

## Válaszok Dr. Dobolyi Árpád Professor Úr bírálatában megfogalmazott kérdésekre

Nagyon köszönöm Bíráló Úr munkáját és a véleményt, amit megfogalmazott! A kritikai észrevételekre illetve a kérdésekre az alábbi válaszokat adom:

**1. „A bevezetésben keveset tudtunk meg a PACAP és receptora, valamint a Trpa1 agyi eloszlásáról, pedig ez fontos lenne, hogy közvetlen vs. közvetett hatásokat megítéljük. Milyen mértékben fejeződnek ki ezen gének a vizsgált, szorongásban és depresszióban érintett agyterületeken más agyterületekkel összehasonlítva?”**

Válasz:

Elismerem, hogy a dolgozat megírásánál szentelhettem volna több teret a PACAP és fő receptora, PAC1 központi idegrendszeri eloszlásának. Ebbe a kérdésbe azért nem mentem bele mélyebben, mert mint arra utaltam is, nagyon sok régióban kifejeződik mind a PACAP, mind a receptora.

Immunhisztokémiai vizsgálatok során PACAP tartalmú idegsejteket nagy számban találtak az agykéregben, hippocampusban, amygdalában, habenula magvakban és a hypothalamus területén is. Az agytörzsben a periaqueductális szürkeállomány, az Edinger-Westphal mag, a parabrachialis mag, a cochleáris, vestibularis magvak, a motoros agyidegmagvak emelendők ki. (Hannibal 2002). Az mRNS szintű vizsgálatok ezzel jó átfedést mutatnak (Hannibal 2002), melyet újabb adatbázisok (Allen Mouse Brain Atlas) is alátámasztanak. A fő receptor, a PAC1 receptor lényegében megtalálható minden olyan területen, ahol a PACAP is, de mRNS-ének (Lein et al 2007) és a PAC1 fehérje termék eloszlása, ha lehet, még diffúzabb a központi idegrendszerben (Joo és mtsai 2004).

Ami a TRPA1 központi eloszlását illeti, egy nagyon ellentmondásos adatokkal terhelt irodalom áll rendelkezésre. Tekintettel arra, hogy ez a kérdés szorosan összefügg Professor Úr 9. kérdésével, arra kérem, hogy legyen szíves az arra adott választ megtekinteni, mert ott a *Trpa1* eloszlásáról részletesebben írok.

Hannibal J. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Comp Neurol.* 2002 Nov 25;453(4):389-417. doi: 10.1002/cne.10418. PMID: 12389210.

Joo KM, Chung YH, Kim MK, Nam RH, Lee BL, Lee KH, Cha CI. Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *J Comp Neurol.* 2004 Aug 30;476(4):388-413. doi: 10.1002/cne.20231. PMID: 15282712.

Lein ES, Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen TM, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, et al. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature.* 2007 Jan 11;445(7124):168-76. doi: 10.1038/nature05453. Epub 2006 Dec 6. PMID: 17151600.

2. **„A jelölt mutatja a három találat elmélet modelljében túlélte egerek számát, mely szerint a PACAP KO egerek aránya (14.7%) alacsonyabb volt, mint azt a mendeli törvények (25%) alapján várható volna. Kérdésem, hogy a genotipizáláskori fiatal korban, vagy a kísérlet végén van mutatva a túlélte állatok száma? Jelentős volt a két időpont közötti (vagyis a stresszkezelés hatására) az elhalálozás? Ha igen, talán érdemes lenne mindkettőt mutatni. Irodalmi adatok mekkora a PACAP KO állatok születési aránya? Ahhoz képest is kevés a 14,7%?”**

**Válasz:**

A szövetmintavételt a már felnőtt, 70 napos állatok farkából történt. Az állatok elhullása kivétel nélkül a maternális depriváció időszakára esett. Azután, hogy az állatokat leválasztottuk, és később, a krónikus stresszexpozíció alatt sem tapasztaltunk elhullást. Kivétel volt ez alól az a kísérlet, ahol az állatokat fluoxetinnel kezeltük. Itt előfordult, hogy az állat hasfalában az injekció beadása helyén gennyes gyulladás alakult ki, és ezért állatetikai megfontolásból az állatot túl kellett altatnunk, de ezek az állatok nem a stresszadaptáció elégtelensége miatt hullottak el.

Irodalmi adatok szerint (Hashimoto és mtsai 2001) PACAP heterozigóta szülők almainál 23.9% a KO, 49.6% a heterozigóta és 26.5% a vad típusú egerek aránya, ami gyakorlatilag a mendeli arányokat mutatja. Ez, összehasonlítva az általunk látott 14.7%-kal, arra enged következtetni, hogy a PACAP KO egereknek majdnem a felét veszítettük el posztnatálisan.

Idézett irodalom:

Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K, Mori W, Hirose M, Matsuda T, Sakaue M, Miyazaki J, Niwa H, Tashiro F, Yamamoto K, Koga K, Tomimoto S, Kunugi A, Suetake S, Baba A. Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Nov 6;98(23):13355-60. doi: 10.1073/pnas.231094498. Epub 2001 Oct 30. PMID: 11687615; PMCID: PMC60875.

3. **„A leírásuk szerint a peroxidázos immunhisztokémiát nikkelszulfát nélkül alkalmazták. Kérdésem, hogy ennek mi volt az oka, hiszen általában intenzifikálni szokták a DAB jelet?”**

