

**SEMMELWEIS EGYETEM**  
**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**3151.**

**FINSZTER CINTIA KLAUDIA**

**Neuromorfológia és sejtbiológia**

című program

Programvezető: Dr. Alpár Alán, egyetemi tanár

Témavezetők: Dr. Ádám Ágota, egyetemi docens  
Dr. Adorján István, tudományos főmunkatárs

Szelektív sejtes és szinaptikus változások korai  
posztnatális és felnőtt egerek dopaminerg és  
dopaminoceptív agyterületein prenatális valproát  
kezelés hatására

Doktori értekezés

**Finszter Cintia Klaudia**

Semmelweis Egyetem  
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Ádám Ágota, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Adorján István, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. László Kristóf, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Dávid Csaba, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Alpár Alán, az MTA doktora, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Tóth Zsuzsanna, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Dr. Kovács Krisztina, Ph.D., tudományos tanácsadó

Budapest  
2024

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés (irodalmi háttér).....	8
1.1 Autizmus spektrum zavar (ASD).....	8
1.2 Genetikai, epigenetikai és környezeti hatások.....	9
1.3 VPA kezelés, mint az autizmus modellje.....	11
1.4 Az autizmussal kapcsolatba hozható idegi rendszerek.....	12
1.4.1 Dopamin.....	12
1.4.1.1 Dopamin szintézise.....	12
1.4.1.2 Dopaminerg rendszer anatómiája és szerepe.....	14
1.4.1.3 Dopaminerg pályarendszer fejlődése.....	16
1.4.1.4 Dopaminerg pályarendszer érintettsége az autizmusban....	17
1.4.2 Kalciumkötő fehérjék.....	17
1.4.2.1. Calbindin tartalmú neuronok.....	18
1.4.2.2. Calretinin tartalmú neuronok.....	18
1.4.2.3. Parvalbumin tartalmú neuronok.....	19
1.4.3 Szinaptikus változások az autizmusban.....	20
1.4.4 Apoptózis.....	21
2. Célkitűzések.....	22
2.1 A dopaminerg pályarendszer eddig ismert károsodása milyen sejtszintű változásokkal jár a VPA kezelés hatására?.....	22
2.2 A mesotelencephalicus dopaminerg pálya redukciója okoz-e változásokat egyes dopaminoceptív célterületek szinaptikus kapcsolataiban a prenatális VPA expozíciót követően?.....	22
3. Módszerek.....	24
3.1 Kísérleti állatok.....	24
3.2 Hisztológiai előkészítés.....	24
3.2.1 Perfúzió.....	24
3.2.2 Szabadon úszó metszetek előkészítése.....	25
3.2.3 Paraffinos metszetek előkészítése.....	25
3.3 Immunhisztokémia.....	25
3.3.1 Paraffinba ágyazott minták festése.....	26

3.3.2 Szabadon úszó metszetek immunfestése .....	26
3.4 Hisztológiai analízis.....	28
3.4.1 Immunreaktív perikarionok vizsgálata .....	30
3.4.1.1 Fluoreszcens mikroszkópia .....	30
3.4.1.2 Sejtszámlálás .....	30
3.4.2 Volumetriás denzitás és térbeli elrendeződés .....	30
3.4.2.1 Konfokális mikroszkópia.....	30
3.4.2.2 Juxtapozíciók mérése.....	32
3.5 Immunoblot (Western blot) .....	34
3.5.1 Agyminták disszekciója .....	34
3.5.2 Western blot és elektroforézis .....	34
3.5.3 Immunfestés .....	36
3.6 Statisztikai analízis .....	37
4. Eredmények.....	38
4.1 A mesotelencephalicus pálya defasciculációját követő változások a subpalliumban.....	38
4.2 Sejtszintű változások a VPA kezelés hatására.....	38
4.2.1 Apoptózisbeli változások.....	38
4.2.2 A kalciumkötő fehérjék változása.....	43
4.2.2.1 A kalciumkötő fehérjék vizsgálata 7 napos egerekben .....	44
4.2.2.2 A kalciumkötő fehérjék vizsgálata 60 napos egerekben .....	46
4.2.2.3 A kalciumkötő fehérjéket tartalmazó neuronok nem fejeznek ki apoptotikus fehérjéket.....	49
4.2.3 TH immunpozitív és kalciumkötő fehérjéket tartalmazó sejtek kolokalizációja a mesotelencephalicus pálya kiinduló régióiban.....	50
4.2.3.1 Ventral tegmental area (VTA).....	51
4.2.3.2 Substantia nigra (SN) .....	52
4.3 Szinapszis szintű változások.....	53
4.3.1 Proteomikai vizsgálat (Western blot).....	53
4.3.2 Kalciumkötő fehérje-tartalmú neuronokkal kapcsolatos szinaptikus változások két dopaminerg célrégióban (NAc, TO) .....	54

4.3.2.1 TH <sup>+</sup> axonok és CR <sup>+</sup> /CB <sup>+</sup> sejttetek és dendritek közti juxtapozíciók változásai a NAc területén .....	55
4.3.2.2 TH <sup>+</sup> axonok és CB <sup>+</sup> sejttetek és dendritek közti juxtapozíciók változásai a TO területén .....	58
5. Megbeszélés .....	61
5.1 Dopaminerg rendszer változásainak értelmezése .....	61
5.2 Apoptózisbeli változások értelmezése .....	62
5.3 Kalciumkötő fehérjék változásainak összegzése .....	62
5.4 A dopamint fogadó célterületek változásai.....	64
5.4.1 Szinaptikus változások értékelése.....	64
5.4.2 A dopamin tartalmú axonok és a kalciumkötő fehérje tartalmú neuronok kapcsolatai .....	66
5.5 Általános megbeszélés.....	68
6. Következtetések.....	70
7. Összefoglalás.....	71
8. Irodalomjegyzék .....	72
9. Saját publikációk jegyzéke .....	89
10. Köszönetnyilvánítás .....	90

## Rövidítések jegyzéke

ABC: avidin-biotin komplex

ac: commissura anterior

ACC: anterior cingulate cortex

ADNP: aktivitásfüggő neuroprotektív fehérje

ASD: autizmus spektrum zavar

Bcl-2: B-sejtes limfóma 2 fehérje

BNST: bed nucleus of stria terminalis

C57BL/6: C57 Black 6 egértörzs

CaBP: kalciumkötő fehérje

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát

casp-3: caspase-3

CB: calbindin- D28K

Ch: csillársejt

CPu: caudoputamen

CR: calretinin

DAB: diaminobenzin

DARPP-32: dopamin és cAMP által szabályozott foszoprotein 32000

DAT: dopamin transzporter

DNS: dezoxiribonukleinsav

DR: dopamin receptor

DSM: Mentális Zavarok Diagnosztikai és Statisztikai Kézikönyve

DTI: diffúziós tenzor képalkotó eljárás

E13,5: embrionális 13,5. nap

FMRP: törékeny X mentális retardációs fehérje

FOXP: Forkhead Box transzkripció faktor

FXS: törékeny X szindróma

GABA: gamma-amino-vajsav

GAD1: glutaminsav-dekarboxiláz-1

H3: hiszton-3

H4: hiszton-4

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hidrogén-peroxid  
Hp: hippocampus  
HT: heterozigóta  
Hyp: hypothalamus  
iDISCO: immunolabeling and three-dimensional imaging of solvent-cleared organs  
L-DOPA: levodopa  
lf: fissura longitudinalis  
LS: lateral septum  
MAO: monoamin-oxidáz  
MCL: mesocorticolimbicus pálya  
mRNS: messenger ribonukleinsav  
mt: mesotelencephalicus pálya  
mTOR: rapamicin emlős célpont kináz  
Myt1: Myelin transzkripció faktor  
NAc: nucleus accumbens  
NF: neurofilamentum  
NGS: normál kecskeszérum  
NHS: normál lószérum  
Nlgn-1: Neuroligin 1  
NR1: N-metil-D-aspartát receptor  
Nrp2: neuropilin-2  
P7: posztnatális 7. nap  
P60: posztnatális 60. nap  
PBS: foszfát-pufferelt sóoldat  
PCC: posterior cingulate cortex  
PFA: paraformaldehid-oldat  
PFC: prefrontal cortex  
PSD-95: posztszinaptikus denzitás-95 fehérje  
PV: parvalbumin  
RSC: retrosplenial cortex  
Sema3F: Semaforin 3F  
Sept: septum

Shh: Sonic hedgehog  
SN: substantia nigra  
SNc: substantia nigra pars compacta  
SSC: somatosensory cortex  
Syn: szinaptofizin  
TH: tirozin-hidroxiláz  
TO: tuberculum olfactorium  
TRIS: tris-hidroxi-aminometán  
TTF-1: tiroid transzkripció faktor-1  
vGAT: vezikuláris GABA transzporter  
VL: lateral ventricle  
VMAT2: vezikuláris monoamin transzporter  
VP: ventral pallidum  
VPA: nátrium-valproát, valproinsav  
VTA: ventral tegmental area  
Wnt: Wingless and Int-1 fehérje



## 1. Bevezetés (irodalmi háttér)

### 1.1 Autizmus spektrum zavar (ASD)

Az autizmussal összefüggő viselkedés-zavarokat a Mentális Zavarok Diagnosztikai és Statisztikai Kézikönyve (DSM) korábbi kiadása (DSM-IV) nyomán öt különböző kategóriába sorolták: gyermekkori autizmus, Asperger-szindróma, atípusos autizmus, nem meghatározott pervazív fejlődési zavar és egyéb pervazív fejlődési zavar.<sup>[1]</sup> Azonban, az utóbbi harminc év kutatómunkája ellenére sem tudták e kategóriák közötti különbségeket megbízhatóan igazolni, így a korszerűbb ajánlások már egységesen „autizmus spektrum zavarként” írják le. Az ASD-re a szociális alkalmazkodás és a viselkedés diszfunkciója jellemző, melynek tünetei már kisgyermekkorban megjelennek. A jelenleg érvényes DSM-V két fő tartományra osztja az autizmus spektrumát. Az első a szociális interakció nehézségeit írja le. Az érintett személyeknek hiányosságai vannak a szociális érzelmi kölcsönösségben, nem értik a nonverbális kommunikációt vagy nem képesek kapcsolatokat kialakítani és fenntartani. A második tartományba tartoznak a korlátozott és ismétlődő viselkedési és cselekvési mintázatok; az autista személyek bizonyos pillanatokban ismétlődő sztereotip mozdulatokat tesznek, és rendkívüli szorongást tapasztalnak, ha a rutinjukat megváltoztatják, valamint hiper- vagy hiporeaktivitást is mutathatnak szenzoros ingerekre.<sup>[2]</sup> Az autizmus specifikus biológiai okait a mai napig nem sikerült egyértelműen meghatározni. Bár a genetikai tényezők jelentős szerepet játszanak, valószínűsíthető, hogy az okok komplexek, és az idegrendszer fejlődésére ható környezeti tényezők, valamint a gén-környezet kölcsönhatásai is közreműködnek az állapot kialakulásában. Különböző tényezők különböző kombinációi és egymásra gyakorolt hatásai vezetnek a klinikai tünetek sokféleségéhez. Mivel az autizmus alapvetően egy sajátos (atipikus) fejlődés eredménye, így élethosszig tartó állapotnak felel meg.<sup>[3]</sup> 2022-ben több, mint 75 millió ember volt érintett világszerte, ami 1%-os globális előfordulást jelent, a WHO adatai alapján. A férfiak hajlamosabbak az ASD-re, a férfiak és nők aránya 3:1.<sup>[4]</sup> Az ASD világszerte megtalálható, ám a magas jövedelmű országokban a prevalenciája gyorsabban növekszik.<sup>[5]</sup> Az autizmus spektrum zavar jelen tudásunk szerint nem gyógyítható, de intenzív fejlesztéssel az állapot javítható. Az

autizmus spektrum zavar magas és növekvő előfordulási gyakorisága miatt, ez a rendkívül összetett idegrendszeri fejlődési szindróma állt a vizsgálatunk középpontjában.

## 1.2 Genetikai, epigenetikai és környezeti hatások

Általánosan elfogadott, hogy a genetika fontos szerepet játszik az ASD kialakulásában. Kezdetben, egypetéjű ikrek tanulmányozása esetében 90%-nál nagyobb öröklődési átfedést írtak le<sup>[6]</sup>, ám az új kutatási adatok alacsonyabb örökölhetőséget mutatnak, körülbelül 52%-ot.<sup>[7]</sup> *De novo* vizsgálatok alapján, a ritka esetek kontrollvariációit is figyelembe véve, több, mint 100 gént azonosítottak ASD kockázati génként.<sup>[8]</sup> Az adott kockázati gének többsége a génexpressziót vagy a neuronális kommunikációt szabályozza.<sup>[9]</sup>

A Forkhead Box transzkripciós faktorok (*FOXP1* és *FOXP2*) az ASD-vel kapcsolatba hozható gének.<sup>[8]</sup> A *FOXP1* szindróma egy idegrendszeri fejlődési rendellenesség, amelyet a *FOXP1* gén deléciói okoznak. Ez a gén egy transzkripciós faktort kódol, amely számos szervrendszer, köztük az agy korai fejlődéséhez nélkülözhetetlen.<sup>[10]</sup> Ezek a transzkripciós faktorok szerepet játszanak a beszédben és a nyelvi rendellenességek kialakulásában<sup>[11]</sup>, annak a tapasztalatnak megfelelően, hogy egyes autistáknak problémáik adódhatnak a verbális kommunikációval.

Az általános fejlődésben szerepet játszó Sonic hedgehog (*Shh*) gén a rostralis dopaminerg projekciók útvonalának egy elágazási pontján fejeződik ki, meghibásodása esetén a ventral tegmental area (VTA) és a substantia nigra (SN) dopaminerg neuronjainak korai szétválásában zavar lép fel.<sup>[12]</sup> Azokban az egerekben, amelyekben a *Shh* jelátvitelt a késői idegsejt-fejlődés során inaktiválták *in vivo*, a dopaminerg projekciók hiányosan fejlődtek.<sup>[13]</sup>

A Wnt-fehérjék olyan morfogének, amelyeket az axonvándorlás irányító molekuláiként azonosítottak. Számos Wnt-fehérje expresszálódik a középagy területén, ahol szabályozzák a dopaminerg neuronok kialakulását.<sup>[14]</sup> *In vivo* vizsgálat során a *Wnt5a* gén az E11.5 napon fejeződik ki egerekben, meghibásodása esetén a mesotelencephalicus dopaminerg pálya fejlődése hiányosságot szenved, miáltal a pálya axonjai nem jutnak el a célterületeikre.<sup>[15]</sup>

Az aktivitásfüggő neuroprotektív fehérje (ADNP) szindróma egy autizmushoz hasonló rendellenesség, melyet az *ADNP* gén mutációi okoznak.<sup>[16]</sup> Az ADNP-károsodásban szenvedő betegek jelentős pszichiátriai tüneteket produkálnak, mint például beszédzavarok, mozgásfunkciós problémák, rendellenes hallás és értelmi fogyatékoság.<sup>[17]</sup> Az ADNP az agyműködés és a normál kognitív teljesítmény nélkülözhetetlen fehérjéje.<sup>[18]</sup> Egerekben az ADNP KO törzs életképtelen, ám ha csak korlátozzák az ADNP expresszióját *in vivo*, az emberhez hasonló kognitív és szociális hiányosságokhoz vezet.<sup>[19]</sup> Az ADNP rendszerben nemek közti különbséget is megfigyeltek, ráadásul az autizmushoz hasonlóan, a hím egerek jobban érintettek és több autistákra jellemző tünetet mutattak, mint a nőstény egerek.<sup>[20]</sup>

A rapamicin emlős célpontjának nevezett kinázt, az mTOR-t a szinaptikus plaszticitásban betöltött szerepe miatt hozták összefüggésbe az autizmussal, főként egérmodellek alapján.<sup>[21,22]</sup> Az mTOR mutációi zavart okoznak a sejten belüli jelátviteli útvonalak működésében, a szinaptikus transzmisszióban és a neuronális aktivitásban.<sup>[23]</sup>

Az ASD néhány genetikai faktorának ismertetése után hangsúlyozni kell, hogy a genetikai hatások mellett a környezeti tényezők is fontosak az autizmus kialakulásában. Ikervizsgálatok alapján kb. 40% relevanciát tulajdonítanak a környezeti hatásoknak.<sup>[7]</sup> Ezen tényezők közé tartozik a prenatális ischaemia és hypoxia, az anyai elhízás, a késői gyermekvállalás vagy a cukorbetegség.<sup>[24]</sup> További lehetséges környezeti mechanizmusok lehetnek az oxidatív stressz, gyulladás, endokrin zavarok, neurotranszmitter-változások és a jelátviteli útvonalakkal való interferencia.<sup>[24]</sup>

Az ASD-ben bizonyítottan fontos környezeti tényezők epigenetikai mechanizmusokon keresztül is kifejtik hatásukat. Ilyen, az autizmushoz is igazolt mechanizmus a DNS metiláció, a hiszton módosulás és a nem kódoló RNS változások.<sup>[25]</sup> Az epigenetikai mechanizmusok nem magát a DNS szekvenciát változtatják meg, hanem módosítják a génkifejeződést vagy a genetikai kód leolvasását befolyásolják.<sup>[26]</sup> Ez kulcsfontosságú az agy fejlődése, az agyi ideghálózat kialakulása szempontjából. Így az epigenetikai diszreguláció neuronális fejlődési rendellenességeket, például ASD-t idézhet elő.

Az antiepileptikumként is használt nátrium-valproát (VPA) növeli az ASD kialakulásának valószínűségét, ha az érintett gyermekek anyját terhesség alatt ezzel kezelték.<sup>[9]</sup> A VPA a hiszton-deacetiláz inhibitora, és hiszton H3 és H4 hiperacetilációt

okoz.<sup>[27]</sup> Ez az epigenetikai változás megzavarhatja a központi idegrendszer normális kialakulását, és felelőssé tehető a gyermek késleltetett fejlődéséért, valamint a posztnatális kommunikáció és szociabilitás károsodásáért.<sup>[28]</sup> A VPA állatmodellekhez is felhasználható: ha az embriókat kritikus időablakban VPA hatásának tesszük ki a vemhes anyaállatok injektálása által, az utódok szociális interakciós hiányosságokat, szorongásszerű viselkedést és memóriaproblémákat mutatnak.<sup>[29]</sup>

### 1.3 VPA kezelés, mint az autizmus modellje

A nátrium-valproát, valproinsav vagy 2-propil-pentánsav (VPA) egy gyakran használt antiepileptikum, mely blokkolja a nátrium-, és kalcium csatornákat, valamint GABA transzamináz inhibitoraként működik.<sup>[30]</sup> Ezen terápiásan is kihasználható hatása mellett azonban figyelembe kell venni, hogy erős teratogén mellékhatásai lehetnek.<sup>[31]</sup>

Az ASD-t elemző számos klinikai és neuropatológiai vizsgálaton túlmenően szisztematikus kísérletek történtek arra, hogy megfelelő állatmodelleket találjanak a potenciálisan ASD-hez vezető molekuláris mechanizmusok kísérleti elemzésére.

Rágcsálókban megfigyelték, hogy a vemhes anyaállatok VPA expozíciója jellegzetes szociális viselkedési zavarokat idéz elő születés után az utódokban.<sup>[32,33,34,35,36]</sup> A VPA-val kezelt állatok szorongást, depressziószerű viselkedést és abnormális nocicepciós küszöböt mutatnak.<sup>[37]</sup> A VPA expozíció modellként való használata nem korlátozódik az emlősökre, amint azt halakon<sup>[38,39]</sup> és madarakon<sup>[10,40,41,42,43]</sup> végzett vizsgálatok is igazolják. A modell összhangban van azzal az elképzeléssel, hogy az emberi autizmus eseteinek csak egy része tulajdonítható genetikai összetevőknek, környezeti vagy epigenetikai tényezők hasonlóan fontos szerepet töltenek be.<sup>[44]</sup>

Hogy a VPA teratogén hatása molekuláris szinten hogyan hozható összefüggésbe az autizmusra specifikus defektusokkal, még nem teljesen érthető, mindenesetre a beavatkozás időablaka kritikus kérdés. Az irodalomban megtalálható korábbi vizsgálatok az ideális időperiódust a VPA beadására prenatális E12-15 nap közé teszik egerek esetében.<sup>[29]</sup> A 12. nap előtti VPA kezelés nem specifikus teratogén hatások által vetélést okoz, míg a 15. nap után nincs közvetlen hatás.<sup>[45]</sup> Ez azt jelzi, hogy a 12. és a 15. nap között olyan fejlődési folyamatok zajlanak, amelyeket jelentősen

befolyásolhatnak epigenetikai és környezeti tényezők. Az egyik lehetséges mechanizmus szerint, a VPA az agy fejlődését a hiszton hiperacetilációja és a Wnt jelátviteli útvonal megváltozása révén akadályozza.<sup>[46]</sup>

Figyelemre méltó, hogy a VPA adminisztráció optimális időablaka egybeesik a dopaminerg sejtek megjelenésével (amit a tirozin-hidroxiláz (TH) segítségével mutattak ki) az agytörzsben, valamint a későbbi mesotelencephalicus (tegmentostriatalis) pályát alkotó dopaminerg axonok korai fejlődésével. Joggal feltételezhetjük, hogy a VPA zavarhatja ezt a folyamatot, és ezáltal a mesotelencephalicus útvonal célterületeinek fejlődését és mintázatát.<sup>[47]</sup>

## 1.4 Az autizmussal kapcsolatba hozható idegi rendszerek

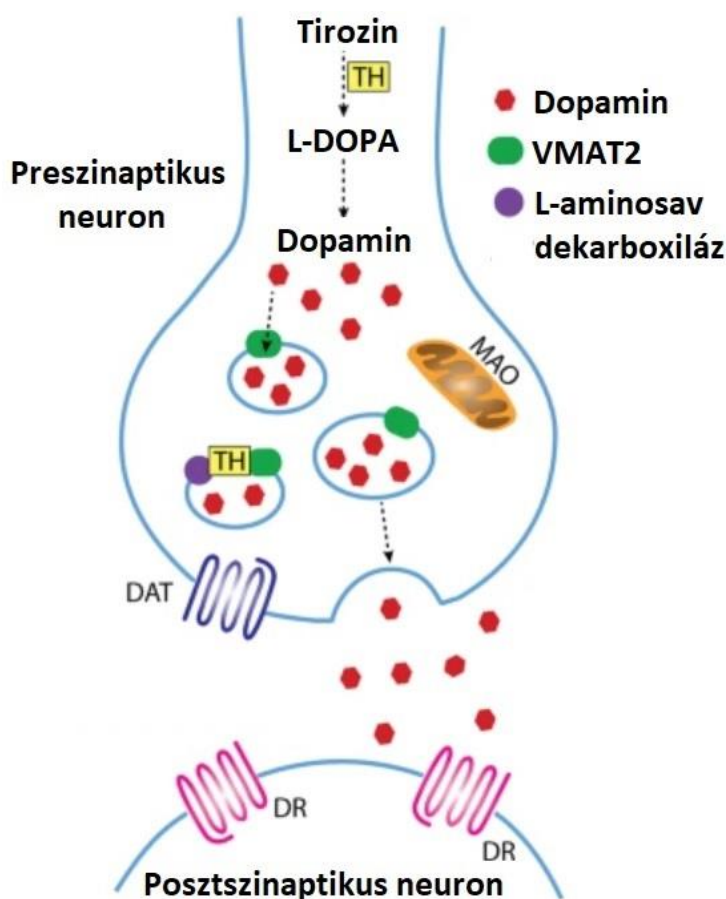
### 1.4.1 Dopamin

A dopamintermelő neuronokat először 1964-ben írta Annica Dahlström és Kjell Fuxe.<sup>[48]</sup> A dopamin az idegrendszerben neuroendokrin- és neurotransmitter funkciót is betölt, aktiválva a dopamin receptorokat. Hormonként gátolja a prolaktin felszabadulását a hipofízis elülső lebenyéből, ezáltal regulálja a laktációt.<sup>[49]</sup> A neurotransmitterként funkcionáló dopaminnak alapvető szerepe van a motoros neuronrendszerek szabályozásában<sup>[50]</sup>, a munkamemória működésében<sup>[51]</sup>, a motivációban<sup>[52]</sup> a jutalmazási válaszokban és viselkedés predikciójában<sup>[53,54]</sup> valamint a szexuális viselkedésben.<sup>[55]</sup> A közepagi dopaminerg neuronok pusztulása ismert kórképpel, a Parkinson-kórral társul.

#### 1.4.1.1. Dopamin szintézise

A dopamin szintézisének nagy része közvetlenül tirozinból történik, de a dopamin közvetetten fenilalaninból is szintetizálható, mivel az L-fenilalanin tirozinná alakítható fenilalanin-hidroxiláz által.<sup>[56]</sup> A dopamin szintézise két lépésben zajlik a citoplazmában. Először a tirozin-hidroxiláz (TH) a tirozint levodopává (L-DOPA) alakítja, tetrahydrobiopterin, oxigén (O<sub>2</sub>) és vas (Fe<sup>2+</sup>) kofaktorok felhasználásával. Az L-DOPA-ból ezután dopamin keletkezik DOPA dekarboxiláz által, mely folyamathoz

piridoxál-foszfát szükséges.<sup>[57]</sup> Egy másik, kevésbé jelentős, útvonal is ismert a dopamin szintézisben, amely során a p-tiramin dopaminná alakítható a cytochrome P450 2D6 hatására a SN területén.<sup>[58,59]</sup> A dopaminerg neuronokban történő szintézis után a dopamin szinaptikus vezikulákba kerül a vezikuláris monoamin transzporter 2 (VMAT2) segítségével <sup>[60]</sup> (1. ábra).



**1. ábra: Dopamin szintézis**

A dopamin anyagcsereútja kétlépcsős szintézisből áll. Először a tirozint a tirozin-hidroxiláz (TH) L-DOPA-vá alakítja, amely ezután dopaminná alakul. A dopamint a citoplazmából a vezikuláris monoamin transzporter (VMAT2) szállítja a szinaptikus vezikulákba, ahol addig tárolódik, amíg fel nem szabadul a szinaptikus részbe. A dopamin lebomlása monoamin-oxidáz (MAO) hatására történik, a külső mitokondriális membránban. A dopamin receptorok (DR) a posztzinaptikus membránban foglalnak helyet, míg a preszinaptikus neuronokban a dopamin transzporter (DAT) fejt ki hatását. <sup>[62 nyomán]</sup>

A dopamin tovább alakulhat noradrenalinná vagy adrenalinná a dopamin  $\beta$ -hidroxiláz és a fenilethanolamin N-metiltransferáz hatására, szekvenciális módosulások révén.<sup>[61]</sup> A dopamint fogadó (dopaminoceptív) neuronok jelentős részében (ide tartoznak a striatum medium spiny neuronjai) jelen van a cAMP által szabályozott foszfoprotein 32000 (DARPP-32), mint a dopaminerg jelátvitel fontos szignálmolekulája, a D1 receptorok választ közvetítve, melynek foszforilációs változásai az érintett neuronok funkciójától függő állapotváltozásokat generálnak.<sup>[63]</sup>

#### 1.4.1.2. Dopaminerg rendszer anatómiája és szerepe

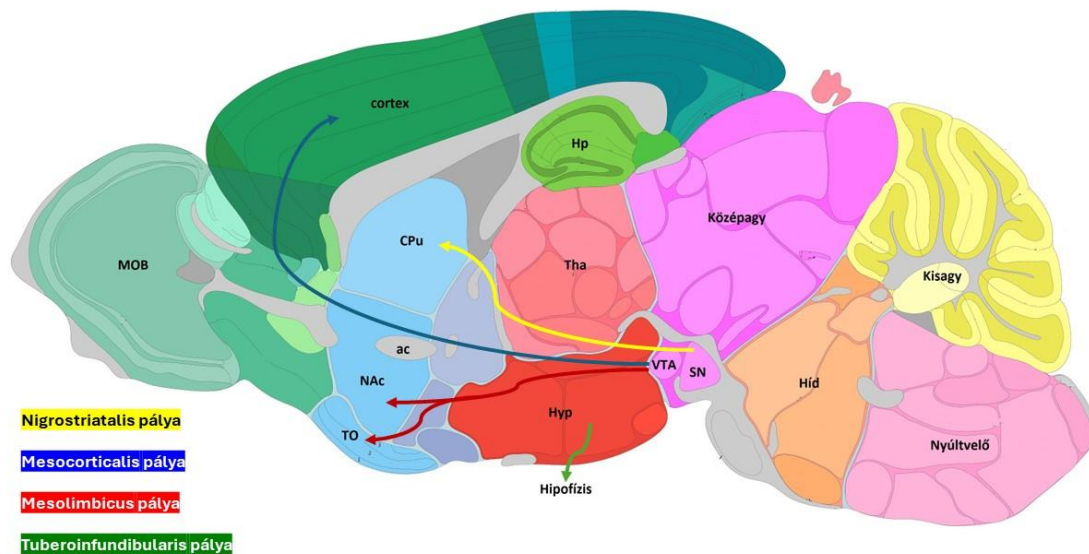
A középagyú dopaminerg neuronok egyik csoportja a ventral tegmental areából a mesocorticalis útvonalon keresztül a prefrontális kéregbe (PFC), valamint a mesolimbicus útvonalon keresztül a nucleus accumbensbe (NAc) vetül.<sup>[64,65]</sup> Ezek a pályák együtt alkotják a mesocorticolimbicus (MCL) rendszert, amely szerepet játszik a jutalmazásban és a motivációban.<sup>[66]</sup> Ezen felül, ugyancsak a VTA régióból indulnak azok a dopaminerg pályák, amelyek az amygdalába, hippocampusba, a gyrus cinguliba és a szaglógumóba vetítenek<sup>[67,68,69]</sup> (2. ábra).

A középagyú dopaminerg neuronok másik csoportját alkotják a substantia nigra pars compacta (SNc) részében lévő dopamin tartalmú neuronok, melyek a striatum területére vetítenek. Az utóbbi nigrostriális útvonal szerepet játszik a motoros funkciók és a tanulási képességek szabályozásában.<sup>[70]</sup> A pálya a bazális ganglionokra vetül, ahol befolyásolja a tanult mozgási mintázatok, motivált viselkedések és a kognitív rutinok szabályozását.<sup>[71,72]</sup> A nigrostriális dopaminerg rendszer részt vesz a fájdalom központi modulációjában, ahol a gátlást a D2 receptorok szabályozzák<sup>[73]</sup> (2. ábra).

A tuberoinfundibuláris pályát a nucleus arcuatusból és nucleus periventricularis hypothalamiból induló dopaminerg neuronok alkotják, melyek az agyalapi mirigybe vetülnek, ezáltal szabályozva az elülső lebenyben a prolaktin kiválasztását.<sup>[74]</sup> A dopamin gátlás alól felszabaduló prolaktin segíti a megfelelő fiziológiai válasz kialakulását a szoptatásra<sup>[75]</sup> (2. ábra).

