

Válasz Pintér Erika bírálatára

Köszönöm a nagyon elgondolkodtató bírálatot. Sajnos sokszor a kutatásaink során a részletekre fókuszálunk, ezért külön köszönöm, hogy a kérdések alkalmat adtak a munkám translációs értékének átgondolására, melyet orvosként különösen fontosnak érzek.

Bevezetés:

A szerző hogyan értékeli a jelenleg alkalmazott akut és krónikus stressz-modelleket? Milyen előnyeik és hátrányaik vannak az egyes modelleknek? Transzlációs szempontból melyeket tartja a legmegfelelőbbnek?

Igyekszem az állatkísérletek során is olyan stresszorok alkalmazására, melyeknek elképzelhető humán megfelelője és ez a trend látszik nemzetközi szinten is. A translációs érték növelésére eltolódott a hangsúly a stresszhez kapcsolható megbetegedések (szorongás, depresszió, szociális zavarok, gyomorfekély) vizsgálatára. Azok a stresszorok kerültek előtérbe, amelyek esetén nemcsak egy, például a hormonrendszerre jellemző mutató a mérési végpontunk (lásd a klasszikus ACTH és kortikoszteron mérés), hanem összetettebb következtetések, összefüggések feltárására is lehetőségünk nyílik. Így számos magatartási teszt során tudjuk monitorozni a hormonszint változásokat, a szimpatikus aktivitás fokozódását (pl. szívfrekvencia, vérnyomás telemetriás készülékkel történő követése) az állat magatartásának követésével párhuzamosan. Számos magatartási teszt embereken is kivitelezhető, ezáltal feltárhatók a párhuzamok és különbségek. Viszont csak az állatkísérletek során tudjuk szelektíven befolyásolni egyes agyterületek aktivitását akár molekulaszpecifikus módon is, amiből próbálhatunk az emberi működések mögött húzódó finomabb agyi működésekre is következtetni.

Sokszor már annak eldöntése sem egyszerű, mit tekinthetünk akutnak és mi a krónikus, illetve egyre nyilvánvalóbb, hogy egy egyszeri enyhének tekinthető stimulus is hosszantartó hatásokat gyakorol (lásd prekondicionálás). Ebből a gondolatból kiindulva, mind az állat szenvedésének csökkentése, mind a gazdaságosság miatt még a krónikus folyamatok vizsgálatához is az egyszeri/egyszerű stresszorokat ajánlom.

Akut stresszorként előszeretettel alkalmazok magatartás-teszteket, melyek pszichés stresszornak tekinthetők (emelt keresztpalló, kényszerített úszás, elektromos lábsokk stb.). Külön kategóriát képeznek a szociális stresszorok (szociális elkerülés, szociális kudarc). Ilyenkor a modellek hasonlósági (az állat az emberhez hasonlóan viselkedik), prediktív (emberre alkalmazható adatok) és konstrukciós (mechanizmusok hasonlósága) validitására kell ügyelnünk (Belzung C, Lemoine M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. Biol Mood Anxiety Disord. 2011 Nov 7;1(1):9. doi: 10.1186/2045-5380-1-9.). Egyes esetekben azonban fizikai stresszorok hatására vagyunk kíváncsiak például gyomorfekéllyel kapcsolatban (ulcerogén hideg stressz), vagy valamilyen régebbi eredménnyel akarjuk összevetni munkánkat, amikor az éter belégzés stresszorként való alkalmazása, vagy a mozgáskorlátozás voltak rendkívül elterjedtek. Emberi párhuzam miatt a hipoglikémia és az immunstimulusok (a baktérium falból származó lipopoliszacharid, LPS; vagy az anafilaktogén tojásfehérje), valamint a só-víz háztartás megváltozása (hipertóniás só, véreztetés) is értékes stresszoroknak tekinthetők. Én későbbi munkáim során azért a hipoglikémiára és immun stresszorokra fókuszáltam, mert korábbi vizsgálataink alapján ezeknél az AVP szerepe az ACTH-szint szabályozásában különösen

erősnek tűnt. Elképzelhető, hogy egy speciális anyag hatására vagyunk kíváncsiak, ekkor természetesen ezt adjuk (NMDA, WIN 55,212-2, morfin) (lásd mindezek stresszorokat a dolgozat 6. táblázatában).

Követhetjük ezen stresszorok késői hatását (például poszttraumás stressz zavarban (PTSD) a lábsokk, vagy szociális vereség után), vagy alkalmazhatjuk őket a korai fejlődés során (in utero, posztnatális, juvenilis) kombinálva felnőttkori stimulusokkal (lásd Engel féle biopszichoszociális modell, vagy ennek Ron de Kloet féle kiterjesztése, a three-hit theory; ahol a korai életesemények mintegy a genetikai háttérre épülve epigenetikai változások révén határozzák meg a személyiséget, ezáltal a felnőttkori stresszreaktivitást is; Selye: Its not stress that kills us, it is our reaction to it.)

