

Állatorvostudományi Egyetem

Biológiai Intézet

Ökológiai Tanszék

**A szociális döntéshozatali hálózat vizsgálata
valproáttal kezelt, autizmus-modell egerekben**

Készítette:

Papp Szilvia Márta

II. évf. Biológus MSc

Témavezető:

Dr. Zachar Gergely, PhD

SE Anatómiai, Szövet-és Fejlődéstani Intézet

Belső konzulens:

Berekméri Eszter

ÁTE Biológiai Intézet, Ökológiai Tanszék

Tartalomjegyzék

Rövidítések	4
Bevezető	5
Az autizmus spektrumzavar és jelentősége a társadalomban	5
A valproát és a valproát-szindróma	6
A valproát története és alkalmazása	6
Valproát-szindróma	7
A valproát farmakokinetikája	10
A szociális döntéshozatali hálózat (SzDH)	13
Bed Nuclei of Stria Terminalis (BNST)	16
Hippokampusz (HIP)	17
Periaquaduktális szürkeállomány (PAG)	19
Ventrális Tegmentális Area (VTA) Interfascikuláris Nucleus-a (IF)	19
Mediális Habenula (MH)	20
Célkitűzés	22
Módszertan	24
Modellállatok, tenyésztés és valproát kezelés	24
A valproát kezelés	25
Kísérleti csoportok kialakítása	25
Háromkamrás szociális újdonság teszt	25
Szeparációs kísérlet	27
Kísérleti elrendezés	27
Az agyak feldolgozása	28
Perfúzió és metszés	28
Immunhisztokémia	28
Metszetek felhúzása és lefedés	29
Mikroszkópia és sejtszámlálás	30
Statisztika	32
Eredmények	33
Az anterior Bed Nuclei of Stria Terminale (aBNST) aktivációja	33
A poszterior Bed Nuclei of Stria Terminale (pBNST) aktivációja	33
A Hippokampusz (Hc) aktivációja	34
A Periaqueductális szürkeállomány (PAG) aktivációja	35

A HIP és a PAG aktivációjának korrelációja a magányos csoportok esetén.....	36
A Ventális Tegmentális Area Interfaszcikuláris Nukleuszának (IF) aktivációja.....	37
A Mediális Habenula (MH) aktivációja.....	38
Az MH és az IF aktivációjának korrelációja a magányos csoportok esetén.....	39
A háromkamrás szociális újdonság teszt eredménye.....	40
Diskusszió.....	42
Összefoglaló	50
Abstract.....	51
Melléklet.....	52
Irodalomjegyzék	56
Köszönetnyilvánítás	68

Rövidítések

Antiepileptikum (AEM)

Autizmus spektrumzavar (ASD)

Bed Nuclei of Stria Terminalis (BNST)

Cerebrospinális folyadék (CSF)

Hippokampusz (HIP)

Interfascikuláris Nucleus (IF)

Központi idegrendszer (CNS)

Lateralis Septum (LS)

Nucleus Accumbens (NAcc)

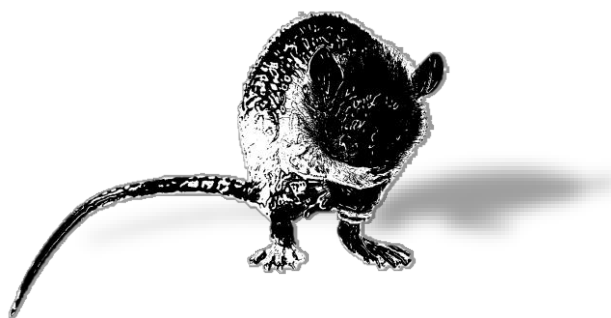
Periaqueduktális szürkeállomány (PAG)

Szociális döntéshozatali hálózat (SzDH)

Substantia Nigra pars compacta (SNc)

Valproát (VPA)

Ventrális Tegmentális Area (VTA)



Bevezető

Az autizmus spektrumzavar és jelentősége a társadalomban

Az autizmus spektrumzavar (ASD) a mentális zavarok között nem egyedülálló módon kapta a „spektrumzavar” elnevezést: mint az a pszichiátriai betegségeknél oly gyakori, az ASD esetén sem csupán egyetlen, átfogóan definiálható betegségről beszélünk, hanem változatos típusú és megjelenésű tünetek különböző súlyosságú variációit felölelő betegségcsoportról (American Psychiatric Association, 2013). Az ASD minden megjelenési formájára igaz azonban, hogy az idegrendszer fejlődési rendellenességeként alakul ki és élethosszig tart. Diagnosztikai kritériumai az alábbiak: a szociális interakciók és a kommunikáció sérülése; korlátolt és repetitív/sztereotíp viselkedésmintázatok; valamint beszűkült és rögeszmés érdeklődés (DiCicco-Bloom et al., 2006; Frith and Happé, 2005; Geschwind and Levitt, 2007; Hamilton, 2015).

Mindezen jellemzők mellett fontos követelmény a diagnózis felállításában, hogy a tünetek kora gyermekkorban jelentkeznek (olyan formában, mint például az arcok iránti közönyösség, vagy motoros zavarok), és a felcseperedő páciens számára klinikailag szignifikáns hátrányt okoznak a tünetek a hétköznapi életben (Hadjikhani et al., 2006; Nebel et al., 2012; Staples and Reid, 2010). A részletes, a klinikumban jelenleg használatos diagnosztikai kritériumokat A Mentális Betegségek Diagnosztikai és Statisztikai Kézikönyve (DSM-5) tartalmazza, ezen kritériumokat magyarázó példákkal együtt a melléklet I. táblázatában foglaltam össze. Az ASD szociális életet érintő tünetei elsősorban nem a szexuális viselkedésben és vonzódásban mutatkoznak meg, hanem az emberi kapcsolatok verbális és nonverbális mozzanatainak megértésében, mint mások hangulata, vágyai, érzései (Schöttle et al., 2017).

Az ASD globális prevalenciájának megállapítása pont a megjelenési formák széles diverzitása miatt rendkívül nehéz feladat, jelen tudásunk szerint 0,6-9 % százalék közé becsülhető, tehát az érintettek száma mindenképp tízmilliós nagyságrendben mérendő

(Agrawal et al., 2018; Elsabbagh et al., 2012). Az ASD különös jellemzője, hogy a férfiak érintettségét 4,5-szörösre becsülik, mely jelentős nemi különbségre kielégítő magyarázat még nem született, így fokozott figyelem irányul az állatmodelleket alkalmazó vizsgálatokban a hím egyedekre (Christensen, 2018).

Bár az ASD etiológiáját a mai napig nem térképeztük fel tökéletesen, annyi bizonyos, hogy számtalan különböző faktor áll a spektrumzavar kialakulásának hátterében, mind genetikai, mind környezeti hatásokat értve ezen faktorok alatt (De Rubeis et al., 2014; Modabbernia et al., 2017). Az egyre növekvő számú, főként fMRI és EEG alapú humán vizsgálatok azt a koncepciót erősítették az elmúlt évtizedekben, hogy az ASD kialakulásáért felelős faktorok bizonyos atipikusan fejlődő, patológiás idegrendszer kialakulásához vezetnek, ahol az egészséges állapothoz képest az egyes agyi hálózatok túl erős vagy éppen túl gyenge összeköttetést mutatnak (Wass, 2011).

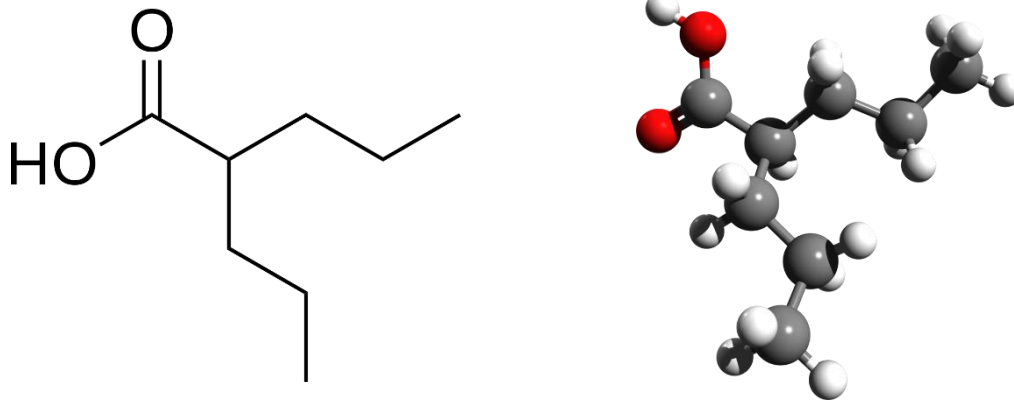
Fontos kiemelni, hogy az ASD-vel kapcsolatos jelenlegi tudásunknak számottevő részét jelentik azok az ún. „újhullámú” kutatások, melyek alapján az ASD számos más patofiziológiai területet érint, mint az emésztő szervrendszer, immunrendszer, metabolikus- és mozgásszervrendszerek (Bhat et al., 2011; Careaga and Ashwood, 2012; Cheng et al., 2017; Julio-Pieper et al., 2014; Sciara et al., 2020).

A valproát és a valproát-szindróma

A valproát története és alkalmazása

Milyen kapcsolatban áll az autizmus spektrumzavar a valproát nevezetű gyógyszerhatóanyaggal, melyet világszerte páciensek ezreinek írnak fel nap mint nap, legfőképp epilepszia kezelésére? A kapcsolat pontos feltárása csaknem fél évszázada tart.

A gyógyszerészet történetében nem egyedülálló módon, a valproát hatóanyagú készítmények globális sikere egy szerencsés, de igazán váratlan felfedezéssel kezdődött, mely felfedezést Pierre Eymard francia kutató tette 1962-ben (Meunier et al., 1963). Eymard munkájában bár indifferens khellin származékok farmakológiai hatását vizsgálta, a munkafolyamat során pusztán vivőanyagként használt valproátról bizonyosságot nyert, hogy erős antikonvulzáns hatással bír. Érdekes módon a valproát legelső publikált szintetizálása jóval Eymard vizsgálatai előtt, 1882-ben történt és Beverly S Burton amerikai kémikus nevéhez köthető, aki a természetben is megtalálható valeriánsav (pl. fogpiszkálófű) származékaként állította elő a valproátot (Burton BS, 1882).



1.ábra: A valproát kémiai szerkezete és struktúrája

Maga a valproát (másképp valproinsav, a továbbiakban VPA) kémiai szerkezete alapján a 2-propilpentánsav nevet viseli, mely igen egyszerűen felrajzolható szerkezet: egy rövid, elágazó szénláncú, telített zsírsav (1.ábra). Burton valószínűleg el sem tudta képzelni, hogy az általa leírt szerves vegyület a jövőben milyen kiemelkedően fontos szerepet tölt majd be a klinikumban, mind pozitív, mind negatív értelemben. Több mint egy évszázad távlatából elmondható, hogy a VPA első vonalbeli antiepileptikum (AEM). Versenytársaival összevetve az egyik legszélesebb spektrumban ható, költséghatékony, és jól ismert mellékhatásprofilal rendelkező epilepsziagyógyszer, mely politerápiák részeként is kiválóan alkalmazható (Marson et al., 2021; National Clinical Guideline Centre (UK), 2012; Perucca, 2002). Ugyanakkor a VPA farmakológiai potenciálja nem merül ki pusztán az epilepszia kezelésében: hatékony megoldás bipoláris zavar, hangulatingadozások és migrén kezelésére is (Bowden, 1998; Freitag et al., 2002; McELROY et al., 1992).

Valproát-szindróma

2018 februárjában az Európai Gyógyszerügynökség Farmakovigilanciai Bizottsága azt javasolta, hogy terhesség alatt a hölgyek lehetőség szerint ne szedjenek VPA-t, amennyiben a páciens rohamai nem bizonyulnak rezisztensnek bármely más gyógykezelésre (European Medicines Agency, 2018a). 2018 májusában (tehát három hónap elteltével) ugyanezen bizottság immár nyomatékosan azt javasolta, hogy azok a hölgyek, akik VPA-kezelésben részesülnek, alkalmazzanak hatékony fogamzásgátló módszereket, és kiemelték, hogy terhesség alatt valóban csak kizárólag a más gyógykezelésre nem reagáló betegek szedik a VPA-t (European Medicines Agency, 2018b). Mióta a 70-es években futótűzként elterjedt Európában a VPA használta, rengetek páciens terhessége alatt is folyamatosan szedte, hiszen

más AEM-kel összevetve a VPA sokkal hatékonyabb kontrollt nyújtott az epilepsziás rohamok felett (Marson et al., 2007). Már egészen az 1980-as évek elejétől kezdve jelentek meg sorra azon publikációk, melyek a terhesség alatti VPA kezelést a magzat súlyos, visszafordíthatatlan károsodásával hozták összefüggésbe, veleszületett deformációkat, rendellenes fejlődési jellegzetességeket jegyeztek fel egymás után (Ardinger et al., 1988, 1988; Clayton-Smith and Donnai, 1995; DiLiberti et al., 1984; Huot et al., 1987; Jäger-Roman et al., 1986; Robert and Guibaud, 1982; Robert and Rosa, 1983). DiLiberti 1984-ben nevezte el a jelenséget valproát-szindrómának, mai napig ez a név használatos terhesség alatti VPA-kitettség okozta magzatkárosodásnak (DiLiberti et al., 1984).

Úgy tűnt, a kutatók erőfeszítései és figyelmeztetései hiábavalók, az első hosszú időintervallumot felölelő kohorsztanulmányok megjelenéséig a valproát-szindróma anekdotikus jelenségnek minősült. Ezen kohorsztanulmányok mindenki számára világossá tették, hogy a VPA súlyos teratogén hatással bír. Jellegzetes hatása az arc diszmorfizmusa (mongolredő, infraorbitális redők jelenléte, lapos ornyereg - *2.ábra*), szkeletális degenerációk (csigolyák és bordák összenövése, megkettőződése, vagy a kifejlődés hiánya, abnormális ujjak, végtagok fejlődése), genitáliák degenerációja (Battino et al., 2009; Meador et al., 2009; Moore, 2000; Omtzigt et al., 1992; Vajda et al., 2004; Wyszynski et al., 2005). A hosszútávú megfigyelések során fény derült azon problémákra is, melyek az újszülöttek, csecsemők korai vizsgálatakor még nem lehetett egyértelmű: a beszédproblémák, kognitív és viselkedési funkciók abnormalitása és neurodevelopmentális problémák, az autizmus spektrumzavar tünetei (Clayton-Smith et al., 2019; Moore, 2000). Bár a mindennemű tünetek súlyossága dózisfüggő és interakcióban áll a gyermek genetikai predispozíciójával, mégis elmondható, hogy a valproát-szindróma a legalacsonyabb kezelési napi dózis mellett



1. ábra: Magzatkorban valproátnak kitett gyerekek a valproát-szindróma jellegzetes arc diszmorfizmusát mutatják (Moore et al., 2000)

ugyanúgy kialakul, mint a klinikumban maximálisan alkalmazott VPA-mennyiség mellett (Mutlu-Albayrak et al., 2017; Ornoy, 2009) (Ornoy 2009, Albayrak 2017).

Jelenlegi tudomásunk szerint a VPA-kitettség esetén fennálló veleszületett rendellenességek esélye 11% körül mozog (Meador et al., 2008; Weston et al., 2016). Ez az esély 24%-ra rúg, ha a napi dózis meghaladja az 1500 mg-ot (Weston et al., 2016). Az ASD prevalenciája azon gyermekeknél, akiknek az édesanyja VPA-t szedett 6-15% között alakul (Bromley et al., 2013; Christensen et al., 2013; Rasalam et al., 2005). Clayton-Smith és munkatársai arra hivatkoznak VPA-szindrómával foglalkozó tanulmányukban, hogy az Egyesült Királyságban azon gyermekek száma, akik fejlődésük során történt VPA-kitettség miatt mutatják az ASD tüneteit 20 000 köré tehető kalkulációk alapján, de egzakt számról nem tudunk. Mindazonáltal az évek előrehaladtával egyre csökkent a precedensek száma, vélhetőleg a kockázat ténye egyre szélesebb körben vált ismertté a klinikumban (Clayton-Smith et al., 2019). Ugyanakkor sajnos nem elég gyorsan: egy Németországban végzett felmérés szerint 2009 és 2017 között a fogamzóképes korú nők neurológusai még 97%-ban VPA-t írtak fel pácienseiknek 2009-ben, 2017-re ez arány csupán 86 %-ra csökkent (Jacob

et al., 2019). Ez a tény nemcsak azért szomorú, mert DiLibert a szindrómát már 1984-ben leírta, hanem azért is, mert a VPA használat kapcsán, mint új gyógyszer értékelésére készült 1977-es terjedelmes tanulmány már kiemelte, hogy az állatkísérletek során a VPA teratogén hatást mutat, ezért fogamzóképes korú nőknek nem javasolt (DiLiberti et al., 1984; Pinder et al., 1977).

Mindezen tragikus precedensekkel párhuzamosan a publikációk között egyre szaporodni kezdett azon kutatások száma, amely az autizmus megértése és jövőbeli terápiás lehetőségei szempontjából nagyon kedvezőek: ezek a VPA-val kezelt modellállatokkal végzett kutatások a mai napig az egyik legelterjedtebb eszközei az autizmus spektrumzavar vizsgálatának (Kataoka et al., 2013; Rouillet et al., 2010; Schneider et al., 2008; Schneider and Przewłocki, 2005; Yang et al., 2016).

A valproát farmakokinetikája

Mi történik a VPA-val, miután valamely módon – orális adminisztrációval, vagy intraparenterális injekción keresztül – bejuttattuk a célszervezetbe? A VPA némely farmakokinetikai tulajdonsága rendkívül eltér a vizsgált állatfajok és az ember esetén, néhány paramétere azonban hasonlóan alakul. A legfontosabb értékek az alábbi táblázatban olvashatóak, az embert és modellállatunk, az egér tekintetében.

A valproát farmakokinetikai tulajdonságai

Faj	Látszólagos eloszlási térfogat (1 kg ⁻¹)	Felezési idő [t _{0,5} (β)] (h)	Biológiai hasznosulás orális adminisztráció esetén (%)	Plazmafehérje- kötés (%)	Agy/vérplazma arány (%)
Ember	0,13-0,19	9-18	70-100	80-95	0,07-0,28
Egér	0,33	0,8	34-47	12	0,15-0,2

(Löscher, 1999)

A VPA biológiai hasznosulása fajfüggő: ember esetén csaknem 100% minden standard adminisztrációforma esetén, rágcsálókban ennél jóval alacsonyabb. Felezési ideje szintén a vizsgált fajtól függ, a legtöbb modellállat esetén jóval rövidebb, mint ahogy azt az embereknél tapasztaljuk, azonban elmondható, hogy a VPA relatíve gyorsan bomlik a célszervezetekben. Szintén fontos különbség fajok között a plazmafehérjékhez való kötődés: pácienseket vizsgálva kiderült, hogy kiemelkedően magas százalékról van szó, míg egerek esetén szinte alig beszélhetünk róla (Löscher, 1999).

Különös módon a VPA-penetráció kinetikájával kapcsolatos tanulmányok feltárták, hogy a VPA hidrofílium ellenére rendkívül gyorsan lép be a központi idegrendszerbe (CNS) (Perucca, 2002). Ezt a jelenséget emberek esetén a VPA magas szérumalbumin-kötése miatt is furcsálhatjuk. A magyarázat, hogy a folyamat mind a vér-liquor (vagyis vér-cerebrospinális folyadék) gáton, mind a véragygáton keresztül csak részben zajlik passzív diffúzióval keresztül, részben azonban kétirányú, probenecid-szenzitív karrier-mediált transzport segítségével történik (Frey and Löscher, 1978; Löscher and Frey, 1984; Shen, 1999). Szintén ismert, hogy az agyi kapillárisok endotheliumán keresztül anioncsere útján is történik VPA belépés, méghozzá közepes- és hosszú szénláncú zsírsavakra szelektív anioncserélő fehérjék által (Levy et al., 2002). Ellenkező irányban, tehát az CNS-ből való kiürülés során, is rendkívül dinamikus zajlik a folyamat, a VPA gyorsan kijut az agyból a véráramba a telíthető, probenecid-szenzitív aktív transzportrendszer útján (Frey and Löscher, 1978; Huai-Yun et al., 1998; Levy et al., 2002; Löscher and Frey, 1984; Shen, 1999). Mindez jó magyarázatot adhat a relatíve alacsony agy/vérplazma VPA arányra és annyi bizonyos, hogy bármilyen célból is használjuk a valproátot, a bejuttatott mennyiség nem fog sok időt az idegrendszerben tölteni.

Az agyban vizsgálva a VPA útját azt láthatjuk, hogy szintén aktív transzportfolyamatok felelnek a VPA neuronokba és gliasejtekbe való bejutásáért, a VPA intracelluláris koncentrációja az agyban ezért nagyobb, mint a szövetközi térben (Levy et al., 2002; Shen, 1999).

A VPA teratogén hatásainak megismerésével fokozódó figyelem irányult arra, hogy miként viselkedik a VPA a terhes kismama szervezetében. Régóta ismert, hogy érdekes módon a VPA ürülése jóval lassabb újszülöttekben, különösképp a koraszülöttekben, mint a felnőttekben (Davis et al., 1994). A VPA farmakokinetikájában szintén megfigyeltek furcsaságokat a terhesség alatt: egy progresszív csökkenés mutatkozott a VPA totális koncentrációjában a terhes anyák vérében, ugyanakkor kevés vagy semmilyen változás nem volt mérhető a nem-kötött koncentrációban (Koerner et al., 1989).

Minden jel arra utalt, hogy a VPA gyorsan halad át a placentán és jut be az embrionális keringésbe (Shen, 1999). A placenta-transzferrel kapcsolatos vizsgálatok közül egy főemlősön (közönséges makákókon (*Macaca fascicularis*)) végzett kísérlet azt mutatta, hogy az ötvenedik gesztációs napon mérve, tehát jócskán az organogenezis időszakában, a VPA a placentán keresztül átjut olyan alacsony dózis esetén is, mint 20 mg/testtömet kg/nap (Jeong et al., 2010). Bár ennél alacsonyabb napi dózis mellett is megfigyelhető teratogén hatás, a klinikumban leggyakrabban alkalmazott dózis ezt bőven meghaladhatja, sőt több mint kétszerese is lehet (Mutlu-Albayrak et al., 2017; Perucca, 2002). A makákók esetén a magzatvíz, placenta és az embrió vérplazma VPA szintje nőtt a dózis emelésével. Az embrió/anya vérplazma VPA aránya 20-30 % körül volt mérhető minden esetben. Egy másik, rézuszmajmokon (*Macaca mulatta*) végzett vizsgálat 200 mg/ttkg/nap dózis alkalmazása mellett a 37. embrionális napon mérve ezt az arány 50%-nak határozta meg (Hendrickx et al., 1988). A terhesség késői időszakában, a 142. gesztációs napon pedig szintén rézuszmajmok esetén 125-145 % között alakult az embrió/anya vérplazmában a VPA aránya, valamint bizonyosságot nyert, hogy a VPA az embrió agyában is kimutatható (Dickinson et al., 1980).

Bár a kutatásokban mutatkozó metodikai különbségek nehezítik az összehasonlítást, mindezen irodalom arra enged minket következtetni, hogy a VPA az embrióban közvetlenül fejtheti ki teratogén hatását, és hogy a terhesség előre haladtával mintegy növekedés mutatkozik az embrióban mérhető VPA szintjében az édesanyához képest.

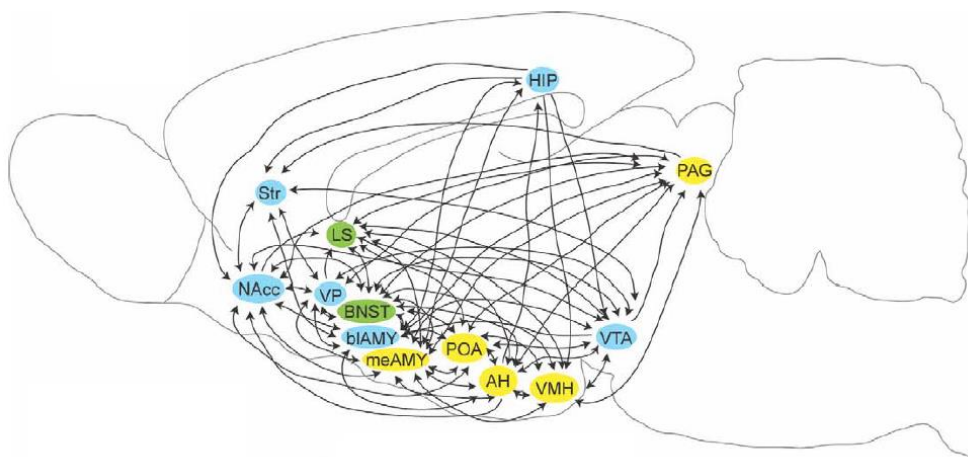
A teratogén hatás mögött álló pontos hatásmechanizmusok a mai napig nem feltérképezettek, jelenleg a VPA-szindróma kialakulásában leginkább gyanúsított mechanizmusok a VPA hisztondeacetiláz-gátló hatása, folsavhiányos állapot előidézése, az oxidatív stressz növelés, valamint az embrionális fejlődésben kulcsfontosságú β catenin-Wnt szignál útvonalak zavarása (Chen et al., 1999; Ornoy, 2009; Vincan et al., 2000). Ismeretes ezenfelül, hogy a VPA antiepileptikus hatását részben a gátló γ -aminovajsav (GABA) neurotranszmitter bizonyos agyterületeken mért szintjének növelésével éri el, valamint antagonistá hatással bír az NMDA-receptorok mediálta neuron-serkentésre és befolyásolja a feszültségfüggő T-típusú Ca^{2+} csatornákat (Löscher, 2002). Bár a szakirodalom nem emelte ki ezen idegrendszeri hatások esetleges szerepét a VPA-szindróma kialakításában, mivel ismeretes, hogy a VPA a magzat idegrendszerében is kimutatható, így feltételezhető, hogy a felsorolt mechanizmusok az idegrendszer fejlődési zavarában is szerepet játszanak.