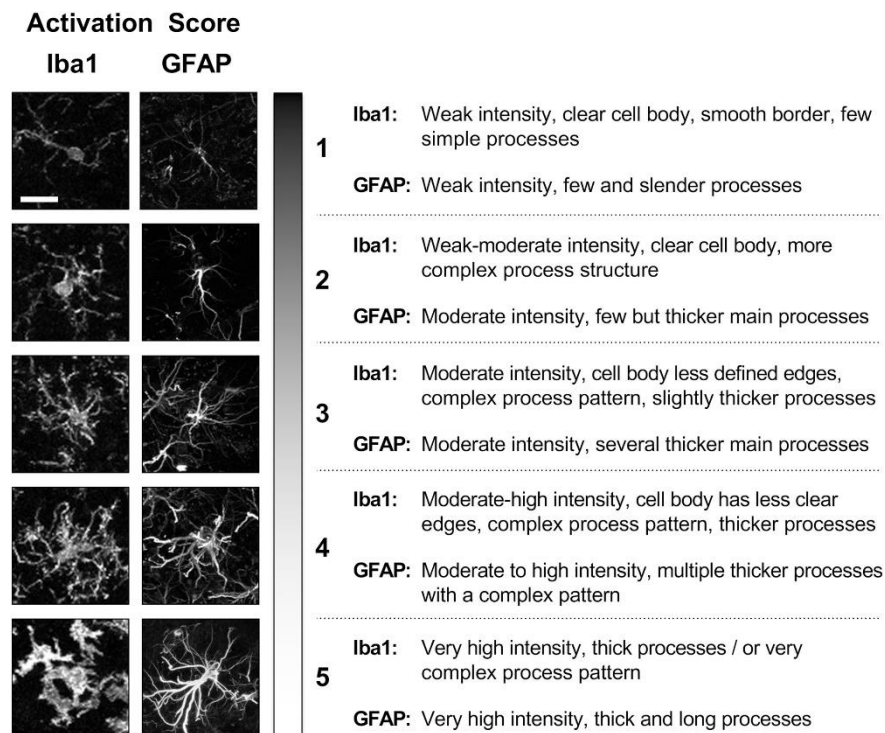
**Válasz:**

Nikkelszulfát intenzifikálást akkor szoktunk alkalmazni, amikor a DAB jel nem elég erős, és feltétlenül szükség van rá a jel háttér arány javítása érdekében. Az a gyakorlati tapasztalatunk, hogy ha sok mintával dolgozunk egyidőben, és az immunfestés előhívásakor váratlan esemény lép fel, és nem tudjuk egészen pontosan a megfelelő időben leállítani az összes mintán a hívást, a hirtelen gyorsuló Ni-DAB reakció jelentős háttérrel okozhat. Azt is megfigyeltük, hogy Ni-DAB festésnél az aspecifikus jel először a sejtmagokban szokott megjelenni. Ez különösen zavaró akkor, amikor nukleáris jelet várunk pl. az általunk használt FOS, FOSB, vagy H3 hiszton festések kapcsán. Mivel ezek a festések megbízhatóan működtek nikkelszulfát jelenléte nélkül is, eltekintettünk a nikkelszulfát intenzifikálástól.

4. **„Az astrocyta és microglia aktivitást a gliasejtek morfológiájának értékelésére alkalmazott pontrendszer szerint értékelték. Mikroglia aktivációra visszahúzzák a nyúlványaikat, megnő a sejtest mérete. Astrocytáknál hogyan következtek a morfológiából az aktivációra?”**

## Válasz:

A mikroglia és astrocyta aktivitás vizsgálatára a Harrison és mtsai. által alkalmazott pontrendszert vettük igénybe. Professzor Úr által leírt mikroglia morfológiai változás a reaktív mikrogliaéknál lép fel, ami a Harrison-féle pontrendszer szerint a legmagasabb, 5-ös pontértéket kapja. Kisebb mértékű gliaktiváció a nyúlványok megvastagodásában és az ágrendszer másod és harmadrendű ágainak megritkulásában nyilvánul meg, melyet Iba1 festéssel jól láthatóvá lehet tenni. Az astrocyták esetén is megfigyelhető hasonló változás a sejtek nyúlványainak morfológiájában, de ott a GFAP festést kell alkalmazni a sejtek jelölésére. A mikrogliaikkal ellentétben az astroglia esetében nem történik meg az amöboid makrofággá alakulás. Hosszabb szöveges magyarázat helyett álljon itt egy ábra illusztrációként Harrison és mtsai. (2019) cikkéből:



1. ábra. Gliaktiváció értékelésére alkalmazott pontrendszer. (Harrison és mtsai, 2019).

Idézett irodalom:

Harrison L, Pfuhlmann K, Schriever SC, Pfluger PT. Profound weight loss induces reactive astrogliosis in the arcuate nucleus of obese mice. *Mol Metab.* 2019 Jun;24:149-155. doi: 10.1016/j.molmet.2019.03.009. Epub 2019 Apr 3. PMID: 30979678; PMCID: PMC6977167.

**5. Vad típusú kontroll állatok esetén 2 különböző kísérletben (PACAP-5.1 ábra, és 3 hot modell, 5.16 ábra) nagymértékben különbözött az elásott üveggolyók száma (kb. 20 vs. 3 kb. 2). A két kísérletben az alap cortikoszteron szintekben is jelentős különbséget mértek. Mi lehet a kontroll csoportok közötti jelentős különbségek oka?**

## Válasz:

Elnézést kell kérnem Bíráló Úrtól, mert úgy adtam meg az ábrákon a genotípust, hogy az abszcisszán nem tüntettem fel, melyik génre nézve KO az állat. Ez sajnos csak az ábramagyarázatba került be, és ez valóban félrevezető lehet az olvasónak. Ez a lehetséges

probléma a dolgozat szerkesztésénél sajnos nem merült fel bennem, és az eredeti közlemények ábráit vettem át és fordítottam le. Azért fordulhatott ez elő, mert az egyes eredeti közleményekben csak 1-1 génmódosított törzset használtunk, és ezért ott nem volt szükséges minden ábrán külön jelezni, hogy milyen génre nézve KO az adott csoport.

Professzor Úr által idézett 5.16. ábra a TRPA1 KO törzs eredményeit mutatja, és nem a három találat elméletben alkalmazott PACAP KO törzset, amit az 5.1. ábra mutat. Mivel a PACAP KO törzs CD1 alapú, a TRPA1 pedig C57/Bl6 törzsű, a kontroll szorongási szint értékek, azaz az elásott üveggolyók száma, és a kortikoszteron szint különbségek adódhatnak az egértörzsek közti különbségből is. Azt is fontos szempont, hogy a két kísérlet között 10 év telt, el és időközben az állatházak is többször költöztek, ezért az eredmények nem hasonlíthatók össze direkt módon. Ezeket a viselkedési tesztekét mindig a saját, egyidőben mért kontrolljaikhoz kell viszonyítani.

## ***6. „Ha a PACAP állatokban csökkent szorongást és depressziót mérünk, akkor miért feltételezhető, hogy a heterozigóták predisponálják a depresszió-szerű viselkedést?”***

Válasz:

Hashimoto és munkatársai, amikor 2001-ben létrehozták azt a PACAP KO egértörzset amivel mi is dolgoztunk. Cikkükben a vad és heterozigóta genotípusok összehasonlítására összpontosítottak és elsősorban az állatok lokomotoros aktivitását és szorongási szintjét elemzik. Nem fordítottak sok figyelmet a heterozigóta állatok karakterizálásra. Ennek ellenére, cikkükben néhány viselkedési teszt adatsorát közölték, és esetenként az adatsorok a heterozigóta állatok eredményeit is tartalmazzák. Ebben az adatsorban az látszik, hogy a heterozigóta állatok eredményei a mérőszámok tekintetében sok esetben a vad típus és a KO közé esik olyan módon, hogy a vad vs. heterozigóta összehasonlításban a különbség nem éri el a szignifikancia szintjét, de megközelíti azt. Ezek a mérések 7-8 állatot tartalmaztak csoportonként, ami emelt keresztpalló teszt és open field teszt esetén nagy különbségek kimutatására elégséges lehet, de a heterozigóta állatoknál látható moderált mértékű viselkedési anomália statisztikai alátámasztására nem volt elegendő az ezekben a tesztekben jellemző jelentékeny szórás miatt. Hashimoto és mtsai ugyanebben a cikkükben (2001) meghatározták a heterozigóta állatokban a PACAP mRNS-ének és PACAP 38 peptid mennyiségét is. Az situ hibridizáció azt mutatta, hogy a PACAP mRNS mennyisége heterozigóta állatokban nagymértékben csökkent, de nem tűnt el. A PACAP 38 immunreaktivitást a heterozigóta állatokban a vad típusban megfigyelnél 70%-kal kisebbnek találták. Hashimoto és mtsai azután 2009-ben közölték azt, hogy ezek az egerek depresszió-szerű fenotípussal is rendelkeznek, de ebben a közleményükben egyáltalán nem vizsgálták a heterozigóta állatokat, de legalábbis nem közöltek eredményeket. Innen jött a gondolat, hogy a heterozigóta állatok a kisebb PACAP expresszió miatt genetikai hajlamot mutathatnak depresszió-szerű állapotra.

Amikor azután a PACAP KO állatokat stressznek tettük ki, azt láttuk, hogy a depresszió-szerű fenotípus (5.1. A ábra a dolgozatban) stresszexpoziáció hatására paradox módon megfordul, és egy egészen alacsony immobilitási értékeket láttunk a forced swim tesztben (5.8. G ábra és 5.21 A ábra a dolgozatban). Mivel ez nem egyeztethető össze azzal, amit az emberi betegségről tudunk, hogy a stresszexpoziáció ront, és nem javít a beteg állapotán, arra jutottunk, hogy a heterozigóta állat lehet alkalmas a modellben, mert ez egy olyan genetikai eltérést hordoz, ami hajlamosítja a depresszió-szerű állapot kialakulására.

Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K, Mori W, Hirose M, Matsuda T, Sakaue M, Miyazaki J, Niwa H, Tashiro F, Yamamoto K, Koga K, Tomimoto S, Kunugi A, Suetake S, Baba A. Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Nov 6;98(23):13355-60. doi: 10.1073/pnas.231094498. Epub 2001 Oct 30. PMID: 11687615; PMCID: PMC60875.

**7. „A három találat modellben mennyit számított a PACAP heterozigóta egerek használata? Eredményei szerint a chronic variable mild stressz anyai deprivációval kombinálva a vad típusú állatban is hasonló depresszió-szerű viselkedést okoz. Milyen esetben és miért ajánlja, pl. egy gyógyszergyárnak, a PACAP het állatok használatát?”**

A tudományos projekt célja az volt, hogy a három találat elméletet teszteljünk egy állatmodellben. A krónikus variábilis enyhe stressz modellt önmagában is nagyon elterjedten alkalmazzák rágszálómodellekben a depressziószerű állapot előidézésére, melynek az az alapja, hogy a krónikus stresszexpozíció emberben is depressziót okozhat. Ebben a modellben a rágszálók jó része (de nem minden egyed) mutat anhedóniát és szorong (Czéh és mtsai 2016, Willner 2016). Mi is ezt láttuk akkor, ha a vad típusú állatainkat stressznek tettük ki. Csoportszinten megfigyelhető volt egy depresszió-szerű állapot, amelyben egyes állatok kisebb, mások nagyobb mértékben mutatták a tüneteket, vagy egyesek esetleg teljesen ellenállónak bizonyultak. Ezzel összhangban, jól tudjuk, hogy nem minden ember szenved depresszióban, aki stresszben éli életét, pl. munkahelyi és/vagy családi okokból. Az, hogy ez miért van így, genetikai vagy epigenetikai okokkal magyarázható. Nagyon sok génmódosított egér és számos patkánytörzset hoztak létre, melyek a génmutáció miatt depressziószerű tüneteket mutatnak, különösebb stresszexpozíció nélkül is. Ilyen a PACAP KO törzs is (Hashimoto és mtsai 2009). Mivel azonban a depresszió nem monogénes betegség, az egyetlen gén mindkét allélját érintő mutációval előidézett állapot konstrukciós szempontból nem illeszthető az emberi kórállapot háttérével. Az emberi depresszió háttérét vizsgáló genetikai kutatások gyakran azt találták, hogy polimorfizmus(ok) áll(nak) a háttérben. Ezek többnyire nem okoznak funkcióvesztést a géntermék teljes hiánya miatt, hanem a géntermék működése valamilyen mértékben megváltozik, ami az allosztatikus kapacitást a stresszadaptáció szempontjából limitálja. A géntermék megváltozott mennyisége, jelen esetben a PACAP 70%-kal kisebb mennyiségű kifejeződése a heterozigóta állatban ezért egy olyan állapot, ami konstrukciósan jobban megfelel az emberi betegség háttérében álló polimorfizmusok okozta hatásnak. Vagyis azért, hogy a willneri konstrukciós validitási kritériumnak megfeleljünk (Willner, 1984) a heterozigóta állatokat is bevontuk a vizsgálatba.

A három találat elmélet harmadik pillére az epigenetikai hatás, mely gyakran az élet korai szakaszában elszenvedett averzív szignifikáns életesemény hatására lép fel, és önmagában is képes depressziószerű állapotot előidézni, melyet szintén gyakran használnak depresszió modellként állatkísérletekben (Czéh és mtsai 2016). De, ha a három találat elméletből indulunk ki, és azt az emberi hangulatzavarra vonatkoztatjuk, ismét azt kell, hogy lássuk, hogy az, hogy egy adott gyermek életkörülményei rosszak voltak (pl. bántalmazó vagy elhanyagoló szülők nevelték vagy szexuális abúzusnak volt kitéve) önmagában nem minden esetben okoz szorongást és/vagy depressziót. Vagyis, hogy a konstrukciós validitásnak teljes mértékben megfeleljünk, a stresszhatást, a genetikai predispozíciót és az epigenetikai hatást kombinálnunk volt szükséges.

Egyetértek Bíráló Úrral abban, hogy egy-egy paraméter esetében nem látszik az, hogy a heterozigóta állat „depressziósabb” lenne mint a vad típusú állat, ha maternális depriváción esett át és később krónikus stressznek volt kitéve, de a vad típusú állat csak két találatot szenvedett el a háromból, vagyis ez az állat konstrukciósan nem felel meg a három találat elmélet validitási kritériumnak.