A dolgozatomban bemutatott krónikus stresszorok közül a két hét mozgáskorlátozás annyiban helytálló, hogy ez egy klasszikus stresszmodell és egyszerű volt különféle időtartamú stresszorok összehasonlítása (4-7-10-14 nap, lásd: Zelena D. Földes A, Mergl Zs, Barna I, Kovács KJ, Makara GB: Effects of repeated restraint stress on hypothalamo-pituitary-adrenocortical function in vasopressin deficient Brattleboro rat. Brain Research Bulletin 2004; 63 (6) 521-530). Igazán krónikus jelenségek vizsgálatára azonban hosszabb távú stimulusok lehetnek szükségesek. Így 4 hét napi 1 óra mozgáskorlátozás során az AVP a HHM tengely szabályozásában már fontosabb szerephez jutott (lásd: Zelena D., Domokos A., Mergl Zs., The Role of Vasopressin in Chronic Stress-induced Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Hyperactivity: Studies on Brattleboro Rats with repeated restraint. Nova Publishers, In Neuropeptide research trends. 2007; Chapter VII. pp. 189-212). Ma már inkább a krónikus megjósolhatatlan stresszt alkalmaznám (Varga J, Domokos A, Barna I, Jankord R, Bagdy G, Zelena D. Lack of vasopressin does not prevent the behavioural and endocrine changes induced by chronic unpredictable stress. Brain Res Bull 2011; 84:45-52.), bár itt a Paul Willner által bevezetett cukor preferencia, mint anhedónia mutatója szinte soha nem reprodukálható, de számos fiziológiai és magatartási paraméter változása feltárható. (lásd most megjelent összefoglalókat: Paul Willner The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. Neurobiol Stress. 2017 Feb; 6: 78–93. Published online 2016 Aug 24. doi: 10.1016/j.ynstr.2016.08.002; Paul Willner Reliability of the chronic mild stress model of depression: A user survey. Neurobiol Stress. 2017 Feb; 6: 68–77. Published online 2016 Aug 22. doi: 10.1016/j.ynstr.2016.08.001).

A másik két, dolgozatomban alkalmazott krónikus stresszmodellre későbbi kérdések kapcsán térek ki.

Említi, hogy nőstényeknél akut stresszhelyzetben gyakran megfigyelhető a „tend and be friend” viselkedés minta. Ismer-e olyan irodalmi adatot, ahol ezt humán vizsgálatokban is bizonyították.

A teória első leírása Dr. Shelley E. Taylor és munkatársaitól (UCLA) származik és a Psychological Review-ben közzétették 2000-ben. Bár következtetéseiket elsősorban patkány neuroendokrinológiai kísérletek (nőstényekben az oxitocin szerepe) alapján vonták le, de humán vizsgálatokat is tanulmányoztak. Azt tapasztalták, hogy a stressz a férfias agresszióval (fight or flight reakció) szemben a nőkben a női társaság keresését, mintegy támogató közösség kiépítését váltja ki.

Későbbi humán vizsgálatok:

-Kivlighan KT, Granger DA, Booth A. Gender differences in testosterone and cortisol response to competition. Psychoneuroendocrinology. 2005 Jan;30(1):58-71.

A női evezős csapat tagjainak hormonszintjei a szociális kötődésükkel, és nem a versengéssel, vagy dominanciával függtek össze ellentétben a férfiakkal.

-David DH, Lyons-Ruth K. DIFFERENTIAL ATTACHMENT RESPONSES OF MALE AND FEMALE INFANTS TO FRIGHTENING MATERNAL BEHAVIOR: TEND OR BEFRIEND VERSUS FIGHT OR FLIGHT? Infant Ment Health J. 2005;21(1):1-18.

Az ijesztő anyai magatartás növekedésével a női utódok jobban ragaszkodtak anyjukhoz, mint a fiúk.

-Zwolinski J. Biopsychosocial responses to social rejection in targets of relational aggression. Biol Psychol. 2008 Oct;79(2):260-7. doi: 10.1016/j.biopsycho.2008.06.006. Epub 2008 Jul 4.

Szociális kapcsolatokkal rendelkező nők alacsonyabb kortizol-szint emelkedéssel és kevesebb szorongással reagáltak kihívásra.

-von Dawans B, Fischbacher U, Kirschbaum C, Fehr E, Heinrichs M. The social dimension of stress reactivity: acute stress increases prosocial behavior in humans. Psychol Sci. 2012 Jun;23(6):651-60. doi: 10.1177/0956797611431576. Epub 2012 May 16.

Férfiakon igazolták, hogy stressz hatására nő a szociális kötődés.

Cáfoló közlemények:

-Tifferet S, Manor O, Constantini S, Friedman O, Elizur Y. Sex differences in parental reaction to pediatric illness. J Child Health Care. 2011 Jun;15(2):118-25. doi: 10.1177/1367493510397710.

Ez a vizsgálat nem támasztotta alá, hogy a nők stresszre szociális kötődéssel és barátkozással reagálnának, hanem inkább arra utalt, hogy ez a barátkozás egy állandóan meglévő anyai tulajdonság.

-Smith TW, Uchino BN, MacKenzie J, Hicks AM, Campo RA, Reblin M, Grewen KM, Amico JA, Light KC. Effects of couple interactions and relationship quality on plasma oxytocin and cardiovascular reactivity: empirical findings and methodological considerations. Int J Psychophysiol. 2013 Jun;88(3):271-81. doi: 10.1016/j.ijpsycho.2012.04.006. Epub 2012 Apr 26.

