1 héttel a viselkedési tesztek elvégzése után, Wisket és kontroll állatainkat 4-4 csoportba osztottuk: víz, MTF, CZP vagy MTF\_CZP kombinációját kapó csoportok (per os, ivóvízben). Oldószerként vizet használtunk. Az MTF-t 1 mg/ml, míg a CZP-t 0,33 mg/ml koncentrációban alkalmaztuk. A vizsgálat során az állatainkat párosával tartottuk. A teljes vizsgálati idő alatt (28 nap) a testsúlyt, a táplálék és folyadékfogyasztást mértük, valamint kétnaponta friss oldatokat készítettünk. A gyógyszeres kezelések 4. hetében két napos táplálékmegevonás után következett a 4 napos Ambitus teszt (Ambitus 2) a 3. és a 2. próbával. Az Ambitus teszt során mérsékelt táplálékkorlátozást tartottunk fenn (10-15 g/nap). A folyadékfogyasztást nem korlátoztuk.

#### 3.3.2. D<sub>1</sub>R funkcionális aktivitása, ligand kötési jellemzői és mRNS expressziója

Az állatokat egy nappal az Ambitus 2 teszt után (29. nap) termináltuk, agyukat eltávolítottuk. A D<sub>1</sub>R ligand kötését és szignalizációját a [<sup>35</sup>S]GTPγS kötési tesztekkel és in vitro receptor kötési teszttel vizsgáltuk meg az agykéregben (CTX), szaglógumóban (BO), agytörzsben és köztiagyban. Meghatároztuk a G-fehérje maximális stimulációját (hatékonyság, [E<sub>max</sub>]) és a ligand hatáserősségének negatív logaritmusát (pEC<sub>50</sub>). Továbbá, megállapítottuk a specifikus radioligand-kötőhelyek maximális számát (kapacitás, [B<sub>max</sub>]) és a ligand-receptor kölcsönhatás affinitását (disszociációs állandó [Kd]). Az mRNS expressziót a CTX-ben, prefrontális kéregben (PFC), striatumban, kisagyban és hippocampusban vizsgáltuk meg, kvalitatív valós idejű polimeráz láncreakciós kísérletekkel az RNS extrakciót követően (qRT-PCR).

### 3.4. Második kísérletsorozat

#### 3.4.1. Kísérleti paradigma

Az EEG felvételek készítéséhez a műtéteket altatásban végeztük, melyhez intraperitoneális ketamin-hidroklorid (Calypsol, Richter Gedeon Nyrt., Budapest, Magyarország; 72 mg/kg) és xilazin (CP-Xylazin, Produlab Pharma B.V. Raamsdonksveer, Hollandia, 8 mg/kg) kombinációját használtuk. Az elektródák beültetésére a következő koordinátákat alkalmaztuk: parietális kéreg (bregmától -2,3 és 2,4 mm jobbra a középvonalig), occipitális kéreg (földelés: -6,1 és 2,4 mm jobbra a középvonalig), kisagy (referencia: -10,5 és 0,5 mm jobbra a

középvonalig). Egyhetes felépülési időszakot követően az állatokat habituáltuk a kísérleti körülményekhez, majd a 21 órás EEG-felvételeket elemeztünk, beleértve a világos fázis teljes hosszát (12 óra) és a sötét fázis 9 óráját (Wisket és kontroll patkányok,  $n=8$ /csoport). Az adatokat 8 s szakaszokban elemeztük offline. A 8 s-os szakaszok alatt 3 éberségi állapotot különböztettünk meg: éber, NREM és REM fázisok. Az ébrenléteket a kevésbé szabályos theta aktivitással és gyakori mozgásokkal definiáltuk, továbbá a motoros aktivitás alapján az ébrenléti fázist két alfázisra tovább osztottuk: aktív és inaktív ébrenléti alfázisokra. Azokat a mozgásokat, amelyek 1 s-nál hosszabbak voltak a 8 s-os időszak alatt, aktív ébrenléti alfázisként kategorizáltuk. A NREM alvást nagy amplitúdójú lassú hullámokkal és kevés mozgással azonosítottuk. A REM alvást a szabályos theta aktivitás, kevés mozgás, alkalmanként rángások jellemezték. Teljesítményspektrumokat a következő frekvencia tartományokra osztottuk fel: delta (0,5–4 Hz), theta (4–8 Hz), alfa (8–12 Hz), béta (12–30 Hz), alacsony gamma (30–48 Hz).