A szociális döntéshozatali hálózat (SzDH)

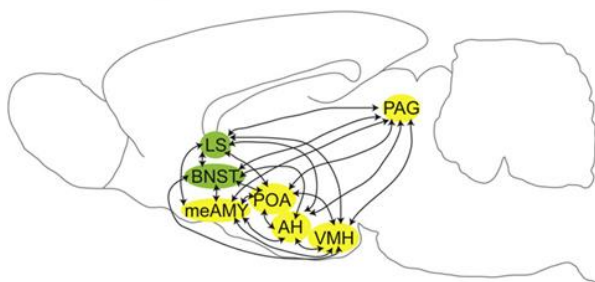
Azt már tudjuk, hogy a VPA hatására – eddig nem tisztázott módon – kialakulnak az ASD specifikus tünetei, köztük jelen kutatás szempontjából a legfontosabb pedig a szociális viselkedés komoly sérülése. Ha meg akarjuk érteni, hogy milyen potenciális patológiás változások okozzák a tüneteket a CNS-ben, akkor be kell vezetnünk a szociális döntéshozatali hálózat (SzDH) fogalmát. Ezen hálózat áttekintésében O’Connell és Hofmann kiváló 2011-es munkájára támaszkodom: a kutatók által felvázolt rendszer integrálja az egyes, szociális viselkedésben és döntéshozásban szerepet játszó specifikus agyterületek gazdag irodalmát egy átfogó, evolúciósan és funkcionálisan is jól körülhatárolható hálózatba (3/A. ábra) (O’Connell és Hofmann, 2011).

Az első pillantásra rendkívül bonyolult hálózat megértésében segít, hogy a szerzők rögtön két alrendszerre tagolják, nevezetesen **a szociális viselkedés hálózatára** (3/B. ábra) és a **mezolimbikus jutalmazási rendszerre** (3/C. ábra).

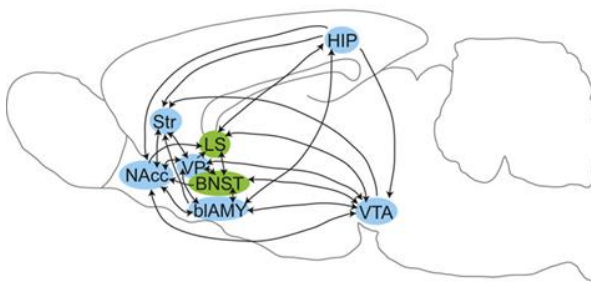
3/A.



3/B.



3/C.

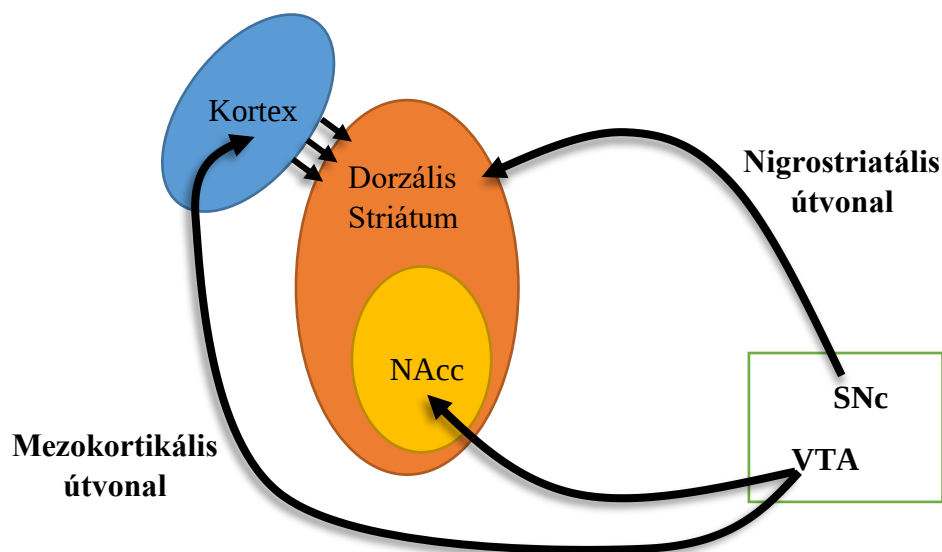


3/A. A szociális döntéshozatali hálózat (SzDH), 3/B. a szociális viselkedés hálózata, 3/C. a mezolimbikus jutalmazási rendszer. (O’Connell és Hofmann, 2011)

A szociális viselkedés hálózata definíció szerint nemi hormon-szenzitív területek összessége, melyek reciprok összeköttetésben állnak egymással és elsősorban a „nemiséggel” kapcsolatos funkciók betöltéséért felelnek: a szaporodásért, a szaporodás motiválta agresszióért és az utódgondozásért mindkét nemben (de Jong et al., 2009; Newman, 1999; Parker et al., 2001; Siegel and Shaikh, 1997). Az elmúlt évtizedekben a viselkedés-neuroendokrinológia tudományterületek összesén végzett kutatások kiterjesztették a szociális viselkedés hálózatáról szóló tudásunkat az emlősökről más gerinces osztályokra, a hüllőkre, madarakra, és valódi csontos halakra, mely arra enged minket következtetni, hogy rendkívül konzervált struktúrák felelősek ezekért a funkciókért (Crews, 2003; Goodson, 2005). Emlősökben ezt a hálózatot a következő magvak és agyterületek építik fel: a laterális szeptum (LS), preoptikus area (POA), ventromediális hypothalamusz (VMH), anterior hypothalamusz (AH), a periaqueductális szürkeállomány (PAG), a mediális amygdala (meAMY), és a bed nucleus of the stria terminalis (BNST – megfelelő magyar neve nem létezik).

A mezolimbikus jutalmazási rendszer a SzDH másik alrendszere, melynek legfontosabb része a középagyi dopaminerg agyi struktúrák összessége. A környezetből érkező különböző stimulusokat relatív fontosságuk szerint értékelnünk kell, hogy a helyzetnek megfelelő viselkedési választ alakítsunk ki. A mezolimbikus jutalmazási rendszer pontosan ezért felelős (Deco and Rolls, 2005; Jr et al., 2007).

A szociális viselkedés hálózatától eltérően itt nem a nemi-hormonok általi szabályozásé a főszerep, e rendszer legfontosabb mechanizmusát a dopaminerg neuronok relatíve kicsi populációja jelenti (körülbelül 400 000-600 000 számlálható az emberben (Pakkenberg et al., 1991)). Kicsi mérete ellenére ez a populáció kritikus irányító szerepet tölt be, az akaratlagos motoros funkciók szabályozásától kezdve az érzelmek irányításáig, valamint általuk dolgozzuk fel a jutalmazás folyamatát és alakítjuk ennek megfelelően a viselkedésünket mind nem-szociális, mind szociális kontextusban egyaránt (Bissonette and Roesch, 2016).



4.ábra: A mezokortikális és a nigrostriatális útvonalak

A dopaminerg prekursorsejtek migrációja az agytörzs irányából középagy végállomásukig már az embrionális fejlődés nagyon korai szakaszában véget ér: kizárólag ezen területek látják el majd a továbbiakban a teljes idegrendszert a széleskörű funkciók ellátásáért felelős dopaminnal (van den Munckhof et al., 2003).

A dopaminerg innerváció legfőbb eredési pontja a Ventrális Tegmentális Area (VTA), mely legfontosabb projekcióit a Nucleus accumbensbe (NAcc) és a kortexbe küldi: ez az útvonal kritikus szerepet játszik a jutalommal kapcsolatos asszociációkban, motivációban, a jutalom predikciójában fellépő hibák feldolgozásában, a stimulusok közötti különbségtételben, a stimulusok fontosság szerinti értékelésében, valamint a különböző asszociációk értékének felmérésében (4.ábra) (Bromberg-Martin et al., 2010; Comoli et al., 2003; Matsumoto and Hikosaka, 2009).

A másik kiemelt pálya az ún. nigrostriatális pálya, melynek eredési pontja a Substantia Nigra pars compacta (SNc) és azon dopaminerg neurális összeköttetésekért felel, mely az akaratlagos mozgások kialakítását irányítja valamint szintén felel a stimulusok megkülönböztetéséért és az egyes predikcióban fellépő hiba feldolgozásáért (Brischoux et al., 2009; Hikida et al., 2010).

A két pálya kialakításáért felelős neuronokat tekintve némi átfedés is mutatkozik (Bromberg-Martin et al., 2010). Az említett agyterületeken kívül a mezolimbikus jutalmazási rendszer tagja a bazolaterális amygdala (blAMY), laterális septum (LS),

ventrális pallidum (VP), striatum (STR), hippokampusz (HIP), és a bed nuclei of stria terminalis (BNST) (3. ábra/B).

A szociális viselkedés hálózatának interakciója a mezolimbikus jutalmazási rendszerrel két agyterületen keresztül követlenül történik, mint ahogy azt a hálózatot bemutató ábrán is láthattuk, ez a két terület a BNST és a LS. Mindkét terület szerepet játszik a szociális viselkedésben és a jutalommal kapcsolatos feldolgozásában is, így egyfajta „átjátszó állomásai” a szociális stimulus fontosságának értékelésében és arra válaszként egy adaptív viselkedés kialakításában (gondoljunk például a territóriumunkra betolakodók agresszív üdvözlésére) (O’Connell és Hofmann, 2011). Fontos azonban kiemelni, hogy ezen két agyterület mellett a gazdag reciprok összeköttetésén keresztül a két alrendszer közvetetten is kapcsolatban áll egymással és kölcsönösen szabályozzák egymást.

Bár kutatásunk a SzDH számos területére kiterjedt, ezen szakdolgozat tárgyát a következő kiemelt agyterületekre szűkítettem: a BNST-re, HIP-ra, PAG-ra és a VTA egy specifikus magjára, az Interfascikuláris Nukleuszra (IF). A továbbiakban ezeket a területeket tekintjük át röviden. A vizsgálatot az SzDH ismert területein kívül kibővítettem egy olyan agyterülettel, mely bár a szigorú értelemben véve vett szociális-döntéshozatali hálózatnak nem tagja, egyre több jel utal a szociális viselkedésben betöltött fontos szerepére: ez a Mediális Habenula (MH), mellyel szintén megismerkedünk röviden.

Bed Nuclei of Stria Terminalis (BNST)

A Bed Nucleus of Stria Terminalis (BNST) első anatómiai meghatározása Johnston nevéhez fűződik, aki 1923-ban úgy írta le a struktúrát, mint “a szürkeállomány által alkotott köteg vagy gerinc, mely a Nucleus Caudatus-hoz viszonyítva mediálisan helyezkedik el” (Johnston, 1923).

Rágcsálókön végzett neuroanatómiai kutatások során 12-18 különböző alrégióját különítették el ennek a kötegszerű struktúrának, molekuláris expresszió és neuronkompozíció alapján, melyek rendkívül változatos funkciókért felelnek és összeségében egy igen bonyolult struktúrát alakítanak ki (Bota et al., 2012; Ju and Swanson, 1989). Léziós, valamint c-Fos jelöléses vizsgálatokból régóta ismert, hogy a BNST szerepet játszik az agresszióban és a reprodukív viselkedésben: mind a párosodás folyamatában, mind az anyai gondoskodásban, valamint a potenciális szexuális partnerek felismerésében is (Kollack and Newman, 1992; Numan and Numan, 1996; Powers et al., 1987; Shaikh et al., 1986; Valcourt and Sachs, 1979).

Azonban az egyértelmű szociális funkciók mellett fény derült arra is, hogy a BNST nélkülözhetetlen mindennemű motivációs mintázat kialakításában, így központi szerepe van a különböző szerekkel kapcsolatos függőség kialakításában, valamint fő felelőse a szorongás, félelem és averzív viselkedésmintázatok kialakításának (Lebow and Chen, 2016). A BNST diszfunkciója olyan súlyos pszichiátriai betegségek jellemzője, mint a generalizált szorongás, poszttraumás stressz szindróma, antiszociális viselkedés és agresszió, valamint a szociális szorongás (Lebow and Chen, 2016).

A BNST diverz struktúrájáról megtudtuk, hogy funkcionális szempontból egy anterior-poszterior tagoltságot mutat: a szociális stimulusokkal kapcsolatos félelmi reakciókért az anterior régió (aBNST) felel, míg a szaporodással kapcsolatos és nemi különbségeket mutató régió a poszterior BNST (pBNST) (Bota and Swanson, 2010; Dumais et al., 2016; Henckens et al., 2017; Sullivan et al., 2014).

Hippokampusz (HIP)

A Hippokampusz formáció legjobban ismert funkciója a különböző neurontípusok általi ún. térképszerű információfeldolgozás és tárolás.

A térbeliséggel kapcsolatos információkat ezen formáció piramis neuronjai kódolják: a jelenlegi tartózkodási hely/helyzet feldolgozása folyik így („helysejtek”; (O’Keefe and Nadel, 1978)), a környezet kollektív térbeli feltérképezése („rácssejtek”; (Hafting et al., 2005)) és a távolságok, valamint irány-információk feldolgozása az egyes térbeli elemekkel kapcsolatban (Deshmukh and Knierim, 2013), a határok kogníciójának folyamata, valamint az egyes térbeli változások céljainak predikciója is itt kerül feldolgozásra (Sarel et al., 2017) — a számos különböző funkció egy teljes térbeli térképezés létrehozását eredményezi. Az epizodikus memória információi a Hippokampusz formációban hasonlóan szerveződnek, mint a fizikai tér. A hippokampusz kódol egy „memória teret” azáltal, hogy különböző elemeit megköti a tapasztalatoknak/élményeknek (Eichenbaum, 2014). Az emlékekkel kapcsolatos tudnivalókhöz pedig az időbeliség kontextusát is kódolják a Hippokampusz sejtjei (“idő sejt”; (MacDonald et al., 2011)), és az egyes események időbeli összekötése is itt történik (Davachi and DuBrow, 2015).

A térképezés ezen formája továbbterjed a pusztán térbeli és epizodikus információk tárolásánál és egy általános feldolgozási folyamatot eredményez, amely érző (Julian et al., 2018; Teki et al., 2012), absztrakt (Gauthier and Tank, 2018), és még fogalmi információkat is (Constantinescu et al., 2016; Quiroga et al., 2009) hasonló struktúrával kódol és gyakran ugyanazon sejt által, mint amelyek a térbeli környezete kódolásáért felelnek. Más

szavakkal a Hippokampusz formáció modellezi a tapasztalatok mögöttes törvényszerűségeit azáltal, hogy információelemeket térképpé köt össze tetszőleges skálán (pl.: specifikustól az általánosig) és tetszőleges absztrakcióval.

A Hippokampusz a szociális információkat is térképekbe rendezi, így irányítva a szociális döntéshozatalt (“szociális navigáció”; (Montagrin et al., 2018; Schafer and Schiller, 2018; Tavares et al., 2015)). Egy fontos példa a szociális dimenziók közül a hatalom és a hovatartozás dimenziója, melyek erősen befolyásolják a szociális kapcsolatok alakulását rágcslókban (Insel and Fernald, 2004), főemlősökben (Brent et al., 2013), és az emberben (Fiske, 2012; Todorov et al., 2008). A Hippokampusz mindkét dimenzióban fontos szerepet tölt be azáltal, hogy tárolja, és a tapasztalatoknak megfelelően felülírja a szociális hierarchiákkal kapcsolatos információt (Kumaran et al., 2016, 2012) és a hovatartozási viselkedést is (Machado and Bachevalier 2006).

Egy olyan kétdimenziós térben melyet a hatalom és a hovatartozás határoz meg, fMRI vizsgálattal kimutatták, hogy szerepjátékot játszó résztvevők Hippokampuszának aktivitása korrelál a szociális interakciókban hozott döntésekkel a hatalom és hovatartozás dimenzióiban. Az eljátszott karakterek ebben a két dimenziós szociális térben voltak ábrázolva relatív módon, a résztvevő szemszögéből. Ahogy az interakciókból származó információk gyűltek a játék során, a Hippokampusz aktivitásának változása korrelált azon vektorszögek változásaival, amelyek a résztvevők által megjelenített karakterek „mozgásából” származtak a szociális térben, más szóval a relatív hatalmi pozíció és hovatartozás aktuális állapotát követte az egyes karakterek esetén az időben a Hippokampusz aktivitás (Tavares et al., 2015).

A Hippokampusz-függő memória ezen felül prediktálja a szociális háló nagyságát az egészséges felnőttekben (Stiller and Dunbar, 2007), és ezzel párhuzamosan a Hippokampusz károsodása nem megfelelően működő szociális memóriát eredményez (Sanders and Warrington, 1971), és kisebb szociális háléhoz vezet (Davidson et al., 2012). A Hippokampusz aktivitása a szociális felismerés tárgykörében, olyan arcokhoz kapcsolódik, amelyekhez asszociálunk életrajzi vagy viselkedési információt (Todorov et al., 2007), és híres vagy személyesen ismert arcokhoz is (Trinkler et al., 2009), de olyan arcokhoz nem, amelyekhez nem társítunk más szociális információt (Aly et al., 2010; Bird et al., 2007). Összefoglalva tehát a szociális-érzelmi memória egyik legfontosabb állomása a Hippokampusz.

Periaquaduktális szürkeállomány (PAG)

A PAG a középagyban található, emberekben mintegy 14 mm x 5 mm nagyságú terület. Reciprok kapcsolatban áll a prefrontális kortex-szel, insulával, amygdalával, hypothalamusszal, hippocampusszal és a gerincvelővel (George et al., 2019). A szociális viselkedési hálózat részeként nagy számban tartalmaz nemi hormon-szenzitív receptorokat, és fontos szerepet tölt be a szaporodással kapcsolatos viselkedésben, a szexuális közeledés elfogadásában, az anyai gondoskodásban és az utódok védelmére kelő anya agresszív reakcióiban (Floody and O'Donohue, 1980; Kollack-Walker and Newman, 1995; Lonstein and Stern, 1997). A vokalizáció, különösképpen a hívó hangadás iniciációja a PAG kiemelt feladata, számos állatfaj egyrészt a szexuális partner keresésekor, másrészt a fajtársaktól való szeparáció hatására hívó hangokat hallat, mely viselkedés a PAG irányításával zajlik, ezen felül stimulálásával a hangadás ki is váltható (Kyuhou and Gemba, 1998; Trevizan-Baú et al., 2019). Az emberi beszéd során a PAG szintén jelentős aktivitást mutat, léziója pedig némasághoz vezethet (Esposito et al., 1999; Jürgens, 2002; Schulz et al., 2005).

A PAG funkciói közül még ki kell emelnünk, hogy kulcsszerepet játszik az ún. menekülési viselkedés kiváltásában, amely túlnyomórészt valamilyen küszöbön álló veszélyre adott azonnali válaszként jelentkezik (Carvalho et al., 2018). A PAG dorzomediális és dorzolaterális területei az aktív védekezési reakciók kiváltásában működnek közre, mint például az ugrás és a futás, míg a ventrolaterális PAG a veszélyre adott passzív reakciókért felel, így a dermedtségért („freezing”) és mozdulatlanságért (Bandler and Carrive, 1988; Fanselow et al., 1995). A PAG léziója után a menekülési válasz zavarai lépnek fel (Depaulis and Bandler, 2012).

Ventrális Tegmentális Area (VTA) Interfascikuláris Nucleus-a (IF)

A VTA-ról, mint a mezolimbikus jutalmazási rendszer egyik dopaminerg „motorjáról” gazdag irodalom áll rendelkezésünkre, azonban az Interfascikuláris Nucleus nevezetű magjával kapcsolatban nagyon kevés információ érhető el. Annyi bizonyos, hogy az aprócska mag számos molekuláris és sejtszintű tekintetben eltér a VTA többi részéről, ezek az információk viszont szórványosan, egy-két VTA-t célzó kutatás kapcsán láttak napvilágot. Magát az IF-et rendkívül sűrűn elhelyezkedő apró méretű neuronok tömörülése alkotja (Phillipson, 1979a). Ezen neuronok dopaminerg és glutamaterg természetére hamar fény derült (Li et al., 2013; Phillipson, 1979a; Yamaguchi et al., 2011), valamint arra is, hogy az IF részt vesz a prefrontális kortex dopamin- és glutamaterg beidegzésében, mely

terület esszenciális a kognitív és érzelmi feldolgozás folyamatában (Gorelova et al., 2012; Yamaguchi et al., 2011). Újabban ismertté vált, hogy a VTA szerepet játszik egy kifejezetten szociális funkciókhoz kapcsolt neurotranszmitter, az oxitocin hatásmechanizmusában, mind patkányok esetén (Melis et al., 2007; Mullis et al., 2013), mind emberekben, szociális jutalom és büntetés bekövetkeztekor (Groppe et al., 2013). A VTA oxitocinhoz fűződő kapcsolatát egy 2013-as kutatás térképezte fel, a VTA oxitocin-érzékeny neuronjai, a kutatók eredményei szerint, főleg az IF-ben találhatóak (több mint 80%-a az IF-ben vizsgált neuronoknak érzékenységet mutatott oxitocinra), ezen felül az oxitocin direkt posztszinaptikus serkentéssel hatott a vizsgált sejtekre. Az oxitocin olyannyira alapvető fontosságú a komplex szociális felismerés és viselkedés irányításában (Benarroch, 2013; Heinrichs et al., 2009), és nélkülözhetetlen a kötődéshez (Insel and Young, 2001), hogy magát az autizmus spektrumzavart is gyakran modellezzik az oxitocin receptor gén kiütésével rágcsálókval végzett vizsgálatokban (LoParo and Waldman, 2015). Az IF beidegzését részben a Mediális Habenula végzi, mely vizsgálatomban kitekintésként választott, szociális funkciókban fontos szerepet játszó terület, mely a hagyományos értelemben vett szociális döntéshozatali hálózaton kívül esik (Phillipson, 1979b).

Mediális Habenula (MH)

A Habenula (nevét alakja alapján kapta a latin szó „kicsi gyeplő”-nek fordítható) egy kicsi, bilaterális agyi struktúra, mely a diencephalon dorzális végénél helyezkedik el (Viswanath et al., 2014). A mezolimbikus jutalmazási rendszer számos területe küld projekciókat a Habenula irányába, a Mediális Habenula pedig többek között az előzőekben áttekintett IF beidegzését végzi (Phillipson, 1979b; Viswanath et al., 2014). Apró mérete miatt nehéz léziós és elektrofiziológiai vizsgálatokban külön célozni a Mediális Habenulát a Habenula egészen belül. Magáról a Habenuláról tudjuk, hogy erős aktivitást mutat a várt jutalom elmaradásakor, így mindenképp fontos a jutalmazási rendszer komplex mechanizmusai mellett figyelemmel követnünk viselkedését (Matsumoto and Hikosaka, 2007). Ezenfelül rágcsálókval végzett léziós vizsgálatokból tudjuk, hogy a Habenula teljes eltávolítása kognitív zavarokhoz vezet (térbeli tanulást és memóriát tekintve), figyelemzavarokat és a stresszre adott hiperreaktivitást vált ki (Lecourtier et al., 2004).

Később specifikusan a MH-t érintő léziós vizsgálatokkal sikerült igazolni, hogy a lézió fejlődési zavart eredményez a prefrontális cortex méretében, csökkent mértékű dopamin-receptor expresszióhoz vezet és számos viselkedési tünethez a figyelemben, impulzivitásban és mozgásban, mely arra engedett következtetni, hogy ezen funkciókért elsősorban az MH,

és nem a teljes Habenula felel (Lee and Goto, 2011). Szelektíven irtott neuronok az MH-ban szintén hiperaktív viselkedéshez vezettek, valamint az új környezethez való alkalmazkodás sikertelenségéhez (az ASD egyik fontos tünete ez szintén), impulzivitáshoz, nehézkes döntéshozatalhoz, a térbeli memória sérüléséhez és tanulási nehézségekhez (Kobayashi et al., 2013). Az MH fokozott aktivitása mindemellett a depresszióval került összefüggésbe (Caldecott-Hazard et al., 1988). A depresszió egy gyakran alkalmazott patkány-modelljében megnövekedett metabolikus aktivitás volt mérhető az MH-ban, ugyanakkor csökkent aktivitás a VTA-ban (Shumake et al., 2003). Az MH viselkedésben betöltött szerepének még egy fontos területe a félelem és a szorongás szabályozása (Yamaguchi et al., 2013). Egerekben az MH neurális összeköttetések megszakítása más agyterületekkel csökkent szorongáshoz és félelmi reakciókhoz vezetett (Yamaguchi et al., 2013). Zebradániókon végzett MH-léziós vizsgálatban pedig túlzott félelmi válaszreakciók voltak megfigyelhetők (Agetsuma et al., 2010). A Mediális Habenula szociális szituációkban tehát minden jel szerint fontos szerepet játszik az adaptív viselkedés kialakításában.

Célkitűzés

Kísérletemnek két fő célja volt:

- (1) Az első cél feltérképezni, hogy miként hat a valproát ivaréretlen, hím egerek szociális döntéshozatali hálózatára. Azon agyi aktivációs mintázatokat kívántam így modellezni, amelyek az ASD-vel élő páciensek idegrendszerét szociális szituációkban jellemzhetik. Szerettem volna egy átfogó képet nyerni a szociális viselkedés kialakításában meghatározó hálózat egészének egyidejű aktivációjáról egy széleskörben alkalmazott autizmus-modellben.