A dopaminerg neuronok és útvonalaik pre- és posztnatális fejlődésével foglalkozó tanulmányok lenyűgöző száma ellenére, a ventrosegmentalis-accumbens

(mesolimbicus) útvonal fejlődési dinamikája kevésbé ismert, mint a partner-rendszeré (nigrostriatális).



## 2. ábra: Dopaminerg pályarendszerek eloszlása a központi idegrendszerben

A VTA a mesocorticolimbicus rendszer kiinduló magja: a dopaminerg neuronok a mesocorticalis útvonalon keresztül a kéregbe (cortex) (kék szín), valamint a mesolimbicus útvonalon keresztül a nucleus accumbensbe (NAc) (piros szín) vetítenek. A substantia nigrában (SN) lévő dopamin neuronok a striatumba vetítenek és alkotják a nigrostriatális útvonalat (sárga szín). A tuberoinfundibuláris útvonalat (zöld szín) a hypothalamicus (Hyp) magokból (nucleus arcuatus és nucleus periventricularis) az agyalapi mirigybe vetítő dopaminerg neuronok alkotják (Allen Mouse Brain Atlas felhasználásával). Rövidítések: comissura anterior (ac), hippocampus (Hp), bulbus olfactorius (MOB), thalamus (Tha), tuberculum olfactorium (TO)

Ismeretes, hogy a dopamin befolyásolja a célneuronok fejlődését és érését, amint azt a szeletkultúrákon végzett vizsgálatok igazolják.<sup>[76]</sup> A szociális agyi hálózat részét képező ventrobazalis előagy kialakulásában komplex fejlődési folyamat játszódik le, mire a dopaminerg neuronok célpontjaikhoz (dopaminoceptív neuronokhoz) jutnak és kapcsolatuk összeáll. Ha ez a folyamat a dopamin bemenet hiánya miatt az embrionális fejlődés kritikus időpontjában megghiúsul (vagy késik), az egyén gyengébb vagy nem megfelelő választ mutathat a születés utáni szociális ingerekre.<sup>[77]</sup>



#### 1.4.1.3. Dopaminerg pályarendszer fejlődése

Egérben az első dopaminerg idegsejtek E10.5 napon jelennek meg a középagy területén.<sup>[78]</sup> Ezek a sejtek a velőcső ventrális középvezetékén található progenitor sejtekből származnak.<sup>[79]</sup> A progenitor sejtekből a dopaminerg sejtekké differenciálódást többek között a Wnt1 kifejeződése teszi lehetővé.<sup>[80]</sup> Ezek a migráló sejtek végleges pozíciójukat nagyjából az E11.5 napra érik el, itt ketté válnak, és a laterális neuronpopuláció a substantia nigrává fejlődik, míg a helyben maradt neuronok a VTA dopaminerg sejtjeit alkotják.<sup>[81]</sup> A sejtek az embrionális 12. napon kezdik el termelni a tirozin-hidroxilázt (TH), mely segítségével a tirozinnal dopamin szintetizálódik.<sup>[81]</sup> A TH kifejeződésében több kulcsfontosságú transzkripciós faktor (Pitx3, Lmx1b, Nurr1) is szerepet játszik, melyek hiányában a neuronok nem expresszálják a TH-t.<sup>[82,83]</sup> Nagyjából az E11.5. napon indul el az axonnövekedés az előagyi területek felé.<sup>[15]</sup> A rostok először dorsalis irányba indulnak, aztán fordulnak rostralis irányba a hypothalamus felé.<sup>[84]</sup> A striatum területét, beleértve a NAc-t, az E16-17 nap környékén érik el a rostok, míg a kérgi területeket csupán a 18-19. nap környékén.<sup>[15,85]</sup>

A TTF-1 (Nkx2.1) transzkripciós faktorról ismert, hogy részt vesz a hypothalamicus mátrixon áthaladó mesotelencephalicus pálya axonjainak irányításában.<sup>[86]</sup> Korábbi alfejezetben már szó esett arról, hogy a mesotelencephalicus pálya Wnt5a KO mutáns egerekben átrendeződik <sup>[15]</sup>, a dopaminerg axonok fasciculációja a célpontjuk felé vezető úton zavart szenved. A TH<sup>+</sup> rostok a mediális előagyi kötegben lazábban rendeződtek a KO mutánsokban, mint a kontroll egerekben.<sup>[15]</sup>

A mesostriatal dopaminerg pálya fasciculációjának további fontos transzkripciós faktorai a Semaforin 3F (Sema3F) és annak receptora, a Neuropilin-2 (Nrp2).<sup>[87,88]</sup> A dopaminerg axonok szétszóródását és a mediális előagyi köteg kiszélesedését figyelték meg Nrp2 vagy Sema3F KO egerekben.<sup>[88,89,90]</sup> A pálya szabályos növekedésében szerepet játszik a Slit-Robo rendszer is. Robo1/2 és Slit 1/2 KO egerekben a mesodiencephalicus dopaminerg axonok a normálisnál szélesebb rostpályákba rendeződtek, feltehetően az axon-orientáció hibája miatt.<sup>[91]</sup>

#### 1.4.1.4. Dopaminerg pályarendszer érintettsége az autizmusban

Már korábban felmerült annak lehetősége, hogy az ASD összefüggésbe hozható a dopaminerg rendszer hibás fejlődésével.<sup>[47,78,92]</sup>

Az ASD-ben megfigyelhető szociális hiányosságok a mesocorticolimbicus (MCL) pálya diszfunkciójának tükröződései lehetnek, tekintve annak szerepét a jutalom és a motiváció terén. A MCL pálya kialakulásában vagy működésében fellépő diszfunkció megváltoztathatja a jutalom reprezentációját és csökkentheti a jutalom keresésére irányuló motivációt.<sup>[93]</sup> Ezek a változások a szociális viselkedést annyiban érintik, hogy az autisták agya nem regisztrálja jutalmazásként a szociális élményeket, ami tovább csökkentheti a szociális interakciók keresésére és a szociális képességek fejlesztésére irányuló motivációt.<sup>[94]</sup>

Kutatócsoportunk által korábban leírt és közölt eredmények kimutatták, hogy az E13.5. napon a prenatális VPA expozíció finom, de jól detektálható eltérést okozott a mesotelencephalicus dopaminerg (TH<sup>+</sup>) pályában a születés után, 7 napos egérkölyökben. Az előagyba vetítő pálya axonnyalábjai defasciculálódtak, a kezelt csoportban kevesebb és szórtabb nyalábokat találtak.<sup>[47]</sup> Továbbá kimutatták, hogy a VTA területén a VPA kezelés hatására csökkent a TH immunpozitív neuronok sűrűsége, míg a SN területén inkább ellentétes változást tapasztaltak.<sup>[47]</sup>

#### 1.4.2 Kalciumkötő fehérjék (CaBP)

A Fragile X-szindróma (FXS), az örökletes értelmi fogyatékoság és az autizmus leggyakoribb formája, mely a Fragile X mentális retardációs fehérje (FMRP) hiányából ered. A FMRP és a feszültségfüggő kalcium ion (Ca<sup>2+</sup>) csatornák közötti közvetlen kölcsönhatás befolyásolja a neurotranszmitterek felszabadulását.<sup>[97]</sup> Egy korábbi munkában, szinaptofizinhez kötött GCaMP6f Ca<sup>2+</sup> indikátor segítségével monitorozták a Ca<sup>2+</sup> tranzienseket a szinaptikus tüskékben, hátsó gyökér ganglionsejtekben. Megállapították, hogy FMRP csökkenése növeli a preszinaptikus terminálokban felszabaduló Ca<sup>2+</sup> tranziensek amplitúdóját, és hogy ez a hatás az N-típusú Ca<sup>2+</sup> csatornák teljes Ca<sup>2+</sup> tranzienshez való hozzájárulásának növekedéséből fakad.<sup>[98]</sup>

A fent említett szindróma is kiemeli a  $\text{Ca}^{2+}$ -ion és Ca-csatornák jelentőségét és felveti annak lehetőségét, hogy a kalciumkötő fehérjék eddig nem feltárt szerepet játszhatnak az autizmus kialakulásában. A  $\text{Ca}^{2+}$ -ion kulcsfontosságú és meghatározó másodlagos hírvivő szerepe nagy mértékben függ a CaBP-től, amelyek képesek specifikus doménekben megkötni ezt az iont. A CaBP-k hozzájárulnak a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjának szabályozásához a citoplazmában, valamint számos sejtfunkcióban részt vesznek. A  $\text{Ca}^{2+}$  transzporter transzmembrán molekulaként a  $\text{Ca}^{2+}$  által modulált receptorként funkcionál, azaz dekódolja a  $\text{Ca}^{2+}$  jeleket.<sup>[95]</sup> A kalcium ionok számos sejtjelátviteli kaszkádban fontosak, és a  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis hibái stresszhez, akár sejthalálhoz is vezethetnek. A stabil kalciumkoncentráció fenntartása és az ionok fehérjékkel való kölcsönhatásainak közvetítése érdekében számos sejt citoplazmája kalciumkötő fehérjéket tartalmaz.<sup>[96]</sup>

Tanulmányunkban három, a központi idegrendszerben jelen lévő CaBP-re koncentrálnak: calbindin-D28k (CB), calretinin (CR) és parvalbumin (PV). Ezek különböző neuronpopulációkban expresszálódnak, és a beáramló kalcium pufferelesében játszanak szerepet, ezáltal a sejtek homeosztázisát szabályozzák.<sup>[99]</sup>

#### 1.4.2.1. Calbindin tartalmú neuronok

A kalciumkötő-fehérjék szerepét más neurodegeneratív betegségekben, a Parkinson-kórban, már vizsgálták. Az emberi középagy dopaminerg neuronjai, főként a substantia nigra pars compactaban (SNc), de kisebb mértékben más dopaminerg sejtsoportok területein is, nagy számban kifejeznek calbindint. Parkinson kórban a calbindint expresszáló dopaminerg neuronok szelektíven megőrződnek az egyébként jelentős degenerációt mutató dopaminerg sejtek között.<sup>[100]</sup>

#### 1.4.2.2. Calretinin tartalmú neuronok

Annak érdekében, hogy megállapítsák, más kalciumkötő fehérjék is potenciális védőfaktorokat jelentenek-e a dopaminerg neuronok számára Parkinson-kórban, korábbi vizsgálatokban elemezték a calretinin-tartalmú (CR+) neuronok eloszlását az emberi középagyban. A calretinin és a dopaminerg elemek (tirozin-hidroxilázzal jelölve) kettős

immunhisztokémiai festéssel változó arányú CR+ neuronokat mutatott a dopaminerg neuronok között: mérsékelt koexpressziót mutatott a katecholaminerg A8 sejtcsoportban és a ventrális tegmentális terület (VTA) dorsalis részében, míg alacsony közös előfordulást az SNc-ben és a VTA ventrális részén.<sup>[100]</sup> A calbindinra vonatkozó, korábban említett, eredményektől eltérően, calretinin esetében nem találtak jelentős változást a parkinsonos agyakban a kontrollhoz képest.<sup>[100]</sup>

A calretinint expresszáló neuronok segítik fenntartani a serkentés-gátlás egyensúlyát a sejtekben. Ez az egyensúly, úgy tűnik, az autizmus során felborul. Egy autistákból származó posztmortem humán agyszövetet vizsgáló tanulmány kimutatta, hogy az autizmusban szenvedőkben a nucleus caudatus területén a CR+ interneuronok sűrűsége 35%-kal alacsonyabb, mint a kontroll csoportokban.<sup>[101]</sup> A szerzők szerint, a csökkent CR+ sűrűség a serkentés és a gátlás egyensúlyának felborulásához vezethet, ezáltal diszfunkcionálissá válik a corticostriatális pálya, ami autista-szerű viselkedést eredményezhet.

#### 1.4.2.3. Parvalbumin tartalmú neuronok

Az agykéregben a parvalbumint gátló gyors-tüzelésű interneuronok expresszálják. A gyors akciós potenciálsorozat generálásával a PV+ interneuronok gyors és stabil gátló inputot biztosítanak a piramis neuronok számára, ezáltal hozzájárulnak az agykérgi válasz kialakulásához. A csillársejtek (Ch) egyfajta PV+ interneuronok, amelyek a piramis neuronok kimenetét szabályozzák és közvetlenül beidegzik az axon iniciális szegmensét. Az ASD-ben a PV+ Ch sejtek száma több kortikális területen csökken.<sup>[102]</sup> A PV+ interneuronok morfológiájában és/vagy funkciójában bekövetkező változásokat a skizofréniával, epilepsziával és bipoláris zavarral is összefüggésbe hozták. Több agyterületen, közte a striatumban megfigyelték, hogy a PV tartalmú neuronokban a PV downregulációja fokozott oxidatív stresszt vált ki, amely együtt jár ASD-szerű tünetek megjelenésével egerekben.<sup>[103]</sup>

### 1.4.3 Szinaptikus változások az autizmusban

Számos autizmushoz társított mutáció várhatóan különböző szinteken befolyásolja a szinapszisok szerkezetét és átépülését, mivel ezek a gének a kromatin átrendeződésében és transzkripcióban, fehérjeszintézisben és -lebontásban, az aktin citoskeleton dinamikájában vagy a szinaptikus átvitelben részt vevő fehérjéket kódolnak.<sup>[104]</sup>

ASD egérmodellek szinaptikus fenotípusainak vizsgálatára Shank3 $\Delta$ 4-22 és Cntnap2 $^{-/-}$  mutáns egereket és azok vad típusú alomtestvéreit használták. A Shank3 $\Delta$ 4-22 és Cntnap2 $^{-/-}$  egerek tüskesűrűsége és GAD1, NR1, vGAT, valamint egy szinaptikus vezikula specifikus fehérje, a szinaptofizin<sup>[105]</sup> szintje szignifikánsan csökkent a szomatoszenzoros kéregben a kontrollesoporthoz képest, nemtől függetlenül, jelezve a mutáns egerek szinaptikus fejlődésének károsodását.<sup>[106]</sup>

A Myelin transzkripciós faktor 1 (Myt1) egy transzkripciós faktor, amely elősegíti a neuronális differenciálódást, és összefüggésbe hozható az autizmus spektrum zavarokkal (ASD), valamint az értelmi fogyatékosággal. Megfigyelték, hogy a faktor expressziója az életkorral erősen változik. Az újszülött Myt1-heterozigóta egerek erős Myt1 expresszióval rendelkeznek, ASD-szerű transzkriptomikus változásokat mutatnak, beleértve a prefrontális kéreg serkentő szinaptikus transzmissziójának csökkenését. A juvenilis Myt1-heterozigóta egerekben a Myt1 expressziója jelentősen csökken, az állatok fokozott prefrontális kérgi serkentő transzmissziót és nagyrészt normális viselkedést mutatnak. Ezzel szemben, a felnőtt Myt1-HT egerek ASD-szerű transzkripciós elváltozásokat mutatnak, beleértve az asztrocita és mikroglia gének regulációját, fokozott prefrontális gátló transzmissziót és a viselkedési deficitet.<sup>[107]</sup>

A prenatálisan VPA-nak kitett egérmodellek felnőttkori striatális és dorsalis hippocampus-funkcióinak vizsgálata során, repetitív viselkedésbeli változásokat figyeltek meg, melyek összefüggésben álltak a serkentő szinapszisok kialakulásában és fenntartásában szerepet játszó fehérjék, mint az Nlgn-1 és a PSD-95 csökkent szintjével. Tehát a motoros készségek, a repetitív viselkedések és az alkalmazkodóképesség hiánya (a szokások megváltoztatása esetén) összefüggésben állnak a csökkent striatális serkentő szinaptikus funkcióval.<sup>[108]</sup>

#### 1.4.4 Apoptózis

Kimutatták, hogy lehetséges összefüggés van az idegsejtek halála és az autizmus között.<sup>[109]</sup> A programozott sejthalál (apoptózis) egy fontos mechanizmus, amely meghatározza az agy méretét és formáját, valamint szabályozza a fejlődő neuronhálózatok megfelelő kapcsolódását. Kóros körülmények között az apoptotikus kaskádok patológiás aktiválása neuroanatómiai rendellenességekhez és esetleg fejlődési fogyatékoságokhoz vezethet.

Az apoptózis kimutatására több fehérjecsald is alkalmas, mint például a B-sejtes limfóma 2 fehérje (Bcl-2), P53 transzkripciós faktor, cathepsin-D lizoszómális fehérje vagy a kaspázok. A kaspázok olyan cisztein-aszparaginsav proteázok, melyek elengedhetetlen résztvevők az apoptózis végső stádiumában. Több neurodegeneratív betegség posztmortem vizsgálata során találtak emelkedett casp-3 szintet, például Alzheimer-kórnál<sup>[110]</sup>, Parkinson-kóros egyedek dopaminerg neuronjaiban<sup>[111]</sup>, autisták kisagyában<sup>[112]</sup> Siniscalco és munkatársai kimutatták, hogy autistákban többféle kaspáz aktivációja és mRNS szintje is megnövekedett az egészséges alanyokhoz képest.<sup>[113]</sup>

Egy másik állatmodell, propionsav kezelés hatására kiváltott oxidatív stresszen alapul. A propionsav olyan viselkedészavarokat válthat ki, melyek az autizmusban szenvedő embereknél is előfordulnak.<sup>[114]</sup> A propionsavval kezelt juvenilis patkányokon emelkedett casp-3 expressziót figyeltek meg.<sup>[115]</sup>

A jelen tanulmány kiindulópontja az a feltételezés volt, hogy a VTA dopaminerg neuronjai számának csökkenése, továbbá a mesotelencephalicus dopaminerg pálya növekedésének és axonvezérlésének zavara, amely a prenatálisan VPA-val kezelt állatoknál P7-nél<sup>[47]</sup> megfigyelhető, megzavarhatja a dopaminoceptív célterületekben a neuronális mintázat kialakulását.

## 2. Célkitűzések

Irodalmi adatok és munkacsoportunk korábbi eredményei alapján célul tűztük ki a mesotelencephalicus dopaminerg pályarendszer kvalitatív és kvantitatív morfológiai változásainak vizsgálatát a VPA-val kezelt állatokban, a kiinduló dopaminerg magokban, valamint a dopamint fogadó (dopaminoceptív) agyterületeken.

2.1 A dopaminerg pályarendszer eddig ismert károsodása milyen sejtszintű változásokkal jár a VPA kezelés hatására?

I.) Megfigyelhető-e fokozott sejtpusztulás (jelesül: apoptózis) a pályarendszer kiinduló területein, akár célterületein? Érintettek-e ebben a dopaminerg neuronok?

II.) A sejthalál érinthet-e sajátos neuron-populációt, különösképpen a kalciumkötő fehérje tartalmú neuronokat.

III.) Célul tűztük ki a prenatális VPA expozíciót követő apoptotikus és sejtszintű változások (kalciumkötő fehérjék expressziója) és a lehetséges regeneratív folyamatok időbeli követését.

IV.) A mesotelecephalicus pálya kiinduló területein megfigyelhető-e a TH<sup>+</sup> (mint dopamin-marker), valamint CR<sup>+</sup> és CB<sup>+</sup> (kalciumkötő fehérjék) együttes sejtszintű előfordulása (perikariális kolokalizáció)?

2.2 A mesotelencephalicus dopaminerg pálya redukciója okoz-e változásokat egyes dopaminoceptív célterületek szinaptikus kapcsolataiban a prenatális VPA expozíciót követően?

V.) Célul tűztük ki egy szinapszis-specifikus proteint, a szinaptofizint, TH fehérjével korrelált változásainak vizsgálatát (a NAc és CPU területén) proteomikai (western blot) módszer alkalmazásával.

VI.) Kvantitatív morfometriai, megközelítéssel elemezni kívántuk egyes dopaminoceptív területeken (NAc, TO) a bemenő TH+ dopaminerg axonok (mint preszinaptikus elem) és a kalciumköötő fehérjét (CB, CR) tartalmazó neuronok (mint posztszinaptikus elem) közti szinaptikus kapcsolatok változásait.



### 3. Módszerek

#### 3.1 Kísérleti állatok

A kísérletek elvégzéséhez C57BL/6 törzsből származó egereket használtunk. A kísérletek egy részéhez előre vemhesített 6 hetes egereket használtunk (Janvier Laboratórium, Franciaország), míg a másik részéhez 10 hetes szűz nőstény egereket pároztattunk (a különböző eljárások alkalmazása csupán anyagi okok következményei). A pároztatás során a hímeket 24 órára külön dobozokba helyeztük, majd 2-2 nőstényt helyeztünk melléjük 12 órára. A hímek eltávolítása után, többszöri súlyellenőrzést végeztünk a vemhesség bizonyítására. Az állatokat  $21 \pm 2$  °C közötti hőmérsékleti- és automatikusan szabályozott fényviszonyok (12 óra világos- és sötét ciklusok) között korlátlan hozzáféréssel táplálékhoz és vízhez. A vemhesség 13,5. napján az anyák felének 500 mg/testtömeg-kg valproinsavat (Convulex 100 mg/ml koncentrációjú 5 ml-es ampullák) (VPA-kezelt csoport), a másik felének fiziológiás sóoldatot (0,9%-os nátrium-klorid oldat) (kontroll csoport) adtunk intraperitoneálisan vagy subcutan a tarkótájékon. Az alkalmazott dózist és a beadás időpontját irodalmi adatok alapján határoztuk meg. <sup>[45]</sup> A születés után a kölykök az anyákkal maradtak 7 napos (P7) korukig. A hosszútávú VPA hatás vizsgálatához olyan kölyköket használtunk, amelyeket a 4. hét után választottunk el az anyjuktól, ivaronként külön tartva 60 napos (P60) korukig. Esetenként azonos kísérletben alomtársakat is használtunk. Az állatok korábban semmilyen más kísérleti eljárásban nem vettek részt.

#### 3.2 Hisztológiai előkészítés

##### 3.2.1 Perfúzió

A transzkardiális perfúziót megelőzően az állatok altatását 50 mg/ml ketamin- és 20 mg/ml xilazinból készült altatókoktél (2:1 keverék; állatoként 0,2 ml) intraperitoneális injekciójával biztosítottuk (Állatkísérleti engedély: XIV-I-001-2269-4/2012). A szív bal kamráján keresztül kanült vezetünk az aortába; először átmostuk az állatok érrendszerét 20 ml foszfát puffer sóval (PBS), majd 4 °C-os 4%-os

paraformaldehid-oldattal (PFA) fixáltuk a szöveteket. A perfúzió után a kivett agyakat 48 órán keresztül utófixáltuk PFA oldatban, majd felhasználásig 0,1%-os nátrium-azidos PBS-ben tároltuk 4°C-on.

### 3.2.2 Szabadon úszó metszetek előkészítése

Az immunhisztokémiai megfigyelésekhez használt agyakat a metszést megelőző 2 napban 0,1%-os Na-azidos PBS-ben kihígított 30%-os cukoroldatba (szacharóz) helyeztük. Az üveg aljára süllyedt agyakból 30 µm vastagságú koronális metszeteket készítettünk Leica SM2000R fagyasztó szánka mikrotóm segítségével. Az agyakat 6 sorozatban tároltuk 0,01%-os Na-azidos PBS-ben 4 °C-on.

### 3.2.3 Paraffinos metszetek előkészítése

A formalinban tárolt agyakat alaposan átmostuk desztillált vízzel. A beágyazáshoz felszálló alkoholsorban (50%, 70%, 80%, 96% és abszolút alkohol) áztattuk az agyakat 30-30 percen keresztül. Ezt követően az agyakat réz-szulfátos abszolút alkoholban mostunk kétszer 1 órát, mely leitatása után 10 perces metil-benzoát kezelés követett. Az agyakat végül a teljes víztelenítés céljából xilollal kezeltük kétszer 10 percig, majd kiöntőformába helyezve kitöltöttük paraffinnal. Az így létrejött paraffin-blokkokat Leica RM2235 manuális rotációs mikrotóm segítségével 10 µm vastagságú koronális vagy szagittális metszeteket készítettünk, melyeket tárgylemezre húztunk fel.

## 3.3 Immunhisztokémia

A kontroll és a VPA-kezelt állatokból származó mintákat minden esetben egyidejűleg, ugyanazon reagensekkel, megegyező mennyiségű adagokkal, azonos körülmények között kezeltük.

### 3.3.1 Paraffinba ágyazott minták festése

A metszeteket tárgylemezeken történő deparaffinálását követően megfestettük. 3x10 percig PBS-ben mostuk a metszeteket, majd 0,3%-os PBS-ben kihígított H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oldattal kezeltük 20 percen át. A 3x10 perces mosás után, az antitestek aspecifikus bekötődését megelőzve, blokkoltuk a mintákat PBS-ben hígított 5%-os normál kecskeszérummal (NGS). Ezt követően 0,1%-os Triton-X-100-as PBS-ben kihígított primer antitestekkel inkubáltuk a metszeteket 2 órán keresztül (lásd 1. táblázat). A primer eltávolítása után mostuk a metszeteket 3x10 percig PBS-ben, majd PBS-ben hígított szekunder antitestekben inkubáltunk azokat. Az 1 órás inkubációt követően 2x10 percig PBS-ben, majd 1x 10 percig TRIS-ben mostuk a tárgylemezeket. A metszetekre ezután 1:500 arányban TRIS-ben hígított avidin-biotin komplexet (ABC-komplex) helyeztünk egy órára. Az immunjelölés előhívó oldata TRIS-ben kihígított 3-diaminobenzidin-t (DAB) és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t tartalmazott. Bizonyos metszeteken az immunhisztokémiai festés után Nissl-festést is alkalmaztunk.

1. táblázat A paraffinba ágyazott metszetek immunhisztokémiai eljárása során használt antitestek

<b>Antitest</b>	<b>Mely fajban termelt</b>	<b>Alkalmazott hígítás</b>	<b>Gyártó</b>	<b>katalógus-szám</b>
anti-TH	nyúl	1:500	Merck Millipore	AB152
anti- NF	patkány	1:800	ABCAM	AB9034

### 3.3.2 Szabadon úszó metszetek immunfestése

A 7 napos egerek koronális metszeteit az apoptózis kimutatására alkalmas Casp-3 antitesttel kezeltük. Ezt kombináltuk calretinin (CR), calbindin-28K (CB) és dopamin- és DARPP-32 antitestekkel is (medium spiny neuronok kimutatása céljából <sup>[63]</sup>), kettős immunhisztokémiai elemzéshez. A P7 napos egerek koronális metszeteit tirozin-

hidroxiláz (TH) antitesttel is megfestettük, kombinálva az ebben a korban jól kifejeződő CR és CB antitestekkel.

A hosszútávú hatások vizsgálatához a 60 napos egerek esetében szintén elvégeztük a CB és a 7 napos korban még nem expresszáldó parvalbumin (PV) egyszeres immunhisztokémiát.

Mindegyik esetben hasonló volt az alkalmazott technikai eljárás. A szabadon úszó metszeteket 3x 10 percig mostuk PBS-ben, majd 20 percig 0,3%-os PBS-ben kihígított H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oldattal kezeltük. Az ezt követő 3x 10 perc mosás után 30 percig blokkoltunk a metszeteket 5%-os normál kecskeszérummal (NGS) elkerülve az antitestek aspecifikus kötődését (a DARPP32 és a TH festéseknél ehelyett normál lószérumot (NHS) használtunk az egész eljárás során). Ezután a megfelelő kombinációjú primer antitestekkel (lásd 2. táblázat) inkubáltuk a metszeteket 24 órán keresztül PBS-ben oldott 0,3%-os Triton-X-100-ban (növelve a membrán permeabilitását) és 1%-os NGS-ban (NHS-ban).

2. táblázat Az immunhisztokémia során felhasznált primer antitestek

<b>Primer antitest</b>	<b>Mely fajban termelt</b>	<b>Alkalmazott hígítás</b>	<b>Gyártó</b>	<b>LOT szám</b>
anti-Casp-3	nyúl	1:1000	Bioworld Technology	CN89330
anti-CR	csirke	1:1000	Thermo Fisher Scientific	22024
anti-CB	csirke	1:1000	Thermo Fisher Scientific	22654
anti-PV	csirke	1:1000	Thermo Fisher Scientific	22579
anti-TH	nyúl	1:1000	Merck Millipore	3870479
anti-DARPP32	kecske	1:1000	RD Systems	XHG0320061

Másnap 3x 10 perces PBS mosást követően 1 órára PBS-ben kihígított, megfelelő kombinációjú fluoreszcens szekunder antitestekkel (lásd 3. táblázat) inkubáltuk a metszeteket, sötétben tárolva.

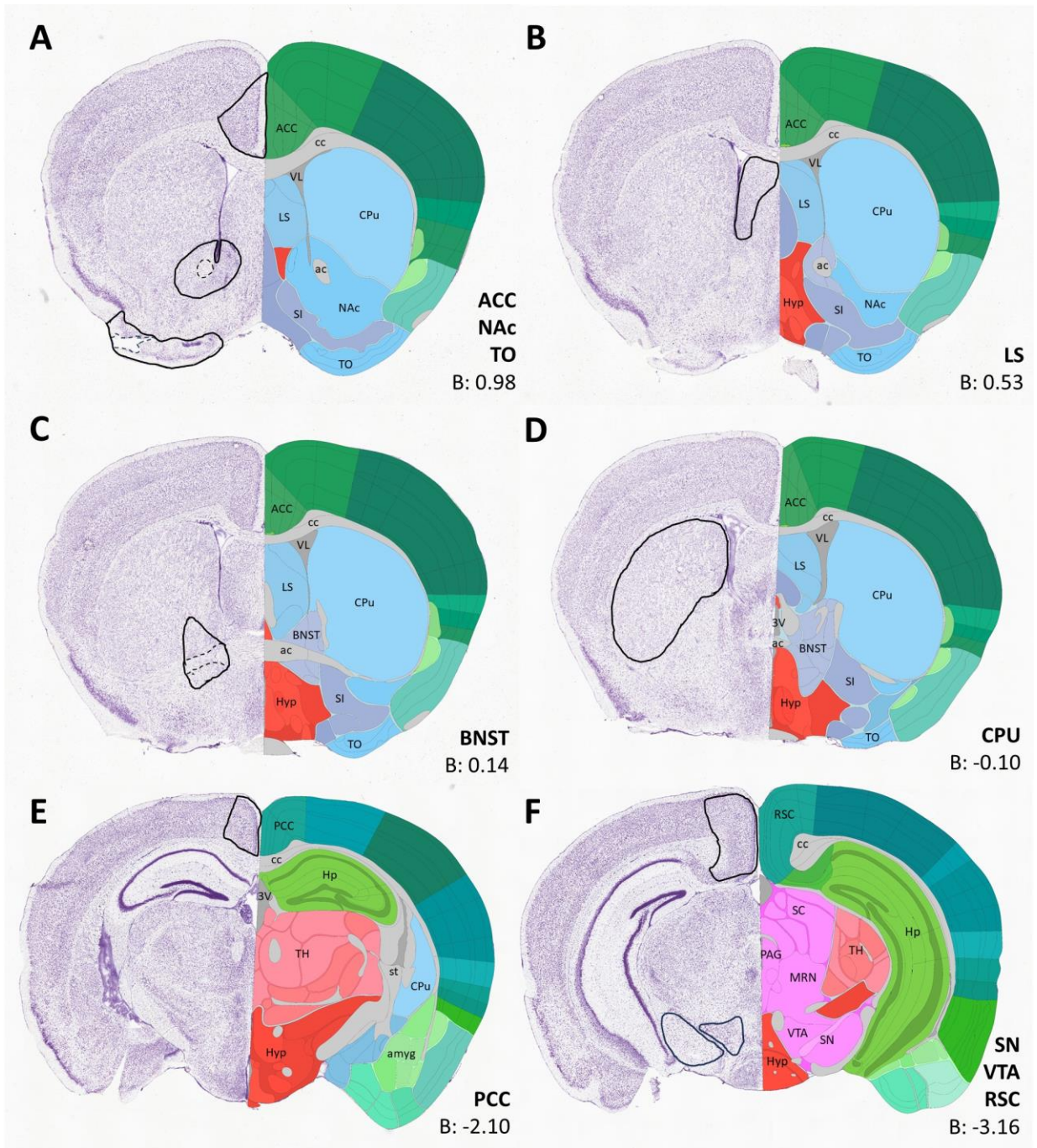
### 3. táblázat Az immunhisztokémia során felhasznált szekunder antitestek

<b>Szekunder antitest</b>	<b>Mely fajban termelt</b>	<b>Alkalmazott hígítás</b>	<b>Gyártó</b>	<b>LOT szám</b>
Alexa Flour 488 anti-nyúl	szamár	1:1000	Invitrogen	VC296619
Alexa Flour 594 anti-csirke	kecske	1:1000	Invitrogen	WA316328
Alexa Flour 488 anti- kecske	szamár	1:1000	Invitrogen	A11078

A metszeteket átmostuk PBS-ben 3x 10 percig, majd tárgylemezre húztuk. PBS-ben oldott glicerinnel (1:1) lefedtük, majd felhasználásig sötétben tároltuk.