#### **4. STATISZTIKAI ANALÍZIS**

Eredményeinket átlag  $\pm$  SEM értékek formájában adtuk meg, a szignifikancia szintjét pedig  $P<0,05$  értéknél határoztuk meg. Az adataink statisztikai elemzéséhez a STATISTICA program (TIBCO Software Inc., USA) 13.4.0.14 verzióját használtuk. *In vivo* és *in vitro* kísérleteink adatainak statisztikai analizéséhez ismételt és faktoriális ANOVA tesztet használtuk. Az ismételt mérések a napokat jelentették, faktorként pedig a csoportot (kontroll, Wisket) és a kezelést (víz, MTF, CZP, MTF\_CZP) használtuk. Ismételt és faktoriális ANOVA tesztet használtuk az EEG paraméterek összehasonlítására is. A post hoc analízist a Fisher-féle LSD teszttel végeztük el. A [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S kötési teszteket és a radioreceptor-kötési teszteket a GraphPad Prism (5.0.; Inc., San Diego, CA) program segítségével, nem lineáris regressziós analízissel elemeztük. Az mRNS-expressziós adatok esetében a páratlan t-próbát is alkalmaztuk a csoportok közötti különbségek megállapítására.

### **5. EREDMÉNYEK**

#### **5.1. Első kísérleti sorozat**

##### **5.1.1. A krónikus kezelés hatásai a viselkedési paraméterekre (motoros aktivitás, tanulási képesség)**

A Wisket állatokban a kontroll állatokhoz képest kimutattuk a csökkent fájdalomérzékenységet, szenzoros kapuzást, lokomotoros és explorációs aktivitást, valamint tanulási képességet. A

különböző gyógyszerekkel kezelt két csoport között nem volt szignifikáns különbség ezekben a paraméterek tekintetében. A vizet kapó csoporttal összehasonlítva az MTF kezelésnek önmagában nem volt szignifikáns hatása a viselkedésre. A CZP kezelés tovább csökkentette az explorációs aktivitást, amely összefüggést mutatott a gyenge tanulási képességgel. A kombinációs kezelés a vizsgált paramétereket a vizet kapó csoportéhoz hasonló szintre javította.

### **5.1.2. D<sub>1</sub>R aktiváció, kötés, és génexpresszió különböző agyi struktúrákban**

A génexpresszió, kötési kapacitás, és G-fehérje aktiváció szignifikánsan lecsökkent a Wisket állatok CTX-ében. Az mRNS expressziót tekintve, egyik kezelésnek sem volt szignifikáns hatása, az  $E_{max}$  és  $B_{max}$  értékeket a kombinációs kezelés javította ezen az agyterületen. Wisket állatokban az BO-ában magasabb D<sub>1</sub>R kötési és G-fehérje mediált transzmembrán szignalizációt figyeltünk meg. A kombinációs kezelés szignifikánsan javította a G-fehérje aktiváció hatáserősségét ezekben az állatokban; hasonló hatást találtunk kontroll állatokban, amely összefüggésben volt az alacsonyabb pEC50 értékkel. Az agytörzsben nem találtunk eltéréseket; a köztiagyat illetően a Wisket patkányokban magasabb ligand kötési hatáserősséget (alacsonyabb pEC50 értékek) mértünk. A kombinációs kezelés okozta  $B_{max}$  növekedés és változatlan  $E_{max}$  értékek elsősorban a kontroll állatokban voltak kimutathatók. A striatumban és hippocampusban nem találtunk szignifikáns eltéréseket a csoportok között a D<sub>1</sub>R mRNS expressziójában. Sőt, a krónikus CZP kezelésnek nem volt hatása erre a paraméterre. A striatumban az MTF kezelés önmagában szignifikáns D<sub>1</sub>R expresszió növekedést okozott mindkét csoportban. A PFC-ben és hippocampusban nem találtunk szignifikáns eltéréseket. A Wisket állatok kisagyában szignifikánsan alacsonyabb D<sub>1</sub>R expressziót figyeltünk meg. A post hoc elemzés szerint az MTF-el kezelt Wisket patkányokban lecsökkent ez a paraméter a kontroll állatokhoz képest.