Bevezettek egy további modellt. A „calm and connect” fő „végrehajtója” az oxitocin. Ebben az értelemben egy támogató, meleg környezet oxitocin-szint emelés révén „lenyugtat”, ami további kötődések kialakulását segíti. Ezzel ellentétben a „tend and befriend” elmélet szerint a pozitív szociális kapcsolatok megszakadása indukálja a kötődés igényét. Bár a két elmélet hasonlóképp is értelmezhető, csak az elsónél egy pozitív, míg a másodiknál egy negatív esemény a folyamat (az oxitocin szekréció) megindítója. Mindenesetre csak csekély kísérletes alátámasztást találtak ezen elméleteknek 180 fiatal pár vizsgálata során.

- Tops M. Oxytocin and the familiarization-habituation response. Psychoneuroendocrinology. 2014 Jul;45:211. doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.03.014. Epub 2014 Apr 2.

Újabb elnevezést javasoltak: „Familiarization-habituation-response”.

Módszerek

36. oldal

Mivel a mű tudományos értékéhez nagyban hozzájárul a Brattleboro patkányok speciális tenyésztése, kérem, ismertesse a hallgatóság számára az alkalmazott tenyésztési eljárás eredményeit!

Munkám kezdetén a di/+ -os nőtények egyedileg voltak tartva egy ketrecben és egy di/di hímhez 4 ilyen ketrec tartozott, 2 hetes váltásban került a hím a következő nőtényhez. Pár di/di –di/di tenyészpárt is fenntartottunk a genotípus arány javítására. Később kiderült, hogy az anya genotípusa befolyásolhatja a stresszkísérleteink eredményét (Zelena D. Mergl Zs. Makara GB: Maternal genotype influences stress reactivity of Brattleboro rats genetically lacking vasopressin. J. Neuroend. 2003; 15: 1105-1110; Zelena D, Mergl Zs, Makara GB Maternal genotype can influence the outcome of a study on mutant animals. Ann Rev NY Acad Sci 2004; 1018: 477-9), ekkortól a di/di-di/di párokat nem alkalmaztuk tovább, csak abban az esetben, ha épp az anya genotípusának hatását akartuk megvizsgálni.

105 di/+ nőtényből $38,79 \pm 5,52$, míg 96 di/di nőtényből $35,85 \pm 9,48$ lett terhes 3 napos bepárási idő alatt. Viszont a di/+ állatoknak 56 ellés során átlag $9,34 \pm 0,29$, míg a di/di anyák 44 ellése során átlag $6,92 \pm 0,35$ ($p < 0,01$) utódjuk született. (Zelena D, Mergl Z, Makara GB. Postnatal development in vasopressin deficient Brattleboro rats with special attention to the hypothalamo-pituitary-adrenal axis function: the role of maternal genotype. Int J Dev Neurosci. 2009; 27(2):175-83.)

2007 elején kezdtük el a +/+ vonal kitenyésztését. Miután két heterozigóta állatot összepárosztatunk és az utódok vízfogyasztás mérése alapján kiszűrtük a di/di genotípust, a maradék vegyesen +/+ és di/+ genotípusú hímekeket és nőtényeket egyenként di/di párral párosztattuk be. Mértük az utódok vízfogyasztását, illetve sokat korai posztnatális korban elhasználtunk stresszvizsgálatokra és a hipofízisük AVP tartalma alapján állapítottuk meg a genotípust. Amelyik szülőnek nem születtek di/di utódjai (elég nagy alomszám esetén), azt +/+ genotípusúnak tekintettük és külön vonalként tartottuk fenn a későbbiekben a +/+ tenyészetet. A genetikai sodródás elkerülésére az új heterozigóta tenyész nőtények beállításakor a +/+ anyákat párosztattuk di/di hímekekkel. Végül így a két vonal elsőfokú rokoni viszonyban maradt egymással.

anya/apa	+/+	di/+	di/di
+/+	+/+	+/+ di/+	di/+
di/+	+/+ di/+	+/+ di/+ di/di	di/+ di/di
di/di	di/+	di/+ di/di	di/di

3. táblázat A patkányok párosztatása. Az első oszlopban az anyák, az első sorban az apák, a táblázat belsejében pedig az utódok lehetséges genotípusa látható. Rózsaszín az általánosan alkalmazott párosztatás, bekeretezve az anyai vizsgálat párosztatása.