#### 3.4 Hisztológiai analízis

A vizsgált agyterületek azonosításához az Allen Mouse Brain Atlas-t használtuk referenciaként. A 3.ábra mutatja a minták körvonalainak vetületét a koronális metszetek rostrális felszínén. A vizsgált területek mintavételi határait kézzel jelöltük ki, hogy jobban illeszkedjenek az anatómiai határokhoz, továbbá műtermékek vagy a minta szempontjából nem releváns területek (pl. agypályák) könnyen kizárhatóak legyenek.



**3. ábra: Vizsgált agyterületek kijelölése mintavételezés céljából**

A vizsgált agyterületek ábrázolása koronális metszeten. Referenciaként az Allen Mouse Brain Atlas-t használtuk. A mérésből kizárt terület szaggatott vonal jelöli.

### 3.4.1 Immunreaktív perikarionok vizsgálata

#### 3.4.1.1 Fluoreszcens mikroszkópia

A megfestett metszeteket Nikon Eclipse E800 fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk és fényképeztük 10x, 20x vagy 40x nagyítású objektívvel. A koordináták meghatározásához az Allen Mouse Brain Atlas, valamint a Paxinos és Franklin Atlas szolgált referenciaként.<sup>[116]</sup>

#### 3.4.1.2 Sejtszámlálás

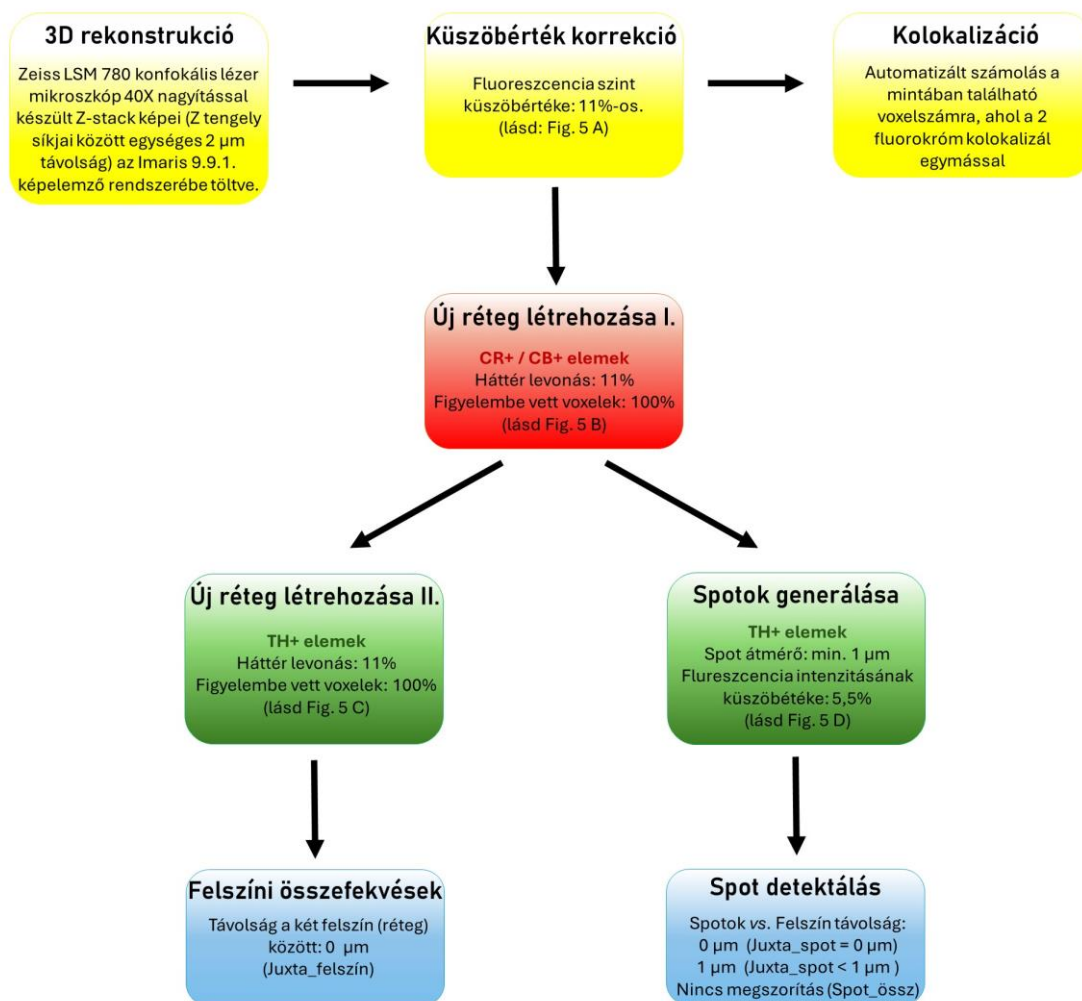
Az immunreaktív perikarionok megoszlását manuális számolással állapítottuk meg az Aperio ImageScope szoftver segítségével. Csak azokat a jelöléseket fogadtuk el sejtestnek, melyek átmérője meghaladta az 5  $\mu\text{m}$  hosszúságot vagy szélességet. A területet határoló vonalra (3. ábra) eső sejteket nem vettük figyelembe a kvantifikáció során. A kapott sejtszámokat a terület méretére ( $\text{mm}^2$ ) normalizáltuk. Az elemzéseket vakon, a kezelési csoportok ismeretének hiányában végeztük el. A számlálást egy koronális metszetre eső mindkét oldali agyfélben elvégeztük, viszont az értékeket nem átlagoltuk, hanem ismétlődő, nem független adatként számoltunk vele. Erre azért volt szükség, mivel előfordult, hogy az egyik oldal sérült volt, ilyen esetben az egyedből csak a meglévő agyfélben végeztük el a kvantifikációt.

### 3.4.2 Volumetriás denzitás és térbeli elrendeződés

A volumetriás denzitás-elemzés folyamatát a 4. ábra foglalja össze.

#### 3.4.2.1 Konfokális mikroszkópia

A preparátumok befotózásához Zeiss Jena, LSM 780 konfokális lézer mikroszkóp segítségével Z-stack képeket készítettünk 40x nagyítású objektívvel (Z koordináta kezelési csoportonként megegyező, ám területenként eltérő vastagságú (10-20  $\mu\text{m}$  között), egyes optikai síkok között egységesen 2  $\mu\text{m}$  távolsággal).



**4. ábra: A volumetriás denzitáselemzés folyamatábrája**

A nagy felbontású konfokális Z-stack képeket Imaris 9.9.1. verziójú szoftvercsomaggal elemeztük. Az Imaris program lehetővé tette a vizsgált régió belüli minták immunreaktív sejtjeinek 3D-s rekonstrukcióját. A rekonstruált képeken a koexpresszió kifejezéséhez az Imaris szoftver 'Coloc' funkcióját alkalmaztuk. A TH+ axonok, valamint a CR+/CB+ sejtestek ill. dendritjeik közötti felületi érintkezések (ún. juxtapozíciók) kvantitatív elemzésének 2 lehetséges módszere látható. Az első esetben a program a CR+/CB+ és a TH+ szerkezeti elemek burkoló felületének térbeli hálózatát generálta, majd ezen belül automatikusan lemérte és összegezte azokat a felületeket, ahol a renderelt felszínek közötti távolság 0 µm volt (Juxta\_felület). A második módszer során ('spot detection function') az Imaris program a preszinaptikus TH+ axonokból sűrűségfüggő pontszerű elemeket (puncta) generált, majd partikulum-számolással megállapította azon elemek sűrűségét, amelyek a CR+/CB+ struktúrák fentebb említett módon renderelt felszíneivel érintkeztek.



### 3.4.2.2 Juxtapozíciók mérése

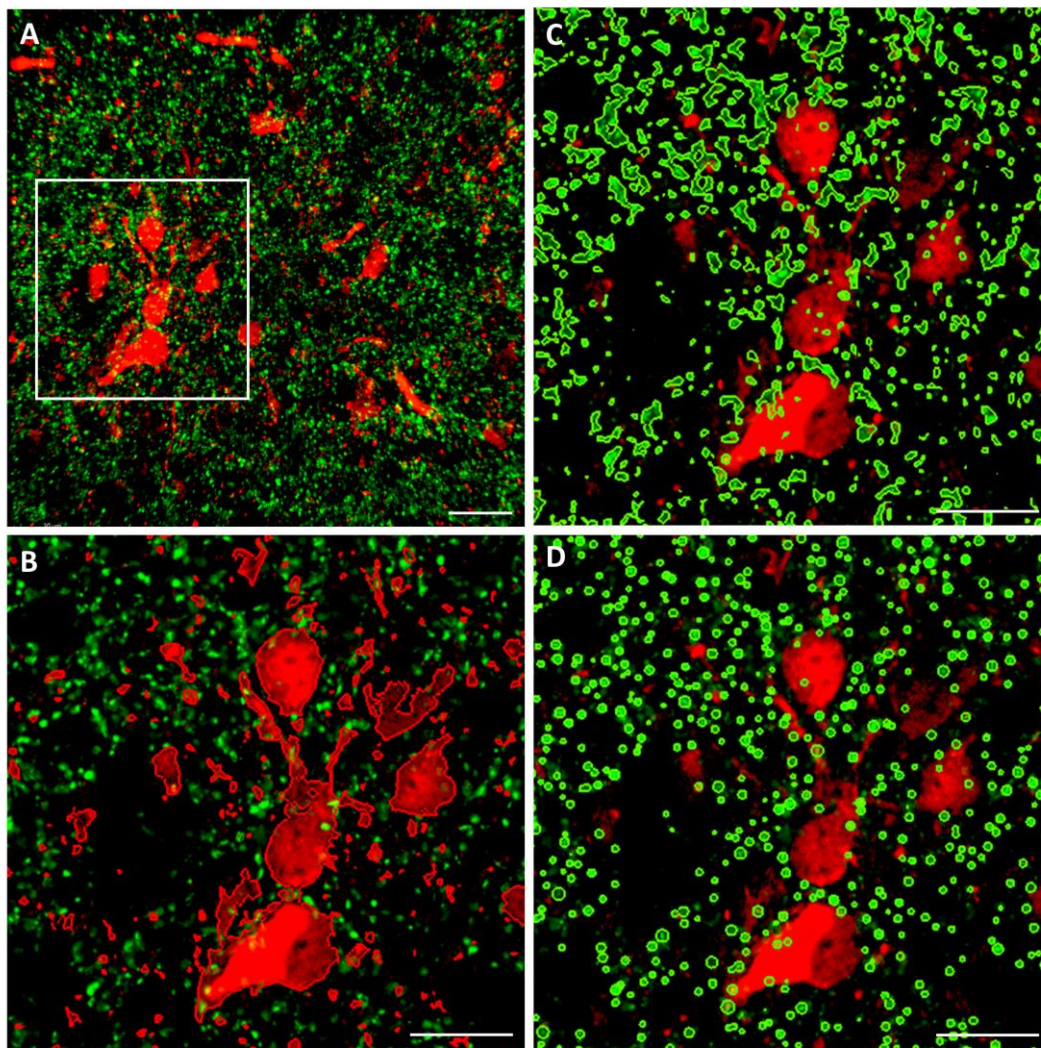
A nagy felbontású konfokális Z-stack képeket HP Z4 vezérlőrendszerű Imaris 9.9.1. verziójú szoftvercsomaggal elemeztük. A TH<sup>+</sup> axonok (mint preszinapszisok) és a CR<sup>+</sup> vagy CB<sup>+</sup> sejttestek és dendritjeik (mint posztszinapszisok) közötti felületi érintkezésének kvantitatív elemzéséhez már korábban leírt módszereket alkalmaztuk.<sup>[117,118]</sup> A vizsgált területeken megegyező méretű mérőkeretet (210 x 210 μm) helyeztünk el a koronális metszetek mindkét oldalán. Az Imaris program lehetővé tette a vizsgált régió belüli minták immunreaktív sejtjeinek 3D-s rekonstrukcióját.

Az 5. ábrán látható módon az Imaris szoftverben elérhető 2 lehetséges megközelítést alkalmaztunk a kvantitatív elemzésekhez.

Az első módszerünk esetében a CR<sup>+</sup>/CB<sup>+</sup> (5B. ábra) és a TH<sup>+</sup> (5C. ábra) szerkezeti elemek burkoló felületének térbeli hálózatát vizsgáltuk, ahol a renderelt felszínek közötti távolság 0 μm volt (Juxta\_felület). Ahhoz, hogy egységesen összehasonlíthatóak legyenek a minták, a fluoreszcens küszöbértéket a legoptimálisabb érzékelhetőségre állítottuk be, egységesen 11%-ra. Az érintkező felületek által a teljes térfogat százalékában kifejezett térfogatot automatizált 3D számítással mértük. Az automatizált számítás konzisztenciáját ellenőrizve, a TH<sup>+</sup> axonok (zöld csatorna) mellé rendeltük a CR<sup>+</sup>/CB<sup>+</sup> (piros csatorna) struktúrákat, majd ezt megfordítva, a CR<sup>+</sup>/CB<sup>+</sup> sejttestek és dendritek mellé rendelve a TH<sup>+</sup> struktúrákat azonos értékeket kaptunk, (függetlenül attól, melyik csatorna szolgált referenciaként), ami bizonyítja a képelemző szoftver megbízhatóságát.

A második módszer során egy 'spot' detektáló funkciót alkalmaztunk a preszinaptikus TH<sup>+</sup> axonok azonosítására (5D. ábra). Csak azokat az immunpozitív jeleket vettük figyelembe, melyek elérték vagy meghaladták az 1 μm átmérőt, egységesen 5,5%-os fluoreszcencia intenzitás küszöbérték mellett. A program automatikusan leszámolta a kritériumoknak megfelelően generált pontszerű elemeket (Spot\_össz). A TH<sup>+</sup> axonok ('spot') és a CR<sup>+</sup> vagy CB<sup>+</sup> sejttestek, illetve dendritjeik 3D-s rekonstrukcióval renderelt felszínek közötti juxtapozíciók kvantifikálásához közvetlen vagy perem-érintkezést feltételezve, a felületek közötti távolságot 0 μm-re (Juxta\_spot = 0 μm), vagy 1 μm-re (Juxta\_spot < 1 μm) állítottuk be.

Az azonos sejten belüli kolokalizáció (koexpresszió) kimutatására az Imaris szoftver 'Coloc' funkcióját alkalmaztuk.<sup>[119]</sup> Ez a módszer lehetővé tette a kolokalizált voxelek leszámolását, ezáltal százalékosan meghatározhattuk a TH<sup>+</sup> és CR<sup>+</sup> vagy TH<sup>+</sup> és CB<sup>+</sup> jelölések együttes kifejeződését az adott mintavételi ablakban.



### 5. ábra: Juxtapozíciók mérése

Reprezentatív konfokális Z-stack képek az Imaris 9.9.1 programban. A: mintavételi ablak, melyben a kvantitatív elemzéseket végeztük a vizsgált célterületeinkben (NAc és TO) mutatja a további képen kinagyított régió elhelyezkedését (fehér négyzet); B: CB<sup>+</sup> (piros csatorna) szerkezeti elemek renderelt burkoló felületének kijelölése; C: TH<sup>+</sup> (zöld csatorna) immunpozitív elemek burkoló felületének kijelölése; D: 'Spot' detektálás a TH<sup>+</sup> axonok (zöld csatorna) azonosítására. Skála: 30  $\mu$ m

### 3.5 Immunoblot (Western blot)

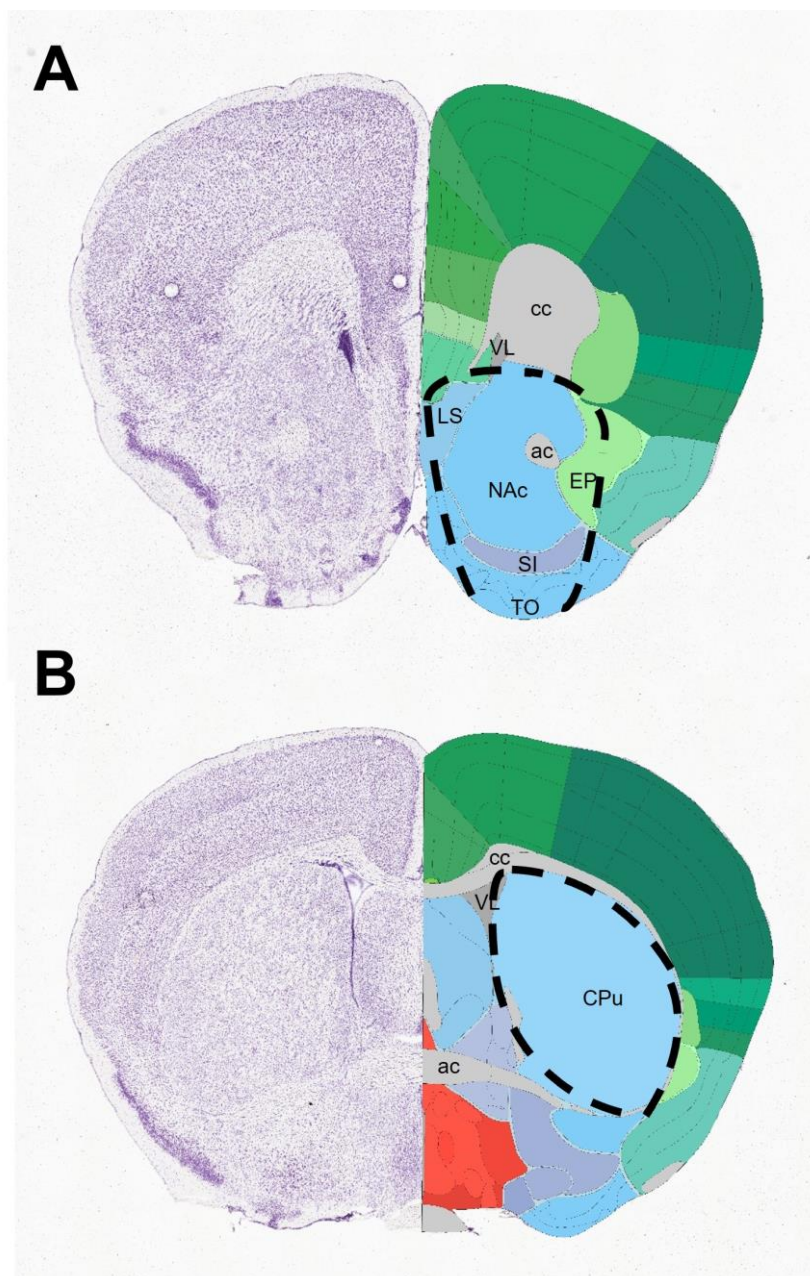
Az immunoblothoz 22 vegyes ivarú, P7 napos egérkölyköt használtunk fel.

#### 3.5.1 Agyminták disszekciója

A fixálatlan agyakat egy acél agymátrixba helyeztük, melynek segítségével megközelítőleg azonos területről, nagyságrendileg azonos vastagságú (1 mm) koronális metszeteket készítettünk. A szeletek további preparálását jeget tartalmazó alumínium dobozon végeztük sztereomikroszkóp segítségével. 10-20 mg tömegű szövetmintákat vettünk bilaterálisan a NAc és a CPu területéről. A területek lokalizálásához az Allen Mouse Brain Atlas-t vettük alapul. A 6. ábrán látható síkok a kivett minták rostrális felszíneit mutatják. Az eltávolított NAc szövetblokkok fő részét a nucleus accumbens core és shell része tette ki, de mellette tartalmazta még a septum, a bed nucleus of stria terminalis és a nucleus entopeduncularis egy részét, a substantia innominata-t, a tuberculum olfactorium-ot és a commissura anterior-t. A CPu-ként eltávolított szövetblokk továbbá tartalmazta még a pallidum externum egy részét a capsula interna rostjaival. A disszekált mintákat előre mérlegelt Eppendorf csövekbe helyeztük, a bilaterális mintákat egyként kezelve, majd felhasználásig száraz jégen, azt követően pedig -80 °C-os fagyasztó hűtőben tároltuk.

#### 3.5.2 Western blot és elektroforézis

A mintákat 4 °C-os, pH 8.0 lizáló pufferben (150 mM NaCl, 1%-os 4-nonilfenil-polietylén-glikol (NP40), 0,5%-os nátrium-dezoxikolat, 0,1%-os nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 50 mM Tris) homogenizáltuk. Ezt követően 10 percig 4 °C-on 1200 fordulatszámon centrifugáltuk a mintákat, hogy a fehérjetartalom szétváljon a nehezebb sejtes alkotóktól, közte a mag-frakciótól. A felülúszót átpipettáztuk új Eppendorf csövekbe, majd 15000 fordulatszámon újra centrifugáltuk 20 percen keresztül, 4 °C-on. A durva szinaptoszóma-frakciót tartalmazó üledéket oldottuk fel és használtuk fel a továbbiakban. Ezt követően az összes mintát azonos fehérjekoncentrációra hígítottuk (1,25 µg/µl), amit a Bio-Rad iMark Microplate Reader segítségével állítottunk be.



**6. ábra: A western blothoz használt NAc (A) és a CPu (B) agyminták lokalizációja**

A mintavétel során kivett területek körülbelüli körvonalai láthatók a szövetblokkok rostrális felszínére vetítve. A mintavételezés alapját az Allen Mouse Brain Atlas koronális metszetsora képezte. Az eltávolított NAc szövetblokkok fő részét a nucleus accumbens (NAc) tette ki, de mellette tartalmazta még a septum laterális részét (LS), a bed nucleus of stria terminalis (ez a rostrális síkon nem látható) és a nucleus entopeduncularis (EP) egy részét, a substantia innominata-t (SI), a tuberculum olfactorium-ot (TO) és a commissura anterior-t (ac). A CPu-ként eltávolított szövetblokk továbbá tartalmazta még a pallidum externum egy részét a capsula interna rostjaival.

A mintákat Laemmli pufferben (Sigma-Aldrich) oldottuk fel, majd 5 percen át, 96 °C-on hevítettük. Felhasználásig -80 °C-os hűtőben tároltuk. Bio-Rad Mini Protean III függőleges elektroforézis és blotrendszerrel segítségével a mintákat először 8%-os akrilamid gyűjtőgélre futattuk 30V feszültségnél 20 percen keresztül. Ezt követően 150 V-re növeltük a feszültséget, 1-1,5 órára, amíg a 13%-os feloldógélen kellően elkülönültek a mintasávok. Ezután a szétválasztott mintákat 0,45 µm pólusméretű, Bio-Rad nitrocellulóz membránra transzferáltuk 90 V feszültségen, 2 órán keresztül.

### 3.5.3 Immunfestés

A nitrocellulóz membránokat 7,4 pH-jú 0,05 M TBS-T (Tris-puffer sóval 0,1 %-os Triton-X-100-zal) pufferben kihígított 5%-os zsírszegény tejben inkubáltuk 1 órán át 22 °C-os hőmérsékleten. Ezt követően anti-syn, anti-TH és anti-β-aktin primer antitestek keverékével (lásd 4. táblázat) inkubáltuk a membránokat 24 órán át 4 °C-on, melyet 1%-os zsírszegény tejben kihígítottunk ki. Másnap 3x10 percig mostuk a membránokat PBS-ben. A mosást követően 1 órára szekunder antitestek keverékében inkubáltuk (lásd 3. táblázat). A blotokat lumineszcens detektálórendszerrel (Bio-Rad ChemiDoc MP) kvantifikáltuk, majd az adatokat β-aktinra standardizáltuk. Az analízist az ImageLab szoftver segítségével végeztük.

4. táblázat Az immunoblot során felhasznált primer és szekunder antitestek

<b>Antitest</b>	<b>Mely fajban termelt</b>	<b>Alkalmazott hígítás</b>	<b>Gyártó</b>	<b>LOT szám</b>
anti-syn	egér	1:1000	DAKO	177857
anti-TH	nyúl	1:5000	EMD Millipore	7923458
anti- β-aktin	egér	1:10000	Cell Signaling Technology	660091
Alexa Flour 488 anti-nyúl	szamár	1:1000	Invitrogen	VC296619
Alexa Flour 594 anti-egér	szamár	1:1000	Invitrogen	WC198325

### 3.6 Statisztikai analízis:

Az eredmények statisztikai elemzéséhez a koronális metszetek bilaterálisan leszámolt vagy lemért adatait dolgoztuk fel a R Studio statisztikai program segítségével. A két oldal értékeit nem átlagoltuk (így a grafikonokon is külön adatpontokként jelenítettük meg), mert előfordult, hogy a koronális metszet egyik oldala sérült volt. Az analízis során az azonos metszet két oldalán mért adatokat nem kezeltük statisztikailag függetlenként. Esetenként azonos kísérletben, azonos kezelési csoportban (kontroll vagy VPA) alomtársak is szerepeltek, melyeket az állatazonosítók mellett szintén random faktorként illesztettük a modellbe az elemzés során. Mivel az adatpontok eloszlása az adott területeken nem egyenletes, a kezelés hatásainak meghatározásához negatív binominális regresszió alapuló általánosított lineáris kevert modellt (generalized linear mixed model) alkalmaztunk, az adatok logaritmikus transzformációját követően.<sup>[120]</sup>

## 4. Eredmények

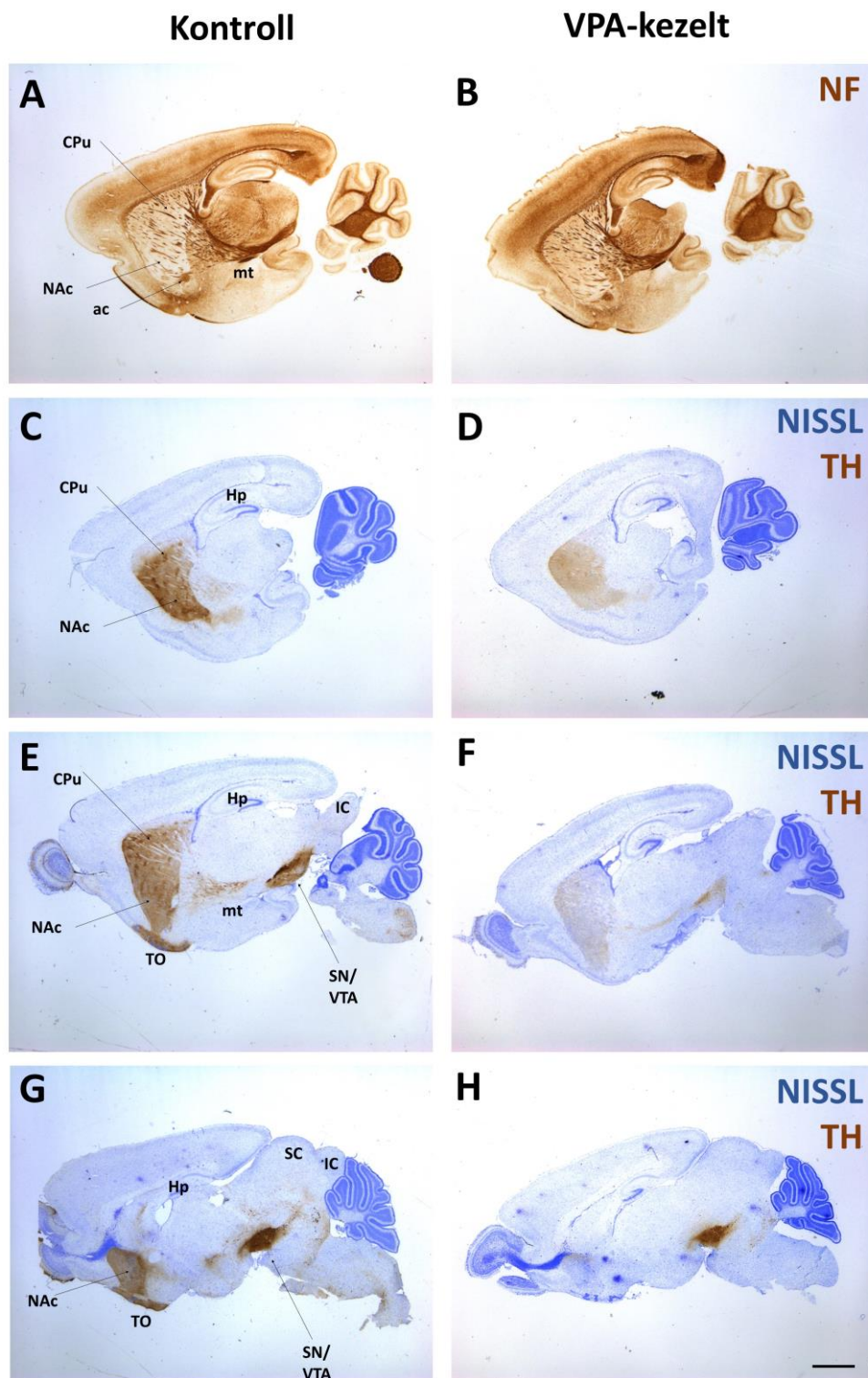
### 4.1 A mesotelencephalicus pálya defasciculációját követő változások a subpalliumban

Kutatócsoportunk által korábban leírt és közölt eredményekkel összhangban <sup>[47]</sup>, a VPA-val kezelt P7 napos egérkölykök paraffinba ágyazott szagittális metszetein is megfigyelhető volt a TH<sup>+</sup> mesotelencephalicus dopaminerg pálya felritkulása és jelszegényebb megjelenése, valamint annak subpallialis célterületeiben (CPu és NAc) a festődés intenzitásának csökkenése (7C-H. ábra). Mindemellett az egyik leglátványosabb TH-jelölésbeli változást, mely a korábban leírtakban még nem hangsúlyoztuk, a TO területén találtuk meg, ahol már kis nagyításban is feltűnik a TH immunreaktivitás erős csökkenése. Fontos kiemelni, hogy míg a mesotelencephalicus pálya területén futó TH<sup>+</sup> rostok mennyisége szemmel láthatóan lecsökkent és a lefutásuk szórtabb lett, addig az általános neuron-markerként használt NF (7A-B. ábra) nem mutatott eltérést a kezelési csoportok között, sem a tractus mesotelencephalicus, sem más jelentősebb agypályák esetében. Ez az észlelet a TH<sup>+</sup> dopaminerg axonok szelektív redukciójára (vagyis nem általános pályakárosodásra) utal a VPA-val kezelt csoportban.