A VPA-kezelés hatásával kapcsolatban megvizsgáltam, hogy egészséges kontroll egyedekhez viszonyítva milyen aktivációs mintázatot mutatnak a SzDH egyes területei különféle szociális szituációkban. Ezen szakdolgozat keretein belül az SzDH pár kiemelt területének aktivációját követtem nyomon két különböző szociális viselkedésben, nevezetesen a BNST, HIP, PAG, és IF területeket, valamint a SzDH-on kívül eső, de szociális viselkedésben fontos szerepet játszó MH aktivációját. A konkrét cél az egyes agyterületek ún. c-Fos fehérje jelölt aktivitásának mérése volt. A c-Fos egy azonos nevű korai génről átíródó transzkripciós faktor fehérje, mely az idegsejtek aktivitás-változásának hatására kezd el termelődni a sejtmagban. Ez a transzkripciós faktor számos kései gén expresszióját iniciálja, így szolgálja az idegrendszer rugalmas, adaptív válaszadását a különböző külső és belső stimulusokra (Herdegen and Leah, 1998). Alkalmazásával gyakorlatilag „pillanatfelvétel” készíthető az egyes agyi régiók aktivitásának intenzitásáról. A c-Fos expresszió csúcsa az átírás kezdetétől számítva 90 perc, ezt a kísérlet tervezésénél, a szociális szituációk kialakításánál figyelembe vettem (Sagar et al., 1988).

Az ivaréretlenség fontos szerepet játszott a vizsgálat céljában: az egerek ebben az időszakban viselkednek „szociálisan” a hagyományos értelemben véve: társaikkal számos nemiségtől független interakcióban vesznek részt, ez a játék időszaka, amely az egészséges felnőtté váláshoz szükséges (Benner et al., 2014).

- (2) Második célom az volt, hogy megvizsgáljam, a VPA-kezelés hatására valóban mutatnak-e ezek az egerek autisztikus viselkedésjegyeket. Pontosabban egy, a szociabilitás mérésére alkalmas viselkedéstesztet végrehajtása volt a cél, melynek

lényege felmérni az egér hajlandóságát arra, hogy idejét inkább a fajtársak közelében töltsse, mintsem távol tőlük, egyedül. A szociabilitás ezen aspektusa autisztikus tüneteket produkáló állatok esetén jelentősen sérül (Moy et al., 2004). A teszt segítségével kívántam megbizonyosodni arról, hogy a VPA-kezelés valóban sikeres volt-e.

Módszertan

Modellállatok, tenyésztés és valproát kezelés

A kísérletekben C57Bl/6NCrl törzsből származó egerek vettek részt. A kísérleti állatok tenyésztését magunk végeztük a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetének állatházában. A tenyészállatok három forrásból érkeztek hozzánk: az Országos Onkológiai Intézet Kísérletes Farmakológiai Osztályának tenyészetéből, a Charles River Laboratories, valamint a Janvier Labs tenyészetéből. A tenyészállatok elhelyezése mesterségesen megvilágított állatházban történt, 12 órás fény/sötét ciklus és szabályozott konstans hőmérséklet (24 °C) mellett. A táplálékhoz és az ivóvízhez ad libitum hozzáférést biztosítottunk.

A kísérletek szempontjából az volt a legfontosabb cél a tenyésztés során, hogy a megtermékenyítés és az utódok világra jövétele minden alom esetén a lehető legnagyobb összhangban történjék. Mindezen okokból a tenyésztés szigorú protokollt követett.

A nőtényeket öt fős csoportokban tartottam a pároztatás előtt, ilyen körülmények között a Lee-Boot hatás következtében az együtt tartott nőtények ösztrusz ciklusa leáll (Ma et al., 1998). A pároztatást megelőző napon a kiválasztott jövendőbeli anyákat párosával helyeztem el, közvetlen szomszédságukba pedig annak a hímnek a ketrece került, akit a jövendőbeli apának szántam. A hím egér vizeletében lévő szaganyagok indukálják az ösztrusz ciklus beindulását és az ovulációt a nőtényekben, épp ezért a szomszéd tenyészhím alomjából egy keveset szórtam a nőtények ketrecébe (Whitten, 1959). Mindezen eljárások azt a célt szolgálták, hogy a nőtények ovulációja és így a megtermékenyítés a lehető legnagyobb szinkronban történjen.

A pároztatás alkalmával a szomszédos tenyészállatokból három fős csoportokat hoztam létre, egy csoportot két nőtény és egy hím alkotott. Ebben az elrendezésben nagyobb eséllyel végződött sikerrel a pároztatás, mintha pusztán egy nőtény került volna egy hímhez közös ketrecbe (Dorsch et al., 2020). A pároztatás a sötét ciklus előtt körülbelül egy órával kezdődött és egy napon keresztül tartott. Másnap, ugyanebben az időpontban, a három fős csoportokat újra szétbontottam, a nőtények testtömegét megmértem (ezt az időpontot tekintettem a 0.5. gesztációs napnak). A nőtények párban maradtak a pároztatás után, így a születő kölykökről együtt gondoskodhattak. A gondos anyai viselkedést fészekanyag papírvattacsíkok behelyezésével támogattam (Bond et al., 2002). Abban az esetben, ha egy hímtől mindkét nőtény vemhesedett, a vemhesség 13,5-edik napján külön ketrecbe helyeztem a nőtényeket, így követhető volt, hogy melyik kölyök melyik anyához tartozik.

A valproát kezelés

A kísérleteket csak úgy végezhettem el sikerrel, ha a vemhes nőstény egerek a valproát kezelést egy szűk időintervallumban kapták meg. Pontosan abban a szűk időintervallumban, mely alatt a kezelés a szakirodalomnak megfelelő autizmus-modell kölyköket eredményez. Túl korai beadás súlyos mozgásszervi elváltozásokhoz vezethet, míg túl kései beadás esetén az autisztikus viselkedésjegyek kevésbé megfigyelhetőek (Nicolini and Fahnestock, 2018). A valproát kezelés a vemhesség 13,5-ik napján történt, a nőstények 500 mg/ttkg dózisban kaptak szubkután Depakine® (Sanofi, Hungary) valproát készítményt, a kontroll nőstények pedig ugyanilyen dózisban fiziológiás sóoldatot.

A második testtömegmérés a vemhesség 8,5-ik napján történt, a harmadik pedig a kezelés napján. A potenciálisan vemhes nőstényeket a testtömeggyarapodás alapján választottam ki és sorsoltam random módon a két kezelési csoportba (Heyne et al., 2015.).

Kísérleti csoportok kialakítása

A kölyköket 24 napos korukban választottam el az anyától, mivel ennél korábbi elválasztás nagyobb eséllyel okoz komoly stresszt az utódok számára (Richter et al., 2016). Az elválasztás után a hím kölyköket öt fős csoportokba soroltam olyan módon, hogy testvérek ne kerüljenek egy csoportba. Ezek az öt fős csoportok voltak a továbbiakban a kísérleteim alapegységei. A kontroll csoportokat kizárólag egészséges kölykök alkották, akik a vemhesség alatt méhen belül fiziológiás sóoldat kezelést kaptak. Az autizmus vizsgálatára szánt csoportokban azonban kettő kölyök az ötből valproát-kezelt nőstény utódja volt.

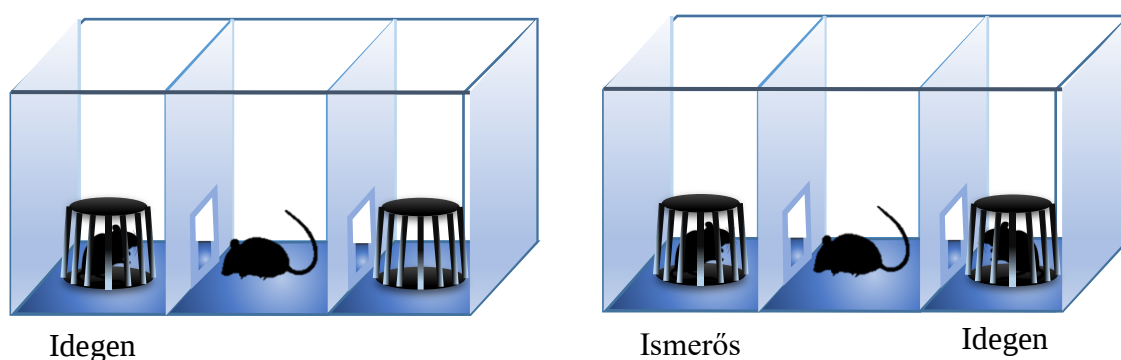
Háromkamrás szociális újdonság teszt

Azon a napon, mikor létrehoztam az öt fős csoportokat, a kölykök részt vettek egy ún. háromkamrás szociális újdonság tesztben. Ezt a viselkedésteztet széles körben alkalmazzák a rágcsálókkal végzett autizmust célzó kutatásokban, mind valproát kezelés, mind más autizmust modellező módszer esetén (Chen et al., 2020; Lim et al., 2019; Mony et al., 2016; Rouillet et al., 2010; Silverman et al., 2010). A teszt lebonyolításához a Kaidanovich-Beilin és munkatársai által publikált útmutatót alkalmaztam (Kaidanovich-Beilin et al., 2011).

A viselkedéstezthez használt eszköz egy áttetsző plexiüvegből készült doboz, melyet két, szintúgy plexiüveg válaszfal oszt fel három, egyenként 19×45 cm területű „kamrára”. A válaszfalak közepén egerek számára kényelmes méretű (7*7 cm) nyílás teszi lehetővé a

szabad közlekedést mindhárom kamra között. A teszt célja, hogy megvizsgáljam, az egér melyik kamrában tartózkodik a legszívesebben három különböző szituációban: (1) ha egyedül van; (2) ha valamelyik szélső kamrában egy ismeretlen egérrel találkozhat; és (3) ha az egyik szélső kamrában egy már ismerős, a másikban viszont egy ismeretlen egér tartózkodik. A két szélső kamra közepére elhelyeztem egy-egy acélhálóból készült dobozkát (10 × 10 × 11 cm), a második és harmadik szituációban szereplő ismeretlen és ismerős egerek ezen dobozkákba kerültek. Annak érdekében, hogy az egereket aktív időszakukban tudjuk vizsgálni, a tesztet a sötét ciklusban végeztem vörös fény megvilágításában, amely az egerek számára csak nagyon gyengén detektálható, azonban elég fényt biztosít a videófelvételhez (Peirson et al., 2018). A tesztről felül- és oldalnézetből is készült videófelvétel.

A teszt első részében a vizsgálandó egérnek öt percnyi habituációs időt biztosítottam, ezalatt szabadon felfedezhette mindhárom kamrát. Ezután random módon választottam a két szélső kamra közül, és egy ismeretlen egeret helyeztem a kamrában lévő dobozkába. A vizsgált egerem tíz percen keresztül ismét szabadon mozoghatott mindhárom kamrában, immár úgy, hogy az egyik kamrában egy ismeretlen fajtárral tölthetett időt. A teszt utolsó szakaszában a másik szélső kamrába is került egy ismeretlen egér, így a következő tíz percben vizsgálati alanyom három helyen tölthetett időt, az előző szakaszban már megismert egér kamrájában, az új, ismeretlen fajtársat tartalmazó kamrában, vagy a középső üres kamrában (5.ábra). A videófelvételek elemzése Solomon Coder programmal történt (<https://solomon.andraspeter.com/>).



5. ábra: Háromkamrás szociális újdonság teszt

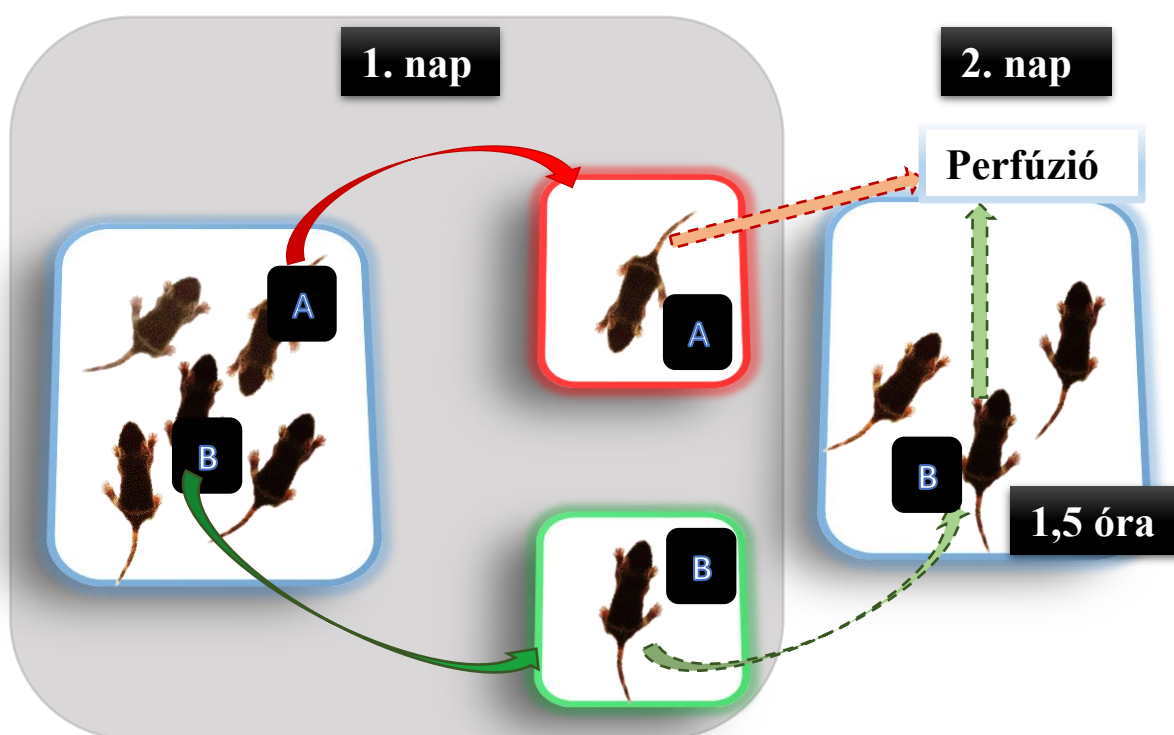
Szeperációs kísérlet

Kísérleti elrendezés

A háromkamrás szociális újdonság teszt után az öt fős csoportjaiban egy héten keresztül együtt tartottam a fiatal egereket, majd a 32. napon kezdetét vette a szeperációs kísérlet.

A kísérleti elrendezés alapgondolata, hogy két különböző szociális szituáció esetén tudjam megvizsgálni, hogy egerek agyában mely agyterületek milyen mértékben aktiválódnak. Minden öt fős csoportban volt egy olyan egér, aki az első szituációban vett részt és egy olyan, aki a másodikban. Ezek az egyedek egyéni jelölést kaptak alkoholos filccel a farkukra.

(1) Az első szituációban a kísérleti alany új ketrecbe került és egy napon keresztül teljesen szeperálva volt társaitól. A magányosan töltött 24 óra után ezen egerek agyát perfúziós fixálás keretén belül kiemeltem és paraformaldehidbe helyeztem (6.ábra/A). Ily módon lehetőségem nyílt megvizsgálni, hogy a hosszas szeperáció alatt mely agyterületek, milyen aktivitási mintázatot mutatnak.



6. ábra: Szeperációs kísérlet

(2) A második szociális szituáció esetén a kiválasztott egerek saját ketrecükben maradtak, azonban társaikat egy napra új ketrecbe helyeztük, így alanyaink egy teljes napot szintén tökéletesen szeperációban töltöttek. A 24 óra magányt követően visszahelyeztem

hozzájuk jól ismert, megszokott társaikat és másfél órán keresztül lehettek ismét együtt. A másfél óra elteltével végeztem el ezen alanyokon is a perfúziós fixálást, így lehetőségem nyílt megvizsgálni, hogy az ismert társakkal való újbóli találkozás egy hosszas szeparáció után milyen aktivitási mintázatot eredményez az agyban (6. ábra/B).

Így összesen négy kezelési csoportot alakítottam ki: valproát-kezelt és szeparált (N=5); kontroll és szeparált (N=6); valproát-kezelt és újra találkozó (N=4); kontroll és újra találkozó (N=6). A kísérlet lépéseinek táblázatos, kronologikus összefoglalója a melléklet II. táblázatában található.

Az agyak feldolgozása

Perfúzió és metszés

Az egerek terminálása és az agyak kiemelése perfúziós fixálás keretein belül történt. A beavatkozás elején az anesztézia eléréséhez Ketamine/Xylazine injekciót alkalmaztam (Ketamine: 80 mg/ttkg, Xylazine: 10 mg/ttkg). Az egerek szívének bal kamrájába (*ventriculus sinister*) vezetett kanülön keresztül átmostam az érrendszert. Először 50 ml fiziológiás sóoldat folyt keresztül a nagyvérkörön, majd a szöveteket fixáló 50 ml 4 %-os paraformaldehid. A fixációt követően kiemeltem az agyakat, melyek 3-4 nap paraformaldehides posztfixáció után 25%-os szaharózoldatba kerültek, melyhez 0,1%-os nátrium-azid oldatot is adtam, hogy megakadályozzam különböző gombák esetleges elszaporodását. A metszés megkezdéséig tároltam így az agyakat, 4 °C-on. Az egéragyak metszése fagyasztó mikrotómmal (Leica Frigomobil, Germany) történt, 50 µm vastagságú koronális metszeteket készítettem. A szaharózoldat krioprotektív tulajdonságú, így az agyszövetet sérülés nélkül lehet -25 °C-ra hűteni a fagyasztva metszés során. A metszeteket az immunhisztokémia elvégzéséig 7,4-es pH-jú foszfát pufferes sóoldatban (PBS), 4 °C-on tároltam.

Immunhisztokémia

Az immunhisztokémia megkezdése előtt a metszeteket PBS -ben átmostam. A teljes eljárás pontos lépései a mellékletben, a III. táblázatban találhatóak. Minden egyes inkubációs idő alatt a metszetek rázógépre kerültek. A PBS-es mosást az immunhisztokémia során minden alkalommal háromszor tíz percig végeztem el. Első lépésként 2%-os hidrogén-peroxid oldatot adtam a PBS-hez, melyben a metszetek fél órán keresztül inkubálódtak. A hidrogén-peroxid a szöveti peroxidáz aktivitás kimerítésével segít a későbbi specifikus jelölés háttérzajának csökkentésében. Ismételt PBS-es mosást követően a metszetekhez 1%-os

normál ló szérumot adtam PBS-ben, 0,2 %-os Tween 20-al keverve. A normál ló szérum szerepe a nem specifikus immunkötőhelyek blokkolása, a Tween 20 pedig a sejtmembrán permeabilitását növeli, így az átjárhatóbbá válik az eljárás során használt anyagok számára. Fél órát követően hozzáadtam a metszetekhez a primer ellenanyagokat: nyúlban termelt anti-c-Fos-t (1:5000) (Abcam, Egyesült Királyság). Az antitesteket 1 %-os normál ló szérummal és 0,2 %-os Tween 20-al kevertem össze, így adtam hozzá a metszetekhez, majd egy éjszakán keresztül tartó inkubáció következett 4 °C-on. Másnap ismételt PBS-es mosás után hozzáadtam a metszetekhez a szekunder antitestet: lóban termelt anti-nyúl IgG ImmPRESS® kit (Vector Laboratories, Inc., USA) (1:200, PBS-ben hígítva). Szobahőmérsékleten két órán keresztül inkubáltam így a metszeteket. Ezután kétszer tíz percig tartó PBS-es, majd egyszer tíz percig tartó TRIS-ben (Trisz-(hidroximetil)-aminometán, pH:8,0) történő mosás volt az utolsó lépés a jelölés előhívása előtt.

Nikkel-DAB (diaminobenzidin) festést alkalmaztam, mely a szekunder antitesthez konjugálva detektálhatóvá teszi a c-Fos jelölést (15 mg DAB, 100 ml 0,05M-os TRIS-ben (pH 8,0) és 400 mg ammónium-nikkel-szulfát-hexahidrát). Tíz perces inkubáció után iniciáltam a nikkel-DAB festék konjugációját, vagyis a c-Fos jelölés előhívását: 0,5 µl 1%-os hidrogén-peroxid oldatot adtam az 1 ml nikkel-DAB oldatban lévő metszetekhez. Innentől kezdve a metszeteket fénytől védetten kezeltem, ezzel óvva a jelölődéseket az esetleges károsodástól. Az előhívás öt percen keresztül tartott, ezután a hívó-elegy eltávolításával és PBS (pH:7,4) hozzáadásával leállítottam a reakciót. A festés befejeztével egy utolsó PBS-es mosás következett.

Metszetek felhúzása és lefedés

Az immunhisztokémia után a metszeteket króm-zselatin oldattal feltöltött Petri-csészéből húztam tárgylemezre (1l desztillált víz, 5 g zselatinpor, 0,5 g Króm(III)-kálium-szulfát-dodekahidrát), így biztosítottam a metszetek adhézióját a tárgylemezre. A tárgylemezek egy napon keresztül száradtak, majd felszálló alkoholsorban dehidratációra került sor, a következő sorrendben, folyadékonként 5 percig: desztillált víz, 30%-os alkohol, 50%-os alkohol, 70%-os alkohol, 90%-os alkohol, 96%-os alkohol, abszolút alkohol, első xilolos áztatás, második xilolos áztatás. Ezután a metszeteket Surgipath Micromount fedőanyaggal lefedtem. A mikroszkópos kiértékelés megkezdése előtt a lefedett metszeteket egy-két napig portól védetten helyeztem el szobahőmérsékleten és hagytam megszáradni a fedőanyagot.

Mikroszkópia és sejtszámlálás

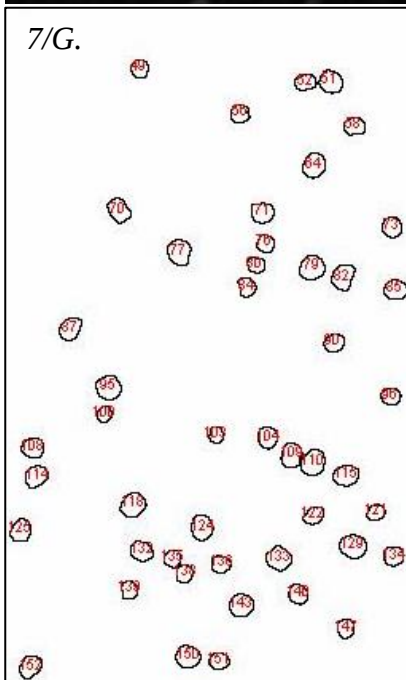
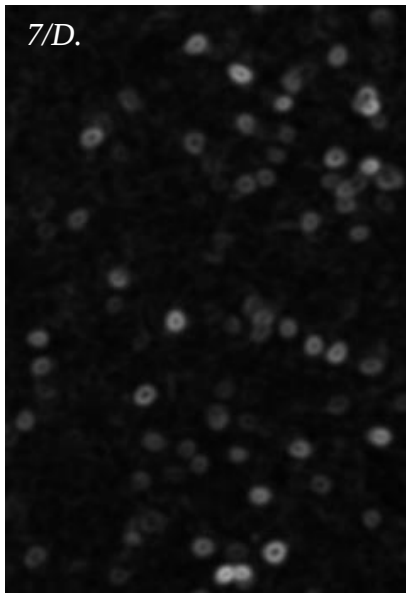
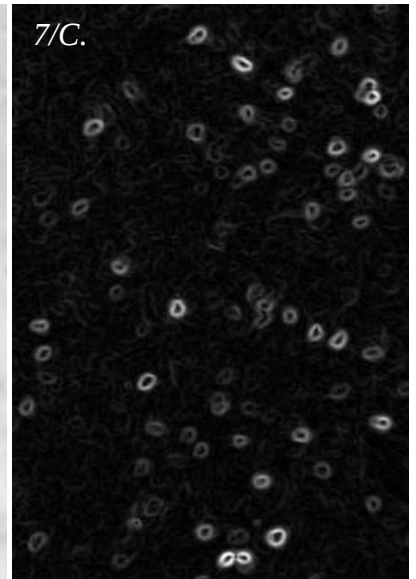
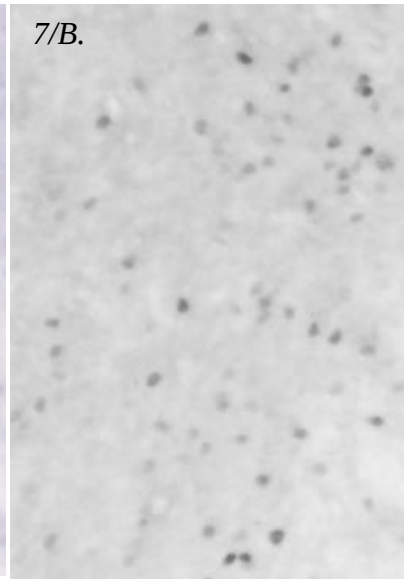
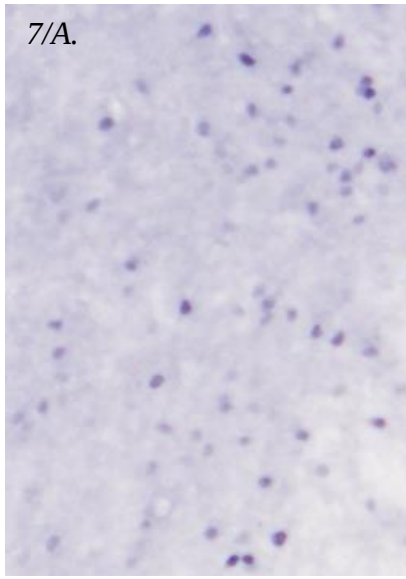
Az immunjelölt metszetek kiértékelésének első lépéseként kiválasztottam azt a négy metszetsíkot, melyeken az általam vizsgált agyterületek megtalálhatóak, ehhez segítségképp az Allen egéragy atlaszt használtam (<https://mouse.brain-map.org/static/atlas>), valamint a Franklin és Paxinos (2008) által szerkesztett egéragy atlaszt. Fénymikroszkópos felvételeket készítettem a vizsgált agyterületekről (Olympus DP74). Négyszeres nagyítású objektívet használtunk, 2880×1800 pixel felbontású felvételek készültek.