52. oldal

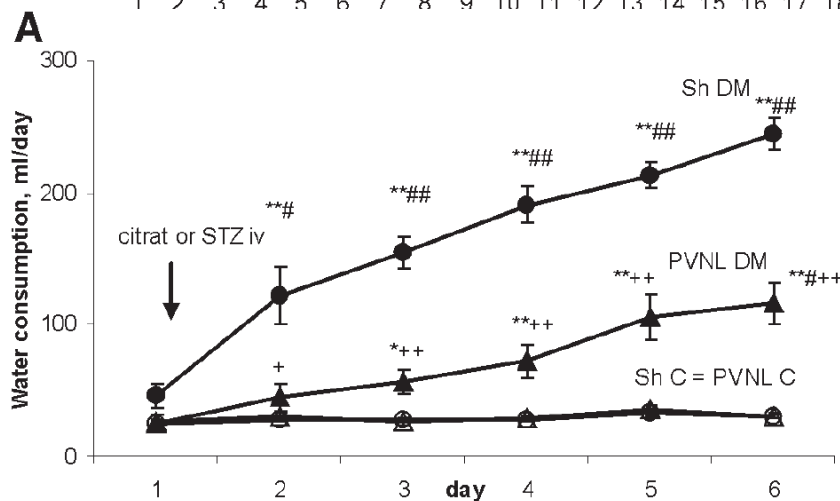
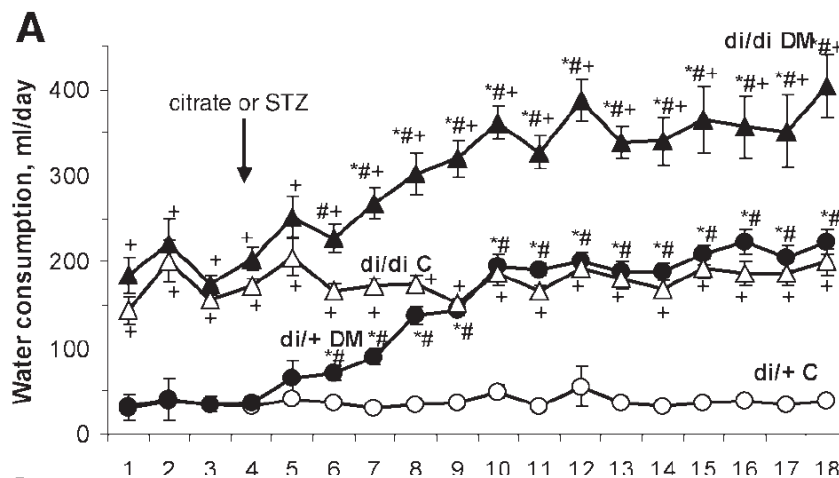
Mi a véleménye az STZ diabetes stressz-modellről? Mivel a beavatkozás nagyon súlyos metabolikus zavarokat okoz, polidipsziát, poliúriát, cukorvizelést. A szervezet csak ilyen módon képes megszabadulni az inzulin hiányból adódó felhasználatlan cukortól. A stressz reakciók és ezen belül az AVP hatása nehezen vizsgálható ilyen körülmények között. Miért ezt a modellt választották? Miért csak a 15. napon határozták meg a vércukor szintjét?

Humán betegségmodellként mindenképp hasznosnak tartom preklinikai vizsgálatok szempontjából. Kis munkaigénye (egyszeri injekció) és nagy transzlációs értéke, jó reprodukálhatósága kedvező modellé teszi. Persze némileg csőlátásra utal csak stresszorként tekinteni erre a komplex metabolikus kihívásra, ezért különösen fontos, hogy ha a stressz vonatkozásait vizsgáljuk, ne ez legyen az egyetlen modellünk. Munkánk alapját Chan és munkatársai 2001-es cikke képezte (Chan O, Chan S, Inouye K, Vranic M, Matthews SG.

Molecular regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in streptozotocin-induced diabetes: effects of insulin treatment. *Endocrinol.* 2001;142(11):4872–4879.), akik STZ-diabetes HHM tengelyt aktiváló hatásának centrális voltát hangsúlyozták és ezért merült fel bennünk az AVP lehetséges szerepe. Érdekes módon a PVN kiirtása (Zelena D, Filaretova L, Mergl Z, Barna I, Toth ZE, Makara GB. Nucleus paraventricularis hypothalami but not vasopressin participates in chronic hyperactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006; 290: E243-E250) ugyan kivédte az ACTH szintézisét jelző proopiomelanokortin (POMC) mRNS szint növekedést a hipofízis első lebenyében, de valamilyen perifériás, direktben a mellékvese kéregre ható faktor is közrejátszott a stressz-tengely aktiválódásban, hiszen ennek ellenére a kortikoszteron szintek magasak maradtak.

A vércukor-szint méréshez vért kell venni, ami maga is stresszor, így erre csak a kísérlet végén kerítettünk sort más paraméterek egyidejű monitorozásával. Ez egyébként csak plusz megerősítésül szolgált, hiszen az állatok vízfogyasztását naponta követtük és ezen jól látható a diabetes mellitus-szal járó fokozott vízfogyasztás kialakulása (lásd dolgozat 24. ábra).

Érdekesség, hogy az AVP-hiány vízfelvételt fokozó hatása összeadódik a DM hatásával. Illetve a PVN lézió csökkenti a DM-által okozott vízfogyasztás növekedést (aminek fő okaként a vesében megnövekedett ozmótikusan aktív anyagmennyiséget szokták megjelölni; bár vizsgálatunkban az STZ hatására 2 hét múlva létrejövő vércukorszint emelkedés mind az AVP-hiányos, mind a PVN irtott állatoknál a kontrolljaikkal megegyező értéket mutatott!), ami megerősíti, hogy a DM centrális komponensek révén az egyed egészére jelentős befolyással van.



61. oldal

Nem világos a 27. ábrából, hogy nem a krónikus morfin-adás hatásait mutatja be, hanem az elvonás miatt kialakult POMC mRNS és kortikoszteronnak növekedéseket. Mi a véleménye erről a modellről? Mennyire tartja hasznosnak a stressz-kutatásban?