Arra a kérdésre, hogy milyen esetben ajánlanám a modellt tesztelésre, bár ismertek olyan PACAP és PAC1 receptor polimorfizmusok, amelyek hangulatzavarral asszociáltak (Ressler és mtsai, 2011, Almlí és mtsai 2013), azt tudom mondani, hogy mivel a depresszióban szenvedő betegek esetében nem történik genetikai vizsgálat annak meghatározására, hogy milyen genetikai ok lehet a háttérben, egyelőre nem tudunk az adott betegségben személyre szabott terápiát adni. Ahogyan azt sem tudjuk, hogy milyen epigenetikai eltérések lépnek fel az adott beteg esetében. Mégis, azt gondolom, hogy a modellünk olyan betegségcsoportot reprezentál legjobban, ahol pozitív családi anamnézis (genetikai faktor) áll fenn, és esetleg az illetőt gyermekként érte valamilyen családi trauma, majd felnőtt korában egy krónikus stresszhatás (bántalmazó kapcsolat, munkahelyi konfliktus, anyagi nehézségek, gyász stb.) előidézi a depressziós epizódot. Én azt gondolom, hogy megközelítésünk arra is alkalmas lehet, hogy egy adott új hatóanyagjelölt molekula hatékonyságát összevessük a modellben a standardnak számító antidepresszánsokkal. Mivel a PACAP KO állatról tudjuk, hogy agyukban a szerotonin metabolitja csökkent mennyiségben van jelen, és a mi eredményeink is arra utalnak, hogy a nucleus raphe dorsalis szerotoninerg sejtjeinek működésében változások láthatók, úgy ítélem, meg, hogy a szerotoninerg rendszert befolyásoló gyógyszerhatóanyag-jelölt vegyületek tesztelésére alkalmas lehet modellünk.

Idézett irodalom:

Almlí LM, Mercer KB, Kerley K, Feng H, Bradley B, Conneely KN, Ressler KJ. ADCYAP1R1 genotype associates with post-traumatic stress symptoms in highly traumatized African-American females. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2013 Apr;162B(3):262-72. doi: 10.1002/ajmg.b.32145. Epub 2013 Mar 15. PMID: 23505260; PMCID: PMC3738001.

Czéh B, Fuchs E, Wiborg O, Simon M. Animal models of major depression and their clinical implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2016 Jan 4;64:293-310. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.04.004. Epub 2015 Apr 17. PMID: 25891248.

Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K, Mori W, Hirose M, Matsuda T, Sakaue M, Miyazaki J, Niwa H, Tashiro F, Yamamoto K, Koga K, Tomimoto S, Kunugi A, Suetake S, Baba A. Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Nov 6;98(23):13355-60. doi: 10.1073/pnas.231094498. Epub 2001 Oct 30. PMID: 11687615; PMCID: PMC60875.

Ressler KJ, Mercer KB, Bradley B, Jovanovic T, Mahan A, Kerley K, Norrholm SD, Kilaru V, Smith AK, Myers AJ, Ramirez M, Engel A, Hammack SE, Toufexis D, Braas KM, Binder EB, May V. Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. *Nature.* 2011 Feb 24;470(7335):492-7. doi: 10.1038/nature09856. Erratum in: *Nature.* 2011 Sep 1;477(7362):120. PMID: 21350482; PMCID: PMC3046811.

Willner P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol Stress.* 2016 Aug 24;6:78-93. doi: 10.1016/j.ynstr.2016.08.002. PMID: 28229111; PMCID: PMC5314424.

Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 1984;83(1):1-16. doi: 10.1007/BF00427414. PMID: 6429692.

**8. Miért más agyterületekre fókuszál a stressz-indukált c-Fos aktiváció esetén (amygdala, BNST, septum, PVN), és a FOSB/ΔFOSB esetén (mPFC, hippocampus)? A különböző immediate early gének más területeken aktiválódnak?**

Válasz:

A prefrontális kéreg vizsgálatát csak a három találat elmélet modellben, a hippocampus vizsgálatát pedig a három találat elmélet modellben és a krónikus variábilis enyhe stressz modellben végeztük el, mivel valószínűleg ezt a két agyterületet vizsgálták és vizsgálják leggyakrabban a depresszióval kapcsolatos kutatások során. A krónikus modellben a FOSB/ΔFOSB, mint krónikus idegsejtaktiváció marker kifejeződését vizsgáltuk meg. A FOS fehérjét (vagy másnéven c-Fos) csak akut modellben vizsgáltuk, mivel kb. 24 órával a stresszexpozíció után ez az aktivitási marker eltűnik a sejtmagból, és ismétlődő stresszek esetén kifejeződése gyakran csökken, az agyterületek adaptációja következtében (Kovács, 1998, 2008). Tehát, a gének kifejeződésének időbeli dinamikája és a modellezni kívánt állapot (akut stressz illetve krónikus stressz okozta depressziószerű állapot) eltérő jellege miatt vizsgáltunk eltérő markereket ezeken a területeken, illetve ezért vizsgáltunk krónikus markereket a prefrontális kéreg és hippocampus területén.

Idézett irodalom:

Kovács KJ. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int*. 1998 Oct;33(4):287-97. doi: 10.1016/s0197-0186(98)00023-0. PMID: 9840219.

Kovács KJ. Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J Neuroendocrinol*. 2008 Jun;20(6):665-72. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01734.x. PMID: 18601687.

**9. Annak tesztelésére, hogy a chronic variable mild stress globális hatással van-e a Trpa1 expressziójára, ganglion trigeminale mintákon RT-qPCR mérést végzett. Talán jobb lett volna azonos módszerrel, másik agyterületen (és nem a periférián) végezni el ezt a validálást. PCR-el kimutatható a Trpa1 expresszió változása az EW mag területén?**

