

Hálózati szintű elemzés a szociális agyi aktivációról autista fenotípusú egerekben

Doktori értekezés

Kemecsei Róbert Gergely

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Zachar Gergely, PhD, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Négyessy László, DSC, osztályvezető

Dr. Horváth András, PhD, adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Alpár Alán, MD, DSC, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Várnainé Dr. Tóth Zsuzsanna, PhD, tudományos főmunkatárs

Dr. Kovács Krisztina, DSC, csoportvezető

Budapest
2025

1. Bevezetés

Az autizmus spektrum zavar (ASD) neurológiai fejlődési rendellenesség, amelyet a társas kommunikáció súlyos hiányosságai, a beszűkült, repetitív viselkedésminták és érdeklődési kör jellemez. Etiológiája összetett, genetikai és környezeti tényezők egyaránt hozzájárulnak a kialakulásához.

Az ASD idegrendszeri hátterét célzó kutatások eltéréseket tártak fel több szinten: a szürke- és fehérállomány szerkezetében, a mikrostruktúrák integritásában, az idegsejtek migrációjában, valamint a szinaptikus kapcsolatok és hálózatok fejlődésében. Ezek a változások hozzájárulnak az ASD fő tüneteinek idegrendszeri alapjaihoz. Számos vizsgálat kimutatta, hogy az ASD nem egyetlen agyterület izolált diszfunkciójával magyarázható, hanem több, egymással kapcsolatban álló agyi hálózat rendellenes működése jellemzi. Az O'Connell és Hofmann által javasolt Szociális Döntéshozó Neurális Hálózat (Social Decision-Making Network, SDMN) ígéretes kiindulópontot kínál a társas viselkedés idegi alapjainak vizsgálatához, mivel jól integrálja a szociális és jutalmazó viselkedés agyi komponenseit. Az SDMN két fő funkcionális alhálózatból áll: a Szociális Viselkedési Hálózatból (Social Behavior Network, SBN) és a mezolimbikus jutalmazó rendszerből (Mesolimbic Reward System, MRS). Az SBN azokat az agyterületeket foglalja magába, amelyek a szaporodási, affiliatív és agresszív viselkedésminták szervezéséért felelősek. Az MRS, különösen a ventrális tegmentális area (VTA) és a nucleus accumbens (NAcc) közötti dopaminerg pálya, a szociális ingerek jutalomértékének feldolgozásában játszik kulcsszerepet.

A társas helyzetekkel összefüggő stresszreakciók szabályozásában emellett kiemelt szerepet tölt be a mediális habenula (mHb) és az interpeduncularis nucleus (IPN) alkotta tengely, amely a szociális averzió és elkerülő magatartás idegi hátterében állhat. Az ASD patofiziológiájának megértéséhez ezért

elengedhetetlen az SDMN mellett a stresszszabályozásban részt vevő struktúrák vizsgálata is.

Az autizmus kutatásában elterjedt állatmodell a prenatális valproinsav (VPA) expozíció, amely humán populációkban is összefüggést mutat az ASD fokozott kockázatával. Rágcsálókban a VPA-kezelés szociális viselkedési és neuroanatómiai eltéréseket eredményez, többek között csökkent szociális érdeklődést, fokozott szorongást, amygdala-hiperreaktivitást és konnektivitási zavarokat. A VPA nem specifikusan autizmust okozó szer, hanem hatása attól függ, hogy a fejlődés mely szakaszában történik az expozíció. Különösen a 11. és 14. embrionális napok közötti időablak tekinthető szenzitív periódusnak, amikor az idegrendszeri pályák fejlődése aktívan zajlik. Ebben az időszakban bekövetkező farmakológiai hatás képes tartósan befolyásolni az agyi struktúrák kialakulását.

2. Célkitűzések

A tanulmány célja a prenatális valproinsav-expozíció szociális viselkedésre gyakorolt idegrendszeri hatásainak vizsgálata, különös tekintettel az agyi hálózatok szintjén megjelenő eltérésekre. A kutatás az alábbi három fő kérdéskörre fókuszál:

2.1. Regionális aktiváció

- A VPA-kezelés szociális viselkedésre gyakorolt hatásának mérése viselkedési tesztekkel.
- Azon agyi régiók azonosítása, amelyek c-Fos aktivációja különbözik a VPA-kezelt és a kontroll állatokban különböző szociális állapotokban (konstans társas környezet, szociális szeparáció, szociális újraegyesítés).