Az ismételt mozgáskorlátozás, mint meglehetősen „steril” stresszmodell és a cukorbetegség, mint nagyon komplex metabolikus zavar mellé kerestünk egy harmadik, humán relevanciával bíró stresszort. Csoportunk Bristol-i kapcsolatai révén az ott bevezetett arthritisz modellen a PVN irtás szerepét sikerült megvizsgálnunk (Makara GB, Harbuz MS, Coventry TL, Jessop DS, Zelena D, Lightman SL: The effect of hypothalamic lesions on hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity and inflammation in adjuvant-induced arthritis. *Stress*. 2001; 4: 25-37). Márcsak ezért is logikus lett volna ezt a stresszort alkalmazni a vazopresszin-hiányos állatokon is. Meg is próbáltuk, de a *Mycobacterium butyricum* intrakután faroktőbe injektálása nem váltott ki arthritiszt a Brattleboro patkányokon (de még a Wistarokon sem). Ekkor derült ki, hogy ez a modell csak a Bristol-ban elérhető PVG (Piebald-Viral-Glaxo) patkányokon működik. Így esett a választásunk a krónikus morfin kezelésekre, mivel ekkor jelent meg erről egy cikk (Houshyar H, Cooper ZD, Woods JH. Paradoxical effects of chronic morphine treatment on the temperature and pituitary-adrenal responses to acute restraint stress: a chronic stress paradigm. *J Neuroendocrinol*. 2001 Oct;13(10):862-74.), melyet megpróbáltunk reprodukálni. Ezúton szeretnék mentoromnak, dr Makara Gábornak köszönetet mondani, mivel ez a stresszor az állatok reggel és este 7 órakor történő injekcióját igényelte, amit akkor kisgyerekes anyukaként csak hétvégente tudtam vállalni. Ezért szinte egyedül ő kezelte 2 héten keresztül reggel és este is az állatokat.

Valóban, az eredményeknél nem hangsúlyoztam, hogy a mintavétel az utolsó morfin injekciót követő 12 (kortikoszteron) illetve 16 és 4 (POMC mRNS) órával történt, ahogy a módszerek fejezetben leírásra került (4.7.1.1.3.). Az elvonás alatt az állatkísérletek során általában antagonisták (például naloxon) beadását értik (például: Navarro-Zaragoza J, Núñez C, Laorden ML, Milanés MV. Effects of corticotropin-releasing factor receptor-1 antagonists on the brain stress system responses to morphine withdrawal. *Mol Pharmacol*. 2010 May;77(5):864-73. doi: 10.1124/mol.109.062463. Epub 2010 Feb 16.; Martínez-Laorden E, Hurle MA, Milanés MV, Laorden ML, Almela P. Morphine withdrawal activates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and heat shock protein 27 in the left ventricle: the role of extracellular signal-regulated kinase. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012 Sep;342(3):665-75. doi: 10.1124/jpet.112.193581. Epub 2012 May 30.; Almela P, Navarro-Zaragoza J, García-Carmona JA, Mora L, Hidalgo J, Milanés MV, Laorden ML. Role of corticotropin-releasing factor (CRF) receptor-1 on the catecholaminergic response to morphine withdrawal in the nucleus accumbens (NAc). *PLoS One*. 2012;7(10):e47089. doi: 10.1371/journal.pone.0047089. Epub 2012 Oct 10.), kísérletünkben viszont spontán elvonásról volt szó. Úgy gondoljuk, hogy magát a krónikus stresszt is a folyamatosan ingadozó morfin-szintek elvonási hatásai okozzák és mivel a többi krónikus stresszor esetén sem az akut fázisban, hanem pl. 24h-val az utolsó mozgáskorlátozás után került sor a mintavételezésre, ezért ez az időpont kedvezett az összehasonlíthatóságnak. Valamint ebben a vonatkozásban is próbáltuk az irodalmat követni, mivel 4h-nál csökkent glükokortikoid receptor mennyiséget, míg 16h-nál normalizálódott értékeket írtak le (Houshyar H, Galigniana MD, Pratt WB, Woods JH. Differential responsivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to glucocorticoid negative-feedback and corticotropin releasing hormone in rats undergoing

morphine withdrawal: possible mechanisms involved in facilitated and attenuated stress responses. J Neuroendocrinol. 2001 Oct;13(10):875-86.).

98. oldal

3. bekezdés, 2. mondat helytelen, zavaros. Az idézett közleményben (Gyires és Barna: Differences in gastroprotective processes in 6- to 8- and 14- to 16-week-old rats. (Dig. Dis. Sci. 2002. természetesen nem szerepel, hogy a kapszaicin endogén védőfaktor lenne a fekélyben. A kapszaicin nem termelődik állati szervezetben. Viszont a paprika csípős anyaga a capsaicin a gyomornyálkahártya érzőideg végződéseire hatva, a TRPV1 receptorok aktivációja útján CGRP-t szabadít fel, mely már valóban endogén védőfaktor a fekély ellen, hisz fokozza a gyomornyálkahártya mikrocirkulációját.

Nagyon köszönöm a pontosítást. Bevallom, ezt a részt egy az egyben a gyomorfekélyhez jobban értő Ludmilla Filaretovával írt cikkünkéből fordítottam átgondolás nélkül (In Wistar rats it was found that ethanol-induced gastric mucosal damage was more severe in 14–16 than in 6–8-week old animals and mucosal protective action of several factors (opioids, capsaicin, prostaglandin) was also diminished (Zelena D, Filaretova L. Age-dependent role of vasopressin in susceptibility of gastric mucosa to indomethacin-induced injury Regul Pept. 2010, 161(1-3):15-21.)). Szolcsányi János professzor úr és munkacsoportja kapszaicinnal kapcsolatos munkái mindkettőnket lenyűgöztek és az érző neuronok effektor szerepét valahogy próbáltuk belecsempészni ebbe a cikkbe is, sajnos helytelenre sikerült megfogalmazással. A kapszaicin helyett érző neuronokat kellett volna írnom.