### 4.2 Sejtszintű változások a VPA kezelés hatására

#### 4.2.1 Apoptózisbeli változások

Korábban leírt <sup>[47]</sup> eredmények, valamint a dopaminerg rostozat és bemenet fentebb, paraffinos metszeteken is illusztrált, csökkenése miatt, mint lehetséges következmény, elemeztük a neuronális degenerációt (apoptózist) a mesotelencephalicus pálya fő célterületein (NAc, CPu), kiegészítve más pallialis (ACC, PCC, RSC), subpallialis (LS, BNST) régiókkal, valamint a dopaminerg pálya középagyú eredő területein (VTA, SN). A Casp-3-t expresszáló immunpozitív perikarionok denzitását a terület méretének függvényében <sup>[121]</sup> összehasonlítottuk a kontroll és a VPA kezelt P7 napos egerekben.

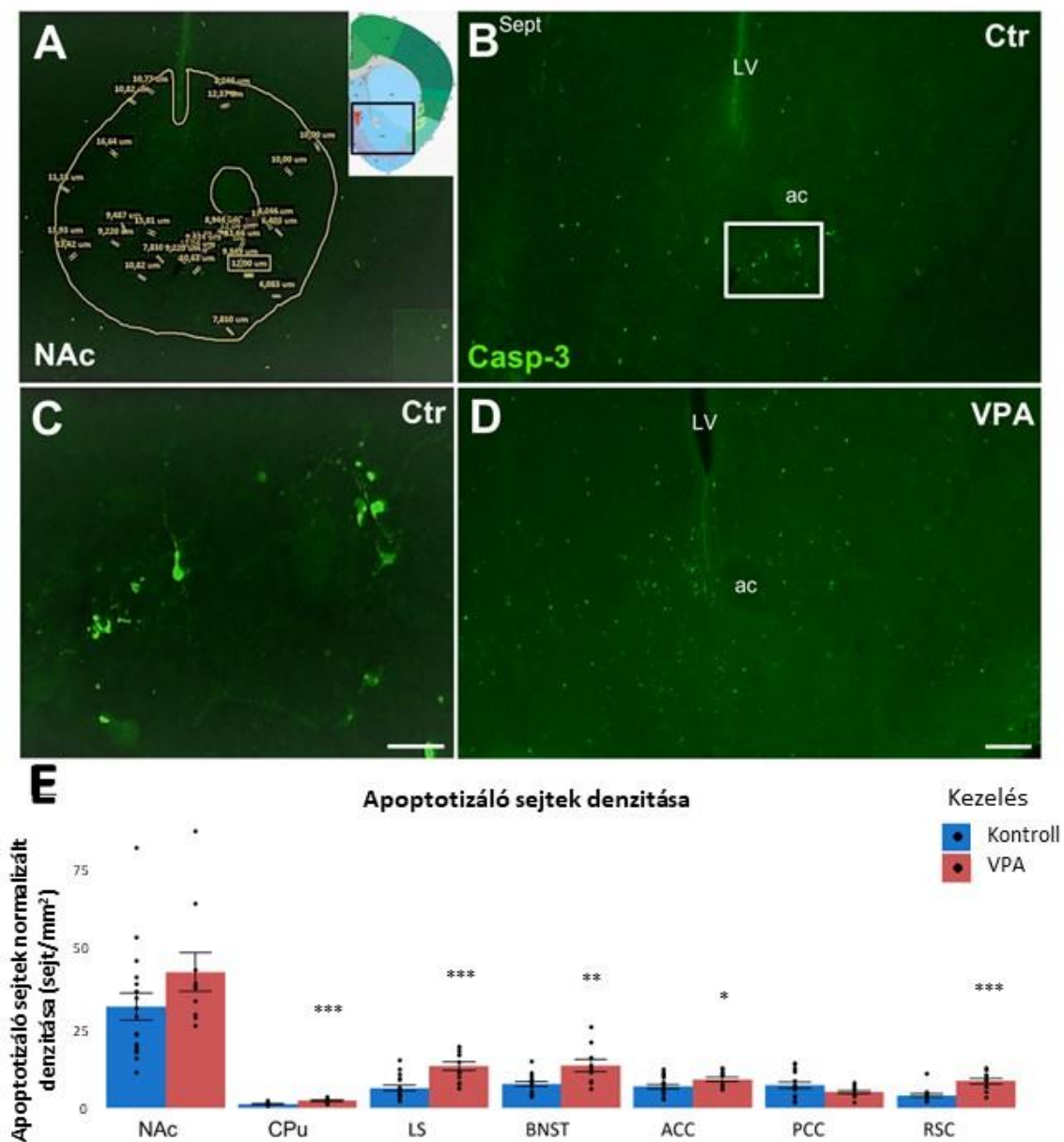


**7. ábra: Reprezentatív paraffinos szagittális metszetek P7 napos egerekből**

Kontroll és VPA kezelt P7 napos egerek szagittális metszeteinek reprezentatív sorozata neurofilament (NF) (A - B), valamint tirozin-hidroxiláz (TH) immunjelöléssel és Nissl (C-H) festéssel. A VPA kezelésnek kitett állatokban a TH jelölés ritkább mind a mesotelencephalikus pálya (mt), mind pedig annak cél régióiban (NAc, CPu). A legszembetűnőbb TH-jelölésbeli hiányt a TO területén találjuk. Skála (A-H): 1 mm.



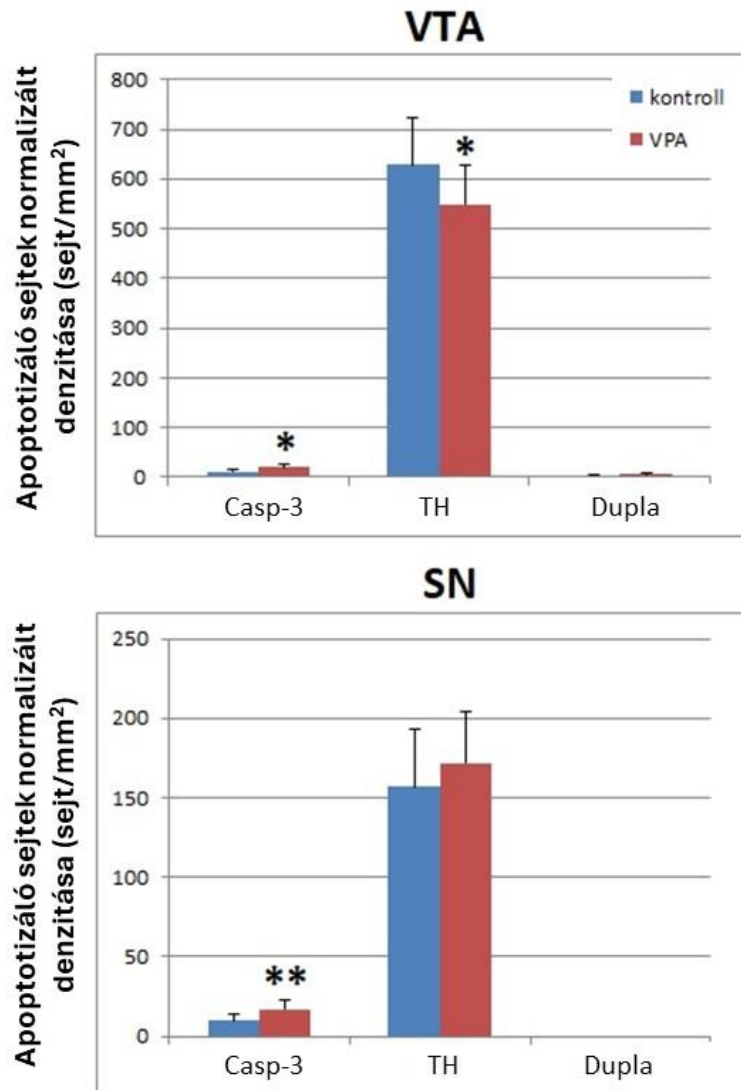
A P7 napos egerek apoptózis szintje általánosan magas ebben a korban, hiszen ilyenkor zajlik a központi idegrendszer második posztnatális apoptotikus hulláma.<sup>[122]</sup> Ezen belül, az általunk vizsgált területekben, valproinsavval kezelt egerekben a Casp-3-mal kimutatott apoptotikus sejtek regionális sűrűsége megnövekedett a kontroll csoportéhoz képest (8. ábra). A területeken az apoptotikus sejtek eloszlása esetenként nem volt homogén, ezért a statisztikai elemzéshez negatív binominális próbát alkalmaztunk, melyben az alomtársakat random faktorként kezeltük. A legkiemelkedőbb növekedést a vizsgált subpallialis területek közül a BNST ( $p=0,0038^{**}$ ,  $n = \text{kontr: } 17$ , VPA: 10), a LS ( $p=0,00029^{***}$ ,  $n = \text{kontr: } 17$ , VPA: 12), valamint a CPu ( $p=0,0008^{***}$ ,  $n = \text{kontr: } 19$ , VPA: 10) mutatta, míg a NAc területén a tendencia hasonló, ám nem szignifikáns a változás ( $p=0,314$ ,  $n = \text{kontr: } 17$ , VPA: 10). Ezt erősíti az alábbi eredményünk is, ahol a CPu kvadránsokra osztása során (dorsolaterális: DL ( $p=0,0009^{***}$ ,  $n = \text{kontr: } 20$ , VPA: 12), dorsomedialis: DM ( $p=0,0002^{***}$ ,  $n = \text{kontr: } 20$ , VPA: 12), ventrolaterális: VL ( $p=0,0006^{***}$ ,  $n = \text{kontr: } 19$ , VPA: 10), ventromediális: VM ( $p=0,016^{*}$ ,  $n = \text{kontr: } 19$ , VPA: 10); itt a legalacsonyabb p-értéket a ventromedialis kvadránsban találtuk, mely a legközelebb esik a NAc területéhez. A kortikális vizsgálatok során a Casp-3<sup>+</sup> sejtek denzitásának szignifikáns növekedést tapasztaltunk a RSC-ben ( $p=0,0003^{***}$ ,  $n = \text{kontr: } 16$ , VPA: 10) és az ACC ( $p=0,027^{*}$ ,  $n = \text{kontr: } 20$ , VPA: 12) területén, ám a PCC területén nem találtunk szignifikáns változást ( $p=0,156$ ,  $n = \text{kontr: } 18$ , VPA: 12).



**8. ábra: Casp-3+ és TH+ sejtek koexpressziója**

(A–D): A reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos képek az apoptotikus (Casp-3+) sejtek eloszlását mutatják kontroll és VPA-kezelt 7 napos egerekben. A vizsgált terület (jelen esetben NAc) kijelölése referencia-atlasz képével összevetve (A). A számolásra kijelölt Casp-3+ sejtek csoportját kontroll egérben mutatja a B, nagyobb nagyításban a C panel. A kontroll mintához képest az apoptotikus sejtek nagyobb számban jelennek meg a VPA-val kezelt egér ugyanazon régiójában (D). Skála (B, D): 200  $\mu\text{m}$ , (C) 50  $\mu\text{m}$ . A csatolt diagram (E) a casp-3+ sejtek területi eloszlását mutatja az általunk vizsgált subpallialis és pallialis régiókban, összehasonlítva a kontroll és a VPA-kezelt csoportokat. Szign. szint: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

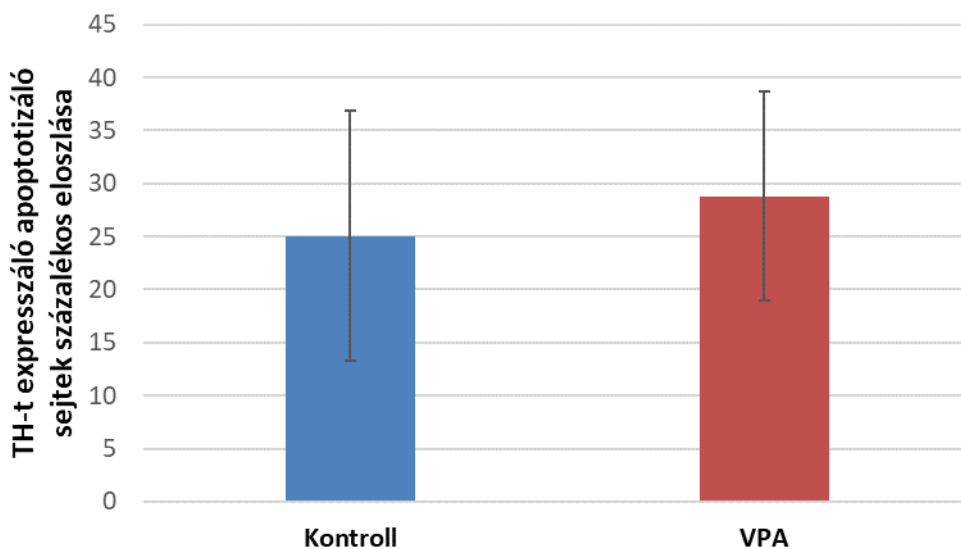
Szignifikáns növekedést találtunk az apoptózis tekintetében a VPA-nak kitett állatokban a mesotelencephalicus pálya kiinduló területeiben, a VTA-ban ( $p= 0.0117^*$ ,  $n=$  kontr: 10, VPA: 11) és a SN-ban ( $p= 0.00738^{**}$ ,  $n =$  kontr: 12, VPA: 11) (9. ábra).



**9. ábra: VTA és SN területi Casp-3+ és TH+ sejtek eloszlása és átfedése**

A VTA és a SN területén az apoptotizáló sejtek száma szignifikánsan nőtt a VPA-val kezelt P7 napos egerekben a kontroll csoportokhoz képest. A VTA területén a TH a VPA kezelés hatására szignifikánsan csökkent. A Casp-3 csak a VTA területén mutatott koexpressziót a TH-val. Szign. szint: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Ezeken a közepagy kiinduló területeken a sejttestek jelentős része dopamint tartalmaz (TH<sup>+</sup>), ezért megvizsgáltuk, hogy a casp-3 pozitív sejtek hány százaléka TH pozitív is egyben. A VTA területén a kontroll csoportban 25,07%-ban, míg a VPA-val kezelt csoportban 28,04%-ban TH pozitívak az apoptotizáló sejtek. A kezelési csoportok között nincs szignifikáns különbség (10. ábra). A SN területén az apoptotizáló sejtek nem fedtek át a tirozin-hidroxilázt expresszáló sejtekkel (9. ábra).



**10. ábra: Casp-3-t expresszáló sejtek átfedése a TH pozitív sejtekkel**

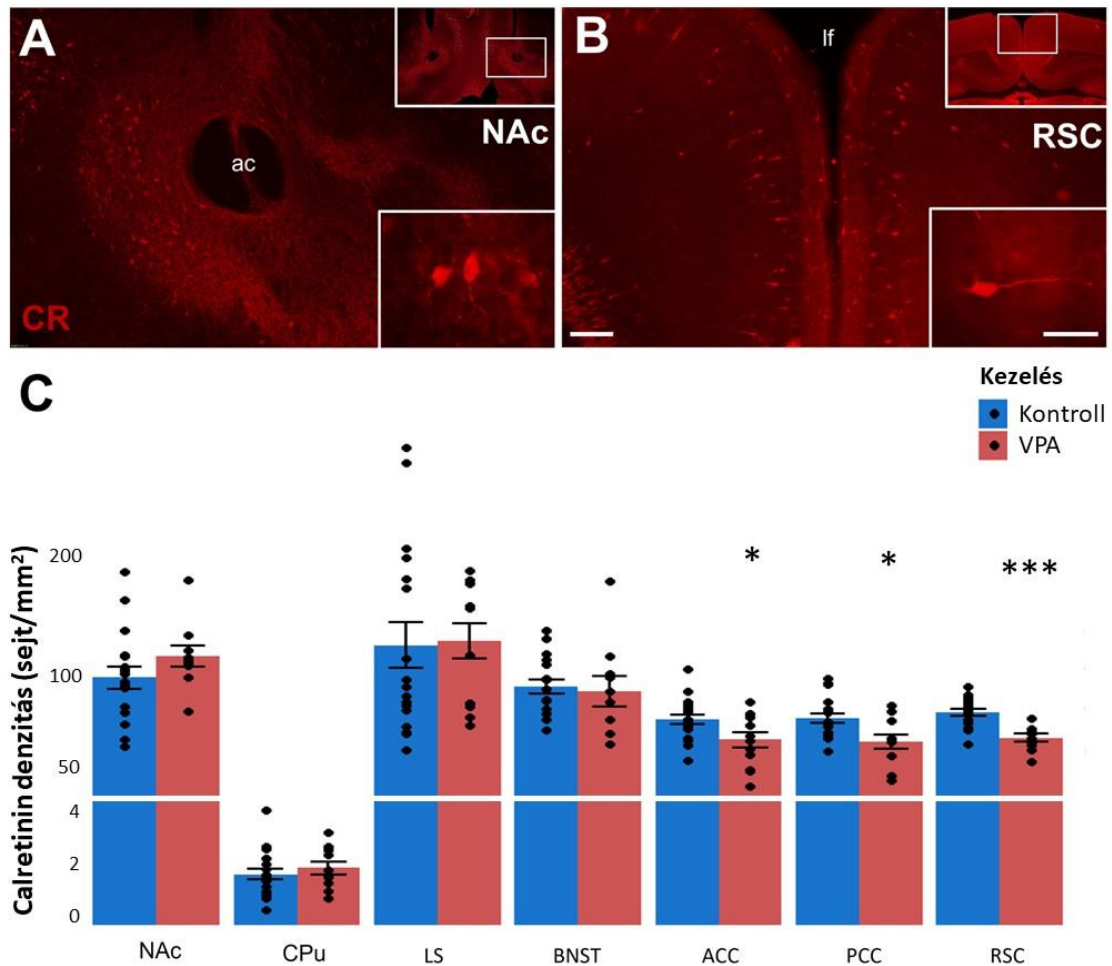
A VTA területén az apoptotizáló sejtek egy része tirozin-hidroxilázt is expresszál. A VPA-nak kitett P7 napos egerek nem különböztek a kontroll csoporttól, tehát az apoptotizáló sejtek változása nem specifikus a TH<sup>+</sup> sejtekre.

#### 4.2.2 A kalciumkötő fehérjék változása

Az apoptózis vizsgálatok során talált változások indokolták a potenciálisan neuroprotektív fehérjék expressziójának vizsgálatát. A kalciumkötő fehérjék (calretinin, calbindin-D28k, valamint parvalbumin) eloszlását 2 különböző korosztályban vizsgáltuk, több pallialis és subpallialis régióban, kontroll és VPA-val kezelt állatokban. Mivel a PV még nem expresszálódik 7 napos korban, ezért ennek eloszlását posztnatális 60 napos korban vizsgáltuk. Az összehasonlíthatóság kedvéért a calbindin eloszlásának vizsgálatát is mindkét korosztályban elvégeztük.

#### 4.2.2.1 A kalciumkötő fehérjék vizsgálata 7 napos egerekben

A calretinin immunreaktív sejtek eloszlása nem változott szignifikánsan a kezelés hatására a vizsgált subpallialis területeken; NAc ( $p=0,406$ ,  $n = \text{kontr: } 17, \text{VPA: } 10$ ), CPu ( $p=0,286$ ,  $n = \text{kontr: } 19, \text{VPA: } 10$ ), LS ( $p=0,905$ ,  $n = \text{kontr: } 17, \text{VPA: } 10$ ).

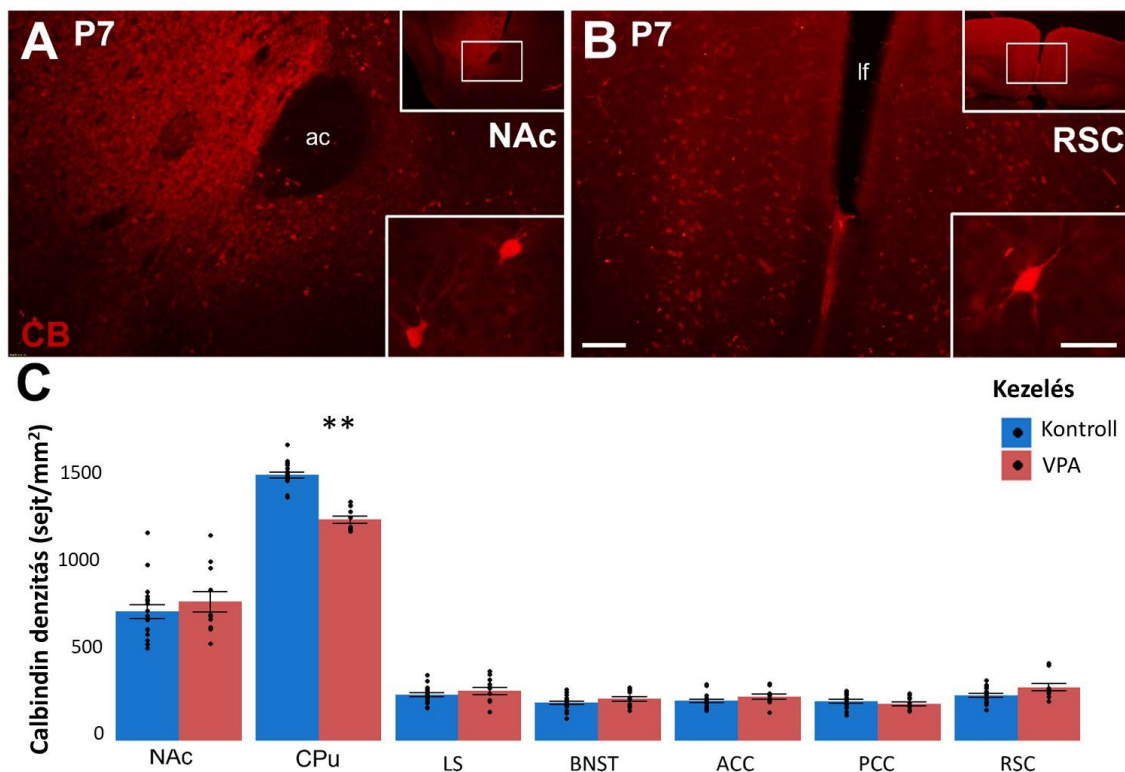


**11. ábra: Calretinin-immunreaktív sejtek eloszlása P7 napos egerekben**

A-B: reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos képek a CR<sup>+</sup> sejtek eloszlásáról a NAc és a RSC területéről P7 napos kontroll egerekben. A panelek jobb felső sarkában topogramon jeleztük a teljes képmézőn ábrázolt mérési terület (skála (A-B): 100  $\mu\text{m}$ ) pontos helyzetét a coronalis metszethez képest, míg a jobb alsó négyszögekben nagyobb nagyítással látható néhány jellegzetes immunfestett sejt (skála (A-B): 20  $\mu\text{m}$ ). A mellékelt grafikon (C) mutatja a CR<sup>+</sup> sejttestek területi sűrűségének összehasonlítását az általunk vizsgált subpallialis és pallialis területeken a VPA kezelés hatására. Szign. szint: \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

12) és BNST ( $p=0,954$ ,  $n = \text{kontr: } 17, \text{VPA: } 10$ ). A pallialis vizsgálatok során azonban a  $\text{CR}^+$  sejtek denzitásának szignifikáns csökkenését tapasztaltuk az általunk vizsgált összes kortikális területen a VPA kezelés hatására; ACC ( $p=0,05^*$ ,  $n = \text{kontr: } 20, \text{VPA: } 12$ ), PCC ( $p=0,011^*$ ,  $n = \text{kontr: } 18, \text{VPA: } 12$ ) és RSC ( $p=0,00003^{***}$ ,  $n = \text{kontr: } 16, \text{VPA: } 10$ ) (11. ábra).

Ezzel szemben, a calbindin pozitív perikarionok területi eloszlása, P7 napos korban csupán egyetlen területen, a CPu-ban ( $p=0,002^{**}$ ,  $n = \text{kontr: } 19, \text{VPA: } 10$ ), mutatott szignifikáns csökkenést a VPA expozíció hatására. Ezt további kvadránsokra



**12. ábra: Calbindin-immunreaktív sejtek eloszlása P7 napos egerekben**

A-B: reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos képek a  $\text{CB}^+$  sejtek eloszlásáról a NAc és a RSC területéről P7 napos kontroll egerekben. A panelek jobb felső sarkában topogramon jeleztük a teljes képmezőn ábrázolt mérési terület (skála (A-B):  $100 \mu\text{m}$ ) pontos helyzetét a coronalis metszethez képest, míg a jobb alsó négyzetekben nagyobb nagyítással látható néhány jellegzetes immunfestett sejt (skála (A-B):  $20 \mu\text{m}$ ). A mellékelt grafikon (C) mutatja a  $\text{CB}^+$  sejttestek területi sűrűségének összehasonlítását az általunk vizsgált subpallialis és pallialis területeken a VPA kezelés hatására. Szign. szint:  $** p < 0.01$ .

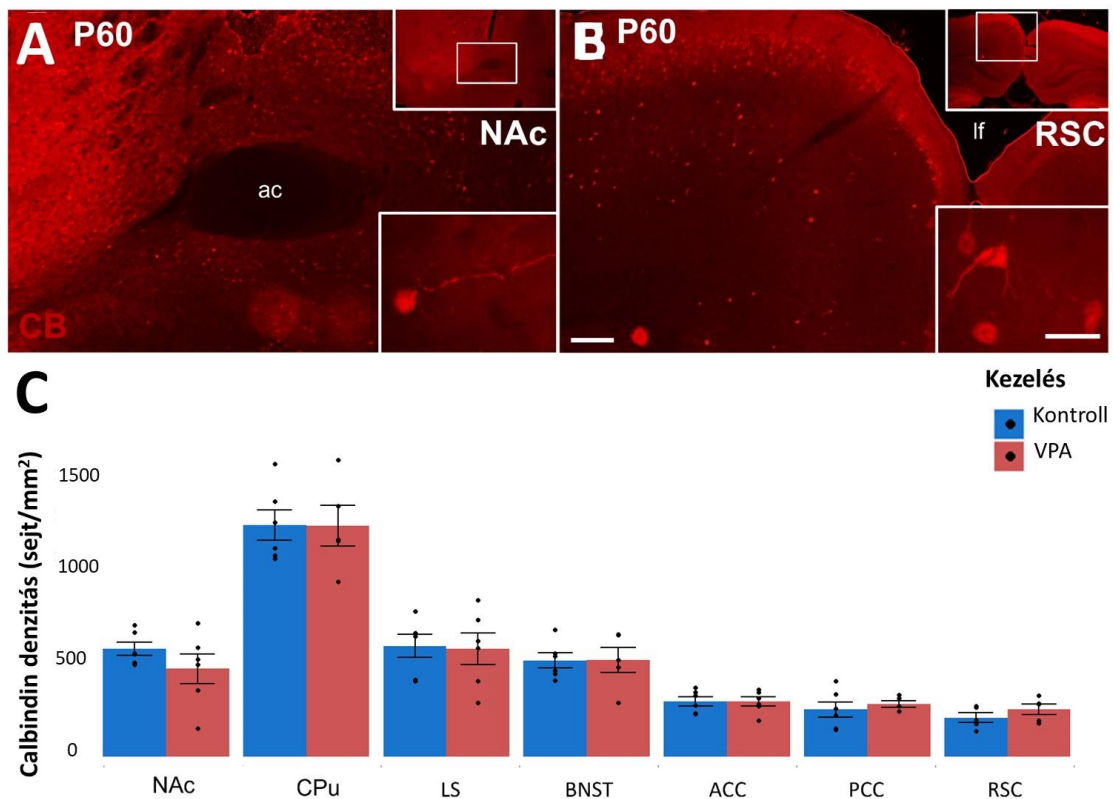
is felosztottuk; dorsolaterális: DL ( $p=0,017^*$ ,  $n = \text{kontr: } 19, \text{ VPA: } 10$ ), dorsomediális: DM ( $p=0,31$ ,  $n = \text{kontr: } 19, \text{ VPA: } 10$ ), ventrolaterális: VL ( $p=0,0002^{***}$ ,  $n = \text{kontr: } 19, \text{ VPA: } 10$ ), ventromediális: VM ( $p=0,0007^{***}$ ,  $n = \text{kontr: } 19, \text{ VPA: } 10$ ). A többi vizsgált területen változatlan maradt a  $CB^+$  perikarionok száma; NAc ( $p=0,717$ ,  $n = \text{kontr: } 17, \text{ VPA: } 10$ ), LS ( $p=0,806$ ,  $n = \text{kontr: } 17, \text{ VPA: } 12$ ) és BNST ( $p=0,780$ ,  $n = \text{kontr: } 17, \text{ VPA: } 10$ ), ACC ( $p=0,452$ ,  $n = \text{kontr: } 20, \text{ VPA: } 12$ ), PCC ( $p=0,638$ ,  $n = \text{kontr: } 18, \text{ VPA: } 12$ ) és RSC ( $p=0,137$ ,  $n = \text{kontr: } 16, \text{ VPA: } 10$ ) (12. ábra).

#### 4.2.2.2 A kalciumkötő fehérjék vizsgálata 60 napos egerekben

A posztnatális 60 napos állatokban hasonló eredményt figyeltünk meg a CB immunpozitív perikarionok területi eloszlásának vizsgálatakor, azzal a különbséggel, hogy a P7 napos korban, a CPu területén ( $p=0,854$ ,  $n = \text{kontr: } 19, \text{ VPA: } 10$ ), megfigyelt csökkenés eltűnt. A CPu kvadránsokra osztása megmutatta, hogy legjelentősebb kompenzáció a P7 napos korhoz képes a ventrális területeken történt; dorsolaterális: DL ( $p=0,901$ ,  $n = \text{kontr: } 19, \text{ VPA: } 10$ ), dorsomediális: DM ( $p=0,911$ ,  $n = \text{kontr: } 19, \text{ VPA: } 10$ ), ventrolaterális: VL ( $p=0,701$ ,  $n = \text{kontr: } 19, \text{ VPA: } 10$ ), ventromediális: VM ( $p=0,986$ ,  $n = \text{kontr: } 19, \text{ VPA: } 10$ ).