Ezek után az ImageJ program segítségével (<https://imagej.nih.gov/ij/>) kvantifikáltam az egyes agyterületeken a c-Fos pozitív sejtmagvú sejteket. A kvantifikálás fél-automata módon történt. Először megmértem a program segítségével az adott agyterület méretét, majd képmódifikációs eljárások sorával alkalmassá tettem, a felvételt az automata sejtszámlálásra:

- Az egyszerű kezelhetőség érdekében az eredeti képet (7. ábra/A). 8-bites szürkeárnyaltos típusú alakitottam (7. ábra/B). Ezután kiemeltam az éles intenzitás-erősség-határokat a program beépített pluginjának segítségével („Find Edges”), így számos apró zajt ki tudtam szűni (7. ábra/C).
- A letisztult képen a határokat Gauss-függvény alapú simítással finomítottam ($\sigma=1,6$) (7. ábra/D),
- és az ily módon hangsúlyozott képen egy hisztogram alapú küszöbérték-algoritmus, a „Triangle” metódus segítségével szelektáltam ki azokat a pixeleket, melyek potenciálisan a jelölt sejtmagokhoz tartoznak (Zack et al., 1977) (7. ábra/E).
- Mindezek utána az ImageJ „Watershed” pluginjának segítségével emeltem ki az egy sejtmaghoz tartozó pixelek csoportját, elválasztva azt más potenciális sejtmag-jelölésektől. A „Watershed” egy matematikai szimuláció alapú képszegmentációs módszer (Soille and Vincent, 1990) (7. ábra/F).

Az utolsó lépés a sejtmagok megszámlálása volt, az ImageJ rendelkezik sejtszámláló funkcióval és egyben finomítható a számolás paraméterek megadásával (7. ábra/G). Tapasztalataim alapján a sejtmagok mérete 70 és 200 pixel közé esett, és ezen pixelek elrendeződésének körparamétere 0.85-1 tartományt fedi le ($4\pi \times \frac{[Terület]}{[Periméter]}$, 1,0 érték a tökéletes kört jelenti, 0,0 érték a végtelen mértékben megnyúlt poligont).

A felvételek kiértékelésének eredményét Microsoft® Office Excel táblázatba foglaltam.



Statisztika

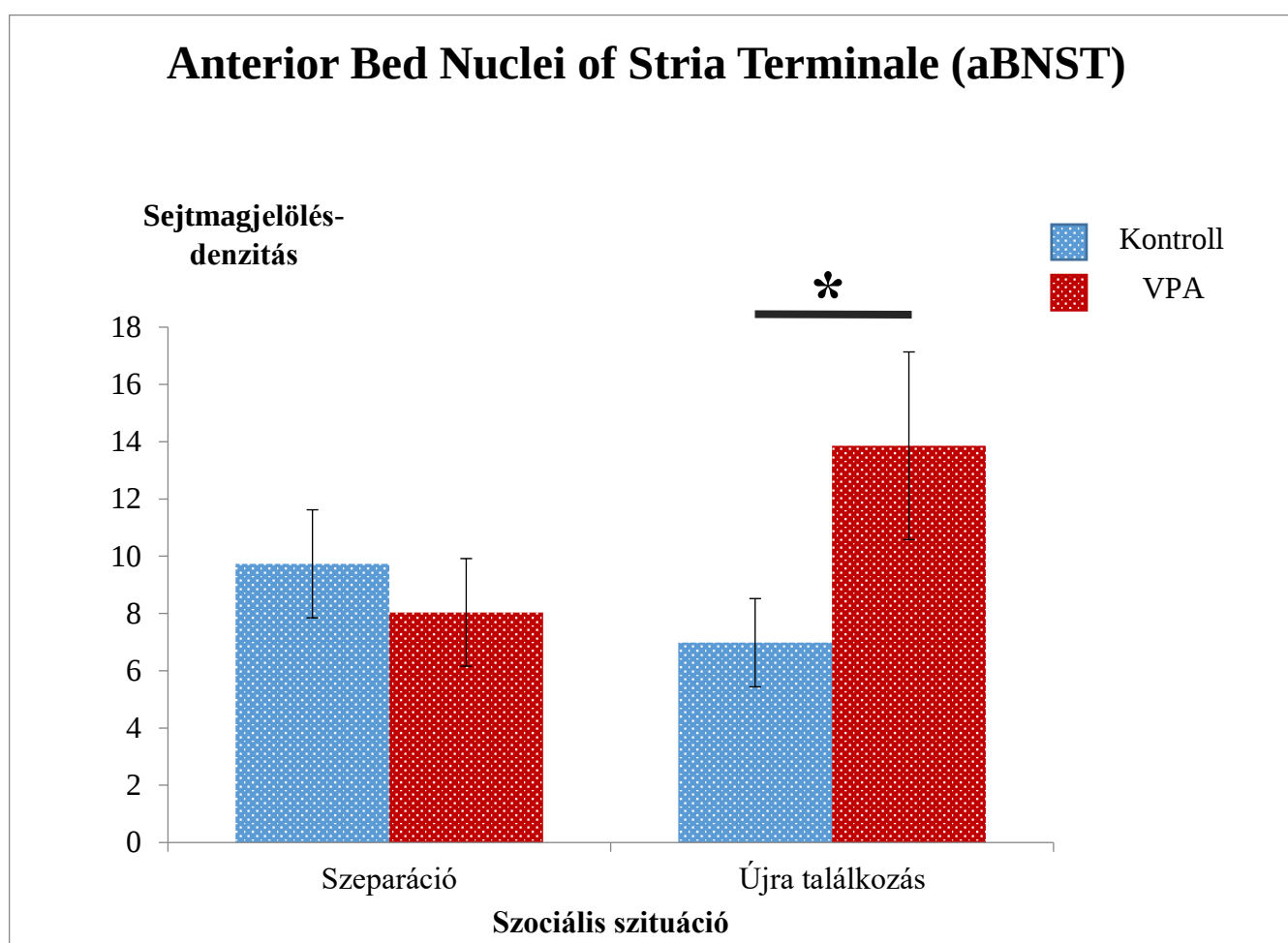
A statisztikai elemzésekhez R programot használtam (<https://www.r-project.org/>). Az agyterületeken mért c-Fos jelölések kvantitatív összehasonlítását a különböző kezelési csoportokban negatív binomiális eloszlású adatokra illesztett generalizált lineáris kevert modellel végeztem, random faktornak a perfúzió napját választottam. A negatív binomiális eloszlás feltételezése célszerű volt, mivel egy egységnyi agyterületen nem minden esetben azonos gyakorisággal találhatók a c-Fos jelölt sejtmagok, az aktív idegsejtek egy-egy mag esetén aggregáltan fordulhatnak elő. Az így fellépő túlszóródást negatív binomiális eloszlással jól modellezhető (McCabe et. al, 1989). Fontos volt, hogy ne pusztán a jelölt sejtek számát hasonlítsuk össze, hanem azt, hogy mekkora területen találtunk adott mennyiségű jelölt sejtet. Bár a negatív binomiális eloszlás nemnegatív egész szám-adatokra illeszkedik, az R lme4 nevű csomagjában található glmer.nb függvénnyel olyan modellt készíthetünk, mely figyelembe veszi, hogy mekkora területen mértünk adott jelölés-számot (Bates et al., 2015). Az összehasonlítások számából adódó esetleges fals p-értékek elkerülése érdekében Tukey-féle adjusztált p-értékeket számoltam. A modell illeszkedését minden esetben szimulációs modelldiagnosztikával ellenőriztem.

A korrelációs vizsgálatokhoz a Pearson-féle korreláció módszerét alkalmaztam. A háromkamrás szociális újdonság teszt elemzése pedig lineáris modellel készült, ahol a magyarázóváltozó a kezelés, a célváltozó pedig az egyes kamrákban eltöltött idő aránya a habituációs 5 percben mért időarányokkal súlyozva (min/min) volt.

Eredmények

Az anterior Bed Nuclei of Stria Terminale (aBNST) aktivációja

Az aBNST ativációjában szignifikáns különbség mutatkozott a VPA-kezelt és a kontroll csoport egyedei között az „Újra találkozás” szociális szituáció esetén ($p < 0,05^*$). Ugyanakkor nem találtam különbséget a kezelések között a szeparált egyedeket vizsgálva, valamint a két szociális szituáció között sem volt tapasztalható eltérés az agyterület sejtmagjelöléseinek denzitásában.

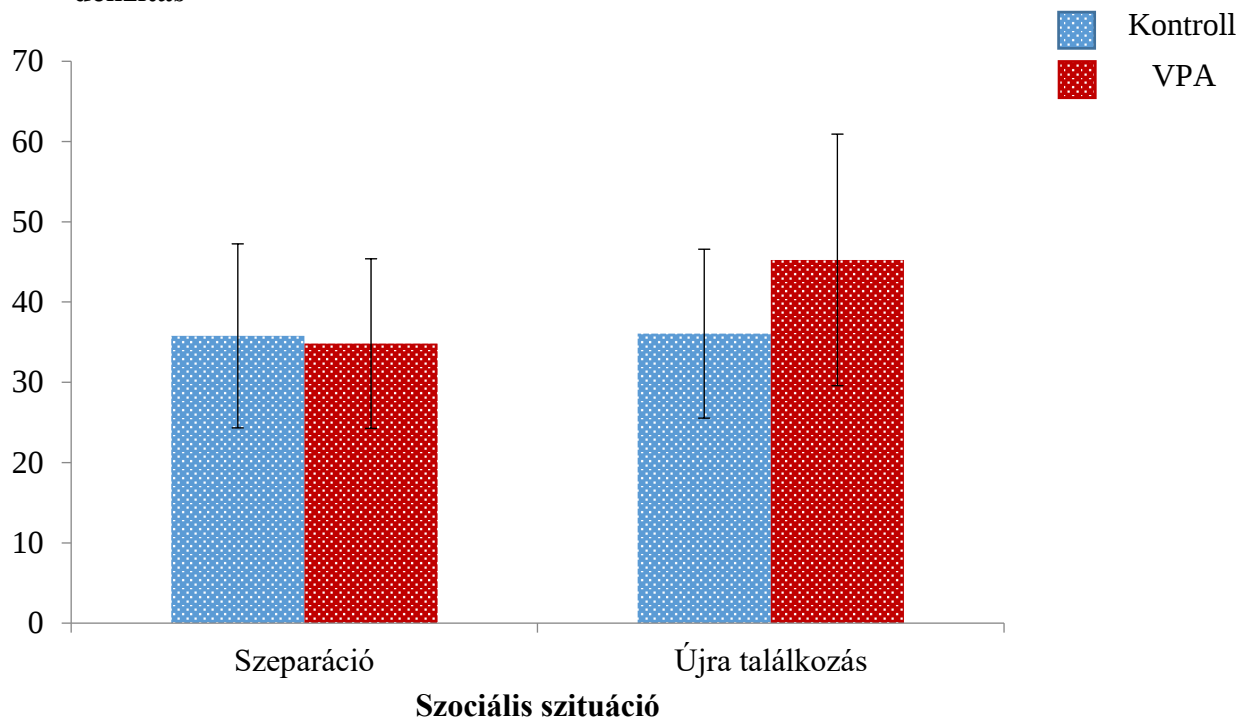


A poszterior Bed Nuclei of Stria Terminale (pBNST) aktivációja

A pBNST ativációjában nem mutatkozott különbség a VPA-kezelt és a kontroll csoport egyedei között a szociális szituációk összehasonlításakor és az egyes kezeléseken belül sem találtam eltérést a két szituációra adott aktivációs válasz tekintetében.

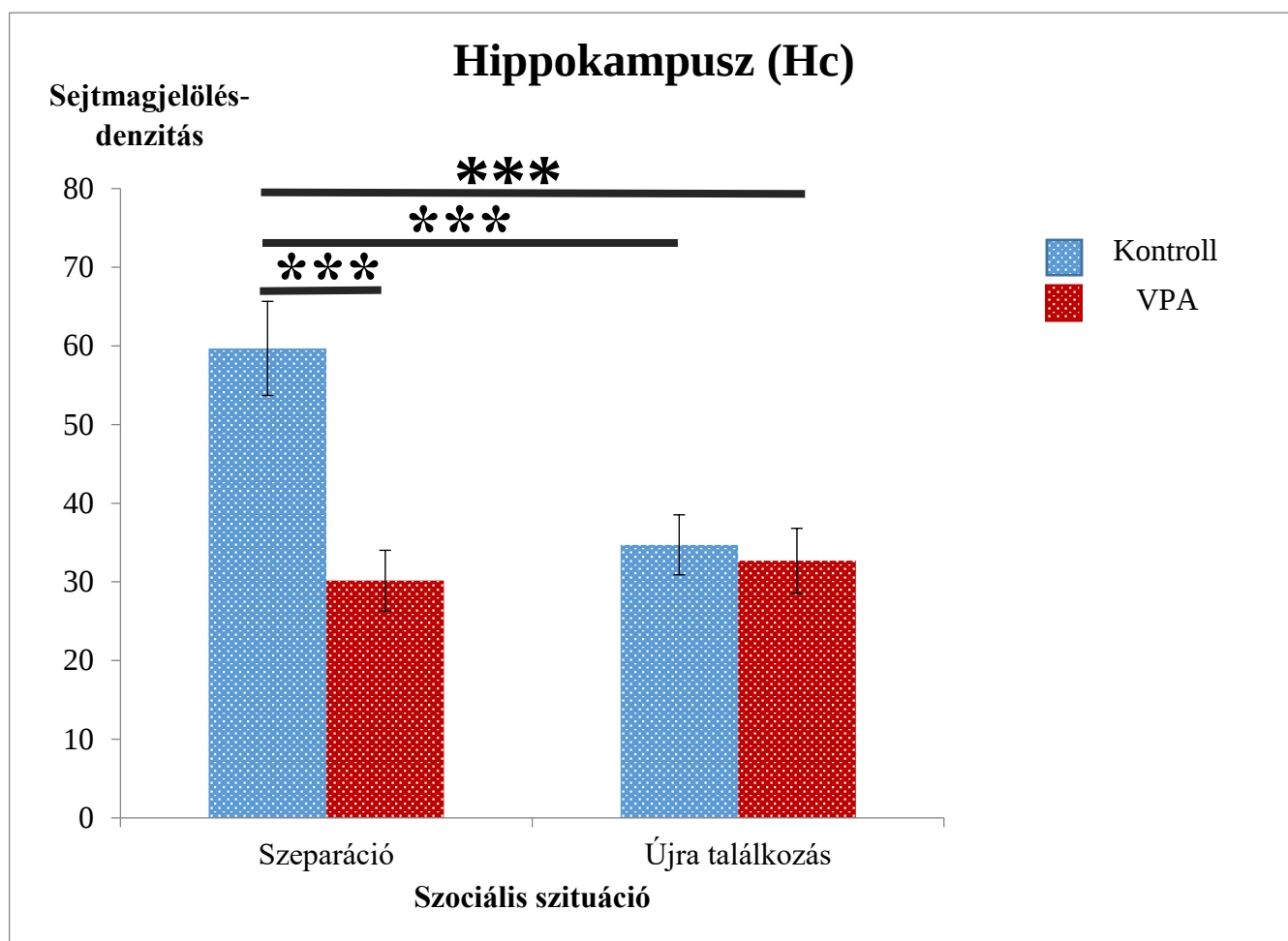
Posterior Bed Nuclei of Stria Terminale (pBNST)

Sejtmagjelölés-
denzitás



A Hippokampusz (Hc) aktivációja

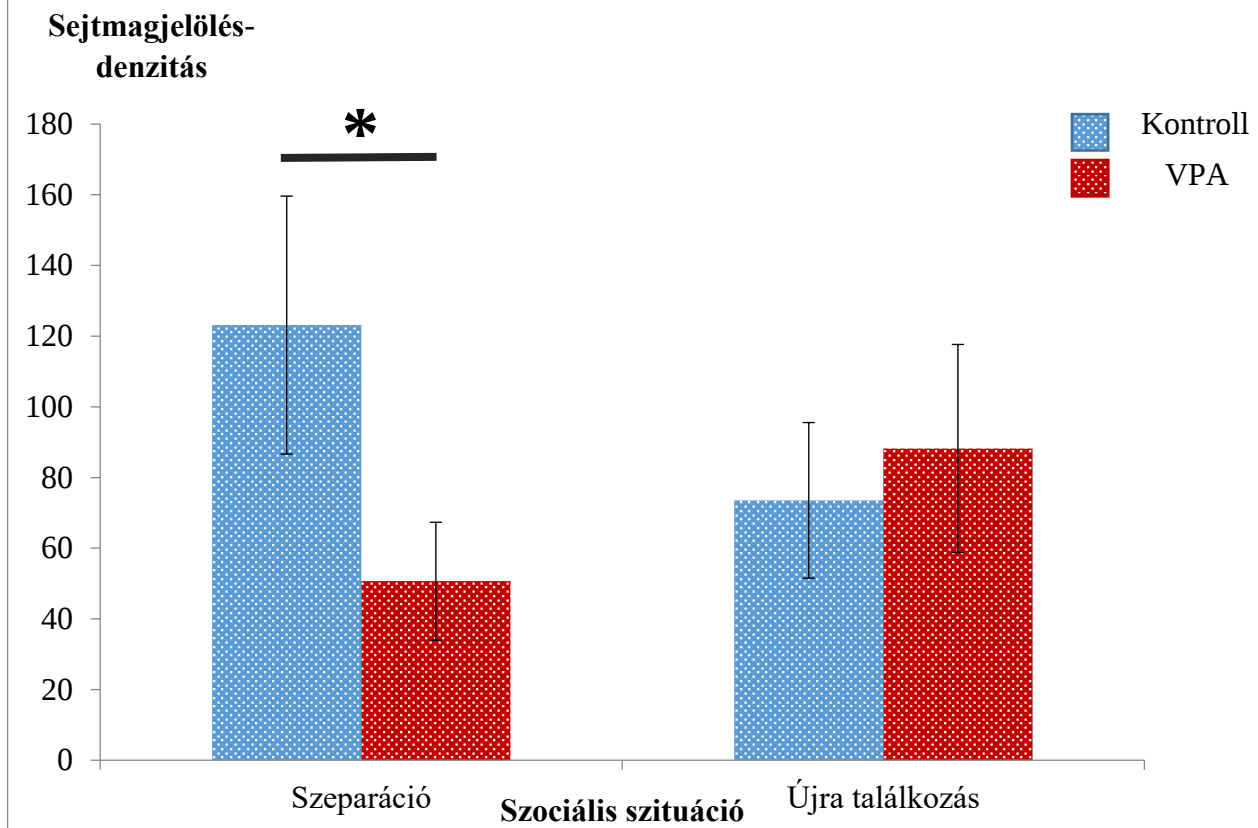
Az hippocampusz aktivációjában szignifikáns különbséget találtam a VPA-kezelt és a kontroll csoport egyedei között a „Szeparáció” szociális szituációt tekintve, a kontroll csoport egyedei magas sejtmagjelölés-denzitást mutattak ($p < 0,0005^{***}$). A kontroll egyedek és a VPA-kezelt egyedek között a két különböző szituációra adott válaszban is erős volt a különbség, a szeparált, kontroll egyedek esetén szignifikánsan markánsabb az aktiváció ($p < 0,0005^{***}$). A kontroll csoportban a két szituáció között is erősen szignifikáns különbség mutatkozott a hippocampusz aktivációjában ($p < 0,0005^{***}$). Összességében elmondható, hogy a szeparált, kontroll egyedek mind a VPA-kezelttekkel, mind az „Újra találkozás” szituációban tapasztaltakkal összevetve szignifikánsan erősebb hippocampális aktivitást mutattak.



A Periaqueduktális szürkeállomány (PAG) aktivációja

A PAG aktivációjában a „Szeparáció” szituációban találtam szignifikáns különbséget a kontroll csoport és a VPA-kezelt csoport egyedei között, a kontroll egyedek erősebb aktivációt mutattak ($p < 0,05^*$). Ugyanakkor nem mutattak különbséget az újra találkozás szituáció esetén az egyedek a kezeléseket tekintve, valamint a két szociális szituáció között sem volt tapasztalható eltérés az agyterület sejtmagjelöléseinek denzitásában.

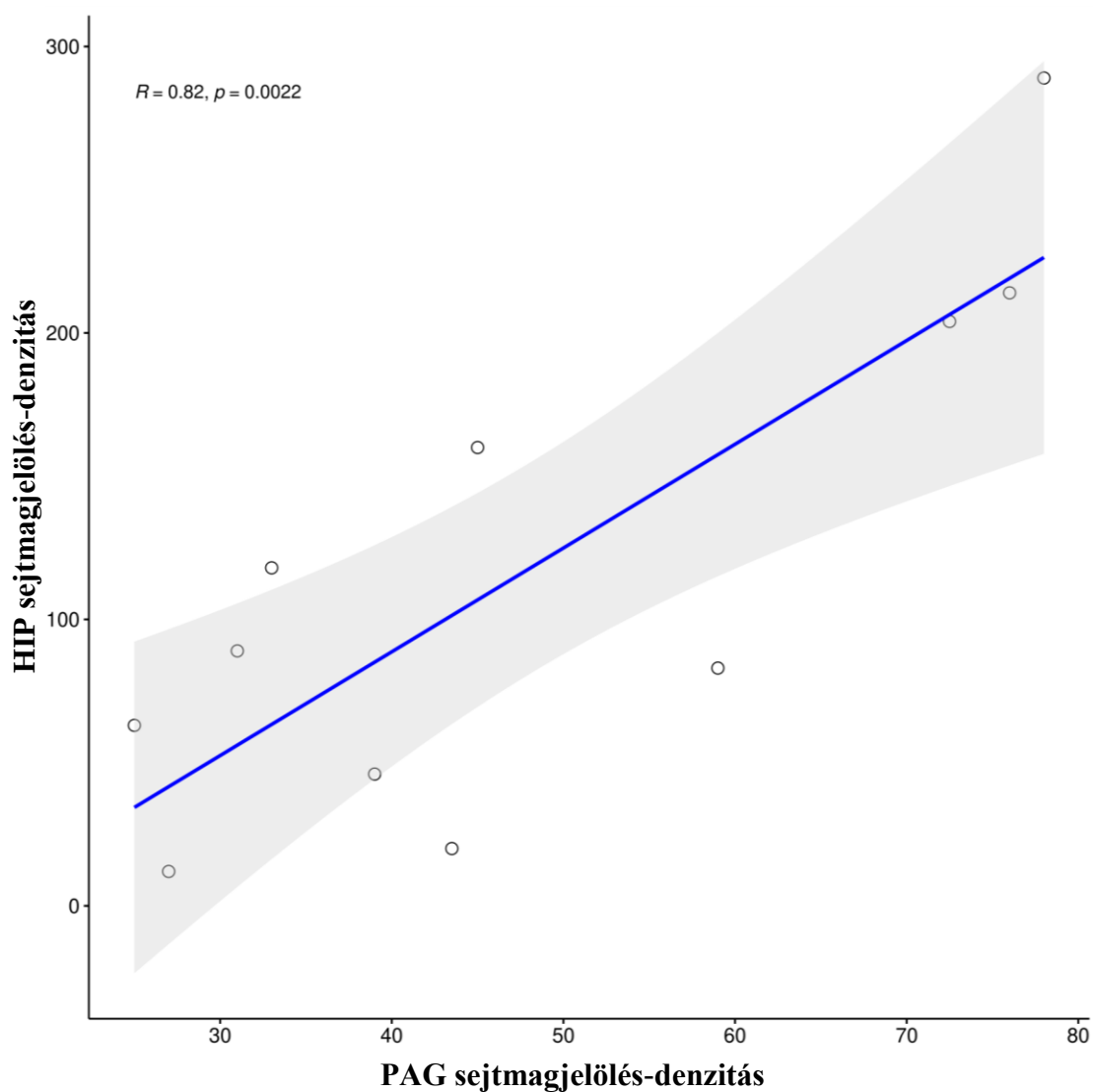
Periaqueduktális szürkeállomány (PAG)



A HIP és a PAG aktivációjának korrelációja a magányos csoportok esetén

Az hippocampusz és a PAG aktivációját korreláltatva a szeparált egyedek között szignifikánsan pozitív korrelációt találtam: ha magasabb sejtmagjelölés-denzitást mutatott az egyik agyterület, az együtt járt a másik agyterület magasabb értékeivel is ($p < 0,005^{**}$).