Miért az indomethacin fekélyt választották?

Az általános vélekedéssel szemben, hogy a *Helicobacter pylori* felfedezését követően a gyomorfekély nem jelent problémát, még ma is jelentős a halálozáshoz vezető stressz-fekélyek száma az intenzív osztály páciensei körében (Zelena D, Filaretova LP, Stress adaptation with special emphasis on gastric erosion: is stress a bad guy or a good guy? Nova Publisher 2017). Éppen azért mi is elsőként hideg immobilizációs stresszt alkalmaztunk (lásd 5.2.1. 6. táblázat). Részben ebben az esetben is egy modell nem modell, valamint a nagyobb transzlációs értéke (és egyszerűbb alkalmazhatósága) miatt döntöttünk a nem szteroid gyulladásgátlók (NSAID) alkalmazása mellett. Ezek közül az indometacinnal szerzett előzőleg orosz partnerünk a legtöbb tapasztalatot, így ezt választottuk (bár kétségtelenül manapság nem ez a legelterjedtebb NSAID; hanem talán még mindig az aszpirin).

Az eredmények nehezen magyarázhatók, nem egyértelműek. (Az AVP hiány fiatal állatokban csökkentette az erózió mértékét, idős patkányokban fokozta) mi köze van ennek a jelenségnek a stresszhez? Mérték ACTH ill. kortikoszteron szinteket a modellben?

Vizsgálataink kiindulópontját éppen a nem egyértelmű irodalmi háttér szolgáltatta (lásd 2.4.2.5.1.). Az ellentmondó eredmények egyik lehetséges magyarázata az eltérő korú állatok alkalmazása lehet. Az AVP sokrétű szerepénél fogva számos ponton csatlakozhat a gyomorfekély kialakulásába támogatva sok védő és sok károsító folyamatot egyaránt. Az egyed kora befolyásolhatja, hogy az AVP károsító vagy védő hatása kerül túlsúlyba. Például a fiatalok mikrocirkulációja jó, ekkor az AVP képes lehet vazokonstriktorként viselkedni. Idősekben a mikrocirkuláció eleve rosszabb lehet és az AVP hatása az ereken kevésbé érvényesül. Ellenben az AVP-hiány hosszantartó következményei, például a stresszhormon-szintek vonatkozásában előtérbe kerülhetnek.

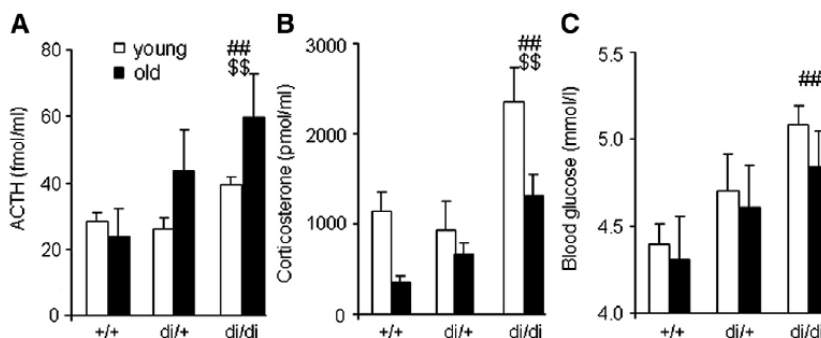
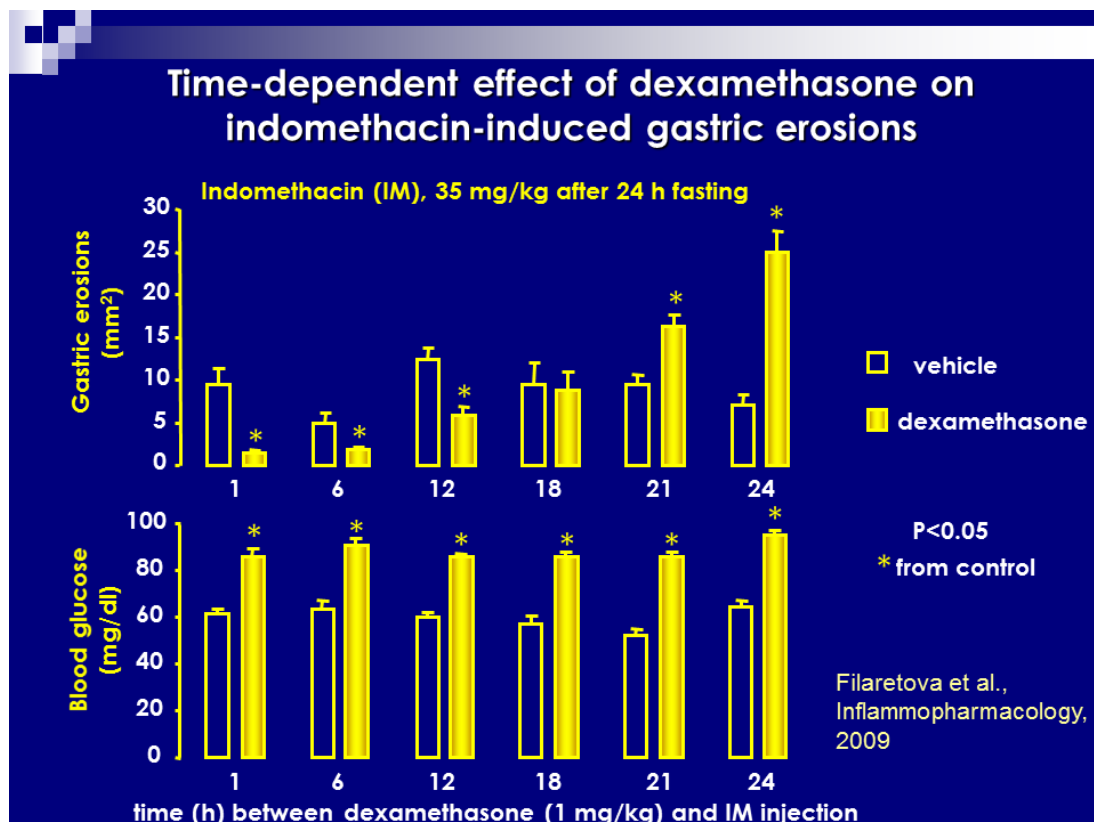