Így hát P60 napos korban már egyik területen sem tapasztaltunk a VPA kezelés hatására szignifikáns változást. NAc ( $p=0,053$ ,  $n = \text{kontr: } 17, \text{ VPA: } 10$ ), LS ( $p=0,631$ ,  $n = \text{kontr: } 17, \text{ VPA: } 12$ ) és BNST ( $p=0,739$ ,  $n = \text{kontr: } 17, \text{ VPA: } 10$ ), ACC ( $p=0,745$ ,  $n = \text{kontr: } 20, \text{ VPA: } 12$ ), PCC ( $p=0,184$ ,  $n = \text{kontr: } 18, \text{ VPA: } 12$ ) és RSC ( $p=0,187$ ,  $n = \text{kontr: } 16, \text{ VPA: } 10$ ) (13. ábra).

A fiatal és a felnőtt egerek  $CB^+$  neuron-sűrűségének összehasonlításakor a legmagasabb értéket a CPu területén mutattuk ki (mindkét korcsoportban). A legnagyobb életkor közötti különbséget a LS és a BNST területein találtuk, ahol 2,5-3-szoros  $CB^+$  perikarionszám-növekedést tapasztaltunk az életkor előrehaladtával, míg a CPu (kiváltképpen a ventrális (VL, VM)) területén, valamint a NAc területén az értékek kb. 15%-kal csökkentek.



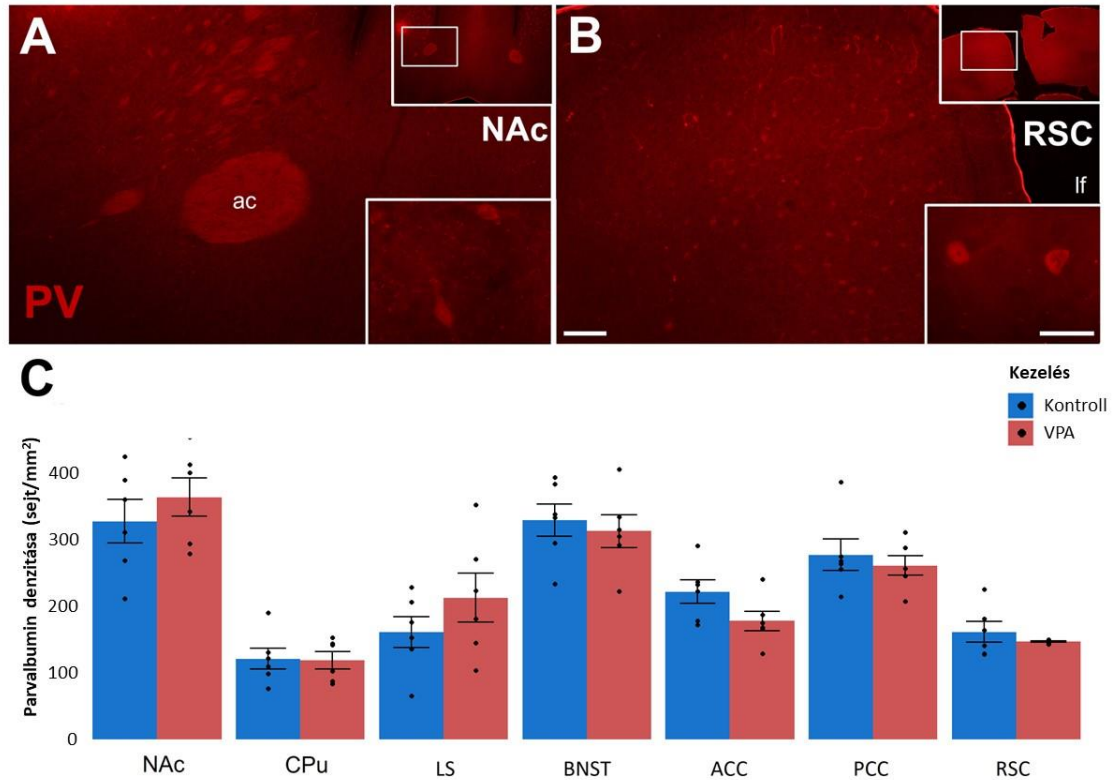
### 13. ábra: Calbindin-immunreaktív sejtek eloszlása P60 napos egerekben

A-B: reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos képek a CB<sup>+</sup> sejtek eloszlásáról a NAc és a RSC területéről P60 napos kontroll egerekben. A panelek jobb felső sarkában topogramon jeleztük a teljes képmezőn ábrázolt mérési terület (skála (A-B): 100  $\mu$ m) pontos helyzetét a coronalis metszethez képest, míg a jobb alsó négyszögekben nagyobb nagyítással látható néhány jellegzetes immunfestett sejt (skála (A-B): 20  $\mu$ m). A mellékelt grafikon (C) mutatja a CB<sup>+</sup> sejttestek területi sűrűségének összehasonlítását az általunk vizsgált subpallialis és pallialis területeken a VPA kezelés hatására.

A parvalbumin P60 napos korban már kifejeződik az egerek agyában (míg 7 napos korban még nincs jelen). A PV immunpozitív sejttestek területi eloszlásának vizsgálatakor nem találtunk szignifikáns különbségeket a kezelés hatására; CPu ( $p=0,976$ ,  $n =$  kontr: 19, VPA: 10), NAc ( $p=0,454$ ,  $n =$  kontr: 17, VPA: 10), LS ( $p=0,462$ ,  $n =$  kontr: 17, VPA: 12) és BNST ( $p=0,604$ ,  $n =$  kontr: 17, VPA: 10), ACC ( $p=0,191$ ,  $n =$  kontr: 20, VPA: 12), PCC ( $p=0,298$ ,  $n =$  kontr: 18, VPA: 12) és RSC ( $p=0,23$ ,  $n =$  kontr: 16, VPA: 10) (14. ábra). Úgy tűnik, ha voltak is korábban eltérések a VPA



expozíció hatására a kalciumkötő fehérjék expressziójában, azok 60 napos korra már nem mutathatók ki.

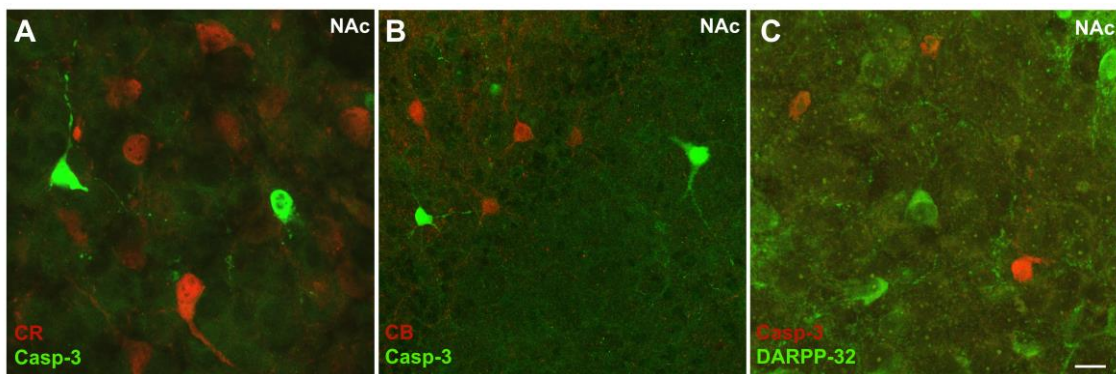


**14. ábra: Parvalbumin-immunreaktív sejtek eloszlása P60 napos egerekben**

A-B: reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos képek a PV+ sejtek eloszlásáról a NAc és a RSC területéről P60 napos kontroll egerekben. A panelek jobb felső sarkában topogramon jeleztük a teljes képmézőn ábrázolt mérési terület (skála (A-B): 100  $\mu$ m) pontos helyzetét a coronalis metszethez képest, míg a jobb alsó négyzetekben nagyobb nagyítással látható néhány jellegzetes immunfestett sejt (skála (A-B): 20  $\mu$ m). A mellékelt grafikon (C) mutatja a CB+ sejtestek területi sűrűségének összehasonlítását az általunk vizsgált subpallialis és pallialis területeken a VPA kezelés hatására.

#### 4.2.2.3 A kalciumkötő fehérjéket tartalmazó neuronok nem fejeznek ki apoptotikus fehérjéket

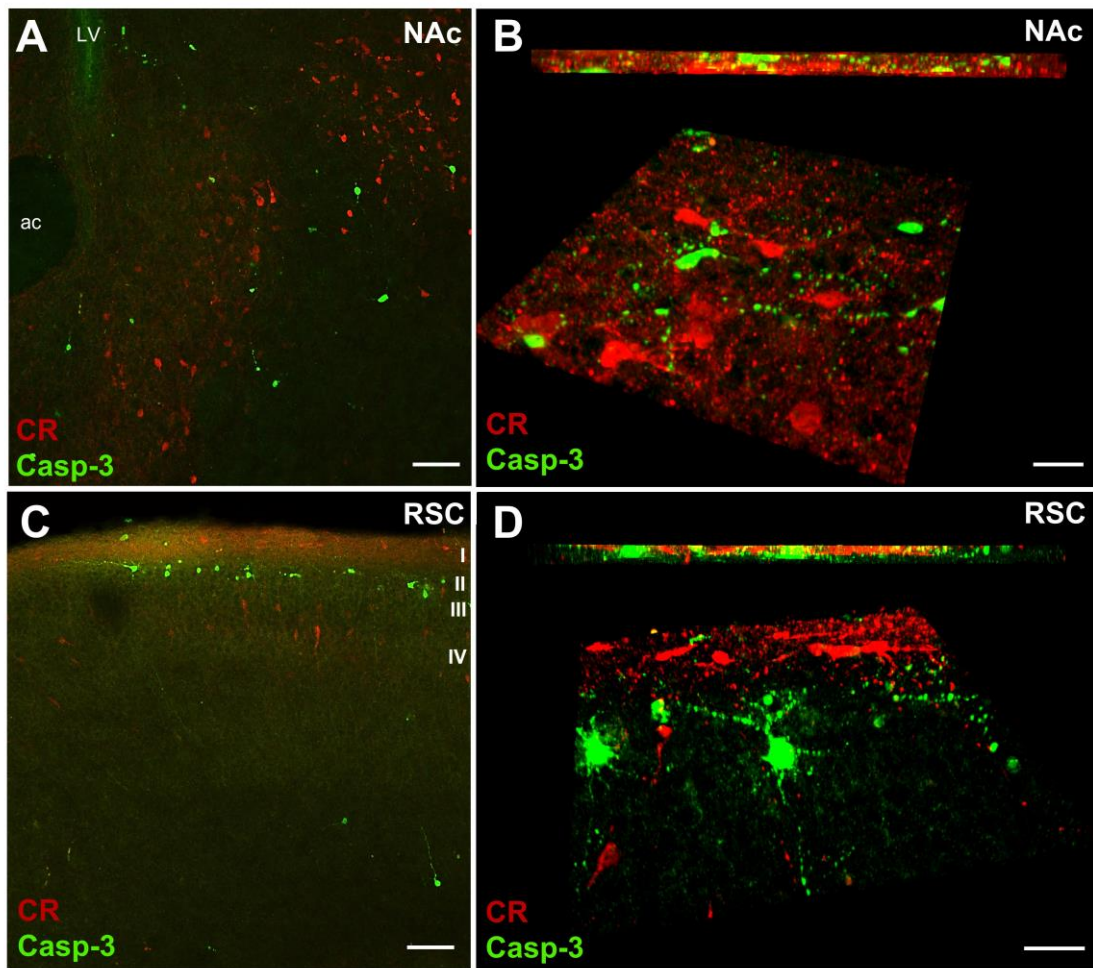
A kalciumkötő fehérjéket expresszáló sejtek általános eloszlásának vizsgálatát követően megvizsgáltuk, hogy vajon a VPA kezelés hatására megnövekedett apoptózis összefüggésbe hozható-e a CR<sup>+</sup> vagy CB<sup>+</sup> perikarionok számának változásával a 7 napos egerek esetében. Nem találtunk jelentős átfedést a Casp-3<sup>+</sup> és a CR<sup>+</sup>/CB<sup>+</sup> sejtek között sem a kontroll, sem a kezelt csoportok esetében (15.A és B ábra). Az apoptotikus sejtek kolokalizációját a kalciumkötő fehérjék mellett a DARPP-32-vel, mint a medium spiny neuronok általános markerével is megvizsgáltuk, ám ezekkel a sejtekkel sem találtunk átfedést (15.C ábra).



**15. ábra: Non-kolokalizációt reprezentáló ábra a NAc területéről 7 napos kontroll egerekben**

Reprezentatív konfokális lézer mikroszkópos felvételek, melyek demonstrálják a Casp-3 immunjelölt perikarionok non-kolokalizációját az CR immunpozitív (A), a CB immunpozitív (B) és a DARPP-32 immunjelölt (C) sejttestekkel 7 napos kontroll egerekben. Skála (A-C): 20  $\mu$ m.

A non-kolokalizáció mértékét Imaris képelemző program segítségével pontosabban is meghatároztuk egy-egy kiemelt subpallialis és pallialis területen. 7 napos egerekben a CR<sup>+</sup> és a Casp-3<sup>+</sup> sejttestek és nyúlványaik átfedése a NAc területén 0,02% (16. A-B ábra). A RSC területén 0,09% az átfedés mértéke, ahol az immunpozitív perikarionok a kéreg rétegeiben elkülönülve találhatóak; az apoptotizáló sejtek főként a kéreg II. laminájában jelennek meg, míg a CR<sup>+</sup> perikarionok az I., valamint a mélyebb infragranuláris rétegekben fordulnak elő (16. C-D ábra).



**16. ábra: Casp-3 és CR immunpozítív perikarionok non-kolokalizációját reprezentáló képek a NAc és a RSC területéről 7 napos kontroll egerekben**

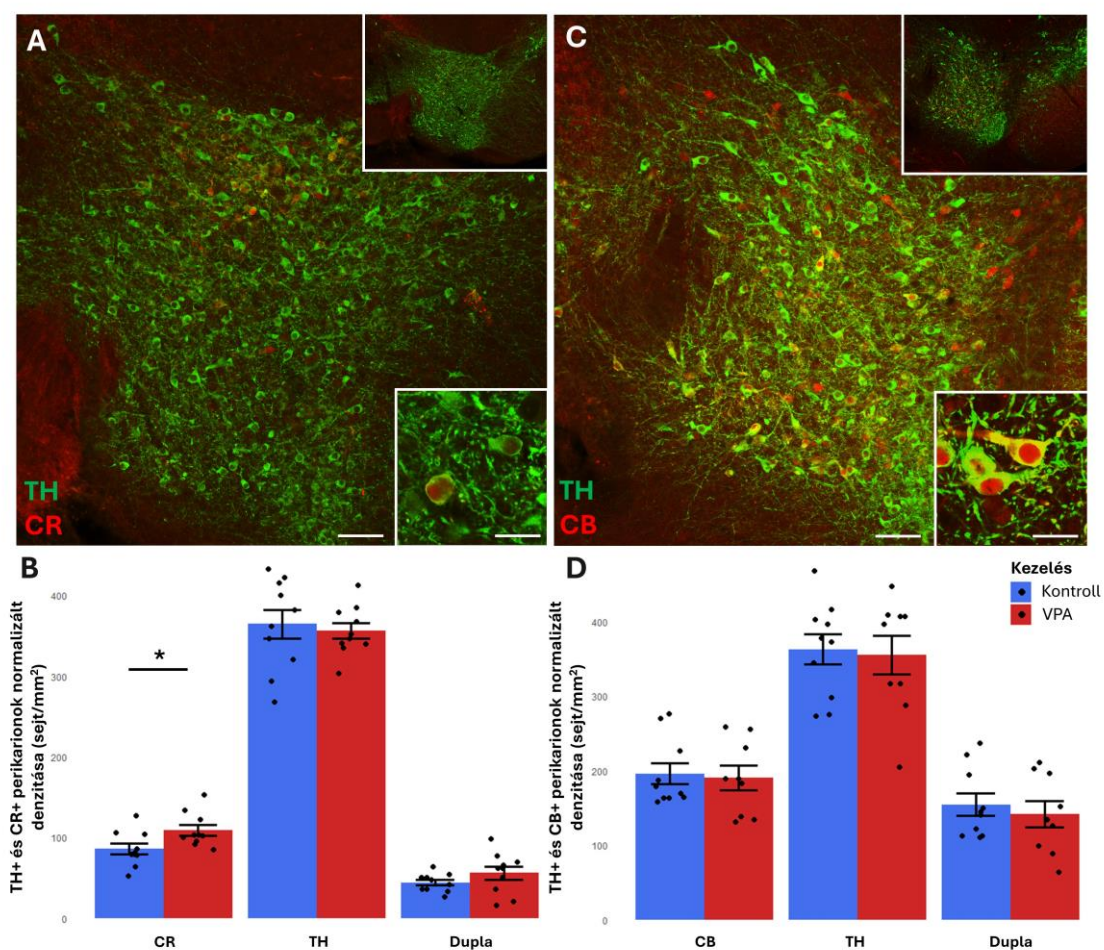
A, C: Reprezentatív konfokális lézermikroszkópos felvételek, melyek a CR és a Casp-3 immunreaktív neuronok nem átfedő megoszlását mutatják a NAc és a RSC területein. Skála: 50  $\mu\text{m}$ . B, D: Z-stack képek 3D rekonstrukciója az Imaris program segítségével. Skála: 30  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.3 TH immunpozítív és kalciumkötő fehérjéket tartalmazó sejtek kolokalizációja a mesotelencephalikus pálya kiinduló régióiban

Összehasonlítottuk a mesotelencephalicus pálya kiinduló területein (VTA és SN) a TH és a CR vagy CB immunjelölt perikarionok kolokalizációját.

#### 4.2.3.1 Ventral tegmental area (VTA)

A VTA területén szignifikáns növekedést találtunk a CR immunpozitív neuronok számában a VPA kezelés hatására ( $p=0,032^*$ ,  $n = \text{kontr: } 10, \text{ VPA: } 10$ ), míg a  $\text{CB}^+$  neuronok ( $p=0,879$ ,  $n = \text{kontr: } 10, \text{ VPA: } 9$ ) száma nem változott. A  $\text{TH}^+$  ( $p=0,823$  és  $p=0,912$ ) jelölésben nem észleltünk különbséget, ahogy a kettősen jelölt perikarionok száma sem változott ( $p=0,187$ ,  $p=0,648$ ) (17. ábra).



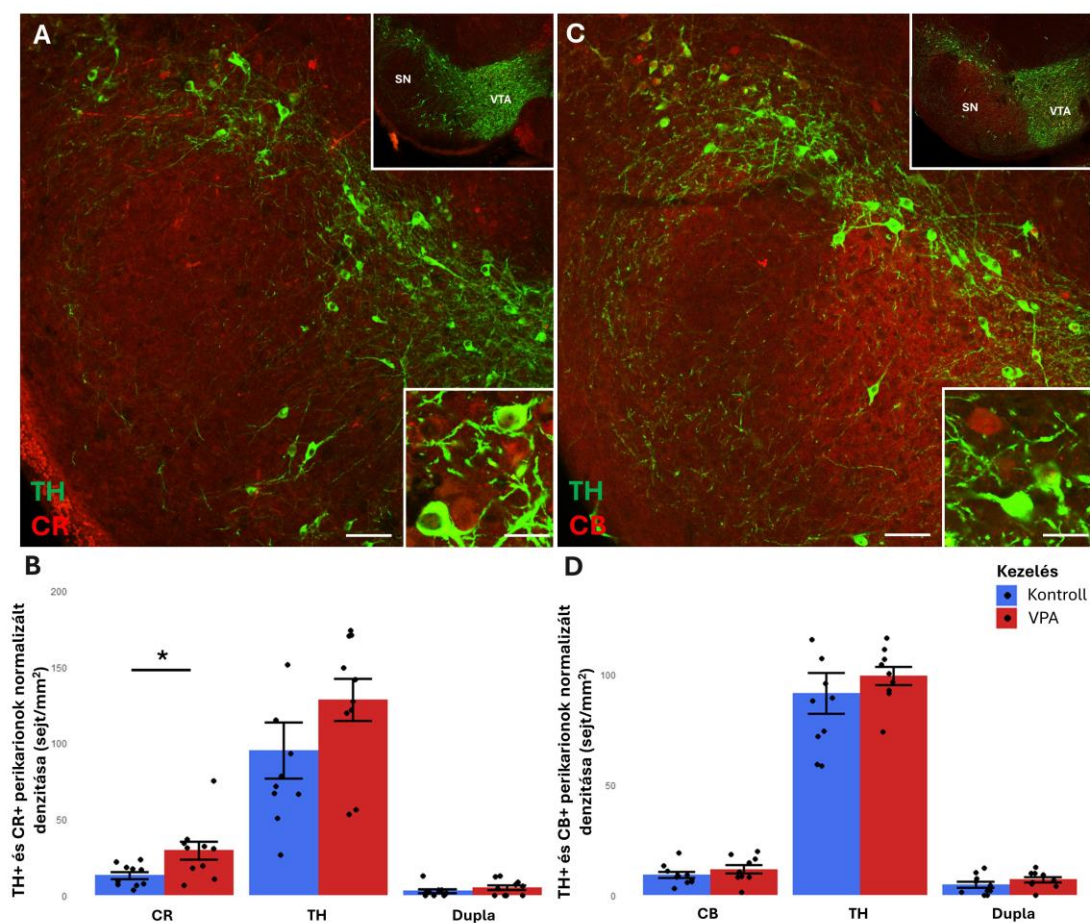
**17. ábra: TH és CR/CB immunpozitív perikarionok kolokalizációja a VTA területén 7 napos egerekben**

Reprezentatív konfokális lézermikroszkópos felvételek, melyek a TH és CR (A) vagy CB (C) immunreaktív neuronok átfedését mutatják a VTA területén. A jobb felső sarokban a mért régió kicsinyített képe látható (skála: 50  $\mu\text{m}$ ), míg alul egy kinagyított részleten egyes jelzett perikarionok láthatók (skála: 20  $\mu\text{m}$ ). A mellékelt grafikon mutatja a  $\text{TH}^+$  és a  $\text{CR}^+$  (B) vagy  $\text{CB}^+$  (D) sejttestek területegységre eső denzitásainak összehasonlítását a VPA kezelés hatására. Szign. szint: \*  $p < 0.05$ .

A VTA területén az összes TH<sup>+</sup> neuronoknak kb. 15%-a immunpozitív CR-re is, míg a CB-nal 40%-os átfedést mutat a TH<sup>+</sup> perikarionok.

#### 4.2.3.2 Substantia nigra (SN)

A VTA területéhez hasonlóan, a SN területén is szignifikáns növekedést találtunk a CR immunpozitív neuronok számában a VPA kezelés hatására ( $p=0,019^*$ ,  $n = \text{kontr: } 10, \text{ VPA: } 10$ ), míg a CB<sup>+</sup> neuronok ( $p=0,478$ ,  $n = \text{kontr: } 10, \text{ VPA: } 10$ ) száma



**18. ábra: TH és CR/CB immunpozitív perikarionok kolokalizációja a SN területén 7 napos egerekben**

Reprezentatív konfokális lézer mikroszkópos felvételek, melyek bemutatják a TH és CR (A) vagy CB (C) immunreaktív neuronok átfedését a SN területén. A jobb felső sarokban a mért régió kicsinyített képe látható (skála: 50  $\mu\text{m}$ ), míg alul egy nagyított részlet található (skála: 20  $\mu\text{m}$ ). A mellékelt grafikon mutatja a TH<sup>+</sup> és a CR<sup>+</sup> (B) vagy CB<sup>+</sup> (D) sejtestek területi sűrűségének összehasonlítását a VPA kezelés hatására. Szign. szint: \*  $p < 0,05$ .

nem különbözött szignifikánsan a kezelés hatására. A TH<sup>+</sup> perikarionok (p= 0,364, p=0,598) számában nem észleltünk különbséget, ahogy a kétszeresen jelölt sejtek száma sem változott (p= 0,635, p= 0,597) (18. ábra).

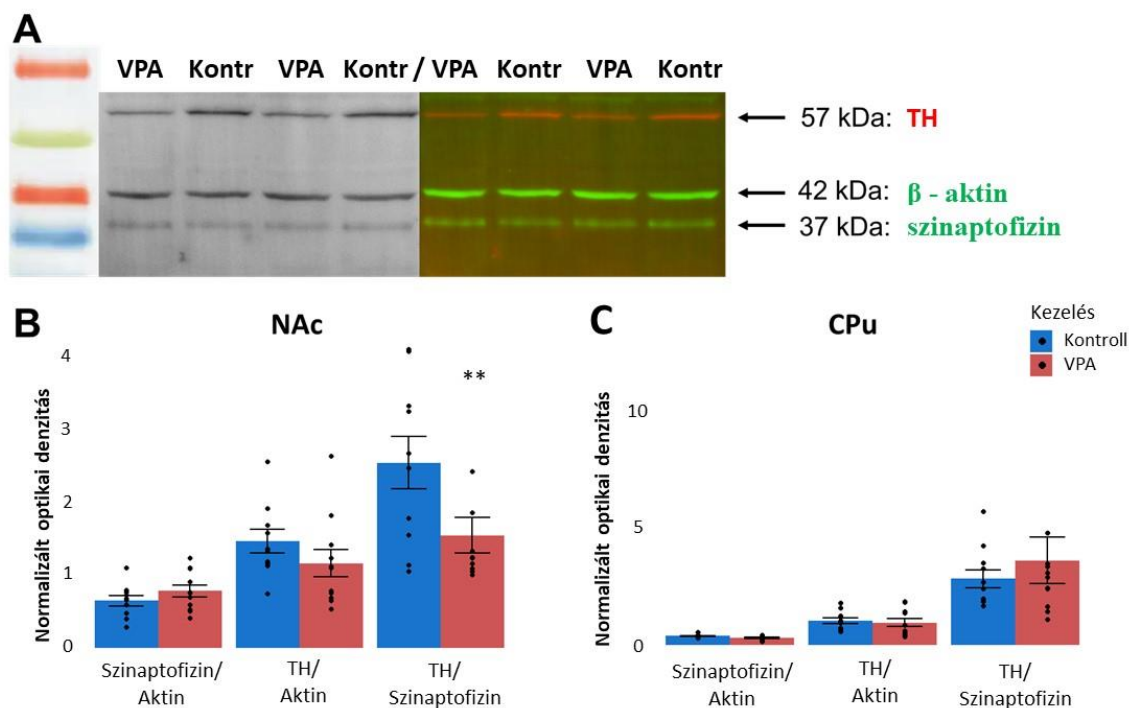
A SN területén a kalciumkötő fehérjéket expresszáló neuronok százalékos aránya lényegesen kisebb volt, valamint a kolokalizációjuk is ritkább TH immunpozitív sejtekkel, mint a VTA területén. Az összes TH<sup>+</sup> neuron kb. 5%-a immunpozitív CR-re és kb. 8%-a immunpozitív CB-ra is.

### 4.3 Szinapszis szintű változások

A sejtszintű változásokon túl, proteomikai módszerrel elemeztük egy szinaptikus fehérje (szinaptofizin) változásait, továbbá szinaptikus kontaktstruktúrákra vonatkozó morfológiai vizsgálatokat is végeztünk 7 napos kontroll és VPA-val kezelt egereken.

#### 4.3.1 Proteomikai vizsgálat (western blot)

Először a szinaptikus fejlődés változásait vizsgáltuk két subpallialis, dopaminoceptív régióban: a CPu és NAc területein. Vizsgálatunk a kontroll és a VPA-val kezelt anyák P7 napos kölykeiből származó szövetmintákon a szinaptofizin és a TH protein egyidejű kimutatására összpontosított (n = kontr: 11, VPA: 11) (19. A ábra). A szinaptofizin koncentrációja stabil maradt ( $\beta$ -aktinra normalizálva) mind a NAc (p= 0,697) (19. B ábra) mind a CPu (p= 0,0731) (19. C ábra) területén. A CPu-ban (19. C ábra) a TH szintje szintén nem mutatott változást (p= 0,892), de a NAc-ben (19. B ábra) trendszerűen csökkent (p= 0,0547) a TH szintje ( $\beta$ -aktinra normalizálva). A legfontosabb megfigyelésünk szerint, a TH/szinaptofizin aránya jelentősen csökkent a NAc területén a VPA-nak kitett kezelési csoportban (p= 0,00602\*\*) (19. B ábra), míg a CPu (19. C ábra) területén nem változott (p= 0,524).



**19. ábra: A TH és a szinaptofizin fehérjék proteomikai analízise a NAc és a CPU területén 7 napos egerekben**

A: Gélre futatott TH, szinaptofizin és a  $\beta$ -aktin fehérjék reprezentatív képe a NAc-t tartalmazó szövetmintákból, összehasonlítva a kontroll és a VPA kezelt állatokat. A mellékelt diagramok a NAc (B) és a CPU (C) területekből származó szövetminták kvantitatív méréseit hasonlítja össze. Szign. szint: \*\*  $p < 0.01$ .

#### 4.3.2 Kalciumkötő fehérje-tartalmú neuronokkal kapcsolatos szinaptikus változások két dopaminoceptív cél régióban (NAc, TO)

A szinaptikus kontakt elemzés szempontjából fontos kérdés volt, hogy a TH mint dopaminerg preszinaptikus axonmarker, valamint a CB, illetve CR mint a poszt-szinaptikus neuron perikariális/dendritikus markerei teljes mértékben elkülönült struktúrákban fordulnak-e elő a vizsgált cél régiókban. Ellenkező esetben ugyanis az alább részletezett morfometriai analízis nem lett volna biztonságosan kivitelezhető. Ezért elsőként megvizsgáltuk a TH<sup>+</sup> és CaBP<sup>+</sup> struktúrák kolokalizációját.