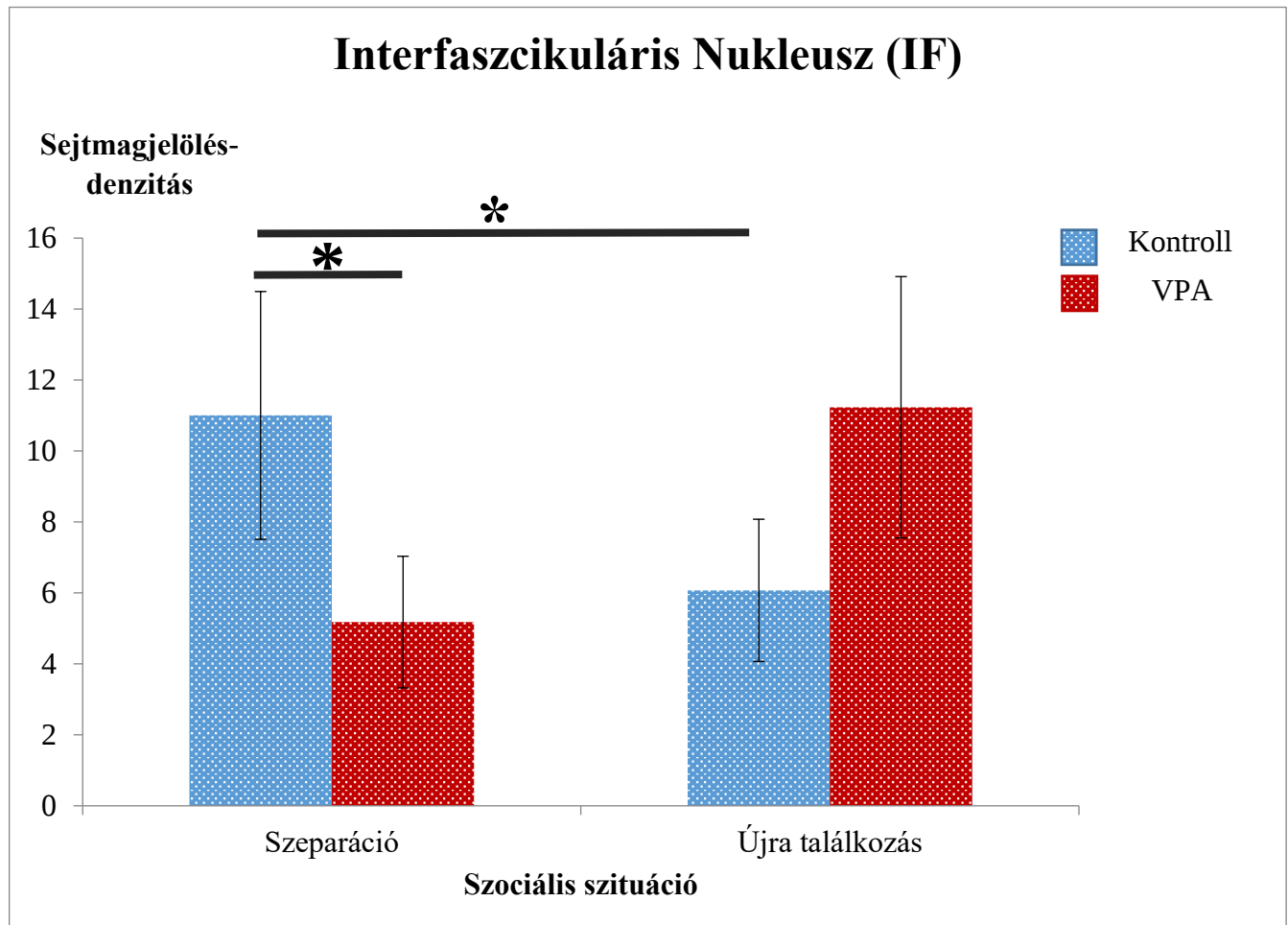
A Hippocampus (HIP) és a Periaqueduktális szürkeállomány (PAG) aktivitásának korrelációja szeparált egyedekben



A Ventális Tegmentális Area Interfaszcikuláris Nukleuszának (IF) aktivációja

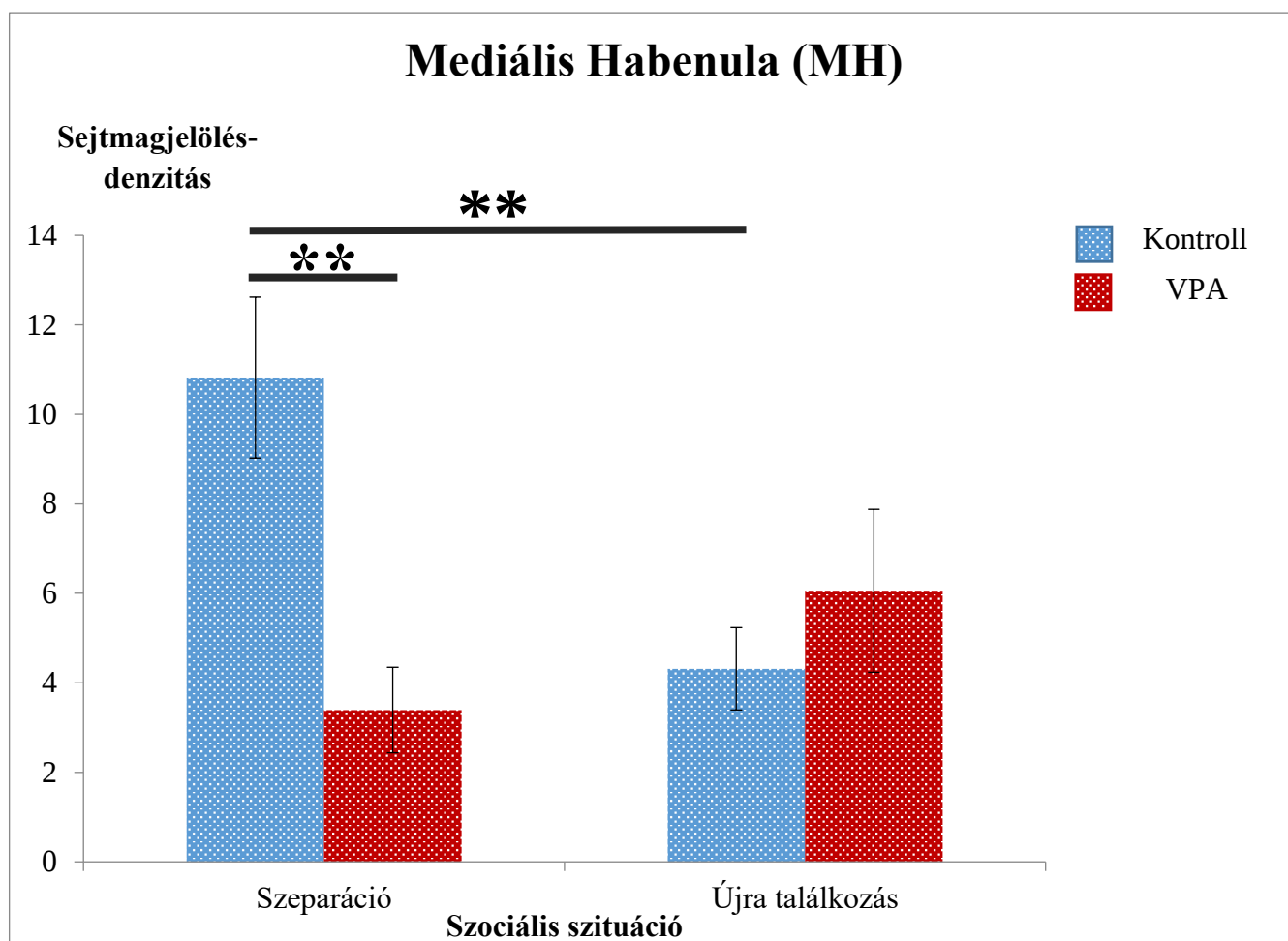
Az IF aktivációjában a kontroll csoporton belül szignifikáns különbséget találtam a két szociális szituáció között ($p < 0,05^*$), a „Szeparáció” szituációban pedig a kontroll egyedek és a VPA-kezelt egyedek között mutatott szignifikáns eltérést a sejtmagjelölések denzitása ($p < 0,05^*$). Mindkét esetben a szeparált, kontroll egyedek mutattak erősebb aktivációt. Nem

találtam különbséget az „Újra találkozás” szituáción belül és a VPA-kezelt egyedek között sem a két szociális szituációt tekintve, azonban a kezelések és a szociális szituációk között szignifikáns interakció mutatkozott ($p < 0,05^*$)



A Mediális Habenula (MH) aktivációja

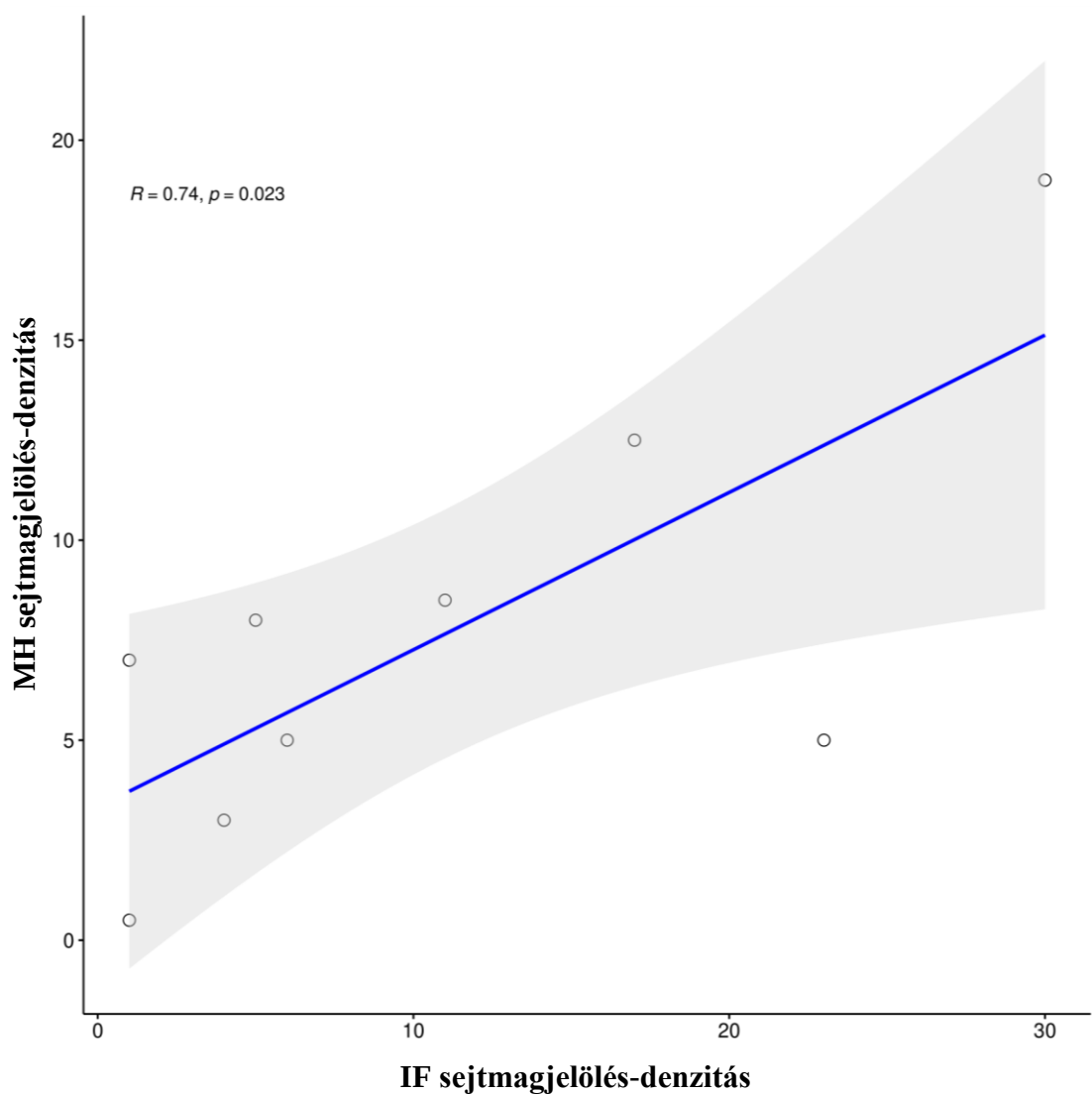
Az IF-hez hasonlóan az MH aktivációjában a kontroll csoporton belül mutatkozott szignifikáns különbség a két szociális szituáció között ($p < 0,005^{**}$), a „Szeparáció” szituációban pedig a kontroll egyedek és a VPA-kezelt egyedek között találtam szignifikáns eltérést a sejtmagjelölések denzitásában ($p < 0,005^{**}$). Mindkét esetben a szeparált, kontroll egyedek mutattak erősebb aktivációt. Nem találtam különbséget az „Újra találkozás” szituáción belül és a VPA-kezelt egyedek között sem a két szociális szituációt tekintve.



Az MH és az IF aktivációjának korrelációja a magányos csoportok esetén

A Mediáli Habenula és az Interfascikuláris Nucleus aktivációját korreláltatva a szeparált egyedek között szignifikánsan pozitív korrelációt találtam: ha magasabb sejtmagjelölés-denzitást mutatott az egyik agyterület, az együtt járt a másik agyterület magasabb értékeivel is ($p < 0,05^*$).

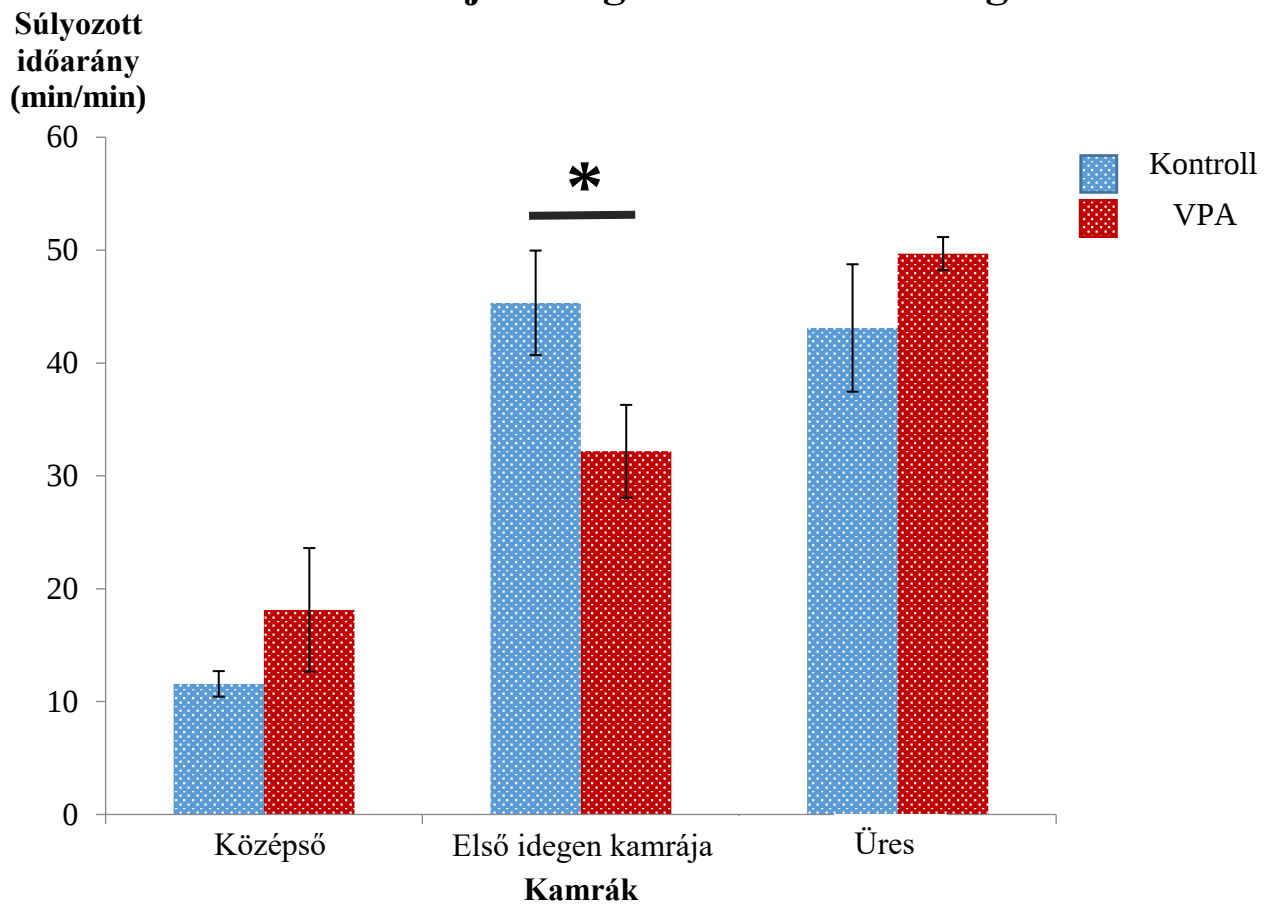
A Mediális Habenula (MH) és az Interfascikuláris Nucleus (IF) aktivitásának korrelációja szeparált egyedekben



A háromkamrás szociális újdonság teszt eredménye

A háromkamrás viselkedésteszt elemzése során az első idegen egyed behelyezésekor találtam eltérést a kezelések között. Ekkor a VPA-kezelt egyedek szignifikánsan kevesebb időt töltöttek abban a kamrában, amelyben az idegen egyed volt található, mint egészséges kontroll fajtársaik ($p < 0,05^*$). Az üres és a középső kamrában töltött időben nem talál eltérést.

Szociális újdonságkeresés – Első idegen



Diszkusszió

Jelen kutatás fő célja volt feltérképezni, hogy miként hat a valproát **ivaréretlen, hím** egerek szociális döntéshozatali hálózatára. Azon agyi aktivációs mintázatok modellezése ez a kísérlet, amelyek az ASD-vel élő páciensek idegrendszerét szociális szituációkban jellemzik. A fókusz nem az egyes specifikus agyterületek kiemelt sejtcsoportjaira irányult, hanem arra, hogy egy átfogó képet nyerjünk a szociális viselkedés kialakításában meghatározó hálózat egészének egyidejű aktivációjáról egy széleskörben alkalmazott autizmus-modell esetén.

Két különböző szociális szituáció hatására voltam kíváncsi: egyrészt a szociális szeparációval összefüggő aktivitási mintázatokra, másrészt szeparáció után a jól ismert társakkal való újra találkozás aktivációs hatásaira a kiválasztott agyterületeken. A szakdolgozat tárgyát a következő agyterületek képezik: az SzDH szociális viselkedés hálózatába tartozó PAG, a mezolimbikus jutalmazási rendszer tagjai közül a HIP és a VTA IF-je, a két alrendszerhez egyaránt tartozó BNST, valamint az SzDH-n kívül eső, de a szociális viselkedésben fontos szerepet játszó MH.

A vizsgálatban hím egerek vettek részt, mivel az emberi populációban a férfiak ASD-érintettsége 4,5-szörös a nőkkel összevetve (Christensen, 2018). Az ivaréretlenség szükségességét az indokolja, hogy az egerek ebben az időszakban viselkednek „szociálisan” a hagyományos értelemben véve: társaikkal számos nemiségtől független interakcióban vesznek részt, ez a játék időszaka, amely az egészséges felnőtté váláshoz szükséges (Benner et al., 2014).

A kísérlet megkezdése a 24. posztnatális napon történt, ettől kezdve öt fős csoportokban tartottuk a vizsgálat egyedeket. A csoportok vagy teljes mértékben egészséges kontroll kölykökből álltak, vagy két VPA-kezelt kölyökből és három egészséges kontroll egyedből. Azért nem hoztunk létre teljesen autizmus-modell egerekből álló csoportot, mert olyan körülményeket kívántuk modellezni, melyek az emberi társadalomban egy autista gyermek számára a leggyakrabban előfordulnak. Ilyen körülmény például az, hogy egy óvoda vagy iskolás csoportban az autista gyermek minden nap találkozik sok egészséges kortárral. Az autizmussal élő gyermekek számára a gyakori, egészséges szociális tapasztalatok jelentős javulást eredményeznek a kommunikációs készségekben és viselkedésben (Dawson, 2008; Sallows and Graupner, 2005). Ugyanez a jelenség tapasztalható autizmus-modell egerek esetén is, ha az együtt tartott kölyköknek legalább a fele egészséges (Yang et al., 2011). Annak érdekében tehát, hogy a humán szociális

környezetre jobban hasonlító körülményeket teremtsek, az autizmust én is olyan csoportokkal modelleztem, ahol a kezelt egerek egészséges társakkal élnek együtt, így növelve eredményeim validitását..

A VPA hatásosságát háromkamrás szociális újdonság teszt segítségével ellenőriztem, melyről bőséges szakirodalom áll rendelkezésre.

BNST

A BNST a szociális viselkedési hálózat és a mezolimbikus jutalmazási rendszer interakciójáért felelős közös terület. Diverz struktúrájával kapcsolatban ismert, hogy funkcionális szempontból egy anterior-poszterior tagoltságot mutat: a szociális stimulusokkal kapcsolatos félelmi reakciókért az anterior régió (aBNST) felel, míg a szaporodással kapcsolatos és nemi különbségeket mutató régió a poszterior BNST (pBNST) (Bota and Swanson, 2010; Dumais et al., 2016; Lebow and Chen, 2016).

- (1) A pBNST esetén nem mutatkozott különbség a VPA-kezelt és a kontroll csoport egyedei között a szociális szituációk összehasonlításakor, és az egyes kezeléseken belül sem találtam eltérést a két szituációra adott aktivációs válasz tekintetében.
- (2) Ezzel szemben az aBNST aktivációjában szignifikáns különbség mutatkozott a VPA-kezelt és a kontroll csoport egyedei között az „Újra találkozás” szociális szituáció esetén.

Ez az eredmény összhangban áll a pBNST szakirodalomból megismert funkcionális tagoltságával: a poszterior régió főként szaporodással kapcsolatos szabályozó szerepet tölt be, így nem volt valószínűsíthető, hogy az ivaréretlen egerekben komoly különbségeket mutat a kezelés vagy szociális szituáció tekintetében.

A aBNST viszont fontos szerepet tölt be a félelmi reakciók és a szorongás kialakulásában, erős aktivációja figyelhető meg olyan pszichiátriai betegségek esetén, melyek valamilyen szempontból köthetők a szorongáshoz és a túlzott félelemhez (például fóbiákkal élő páciensek esetén erős aktivitást mutat, ha a fóbia tárgyát vizuális stimulusként mutatjuk be, vagy állat-modellek esetén nem várt averzív inger esetén) (Dumais et al., 2016; Henckens et al., 2017; Lebow and Chen, 2016).

Lehetséges, hogy a társakkal való találkozás a VPA-kezelt egerekben azért indukált erősebb BNST választ, mert az élményt kellemetlennek, szorongáskeltőnek élték meg a vizsgált egyedek. Az ASD-vel élő felnőttek viselkedését vizsgálva már bizonyosságot nyert,

hogyan a szociális szituációkban sokkal erősebb stresszreakciót mutatnak, mint az egészséges személyek (például egy beszéd megtartásakor) (Taylor et al., 2018). ASD-s gyermekek pedig a különböző szociális szituációkban (mint az iskolába való beilleszkedés, játszótéren történő szociális interakciók) a stresszreakciók kiváltásáért felelős hypothalamus-hypophysis-mellékvese (HPA) tengely aktivációját mutatják, a stresszhelyzet után pedig jelentősen megnövekedik a kortizolszintjük (Corbett and Simon, 2014).

Összegezve tehát nem kizárható, hogy a VPA-kezelt egerek reakciója a társakkal való újbóli találkozáskor a szociális stressz eredménye.

HIP

Az hippocampus aktivációja a szeparált, kontroll egyedekben szignifikánsan erősebb volt mind a VPA-kezeltekkel, mind az „Újra találkozás” szituációban tapasztaltakkal összevetve.

A kísérleti elrendezés szerint a „Szeparáció” szituációban a vizsgálat egyedek új ketrecbe kerültek, tehát nemcsak a szociális környezet, hanem a fizikai tér is változott. Tudjuk, hogy a térbeliséggel kapcsolatos információkat, a környezet kollektív térbeli feltérképezését a HIP végzi (Hafting et al., 2005), ezzel párhuzamosan alakítja és tárolja a HIP az epizodikus memória információit is időbeli kontextusba helyezve (Eichenbaum, 2014; MacDonald et al., 2011). A szociális információk is térképekbe rendeződve kerülnek feldolgozásra a HIP-ben, így alakul ki a számos paramétert figyelembe vevő predikció képessége és a szociális keresési viselkedés is (Montagrin et al., 2018; Schafer and Schiller, 2018; Tavares et al., 2015). Mindez arra enged minket következtetni, hogy a szeparáció a kontroll egyedekben komplex módon (a környezeti feltérképezés, epizodikus memória, és szociális keresés funkcióin keresztül) eredményezhette a HIP aktivitását.

A krónikus szociális szeparáció egy patkányokon végzett kutatásban a HIP megnövekedett c-Fos aktivitását eredményezte (Stanisavljević et al., 2019). Egy másik vizsgálatban úgy találták, hogy a HPA tengely stresszhatásáért felelős enzimjeinek mRNS expressziója (11 β -hidroxiszteroid-dehidrogenázok) a HIP-ben jelentős mértékben megnövekedett rövid szeparáció hatására házimalacokban (Kanitz et al., 2009). A szeparáció okozta stressz tehát lehetséges magyarázata a kontroll egerekben tapasztalt HIP-aktivitás növekedésének.

Mindezekkel szemben az autizmus-modell egyedek látszólag még a környezet változására sem mutattak semmivel sem különb HIP aktivitást, mint akkor, amikor el sem mozdítottuk őket eredeti helyükről, hiszen a társakkal való újra találkozás szituációjában

résztevők a teljes kísérlet alatt a megszokott ketrecükben maradtak. Mivel az ASD egyik fontos velejárója az újdonságokhoz való nehéz alkalmazkodás és a megszokottakhoz való erős ragaszkodás (Vivanti et al., 2018), kísérletünk szerint érdemes a jövőbeni ASD-kutatásokban figyelmet szentelni a HIP újdonságokkal kapcsolatos aktivációjának alulműködésére. A környezetváltozás hatásának hiánya a VPA kezelt állatokban azt sugallja, hogy a kontroll egerekben is a társak (esetleg a társak szagának) hiánya az elsődleges oka a HIP megnövekedett aktivitásának, nem pedig az esetleges új térbeli stimulusok.