Fig. 2. HPA axis hormone as well as blood glucose levels measured 4 h after indomethacin injection (35 mg/kg sc) in fasted rats. A. ACTH (fmol/ml) plasma levels in trunk blood. With two way ANOVA the effect of genotype was significant ($p < 0.05$). B. Corticosterone (pmol/ml) plasma levels. With two way ANOVA the effect of age and genotype was significant ($p < 0.01$). C. Blood glucose levels (mmol/l). With two way ANOVA the effect of genotype was significant ($p < 0.05$). $n = 10$ –13. Newman-Keuls post hoc analysis on genotype: ## $p < 0.01$ vs. +/+ animals; \$\$\$ $p < 0.01$ vs. di/+ animals.

Az indometacin kémiai stresszornak tekinthető, a gyomorfekély, mint a szervezet egészét megterhelő kihívás pedig maga is- létrejöttének okától függetlenül- aktiválja a stressz adaptációs mechanizmusait. Történt ACTH és kortikoszteron mérés is, és azt tapasztaltuk, hogy a 24 óra éhezés és 4h 35mg/kg szubkután indometacin injekciót követően a di/di állatok hormonszintjei magasabbak voltak, mint akár a di/+ testvéreiké, akár a +/+ kontrolloké. Más vizsgálataink arra utaltak, hogy a di/di állatokban a stresszreakció lecsengése elmarad (Zelena, D., Langnaese, K., Domokos, A., Pintér, O., Landgraf, R., Makara, G.B. Engelmann, M. Vasopressin administration into the PVN normalizes plasma oxytocin and corticosterone levels in Brattleboro rats *Endocrinology* 2009; 150(6):2791-8.), valamint a megnövekedett mellékvese súlyok is azt jelzik, hogy bennük élethosszig magasabb kortikoszteron szintek fordulhatnak elő. Ludmila Filaretova korábbi munkái arra utaltak, hogy a glükokortikoidok



tartós emelkedése káros, míg a rövid ideig tartó emelkedés véd a gyomorfekély kialakulásával szemben (lásd a szintetikus glükokortikoid dexametazonnal végzett munkái alább).

Valóban, az idős AVP-hiányos állatok az elhúzódóan magas glükokortikoid-szint természetes modelljei lehetnek, szemben a fiatal állatokban megfigyelhető rövidebb ideig fennálló (ezáltal gasztroprotektív) glükokortikoid emelkedéssel.

Hogyan befolyásolta ezekben a patkányokban a krónikus stressz a fekélyek kialakulását? Végeztek ilyen vizsgálatot?

Nem végeztük krónikus stressz-indukálta gyomorfekély vizsgálatokat az AVP-hiányos állatainkban, de Wistar patkányok alkalmazásával 14 nap ismételt mozgáskorlátozás hatását elemeztük az indometacin okozta gyomorfekélyre (Filaretova L, Morozova O, Laszlo F, Morschl E, Zelena D. Does chronic stress enhance the risk of diseases? *Endocr Regul.* 2013; 47(4):177-88.). A stresszulus elképzelés értelmében azt vártuk, hogy a gyomorfekély képződés fokozódni fog, de nem találtunk változást a nem stresszelt állatokhoz képest. A krónikus stresszt felfoghatnánk egyfajta prekondicionálásnak is, ami az alkalmazkodás miatt védő hatású lehetne, de ilyen hatást sem tapasztaltunk. Ludmila Filaretova munkacsoportja később megismételte ezeket a vizsgálatokat Szent Péterváron is és azt tapasztalták, hogy ha a krónikus ismételt mozgáskorlátozást ugyanúgy zajlott, mint Budapesten, akkor ugyancsak nem volt hatás. Ha ellenben kicsit erőteljesebb mozgáskorlátozást alkalmaztak a cső méretének változtatásával, akkor megjelent a gasztroprotektív.

Sikerült-e kimutatni az AVP szerepét az emberi-anyai viselkedés-mintákban?

Irodalmi adatok a V1a receptor genetikai variánsainak anyai viselkedéssel való összefüggéséről számolnak be, mely megváltoztathatja az AVP hatást.

- Leerkes EM, Su J, Calkins S, Henrich VC, Smolen A. Variation in mothers' arginine vasopressin receptor 1a and dopamine receptor D4 genes predicts maternal sensitivity via social cognition. *Genes Brain Behav.* 2017 Feb;16(2):233-240. doi: 10.1111/gbb.12326. Epub 2016 Oct 7.