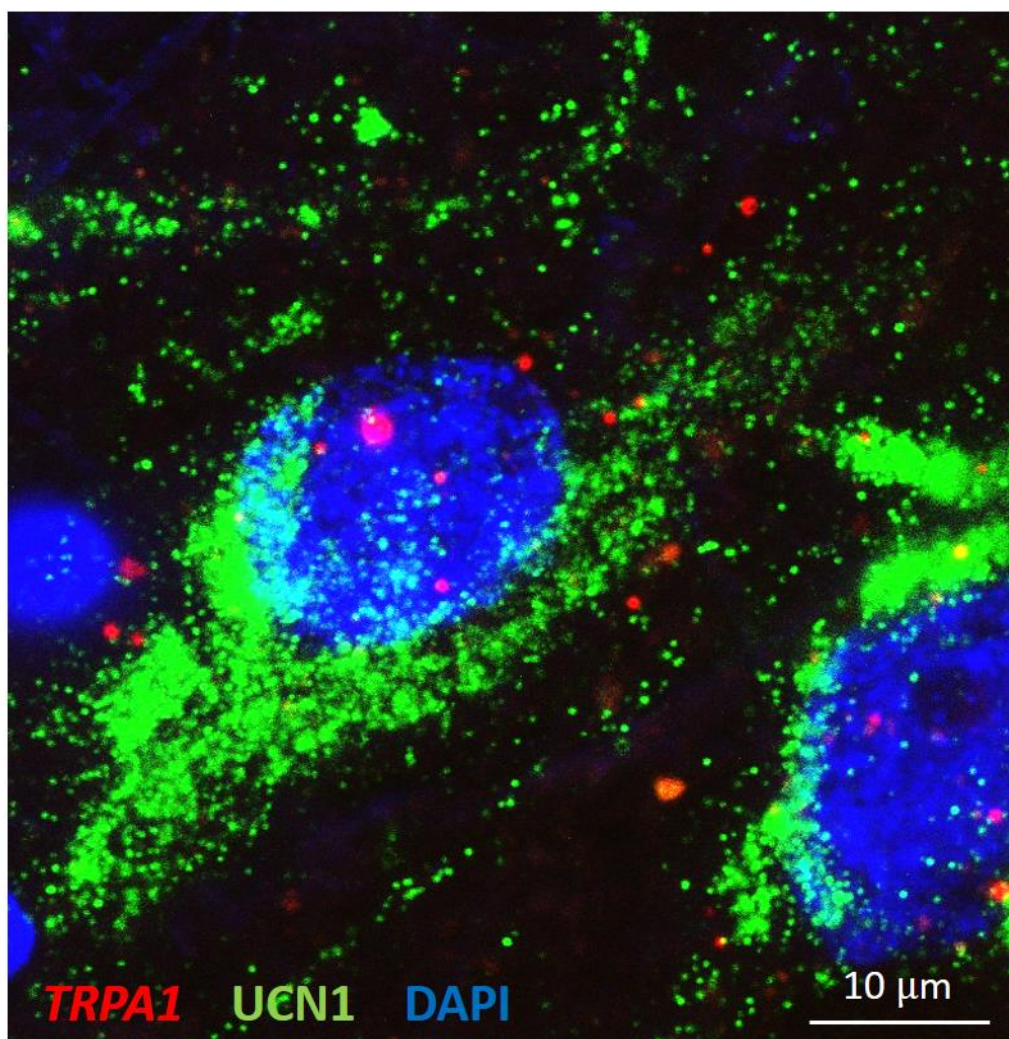
Válasz:

Professzor Úr felvetésével teljes mértékben egyetértek. Ami a TRPA1 központi kifejeződését illeti, az irodalomban azt lehet találni, hogy a legtöbb agyterületen kifejeződik, mind neuronokban, mind gliasejteken. Ezek a közlemények immunszövettani módszerrel végzett festéseken alapulnak. Sajnos azt kell, hogy mondjuk, hogy ezek az adatok finoman szólva is megkérdőjelezhetők. Az antitestek specificitásának ellenőrzésével ugyanis kevés szerző törődött, amikor ezeket a cikkeket megírták. Saját tapasztalatunk szerint a kereskedelemben elérhető TRPA1 antitestek nem megbízhatóak, ahogy ezt a keserű valóságot nemrégiben külön közlemény is taglalta (Virks és munkatársai, 2019). Saját magunk, a Farmakológiai Intézettel és a Biotechnológiai Intézettel közösen is végeztünk kísérleteket, hogy megbízható antitestet

állítsunk elő egérben, de többszöri próbálkozás ellenére sem sikerült olyan B sejt klónt azonosítani, ami specifikus monoklonális antitestet termelt volna. Mivel tehát nem tudtunk megoldást találni az antitest problémára, és az immunfestésen alapuló leírások nem megbízhatóak, RNAscope in situ hibridizációt végeztünk, hogy meghatározzuk, milyen mértékben fejeződik ki a *Trpa1* a központi idegrendszerben. Azt találtuk, hogy ellentétben az immunfestéseken alapuló leírásokkal fokális, elszórtan, 1-1 sejtre lokalizált igen alacsony mértékű, kizárólag neuronális expresszió jellemző (sejtenként 1-1 transzkriptum) a központi idegrendszer több területén, mint pl. a hypothalamus (Oláh és mtsai. 2021) és a bulbus olfactorius (Konkoly és mtsai. 2021). Sejtenként több (néhány) transzkriptum a piriform kéreg területén figyelhető meg elszórtan, glutamát tartalmú neuronokban (Konkoly és mtsai 2021). Erős *Trpa1* expressziót azonban eddig csak az Edinger-Westphal magban találtunk. Hasonlóan erős expressziót a környéki idegrendszerben, a ggl. trigeminalé-ban figyeltünk meg, ezért esett a választásunk erre a területre, mint kontroll. Amennyiben lenne a központi idegrendszer területén egy olyan jól körülhatárolható idegsejt csoport ahol kifejeződik a *Trpa1* mRNS, és amelyet (talán) nem befolyásol a krónikus stressz hatása, azt választottuk volna belső kontrollnak, de mi ilyet mi nem találtunk.

PCR vizsgálattal meg tudjuk mérni a *Trpa1* mRNS változását. Mivel a *Trpa1* jelentős mértékben kifejeződik a fehérvérsejtekben (Zhu és mtsai. 2019, Szabó és mtsai. 2024), az agyszövet ereiben található vérsejtekben jelen levő *Trpa1* befolyásolhatta volna a méréseket. Ezért, amikor volt rá lehetőség, RNAscope in situ hibridizációt végeztünk perfundált szövetből. Így a vérsejtek zavaró hatása nem érvényesül, mert azokat a perfúziókor eltávolítjuk, illetve reziduális vérsejtek esetén is pontosan láthatjuk, milyen sejtből jön a fluoreszcens jel. Humán agyszövet mintáink Palkovits Professzor Úr fagyasztott szövetblokkjaiból származtak. Ezekből egyrészt a fagyasztás okozta strukturális károsodás, másrészt a fixálás hiánya miatt nem tudtunk megbízhatóan RNAscope-ot végezni, ezért PCR vizsgálattal mutattuk be azt, hogy a receptor mRNS-ének mennyisége kisebb depressziós egyének mintáiban (Kormos és mtsai., 2022). Azóta, hogy ez a közlemény megjelent, sikerült perfundált humán szövetmintán is bemutatni a *TRPA1* mRNS jelenlétét UCN1 tartalmú neuronokban az EWcp-ben RNAscope segítségével. Bár ezt egyelőre nem publikáltuk, az alábbi 2. ábra demonstrálja az mRNS jelenlétét egy emberi EWcp UCN1 tartalmú neuronban.