PAG

A PAG aktivációjában a „Szeparáció” szituációban találtam szignifikáns különbséget a kontroll csoport és a VPA-kezelt csoport egyedei között, a kontroll egyedek erősebb aktivációt mutattak.

Tudjuk, hogy a vokalizáció, különösképpen a hívó hangadás iniciációja a PAG kiemelt feladata. A fajtársaktól való szeparáció hatására megfigyelhető számos állatfajban, köztük az egér esetén is a fokozott hívó vokalizáció. Gyakran alkalmazzák kutatásokban az ilyen típusú szeparációs vokalizáció mérését a szorongás mértékének prezentálására (Kyuhou and Gamba, 1998; Trevizan-Baú et al., 2019). Egerek esetén ismert, hogy a csökkent mennyiségű hívó hangadás a társaktól való szeparációkor gyakori jelenség az idegrendszer fejlődési zavarainak modellezésekor (Premoli et al., 2021).

A kísérlet eredménye felveti a kérdést, hogy a szeparáció hatására tapasztalt különbség a PAG aktivitásában vajon ez esetben is a VPA-kezelt egerek csökkent vokalizációjával járt-e együtt. Jelen kísérletben nem volt lehetőségünk mérni az egerek vokalizációját a szeparáció ideje alatt, de a jövőbeli kísérleteinkben mindenképpen szükségesnek látjuk mérni ezt a viselkedésváltozót is. A tapasztalt különbség alapján érdekes lenne megvizsgálni a későbbiekben, hogy az autisztikus tünetek együtt járhatnak-e a PAG-ban mérhető változásokkal más szituációkban is, például a fenyegetettségre adott azonnali reakcióban, mely szintén a PAG irányításával jönnek létre.

A HIP és a PAG aktivitásának korrelációja

Tekintve, hogy a HIP a szociális keresésben, a PAG pedig a hívó hangadásban játszik szerepet, a funkcionális összefüggés szempontjából érdekes volt megnézni, hogy milyen kapcsolatban áll a két terület aktivációja a szeparált egyedekben.

Az HIP és a PAG aktivációját korreláltatva a szeparált egyedek között szignifikánsan pozitív korrelációt találtam: ha magasabb sejtmagjelölés-denzitást mutatott az egyik agyterület, az együtt járt a másik agyterület magasabb értékeivel is.

Bár funkcionális összeköttetést még nem írtak le a HIP és a PAG között, egy embereken végzett fMRI kutatás szintén korrelációt talált a két terület aktivitása között különböző stresszhelyzetekben (Faull and Pattinson, 2017.). Egy másik, patkányokon végzett kutatásban a ventrális HIP-ben található neurokinin 1 receptorokat vizsgálták, melyek a negatív élmények feldolgozásában játszanak szerepet és az amygdalában már összefüggésbe került a PAG okozta menekülési reakciókkal. A ventrális HIP-ben ezen receptorok gátlásával meg lehetett akadályozni a PAG stimulálásakor fellépő menekülési viselkedést (Carvalho et al., 2018).

Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy a két agyterület közötti közvetlen vagy közvetett kapcsolat fontos a negatív ingerekre adott válasz kivitelezésében, és lehetséges, hogy a mi vizsgálatunkban a szeparáció okozta stressz miatt mutatták a kontroll egyedek az erős összefüggő aktivitást. Ezzel szemben ilyen hatás a VPA-kezelt egerekben nem volt kimutatható.

IF

Az IF aktivációjában a kontroll csoporton belül szignifikáns különbséget találtam a két szociális szituáció között, a „Szeparáció” szituációban pedig a kontroll egyedek és a VPA-kezelt egyedek között mutatott szignifikáns eltérést a sejtmagjelölések denzitása. Mindkét esetben a szeparált, kontroll egyedek mutattak erősebb aktivációt. Ezenfelül az összes agyterület közül egyedül itt találtam szignifikáns interakciót a kezelések és a szociális szituációk között is.

Az IF-el kapcsolatos szegényes irodalom miatt konkrét funkcionális szerepét nem ismerjük egyelőre ennek a kisméretű magnak. Mivel azonban ismeretes, hogy az IF nagy számban tartalmaz oxitocin-érzékeny neuronokat, kiindulási pontunk a VTA oxitocin-függő aktivációja. Oxitocin hatására ugyanis a VTA mind jutalom, mind büntetés bekövetkeztekor erősebb aktivitást mutat (Groppe et al., 2013; Melis et al., 2007; Mullis et al., 2013).

A szociális viselkedésben kulcsfontosságú oxitocin meghatározó szerepet tölt be az ASD-kutatásban: gyakran modellezik az oxitocin receptor gén kiütésével rágsálókkal végzett vizsgálatokban (LoParo and Waldman, 2015).

Eredményeimben az IF aktiváció szignifikáns interakciója a kezelések és a szociális szituációk között felveti a gondolatot, hogy a VPA-kezelt és kontroll egyedekre ellentétes módon hatott a szeparáció és az újra találkozás az ismert társakkal. Bár utóbbi szituációban nem mutatkozott szignifikáns különbség a kezelések között, lehetséges, hogy nagyobb mintaelemszám mellett markánsabb aktiváció-különbséget tapasztaltam volna az interakció mellett.

Nagyon fontos hogy a szakirodalom szerint a teljes mezolimbikus jutalmazási rendszer összes dopaminerg neuronja közül az IF neuronjai differenciálódnak a legkésőbb, és zömében pont a 13. embrinális napon, amikor a VPA-kezelés történt (Bayer et al., 1995). Ez az egybeesés magyarázhatja, hogy miért mutatott az IF ilyen markáns különbségeket a vizsgálatunkban. A dopaminerg IF jutalmazás-feldolgozásban sejthető szerepe alapján gondolhatunk arra, hogy a kísérletben ellenkező hatású ingert jelentettek a szituációk a VPA-kezelt és a kontroll egereknek: mást találtak „jutalomnak” és mást averzívnek. Míg a kontroll állatokban a szeparáció inkább szorongást, stresszt idézett elő, amint arra a HIP és a PAG aktivációja is utalt, addig a jelentősen kevesebb stimulussal járó izoláció akár megnyugtatólag is hathatott a VPA kezelt csoport egyedeire. E hipotézis tesztelésére érdemes a jövőben alaposabb kutatásokat tervezni, így bővítve az IF irodalmát.

MH

Az IF-hez hasonlóan az MH aktivációjában a kontroll csoporton belül mutatkozott szignifikáns különbség a két szociális szituáció között, a „Szeparáció” szituációban pedig a kontroll egyedek és a VPA-kezelt egyedek között találtam szignifikáns eltérést a sejtmagjelölések denzitásában. Mindkét esetben a szeparált, kontroll egyedek mutattak erősebb aktivációt. Az IF-től eltérően azonban itt nem volt szignifikáns interakció a kezelések és a szociális szituációk között.

Tudjuk, hogy az MH sérülése hiperaktív viselkedéshez vezethet, valamint az új környezethez való alkalmazkodás sikertelenségéhez, impulzivitáshoz, nehézkes döntéshozatalhoz, és a térbeli memória sérüléséhez (Kobayashi et al., 2013). Ezen tünetek közül számos felfeldezhető az ASD-vel élő pácienseknél is (American Psychiatric Association, 2013). Az MH viselkedésben betöltött szerepének további fontos aspektusa a félelem és a szorongás szabályozása (Yamaguchi et al., 2013).

A kapott eredmények arra engednek következtetni, hogy a VPA-kezelés hatására szeparációkor nem az egészséges egyedekben megfigyelt módon aktiválódik az MH. Mivel

az MH szakirodalomban fellelhető vélt funkciói hasonlóságot mutatnak az ASD tüneteiben sérült funkciókkal, így eredményünk alapján érdemes ASD-vizsgálatokban alaposabban tanulmányozni ezt a területet.

A MH és az IF aktivitásának korrelációja

Az MH részben felelős az IF beidegzéséért (Phillipson, 1979b), így érdekes volt megvizsgálni a két terület aktivációjának kapcsolatát a szeparált egerek esetén, ahol ugyanis erős aktivációkülönbséget tapasztaltam a kezelések tekintetében mindkét terület esetén.

Az MH és az IF aktivációját korreláltatva a szeparált egyedek között szignifikánsan pozitív összefüggést találtam: ha magasabb sejtmagjelölés-denzitást mutatott az egyik agyterület, az együtt járt a másik agyterület magasabb értékeivel is.

Javasolni tudom tehát, hogy a két agyterület közötti kapcsolatot érdemes figyelembe venni a szociális viselkedést célzó kutatásokban, mindezt ideig ugyanis nem sok ismeretünk van róla.

A háromkamrás szociális újdonság teszt

A háromkamrás viselkedésteszt elemzése során az első idegen egyed behelyezésekor találtam eltérést a kezelések között. Ekkor a VPA-kezelt egyedek szignifikánsan kevesebb időt töltöttek abban a kamrában, amelyben az idegen egyed volt található, mint egészséges kontroll fajtársaik. Az üres és a közép kamrában töltött időben nem talál eltérést. Eredményeim egybevágnak a VPA szakirodalomban leírt hatásával a háromkamrás viselkedéstesztet tekintve (Choi et al., 2016; Kim et al., 2014; Mabunga et al., 2015; Schiavi et al., 2019). Az általam alkalmazott embrionális VPA kezelés tehát hatásosan idézett elő autisztikus fenotípust a bemutatott kísérletekben.

Összegeve elmondható, hogy az autizmus-modell egyedek az SzdH számos területén belül aktivációs különbséget mutattak az egészséges kontrollokkal összevetve, főként szeparáció esetén. Eredményeim alátámasztják a feltételezést, miszerint az ASD szociális viselkedésben tapasztalható tüneteit egy komplex hálózat rendellenes működése okozza, mely különböző szociális stimulusokra nagyobb, vagy épp kisebb aktivációt mutat az egészséges állapothoz képest. A szakdolgozatban bemutatott eredmények irányt mutathatnak olyan specifikusabb kutatások számára a jövőben, melyek az ASD tüneteit egy-

egy agyterületen belül részletesebb molekuláris, anatómiai és elektrofiziológiai tekintetben kívánják tanulmányozni.

Összefoglaló

Az autizmus spektrum zavar (ASD) egy élethosszig tartó idegrendszeri fejlődési rendellenesség, mely férfiaknál számottevően magasabb prevalenciát mutat, mint nőknél. Az ASD bármely súlyossági szintje esetén jellemezhető a szociális viselkedés sérülésével, főként a szexualitással nem kapcsolatos szituációkban. A komplex genetikai háttér mellett, a betegség gyakran teratogén hatásokra is visszavezethető. Ilyen lehet például az anya valproát (VPA) bevitele a terhesség alatt. Jelen vizsgálatomban az ASD modellezésére VPA-injektált nőstény egerek ivaréretlen hím kölykeit használtam. Feltérképeztem a szociális döntéshozatali hálózathoz (SzDH) tartozó agyterületek szociális stimuláció hatására történő változásait az alábbi területeken: anterior és poszterior bed nuclei of stria terminalis (a,pBNST), hippocampusz (HIP), periaqueductális szürkeállomány (PAG), ventrális tegmentális area interfascicularis nucleusa (IF); valamint az SzDH-n kívül eső, de a szociális viselkedésben fontos szerepet játszó mediális habenulát (MH) is vizsgáltam. Az anya VPA kezelését a vemhesség 13,5. napján végeztem. A megszületett kölykökön a VPA kezelés hatásosságát háromkamrás viselkedésteszt segítségével ellenőriztem, mely általánosan elfogadott módszer az ASD-re jellemző tünetek mérésére. Az elválasztás után csoportban tartott VPA-kezelt és kontroll egereket 31 napos korukban szeparáltam a megszokott társaiktól, majd egy napig egyedül tartottam őket. Ezután a szeparált egyedek egy részét visszahelyeztem megszokott alomtársaikhoz 90 percre (ez a szociális szituáció az „Újra találkozás” (ÚT) címet viseli); míg a többi szeparált egér nem kerültek visszahelyezésre („Szeparáció” (Sz) című szociális szituáció). Az állatokat ezután perfundáltam, az agyukból készült metszeteken c-Fos immunhisztokémiát alkalmaztam, így vizualizálva az idegsejtek aktivációját. A kezelések között a HIP, PAG, IF és az MH mutatott szignifikáns különbséget az S szociális szituáció következtében, és az aBNST az R következtében. A kontroll csoportban mindegyik vizsgált agyterületen szignifikáns különbséget találtam a szociális szituációk között, kivéve a BNST-ben. Egyedül a pBNST nem mutatott semmilyen különbséget se a kezelések hatására, se az egyes szituációk között. Funkcionálisan a tapasztalt aktivációs eltérések a szociális stressz eltérő jelentkezéséhez köthetőek elsődlegesen. Eredményeim alapján, a méhen belüli VPA-kitettség nagy valószínűséggel zavart okoz a SzDH komplex működésében, ezáltal hatva a szociális interakciók idegrendszeri hátterére. A korai posztnatális fejlődéstől kezdve rendellenesen működő SzDH meggátolja a normális szociális viselkedés kialakulását.

Abstract

The Autism Spectrum Disorder (ASD) is a lifelong neurodevelopmental disease that is extensively prevalent and males are multiple times more affected than females. ASD any degree of severity, is clinically characterized by social behaviour impairments, mainly involving difficulties in non-sexual social situations. Despite a complex genetic background, exposure to specific agents, such as valproic acid (VPA) during pregnancy, have been linked to ASD. In the current experiment I used the VPA-mouse model of ASD, investigating changes of the social decision-making network of brain regions (SDMN) of juvenile male mice in the light of several social settings. The examination was performed on the following parts of SDMN: the anterior and posterior bed nuclei of stria terminalis (a,pBNST), hippocampus (HIP), periaqueductal gray (PAG), and the interfascicular nucleus (IF) of the ventral tegmental area. Furthermore, I chose a brain region that is not part of the conventional SDMN, although it plays crucial role in social behaviour: the medial habenule (MH). VPA-injection of mothers happened on the embryonal day 13.5. The efficacy of VPA treatment on pups was validated by three-chamber behaviour test, commonly accepted for measuring the ASD-like effects of VPA exposure. c-Fos immunohistochemistry was performed in healthy and VPA-treated individuals in order to capture snapshots of the momentary activity of cells of the SDMN during two types of social situation: (S) separated from familiar companion and kept alone for one day; (R) separated for one day and then reinstated to familiar cagemates. Certain brain regions of the SDMN showed marked differences according to social situations and treatments. I found significant differences between treatments in the HIP, PAG, IF and in the MH during S social situation and in the aBNST during R. In the control group every brain region showed significant differences between social situations, except the BNST. The pBNST showed no difference in activity despite any treatment or social situation. The results are functionally best linked to dissimilar activation of brain regions due to social stress. Exposure to valproic acid most likely disrupts the SDMN and, therefore, affects the social interactions from early postnatal development, further hindering the acquisition of normal social behaviour.

Melléklet

A DSM-5 autizmus spektrumzavar (ASD) kritériumainak áttekintése példákkal

A. Perzisztens hiányossága a szociális kommunikációnak és a szociális interakcióknak számos kontextusban, amely jelenleg vagy a kórtörténet során az alábbi módokon jelentkezik:

1. Hiányosság a szociális-érzelmi kölcsönösségben, mely a szociális közeledés abnormalitásától és a normális oda-vissza működő társalgás képtelenségétől odaáig terjedhet, hogy a páciens nem osztozik az érdeklődésben, érzelmekben és képtelen szociális interakciót kezdeményezni, vagy arra választ adni.
2. A nonverbális kommunikáció hiánya, mely természetes része a szociális interakcióknak, az elégtelenül használt verbális és nonverbális jelek használatától kezdve az abnormalis szemkontaktus, testbeszéd, gesztikuláció megértése, és a teljes arcbeli kifejezések és nonverbális kommunikáció hiányáig.
3. Hiányosság a kapcsolatok kialakításában, fenntartásában és megértésében, onnantól kezdve, hogy a páciensnek problémát okoz a viselkedését különböző szociális kontextusokhoz igazítani, odaáig, hogy nehézséget okoz az elképzelésekkel, asszociációkkal való játék, vagy a barátkozás, egészen odaáig, hogy semmilyen érdeklődést nem mutat a páciens a szociális környezete iránt.

B. Korlátolt, repetitív viselkedésmintázatok, érdeklődés, és időtöltés, amely jelenleg vagy a kórtörténet során az alábbi módokon jelentkezik:

1. Sztereotíp vagy repetitív motoros mozgások, tárgyak használata, vagy beszéd (mint egyszerű motoros sztereotípiák, játékok sorrendbe rendezése vagy tárgyak megfordítása, echolália, idioszinkratikus beszéd).
2. A megszokotthoz való ragaszkodás, nem flexibilis rutinok kiépítése, ritualizált mintázatok verbális és nem verbális viselkedésben (mint extrém stresszreakció kiss változásokra, nehézség az átmeneti állapotok megélésében, merev gondolkodási mintázatok, napi szintű szükségessége egy rutin elvégzésének vagy egy bizonyos étel fogyasztásának.)

3. Erősen korlátolt, fixált érdeklődés, amely intenzitásában vagy fókuszában abnormális (mint erős ragaszkodás szokatlan tárgyakhoz, vagy azokkal való elfoglaltság, rendkívül körülírt vagy konzisztens az érdeklődés tárgya.)
4. Hiper- vagy hipoaktivitás az érzékszervi ingerekre vagy szokatlan érdeklődés a környezet érzékszervi aspektusai iránt (mint látszólagos érzéketlenség fájdalomra/hőmérsékletre, adverbív válasz specifikus hangokra és textúrákra, túlzott szagolgatás vagy érintése tárgyaknak, vizuálisan megigéző hatással bírhatnak a páciensekre a fények és mozgások.)

C. A tüneteknek kötelező érvénnyel a korai fejlődési időszakban kell jelentkezniük (bár nem minden esetben jelentkeznek teljes mértékben mielőtt a társadalmi elvárások meghaladnák a korlátolt teljesítőképeséget, vagy tanult stratégiákkal gyakran elfedhetőek a későbbi élet során).

1. A gyermeket elsődlegesen nevelő személyek beszámolója a tünetekről többi nem esszenciális feltétel
2. A korai fejlődési szakasz, vagy „kora gyermekkor” 8 éves és annál kisebb korút jelent.

D. A tünetek klinikailag szignifikáns zavart okoznak a szociális, foglalkozásbeli, vagy egyéb fontos életterületeken.

E. Ezek a zavarok nem magyarázhatóak jbban intellektuális képességek hiányosságával (intellektuális fejlődési zavar) vagy globális fejlődési lemaradással. Az intellektuális képességek fogyatékosága az autizmus spektrumzavarral együttesen gyakran előfordul, komorbid diagnózist eredményezve. A szociális kommunikáció alacsonyabb szintet kell megüssön, mint ami általánosan a fejlettségi állapot szerint elvárható lenne.

I. *Táblázat: A DSM-5 autizmus spektrumzavar (ASD) kritériumainak áttekintése példákkal*

Napok	Esemény	
0,5. gesztációs nap	Nőstények első testtömeg-mérése;	
8,5. gesztációs nap	Nőstények második testtömeg-mérése;	
13,5. gesztációs nap	Nőstények utolsó testtömeg-mérése; ez alapján a potenciálisan vemhes állatok kiválasztása; valproát és fiziológias sóoldat (kontroll kezelés) beadása	
24. posztnatális nap	Hím utódokkal háromkamra szociális újdonság teszt elvégzése; Ezen utódok öt fős csoportokba sorolása; A szeparációs kísérletben részt vevő kölykök egyedi farokjelölése;	
32. posztnatális nap	Kontroll-videófelvétel készítése a csoportokról zavarás után; Szeparációs kísérlet első napja, a 24 órás szeparáció kezdete	
33. posztnatális nap	Szeparáció vége;	
	Az első szociális szituációban részt vevő egerek perfundálása;	A második szociális szituációban résztvevő egerek újra találkoznak a társaikkal és másfél órát együtt töltenek, 10 perces videófelvétel az újra találkozásról; Az egerek perfúziója

II. Táblázat: A szeparációs kísérletben résztvevő fiatal him egerek életútja a 0,5 embrionális naptól kezdve a perfúzióig

	Folyamat	Idő
1.	Mosás (0,1M) PBS-ben	3 × 10 perc
2.	2%-os hidrogén-peroxid hozzáadása az utolsó a PBS-hez	30 perc
3.	Mosás (0,1M) PBS-ben	3 × 10 perc
4.	Blokk: 1%-os normál ló szérum + PBS + 0,2 %-os Tween 20	30 perc
5.	Primer: anti-c-Fos (nyúlban termelve); 1:5000 + 1%-os normál ló szérum + 0,2 %-os Tween 20	Egy éjszakán keresztül, 4 °C-on
5.	Mosás (0,1M) PBS-ben	3 × 10 perc
6.	Szekunder: ImmPRESS® anti-nyúl IgG (lóban termelve); 1:200 PBS-ben keverve	2 óra
7.	Mosás (0,1M) PBS-ben	2 × 10 perc
8.	Mosás (0,1M) TRIS-ben	10 perc
9.	Nikkel-DAB festés: 15 mg DAB 100 ml 0,05M TRIS-ben (pH 0,8) + 400 mg ammónium-nikkel-szulfát-hexahidrát Előhívás: 0,5 µl 1%-os hidrogén-peroxid / ml	10 perc inkubáció sötétben, majd 5 perc hívás
10.	Mosás PBS-ben	3 × 10 perc

III. Táblázat: Az immunhisztokémia részletes protokollja.

Irodalomjegyzék

- American Psychiatric Association, 2013. Task Force on DSM 5. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-5. DSM-5. Philadelphia: American Psychiatric Association
- Agetsuma, M., Aizawa, H., Aoki, T., Nakayama, R., Takahoko, M., Goto, M., Sassa, T., Amo, R., Shiraki, T., Kawakami, K., Hosoya, T., Higashijima, S., Okamoto, H., 2010. The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. *Nat Neurosci* 13, 1354–1356. <https://doi.org/10.1038/nn.2654>
- Agrawal, S., Rao, S.C., Bulsara, M.K., Patole, S.K., 2018. Prevalence of Autism Spectrum Disorder in Preterm Infants: A Meta-analysis. *Pediatrics* 142. <https://doi.org/10.1542/peds.2018-0134>
- Aly, M., Knight, R.T., Yonelinas, A.P., 2010. Faces are special but not too special: Spared face recognition in amnesia is based on familiarity. *Neuropsychologia* 48, 3941–3948. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2010.09.005>
- Ardinger, H.H., Atkin, J.F., Blackston, R.D., Elsas, L.J., Clarren, S.K., Livingstone, S., Flannery, D.B., Pellock, J.M., Harrod, M.J., Lammer, E.J., 1988. Verification of the fetal valproate syndrome phenotype. *Am J Med Genet* 29, 171–185. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320290123>
- Bandler, R., Carrive, P., 1988. Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. *Brain Research* 439, 95–106. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)91465-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)91465-5)
- Battino, D., Binelli, S., Caccamo, M.L., Canevini, M.P., Canger, R., Como, M.L., Croci, D., Giambattista, M.D., Granata, T., Pardi, G., Avanzini, G., 2009. Malformations in offspring of 305 epileptic women: a prospective study. *Acta Neurologica Scandinavica* 85, 204–207. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1992.tb04029.x>
- Bayer, Shirley A., Wills, Katherine V., Triarhou, Lazaros C., Ghetti, B., 1995. Time of neuron origin and gradients of neurogenesis in midbrain dopaminergic neurons in the mouse. *Exp Brain Res* 105. <https://doi.org/10.1007/BF00240955>
- Benarroch, E.E., 2013. Oxytocin and vasopressin: Social neuropeptides with complex neuromodulatory functions. *Neurology* 80, 1521–1528. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828cfb15>
- Benner, S., Endo, T., Endo, N., Kakeyama, M., Tohyama, C., 2014. Early deprivation induces competitive subordination in C57BL/6 male mice. *Physiology & Behavior* 137, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.06.018>
- Bhat, A.N., Landa, R.J., Galloway, J.C., 2011. Current perspectives on motor functioning in infants, children, and adults with autism spectrum disorders. *Phys Ther* 91, 1116–1129. <https://doi.org/10.2522/ptj.20100294>
- Bird, C.M., Shallice, T., Cipolotti, L., 2007. Fractionation of memory in medial temporal lobe amnesia. *Neuropsychologia* 45, 1160–1171. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2006.10.011>
- Bissonette, G.B., Roesch, M.R., 2016. Development and function of the midbrain dopamine system: what we know and what we need to. *Genes Brain Behav* 15, 62–73. <https://doi.org/10.1111/gbb.12257>
- Bota, M., Sporns, O., Swanson, L.W., 2012. Neuroinformatics analysis of molecular expression patterns and neuron populations in gray matter regions: the rat BST as a rich exemplar. *Brain Res* 1450, 174–193. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.02.034>
- Bota, M., Swanson, L.W., 2010. Collating and Curating Neuroanatomical Nomenclatures: Principles and Use of the Brain Architecture Knowledge Management System (BAMS). *Front Neuroinform* 4, 3. <https://doi.org/10.3389/fninf.2010.00003>
- Bowden, C., 1998. New Concepts in Mood Stabilization: Evidence for the Effectiveness of Valproate and Lamotrigine. *Neuropsychopharmacology* 19, 194–199. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(98\)00025-6](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(98)00025-6)