A hosszabb V1aR alléllal rendelkező anyák pozitívabb anyai gondolatokat mutattak (pockokban a hosszabb V1aR szatellita régió fokozott expresszióval járt (Hammock EA, Young LJ. Oxytocin, vasopressin and pair bonding: implications for autism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006 Dec 29;361(1476):2187-98. Review.), azaz feltehetően az emberben is a hosszabb allélúakban erősebb az AVP hatás, ami jobb anyát eredményez- mely összhangban áll saját eredményeinkkel (kevesebb AVP=rosszabb anya)).

- Bisceglia R, Jenkins JM, Wigg KG, O'Connor TG, Moran G, Barr CL Arginine vasopressin 1a receptor gene and maternal behavior: evidence of association and moderation. *Genes Brain Behav.* 2012 Apr;11(3):262-8. doi: 10.1111/j.1601-183X.2012.00769.x. Epub 2012 Mar 1.

A V1aR hosszú RS3 allélját hordozó anya érzékenyebb volt.

- Avinun R, Ebstein RP, Knafo A. Human maternal behaviour is associated with arginine vasopressin receptor 1A gene. *Biol Lett.* 2012 Oct 23;8(5):894-6. doi: 10.1098/rsbl.2012.0492. Epub 2012 Jul 4.

V1aR RS3 allél variáns hordozó „rosszabb” anya.

Vannak-e AVP KO egerek, ha igen, mennyire korrelálnak a velük nyert adatok a Brattleboro patkányokkal?

Egy 2003-ban Smolenicében tartott szimpozionon Majzoub professzor Amerikából (Division of Endocrinology, Boston Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.) tartott egy előadást az AVP-KO egerekről, amely adatok azóta se kerültek közlésre. Mindenesetre tavalyi levélváltásunk során megerősítette, hogy jól emlékszem, és ezen állatok AVP adás nélkül nem életképesek. Ezzel egybehangzóan az „összes” KO egér előállítására és fenotípezálására létrehozott konzorcium honlapján is az az információ olvasható, hogy az AVP-KO egér nem életképes (<https://www.mousephenotype.org/data/phenotypes/MP:0011100>). (részleteket lásd: Zelena D. Comparison of natural and artificial vasopressin deficiency: why the latter is lethal? Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):228-233. DOI 10.18699/VJ16.142).

Az AVP stresszben betöltött szerepéről Brattleboro patkányok felhasználásával nyert adataink egybevágnak farmakológiai kezelések és AVP antiszérum adásával.

Mennyiben lehet ezeket a patkányokból nyert adatokat humán viszonyokra transzlálni?

Hogyan tudná összefoglalni tudományos munkásságának gyakorlati hasznát? Kísérleti adatai hogyan hasznosíthatók a gyakorlati orvostudományban? Mely eredményei használhatók fel esetleges gyógyszerfejlesztési projekteken?

Természetesen a patkány nem kis ember, így a belőle nyerhető adatok csupán ötleteket adhatnak gyógyszerfejlesztésekhez, és további - humán – vizsgálatokat generálhatnak. A dolgozatban bemutatott eredmények elsősorban a stresszadaptáció agyi folyamatainak feltárására szolgáltak. A magatartás vizsgálataink további adalékot adtak az AVP antagonisták depressziós kórképekben való hasznosíthatóságához, rávilágítva, hogy az AVP antidepressziós hatásában nem igazán a stressz-tengelyen keresztül megvalósuló befolyás a jelentős. Azaz nem a V1b, hanem inkább a V1a receptorok antagonizálása vezethet megfelelő eredményre. Ugyanakkor igazoltuk, hogy az AVP rendszer modulációja szorongásban nem igazán hatékony. Nőstény állatokon végzett kutatásaink felhívták a figyelmet a nem-függő tesztek bevezetésének szükségességére valamint arra, hogy egy-egy molekula nem feltétlenül hat ugyanúgy a két nemre, azaz már a preklinikai vizsgálatok során szükséges mindkét nem vizsgálata. Hasonló következtetés vonható le a perinatális korszakra vonatkozóan, amikor a szabályozás- és ezáltal a farmakológiai befolyásolás- is teljesen eltérhet a felnőttben tapasztaltaktól (azaz nemcsak mennyiségileg, hanem minőségileg is másfajta terápiára lehet szükség).

Ugyanakkor a Brattleboro patkány, mint modell állat hasznosítható lehet gyógyszerfejlesztési projekteken. A Richter Gedeon Nyrt. témapályázatának támogatásában több éven keresztül vizsgáltam a Brattleboro patkányok skizofrénia-szerű magatartásait, melyeket ismert és fejlesztés alatt álló antipszichotikumokkal próbáltam meg helyreállítani.

Még egyszer köszönöm a bírálókat fáradságos munkájáért és remélem, a felvetett kérdésekre adott válaszaim megfelelő megvilágításba helyezik a dolgozatomban maradt homályos pontokat.

Budapest, 2017. április 20.

Zelena Dóra

Magatartás Neurobiológiai Osztály
Magyar Tudományos Akadémia
Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

cím: 1083 Budapest Szigony utca 43.
Telefon: +36-1-210 9400
Fax: +36-1-2109423
E-mail: zelena.dora@koki.mta.hu
www.koki.mta.hu