## **5.2. Második kísérleti sorozat**

### **5.2.1. Alvás-ébrenlét ritmus**

Wisket állataink napszaki ritmusában nem találtunk szignifikáns eltérést, bár kismértékben kevesebb időt töltöttek ébren a világos fázisban, amelyet egy mérsékelt hosszabb NREM alvás követett. A kontroll csoporthoz viszonyítva rövidebb REM ciklusok voltak megfigyelhetők, mely együtt járt az epizódok számának kismértékű csökkenésével minden állapotban.



### **5.2.2. Oszcillációs mintázat**

A Wisket állatokban az ébrenlét mindkét alfázisában megnövekedett delta teljesítményt mutattunk ki a kontroll állatokhoz képest. Az alacsony frekvenciájú delta aktivitás növekedett Wisket állatokban NREM alatt, míg a magasabb frekvenciájú delta csökkent NREM és REM alvásban. A theta hullám magasabb frekvenciasávjában a Wisket állatokban a relatív teljesítmény csökkent az ébrenléti (mind az aktív, mind az inaktív alfázisban) és a REM fázisban, míg az alacsony theta hullámokban NREM alatt szignifikánsan alacsonyabb teljesítményt mértünk. Wisket állatainkban az alacsonyabb frekvenciájú alfa sávban szignifikánsan megnövekedett relatív teljesítményt találtunk az éber (elsősorban az aktív alfázisban) és a REM fázisokban. Kontroll állatokhoz képest a Wisket patkányokban szignifikánsan magasabb béta teljesítményt figyeltünk meg annak alacsonyabb frekvencia tartományában, mindegyik fázisban, de ez a különbség az aktív ébrenléti alfázisban volt a legkiemelkedőbb. A gamma hullám magasabb frekvenciasávjában, a Wisket patkányok relatív teljesítményének szignifikáns csökkenését találtuk, amely az ébrenléti fázisban volt jelentős (főként az aktív alfázisban).

## **6. MEGBESZÉLÉS**

### **6.1. A krónikus kezelés hatásai a viselkedéses paraméterekre (motoros aktivitás, tanulási képesség)**

A bemutatott eredmények rámutattak arra, hogy az antipszichotikum terápia (CZP) önmagában további viselkedésbeli eltéréseket okozott. Egy tanulmány arról számolt be, hogy a kombinált kezelés (két antidepresszáns és CZP kiegészítve MTF-el) javította az MK-801 (dizocilpin) okozta viselkedési eltéréseket. Az MTF kezelés önmagában adagolva nem befolyásolta szignifikánsan a viselkedéses paramétereket, ám kombinációban az MTF szignifikánsan csökkentette a CZP által generált kognitív károsodásokat Wisket állatokban. Néhány preklinikai vizsgálatból kiderül, hogy az MTF önmagában is képes javítani a farmakológiailag indukált kognitív károsodást.