- Brent, L.J.N., Heilbronner, S.R., Horvath, J.E., Gonzalez-Martinez, J., Ruiz-Lambides, A., Robinson, A.G., Skene, J.H.P., Platt, M.L., 2013. Genetic origins of social networks in rhesus macaques. *Scientific Reports* 3, 1042. <https://doi.org/10.1038/srep01042>
- Brischoux, F., Chakraborty, S., Brierley, D.I., Ungless, M.A., 2009. Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4894–4899. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811507106>
- Bromberg-Martin, E.S., Matsumoto, M., Hikosaka, O., 2010. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron* 68, 815–834. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.022>
- Bromley, R.L., Mawer, G.E., Briggs, M., Cheyne, C., Clayton-Smith, J., García-Fiñana, M., Kneen, R., Lucas, S.B., Shallcross, R., Baker, G.A., Liverpool and Manchester Neurodevelopment Group, 2013. The prevalence of neurodevelopmental disorders in children prenatally exposed to antiepileptic drugs. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84, 637–643. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-304270>
- Burton B. S., 1882. On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetate. *Am Chem J.* 1882; 3: 385-395
- Caldecott-Hazard, S., Mazziotta, J., Phelps, M., 1988. Cerebral correlates of depressed behavior in rats, visualized using ¹⁴C-2-deoxyglucose autoradiography. *J Neurosci* 8, 1951–1961.
- Careaga, M., Ashwood, P., 2012. Autism Spectrum Disorders: From Immunity to Behavior, in: Yan, Q. (Ed.), *Psychoneuroimmunology: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 219–240. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-071-7_12
- Carvalho, M.C., Veloni, A.C., Genaro, K., Brandão, M.L., 2018. Behavioral sensitization induced by dorsal periaqueductal gray electrical stimulation is counteracted by NK1 receptor antagonism in the ventral hippocampus and central nucleus of the amygdala. *Neurobiology of Learning and Memory* 148, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.01.009>
- Chen, G., Huang, L.D., Jiang, Y.M., Manji, H.K., 1999. The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3. *J Neurochem* 72, 1327–1330. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0721327.x>
- Chen, K., Fu, Y., Wang, Y., Liao, L., Xu, H., Zhang, A., Zhang, J., Fan, L., Ren, J., Fang, B., 2020. Therapeutic Effects of the In Vitro Cultured Human Gut Microbiota as Transplants on Altering Gut Microbiota and Improving Symptoms Associated with Autism Spectrum Disorder. *Microb Ecol.* <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01494-w>
- Cheng, N., Rho, J.M., Masino, S.A., 2017. Metabolic Dysfunction Underlying Autism Spectrum Disorder and Potential Treatment Approaches. *Front Mol Neurosci* 10, 34. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00034>
- Choi, C.S., Gonzales, E.L., Kim, K.C., Yang, S.M., Kim, J.-W., Mabunga, D.F., Cheong, J.H., Han, S.-H., Bahn, G.H., Shin, C.Y., 2016. The transgenerational inheritance of autism-like phenotypes in mice exposed to valproic acid during pregnancy. *Scientific Reports* 6, 36250. <https://doi.org/10.1038/srep36250>
- Christensen, D.L., 2018. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *MMWR Surveill Summ* 65. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6513a1>
- Christensen, J., Grønberg, T.K., Sørensen, M.J., Schendel, D., Parner, E.T., Pedersen, L.H., Vestergaard, M., 2013. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA* 309, 1696–1703. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.2270>
- Clayton-Smith, J., Bromley, R., Dean, J., Journal, H., Odent, S., Wood, A., Williams, J., Cuthbert, V., Hackett, L., Aslam, N., Malm, H., James, G., Westbom, L., Day, R., Ladusans, E., Jackson, A., Bruce, I., Walker, R., Sidhu, S., Dyer, C., Ashworth, J., Hindley, D., Diaz, G.A., Rawson, M., Turnpenny, P., 2019. Diagnosis and management of individuals with Fetal Valproate Spectrum Disorder; a consensus statement from the European Reference Network for Congenital Malformations and Intellectual Disability. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 14, 180. <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1064-y>

- Clayton-Smith, J., Donnai, D., 1995. Fetal valproate syndrome. *Journal of Medical Genetics* 32, 724–727. <https://doi.org/10.1136/jmg.32.9.724>
- Comoli, E., Coizet, V., Boyes, J., Bolam, J.P., Canteras, N.S., Quirk, R.H., Overton, P.G., Redgrave, P., 2003. A direct projection from superior colliculus to substantia nigra for detecting salient visual events. *Nat Neurosci* 6, 974–980. <https://doi.org/10.1038/nn1113>
- Constantinescu, A.O., O'Reilly, J.X., Behrens, T.E.J., 2016. Organizing conceptual knowledge in humans with a gridlike code. *Science* 352, 1464–1468. <https://doi.org/10.1126/science.aaf0941>
- Corbett, B.A., Simon, D., 2014. Adolescence, Stress and Cortisol in Autism Spectrum Disorders. *OA Autism* 1, 2.
- Crews, D., 2003. The development of phenotypic plasticity: where biology and psychology meet. *Dev Psychobiol* 43, 1–10. <https://doi.org/10.1002/dev.10115>
- Davachi, L., DuBrow, S., 2015. How the hippocampus preserves order: the role of prediction and context. *Trends in Cognitive Sciences* 19, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2014.12.004>
- Davidson, P.S.R., Drouin, H., Kwan, D., Moscovitch, M., Rosenbaum, R.S., 2012. Memory as social glue: close interpersonal relationships in amnesic patients. *Front Psychol* 3, 531. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2012.00531>
- Davis, R., Peters, D., McTavish, D., 1994. Valproic Acid: A Reappraisal of its Pharmacological Properties and Clinical Efficacy in Epilepsy. *Drugs* 47, 332–372.
- Dawson, G., 2008. Early behavioral intervention, brain plasticity, and the prevention of autism spectrum disorder. *Dev Psychopathol* 20, 775–803. <https://doi.org/10.1017/S0954579408000370>
- de Jong, T.R., Chauke, M., Harris, B.N., Saltzman, W., 2009. From here to paternity: neural correlates of the onset of paternal behavior in California mice (*Peromyscus californicus*). *Horm Behav* 56, 220–231. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.05.001>
- De Rubeis, S., He, X., Goldberg, A.P., Poultney, C.S., Samocha, K., Cicek, A.E., Kou, Y., Liu, L., Fromer, M., Walker, S., Singh, T., Klei, L., Kosmicki, J., Fu, S.-C., Aleksic, B., Biscaldi, M., Bolton, P.F., Brownfeld, J.M., Cai, J., Campbell, N.J., Carracedo, A., Chahrour, M.H., Chiocchetti, A.G., Coon, H., Crawford, E.L., Crooks, L., Curran, S.R., Dawson, G., Duketis, E., Fernandez, B.A., Gallagher, L., Geller, E., Guter, S.J., Hill, R.S., Ionita-Laza, I., Gonzalez, P.J., Kilpinen, H., Klauck, S.M., Klevzon, A., Lee, I., Lei, J., Lehtimäki, T., Lin, C.-F., Ma'ayan, A., Marshall, C.R., McInnes, A.L., Neale, B., Owen, M.J., Ozaki, N., Parellada, M., Parr, J.R., Purcell, S., Puura, K., Rajagopalan, D., Rehnström, K., Reichenberg, A., Sabo, A., Sachse, M., Sanders, S.J., Schafer, C., Schulte-Rüther, M., Skuse, D., Stevens, C., Szatmari, P., Tammimies, K., Valladares, O., Voran, A., Wang, L.-S., Weiss, L.A., Willsey, A.J., Yu, T.W., Yuen, R.K.C., Cook, E.H., Freitag, C.M., Gill, M., Hultman, C.M., Lehner, T., Palotie, A., Schellenberg, G.D., Sklar, P., State, M.W., Sutcliffe, J.S., Walsh, C.A., Scherer, S.W., Zwick, M.E., Barrett, J.C., Cutler, D.J., Roeder, K., Devlin, B., Daly, M.J., Buxbaum, J.D., 2014. Synaptic, transcriptional, and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* 515, 209–215. <https://doi.org/10.1038/nature13772>
- Deco, G., Rolls, E.T., 2005. Attention, short-term memory, and action selection: a unifying theory. *Prog Neurobiol* 76, 236–256. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.08.004>
- Depaulis, A., Bandler, R., 2012. The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical, and Neurochemical Organization. Springer Science & Business Media.
- Deshmukh, S.S., Knierim, J.J., 2013. Influence of local objects on hippocampal representations: Landmark vectors and memory. *Hippocampus* 23, 253–267. <https://doi.org/10.1002/hipo.22101>
- DiCicco-Bloom, E., Lord, C., Zwaigenbaum, L., Courchesne, E., Dager, S.R., Schmitz, C., Schultz, R.T., Crawley, J., Young, L.J., 2006. The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. *J Neurosci* 26, 6897–6906. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1712-06.2006>
- Dickinson, R.G., Lawyer, C.H., Kaufman, S.N., Lynn, R.K., Gerber, N., Novy, M.J., Cook, M.J., 1980. Materno-fetal pharmacokinetics and fetal distribution of valproic acid in a pregnant rhesus monkey. *Pediatr Pharmacol (New York)* 1, 71–83.
- DiLiberti, J.H., Farndon, P.A., Dennis, N.R., Curry, C.J., 1984. The fetal valproate syndrome. *Am J Med Genet* 19, 473–481. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320190308>

- Dorsch, M., Wittur, I., Garrels, W., 2020. Efficiency of timed pregnancies in C57BL/6 and BALB/c mice by mating one male with up to four females. *Lab Anim* 002367721989768. <https://doi.org/10.1177/0023677219897687>
- Dumais, K.M., Alonso, A.G., Immormino, M.A., Bredewold, R., Veenema, A.H., 2016. Involvement of the oxytocin system in the bed nucleus of the stria terminalis in the sex-specific regulation of social recognition. *Psychoneuroendocrinology* 64, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.11.007>
- Eichenbaum, H., 2014. Time cells in the hippocampus: a new dimension for mapping memories. *Nature Reviews Neuroscience* 15, 732–744. <https://doi.org/10.1038/nrn3827>
- Elsabbagh, M., Divan, G., Koh, Y.-J., Kim, Y.S., Kauchali, S., Marcín, C., Montiel-Nava, C., Patel, V., Paula, C.S., Wang, C., Yasamy, M.T., Fombonne, E., 2012. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res* 5, 160–179. <https://doi.org/10.1002/aur.239>
- European Medicines Agency New, 2018. Measures to avoid valproate exposure in pregnancy endorsed. EMA/145600/2018 https://www.ema.europa.eu/documents/referral/valproate-article-31-referral-new-measures-avoid-valproate-exposure-pregnancy-endorsed_en-0.pdf. Accessed 31 May 2018.
- European Medicines Agency New, 2018. PRAC recommends new measures to avoid valproate exposure in pregnancy. EMA/EMA/67672/2018 https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/valproate-article-31-referral-prac-recommends-new-measures-avoid-valproate-exposure-pregnancy_en.pdf. Accessed 9 February 2018.
- Esposito, A., Demeurisse, G., Alberti, B., Fabbro, F., 1999. Complete mutism after midbrain periaqueductal gray lesion. *Neuroreport* 10, 681–685. <https://doi.org/10.1097/00001756-199903170-00004>
- Fanselow, M.S., Decola, J.P., Oca, B.M.D., Landeira-Fernandez, J., 1995. Ventral and dorsolateral regions of the midbrain periaqueductal gray (PAG) control different stages of defensive behavior: Dorsolateral PAG lesions enhance the defensive freezing produced by massed and immediate shock. *Aggressive Behavior* 21, 63–77. [https://doi.org/10.1002/1098-2337\(1995\)21:1<63::AID-AB2480210109>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1098-2337(1995)21:1<63::AID-AB2480210109>3.0.CO;2-F)
- Faull, O.K., Pattinson, K.T., n.d. The cortical connectivity of the periaqueductal gray and the conditioned response to the threat of breathlessness. *eLife* 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.21749>
- Fiske, S.T., 2012. Journey to the edges: Social structures and neural maps of inter-group processes. *British Journal of Social Psychology* 51, 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.2044-8309.2011.02092.x>
- Floody, O.R., O'Donohue, T.L., 1980. Lesions of the mesencephalic central gray depress ultrasound production and lordosis by female hamsters. *Physiol Behav* 24, 79–85. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(80\)90017-7](https://doi.org/10.1016/0031-9384(80)90017-7)
- Freitag, F.G., Collins, S.D., Carlson, H.A., Goldstein, J., Saper, J., Silberstein, S., Mathew, N., Winner, P.K., Deaton, R., Sommerville, K., 2002. A randomized trial of divalproex sodium extended-release tablets in migraine prophylaxis. *Neurology* 58, 1652–1659. <https://doi.org/10.1212/WNL.58.11.1652>
- Frey, H.-H., Löscher, W., 1978. Distribution of valproate across the interface between blood and cerebrospinal fluid. *Neuropharmacology* 17, 637–642. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(78\)90160-0](https://doi.org/10.1016/0028-3908(78)90160-0)
- Frith, U., Happé, F., 2005. Autism spectrum disorder. *Curr Biol* 15, R786–790. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.09.033>
- Gauthier, J.L., Tank, D.W., 2018. A Dedicated Population for Reward Coding in the Hippocampus. *Neuron* 99, 179–193.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.06.008>
- George, D.T., Ameli, R., Koob, G.F., 2019. Periaqueductal Gray Sheds Light on Dark Areas of Psychopathology. *Trends in Neurosciences* 42, 349–360. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.03.004>
- Geschwind, D.H., Levitt, P., 2007. Autism spectrum disorders: developmental disconnection syndromes. *Curr Opin Neurobiol* 17, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.01.009>

- Goodson, J.L., 2005. The Vertebrate Social Behavior Network: Evolutionary Themes and Variations. *Horm Behav* 48, 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.02.003>
- Gorelova, N., Mulholland, P.J., Chandler, L.J., Seamans, J.K., 2012. The Glutamatergic Component of the Mesocortical Pathway Emanating from Different Subregions of the Ventral Midbrain. *Cerebral Cortex* 22, 327–336. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhr107>
- Groppe, S.E., Gossen, A., Rademacher, L., Hahn, A., Westphal, L., Gründer, G., Spreckelmeyer, K.N., 2013. Oxytocin Influences Processing of Socially Relevant Cues in the Ventral Tegmental Area of the Human Brain. *Biological Psychiatry, Oxytocin and Autism* 74, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.12.023>
- Hadjikhani, N., Joseph, R.M., Snyder, J., Tager-Flusberg, H., 2006. Abnormal activation of the social brain during face perception in autism. *Hum Brain Mapp* 28, 441–449. <https://doi.org/10.1002/hbm.20283>
- Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M.-B., Moser, E.I., 2005. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436, 801–806. <https://doi.org/10.1038/nature03721>
- Hamilton, A.F. de C., 2015. Cognitive underpinnings of social interaction. *Q J Exp Psychol (Hove)* 68, 417–432. <https://doi.org/10.1080/17470218.2014.973424>
- Heinrichs, M., von Dawans, B., Domes, G., 2009. Oxytocin, vasopressin, and human social behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology, Hormones & Social Behavior* 30, 548–557. <https://doi.org/10.1016/j.yfme.2009.05.005>
- Henckens, M.J. a. G., Printz, Y., Shamgar, U., Dine, J., Lebow, M., Drori, Y., Kuehne, C., Kolarz, A., Eder, M., Deussing, J.M., Justice, N.J., Yizhar, O., Chen, A., 2017. CRF receptor type 2 neurons in the posterior bed nucleus of the stria terminalis critically contribute to stress recovery. *Molecular Psychiatry* 22, 1691–1700. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.133>
- Hendrickx, A.G., Nau, H., Binkerd, P., Rowland, J.M., Rowland, J.R., Cukierski, M.J., Cukierski, M.A., 1988. Valproic acid developmental toxicity and pharmacokinetics in the rhesus monkey: An interspecies comparison. *Teratology* 38, 329–345. <https://doi.org/10.1002/tera.1420380405>
- Herdegen, T., Leah, J.D., 1998. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREBrATF proteins 121.
- Heyne, G.W., Plisch, E.H., Melberg, C.G., Sandgren, E.P., Peter, J.A., Lipinski, R.J., n.d. A Simple and Reliable Method for Early Pregnancy Detection in Inbred Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 4.
- Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K., Nakanishi, S., 2010. Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron* 66, 896–907. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.05.011>
- Huai-Yun, H., Secrest, D.T., Mark, K.S., Carney, D., Brandquist, C., Elmquist, W.F., Miller, D.W., 1998. Expression of Multidrug Resistance-Associated Protein (MRP) in Brain Microvessel Endothelial Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243, 816–820. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.8132>
- Huot, C., Gauthier, M., Lebel, M., Larbrisseau, A., 1987. Congenital Malformations Associated with Maternal Use of Valproic Acid. *Can. j. neurol. sci.* 14, 290–293. <https://doi.org/10.1017/S0317167100026639>
- Insel, T.R., Fernald, R.D., 2004. HOW THE BRAIN PROCESSES SOCIAL INFORMATION: Searching for the Social Brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 697–722. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144148>
- Insel, T.R., Young, L.J., 2001. The neurobiology of attachment. *Nature Reviews Neuroscience* 2, 129–136. <https://doi.org/10.1038/35053579>
- Jacob, L., Schmitz, B., Bohlken, J., Kostev, K., 2019. Trends in valproate use in patients in Germany between 2009 and 2017. *Epilepsy Behav* 92, 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2018.12.002>
- Jäger-Roman, E., Deichl, A., Jakob, S., Hartmann, A.-M., Koch, S., Rating, D., Steldinger, R., Nau, H., Helge, H., 1986. Fetal growth, major malformations, and minor anomalies in infants born to women receiving valproic acid. *The Journal of Pediatrics* 108, 997–1004. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(86\)80949-0](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(86)80949-0)

- Jeong, E.J., Yu, W.-J., Kim, C.-Y., Chung, M.-K., 2010. Placenta Transfer and Toxicokinetics of Valproic Acid in Pregnant Cynomolgus Monkeys. *Toxicol Res* 26, 275–283.
- Johnston, J.B., 1923. Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. V. Survey of forebrain morphology. *Journal of Comparative Neurology* 36, 143–192. <https://doi.org/10.1002/cne.900360205>
- Jr, W., Cs, B., Bi, H., Gw, A., 2007. Striatal contributions to reward and decision making: making sense of regional variations in a reiterated processing matrix. *Ann N Y Acad Sci* 1104, 192–212. <https://doi.org/10.1196/annals.1390.016>
- Ju, G., Swanson, L.W., 1989. Studies on the cellular architecture of the bed nuclei of the stria terminalis in the rat: I. Cytoarchitecture. *J Comp Neurol* 280, 587–602. <https://doi.org/10.1002/cne.902800409>
- Julian, J.B., Keinath, A.T., Frazzetta, G., Epstein, R.A., 2018. Human entorhinal cortex represents visual space using a boundary-anchored grid. *Nature Neuroscience* 21, 191–194. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0049-1>
- Julio-Pieper, M., Bravo, J.A., Aliaga, E., Gotteland, M., 2014. Review article: intestinal barrier dysfunction and central nervous system disorders--a controversial association. *Aliment Pharmacol Ther* 40, 1187–1201. <https://doi.org/10.1111/apt.12950>
- Jürgens, U., 2002. A study of the central control of vocalization using the squirrel monkey. *Med Eng Phys* 24, 473–477. [https://doi.org/10.1016/s1350-4533\(02\)00051-6](https://doi.org/10.1016/s1350-4533(02)00051-6)
- Kaidanovich-Beilin, O., Lipina, T., Vukobradovic, I., Roder, J., Woodgett, J.R., 2011. Assessment of Social Interaction Behaviors. *JoVE* 2473. <https://doi.org/10.3791/2473>
- Kanitz, E., Puppe, B., Tuchscherer, M., Heberer, M., Viergutz, T., Tuchscherer, A., 2009. A single exposure to social isolation in domestic piglets activates behavioural arousal, neuroendocrine stress hormones, and stress-related gene expression in the brain. *Physiology & Behavior* 98, 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.05.007>
- Kataoka, S., Takuma, K., Hara, Y., Maeda, Y., Ago, Y., Matsuda, T., 2013. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 16, 91–103. <https://doi.org/10.1017/S1461145711001714>
- Kim, J.-W., Seung, H., Kwon, K.J., Ko, M.J., Lee, E.J., Oh, H.A., Choi, C.S., Kim, K.C., Gonzales, E.L., You, J.S., Choi, D.-H., Lee, J., Han, S.-H., Yang, S.M., Cheong, J.H., Shin, C.Y., Bahn, G.H., 2014. Subchronic Treatment of Donepezil Rescues Impaired Social, Hyperactive, and Stereotypic Behavior in Valproic Acid-Induced Animal Model of Autism. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104927>
- Kobayashi, Y., Sano, Y., Vannoni, E., Goto, H., Suzuki, H., Oba, A., Kawasaki, H., Kanba, S., Lipp, H.-P., Murphy, N.P., Wolfer, D.P., Itohara, S., 2013. Genetic dissection of medial habenula-interpeduncular nucleus pathway function in mice. *Front Behav Neurosci* 7, 17. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00017>
- Koerner, M., Yerby, M., Friel, P., McCormick, K., 1989. Valproic Acid Disposition and Protein Binding in Pregnancy: Therapeutic Drug Monitoring 11, 228–230. <https://doi.org/10.1097/00007691-198905000-00002>
- Kollack, S.S., Newman, S.W., 1992. Mating behavior induces selective expression of Fos protein within the chemosensory pathways of the male Syrian hamster brain. *Neurosci Lett* 143, 223–228. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90270-h](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90270-h)
- Kollack-Walker, S., Newman, S.W., 1995. Mating and agonistic behavior produce different patterns of Fos immunolabeling in the male Syrian hamster brain. *Neuroscience* 66, 721–736. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00563-k](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00563-k)
- Kumaran, D., Banino, A., Blundell, C., Hassabis, D., Dayan, P., 2016. Computations Underlying Social Hierarchy Learning: Distinct Neural Mechanisms for Updating and Representing Self-Relevant Information. *Neuron* 92, 1135–1147. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.10.052>
- Kumaran, D., Melo, H.L., Duzel, E., 2012. The Emergence and Representation of Knowledge about Social and Nonsocial Hierarchies. *Neuron* 76, 653–666. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.035>

- Kyuhou, S., Gemba, H., 1998. Two vocalization-related subregions in the midbrain periaqueductal gray of the guinea pig. *Neuroreport* 9, 1607–1610. <https://doi.org/10.1097/00001756-199805110-00064>
- Lebow, M.A., Chen, A., 2016. Overshadowed by the amygdala: the bed nucleus of the stria terminalis emerges as key to psychiatric disorders. *Mol Psychiatry* 21, 450–463. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.1>
- Lecourtier, L., Neijt, H.C., Kelly, P.H., 2004. Habenula lesions cause impaired cognitive performance in rats: implications for schizophrenia. *Eur J Neurosci* 19, 2551–2560. <https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03356.x>
- Lee, Y.-A., Goto, Y., 2011. Neurodevelopmental disruption of cortico-striatal function caused by degeneration of habenula neurons. *PLoS One* 6, e19450. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019450>
- Levy R. H., Shen D., Abbott F., 2002. Valproic acid: chemistry, biotransformation and pharmacokinetics. In: Levy RH, Mattson BS, Meldrum BS, et al., editors. *Antiepileptic drugs*. 5th ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams and Wilkins, 2002: 780-800
- Li, X., Qi, J., Yamaguchi, T., Wang, H.-L., Morales, M., 2013. Heterogeneous composition of dopamine neurons of the rat A10 region: molecular evidence for diverse signaling properties. *Brain Struct Funct* 218, 1159–1176. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0452-z>
- Lim, J., Ryu, J., Kang, S., Noh, H.J., Kim, C.H., 2019. Autism-like behaviors in male mice with a *Pcdh19* deletion. *Mol Brain* 12, 95. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0519-3>
- Lonstein, J.S., Stern, J.M., 1997. Role of the midbrain periaqueductal gray in maternal nurturance and aggression: c-fos and electrolytic lesion studies in lactating rats. *J Neurosci* 17, 3364–3378.
- LoParo, D., Waldman, I.D., 2015. The oxytocin receptor gene (OXTR) is associated with autism spectrum disorder: a meta-analysis. *Mol Psychiatry* 20, 640–646. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.77>
- Löscher, W., 1999. Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Prog Neurobiol* 58, 31–59. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(98\)00075-6](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(98)00075-6)
- Löscher, W., Frey, H.-H., 1984. Kinetics of Penetration of Common Antiepileptic Drugs into Cerebrospinal Fluid. *Epilepsia* 25, 346–352. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1984.tb04199.x>
- Löscher W., 2002. Valproic Acid: Mechanisms of Action. In „Antiepileptic Drugs” (R. H. Levy, R. H. Mattson, B. S. Meldrum, and E. Perucca, Eds.), 5th ed., pp. 767-779. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Ma, W., Miao, Z., Novotny, M.V., 1998. Role of the Adrenal Gland and Adrenal-Mediated Chemosignals in Suppression of Estrus in the House Mouse: The Lee-Boot Effect Revisited1. *Biology of Reproduction* 59, 1317–1320. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.6.1317>
- Mabunga, D.F.N., Gonzales, E.L.T., Kim, J., Kim, K.C., Shin, C.Y., 2015. Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. *Exp Neurobiol* 24, 285–300. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.285>
- MacDonald, C.J., Lepage, K.Q., Eden, U.T., Eichenbaum, H., 2011. Hippocampal “Time Cells” Bridge the Gap in Memory for Discontiguous Events. *Neuron* 71, 737–749. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.012>
- Machado CJ, Bachevalier J., 2006. The impact of selective amygdala, orbital frontal cortex, or hippocampal formation lesions on established social relationships in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Behav Neurosci* 120: 761–786. [doi:10.1037/0735-7044.120.4.761](https://doi.org/10.1037/0735-7044.120.4.761)
- Marson, A., Burnside, G., Appleton, R., Smith, Dave, Leach, J.P., Sills, G., Tudur-Smith, C., Plumpton, C., Hughes, D.A., Williamson, P., Baker, G.A., Balabanova, S., Taylor, C., Brown, R., Hindley, Dan, Howell, S., Maguire, M., Mohanraj, R., Smith, P.E., Lanyon, K., Manford, M., Chitre, M., Parker, A., Swiderska, N., Appleton, R., Pauling, J., Hughes, A., Gupta, R., Hanif, S., Awadh, M., Ragunathan, S., Cable, N., Cooper, P., Hindley, Daniel, Rakshi, K., Molloy, S., Reuber, M., Ayonrinde, K., Wilson, M., Saladi, S., Gibb, J., Funston, L.-A., Cassidy, D., Boyd, J., Ratnayaka, M., Faza, H., Sadler, M., Al-Moasseb, H., Galtrey, C., Wren, D., Olabi, A., Fuller, G., Khan, M., Kallappa, C., Chinthapalli, R.,