Egyik vizsgált kalciumkötő fehérje sem volt kimutatható jelentős mennyiségben a TH-t expresszáló axonokban a NAc és a TO területén. A kvantitatív kolokalizációs vizsgálat során a NAc területén a TH/CR átfedés mértéke a VPA-val kezelt állatokban

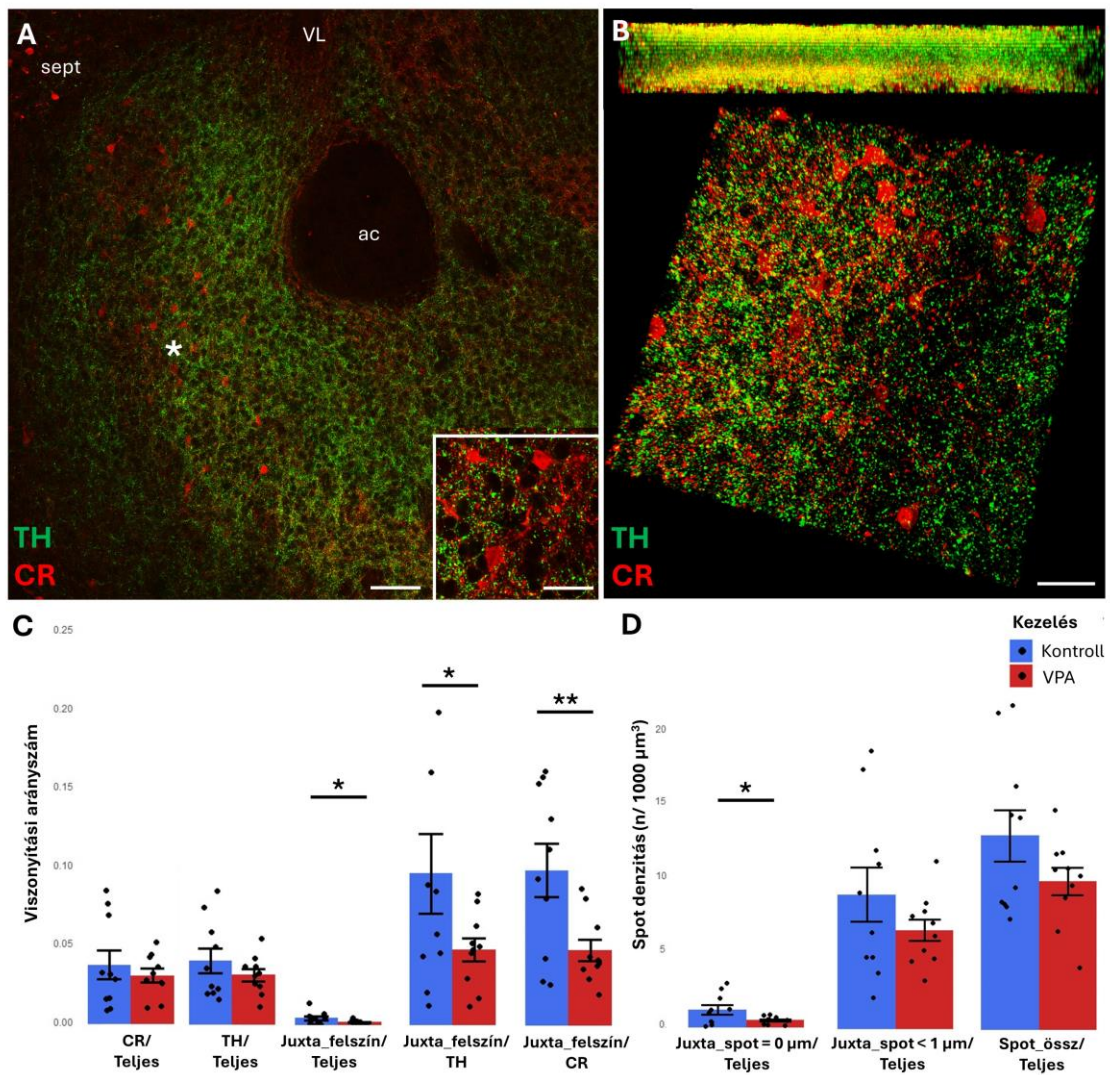
0,29%, míg a kontroll állatokban 0,26% volt. A TH/CB átfedés a kezelt csoportban 0,39%, míg a kontroll csoportban 0,36% értékeket adott. Ehhez hasonlóan, a TO területén a TH/CB a kezelt csoportban 0,38%, míg a kontroll csoportban 0,39%-os átfedést mutatott.

#### 4.3.2.1 TH<sup>+</sup> axonok és CR<sup>+</sup>/CB<sup>+</sup> sejtek és dendritek közti juxtapozíciók változásai a NAc területén

A NAc vizsgálata során a core területén végeztük a méréseket az Imaris képelemző szoftver segítségével. A korábbi eredményeinkkel egybevágóan nem találtunk szignifikáns változást a kezelés hatására a CR<sup>+</sup> (p= 0,483) elemek térfogatarányában, ahogy a TH<sup>+</sup> (p= 0,244) rostokban sem. A kontaktfelület (továbbiakban: juxtapozíciók) kvantitálása során, mind a TH<sup>+</sup> mind a CR<sup>+</sup> elemeket a burkolófelület renderelése alapján mérve (n = kontr: 20, VPA: 20), a juxtapozíciók térfogati aránya szignifikánsan csökkent a VPA-val kezelt csoportban, akár a TH (p= 0,0242\*), akár a CR (p= 0,00164\*\*), akár a teljes (p= 0,0193\*) mintavételi térfogatot vettük referenciaként.

A másik alkalmazott képelemző módszerrel, a TH<sup>+</sup> elemek pontszerűvé alakítását (az Imaris spot detection programjának segítségével) a CR<sup>+</sup> struktúrák burkolófelületének renderelésével kombinálva, hasonló, ám kisebb eltéréseket sikerült kimutatni. A TH<sup>+</sup> és CR<sup>+</sup> közti juxtapozíciók csak abban az esetben mutattak szignifikáns csökkenést a VPA-kezelt csoportban, ha a találkozó elemek közvetlen érintkezéseit (távolság=0 μm) vettük figyelembe (p=0,0451\*), ám a közeli peremérintkezéseket (távolság=1 μm) is figyelembe véve a változás már nem bizonyult szignifikánsnak. (p= 0,237), és az összfelületre vetített spot-érték (p= 0,135) sem mutatott szignifikáns eltérést (20. ábra).



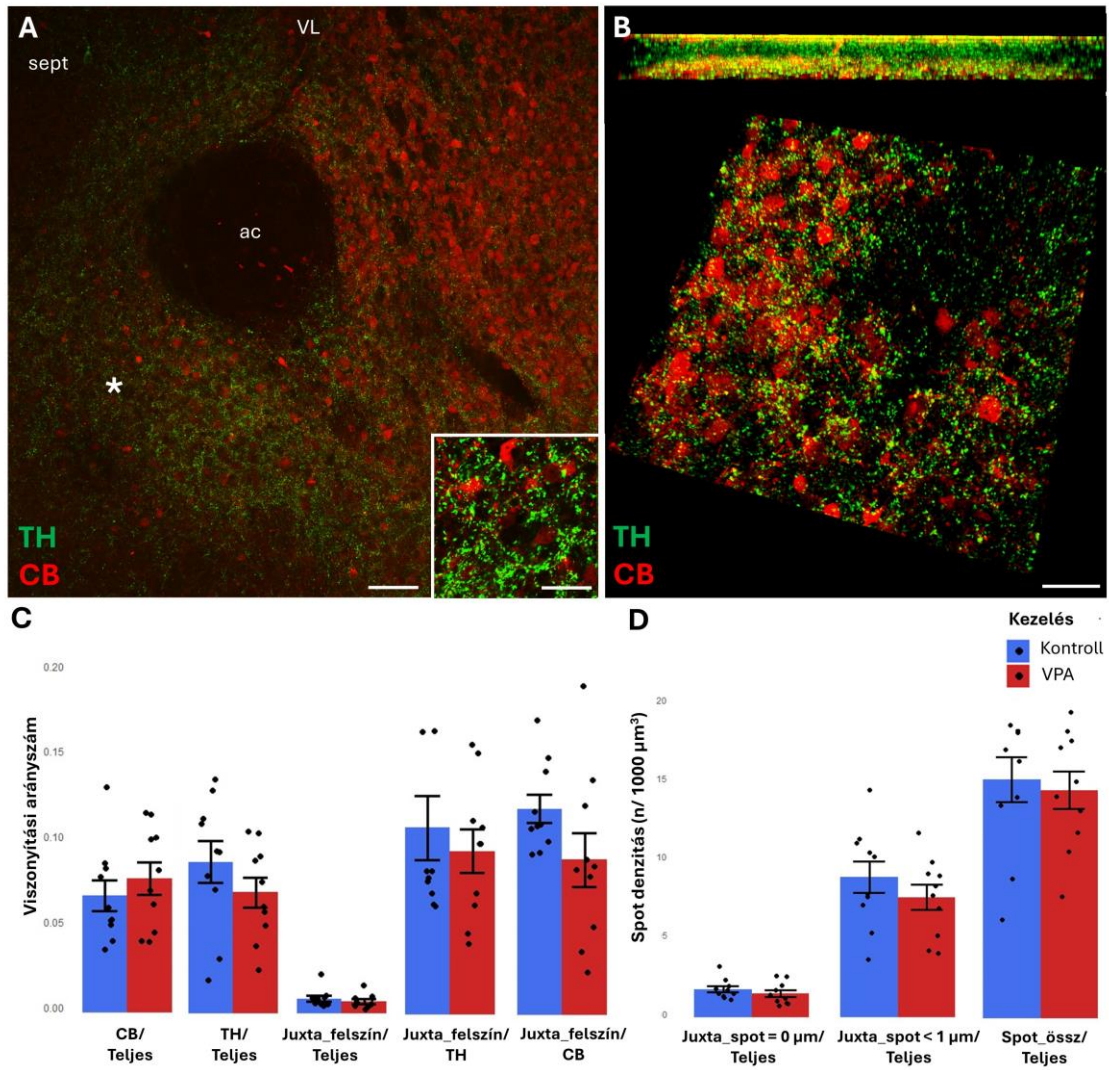


**20. ábra: A TH és CR axosomatikus/axodendritikus juxtapozíciói a NAc területén 7 napos egerekben**

A: Reprezentatív konfokális lézer mikroszkóp kép egy 7 napos kontroll egér NAc területéről. Skála: 50  $\mu\text{m}$ . A jobb alsó sarokban egy kinagyított részlete látható, skála: 20  $\mu\text{m}$ . B: Az A panelen található \* jelölés kiemelt része látható 3D-s rekonstrukciós képként a régió jellegzetes sejttypusaival. Skála: 30  $\mu\text{m}$ . C, D: A mellékelt diagramok a VPA-nak kitett és kontroll állatok TH<sup>+</sup> és CR<sup>+</sup> elemek volumetrikus, kvantitatív eredményeit mutatja a NAc területén. Szign. szint: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

A TH<sup>+</sup> ( $p = 0,221$ ) és a CB<sup>+</sup> ( $p = 0,468$ ) elemek térfogatarányában szintén nem találtunk szignifikáns változást a kezelés hatására a NAc területén. A TH<sup>+</sup> és a CB<sup>+</sup> juxtapozíciók, sem felszíni rendereléssel mérve ( $n = \text{kontr: } 20, \text{ VPA: } 20$ ); TH ( $p = 0,754$ ), CB ( $p = 0,177$ ), teljes mintavételi terület ( $p = 0,841$ ), sem spot detektálással nem

változtak a kezelés hatására; TH<sup>+</sup> felszín és CB<sup>+</sup> spotok közötti 0 μm távolság esetén (p= 0,689), 1 μm esetén (p= 0,484), összfelületre vetített mintavételi kijelölésben (p= 0,798) értékeket kaptunk (21. ábra).

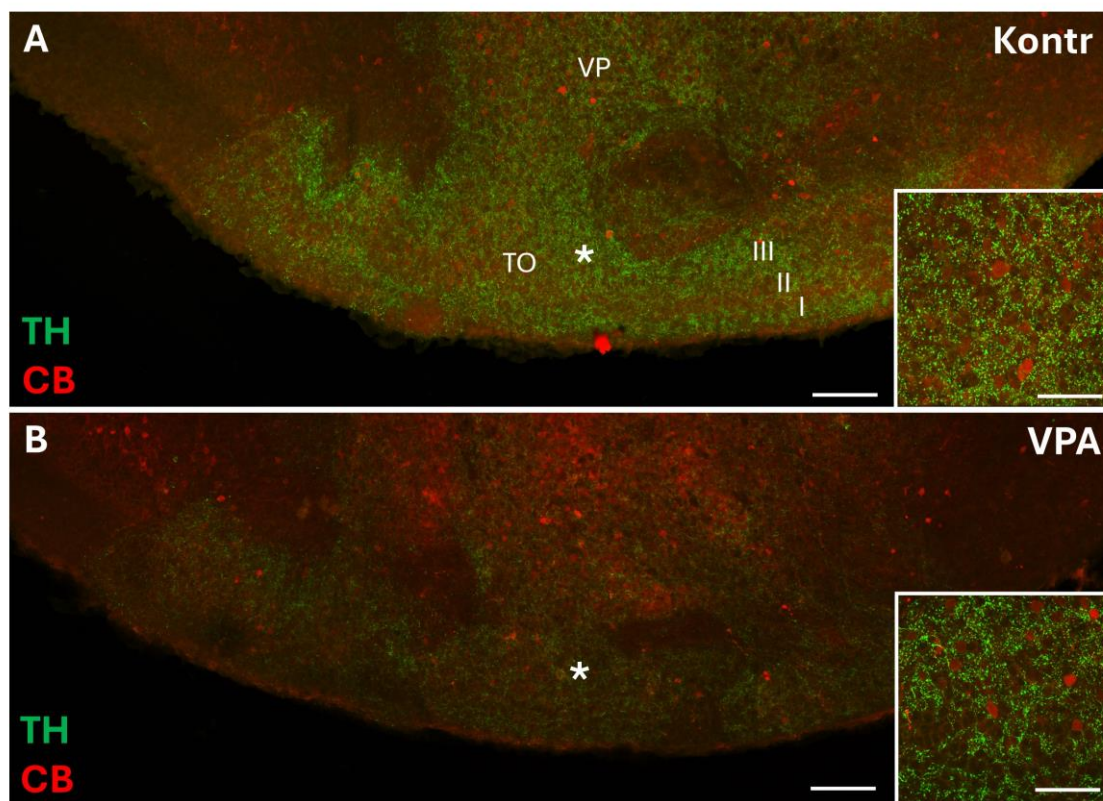


**21. ábra: A TH és CB axosomatikus/axodendritikus juxtapozíciói a NAc területén 7 napos egerekben**

A: Reprezentatív konfokális lézer mikroszkóp kép egy 7 napos kontroll egér NAc területéről. Skála: 50 μm. A jobb alsó sarokban egy kinagyított részlete látható, skála: 20 μm. B: Az A panelen található \* jelölés kiemelt része látható 3D-s rekonstrukciós képként a régió jellegzetes sejtípusaival. Skála: 30 μm. C, D: A mellékelt diagramok a VPA-nak kitett és kontroll állatok TH<sup>+</sup> és CB<sup>+</sup> elemek volumetrikus, kvantitatív eredményeit mutatja a NAc területén.

#### 4.3.2.2 TH<sup>+</sup> axonok és CB<sup>+</sup> sejttestek és dendritek közti juxtapozíciók változásai a TO területén

A TO területén a dopaminerg bemenet szabad szemmel láthatóan is csökkent. A szinaptikus változások méréseit a TO III. rétegében végeztük, elkerülve a ventralis pallidumot (VP) és a Calleja szigeteket (22. ábra).

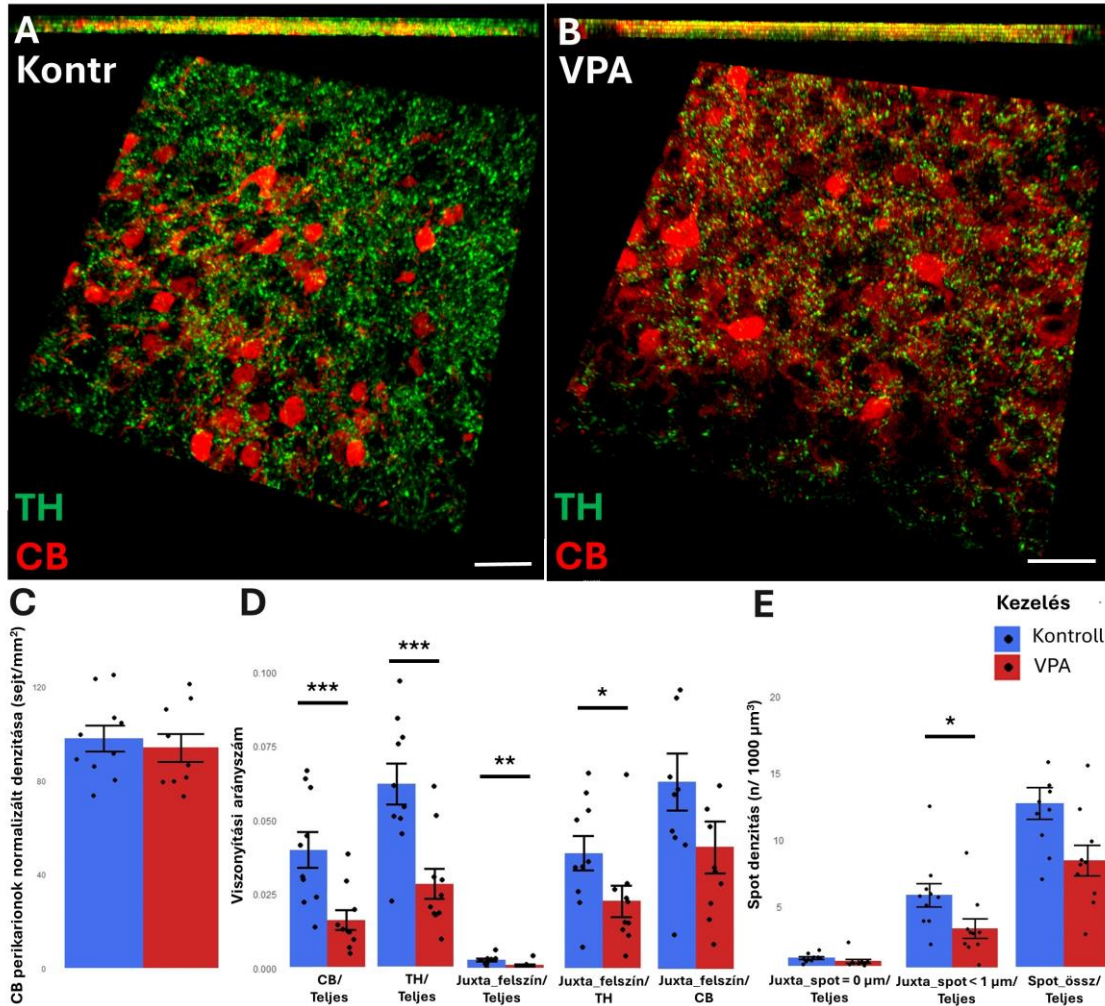


**22. ábra: TH és CB immunpozitív jelölések a TO területén 7 napos egerekben**

A, B: Áttekintő konfokális képek 7 napos kontroll és VPA-val kezelt egérből (skála: 50  $\mu$ m). A régió jellegzetes sejttípusai nagyobb nagyítással a jobb alsó sarokban inzeremben láthatók (skála: 20  $\mu$ m).

A tuberculum olfactoriumban P7 napos egereken a CR<sup>+</sup> elemek annyira ritkák, hogy ezek kvantitatív elemzésétől el kellett tekintenünk, így a számolás a sokkal gyakoribb CB<sup>+</sup> struktúrákra szorítkozott. Először meghatároztuk a CB<sup>+</sup> perikarionok sűrűségét a TO területén. A VPA kezelés hatására nem találtunk szignifikáns

különbséget a perikarionok területre normalizált számában ( $p=0,815$ ). Ezzel szemben, a teljes térfogatarány vizsgálatakor ( $n = \text{kontr: } 20, \text{ VPA: } 20$ ) szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a kezelés hatására nem csak a TH<sup>+</sup> elemekben ( $p=0,000131^{***}$ ), de még CB<sup>+</sup> elemekben is ( $p=0,00021^{***}$ ). Hangsúlyozzuk, hogy az utóbbi, volumetrikus analízis nem csak a perikarionokat, hanem az összes immunreaktív struktúrát (tehát a



**23. ábra: A TH és CB axosomatikus/axodendritikus juxtapozíciói a TO területén 7 napos egerekben**

A, B: Reprezentatív 3D-s rekonstrukciós képek a TO területéről összehasonlítva a kontroll és a VPA-s kezelési csoportot. Skála: 30 μm. C: A CB<sup>+</sup> perikarionok területre normalizált eloszlásának grafikonja a TO területéről. D, E: A mellékelt diagramok a VPA-nak kitett és kontroll állatok TH<sup>+</sup> és CB<sup>+</sup> elemei közti juxtapozíciók volumetrikusan meghatározott kvantitatív eredményeit mutatják. Szign. szint: \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ .

neuronok vizsgálati területre eső nyúlványait) is figyelembe veszi. A TH<sup>+</sup> és a CB<sup>+</sup> juxtapozíciók értéke, felszíni rendereléssel mérve, szignifikánsan csökkent a VPA-val kezelt csoportban, TH-ra normalizálva ( $p= 0,0396^*$ ), valamint a teljes mintavételi területen ( $p= 0,00806^{**}$ ), míg a CB-ra normalizálva nem érte el a szignifikáns szintet ( $p= 0,0981$ ). Spot detektálással a juxtapozíciók értéke csupán az 1  $\mu\text{m}$ -en belül megadott közelítési távolság esetén mutatott szignifikáns csökkenést a VPA-kezelt csoportban ( $p=0,0407^*$ ), az összfelületre vetítve hasonló, szubszignifikáns trend volt látható ( $p= 0,0566^\#$ ), míg a 0  $\mu\text{m}$ -ben rögzített közelítési távolság esetén nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kezelési csoportok között ( $p= 0,202$ ) (23. ábra).

## 5. Megbeszélés

### 5.1 Dopaminerg rendszer változásainak értelmezése

Kimutattuk és megerősítettük, hogy a mesotelencephalicus dopaminerg pálya immunjelölése jelentősen csökkent a 7 napos egérkölyökben a prenatális VPA kezelés hatására. Mivel a neurofilamentum festés nem mutatott eltérést a kezelési csoportok között, így kizárhatjuk annak a lehetőségét, hogy az agypályák általános károsodásáról lenne szó. Tehát a megfigyelt jelenség valószínűsíthetően a TH immunreaktív rostok szelektív csökkenésének tudható be. Ezt alátámasztja kutatócsoportunk korábbi eredménye, ahol iDISCO módszerrel a TH-val festett teljes átderített agyak 3D-s kvantitatív elemzése során jelentős csökkenést figyeltek meg a mesotelencephalicus dopaminerg axonnyalábok számában.<sup>[47]</sup> Más autizmus modelleken, például Wnt5a KO mutáns egerekben, szintén kimutatták ennek a pályának átrendeződését, miszerint a TH<sup>+</sup> rostok széttartóbbá váltak a vad típusú egerekhez képest.<sup>[15]</sup> A neuropilin-2 (Nrp2) fehérje a mesostriatalis pálya kialakulásában kulcsszerepet játszó faktor. A Nrp2 KO egerekben szintén rendellenes rostrnövekedést figyeltek meg a pályarendszer defasciculációja és kiszélesedése által.<sup>[90]</sup>

A pályarendszer fejlődésének a megfelelő időablakban beadott prenatális VPA hatására észlelt zavarából kiindulva, logikus lépésként megvizsgáltuk a dopaminerg kiinduló- és a dopaminoceptív célterületek változásait. A VTA területén a TH<sup>+</sup> sejtek száma csökkenni látszott a VPA kezelés hatására, míg a SN területén ezzel inkább ellentétes változást figyeltünk meg, habár ezek az eltérések nem érték el a szignifikáns szintet.<sup>[123]</sup> Ezen eredmények megegyeznek kutatócsoportunk korábbi eredményeivel, melyek akkor iDISCO módszerrel szignifikánsnak is bizonyultak.<sup>[47]</sup> Az E11.5 napon a középagyi fejlődő dopaminerg neuronok elérik a végleges helyüket, ahol a neuronpopuláció laterális része leválva a SN pars compacta részét alkotja, míg a helyben maradt neuronok a VTA dopaminerg sejtjeit alkotják.<sup>[124]</sup> Ekkor kezdődik meg a dopaminerg neuronokban a *Pitx3* gén kifejeződése.<sup>[83]</sup> Azokban az egerekben, ahol a *Pitx3* mutáción esett át, a laterális populációban, tehát a fejlődő SNc területén, a dopaminerg neuronok száma csökkent, valamint a nigrostriatalis projekció is sérült<sup>[125]</sup>, míg a VTA területe teljesen érintetlen maradt.<sup>[124]</sup> A *Pitx3* expressziója különbözik a két

dopaminerg agyterület között; a VTA-ban nagyjából hatszoros értéket mutat a SN-hoz képest.<sup>[126]</sup> A *Pitx3* gén kifejeződésével egyidőben az *En1* és *En2* gének expressziója is megkezdődik.<sup>[127]</sup> Kimutatták, hogy az *En1* és *En2* kifejeződése elengedhetetlen a dopaminerg neuronok túléléséhez.<sup>[128]</sup> Az *En1* vagy *En2*-t érintő mutációk szelektív sejthalálhoz vezetnek az SNc populációban, mely végül motoros zavarokat okozhat.<sup>[129]</sup> A *Pitx3* génhez hasonlóan a VTA neuronjai itt is kevésbé érintettek.<sup>[130]</sup> Ez bizonyítja, hogy a VTA és a SN területén található dopaminerg neuronok eltérő fejlődést mutatnak, mely indokolhat különböző válaszreakciókat a prenatális VPA kezelés hatására.

## 5.2 Apoptózisbeli változások értelmezése

A mesotelencephalicus pálya és a VTA dopaminerg neuronjainak redukciója indokolta az apoptózis vizsgálatát. Az eredményeink arra utalnak, hogy a VPA kezelés hatására általános apoptózis-növekedés lép fel mind a pallialis (ACC, RSC), mind a subpallialis (CPU, LS, BNST) területeken. A mesotelencephalicus pálya egyik fontos célterületén (NAc) nem tapasztaltunk szignifikáns apoptózis-növekedést, habár a változás iránya nem mondott ellent az általános trendnek (8. ábra).<sup>[131]</sup> Ennek egy lehetséges oka, hogy P7 napos egerek apoptózis szintje általánosan magas, hiszen ilyenkor zajlik a központi idegrendszer második posztnatális apoptotikus hulláma.<sup>[122,132,133]</sup> Ezen felül, P7 napos kontroll egérben éppen a NAc területén a legnagyobb a Casp-3 immunpozitív neuronok sűrűsége <sup>[134]</sup>, így a magas alapértékhez képest már nem tudtunk szignifikáns változást kimutatni. Felnőtt egerek tirozin-hidroxilázt expresszáló sejtjeiben a Casp-3 gén szelektív deléciója esetén a TH-pozitív neuronok számának növekedését figyelték meg mind a SN-ban, mind a VTA területén. A striatumban a dopamin-felszabadulás jelentősen csökkent a Casp-3 hiányos egerekben, ami egyértelműen dopaminerg diszfunkcióra utal.<sup>[135]</sup>

## 5.3 Kalciumkötő fehérjék változásainak összegzése

A kalciumkötő fehérjék közül a CR és CB immunpozitív neuronok sűrűségét és eloszlását vizsgáltuk P7 napos egérkölykökben. A CR vizsgálata során a pallialis területeken találtunk szignifikáns csökkenést (ACC, PCC, RSC), míg a subpallialis

területeken nem tapasztaltunk változást (NAc, CPU, LS, BNST).<sup>[129]</sup> Ezzel szemben, 6-OHDA-nal kezelt (dopaminhiányos) felnőtt egerekben kimutatták, hogy a közepes méretű CR immunpozitív interneuronok sűrűsége csökkent a striatumban, míg a NAc területén nem tapasztaltak változást.<sup>[136]</sup> Autistákból származó posztmortem emberi agymintákon hasonló eredményeket találtak a nucleus caudatus területén, ahol a CR<sup>+</sup> interneuronok sűrűsége 35%-kal alacsonyabb volt, mint a kontroll mintákban.<sup>[101]</sup> A saját eredmények és az irodalmi adatok közötti különbségek feltételezhetően az életkor és a kezelések eltérésének következményei, nem teszik lehetővé a közvetlen összehasonlítást. Ezzel szemben, korábbi irodalmi adatokkal összhangban<sup>[137,138]</sup> azt figyeltük meg, hogy a mesotelencephalicus pálya eredő területein a kalciumkötő fehérjéket tartalmazó neuronok a VTA területén nagy mértékben, míg a SN területén kis mértékben koexpresszálódtak a TH fehérjével. Továbbá, a CR<sup>+</sup> sejtek fokozott expressziót mutattak a VPA kezelés hatására, ám ez a tirozin-hidroxilázzal koexpressziót mutató sejteket nem érintette.<sup>[123]</sup>

Ami a kalciumkötő fehérjék és az apoptózis között fennálló kapcsolatot illeti, általában elmondhatjuk, hogy nem találtunk ilyen korrelációt sem a CR, sem a CB esetén, az általunk vizsgált agyterületeken. Egyetlen kivételképpen, a CB immunpozitív neuronok szelektíven csökkentek a VPA kezelés hatására a P7 napos állatok CPu-ja területén. Itt, a CB<sup>+</sup> neuronok csökkenése negatív korrelációban van a Casp-3 pozitív sejtek számának növekedésével<sup>[131]</sup>, ami jelentheti azt, hogy kevesebb CB expresszió több apoptózishoz vezetett az érintett neuronokban.<sup>[101]</sup> Ez tükrözheti az optimális Ca<sup>2+</sup>-szint neuroprotektív hatását, amelyben a CaBP-ek akár kulcsfontosságúak is lehetnek a sejtek túléléséhez.<sup>[139]</sup> Úgy tűnik, hogy terhesség alatti VPA expozíció hatására károsodott Ca<sup>2+</sup>-homeosztázis a striatumban P7 napos korban még kimutatható. Ezzel szemben, a fiatal felnőtt, 60 napos korra, ez a változás kompenzálódik. Ez az észlelet azért jelentős, mert a VPA által okozott elváltozás regenerációjának lehetőségét (legalábbis a CPu régió megnövekedett ellenálló képességét) jelezheti, mellyel a korai sejtkárosító hatások helyreállíthatók.

Ezt az elképzelést látszik megerősíteni a PV látszólagos stabilitása, amely nem reagál a prenatális VPA expozícióra 60 napos egerekben. Hangsúlyozni kell, hogy 7 napos egerekben még nem expresszálódik a PV, az első PV<sup>+</sup> sejtek csak a P10 napon jelennek meg, mégpedig a RSC területén.<sup>[140]</sup> A P25 korosztályban a PV<sup>+</sup> sejtek



számának jelentős csökkenését találták a striatumban VPA-nak kitett egéranyag kölykeinél, míg a kortikális területeken nem tapasztaltak változást.<sup>[141]</sup> Fiatal felnőtt patkányokon, átmeneti NMDA receptor-blokkolást követően, nem mutattak ki változást CR-t vagy CB-t tartalmazó GABAerg interneuronok sűrűségében. Ezzel szemben, a PV tartalmú neuronok száma szignifikánsan csökkent a kérgi területeken (SSC, RSC), míg a striatumban nem változott.<sup>[142]</sup>

A Casp-3<sup>+</sup> sejtek és a CaBP-immunreaktív neuronok általunk megfigyelt non-kolokalizációja összhangban áll azzal, hogy a MK801 által indukált aktivált Casp-3 expressziót leggyakrabban olyan sejtekben találták, amelyek nem fejeznek ki kalciumkötő fehérjéket.<sup>[143]</sup> Továbbá, P7 napos korban adott phencyclidine (PCP) kezelést követően, fiatal felnőtt (P56) korban vizsgált patkányok szintén nem mutattak koexpressziót a Casp-3 és a CR vagy CB között, ami azt jelzi, hogy a CR- és CB-tartalmú neuronok védettek voltak a PCP toxikus hatásától és túléltek felnőttkorig.<sup>[144]</sup>

## 5.4 A dopamint fogadó célterületek változásai

### 5.4.1 Szinaptikus változások értékelése

Az előagyi célterületekre vetülő mesotelencephalicus dopaminerg pálya fejlődésének kezdete a VPA expozíció időablakával esik egybe, ám az axonok végső arborizációja és a szinapszisok kialakulása a posztnatális 7 napos korban még nem fejeződik be.<sup>[145]</sup> Ez alapján következtettünk arra, hogy a dopaminoceptív célterületek szinapszisai jelentősen érintettek lehetnek a VPA kezelés hatására.