### **6.2. D<sub>1</sub>R aktiváció, kötés és génexpresszió az agy különböző struktúráiban**

Wisket állatainkban a dopaminerg rendszer további eltéréseit figyeltük meg, amely a csökkent D<sub>1</sub>R kötési, szignalizációs és génexpresszió szintjén nyilvánult meg, elsősorban a CTX-ben. A képkötő vizsgálatok ellentmondásos eredményeket írtak le a D<sub>1</sub>R denzitását és vagy aktivitását illetően szkizofréniában. Egy közelmúltbéli vizsgálatban kimutatták a D<sub>1</sub>R upregulációját a CTX-ben és a striatumban, míg más tanulmányok nem találtak eltéréseket vagy

alacsonyabb kötési potenciált mutattak ki a frontális kéregben szkizofrén betegeknel. Egy állatokon végzett tanulmányban a krónikus CZP kezelés mérsékelt növekedést eredményezett a D<sub>1</sub>R mRNS expressziójában, míg jelen vizsgálatunkban egyik kezelés sem befolyásolta a paramétereket. Az E<sub>max</sub> és B<sub>max</sub> értékeket szignifikánsan javította a kombinált kezelés a CTX-ben, amely pozitívan hathatott a Wisket állatok viselkedésére. A klinikai adatok a D<sub>1</sub>R transzkript alacsonyabb expresszióját mutatták ki szkizofrén betegek PFC-jében, bár a hippocampusban és a nucleus caudatusban nem mutattak ki változásokat. Ezenkívül a D<sub>1</sub>R mRNS downregulációját figyelték meg a PFC-ben szubkrónikus NMDA receptor antagonistá kezelést követően (szkizofrénia modellként), ami összhangban van a Wisket patkányokban megfigyelt mintázattal. Egy vizsgálat kimutatta, hogy a CZP szubkrónikus adagolása nem akadályozta meg a frontális kéreg D<sub>1</sub>R sűrűségének csökkenését, hanem inkább növelte az affinitását. A modellek és/vagy a kezelések közötti különbségek miatt nem tudtuk kimutatni a CZP kezelés hatását a D<sub>1</sub>R mRNS-expressziójára a PFC-ben.

Az BO területe gazdag D<sub>1</sub>R-ban és fontos szerepet játszik a kognitív funkciókban, amelyekhez részben hozzájárulhatnak a D<sub>1</sub>R-ok is. Wisket patkányokban megemelkedett a D<sub>1</sub>R kötés és szignalizáció, amely a receptorok nagymértékű denzitására utalhat. A kombinációs kezelés szignifikánsan javított a G-fehérje aktiváció hatékonyságán, ami hozzájárulhatott a kombinált kezelés jótékony hatásához a Wisket állatokban.

Az agytörzs és köztiagy magjaiban megtalálható a D<sub>1</sub>R-ok számos élettani folyamatot (például táplálkozás, fájdalom percepció, szenzoros kapuzás, cirkadián ritmus) szabályoznak, amelyek mind érintettek szkizofréniaiban. Wisket állatainkban az agytörzset illetően nem találtunk eltéréseket, míg a köztiagy esetében magasabb kötési hatáserősséget mutattunk ki. A kontroll állatokban a kombinált kezelés megnövekedett B<sub>max</sub> és változatlan E<sub>max</sub> értékekkel járt együtt. Az eredmények arra utalnak, hogy a megnövekedett kötési denzitás összefüggésben volt az alacsony G-fehérje aktivitással a köztiagy esetében.

Korábbi eredményekkel összhangban, a D<sub>1</sub>R mRNS expressziót illetően nem találtunk szignifikáns különbségeket a két csoport között. A CZP kezelés nem hatott erre a paraméterre, ám a MTF önmagában szignifikánsan megnövelte a D<sub>1</sub>R mRNS expressziót a striatumban mindkét csoportban. A kisagy fontos szerepet játszik a motoros koordinációban és a kognícióban egyaránt, így a cerebelláris funkciókban bekövetkező változások a szkizofréniahoz is köthetők. A Wisket állatokban kimutatott csökkent kisagyi D<sub>1</sub>R mRNS expresszió hozzájárulhatott az állataink viselkedésbeli eltéréseikhez.