2.2. Hálózatszintű elemzés

- A szociális viselkedéshez kapcsolódó neurális hálózatok, köztük az SDMN, MRS, SBN és a stresszregulációs alhálózatok funkcionális kapcsolatrendszerének azonosítása hálózatelemzési eszközökkel.
- A VPA-kezelt és kontroll állatok funkcionális agyi hálózatainak összehasonlítása: központi csomópontok (hubok), hálózati modularitás, kapcsolatmintázatok feltérképezése.
- A viselkedési változók és a c-Fos-aktivációs mintázatok közötti korrelációk vizsgálata.

2.3. Génexpresszió és pályaszerveződés

- A dopaminerg rendszer érintettségének feltárása kvantitatív dopaminszint-méréssel (ELISA), különösen annak vizsgálatára, hogy a dopamin eljut-e a megfelelő célterületekre.
- Az E13.5 embrionális időpontban kifejeződő gének bioinformatikai elemzése, különösen az axonális pályák és dopaminerg rendszerek

fejlődésére fókuszálva, az érintett időablak molekuláris sajátosságainak feltárása érdekében.

3. Módszerek

3.1. Kísérleti állatok és kezelések

A vizsgálathoz fiatal, ivaréretlen C57BL/6 egereket használtunk. Az állatokat 12:12 órás fény-sötét ciklusban, standard laboratóriumi körülmények között tartottuk, vízhez és táplálékhoz szabadon hozzáférhettek. A modellállatok tenyésztéséhez nőstény állatokat időzítve pároztattunk, majd az vemhesség nap 13.5-ik napján kaptak szubkután injekcióban 500 mg/ttkg valproinsavat (VPA) vagy térfogat-azonos fiziológiás sóoldatot (kontroll).

Az utódokból különálló állatcsoport (kohorsz) került felhasználásra.

3.2. Dopaminszint-vizsgálat (ELISA)

Az első kohorszban a kölyköket a postnatális 7. napon (P7) választottuk el, majd az agyukat szekcionáltuk. Összesen 23 állat szerepelt a vizsgálatban (CTR: 5 nőstény, 5 hím; VPA: 6 nőstény, 7 hím). A mintákból meghatározott striatális régiókat (nucleus accumbens és CPU) izoláltuk és dopaminszint-meghatározást végeztünk BioVision DA ELISA kitekkel.

3.3. Viselkedés és c-Fos immunhisztokémia

A második kohorsz hím kölykeit használtunk ($n = 41$). A háromkamrás szociabilitási tesztet a P24-en végeztük. A szociális preferencia és szociális memória tesztelésére. Ezt követően az állatokat ötös csoportokban tartottuk (kevert VPA és CTR), hogy szociális környezetük egységes legyen.

A c-Fos-vizsgálathoz az állatok három különböző szociális állapotban kerültek vizsgálatra a 31. napon:

- Konstans társas környezet: az állatok a kevert-genotípusú otthoni ketrecükben maradtak.
- Szociális szeparáció: 24 órára egyedül helyeztük el őket.

- Szociális újraegyesítés: 24 órás szeparáció után 1,5 órára visszakerültek a közös ketrecbe.

A szociális interakciókat videofelvétel alapján elemeztük, a viselkedések kódolását Solomon Coder szoftverrel végeztük. Az elemzett viselkedések: szociális szaglászás, követés, közeledés, távolmaradás, ön-ápolás és anogenitális szaglászás.

Az állatok agyait 4%-os paraformaldehiddel perfundáltuk, majd 50 µm-es koronális metszeteket készítettünk. A c-Fos expressziót primer antitesttel (Abcam ab190289, 1:5000 hígítás) és Ni-DAB technikával detektáltuk. A szociálisan releváns régiókat (n = 36) az SDMN, SBN, MRS, stresszszabályozó régiók alapján választottuk ki. Minden régióban egy reprezentatív metszet készült, 4× nagyítással rögzítve. A c-Fos-pozitív sejtek számolása ImageJ szoftverrel történt, az adott régiók területéhez normalizálva.