Proteomikai eredményeink a TH protein szelektív csökkenését mutatták a NAc-ben, összhangban kutatócsoportunk korábbi neurokémiai és hisztológiai eredményeivel<sup>[46]</sup>, anélkül, hogy egyidejűleg csökkent volna az általunk vizsgált szinaptikus fehérje, a szinaptofizin, szintje. A szinaptofizin értéke itt közvetve a szinapszisok számát reprezentálja.<sup>[117,131]</sup>

Általános megfigyelés, hogy számos ASD modellben, a valproinsav-kezelést is beleértve, kimutathatók strukturális és funkcionális szinaptikus elváltozások.<sup>[144,146,147]</sup> Az emberi és állatmodellekből származó tanulmányok már rámutattak a szinaptikus átrendeződés fontosságára az autizmus kialakulásában. Összességében az emberi és

állati modellekből nyert adatok a dendritek méretének és számának általános csökkenésére, valamint a dendritek morfológiájának megváltozására utalnak. Ezen belül növekszik az éretlen morfológiát mutató dendrittüskék sűrűsége, ami általános tüske éretlenségi állapotra utal autizmus esetén.<sup>[148]</sup>

Egy *in vivo* tanulmány a szinaptikus átvitel és szinaptikus plaszticitás vizsgálatára irányult a mPFC-ben, prenatálisan VPA kezelt posztnatális 30 napos patkányokban. Az eredmények azt mutatták, hogy mind a rövid távú, mind a hosszú távú szinaptikus plaszticitás fokozódott a prenatális VPA-expozíció hatására.<sup>[146]</sup> Meglepő módon, a serdülőkori eredményekkel ellentétben, a prenatálisan VPA-val kezelt patkányok felnőtt korban csökkent szinaptikus funkciót mutatnak, ezen belül csökken az LTP, míg a spontán aktivitás zavartalan.<sup>[149]</sup> A fiatalkori hiperfunkcióról a felnőttkori hipofunkcióra való váltás a mPFC-ben arra utal, hogy a prenatális VPA-expozíció által kiváltott korai neurális fejlődési károsodás a felnőtt kori szinaptikus organizációt is képes befolyásolni.

Közvetlenül a születés után a BTBR T+tf/J egér (egy idiopátiás autizmus állatmodell) CA3 hippocampális régióját vizsgálva, a GABA és glutamát szinergizmusra épülő koherens hálózati oszcillációk súlyosan károsodtak, melynek hatására a CA3 principális sejtek belső ingerlékenysége és a fősejtekre vetítő GABAerg interneuronok söntölési aktivitása csökkent.<sup>[150]</sup> Egy másik tanulmányban terhesség alatti anyai immunaktiváció után vizsgálták újszülött, P0-P2 napos utódok CA1 hippocampális piramissejtjeit. A kezelt anyák utódneuronjai szignifikánsan alacsonyabb belső ingerlékenységet és erősebb tüskfrekvencia-adaptációt mutattak.<sup>[151]</sup> Prenatálisan VPA-val kezelt 4 hetes egerekben a hippocampusban csökkent dendrittüske-sűrűséget, valamint a szinaptikus fehérjék (PSD 95, Shank3) mRNS-ek expressziójának csökkenését találták.<sup>[152]</sup> A prenatális VPA kezelést követően csökkent dendrittüske-sűrűséget figyeltek meg 8 hetes hím egerek PFC-ében.<sup>[153]</sup>

Ezzel szemben, megnövekedett dendrittüske-sűrűséget és fokozott neuronális arborizációt találtak a NAc területén prenatálisan VPA expozíciónak kitett felnőtt patkányokban.<sup>[154]</sup> Tekintettel arra, hogy az irodalmi adatok eltérő életkorban, valamint különböző agyterületeken végzett vizsgálatokról számolnak be, mindezen észleleteket nem könnyű összehasonlítani a jelenlegi megállapításainkkal. Ezért is tartjuk különösen fontosnak a következetes kiindulópont rögzítését a folyamatok tipikus, illetve attól

eltérő, károsodott formáinak leírása és interpretálása érdekében. Jelen munkánkban posztnatális 7 napos egerekből származó eredményeink által próbáljuk megérteni azokat a folyamatokat, amelyek a neurális mintázat kialakulásának korai szakaszában történnek, a dopaminerg rostok és az általuk fogadott struktúrák végleges kifejlődése és szinaptikus kapcsolataik kialakulása előtt.

#### 5.4.2 A dopamin tartalmú axonok és a kalciumkötő fehérje-tartalmú neuronok kapcsolatai

Joggal merül fel a kérdés, hogy a mintázat kialakulásában és a szinaptikus szerveződésben megfigyelt változások milyen mértékben tulajdoníthatók a limbicus előagy redukált dopaminerg bemenetének. Ezen kérdés megválaszolása érdekében, megvizsgáltuk a NAc és a TO célterületeken a TH tartalmú axonok és CR-t vagy CB-t expresszáló sejtestek és dendritek kapcsolatait.

A fénymikroszkópos kvantitatív módszerrel megállapított juxtapozíció-változások közvetve az adott szinaptikus kapcsolatok sűrűségének hasonló változásaira utalnak.<sup>[123]</sup> Maguk a szinaptikus struktúrák, azok típusa (pl. szimmetrikus vagy aszimmetrikus), természetesen csak elektronmikroszkóppal azonosíthatók, azonban az irodalmi tapasztalatok alapján<sup>[155]</sup>, szelektív fénymikroszkópos módszerekkel (közte az általunk is használt technikával) a szinapszis-számolás jó megközelítéssel elvégezhető. E módszerek előnye az elektronmikroszkópiával szemben az, hogy sokkal nagyobb agyterületről nyújtanak reprezentatív és összehasonlítható információt.

A NAc területén a TH<sup>+</sup> és CR<sup>+</sup> struktúrák közti juxtapozíciók jelentősen csökkentek a VPA-val kezelt csoportban, míg a TH<sup>+</sup> és CB<sup>+</sup> struktúrák közti juxtapozíciókban nem figyeltünk meg hasonló változást. A CB<sup>+</sup>, CR<sup>+</sup> elemek teljes értékében sem mutatkozott változás a felület-rendereléses módszerrel (20-21. ábra).<sup>[123]</sup> Korábban más mérési technikával is hasonló eredményeket kaptunk, miszerint nem észleltünk változást a CB<sup>+</sup> vagy CR<sup>+</sup> perikarionok mennyiségében a P7 egerekben (11-12. ábra).<sup>[131]</sup>

A TO területén vizsgálatunk az P7 napos egerben sokkal nagyobb számban található CB<sup>+</sup> neuronokra irányult, szemben Seifert és munkatársai eredményeivel<sup>[156]</sup>, akik felnőtt patkányokban a CR neuronpopulációt találták nagyobbak. A NAc-ben

tapasztaltakkal szemben, a TO területén TH<sup>+</sup> és a CB<sup>+</sup> elemek között lényegesen kevesebb juxtapozíciót figyeltünk meg a régió striatumhoz és ventralis pallidumhoz legközelebb eső III. rétegében, a VPA-kezelt csoportban.

Megjegyzendő, hogy a CaBP-t expresszáló sejtek reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos képeken korábban alkalmazott denzitásmérését kiegészítettük az összes CB<sup>+</sup> szövetelem mérésével, konfokális képsorozatokban, felület-renderelés alapján. Figyelemre méltó, hogy míg a TO területén a CB<sup>+</sup> perikarionok számolása esetén nem találtunk különbséget, a felület-rendereléses módszer jelentős CB csökkenést mutatott a VPA-val kezelt állatokban. Ez az eredmény arra utalhat, hogy nem maga a perikarion-szám, hanem a CB<sup>+</sup> neuronok nyúlványrendszere redukálódott, ami megmagyarázná az általunk megfigyelt TH<sup>+</sup> és CB<sup>+</sup> közti juxtapozíciók csökkenését. Ám ezt a változást az is indokolhatja, hogy a VTA felől érkező TH<sup>+</sup> axonok mennyisége szintén csökkent a kezelt P7 napos egerek TO-jában.

Ami a TH<sup>+</sup> elemeket illeti, a NAc területén a felület-rendereléses módszerrel mérve, ezek nem mutattak szignifikáns változást a kezelés hatására. Ez az észlelet nem egyezik (noha közvetlenül ellent sem mond) a kutatócsoportunk által korábban leírt eredményekkel, miszerint a dopaminszint ELISA-val mérve csökkent a NAc területén (a CPu-ban azonban nem).<sup>[47]</sup> Az ellentmondás magyarázata valószínűleg az, hogy az agyminták mérése során a NAc-ként jelölt szövetminta tartalmazta a TO-t is, melynek magas TH tartalma torzíthatta azokat a válaszokat, amelyeket annak idején egységesen a NAc-nek tulajdonítottak.<sup>[47]</sup>

Proteomikai méréseink során, a prenatális VPA kezelést követő TH fehérje csökkenést csak nem szignifikáns trendként tudtuk kimutatni a NAc-ben (CPu-ban nem volt változás). Azonban amikor a TH értéket a szinapszis-specifikus protein (szinaptofizin) párhuzamosan mért (önmagában nem csökkenő) értékével normalizáltuk, a TH csökkenése a VPA-val kezelt állatokban már szignifikánsan kimutatható volt.<sup>[129]</sup> Ezt úgy értékelhetjük, hogy a TH<sup>+</sup> axonok erős redukciót szenvednek a rendelkezésre álló szinaptikus helyekhez viszonyítva. Tehát a TH<sup>+</sup> axonok szinaptizációs valószínűsége a NAc-ben (különösen, hogy a western blot minta 'NAc'-nek nevezett része a TO-t is tartalmazta) szemmel láthatóan csökkent. Ezt követő észleleteink, miszerint jelentősen csökkentek a TH<sup>+</sup> és CB<sup>+</sup> közti juxtapozíciók az TO-ban, valamint a TH<sup>+</sup> és CR<sup>+</sup> közti juxtapozíciók a NAc-ben, alátámasztják ezt a feltételezést. Ezek az

eredmények bizonyítékként szolgálnak arra, hogy csökken azon dopaminerg rostok előfordulása, amelyek szinaptikus kapcsolatokat hoznak létre (jelen esetben különböző kalciumkötő fehérjékkel), a ventrobasisalis előagy legalább két dopamin-recipiens régiójában a NAc-ben és a TO-ban. Jelen észleleteink arra is rámutatnak, hogy a CaBP-expresszáló interneuronok egy csoportja potenciális célstruktúráként szerepelhet a ventrobasisalis előagyi dopaminerg bemenet változását követő szinaptikus átrendeződésben, VPA kezelés hatására.

Míg egyes irodalmi források nem erősítették meg a TH<sup>+</sup> sejtek csökkenését a VTA-ban, sem a TH protein csökkenését a NAc-ben, legalábbis P21 napos egérben <sup>[157]</sup>, mások a dopamin receptorok upregulációjáról számolnak be a VPA-val kezelt anyáktól született felnőtt patkányok NAc-ében. <sup>[158]</sup> Utóbbi valószínűleg egy korábbi ligand (azaz dopamin) deprivációra adott kompenzációs válaszra utal (a dopaminerg rostok redukcióját P7 egerekben valóban észleltük is). <sup>[131]</sup> Az En1<sup>cre/+</sup>, Otx2<sup>flox/flox</sup> mutáns egerekben a ventrobasisalis előagyi régiókban (TO, NAc shell) szelektív TH depléciót, valamint a D1 és D2 receptorok és a foszforilált DARPP-32 upregulációját figyelték meg, a közepagyi dopaminerg neuronok jelentős csökkenését követően. <sup>[159]</sup> Úgy tűnik, hogy a dopamin-recipiens ventrobasisalis előagy rendkívül érzékeny az olyan genomikai és transzkripciós elváltozásokra, amelyek az agypályák fejlődését és a neurális szerveződést érintik. Mind az irodalmi adatok (összefoglalóan <sup>[160]</sup>), mind a jelenlegi megállapításaink alapján, a TO-ban kialakuló mintázat valószínűleg kiemelkedő szerepet játszik a korai dopaminerg szabályozásban.

## 5.5 Általános megbeszélés

Eredményeink arra szolgálnak bizonyítékkul, hogy a prenatális VPA expozíciót követően csökken azoknak a szinaptikus kapcsolatoknak az előfordulási valószínűsége, amelyek a dopaminerg axonok, valamint egyes kalciumkötő fehérjéket tartalmazó interneuronok között jönnek létre, a ventrobasisalis előagy legalább két dopamin-recipiens régiójában, a NAc-ben és a TO-ban. <sup>[123]</sup> Ezenkívül, kísérleti adataink ráirányíthatják a figyelmet a CaBP-expresszáló interneuronok, mint dopamint fogadó célstruktúrák, potenciális jelentőségére a prenatális VPA expozíciót követő szinaptikus reorganizációban.

A szinaptikus kapcsolatok csökkenése mögött állhat egyfelől a dopaminerg axonok redukciója, ami a mesotelencephalicus pálya korábban kimutatott defasciculációjával, a rostbemenet széttartóbbá válásával függhet össze.<sup>[46]</sup> A mesolimbicus pálya hasonló változásairól autista gyermekek diffúziós tenzor képalkotó (DTI) vizsgálata alapján is beszámoltak.<sup>[161]</sup> Ez az elváltozás a limbicus előagyi célpontokhoz futó rostok nettó redukációjához, vagy a középagyi eredetű dopaminerg rostok eltérítéséhez vezethet a ventralis (limbicus) striatumtól a dorsalis striatum felé. Mind a szinaptikus TH protein csökkenése az 'NAc'-ben (beleértve az TO-t) (immunblottinggal meghatározva)<sup>[131]</sup>, mind a TH<sup>+</sup> és CR<sup>+</sup> közti vagy TH<sup>+</sup> és CB<sup>+</sup> közti juxtapozíciók csökkent előfordulása a NAc-ben és a TO-ban<sup>[123]</sup> a dopaminerg input csökkenésére vonatkozó elképzelést támasztja alá, legalábbis a korai posztembrionális fejlődés adott időpontjában.

A jelenlegi eredményeink relevánsak lehetnek a szinaptikus átrendeződésnek egy alternatív/további elemére, a fogadó oldalon bekövetkező változásokra is. A CB redukciója a VPA-val kezelt állatok TO agyterületén tovább csökkentheti az afferens TH<sup>+</sup> axonok szinaptizációjának valószínűségét, feltehetően a rendelkezésre álló szinaptikus felület zsugorodása révén.<sup>[123]</sup> Hogy ez a folyamat fokozott dendrittüskesvesztés (pruning) miatt következik-e be, még további vizsgálatot igényel. Mindenesetre, egy jól meghatározott neurontípus (CB<sup>+</sup>) csökkent dopamin-fogadó képessége olyan tartós szinaptikus átrendeződést modellezhet, amelyet például Martin és Cork<sup>[162]</sup> is megfigyeltek, nem humán főemlősökben, a motivációval kapcsolatos előagyi régiókban (közte a TO-ban), és amelyek potenciálisan az emberi ASD jellemző tüneteire vezethetnek.

## 6. Következtetések

- I. A VPA kezelés hatására fokozott apoptózist figyeltünk meg számos vizsgált régióban, beleértve a mesotelencephalicus pálya kiinduló területeit (VTA, SN), valamint a fogadó területek közül kérgi (ACC, RSC) és subcorticalis (CPu, BNST, LS) régiókat. A változások nem érintik szelektíven a dopaminerg neuronokat.
- II. A CaBP-k közül a CR expressziója csökkent a vizsgált pallialis régiókban, legjelentősebben a retrosplenialis kéregben (RSC), míg a subpallialis területeken nem változott P7 napos egereknél. A VPA-val kezelt állatoknál P7 korban a CB expressziója szelektíven csökkent a CPu területén míg a többi vizsgált területen nem változott. A parvalbumin (PV) sejtek nem mutattak jelentős választ a VPA kezelésre 60 napos korban. A CaBP-immunreaktív neuronok és az apoptotikus (Casp-3<sup>+</sup>) sejtek között nem találtunk kolokalizációt.
- III. Míg a CB P7 korban szelektíven csökkent a CPu-ban a VPA-val kezelt állatoknál, ez a különbség P60 korra eltűnt, ami lehetséges regeneratív mechanizmusra utal.
- IV. A kalciumköti fehérjéket tartalmazó neuronok a VTA területén nagy mértékben, míg a SN területén kis mértékben koexpresszálódtak a TH fehérjével P7 korban. Mindkét közepagi magban fokozott expressziót mutattak a CR<sup>+</sup> sejtek VPA kezelés hatására, ám ez a TH-val koexpressziót mutató sejteket nem érintette.
- V. A proteomikai eredmények a TH csökkenését jelzik a NAc-ban, de a CPu-ban nem, anélkül, hogy a szinaptikus fehérje, a szinaptofizin egyidejű csökkenése megfigyelhető lenne, ami a dopaminerg szinapszisok szelektív károsodására utal.
- VI. A VPA-val kezelt egerekben a NAc-ban a TH<sup>+</sup> és CR<sup>+</sup>, míg a TO-ban a TH<sup>+</sup> és CB<sup>+</sup> közti juxtapozíciók redukción szenvedtek, továbbá a TH<sup>+</sup> és CB<sup>+</sup> elemek térfogataránya is jelentősen csökkent.

A ventrobazalis előagyi célterületek megváltozott dopaminerg bemenete a késői embrionális fejlődés során valószínűleg megzavarja a neurális és szinaptikus architektúra fejlődését és megszilárdulását. A neuronális mintázatban bekövetkező tartós változások (amelyeket itt egyes dopamin-receptiens interneuronok csökkent szinaptikus bemeneteként észleltünk) éppen azokban a ventrobazalis előagyi régiókban jönnek létre, amelyek különösen a motiváció és jutalmazás szempontjából fontosak.

## 7. Összefoglalás

Az egerek prenatalis valproinsav (VPA) expozíciója az autizmus spektrum zavarhoz (ASD) kapcsolódó tipikus tünetek vizsgálatára használt kísérleti modell. Kutatócsoportunk korábbi kvantitatív vizsgálatai jelentős csökkenést és defasciculációt mutattak ki a VPA-val kezelt egerek mesotelencephalicus pályájában (mt), valamint szöveti dopaminszint csökkenését a nucleus accumbensben (NAc), szemben a caudatoputamennel (CPu). Jelen tanulmányban feltételeztük, hogy a VTA dopaminerg neuronjainak számbeli csökkenése és a mt pálya fejlődésének zavara módosítja a dopaminoceptív célrégiók mintázatának kialakulását. Vizsgáltuk a prenatalis VPA kezelés által kiváltott sejtszintű- (apoptózis, Ca-kötő fehérjék (CaBP)), valamint szinapszis szintű változásokat (fehérjeszint-mérés, tirozin-hidroxiláz (TH) pozitív axonterminálisok korrelatív eloszlása, kapcsolata a preszinaptikus calretinint (CR) vagy calbindint (CB) tartalmazó célneuronokkal), kiválasztott subpallialis és pallialis területeken, P7 napos (bizonyos esetekben P60 napos) egerekben. A VPA kezelés hatására fokozott apoptózist figyeltünk meg szinte minden vizsgált régióban. A CaBP-k közül a CR expressziója csökkent a vizsgált pallialis régiókban, legjelentősebben a retrosplenialis kéregben (RSC), míg a subpallialis területeken nem változott P7 napos egereknél. A CB szelektíven csökkent a CPu-ban a VPA-val kezelt állatoknál P7 korban, de ez P60 korban helyreállt. A parvalbumin (PV) sejtek nem mutattak jelentős választ a VPA kezelésre 60 napos korban. A CaBP-immunreaktív neuronok és az apoptotikus (Casp-3<sup>+</sup>) sejtek között nem találtunk kolokalizációt. A proteomikai eredmények a TH csökkenését jelzik a NAc-ban, de a CPu-ban nem, anélkül, hogy a szinaptikus fehérje, a szinaptofizin egyidejű csökkenése megfigyelhető lenne, ami a dopaminerg szinapszisok szelektív károsodására utal. A VPA-val kezelt egerekben a NAc-ban a TH<sup>+</sup> és CR<sup>+</sup>, míg a TO-ban a TH<sup>+</sup> és CB<sup>+</sup> közti juxtapozíciók redukciót szenvedtek, továbbá a TH<sup>+</sup> és CB<sup>+</sup> elemek térfogataránya is jelentősen csökkent. A ventrobazalis előagyi célterületek megváltozott dopaminerg bemenete a késői embrionális fejlődés során tehát megzavarja a neurális és szinaptikus architektúra fejlődését és megszilárdulását, ami a későbbi autizmus-szerű változások alapjául szolgálhat.



## 8. Irodalomjegyzék

1. American Psychiatric Association, DSM-4 Task Force. (2000). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-4™* (4th ed.). American Psychiatric Publishing
2. American Psychiatric Association, DSM-5 Task Force. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5™* (5th ed.). American Psychiatric Publishing
3. Chaste P, Leboyer M. Autism risk factors: genes, environment, and gene-environment interactions. *Dialogues Clin Neurosci*. 2012 Sep;14(3):281-92.
4. Loomes R, Hull L, Mandy WPL. What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2017 Jun;56(6):466-474.
5. Kang DW, Adams JB, Gregory AC, Borody T, Chittick L, Fasano A, Khoruts A, Geis E, Maldonado J, McDonough-Means S, Pollard EL, Roux S, Sadowsky MJ, Lipson KS, Sullivan MB, Caporaso JG, Krajmalnik-Brown R. Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome*. 2017 Jan 23;5(1):10.
6. Steffenburg S, Gillberg C, Hellgren L, Andersson L, Gillberg IC, Jakobsson G, Bohman M. A twin study of autism in Denmark, Finland, Iceland, Norway and Sweden. *J Child Psychol Psychiatry*. 1989 May;30(3):405-16.
7. Gaugler T, Klei L, Sanders SJ, Bodea CA, Goldberg AP, Lee AB, Mahajan M, Manaa D, Pawitan Y, Reichert J, Ripke S, Sandin S, Sklar P, Svantesson O, Reichenberg A, Hultman CM, Devlin B, Roeder K, Buxbaum JD. Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nat Genet*. 2014 Aug;46(8):881-5.
8. Satterstrom FK, Kosmicki JA, Wang J, Breen MS, De Rubeis S, An JY, Peng M, Collins R, Grove J, Klei L, Stevens C, Reichert J, Mulhern MS, Artomov M, Gerges S, Sheppard B, Xu X, Bhaduri A, Norman U, Brand H, Schwartz G, Nguyen R, Guerrero EE, Dias C; Autism Sequencing Consortium; iPSYCH-Broad Consortium; Betancur C, Cook EH, Gallagher L, Gill M, Sutcliffe JS, Thurm A, Zwick ME, Børglum AD, State MW, Cicek AE, Talkowski ME, Cutler DJ, Devlin B, Sanders SJ, Roeder K, Daly MJ, Buxbaum JD. Large-Scale Exome

- Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell*. 2020 Feb 6;180(3):568-584.e23.
9. Lord C, Brugha TS, Charman T, Cusack J, Dumas G, Frazier T, Jones EJJ, Jones RM, Pickles A, State MW, Taylor JL, Veenstra-VanderWeele J. Autism spectrum disorder. *Nat Rev Dis Primers*. 2020 Jan 16;6(1):5.
  10. Lorenzi E, Pross A, Rosa-Salva O, Versace E, Sgadò P, Vallortigara G. Embryonic Exposure to Valproic Acid Affects Social Predispositions for Dynamic Cues of Animate Motion in Newly-Hatched Chicks. *Front Physiol*. 2019 Apr 30;10:501.
  11. Lai CS, Fisher SE, Hurst JA, Vargha-Khadem F, Monaco AP. A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature*. 2001 Oct 4;413(6855):519-23.
  12. Hammond R, Blaess S, Abeliovich A. Sonic hedgehog is a chemoattractant for midbrain dopaminergic axons. *PLoS One*. 2009 Sep 23;4(9): e7007.
  13. Blaess S, Bodea GO, Kabanova A, Chanet S, Mugniery E, Derouiche A, Stephen D, Joyner AL. Temporal-spatial changes in Sonic Hedgehog expression and signaling reveal different potentials of ventral mesencephalic progenitors to populate distinct ventral midbrain nuclei. *Neural Dev*. 2011 Jun 20; 6:29.
  14. Andersson ER, Prakash N, Cajanek L, Minina E, Bryja V, Bryjova L, Yamaguchi TP, Hall AC, Wurst W, Arenas E. Wnt5a regulates ventral midbrain morphogenesis and the development of A9-A10 dopaminergic cells in vivo. *PLoS One*. 2008;3(10):e3517.
  15. Blakely BD, Bye CR, Fernando CV, Horne MK, Macheda ML, Stacker SA, Arenas E, Parish CL. Wnt5a regulates midbrain dopaminergic axon growth and guidance. *PLoS One*. 2011 Mar 31;6(3): e18373.
  16. Arnett JJ, Žukauskienė R, Sugimura K. The new life stage of emerging adulthood at ages 18-29 years: implications for mental health. *Lancet Psychiatry*. 2014 dec;1(7):569-76.
  17. Hacoheh-Kleiman G, Moaraf S, Kapitansky O, Gozes I. Sex-and Region-Dependent Expression of the Autism-Linked ADNP Correlates with Social- and Speech-Related Genes in the Canary Brain. *J Mol Neurosci*. 2020 nov;70(11):1671-1683.

18. Vulih-Shultzman I, Pinhasov A, Mandel S, Grigoriadis N, Touloumi O, Pittel Z, Gozes I. Activity-dependent neuroprotective protein snippet NAP reduces tau hyperphosphorylation and enhances learning in a novel transgenic mouse model. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 Nov;323(2):438-49.
19. Cho H, Yoo T, Moon H, Kang H, Yang Y, Kang M, Yang E, Lee D, Hwang D, Kim H, Kim D, Kim JY, Kim E. Adnp-mutant mice with cognitive inflexibility, CaMKIIalpha hyperactivity, and synaptic plasticity deficits. *Mol Psychiatry*. 2023 aug;28(8):3548-3562.
20. Malishkevich A, Amram N, Hacoheh-Kleiman G, Magen I, Giladi E, Gozes I. Activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) exhibits striking sexual dichotomy impacting on autistic and Alzheimer's pathologies. *Transl Psychiatry*. 2015 Feb 3;5(2):e501.
21. Chen J, Alberts I, Li X. Dysregulation of the IGF-I/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in autism spectrum disorders. *Int J Dev Neurosci*. 2014 Jun;35:35-41.
22. Kazdoba TM, Leach PT, Crawley JN. Behavioral phenotypes of genetic mouse models of autism. *Genes Brain Behav*. 2016 Jan;15(1):7-26.
23. Hershey JW, Sonenberg N, Mathews MB. Principles of translational control: an overview. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Dec 1;4(12):a011528.
24. Modabbernia A, Velthorst E, Reichenberg A. Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Mol Autism*. 2017 Mar 17; 8:13.
25. Masini E, Loi E, Vega-Benedetti AF, Carta M, Doneddu G, Fadda R, Zavattari P. An Overview of the Main Genetic, Epigenetic and Environmental Factors Involved in Autism Spectrum Disorder Focusing on Synaptic Activity. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 5;21(21):8290.
26. Adalsteinsson BT, Ferguson-Smith AC. Epigenetic control of the genome-lessons from genomic imprinting. *Genes (Basel)*. 2014 Aug 14;5(3):635-55.
27. Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J*. 2001 Dec 17;20(24):6969-78.

28. Moldrich RX, Leanage G, She D, Dolan-Evans E, Nelson M, Reza N, Reutens DC. Inhibition of histone deacetylase in utero causes sociability deficits in postnatal mice. *Behav Brain Res.* 2013 Nov 15; 257:253-64.
29. Kataoka S, Takuma K, Hara Y, Maeda Y, Ago Y, Matsuda T. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2013 feb;16(1):91-103.
30. Gram L, Flachs H, Würtz-Jørgensen A, Parnas J, Andersen B. Natrium valproate, antiepileptic effect--serum concentration. A controlled study *Ugeskr Laeger.* 1979 Jul 2;141(27):1833-7.
31. Tureci E, Asan Z, Eser M, Tanriverdi T, Alkan F, Erdinçler P. The effects of valproic acid and levetiracetam on chicken embryos. *J Clin Neurosci.* 2011 Jun;18(6):816-20.
32. Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, Nelson S, Romano J. Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *J Comp Neurol.* 1996 Jun 24;370(2):247-61.
33. Schneider T, Przewłocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology.* 2005 Jan;30(1):80-9.
34. Wagner GC, Reuhl KR, Cheh M, McRae P, Halladay AK. A new neurobehavioral model of autism in mice: pre- and postnatal exposure to sodium valproate. *J Autism Dev Disord.* 2006 Aug;36(6):779-93.
35. Rouillet FI, Lai JK, Foster JA. In utero exposure to valproic acid and autism--a current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicol Teratol.* 2013 Mar-Apr;36:47-56.
36. Nicolini C, Fahnestock M. The valproic acid-induced rodent model of autism. *Exp Neurol.* 2018 Jan;299(Pt A):217-227.
37. Wu HF, Chen PS, Chen YJ, Lee CW, Chen IT, Lin HC. Alleviation of N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Dependent Long-Term Depression via Regulation of the Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Pathway in the Amygdala of a Valproic Acid-Induced Animal Model of Autism. *Mol Neurobiol.* 2017 Sep;54(7):5264-5276.
38. Baronio D, Puttonen HAJ, Sundvik M, Semenova S, Lehtonen E, Panula P. Embryonic exposure to valproic acid affects the histaminergic system and the

- social behaviour of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Br J Pharmacol*. 2018 Mar;175(5):797-809.
39. Chen J, Lei L, Tian L, Hou F, Roper C, Ge X, Zhao Y, Chen Y, Dong Q, Tanguay RL, Huang C. Developmental and behavioral alterations in zebrafish embryonically exposed to valproic acid (VPA): An aquatic model for autism. *Neurotoxicol Teratol*. 2018 Mar-Apr;66:8-16.
  40. Nishigori H, Kagami K, Takahashi A, Tezuka Y, Sanbe A, Nishigori H. Impaired social behavior in chicks exposed to sodium valproate during the last week of embryogenesis. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013 Jun;227(3):393-402.
  41. Sgadò P, Rosa-Salva O, Versace E, Vallortigara G. Embryonic Exposure to Valproic Acid Impairs Social Predispositions of Newly-Hatched Chicks. *Sci Rep*. 2018 Apr 12;8(1):5919.
  42. Zachar G, Tóth AS, Gerecsei LI, Zsebök S, Ádám Á, Csillag A. Valproate Exposure *in ovo* Attenuates the Acquisition of Social Preferences of Young Post-hatch Domestic Chicks. *Front Physiol*. 2019 Jul 16;10:881.
  43. Csillag A, Ádám Á, Zachar G. Avian models for brain mechanisms underlying altered social behavior in autism. *Front Physiol*. 2022 Oct 28; 13:1032046.
  44. Scherer SW, Dawson G. Risk factors for autism: translating genomic discoveries into diagnostics. *Hum Genet*. 2011 Jul;130(1):123-48.
  45. Chaliha D, Albrecht M, Vaccarezza M, Takechi R, Lam V, Al-Salami H, Mamo J. A Systematic Review of the Valproic-Acid-Induced Rodent Model of Autism. *Dev Neurosci*. 2020;42(1):12-48. doi: 10.1159/000509109.
  46. Park G, Jang WE, Kim S, Gonzales EL, Ji J, Choi S, Kim Y, Park JH, Mohammad HB, Bang G, Kang M, Kim S, Jeon SJ, Kim JY, Kim KP, Shin CY, An JY, Kim MS, Lee YS. Dysregulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway via Rnf146 upregulation in a VPA-induced mouse model of autism spectrum disorder. *Exp Mol Med*. 2023 Aug;55(8):1783-1794.
  47. Ádám Á, Kemecei R, Company V, Murcia-Ramón R, Juárez I, Gerecsei LI, Zachar G, Echevarría D, Puelles E, Martínez S, Csillag A. Gestational Exposure to Sodium Valproate Disrupts Fasciculation of the Mesotelencephalic Dopaminergic Tract, With a Selective Reduction of Dopaminergic Output From the Ventral Tegmental Area. *Front Neuroanat*. 2020 Jun 5;14:29.