### 6.3. Alvás-ébrenlét ritmus

Jelen vizsgálatunkban a Wisket patkányok cirkadián ritmusa közel normálisnak tekinthető. Különböző szkizofrén állatmodellek (Disrupted In Schizophrenia 1 [DISC1] gén mutáns egér, prenatális és neonatális hippocampus léziós patkány) esetében hasonló eredményeket mutattak ki. Tendenciaként a Wisket állatok hosszabb NREM és rövidebb REM fázisait figyeltük meg. Hasonló eredményekre jutottak mGLUR5 (metabotrop glutamát receptor 5) mutáns egerekben is. Néhány preklinikai vizsgálat (stable tubule-only polypeptide [STOP] mutáns egerek, valamint a vemhesség 17. napján metilazoximetanol-acetát kezelt mutáns patkányok) ezzel ellentétes eredményekre jutott, csökkent alvási időt, fragmentált alvás-ébrenléteti periódusokat, csökkent NREM és növekedett ébrenléteti időt írtak le. A mögöttes mechanizmus a leszálló és felszálló pályarendszerek közti egyensúly hiányából eredhet, amelyek funkciója a NREM és REM fázisok előfordulásának aktiválása vagy gátlása. Emiatt a Wisket patkányokban megfigyelt károsodott kognitív funkciók összefüggésben lehetnek a NREM-REM alvási ciklusok egymást követő átmeneteivel. Összegezve, a Wisket állatokban megfigyelt cirkadián ritmus megfelel a szkizofrén betegek egy kisebb csoportjára jellemző változásoknak, de nem egyezik meg a szkizofréniában általánosan megfigyelt alvást érintő eltérésekre.

### 6.4. Oszcillációs mintázat

A jelen vizsgálatban a Wisket állatok megnövekedett delta frekvencia teljesítményének tendenciáját mutattuk ki az ébrenléteti fázisban (mindkét alfázisban). Az alacsony frekvenciájú delta aktivitás NREM fázis alatt nőtt, míg a magasabb frekvenciájú delta hullám csökkent mind a NREM és REM alvások során a Wisket patkányokban. Ezen eredményeinkkel összhangban, humán vizsgálatok is hasonló képet mutattak az alacsony frekvenciájú delta hullámot illetően. Továbbá, különböző szkizofrén állatmodellekben (például neonatális hippocampus léziós patkánymodell, STOP mutáns egér, 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav) (AMPA) receptor mutáns egér) is hasonló eredményeket kaptak, míg a mGLUR5 receptor mutáns egerekben csökkent teljesítményt mutattak ki a delta magasabb frekvenciájában NREM alvás alatt.

A Wisket csoportban szignifikánsan csökkent a teljesítmény a théta hullám magasabb frekvenciasávjában ébrenlét (mindkét alfázisban) és REM fázisok alatt, NREM alatt pedig az alacsony frekvenciatartományban. Humán és rágcsáló vizsgálatok ellentmondásos eredményekre jutottak. A szkizofréniára vezető tüneteitől függően a théta hullám nőtt vagy változatlan maradt a betegekben. Összhangban eredményeinkkel, STOP és AMPA receptor

mutáns egerek is csökkent relatív teljesítményt mutattak, amely az alacsony éberségi szintre utal. Ezzel ellentétben neonatális hippocampus léziós patkányok théta teljesítménye növekedett NREM és ébrenléti fázisokban.

A Wisket patkányokban szignifikáns emelkedést találtunk az alacsony frekvenciájú alfa teljesítményben ébrenléti (főként aktív alfázisban) és REM fázis alatt, amelyek a negatív tünetekre utalhatnak. Egy preklinikai vizsgálatban neonatális hippocampus léziós állatokban hasonló eredményeket mutattak ki az ébrenléti fázisban. Ezzel ellentétben AMPA és STOP mutáns egerekben csökkent alfa teljesítményt írtak le REM alvás alatt.