A statisztikai elemzést R-ben végeztük. A dopaminszint-adatokhoz nemparaméteres tesztet alkalmaztunk. A háromkamrás tesztre és c-Fos adatokra lineáris kevert modell illesztésével történt az elemzés, az embrionális kezelés, szociális állapot és régióterület figyelembevételével.

3.4. Funkcionális hálózatelemzés

A funkcionális kapcsolatok feltérképezéséhez a c-Fos expresszió alapján korrelációs mátrixokat hoztunk létre. Az egyes régiók közötti összefüggéseket csak akkor vettük figyelembe, ha azok anatómiailag is megerősített, direkt kapcsolatokkal rendelkeztek. A kapcsolati mátrixok adatainak szűrése kétlépcsős szűrés alapján történt: kizárólag azok a korrelációk kerültek be, amelyek statisztikailag szignifikánsak voltak ($p < 0.05$) és a determinációs együttható értéke meghaladta a 0.7-et ($R^2 > 0.7$).

Vizualizáció és hálózati paraméterek: a kapcsolatok hálózati gráfként kerültek ábrázolásra az igraph R-csomag segítségével. Számított mutatók:

- fokszám (degree) – közvetlen kapcsolatok száma,

- közvetítői központosság (betweenness) – hány leggyorsabb út halad át a régión,
- hub régiók azonosítása – olyan csomópontok, amelyek mindkét mutatóban a 80%-n felül helyezkednek el.
- modularitás – a hálózat alstruktúráinak elkülönülése (Markov Cluster Algorithm),

Ez a módszertani megközelítés lehetővé tette a szociális agy globális szerkezetének és annak diszregulációjának leírását, túlmutatva a régiószintű elemzéseken, és kirajzolva azokat a kulcsfontosságú idegrendszeri közvetítő pontokat, amelyek a VPA-modellezett ASD viselkedési és kognitív tüneteinek hátterében állhatnak.

3.5. Génexpressziós adatbázis-elemzés

A fejlődési időszakban kifejeződő gének azonosításához az Allen Developing Mouse Brain Atlas adatbázisát használtuk. A vizsgálat célja annak feltérképezése volt, hogy az E13.5 embrionális napon mely gének mutatnak túlexpressziót a köztiagy, középgagy, valamint az előagyhólyag területein. Külön figyelmet fordítottunk azokra a génekre, amelyek az pályák fejlődésében vesznek részt.

Az E13.5 időpontban magasabban expresszált géneket összehasonlítottuk az E15.5 időpontban aktív génekkel. A gének funkcionális csoportosítását és a fejlődésben betöltött szerepük dúsulását a MouseMine adatbázis segítségével, hipergeometrikus teszttel és Holm–Bonferroni korrekcióval értékeltük. Ez az elemzés lehetővé tette annak meghatározását, hogy a VPA-kezelés időablaka valóban érzékeny időszak-e a traktus morfológiai fejlődés és a dopaminerg pályák szempontjából.

4. Eredmények

4.1. Szociális viselkedés eltérései

A háromkamrás szociabilitási teszt során a VPA-kezelt állatok szociális preferenciája csökkent. Míg a kontroll csoport az ismeretlen társállatot tartalmazó kamrát preferálta a preferenciafázisban, a VPA-csoportban nem alakult ki hasonló irányultság. A szociális memóriefázisban a kontroll állatok az újonnan behelyezett társállatot részesítették előnyben, míg a VPA-kezelt állatok továbbra is preferenciamentes viselkedést mutattak.

A szociális újraegyesítés első tíz percében az egyes viselkedési típusok időtartamában nem volt szignifikáns különbség a csoportok között. Ugyanakkor a korrelációanalízis rávilágított arra, hogy a kontroll állatok esetében több agyterület aktivációja erős és specifikus kapcsolatot mutatott meghatározott viselkedésmintázatokkal. Ezzel szemben a VPA-csoportban kevesebb és kevésbé szelektív korreláció volt kimutatható, jellemzően az averzív viselkedésekhez kapcsolódóan.

4.2. Dopaminszint (ELISA)

A dopaminszint meghatározása során szignifikáns csökkenést mértünk a nucleus accumbens régióban a VPA-kezelt állatok esetében, különösen hím egyedekben. A caudatus-putamen területén nem mutatkozott csoportközi különbség. Az eltérés a dopaminerg jutalmazórendszer szenzitivitására utalhat.