2. ábra. Emberi centrális projekciójú Edinger-Westphal mag UCN1 (zöld) tartalmú idegsejtjeiben kifejeződik a *TRPA1* mRNS (piros). RNAscope in situ hibridizáció és immunfluoreszcens jelölés kombinációja. A sejtmagokat 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) festéssel tettük láthatóvá.

#### Idézett irodalom

Konkoly J, Kormos V, Gaszner B, Sándor Z, Kecskés A, Alomari A, Szilágyi A, Szilágyi B, Zelena D, Pintér E. The Role of TRPA1 Channels in the Central Processing of Odours Contributing to the Behavioural Responses of Mice. *Pharmaceuticals* (Basel). 2021 Dec 20;14(12):1336. doi: 10.3390/ph14121336. PMID: 34959735; PMCID: PMC8703823.

Olah E, Rumbus Z, Kormos V, Tekus V, Pakai E, Wilson HV, Fekete K, Solymer M, Kelava L, Keringer P, Gaszner B, Whiteman M, Keeble J, Pinter E, Garami A. The Hypothermic Effect of Hydrogen Sulfide Is Mediated by the Transient Receptor Potential Ankyrin-1 Channel in Mice. *Pharmaceuticals* (Basel). 2021 Sep 29;14(10):992. doi: 10.3390/ph14100992. PMID: 34681216; PMCID: PMC8538668.

Szabó K, Makkai G, Konkoly J, Kormos V, Gaszner B, Berki T, Pintér E. TRPA1 Covalent Ligand JT010 Modifies T Lymphocyte Activation. *Biomolecules*. 2024 May 28;14(6):632. doi: 10.3390/biom14060632. PMID: 38927036; PMCID: PMC11202300.

Virk HS, Rekas MZ, Biddle MS, Wright AKA, Sousa J, Weston CA, Chachi L, Roach KM, Bradding P. Validation of antibodies for the specific detection of human TRPA1. Sci Rep. 2019 Dec 6;9(1):18500. doi: 10.1038/s41598-019-55133-7. PMID: 31811235; PMCID: PMC6898672.

Zhu T, Zhou D, Zhang Z, Long L, Liu Y, Fan Q, Chen F, Zhang X, Wu Y, Zeng H, Verkhatsky A, Zhao J, Nie H. Analgesic and antipruritic effects of oxymatrine sustained-release microgel cream in a mouse model of inflammatory itch and pain. Eur J Pharm Sci. 2020 Jan 1;141:105110. doi: 10.1016/j.ejps.2019.105110. Epub 2019 Oct 22. PMID: 31654757.

**10. Bár az erőltetett úszás tesztet nem tartja teljesen megbízhatónak, a cukorpreferencia tesztet sok kísérletében nem végezte el. Mi ennek az oka?**

Válasz:

A cukorpreferencia teszt az anhedónia mérésére egy hatékony teszt és a krónikus stressz hatására bekövetkező depressziós-szerű állapot kimutatására a használhatjuk. Az egerek esetében, amennyiben az állatok egyéni folyadékfogyasztását akarjuk mérni, egyéni tartás mellett viszonylag hosszan (16 óra) kell mérni, ahhoz, hogy jól detektálható folyadékfogyasztás történjen. Mivel a három találat elméletben 158 egérrel dolgoztunk, az állatházi kapacitás és felszerelés limitált volta nem tette lehetővé, hogy ennyi állatot egyszerre teszteljünk. Arra is gondoltunk, hogy időben eltolva teszteljük az állatokat, de mivel a teszt idejére az állatokat izolálni kell alomttestvéreiktől, tulajdonképpen egy szociális izolációs stresszt okozunk, ami része a krónikus variábilis stressz paradigmának. Ez a stresszhatás, mivel a tesztet nem tudtuk volna az összes állaton egyidőben elvégezni a kapacitás korlátozottsága miatt, különböző mértékben befolyásolta volna azokat a stresszparamétereket, amelyekhez a mintákat a leölés idejében gyűjtöttük. Ezért, a cukorpreferencia mérést csak olyan modellekben végeztük el, amelyek esetében rendelkezésre állt az állatszámhoz mért elegendő állattartó helyiség, ketrec és itató üveg ahhoz, hogy minden állatot egyidőben teszteljünk. Ellenkező esetben az izoláció akut stresszhatása a kontolljainkat zavarta volna, a krónikus stresszcsoportban pedig eltérést okozott volna az egyes állatok stresszexpozíciójában, növelve a szórást. A megfelelő körülmények közötti cukorpreferencia tesztelésre a Trpa1 KO egértörzs esetében a Farmakológiai Intézet állatházában volt lehetőségünk. A rotenon modellben az Anatómiai Intézet állatházának patkányok számára fenntartott helyiségeiben is el tudtuk végezni a tesztet, mivel itt a rekonstrukció után volt megfelelő alapterületi kapacitás és elegendő felszerelés ehhez.

**11. Az epididymalis zsírba 2µl Ba-DupGreen vírust injektáltak, ami zöld fluoreszcensfehérjét fejezett ki a fertőzött idegsejtekben. A perfundálásig eltelt 5 nap elég sok idő. Specifikusnak tekinthető még a jel? Hány szinapszison ment át a vírus? Mennyire volt tele az agy fertőzött sejtekkel?**

Válasz:

Az alkalmazott pseudorabies vírus retrográd transzneurális jelölést tesz lehetővé patkányban. Hasonló kísérleti elrendezésben, patkányban több vizsgálatban sikerült kimutatni az EWcp fertőződését, mely a szimpatikus idegrendszer útján történhetett. Korábbi kollaborációs munkánkban a mellékvesébe adott vírusinjekció útján, sikerült retrográd jelöléssel elérni az EWcp sejteket. Itt szintén hasonló túlélési időket teszteltünk több csoportban (96-144 óra), és a hypothalamus területén is találtunk preszimpatikus premotor neuronokat. Ebben a kísérletben a ventrolateralis nyúltvelő sejtjei jelölődtek, és a mesencephalon területén a Darkschewitsch mag, valamint a periaqueductalis szürkeállomány (Shah et al 2013). A viscerális zsírdepók -ide tartozik a mellékherét körülvevő zsírszövet is-, vizsgálata azt mutatta, hogy a zsírszövet szimpatikus idegrendszer által történő beidegzése a gerincvelő oldalsó szarván keresztül

történik, ahova a hypothalamus magjaiból, és ventrolaterális medullából indulnak rostok (Stanley és mtsai 2010). Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy a vírus 2, esetleg 3 szinapszison juthatott át, melyek a sympathetic ganglionok, a nucleus intermediolateralis és esetleg a ventrolateralis medulla területén vannak. Nem tudjuk ugyanis kizárni azt, hogy az EWcp-ból a gerincvelőbe leszálló közvetlen összeköttetést adó rostokon is átjuthatott a vírus, mint ahogy az is lehetséges, hogy a ventrolaterális medullában történt egy további átkapcsolás.