A Wisket patkányokban a kontroll állatokhoz viszonyítva szignifikánsan növekedett az alacsony frekvenciájú béta teljesítmény mindegyik fázisban, és ez a különbség kiemelkedő volt az aktív ébrenléti alfázisban. Hasonló eredményeket mutattak ki szkizofrén betegekben, amely a CTX hiperexcitabilitásából és az ehhez kapcsolódó figyelemzavarokból eredhet. Preklinikai adatok STOP, AMPA és feszültség-függő kalcium csatorna mutáns egerekben csökkent béta teljesítményt mutattak ki NREM és REM alvás során. Ébrenlét alatt, AMPA knock-out állatokra emelkedett, míg kalcium csatorna knock-out állatokra csökkent béta teljesítmény volt jellemző.

Jelen tanulmányunkban a Wisket állatokban szignifikánsan csökkent a magasabb frekvenciájú (39-48 Hz között) gamma hullámok relatív teljesítménye főként az ébrenlét (kifejezetten aktív alfázis) fázisában. Ezen eredmény az alacsony éberségi szintre utalhat ébrenlét alatt, amely kapcsolatban lehet a Wisket állatokban korábban leírt alacsony kognitív teljesítménnyel. Hasonló eredményeket figyeltek meg szkizofrén betegekben, amelyek a negatív tünetekkel volt összefüggésben. Összhangban eredményeinkkel, preklinikai tanulmányokban (NMDA receptor antagonistá kezelés vagy feszültség függő kalcium csatorna mutáció) csökkent vagy változatlan gamma teljesítményt okozott, de mGLUR5 mutáns egerekben emelkedett a gamma hullám aktivitása.

### **Limitációk**

A bemutatott kísérleteknek számos korlátja van. Az első kísérleti sorozatban, ahogy azt korábban említettük, a CZP és az MTF jelentősen befolyásolják a szénhidrát anyagcserét. Azzal, hogy a vizsgálatunk nem terjedt ki glükóz metabolizmus vizsgálatára, nem tudjuk biztosan kizárni a MTF és CZP interakcióját a metabolikus paraméterekre, mint a glükagon-szerű peptid reguláció, amely pozitívan hathatott a kognitív teljesítményre. In vitro mérések

esetében, főként a radioligand kötési tesztekben, különböző állatok szövettani mintáját gyűjtöttük össze egy kísérleti csoporton belül. Ez bevett gyakorlat biokémiai kísérleteknél. Második kísérleti sorozatunkban, a mély hippocampális elektródák hiánya, a csatornák korlátozott száma, vezetékes regisztrálás korlátozták eredményeinket. Fontos megemlítenünk, hogy a vizsgálatban szűk gamma frekvenciatartományt használtunk, így nem tudjuk egyértelműen kizárni, hogy Wisket állatokban kimutatott eltérések a magasabb frekvenciákkal voltak összefüggésben. A mintavételi sebesség is alacsony volt (128 Hz), amely nem biztosította a pontos analízist a gamma magasabb frekvenciatartományában.

## 7. KÖVETKEZTETÉS

Összefoglalva eredményeinket, megállapíthatjuk, hogy a CZP tovább rontotta a viselkedési paramétereket Wisket állatokban, de az MTF-al való kombináció hatására kisebb volt. Tekintettel a D<sub>1</sub>R funkciókra, a Wisket patkányokban a vizsgált agyi területeken belül a legkiemelkedőbb változásokat a CTX-ben tudtunk kimutatni, ez megnyilvánult a csökkent génexpresszió, kötési kapacitás, és G-fehérje aktivációban. A kombinációs terápia a CTX-ben javította a D<sub>1</sub>R kötést és aktivitást mindkét csoportban.

Kimutattuk a Wisket állatok cirkadián ritmusának eltéréseinek tendenciáját és az oszcillációs mintázat komplex eltéréseit. Feltételezhető, hogy a Wisket patkányokban feltárt különböző neurotranszmitter rendszer eltérések szerepet játszhatnak a szkizofréniára hasonló viselkedésbeli változások, valamint a kapcsolódó specifikus agyi oszcilláció kialakulásában. A megfigyelt eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy az általunk kifejlesztett többtényezős szkizofrén patkánymodell károsodásai elektrofiziológiai és D<sub>1</sub>R szintjén is megnyilvánulnak. Ezek az eltérések hozzájárulnak Wisket modell transzlációs kutatásban való hasznosításához, amely segíthet új gyógyszercélpontokat azonosítani.