4.3. Regionális agyi aktiváció (c-Fos expresszió)

A szociális környezet függvényében a c-Fos expresszió különböző aktivációs mintázatokat mutatott. Konstans szociális környezetben a VPA-csoport általánosan alacsonyabb aktivitást mutatott, míg szociális szeparáció hatására a kontroll állatok több agyi területen is fokozott c-Fos expressziót produkáltak. A VPA-csoportban ez a válasz mérsékelten vagy egyáltalán nem jelentkezett. Újraegyesítés után a kontroll állatokban célzott, régióspecifikus aktiváció volt

megfigyelhető, míg a VPA-kezelt állatok diffúz, kiterjedt aktivitást mutattak, amely kevésbé tükrözte a szociális kontextusra adott specifikus válaszokat.

4.4. Funkcionális hálózati mintázatok

A c-Fos alapú korrelációs hálózatok elemzése azt mutatta, hogy a VPA-kezelt állatok hálózatai sűrűbbek és több összeköttetést tartalmaznak, amit a foksám (degree) értékek emelkedése is alátámaszt. Ezzel szemben a közvetítői központiség (betweenness centrality) nem növekedett, ami a hierarchikus szerveződés hiányára utal.

A MCL-alapú klaszteranalízis a hub-régiók körüli hálózati struktúrákban is eltéréseket tárt fel. A kontroll állatok szeparációs állapotában az interpeduncularis mag (IPN) jelent meg központi régióként, míg a VPA-csoportban a ventrális gyrus dentatus (vGD) került előtérbe. Újraegyesítés során a kontroll állatoknál a vCA1 és BNST körüli klaszterek domináltak, míg a VPA-csoportban kizárólag a dorsomedialis hypothalamus (DMH) vált hub-régióvá.

Az a priori definiált hálózatok (pl. SDMN, MRS, stresszregulációs tengely) belső kapcsolaterőssége általánosságban magasabb volt a VPA-kezelt állatokban, kivéve a szociális viselkedési hálózatot (SBN), amely szignifikánsan gyengébb belső összeköttetést mutatott. A klaszterek belső koherenciáját tekintve a vCA1 körüli core-hálózat nem mutatott csoportszintű különbséget, azonban a BNST körüli posterior hálózat a VPA-csoportban szignifikánsan gyengébb kohéziót mutatott, mint a kontroll csoportban.

4.5. Génexpressziós elemzés

Az E13.5 embrionális időpontban erősebben expresszált géneket összevetve az E15.5 időszak expressziós mintázataival, számos, a traktusmorfológiában pályarendszer fejlődésben szerepet játszó gén azonosítható volt. Az eredmények megerősítik, hogy az E13.5 fejlődési időszak különösen érzékeny szakasz a

neurális pályák szerveződésének szempontjából, és a VPA-beavatkozás ebben az ablakban célzottan befolyásolhatja az idegrendszeri kapcsolatok fejlődését.

5. Következtetések

A vizsgálat eredményei alátámasztják, hogy a prenatális valproinsav-kezelés mélyreható változásokat idéz elő a szociális viselkedéshez kapcsolódó agyi hálózatokban. Bár a c-Fos expresszió nem engedte a hatások egyértelmű lokalizációját egyes régiókhoz, a funkcionális hálózatelemzés világosan kirajzolta, hogy az a priori definiált hálózatok – különösen a stresszszabályozó tengely (habenula–interpeduncularis útvonal) – fokozott belső kapcsoltságot, míg a szociális hálózat csökkent integritást mutatott. Ez a mintázat egyfajta „stresszdominanciára” utalhat, ami a VPA-modellekben adaptív szociális válaszok rovására érvényesülhet.

Az újraegyesítési és szeparációs környezetek elemzése alapján az azonosított a posteriori hálózatok (vCA1, BNST) eltérő központi szerepe és csökkent belső kohéziója olyan funkcionális átrendeződésekre utal, amelyek érinthetik a szociális memória és az ismerősfelismerés idegi mechanizmusait. A hálózati centralitás eltolódása a korábban ismert hubrégiókból kevésbé adaptív magok irányába szintén összhangban áll a szociális működés zavarainak idegi alapjaival.