Idézett irodalom:

Shah NS, Pugh PC, Nam H, Rosenthal DT, van Wijk D, Gaszner B, Kozicz T, Kerman IA. A subset of presympathetic-premotor neurons within the centrally projecting Edinger-Westphal nucleus expresses urocortin-1. *J Chem Neuroanat.* 2013 Sep;52:25-35. doi: 10.1016/j.jchemneu.2013.04.004. Epub 2013 May 22. PMID: 23707488; PMCID: PMC3775998.

Stanley S, Pinto S, Segal J, Pérez CA, Viale A, DeFalco J, Cai X, Heisler LK, Friedman JM. Identification of neuronal subpopulations that project from hypothalamus to both liver and adipose tissue polysynaptically. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Apr 13;107(15):7024-9. doi: 10.1073/pnas.1002790107. Epub 2010 Mar 29. PMID: 20351287; PMCID: PMC2872469.

## ***12. Mennyire specifikus az EWcp/UCN1 neuronok érintettsége a rotenon modellben? Más sejtek nem pusztulnak, és nem mutatnak funkcionális károsodást ezen kezelés hatására?***

Válasz:

Bíráló Úr felvetésével a rotenon szelektivitását illetően munkánk során behatóbban foglalkoztunk. Ami a rotenon hatását illeti, ez a toxin elsősorban a nagy energiaigényű szöveteket támadja és a mitochondriális komplex I gátlása révén okoz szabadgyökképződést, mitochondrium károsodást, energiadeficitet és sejtpusztulást. Ez a periférián azt eredményezi, hogy számos élénk metabolizmust folytató szervrendszer károsodhat (szív, csontvelő, vese, máj). A projekt kezdetekor elvégeztünk egy előkísérletet, amelyben próbáltuk meghatározni azt a legkisebb rotenon dózist, ami elégséges a Parkinson-kór-szerű kórállapot kialakítására, és minimális elhullás mellett tudjuk az állatok viselkedését tanulmányozni, még olyan áron is, hogy hosszabb ideig, 6 hétig kezeltük az állatokat, a megszokott 4-5 hét helyett. Tettük ezt azért, mivel a nagyon súlyos állapotú állatokon a viselkedési tesztek kivitelezhetetlenek lettek volna, hiszen, legyen az bármilyen viselkedési teszt, voltaképpen az állat mozgása az, amit vizsgálunk. Az 1,5mg/kg/nap volt az a dózis, amit végül alkalmaztunk, nagyon ügyelve arra, hogy amennyiben az állat általános állapota romlott, és ezért testtömegéből veszített, akkor az aktuális testtömeghez igazítottuk és csökkentettük a dózist. Így sikerült azt elérni, hogy viszonylag kevés állatot kellett az általános állapotuk romlása miatt kizárni a kísérletből. Azokat az állatokat, amelyeket az in vivo tesztek végén feldolgoztunk, alapos szövettani vizsgálatnak vetettük alá, és nem csak a substantia nigra pars compactát, valamit az Edinger-Westphal magot tanulmányoztuk. Ebben a két magban az alaphipotézisünknek megfelelően neurodegeneráció lépett fel. Kiemelném, hogy a két magban bekövetkező idegsejt károsodás mértéke korrelált egymással statisztikailag is. Ezzel szemben, azokban a hangulatszabályozásban kiemelt jelentőségű központokban, amelyekben bár leírtak neurodegenerációt Parkinson-kórban emberben (Borgonovo és mtsai. 2017, Goedert és mtsai. 2001), mi nem találtunk idegsejt pusztulást és gliasejt aktivációt. Ez igaz volt a ventrális tegmentális área és a nucleus raphe dorsalis dopaminerg sejtjeire, a nucleus raphe dorsalis és

medianus serotoniner neuronjaira, valamint a noradrenerg központok közül a locus coeruleus és a ventrolateralis medulla A5 sejtcsoportjára is (Ujvári és mtsai. 2022).

A közleményünk megjelenése óta megvizsgáltunk egyéb peptiderg rendszereket is. Ezek az adatok egyelőre publikálás előtt állnak, de elmondhatom, hogy a CRH rendszert illetően nem találtunk neurodegenerációt sem a nucleus paraventricularis, sem a centrális amygdala, sem pedig a nucleus intersitialis striae terminalis területén, bár a CRH rendszer mRNS és peptid tartalma némi kompenzációt végez, feltételezhetően az UCN1 tartalmú sejtek károsodása miatt (Pytel és mtsai. közlés előtt álló adatok). Az egyéb urocortinokat is megvizsgáltuk, és azt láttuk, hogy sem az *Ucn2* mRNS (nucleus paraventricularis hypothalami) sem az *Ucn3* mRNS (lateralis hypothalamus és nucleus medialis amygdalae) kifejeződése nem változik a modellben (Pytel és mtsai. nem közölt adatok). Arra is gondoltunk, hogy esetleg a főbb orexigén és anorexigén peptidrendszerek károsodhatnak. Egyelőre ezeket az adatokat sem publikáltuk, de változatlan a nucleus arcuatusban a *Npy* neuronok száma és változatlan a *Cart/Pomc* tartalmú neuronok száma is. A sejtek működésében viszont változások lépnek fel, mert rotenon hatására csökken a *Cart* és az *Npy* mRNS expressziója, változatlan *Pomc* mRNS és alphaMSH tartalom mennyiség mellett, míg minimálisan emelkedik az NPY peptid tartalom. Az orexin neuronok száma szintén változatlan, de bennük csökken az hypocretin1 mRNS és az Orexin1 peptid mennyisége is. Azt feltételezzük, hogy e sejtek működésének változása hozzájárulhat a modellben fellépő negatív energiaegyensúlyhoz, mely hasonlít a Parkinson-kórban előforduló testsúlyvesztéshez (Márton és mtsai, közlés előtt álló megfigyelések).

Idézett irodalom:

Borgonovo J, Allende-Castro C, Laliena A, Guerrero N, Silva H, Concha ML. Changes in neural circuitry associated with depression at pre-clinical, pre-motor and early motor phases of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2017 Feb;35:17-24. doi: 10.1016/j.parkreldis.2016.11.009. Epub 2016 Nov 21. PMID: 27889469.

Goedert M, Jakes R, Anthony Crowther R, Grazia Spillantini M. Parkinson's Disease, Dementia with Lewy Bodies, and Multiple System Atrophy as  $\alpha$ -Synucleinopathies. *Methods Mol Med.* 2001;62:33-59. doi: 10.1385/1-59259-142-6:33. PMID: 21318766.