- Aji, B., Davies, R., Foster, K., Hitiris, N., Maguire, M., Hussain, N., Dowson, S., Ellison, J., Sharrack, B., Gandhi, V., Powell, R., Tittensor, P., Summers, B., Shashikiran, S., Dison, P.J., Samarasekera, S., McCorry, D., White, K., Nithi, K., Richardson, M., Brown, R., Page, R., Deekollu, D., Slaght, S., Warriner, S., Ahmed, M., Chaudhuri, A., Chow, G., Artal, J., Kucinskiene, D., Sreenivasa, H., Velmurugan, Singara, Zipitis, C.S., McLean, B., Lal, V., Gregoriou, A., Maddison, P., Pickersgill, T., Anderson, J., Lawthom, C., Howell, S., Whitlingum, G., Rakowicz, W., Kinton, L., McLellan, A., Vora, N., Zuberi, S., Kelso, A., Hughes, I., Martland, J., Emsley, H., de Goede, C., Singh, R., Moor, C.-C., Aram, J., Mohanraj, R., Sakthivel, K., Nelapatla, S., Rittey, C., Pinto, A., Leach, J.P., Cock, H., Richardson, A., Houston, E., Cooper, C., Lawson, G., Massarano, A., Burness, C., Marson, A., Smith, Dave, Wiesmann, U., Dey, I., Sivakumar, P., Yeung, L.-K., Smith, P., Bentur, H., Heafield, T., Mathew, A., Smith, David, Jauhari, P., 2021. The SANAD II study of the effectiveness and cost-effectiveness of valproate versus levetiracetam for newly diagnosed generalised and unclassifiable epilepsy: an open-label, non-inferiority, multicentre, phase 4, randomised controlled trial. *The Lancet* 397, 1375–1386. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00246-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00246-4)
- Marson, A.G., Al-Kharusi, A.M., Alwaidh, M., Appleton, R., Baker, G.A., Chadwick, D.W., Cramp, C., Cockerell, O.C., Cooper, P.N., Doughty, J., Eaton, B., Gamble, C., Goulding, P.J., Howell, S.J.L., Hughes, A., Jackson, M., Jacoby, A., Kellett, M., Lawson, G.R., Leach, J.P., Nicolaides, P., Roberts, R., Shackley, P., Shen, J., Smith, D.F., Smith, P.E.M., Smith, C.T., Vanoli, A., Williamson, P.R., SANAD Study group, 2007. The SANAD study of effectiveness of valproate, lamotrigine, or topiramate for generalised and unclassifiable epilepsy: an unblinded randomised controlled trial. *Lancet* 369, 1016–1026. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60461-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60461-9)
- Matsumoto, M., Hikosaka, O., 2009. Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. *Nature* 459, 837–841. <https://doi.org/10.1038/nature08028>
- Matsumoto, M., Hikosaka, O., 2007. Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* 447, 1111–1115. <https://doi.org/10.1038/nature05860>
- McELROY, S.L., Keck, P.E., Pope, H.G., Hudson, J.I., 1992. Valproate in the Treatment of Bipolar Disorder: Literature Review and Clinical Guidelines. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 12, 42S–52S. <https://doi.org/10.1097/00004714-199202001-00007>
- Meador, K., Reynolds, M.W., Crean, S., Fahrbach, K., Probst, C., 2008. Pregnancy outcomes in women with epilepsy: a systematic review and meta-analysis of published pregnancy registries and cohorts. *Epilepsy Res* 81, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2008.04.022>
- Meador, K.J., Baker, G.A., Browning, N., Clayton-Smith, J., Combs-Cantrell, D.T., Cohen, M., Kalayjian, L.A., Kanner, A., Liporace, J.D., Pennell, P.B., Privitera, M., Loring, D.W., 2009. Cognitive Function at 3 Years of Age after Fetal Exposure to Antiepileptic Drugs. *New England Journal of Medicine* 360, 1597–1605. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0803531>
- Melis, M.R., Melis, T., Cocco, C., Succu, S., Sanna, F., Pillolla, G., Boi, A., Ferri, G.-L., Argiolas, A., 2007. Oxytocin injected into the ventral tegmental area induces penile erection and increases extracellular dopamine in the nucleus accumbens and paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats. *European Journal of Neuroscience* 26, 1026–1035. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05721.x>
- Meunier H., Carraz G., Meunier Y., Eymard P., Aimard M., 1963. Propriétés pharmacodynamiques de l'acide n-dipropylacétique. *ter Mémoire: Propriétés antiépileptiques. Thérapie* 18: 435–438
- Modabbernia, A., Velthorst, E., Reichenberg, A., 2017. Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Mol Autism* 8, 13. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0121-4>
- Montagrin, A., Saiote, C., Schiller, D., 2018. The social hippocampus. *Hippocampus* 28, 672–679. <https://doi.org/10.1002/hipo.22797>

- Mony, T.J., Lee, J.W., Dreyfus, C., DiCicco-Bloom, E., Lee, H.J., 2016. Valproic Acid Exposure during Early Postnatal Gliogenesis Leads to Autistic-like Behaviors in Rats. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 14, 338–344. <https://doi.org/10.9758/cpn.2016.14.4.338>
- Moore, S.J., 2000. A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. *Journal of Medical Genetics* 37, 489–497. <https://doi.org/10.1136/jmg.37.7.489>
- Moy, S.S., Nadler, J.J., Perez, A., Barbaro, R.P., Johns, J.M., Magnuson, T.R., Piven, J., Crawley, J.N., 2004. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav* 3, 287–302. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x>
- Mullis, K., Kay, K., Williams, D.L., 2013. Oxytocin action in the ventral tegmental area affects sucrose intake. *Brain Research* 1513, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.03.026>
- Mutlu-Albayrak, H., Bulut, C., Çaksen, H., 2017. Fetal Valproate Syndrome. *Pediatrics & Neonatology* 58, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2016.01.009>
- National Clinical Guideline Centre (UK), 2012. The Epilepsies: The Diagnosis and Management of the Epilepsies in Adults and Children in Primary and Secondary Care: Pharmacological Update of Clinical Guideline 20, National Institute for Health and Clinical Excellence: Guidance. Royal College of Physicians (UK), London.
- Nebel, M.B., Joel, S.E., Muschelli, J., Barber, A.D., Caffo, B.S., Pekar, J.J., Mostofsky, S.H., 2012. Disruption of functional organization within the primary motor cortex in children with autism. *Hum Brain Mapp* 35, 567–580. <https://doi.org/10.1002/hbm.22188>
- Newman, S.W., 1999. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann N Y Acad Sci* 877, 242–257. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09271.x>
- Nicolini, C., Fahnestock, M., 2018. The valproic acid-induced rodent model of autism. *Experimental Neurology* 299, 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.04.017>
- Numan, M., Numan, M., 1996. A lesion and neuroanatomical tract-tracing analysis of the role of the bed nucleus of the stria terminalis in retrieval behavior and other aspects of maternal responsiveness in rats. *Dev Psychobiol* 29, 23–51. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(199601\)29:1<23::AID-DEV2>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(199601)29:1<23::AID-DEV2>3.0.CO;2-O)
- O’Connell, L.A., Hofmann, H.A., 2011. The Vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: A comparative synthesis. *J. Comp. Neurol.* 519, 3599–3639. <https://doi.org/10.1002/cne.22735>
- O’Keefe, J., Nadel, L., 1978. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford: Clarendon Press.
- Omtzigt, J.G., Los, F.J., Grobbee, D.E., Pijpers, L., Jahoda, M.G., Brandenburg, H., Stewart, P.A., Gaillard, H.L., Sachs, E.S., Wladimiroff, J.W., 1992. The risk of spina bifida aperta after first-trimester exposure to valproate in a prenatal cohort. *Neurology* 42, 119–125.
- Ornoy, A., 2009. Valproic acid in pregnancy: How much are we endangering the embryo and fetus? *Reproductive Toxicology* 28, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.02.014>
- Pakkenberg, B., Møller, A., Gundersen, H.J., Mouritzen Dam, A., Pakkenberg, H., 1991. The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson’s disease estimated with an unbiased stereological method. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54, 30–33. <https://doi.org/10.1136/jnnp.54.1.30>
- Parker, K.J., Kinney, L.F., Phillips, K.M., Lee, T.M., 2001. Paternal behavior is associated with central neurohormone receptor binding patterns in meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). *Behav Neurosci* 115, 1341–1348. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.115.6.1341>
- Peirson, S.N., Brown, L.A., Potheary, C.A., Benson, L.A., Fisk, A.S., 2018. Light and the laboratory mouse. *Journal of Neuroscience Methods* 300, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.04.007>
- Perucca, E., 2002. Pharmacological and Therapeutic Properties of Valproate: A Summary After 35 Years of Clinical Experience. *CNS Drugs* 16, 695–714. <https://doi.org/10.2165/00023210-200216100-00004>
- Phillipson, O.T., 1979a. The cytoarchitecture of the interfascicular nucleus and ventral tegmental area of Tsai in the rat. *J Comp Neurol* 187, 85–98. <https://doi.org/10.1002/cne.901870106>

- Phillipson, O.T., 1979b. Afferent projections to the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus: A horseradish peroxidase study in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 187, 117–143. <https://doi.org/10.1002/cne.901870108>
- Pinder, R.M., Brogden, R.N., Speight, T.M., Avery, G.S., 1977. Sodium valproate: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in epilepsy. *Drugs* 13, 81–123. <https://doi.org/10.2165/00003495-197713020-00001>
- Powers, J.B., Newman, S.W., Bergondy, M.L., 1987. MPOA and BNST lesions in male Syrian hamsters: differential effects on copulatory and chemoinvestigatory behaviors. *Behav Brain Res* 23, 181–195. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(87\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0166-4328(87)90019-2)
- Premoli, M., Memo, M., Bonini, S.A., 2021. Ultrasonic vocalizations in mice: relevance for ethologic and neurodevelopmental disorders studies. *Neural Regen Res* 16, 1158–1167. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.300340>
- Quiroga, R.Q., Kraskov, A., Koch, C., Fried, I., 2009. Explicit Encoding of Multimodal Percepts by Single Neurons in the Human Brain. *Current Biology* 19, 1308–1313. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.060>
- Rasalam, A.D., Hailey, H., Williams, J.H.G., Moore, S.J., Turnpenny, P.D., Lloyd, D.J., Dean, J.C.S., 2005. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Dev Med Child Neurol* 47, 551–555. <https://doi.org/10.1017/s0012162205001076>
- Richter, S.H., Kästner, N., Loddenkemper, D.-H., Kaiser, S., Sachser, N., 2016. A Time to Wean? Impact of Weaning Age on Anxiety-Like Behaviour and Stability of Behavioural Traits in Full Adulthood. *PLoS ONE* 11, e0167652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167652>
- Robert, E., Guibaud, P., 1982. Maternal valproic acid and congenital neural tube defects. *Lancet* 2, 937. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(82\)90908-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(82)90908-4)
- Robert, E., Rosa, F., 1983. VALPROATE AND BIRTH DEFECTS. *The Lancet* 322, 1142. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)90656-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)90656-6)
- Rouillet, F.I., Wollaston, L., deCatanzaro, D., Foster, J.A., 2010. Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. *Neuroscience* 170, 514–522. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.06.069>
- Sagar, S., Sharp, F., Curran, T., 1988. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240, 1328–1331. <https://doi.org/10.1126/science.3131879>
- Sallows, G.O., Graupner, T.D., 2005. Intensive Behavioral Treatment for Children With Autism: Four-Year Outcome and Predictors. *Am J Mental Retard* 110, 417. [https://doi.org/10.1352/0895-8017\(2005\)110\[417:IBTFCW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1352/0895-8017(2005)110[417:IBTFCW]2.0.CO;2)
- SANDERS, H.I., WARRINGTON, E.K., 1971. MEMORY FOR REMOTE EVENTS IN AMNESIC PATIENTS. *Brain* 94, 661–668. <https://doi.org/10.1093/brain/94.4.661>
- Sarel, A., Finkelstein, A., Las, L., Ulanovsky, N., 2017. Vectorial representation of spatial goals in the hippocampus of bats. *Science* 355, 176–180. <https://doi.org/10.1126/science.aak9589>
- Schafer, M., Schiller, D., 2018. Navigating Social Space. *Neuron* 100, 476–489. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.006>
- Schiavi, S., Iezzi, D., Manduca, A., Leone, S., Melancia, F., Carbone, C., Petrella, M., Mannaioni, G., Masi, A., Trezza, V., 2019. Reward-Related Behavioral, Neurochemical and Electrophysiological Changes in a Rat Model of Autism Based on Prenatal Exposure to Valproic Acid. *Front. Cell. Neurosci.* 13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00479>
- Schneider, T., Przewłocki, R., 2005. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* 30, 80–89. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>
- Schneider, T., Roman, A., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Budziszewska, B., Schneider, K., Przewłocki, R., 2008. Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology* 33, 728–740. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.02.011>
- Schöttle, D., Briken, P., Tüscher, O., Turner, D., 2017. Sexuality in autism: hypersexual and paraphilic behavior in women and men with high-functioning autism spectrum disorder. *Dialogues Clin Neurosci* 19, 381–393.

- Schulz, G.M., Varga, M., Jeffries, K., Ludlow, C.L., Braun, A.R., 2005. Functional neuroanatomy of human vocalization: an H215O PET study. *Cereb Cortex* 15, 1835–1847. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhi061>
- Sciara, A.N., Beasley, B., Crawford, J.D., Anderson, E.P., Carrasco, T., Zheng, S., Ordway, G.A., Chandley, M.J., 2020. Neuroinflammatory Gene Expression Alterations in Anterior Cingulate Cortical White and Gray Matter of Males With Autism Spectrum Disorder. *Autism Res* 13, 870–884. <https://doi.org/10.1002/aur.2284>
- Shaikh, M.B., Brutus, M., Siegel, H.E., Siegel, A., 1986. Regulation of feline aggression by the bed nucleus of stria terminalis. *Brain Research Bulletin* 16, 179–182. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(86\)90031-6](https://doi.org/10.1016/0361-9230(86)90031-6)
- Shen, D.D., 1999. Absorption, distribution, and excretion, in: Löscher, W. (Ed.), *Valproate, Milestones in Drug Therapy*. Birkhäuser, Basel, pp. 77–90. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8759-5_4
- Shen D. D., 1999. Valproate, in Loscher W., ed., *Milestones in Drug Therapy*, Birkhauser Verlag, Switzerland.
- Shumake, J., Edwards, E., Gonzalez-Lima, F., 2003. Opposite metabolic changes in the habenula and ventral tegmental area of a genetic model of helpless behavior. *Brain Res* 963, 274–281. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)04048-9](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)04048-9)
- Siegel, A., Shaikh, M.B., 1997. The neural bases of aggression and rage in the cat. *Aggression and Violent Behavior* 2, 241–271. [https://doi.org/10.1016/S1359-1789\(96\)00010-9](https://doi.org/10.1016/S1359-1789(96)00010-9)
- Silverman, J.L., Yang, M., Lord, C., Crawley, J.N., 2010. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat Rev Neurosci* 11, 490–502. <https://doi.org/10.1038/nrn2851>
- Soille, P., Vincent, L.M., 1990. Determining watersheds in digital pictures via flooding simulations, in: Kunt, M. (Ed.), . Presented at the Lausanne - DL tentative, Lausanne, Switzerland, pp. 240–250. <https://doi.org/10.1117/12.24211>
- Stanisavljević, A., Perić, I., Gass, P., Inta, D., Lang, U.E., Borgwardt, S., Filipović, D., 2019. Brain Sub/Region-Specific Effects of Olanzapine on c-Fos Expression of Chronically Socially Isolated Rats. *Neuroscience* 396, 46–65. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.11.015>
- Staples, K.L., Reid, G., 2010. Fundamental movement skills and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 40, 209–217. <https://doi.org/10.1007/s10803-009-0854-9>
- Stiller, J., Dunbar, R.I.M., 2007. Perspective-taking and memory capacity predict social network size. *Social Networks* 29, 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.socnet.2006.04.001>
- Sullivan, A.W., Beach, E.C., Stetzk, L.A., Perry, A., D’Addezio, A.S., Cushing, B.S., Patisaul, H.B., 2014. A Novel Model for Neuroendocrine Toxicology: Neurobehavioral Effects of BPA Exposure in a Prosocial Species, the Prairie Vole (*Microtus ochrogaster*). *Endocrinology* 155, 3867–3881. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1379>
- Tavares, R.M., Mendelsohn, A., Grossman, Y., Williams, C.H., Shapiro, M., Trope, Y., Schiller, D., 2015. A Map for Social Navigation in the Human Brain. *Neuron* 87, 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.011>
- Taylor, J.L., Muscatello, R.A., Corbett, B.A., 2018. Differences in anticipatory versus reactive stress to social evaluative threat in adults versus adolescents with autism. *Autism Res* 11, 1276–1285. <https://doi.org/10.1002/aur.1998>
- Teki, S., Kumar, S., Kriegstein, K. von, Stewart, L., Lyness, C.R., Moore, B.C.J., Capleton, B., Griffiths, T.D., 2012. Navigating the Auditory Scene: An Expert Role for the Hippocampus. *J. Neurosci.* 32, 12251–12257. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0082-12.2012>
- Todorov, A., Gobbini, M.I., Evans, K.K., Haxby, J.V., 2007. Spontaneous retrieval of affective person knowledge in face perception. *Neuropsychologia, The Perception of Emotion and Social Cues in Faces* 45, 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2006.04.018>
- Todorov, A., Said, C.P., Engell, A.D., Oosterhof, N.N., 2008. Understanding evaluation of faces on social dimensions. *Trends in Cognitive Sciences* 12, 455–460. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2008.10.001>
- Trevizan-Baú, P., Dhingra, R.R., Burrows, E.L., Dutschmann, M., Stanić, D., 2019. Tauopathy in the periaqueductal gray, kölliker-fuse nucleus and nucleus retroambiguus is not predicted

- by ultrasonic vocalization in tau-P301L mice. *Behav Brain Res* 369, 111916. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111916>
- Trinkler, I., King, J.A., Doeller, C.F., Rugg, M.D., Burgess, N., 2009. Neural bases of autobiographical support for episodic recollection of faces. *Hippocampus* 19, 718–730. <https://doi.org/10.1002/hipo.20556>
- Vajda, F.J., O'Brien, T.J., Hitchcock, A., Graham, J., Cook, M., Lander, C., Eadie, M.J., 2004. Critical relationship between sodium valproate dose and human teratogenicity: results of the Australian register of anti-epileptic drugs in pregnancy. *Journal of Clinical Neuroscience* 11, 854–858. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2004.05.003>
- Valcourt, R.J., Sachs, B.D., 1979. Penile reflexes and copulatory behavior in male rats following lesions in the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res Bull* 4, 131–133. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(79\)90068-6](https://doi.org/10.1016/0361-9230(79)90068-6)
- van den Munckhof, P., Luk, K.C., Ste-Marie, L., Montgomery, J., Blanchet, P.J., Sadikot, A.F., Drouin, J., 2003. Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons. *Development* 130, 2535–2542. <https://doi.org/10.1242/dev.00464>
- Vincan, E., Leet, C.S., Reyes, N.I., Dilley, R.J., Thomas, R.J., Phillips, W.A., 2000. Sodium butyrate-induced differentiation of human LIM2537 colon cancer cells decreases GSK-3 β activity and increases levels of both membrane-bound and Apc/axin/GSK-3 β complex-associated pools of beta-catenin. *Oncol Res* 12, 193–201. <https://doi.org/10.3727/096504001108747684>
- Viswanath, H., Carter, A.Q., Baldwin, P.R., Molfese, D.L., Salas, R., 2014. The medial habenula: still neglected. *Front Hum Neurosci* 7. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00931>
- Vivanti, G., Hocking, D.R., Fanning, P.A.J., Uljarevic, M., Postorino, V., Mazzone, L., Dissanayake, C., 2018. Attention to novelty versus repetition: Contrasting habituation profiles in Autism and Williams syndrome. *Developmental Cognitive Neuroscience, Autism Spectrum Condition – understanding sensory and social features* 29, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2017.01.006>
- Wass, S., 2011. Distortions and disconnections: Disrupted brain connectivity in autism. *Brain and Cognition* 75, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2010.10.005>
- Weston, J., Bromley, R., Jackson, C.F., Adab, N., Clayton-Smith, J., Greenhalgh, J., Hounscome, J., McKay, A.J., Tudur Smith, C., Marson, A.G., 2016. Monotherapy treatment of epilepsy in pregnancy: congenital malformation outcomes in the child. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010224.pub2>
- Whitten, W.K., 1959. OCCURRENCE OF ANOESTRUS IN MICE CAGED IN GROUPS. *Journal of Endocrinology* 18, 102–107. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0180102>
- Wyszynski, D.F., Nambisan, M., Surve, T., Alsdorf, R.M., Smith, C.R., Holmes, L.B., for the Antiepileptic Drug Pregnancy Registry, 2005. Increased rate of major malformations in offspring exposed to valproate during pregnancy. *Neurology* 64, 961–965. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000154516.43630.C5>
- Yamaguchi, T., Danjo, T., Pastan, I., Hikida, T., Nakanishi, S., 2013. Distinct Roles of Segregated Transmission of the Septo-Habenular Pathway in Anxiety and Fear. *Neuron* 78, 537–544. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.035>
- Yamaguchi, T., Wang, H.-L., Li, X., Ng, T.H., Morales, M., 2011. Mesocorticolimbic glutamatergic pathway. *J Neurosci* 31, 8476–8490. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1598-11.2011>
- Yang, E.-J., Ahn, S., Lee, K., Mahmood, U., Kim, H.-S., 2016. Early Behavioral Abnormalities and Perinatal Alterations of PTEN/AKT Pathway in Valproic Acid Autism Model Mice. *PLOS ONE* 11, e0153298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153298>
- Yang, M., Perry, K., Weber, M.D., Katz, A.M., Crawley, J.N., 2011. Social peers rescue autism-relevant sociability deficits in adolescent mice. *Autism Res* 4, 17–27. <https://doi.org/10.1002/aur.163>

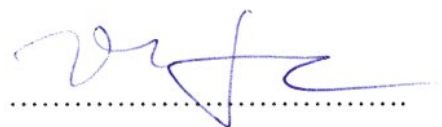
Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Zachar Gergelynek és belső konzulensemnek, Berekméri Eszternek a szakdolgozat elkészüléséhez nyújtott rengeteg segítséget, és amiért az utolsó pillanatig rendkívül nagy türelemmel és figyelemmel kísérték a dolgozat megírását. Köszönettel tartozom családomnak és Fletchernek a végtelen mennyiségű biztatásért, megértésért, dorombolásért, csokoládéért, amivel végig támogattak a munka igazán komplikált napjain is. Kiemelt szerepet töltöttek be a dolgozat elkészítésében barátaim és Kemecsei Robi, aki fáradtságot nem ismerve állt rendelkezésemre az R programkódok rengetegében, és akivel együtt eshettem kétségbe minden alkalommal, amikor a tényészanyák nem voltak hajlandóak vemhesedni. Végül, bár nem olvashatják, de leírhatatlan mértékű hálával tartozom az összes kísérletben részt vett egérnek, minden alkalommal döbbenetes belegondolnom, hogy nélkülük még annyit sem tudnánk az autizmusról, mint amennyit nem tudunk.

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott **Dr. Zachar Gergely** igazolom, hogy **Papp Szilvia Márta** biológus MSc-s hallgató „A szociális döntéshozatali hálózat vizsgálata valproáttal kezelt, autizmus-modell egerekben” című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2021.04.27.....



aláírás

Sz. Anatóliai Szóvet és
Fejlesztési Intézet

tanszék

Belső konzulensi nyilatkozat

Alulírott, **Berekméri Eszter** igazolom, hogy **Papp Szilvia Márta** biológus MSc-s hallgató „*A szociális döntéshozatali hálózat vizsgálata valproáttal kezelt, autizmus-modell egerekben*” című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2021. április 29.



.....
aláírás
Ökológiai tanszék