48. Dahlström A, Fuxe K. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*. 1964 Jul 15;20(7):398-9.
49. Moore KE, Demarest KT, Johnston CA. Influence of prolactin on dopaminergic neuronal systems in the hypothalamus. *Fed Proc*. 1980 Sep;39(11):2912-6.
50. Harrington KA, Augood SJ, Kingsbury AE, Foster OJ, Emson PC. Dopamine transporter (Dat) and synaptic vesicle amine transporter (VMAT2) gene expression in the substantia nigra of control and Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996 Feb;36(1):157-62.
51. Luciana M, Nelson CA. The functional emergence of prefrontally-guided working memory systems in four- to eight-year-old children. *Neuropsychologia*. 1998 Mar;36(3):273-93.
52. Salamone JD, Correa M, Nunes EJ, Randall PA, Pardo M. The behavioral pharmacology of effort-related choice behavior: dopamine, adenosine and beyond. *J Exp Anal Behav*. 2012 Jan;97(1):125-46.
53. Schultz W. Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol*. 1998 Jul;80(1):1-27.
54. Berridge KC, Kringelbach ML. Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008 Aug;199(3):457-80.
55. Kruger TH, Hartmann U, Schedlowski M. Prolactinergic and dopaminergic mechanisms underlying sexual arousal and orgasm in humans. *World J Urol*. 2005; 23:130–8.
56. Fernstrom JD, Fernstrom MH. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *J Nutr*. 2007 Jun;137(6 Suppl 1):1539S-1547S; discussion 1548S.
57. Christenson JG, Dairman W, Udenfriend S. Preparation and properties of a homogeneous aromatic L-amino acid decarboxylase from hog kidney. *Arch Biochem Biophys*. 1970 Nov;141(1):356-67.
58. Bromek E, Haduch A, Gołembiowska K, Daniel WA. Cytochrome P450 mediates dopamine formation in the brain in vivo. *J Neurochem*. 2011 Sep;118(5):806-15.
59. Ferguson CS, Tyndale RF. Cytochrome P450 enzymes in the brain: emerging evidence of biological significance. *Trends Pharmacol Sci*. 2011 Dec;32(12):708-14.

60. Eiden LE, Weihe E. VMAT2: a dynamic regulator of brain monoaminergic neuronal function interacting with drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci.* 2011 Jan;1216:86-98.
61. Weinshilboum RM, Thoa NB, Johnson DG, Kopin IJ, Axelrod J. Proportional release of norepinephrine and dopamine- $\beta$ -hydroxylase from sympathetic nerves. *Science.* 1971 Dec 24;174(4016):1349-51.
62. Bilder RM, Volavka J, Lachman HM, Grace AA. The catechol-O-methyltransferase polymorphism: relations to the tonic-phasic dopamine hypothesis and neuropsychiatric phenotypes. *Neuropsychopharmacology.* 2004 Nov;29(11):1943-61.
63. Bateup HS, Svenningsson P, Kuroiwa M, Gong S, Nishi A, Heintz N, Greengard P. Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs. *Nat Neurosci.* 2008 Aug;11(8):932-9.
64. Horvitz JC. Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience.* 2000;96(4):651-6.
65. Wise RA. Roles for nigrostriatal--not just mesocorticolimbic--dopamine in reward and addiction. *Trends Neurosci.* 2009 Oct;32(10):517-24.
66. Kelley AE, Berridge KC. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci.* 2002 May 1;22(9):3306-11.
67. Fallon JH, Moore RY. Catecholamine innervation of the basal forebrain. III. Olfactory bulb, anterior olfactory nuclei, olfactory tubercle and piriform cortex. *J Comp Neurol.* 1978 Aug 1;180(3):533-44.
68. Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ. Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol.* 2002 Dec 2;454(1):15-33.
69. Lisman JE, Grace AA. The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron.* 2005 Jun 2;46(5):703-13.
70. Hikosaka O, Nakamura K, Sakai K, Nakahara H. Central mechanisms of motor skill learning. *Curr Opin Neurobiol.* 2002 Apr;12(2):217-22.
71. Graybiel AM. The basal ganglia and cognitive pattern generators. *Schizophr Bull.* 1997;23(3):459-69.

72. Haber SN. The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *J Chem Neuroanat.* 2003 Dec;26(4):317-30.
73. Magnusson JE, Fisher K. The involvement of dopamine in nociception: the role of D(1) and D(2) receptors in the dorsolateral striatum. *Brain Res.* 2000 Feb 14;855(2):260-6.
74. Demarest KT, McKay DW, Riegler GD, Moore KE. Biochemical indices of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity during lactation: a lack of response to prolactin. *Neuroendocrinology.* 1983 Feb;36(2):130-7.
75. Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev.* 2001 Dec;22(6):724-63.
76. Snyder-Keller A, Tseng KY, Lyng GD, Graber DJ, O'Donnell P. Afferent influences on striatal development in organotypic cocultures. *Synapse.* 2008 Jul;62(7):487-500.
77. Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, Hauser DN, Bittencourt JC, Correa RG. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cell Mol Neurobiol.* 2019 Jan;39(1):31-59.
78. Bissonette, and Roesch, Development and function of the midbrain dopamine system: what we know and what we need to, *Genes Brain Behav.* 2016 Jan; 15(1): 62–73.
79. Ono Y, Nakatani T, Sakamoto Y, Mizuhara E, Minaki Y, Kumai M, Hamaguchi A, Nishimura M, Inoue Y, Hayashi H, Takahashi J, Imai T. Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. *Development.* 2007 Sep;134(17):3213-25.
80. Brodski C, Weisenhorn DM, Signore M, Sillaber I, Oesterheld M, Broccoli V, Acampora D, Simeone A, Wurst W. Location and size of dopaminergic and serotonergic cell populations are controlled by the position of the midbrain-hindbrain organizer. *J Neurosci.* 2003 May 15;23(10):4199-207.
81. Bayer SA, Wills KV, Triarhou LC, Ghetti B. Time of neuron origin and gradients of neurogenesis in midbrain dopaminergic neurons in the mouse. *Exp Brain Res.* 1995;**105**:191–199



82. Smidt MP, Asbreuk CH, Cox JJ, Chen H, Johnson RL, Burbach JP. A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires *Lmx1b*. *Nat Neurosci*. 2000 Apr;3(4):337-41.
83. Smidt MP, Smits SM, Bouwmeester H, Hamers FP, van der Linden AJ, Hellemons AJ, Graw J, Burbach JP. Early developmental failure of substantia nigra dopamine neurons in mice lacking the homeodomain gene *Pitx3*. *Development*. 2004 Mar;131(5):1145-55.
84. Eells JB. The control of dopamine neuron development, function and survival: insights from transgenic mice and the relevance to human disease. *Curr Med Chem*. 2003 May;10(10):857-70.
85. Hara Y, Takuma K, Takano E, Katashiba K, Taruta A, Higashino K, Hashimoto H, Ago Y, Matsuda T. Reduced prefrontal dopaminergic activity in valproic acid-treated mouse autism model. *Behav Brain Res*. 2015 Aug 1;289:39-47.
86. Marín O, Baker J, Puelles L, Rubenstein JL. Patterning of the basal telencephalon and hypothalamus is essential for guidance of cortical projections. *Development*. 2002 Feb;129(3):761-73.
87. Torre ER, Gutekunst CA, Gross RE. Expression by midbrain dopamine neurons of *Sema3A* and *3F* receptors is associated with chemorepulsion in vitro but a mild in vivo phenotype. *Mol Cell Neurosci*. 2010 Jun;44(2):135-53.
88. Yamauchi K, Mizushima S, Tamada A, Yamamoto N, Takashima S, Murakami F. *FGF8* signaling regulates growth of midbrain dopaminergic axons by inducing semaphorin *3F*. *J Neurosci*. 2009 Apr 1;29(13):4044-55.
89. Kolk SM, Gunput RA, Tran TS, van den Heuvel DM, Prasad AA, Hellemons AJ, Adolfs Y, Ginty DD, Kolodkin AL, Burbach JP, Smidt MP, Pasterkamp RJ. Semaphorin *3F* is a bifunctional guidance cue for dopaminergic axons and controls their fasciculation, channeling, rostral growth, and intracortical targeting. *J Neurosci*. 2009 Oct 7;29(40):12542-57.
90. Brignani S, Pasterkamp RJ. Neuronal Subset-Specific Migration and Axonal Wiring Mechanisms in the Developing Midbrain Dopamine System. *Front Neuroanat*. 2017 Jul 10;11:55.

91. Dugan JP, Stratton A, Riley HP, Farmer WT, Mastick GS. Midbrain dopaminergic axons are guided longitudinally through the diencephalon by Slit/Robo signals. *Mol Cell Neurosci*. 2011 Jan;46(1):347-56.
92. Alsanie WF, Penna V, Schachner M, Thompson LH, Parish CL. Homophilic binding of the neural cell adhesion molecule CHL1 regulates development of ventral midbrain dopaminergic pathways. *Sci Rep*. 2017 Aug 24;7(1):9368.
93. Pavál D. A Dopamine Hypothesis of Autism Spectrum Disorder. *Dev Neurosci*. 2017;39(5):355-360.
94. Chevallier C, Kohls G, Troiani V, Brodtkin ES, Schultz RT: The social motivation theory of autism. *Trends Cogn Sci* 2012;16:231-239.
95. Yáñez M, Gil-Longo J, Campos-Toimil M. Calcium binding proteins. *Adv Exp Med Biol*. 2012;740:461-82.
96. Schwaller B, Meyer M, Schiffmann S. 'New' functions for 'old' proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *Cerebellum*. 2002 Dec;1(4):241-58.
97. Darnell JC, Van Driesche SJ, Zhang C, Hung KY, Mele A, Fraser CE, Stone EF, Chen C, Fak JJ, Chi SW, Licatalosi DD, Richter JD, Darnell RB. FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism *Cell*. 2011 Jul 22;146(2):247-61.
98. Ferron L, Novazzi CG, Pilch KS, Moreno C, Ramgoolam K, Dolphin AC. FMRP regulates presynaptic localization of neuronal voltage gated calcium channels. *Neurobiol Dis*. 2020 May;138:104779.
99. Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH. Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci*. 1992 Aug;15(8):303-8.
100. Mouatt-Prigent A, Agid Y, Hirsch EC. Does the calcium binding protein calretinin protect dopaminergic neurons against degeneration in Parkinson's disease? *Brain Res*. 1994 Dec 30;668(1-2):62-70.
101. Adorjan I, Ahmed B, Feher V, Torso M, Krug K, Esiri M, Chance SA, Szele FG. Calretinin interneuron density in the caudate nucleus is lower in autism spectrum disorder. *Brain*. 2017 Jul 1;140(7):2028-2040.

102. Juarez P, Martínez Cerdeño V. Parvalbumin and parvalbumin chandelier interneurons in autism and other psychiatric disorders. *Front Psychiatry*. 2022 Oct 12;13:913550.
103. Janickova L, Schwaller B. Parvalbumin-Deficiency Accelerates the Age-Dependent ROS Production in Pvalb Neurons *in vivo*: Link to Neurodevelopmental Disorders. *Front Cell Neurosci*. 2020 Sep 28;14:571216.
104. Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci*. 2015 Sep;16(9):551-63.
105. Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, Price DL, Mouton PR. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *J Neurocytol*. 1996 Dec;25(12):821-8.
106. Tripathi MK, Ojha SK, Kartawy M, Khaliulin I, Hamoudi W, Amal H. Mutations associated with autism lead to similar synaptic and behavioral alterations in both sexes of male and female mouse brain. *Sci Rep*. 2024 Jan 4;14(1):10.
107. Kim S, Oh H, Choi SH, Yoo YE, Noh YW, Cho Y, Im GH, Lee C, Oh Y, Yang E, Kim G, Chung WS, Kim H, Kang H, Bae Y, Kim SG, Kim E. Postnatal age-differential ASD-like transcriptomic, synaptic, and behavioral deficits in Myt11-mutant mice. *Cell Rep*. 2022 Sep 20;40(12):111398.
108. Hernandez A, Delgado-González E, Durairaj RV, Reyes-Haro D, Martínez-Torres A, Espinosa F. Striatal synaptic changes and behavior in adult mouse upon prenatal exposure to valproic acid. *Brain Res*. 2023 Sep 15;1815:148461.
109. Wei H, Alberts I, Li X. The apoptotic perspective of autism. *Int J Dev Neurosci*. 2014 Aug;36:13-8.
110. Yu N, Huang Y, Jiang Y, Zou L, Liu X, Liu S, Chen F, Luo J, Zhu Y. Ganoderma lucidum Triterpenoids (GLTs) Reduce Neuronal Apoptosis via Inhibition of ROCK Signal Pathway in APP/PS1 Transgenic Alzheimer's Disease Mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Jan 28; 2020:9894037.
111. Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Turmel H, Srinivasan A, Ruberg M, Evan GI, Agid Y, Hirsch EC. Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 14;97(6):2875-80.

112. Sheikh AM, Li X, Wen G, Tauqeer Z, Brown WT, Malik M. Cathepsin D and apoptosis related proteins are elevated in the brain of autistic subjects. *Neuroscience*. 2010 Jan 20;165(2):363-70.
113. Siniscalco D, Sapone A, Giordano C, Cirillo A, de Novellis V, de Magistris L, Rossi F, Fasano A, Maione S, Antonucci N. The expression of caspases is enhanced in peripheral blood mononuclear cells of autism spectrum disorder patients. *J Autism Dev Disord*. 2012 Jul;42(7):1403-10.
114. MacFabe D., Rodriguez- K., Hoffman J., Franklin A., Mohammad-A Y., Taylor A., et al. A Novel Rodent Model of Autism: Intraventricular Infusions of Propionic Acid Increase Locomotor Activity and Induce Neuroinflammation and Oxidative Stress in Discrete Regions of Adult Rat Brain. *Am. J. Biochem. Biotechnol*. 2008 Apr;4(2), 146–166.
115. Khalil SR, Abd-Elhakim YM, Selim ME, Al-Ayadhi LY. Apitoxin protects rat pups brain from propionic acid-induced oxidative stress: The expression pattern of Bcl-2 and Caspase-3 apoptotic genes. *Neurotoxicology*. 2015 Jul;49:121-31.
116. Paxinos G., Franklin K. B. J. (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates: Hard cover edition*. Amsterdam: Elsevier.
117. Schätzle P, Wuttke R, Ziegler U, Sonderegger P. Automated quantification of synapses by fluorescence microscopy. *J Neurosci Methods*. 2012 Feb 15;204(1):144-149.
118. Klenowski PM, Fogarty MJ, Belmer A, Noakes PG, Bellingham MC, Bartlett SE. Structural and functional characterization of dendritic arbors and GABAergic synaptic inputs on interneurons and principal cells in the rat basolateral amygdala. *J Neurophysiol*. 2015 Aug;114(2):942-57.
119. Costes SV, Daelemans D, Cho EH, Dobbin Z, Pavlakis G, Lockett S. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J*. 2004 Jun;86(6):3993-4003.
120. Yu Z, Guindani M, Grieco SF, Chen L, Holmes TC, Xu X. Beyond t test and ANOVA: applications of mixed-effects models for more rigorous statistical analysis in neuroscience research. *Neuron*. 2022 Jan 5;110(1):21-35.

121. Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem.* 1998 Apr 17;273(16):9357-60.
122. Dekkers MP, Nikolettou V, Barde YA. Cell biology in neuroscience: Death of developing neurons: new insights and implications for connectivity. *J Cell Biol.* 2013 Nov 11;203(3):385-93.
123. Finszter CK, Kemecei R, Zachar G, Ádám Á, Csillag A. Gestational VPA exposure reduces the density of juxtapositions between TH+ axons and calretinin or calbindin expressing cells in the ventrobasal forebrain of neonatal mice. *Front Neuroanat.* 2024 Jul 4;18:1426042.
124. Hwang DY, Ardayfio P, Kang UJ, Semina EV, Kim KS. Selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of Pitx3-deficient aphakia mice. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003;114:123–131.
125. Nunes I, Tovmasian LT, Silva RM, Burke RE, Goff SP. Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:4245–4250.
126. Korotkova TM, Ponomarenko AA, Haas HL, Sergeeva OA. Differential expression of the homeobox gene Pitx3 in midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci.* 2005;22:1287–1293.
127. Veenvliet JV, Dos Santos MT, Kouwenhoven WM, von Oerthel L, Lim JL, van der Linden AJ, Koerkamp MJ, Holstege FC, Smidt MP. Specification of dopaminergic subsets involves interplay of En1 and Pitx3. *Development.* 2013 Aug;140(16):3373-84.
128. Albéri L, Sgadò P, Simon HH. Engrailed genes are cell-autonomously required to prevent apoptosis in mesencephalic dopaminergic neurons. *Development.* 2004 Jul;131(13):3229-36.
129. Sonnier L, Le Pen G, Hartmann A, Bizot JC, Trovero F, Krebs MO, Prochiantz A. Progressive loss of dopaminergic neurons in the ventral midbrain of adult mice heterozygote for Engrailed1. *J Neurosci.* 2007;27:1063–1071.
130. Sgadò P, Alberi L, Gherbassi D, Galasso SL, Ramakers GM, Alavian KN, Smidt MP, Dyck RH, Simon HH. Slow progressive degeneration of nigral dopaminergic

- neurons in postnatal Engrailed mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:15242–15247.
131. Finszter CK, Kemecei R, Zachar G, Holtkamp S, Echevarría D, Adorján I, Ádám Á, Csillag A. Early cellular and synaptic changes in dopaminoceptive forebrain regions of juvenile mice following gestational exposure to valproate. *Front Neuroanat*. 2023 Aug 3;17:1235047.
  132. Southwell DG, Paredes MF, Galvao RP, Jones DL, Froemke RC, Sebe JY, Alfaro-Cervello C, Tang Y, Garcia-Verdugo JM, Rubenstein JL, Baraban SC, Alvarez-Buylla A. Intrinsically determined cell death of developing cortical interneurons. *Nature*. 2012 Nov 1;491(7422):109-13.
  133. Nikolić M, Gardner HA, Tucker KL. Postnatal neuronal apoptosis in the cerebral cortex: physiological and pathophysiological mechanisms. *Neuroscience*. 2013 Dec 19;254:369-78.
  134. Adám A, Gerecsei LI, Lepesi N, Csillag A. Apoptotic effects of the 'designer drug' methylenedioxypyrovalerone (MDPV) on the neonatal mouse brain. *Neurotoxicology*. 2014 Sep;44:231-6.
  135. García-Domínguez I, Suárez-Pereira I, Santiago M, Pérez-Villegas EM, Bravo L, López-Martín C, Roca-Ceballos MA, García-Revilla J, Espinosa-Oliva AM, Rodríguez-Gómez JA, Joseph B, Berrocoso E, Armengol JÁ, Venero JL, Ruiz R, de Pablos RM. Selective deletion of Casp-3 gene in the dopaminergic system exhibits autistic-like behaviour. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2021 Jan 10;104:110030.
  136. Petryszyn S, Saidi L, Gagnon D, Parent A, Parent M. The density of calretinin striatal interneurons is decreased in 6-OHDA-lesioned mice. *Brain Struct Funct*. 2021 Jul;226(6):1879-1891.
  137. Liang CL, Sinton CM, German DC. Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: co-localization with Calbindin-D28K and calretinin. *Neuroscience*. 1996 Nov;75(2):523-33.
  138. Mongia S, Yamaguchi T, Liu B, Zhang S, Wang H, Morales M. The Ventral Tegmental Area has calbindin neurons with the capability to co-release glutamate and dopamine into the nucleus accumbens. *Eur J Neurosci*. 2019 Dec;50(12):3968-3984.

139. Fairless R, Williams SK, Diem R. Calcium-Binding Proteins as Determinants of Central Nervous System Neuronal Vulnerability to Disease. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 30;20(9):2146.
140. Allaway KC, Gabitto MI, Wapinski O, Saldi G, Wang CY, Bandler RC, Wu SJ, Bonneau R, Fishell G. Genetic and epigenetic coordination of cortical interneuron development. *Nature.* 2021 Sep;597(7878):693-697.
141. Lauber E, Filice F, Schwaller B. Prenatal Valproate Exposure Differentially Affects Parvalbumin-Expressing Neurons and Related Circuits in the Cortex and Striatum of Mice. *Front Mol Neurosci.* 2016 Dec 21;9:150.
142. del Río JA, de Lecea L, Ferrer I, Soriano E. The development of parvalbumin-immunoreactivity in the neocortex of the mouse. *Brain Res Dev Brain Res.* 1994 Sep 16;81(2):247-59.
143. Lema Tomé CM, Bauer C, Nottingham C, Smith C, Blackstone K, Brown L, Hlavaty C, Nelson C, Daker R, Sola R, Miller R, Bryan R, Turner CP. MK801-induced caspase-3 in the postnatal brain: inverse relationship with calcium binding proteins. *Neuroscience.* 2006 Sep 1;141(3):1351-63.
144. Wang CZ, Yang SF, Xia Y, Johnson KM. Postnatal phencyclidine administration selectively reduces adult cortical parvalbumin-containing interneurons. *Neuropsychopharmacology.* 2008 Sep;33(10):2442-55.
145. Lesting J, Neddens J, Teuchert-Noodt G. Ontogeny of the dopamine innervation in the nucleus accumbens of gerbils. *Brain Res.* 2005 Dec 20;1066(1-2):16-23.
146. Sui L, Chen M. Prenatal exposure to valproic acid enhances synaptic plasticity in the medial prefrontal cortex and fear memories. *Brain Res Bull.* 2012 Apr 10;87(6):556-63.
147. Andoh M, Shibata K, Okamoto K, Onodera J, Morishita K, Miura Y, Ikegaya Y, Koyama R. Exercise Reverses Behavioral and Synaptic Abnormalities after Maternal Inflammation. *Cell Rep.* 2019 Jun 4;27(10):2817-2825.e5.
148. Martínez-Cerdeño V. Dendrite and spine modifications in autism and related neurodevelopmental disorders in patients and animal models. *Dev Neurobiol.* 2017 Apr;77(4):393-404.
149. Martin HG, Manzoni OJ. Late onset deficits in synaptic plasticity in the valproic acid rat model of autism. *Front Cell Neurosci.* 2014 Jan 31;8:23.

150. Cellot G, Maggi L, Di Castro MA, Catalano M, Migliore R, Migliore M, Scattoni ML, Calamandrei G, Cherubini E. Premature changes in neuronal excitability account for hippocampal network impairment and autistic-like behavior in neonatal BTBR T+tf/J mice. *Sci Rep.* 2016 Aug 16;6:31696.
151. Patrich E, Piontkewitz Y, Peretz A, Weiner I, Attali B. Maternal immune activation produces neonatal excitability defects in offspring hippocampal neurons from pregnant rats treated with poly I:C. *Sci Rep.* 2016 Jan 8;6:19106.
152. Yamaguchi H, Hara Y, Ago Y, Takano E, Hasebe S, Nakazawa T, Hashimoto H, Matsuda T, Takuma K. Environmental enrichment attenuates behavioral abnormalities in valproic acid-exposed autism model mice. *Behav Brain Res.* 2017 Aug 30;333:67-73.
153. Hara Y, Ago Y, Taruta A, Hasebe S, Kawase H, Tanabe W, Tsukada S, Nakazawa T, Hashimoto H, Matsuda T, Takuma K. Risperidone and aripiprazole alleviate prenatal valproic acid-induced abnormalities in behaviors and dendritic spine density in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2017 Nov;234(21):3217-3228.
154. Bringas ME, Carvajal-Flores FN, López-Ramírez TA, Atzori M, Flores G. Rearrangement of the dendritic morphology in limbic regions and altered exploratory behavior in a rat model of autism spectrum disorder. *Neuroscience.* 2013 Jun 25;241:170-87.
155. Mishra A, Kim HJ, Shin AH, Thayer SA. Synapse loss induced by interleukin-1 $\beta$  requires pre- and post-synaptic mechanisms. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2012 Sep;7(3):571-8.
156. Seifert U, Härtig W, Grosche J, Brückner G, Riedel A, Brauer K. Axonal expression sites of tyrosine hydroxylase, calretinin- and calbindin-immunoreactivity in striato-pallidal and septal nuclei of the rat brain: a double-immunolabelling study. *Brain Res.* 1998 Jun 8;795(1-2):227-46.
157. Maisterrena A, Matas E, Mirfendereski H, Balbous A, Marchand S, Jaber M. The State of the Dopaminergic and Glutamatergic Systems in the Valproic Acid Mouse Model of Autism Spectrum Disorder. *Biomolecules.* 2022 Nov 15;12(11):1691.
158. Schiavi S, Iezzi D, Manduca A, Leone S, Melancia F, Carbone C, Petrella M, Mannaioni G, Masi A, Trezza V. Reward-Related Behavioral, Neurochemical and



- Electrophysiological Changes in a Rat Model of Autism Based on Prenatal Exposure to Valproic Acid. *Front Cell Neurosci.* 2019 Oct 25;13:479.
159. Borgkvist A, Puelles E, Carta M, Acampora D, Ang SL, Wurst W, Goiny M, Fisone G, Simeone A, Usiello A. Altered dopaminergic innervation and amphetamine response in adult Otx2 conditional mutant mice. *Mol Cell Neurosci.* 2006 Feb;31(2):293-302.
  160. Cansler HL, Wright KN, Stetzik LA, Wesson DW. Neurochemical organization of the ventral striatum's olfactory tubercle. *J Neurochem.* 2020 Feb;152(4):425-448.
  161. Supekar K, Kochalka J, Schaer M, Wakeman H, Qin S, Padmanabhan A, Menon V. Deficits in mesolimbic reward pathway underlie social interaction impairments in children with autism. *Brain.* 2018 Sep 1;141(9):2795-2805.
  162. Martin LJ, Cork LC. The non-human primate striatum undergoes marked prolonged remodeling during postnatal development. *Front Cell Neurosci.* 2014 Sep 22;8:294.

## 9. Saját publikációk jegyzéke

### Disszertációhoz kapcsolódó közlemények, absztraktok és poszterek:

**Finszter CK**, Kemecsei R, Zachar G, Ádám Á, Csillag A. Gestational VPA exposure reduces the density of juxtapositions between TH+ axons and calretinin or calbindin expressing cells in the ventrobasal forebrain of neonatal mice. *Front Neuroanat.* 2024 doi: 10.3389/fnana.2024.1426042.

**Finszter CK**, Kemecsei R, Zachar G, Holtkamp S, Echevarría D, Adorján I, Ádám Á, Csillag A. Early cellular and synaptic changes in dopaminoceptive forebrain regions of juvenile mice following gestational exposure to valproate. *Front Neuroanat.* 2023 doi: 10.3389/fnana.2023.1235047.

**Finszter CK.**; Kemecsei, R.; Zachar, G.; Ádám, Á.; Csillag A., Gestational VPA exposure reduces the density of juxtapositions between TH+ axons and calretinin or calbindin expressing cells in the ventrobasal forebrain of neonatal mice Federation of European Neuroscience Societies (2024), Vienna, Poster PS05-28AM-062

### Disszertációtól független közlemények, absztraktok és poszterek:

Bruzsik B, Biro L, Zelena D, Sipos E, Szebik H, Sarosdi KR, Horvath O, Farkas I, Csillag V, **Finszter CK**, Mikics E, Toth M. Somatostatin Neurons of the Bed Nucleus of Stria Terminalis Enhance Associative Fear Memory Consolidation in Mice. *J Neurosci.* (2021) 41(9):1982-1995. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1944-20.2020.

Adorjan I, Tyler T, Bhaduri A, Demharter S, **Finszter CK**, Bako M, Sebok OM, Nowakowski TJ, Khodosevich K, Møllgård K, Kriegstein AR, Shi L, Hoerder-Suabedissen A, Ansorge O, Molnár Z. Neuroserpin expression during human brain development and in adult brain revealed by immunohistochemistry and single cell RNA sequencing. *J Anat.* (2019) 235(3):543-554. doi: 10.1111/joa.12931.

**Finszter, C. K.**; Tyler, T.; Frank, E.; Szmecana, K.; Fehér, V.; Menassa, D. A.; Al-Dalahmah, O.; Goldman, J. E.; Adorjan, I. Glial heterogeneity in the human cortex and striatum revealed by immunohistochemistry, qPCR and single cell RNA sequencing In: Abstracts Book of XIV. European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (2019)

## 10. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőimnek Dr. Ádám Ágotának és Dr. Adorján Istvánnak, hogy elvállalták doktori témavezetésemet. Hálámat szeretném kifejezni Dr. Ádám Ágota támogatásáért, mellyel munkám során megtisztelt.

Ezúton szeretném megköszönni Prof. Dr. Csillag Andrásnak, hogy lehetőséget adott a kutatócsoportja munkájába való bekapcsolódásra, valamint az érdekes kutatási téma felvetéséért. Mérhetetlenül hálás vagyok, amiért rengeteg tanácsával és segítségével támogatta szakmai fejlődésemet.

Külön köszönet illeti Kemecei Róbert Gergelyt és Dr. Zachar Gergelyt a munkám során nyújtott szakmai és gyakorlati segítségükért.

Szeretnék köszönetet mondani Barátnőmnek és Barátomnak, Pintér Anettnek és Hegyi Lajos Lászlónak, amiért minden nehéz helyzetben mellettem voltak és támogattak. Hálával tartozom dr. Szeifert Györgynek, aki nélkül a doktori iskolai jelentkezésem meghiúsult volna. Köszönettel tartozom Zimmermann Tamásnak rengeteg támogatásáért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm Családomnak, Barátaimnak a türelmet, amit felém tanúsítottak a hosszan tartó tanulmányaim során.