### **Klinikai relevancia**

Jól ismert tény, hogy az antipszichotikumok adagolása súlyos mellékhatásokkal jár együtt, mint pl. a metabolikus szindróma, ezért az adjuváns terápiáknak (MTF) jótékony hatásai lehetnek a szkizofréniában. Egyre több adat utal arra, hogy az MTF jótékony hatással bír a kognitív folyamatokra. Első kísérletsorozatunkban, az MTF sikerrel enyhítette a CZP károsító hatásait Wisket patkányokban. Számos tanulmányból kiderült, hogy szkizofrén betegek gyakran tapasztalnak alvászavarokat, és az EEG vizsgálatok oszcillációs mintázatbeli eltérésekre világítanak rá. Wisket állatokban számos eltérést tártunk fel a különböző

frekvenciasávokban, amelyek pedig a már korábban kimutatott károsodott kognitív funkciókkal lehetnek kapcsolatban. Jelen eredményeinkkel közelebb kerülhettünk a szkizofrénia viselkedésbeli, neurokémiai és elektrofiziológiai eltérések mögöttes kapcsolatának megértéséhez; komplex patkánymodellünk pedig új perspektívákat nyújthat a betegség megismerésével kapcsolatban, és klinikailag releváns kezelési módok felé irányíthat bennünket.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

A jelen vizsgálatok célja a krónikus szkizofrén állatmodellünk jellemzése volt. A következő eredmények születtek:

1. Wisket patkányokban károsodott a motiváció, a figyelmi és kognitív funkciók, amelyek együtt jártak a D<sub>1</sub>R alacsony szintjével elsősorban a CTX-ben.
2. A CZP adagolás további károsodást okozott a vizsgált viselkedési paraméterekben.
3. A MTF kezelés javította a CZP-indukálta eltéréseket.
4. A CZP és MTF kombinált kezelésnek szignifikáns hatása volt a különböző agyi régiókra, amely megnyilvánult a szignifikáns G-fehérje aktivitás emelkedéssel és D<sub>1</sub>R kötéssel az agykéregben mindkét csoport esetében.
5. A Wisket állatok cirkadián ritmusa a kontroll állatokéhoz hasonló.
6. A NREM fázis hosszabodásának és a REM fázis rövidülésének tendenciáját tudtuk kimutatni Wisket állatokban.
7. Wisket patkányaink komplex oszillációs mintázatbeli eltéréseket mutattak elsősorban az aktív ébrenléti fázisban.

Összességében elmondhatjuk, hogy a megfigyelt eltérések a szkizofréniaában kimutathatóak, ezekkel tovább növelve a Wisket állatmodellünk érvényességét.

## 9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretném kifejezni hálámat témavezetőimnek, Prof. Dr. Horváth Gyöngyinek és Dr. Kékesi Gabriellának szakmai tanácsaikért és személyes útmutatásukért, támogatásukért és bátorításukért a doktori tanulmányaim során.

Hálás vagyok Prof. Dr. Bari Ferencnek és Prof. Dr. Jancsó Gábornak, hogy támogatták az Elméleti Orvostudományok Doktori Iskolában, és az „Idegtudomány” alprogramban való részvételemet. Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Sárly Gyulának, hogy lehetővé tette számomra az Élettani Intézetben való munkámat.

Köszönettel tartozom jelenlegi és korábbi labormunkatársaimnak, Dr. Büki Alexandrának, Dr. Plesz Szonjának, Mészáros Anettnek és Ábrahám-Tandari Ágnesnek, hogy segítették a kísérletek elvégzését és a laboratóriumi méréseket. Szeretném megköszönni Liszli Péternek a kísérleti berendezések beállítását és eszközök létrehozását. Hálás vagyok az Élettani Intézet minden munkatársának.

Végül, szeretném hálámat kifejezni a családomnak és barátaimnak szeretetükért és folyamatos támogatásukért.