Ujvári B, Pytel B, Márton Z, Bognár M, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Berta G, Kecskés A, Kormos V, Farkas B, Füredi N, Gaszner B. Neurodegeneration in the centrally-projecting Edinger-Westphal nucleus contributes to the non-motor symptoms of Parkinson's disease in the rat. *J Neuroinflammation.* 2022 Feb 2;19(1):31. doi: 10.1186/s12974-022-02399-w. PMID: 35109869; PMCID: PMC8809039.

**13. „A szelektív EWcp/UCN1 neuron abláció eredményeiből mennyire következtethetünk arra, hogy ezek a sejtek csak a Parkinson kór tüneteként bekövetkező hangulatváltozásokban érintettek?”**

Válasz:

Véleményem szerint nem következtethetünk arra, hogy csak a Parkinson-kór tünettánában van szerepe a magnak, hanem inkább azt a vonhatjuk le ebből, hogy a Parkinson-kór nem motoros tüneteinek a mag hozzájárul, de a motoros tünetekben nincs jelentős szerepe. A véleményem az, hogy ez a terület nagyon összetett funkciókkal bír, ezért károsításának szerteágazó hatása van. Mi a stresszválasz és hangulatzavarok vizsgálatával foglalkoztunk elősorban, de az energiaegyensúly szabályozásban vitt szerep vizsgálatok is végeztünk viselkedési tesztekkel.

Ezek végül nem kerültek be abba a közleménybe (Xu és mtsai. 2022), de azt láttuk, hogy az EWcp irtott állatok a forced swim tesztben is passzívabbak voltak, ami magasabb immobilitási időtartamban nyilvánult meg. Amikor a stressz hatását vizsgáltuk, a legtöbb modellben azt láttuk, hogy a mag működése megváltozik, amit az aktivációs markerek és az *Ucn1* mRNS és/vagy peptid mennyiségi változása is mutatott (Gaszner és mtsai. 2004, 2009). Korábban is (Kozicz és mtsai. 2001, Rouwette és mtsai. 2011), de nemrégiben is közöltünk adatokat arra vonatkozóan, hogy fájdalom modellekben illetve migrénben (Al-Omari és mtsai. 2024) milyen szerepe lehet a magnak. Nagy irodalma van annak is, hogy miként járulhat hozzá az EWcp az alkohol és egyéb tudatmódosító szerek (Zuniga és Ryabinin 2020), sőt sebészi narkotikumok (Yi és mtsai 2023) hatásához is. Nemrégiben közlemények jelentek meg arról is, hogy a mag jelentős szereppel bír a laktációs időszak előkészítésében akkor, amikor az anyaállat fészket épít (Tobliko és mtsai 2022). De van adat arra is, hogy a figyelem és kognitív funkciókban is lehet szerepe (Li és mtsai 2018).

Idézett irodalom:

Gaszner B, Csernus V, Kozicz T. Urocortinergic neurons respond in a differentiated manner to various acute stressors in the Edinger-Westphal nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 2004 Dec 6;480(2):170-9. doi: 10.1002/cne.20343. PMID: 15514930.

Gaszner B, Jensen KO, Farkas J, Reglodi D, Csernus V, Roubos EW, Kozicz T. Effects of maternal separation on dynamics of urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor in the rat non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus. *Int J Dev Neurosci.* 2009b Aug;27(5):439-51. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2009.05.006. Epub 2009 May 19. PMID: 19460425.

Kozicz T, Li M, Arimura A. The activation of urocortin immunoreactive neurons in the Edinger-Westphal nucleus following stress in rats. *Stress.* 2001 Jun;4(2):85-90. doi: 10.3109/10253890109115724. PMID: 22432129.

Li X, Chen W, Pan K, Li H, Pang P, Guo Y, Shu S, Cai Y, Pei L, Liu D, Afewerky HK, Tian Q, Zhu LQ, Lu Y. Serotonin receptor 2c-expressing cells in the ventral CA1 control attention via innervation of the Edinger-Westphal nucleus. *Nat Neurosci.* 2018 Sep;21(9):1239-1250. doi: 10.1038/s41593-018-0207-0. Epub 2018 Aug 13. PMID: 30104733.

Rouwette TP, Kozicz T, Olde Loohuis NF, Gaszner B, Vreugdenhil E, Scheffer GJ, Roubos EW, Vissers KC, Scheenen WJ. Acute pain increases phosphorylation of DCLK-long in the Edinger-Westphal nucleus but not in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *J Pain.* 2010 Oct;11(10):930-40. doi: 10.1016/j.jpain.2009.12.017. Epub 2010 Apr 24. PMID: 20418180.

Topilko T, Diaz SL, Pacheco CM, Verny F, Rousseau CV, Kirst C, Deleuze C, Gaspar P, Renier N. Edinger-Westphal peptidergic neurons enable maternal preparatory nesting. *Neuron.* 2022 Apr 20;110(8):1385-1399.e8. doi: 10.1016/j.neuron.2022.01.012. Epub 2022 Feb 4. PMID: 35123655; PMCID: PMC9090132.

Xu L, Füredi N, Lutter C, Geenen B, Pétervári E, Balaskó M, Dénes Á, Kovács KJ, Gaszner B, Kozicz T. Leptin coordinates efferent sympathetic outflow to the white adipose tissue through the midbrain centrally-projecting Edinger-Westphal nucleus in male rats. *Neuropharmacology.*

2022 Mar 1;205:108898. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108898. Epub 2021 Dec 1. PMID: 34861283.

Yi T, Wang N, Huang J, Wang Y, Ren S, Hu Y, Xia J, Liao Y, Li X, Luo F, Ouyang Q, Li Y, Zheng Z, Xiao Q, Ren R, Yao Z, Tang X, Wang Y, Chen X, He C, Li H, Hu Z. A Sleep-Specific Midbrain Target for Sevoflurane Anesthesia. *Adv Sci (Weinh)*. 2023 May;10(15):e2300189. doi: 10.1002/advs.202300189. Epub 2023 Mar 24. PMID: 36961096; PMCID: PMC10214273.

Zuniga A, Ryabinin AE. Involvement of Centrally Projecting Edinger-Westphal Nucleus Neuropeptides in Actions of Addictive Drugs. *Brain Sci*. 2020 Jan 26;10(2):67. doi: 10.3390/brainsci10020067. PMID: 31991932; PMCID: PMC7071833.

Még egyszer nagyon köszönöm Bíráló Úr munkáját!

Tisztelettel,

Pécs, 2024. október 26.



Gaszner Balázs

Anatómiai Intézet  
Általános Orvostudományi Kar  
Pécsi Tudományegyetem