A különböző szociális környezetek hatásai tovább árnyalják ezt a képet: míg a VPA-kezelt állatok kevésbé aktiválták a kontroll állatoknál az izolációra jellemző stresszválaszt, az újraegyesítés során fokozott, kiterjedt, de nem célzott aktivációs mintázatot mutattak, ami arra utal, hogy nem ismerték fel korábbi társállataikat. Ez viselkedési szinten csökkent szociabilitásként és fokozott szociális stresszérzékenységgént manifesztálódott.

A dopaminszint csökkenése, különösen a nucleus accumbens területén, valamint a specifikusan a E13.5 időszakban expresszálandó, az axonális pályaszerveződést és dopaminerg rendszerfejlődést szabályozó gének megerősítik, hogy a VPA-kezelés hatásmechanizmusát nem egy specifikus célrégió, hanem a fejlődési

időzítés határozza meg. Az ekkor történő beavatkozás tartósan megváltoztathatja az ideghálózatok szerveződését és funkcióját.

Eredményeink összességében alátámasztják a VPA-modell relevanciáját az idiopátiás autizmus tanulmányozásában, és rámutatnak a hálózatalapú megközelítések jelentőségére. Az ilyen elemzések túlmutatnak az egyedi régiók vizsgálatán, lehetővé téve, hogy az agyi működés egészére kiterjedően azonosítsuk a kulcsfontosságú csomópontokat és a szociális működés zavarait alátámasztó átrendeződéseket. A jövőbeli kutatásoknak célszerű ezekre a hálózati hubokra és az azokhoz kapcsolódó molekuláris mechanizmusokra fókuszálni, mely nemcsak az ASD megértését, hanem potenciális terápiás célpontok azonosítását is elősegítheti.

6. A dolgozat alapjául szolgáló publikációk

A. Adam, R. Kemecsei, V. Company, R. Murcia-Ramon, I. Juarez, L. I. Gerecsei, G. Zachar, D. Echevarria, E. Puellas, S. Martinez, and A. Csillag, “Gestational Exposure to Sodium Valproate Disrupts Fasciculation of the Mesotelencephalic Dopaminergic Tract, With a Selective Reduction of Dopaminergic Output From the Ventral Tegmental Area,” FRONTIERS IN NEUROANATOMY, vol. 14, 2020. Impact Factor: 3.856

R. G. Kemecsei, S. Dániel-Papp, D. B. Balazs, E. Gebrihiwet, A. Csillag, and G. Zachar, “Disrupted functional connectome in a rodent model of autism during social isolation,” FRONTIERS IN NEURAL CIRCUITS, vol. 19, 2025. Impact Factor: 3.4

7. A szerző további publikációi

G. Zachar, C. Montagnese, E. A. Fazekas, R. G. Kemecsei, S. M. Papp, F. Dóra, É. Renner, A. Csillag, Á. Pogány, and Á. Dobolyi, “Brain Distribution and Sexually Dimorphic Expression of Amylin in Different Reproductive Stages of the Zebra Finch (*Taeniopygia guttata*) Suggest Roles of the Neuropeptide in Song Learning and Social Behaviour,” *FRONTIERS IN NEUROSCIENCE*, vol. 13, 2020. Impact Factor: 4.677

G. Zachar, R. Kemecsei, S. M. Papp, K. Wéber, T. Kisparti, T. Tyler, G. Gáspár, T. Balázs, and A. Csillag, “D-Aspartate consumption selectively promotes intermediate-term spatial memory and the expression of hippocampal NMDA receptor subunits,” *SCIENTIFIC REPORTS*, vol. 11, no. 1, 2021. (Megosztott első szerző) Impact Factor: 4.997

C. K. Finszter, R. Kemecsei, G. Zachar, S. Holtkamp, D. Echevarría, I. Adorján, Á. Ádám, and A. Csillag, “Early cellular and synaptic changes in dopaminoceptive forebrain regions of juvenile mice following gestational exposure to valproate,” *FRONTIERS IN NEUROANATOMY*, vol. 17, 2023. Impact Factor: 2.1

C. K. Finszter, R. Kemecsei, G. Zachar, Á. Ádám, and A. Csillag, “Gestational VPA exposure reduces the density of juxtapositions between TH+ axons and calretinin or calbindin expressing cells in the ventrobasal forebrain of neonatal mice,” *FRONTIERS IN NEUROANATOMY*, vol. 18, 2024. Impact Factor: 2.1