

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Biológiai Intézet, Etológia Tanszék

Állatorvostudományi Egyetem
Állathigiéniai, Állomány-egészségtani és Állatorvosi Etológiai Tanszék

**Egy új hazai kezdeményezés: Kutya Agy- és Szövetbank
létesítése és működtetése**

Szerző: Czakó Lenke

Témavezetők: Dr. Kubinyi Enikő, ELTE Etológia Tanszék, tudományos főmunkatárs, Dr.
Czeibert Kálmán, ELTE Etológia Tanszék, tudományos segédmunkatárs, Dr. Adorján
András, Állatorvostudományi Egyetem Állathigiéniai, Állomány-egészségtani és
Állatorvosi Etológiai Tanszék, tanszéki állatorvos

Budapest, 2018

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	2
1. Bevezetés.....	3
3. A Kutya Agy-és Szövetbank	10
3.1 A kezdeményezés háttere.....	10
3.2 A Kutya Agy- és Szövetbank működése	12
3.2.1. Jogszabályi háttér	12
3.2.2. Intézményi megfeleltetés	13
3.2.3. Kommunikáció és felajánlás	14
3.3. Mintavételezés	17
4. Az Agybank validálása	19
4.1. Célkitűzések.....	20
4.2. Anyag és módszertan	20
4.3. Eredmények	21
6. Összefoglaló	28
7. Summary	29
8. Köszönetnyilvánítás.....	30
9. Irodalomjegyzék	31

Rövidítések jegyzéke

CBTB = Canine Brain and Tissue Bank (Kutya Agy-és Szövetbank)

CCD = Canine Cognitive Dysfunction syndrome (Kutyák kognitív diszfunkciós szindrómája)

cDNS = complementary (kiegészítő) DNS

CERAD = Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease

Ct = threshold cycle (küszöbciklus)

DNS = dezoxiribonukleinsav

EEG = elektroencefalográf

ELISA = enzyme-linked immuno-sorbent assay (enzimkapcsolt immunoszorbens vizsgálat)

ELTE = Eötvös Loránd Tudományegyetem

ERC = European Research Council (Európai Kutatási Tanács)

Eütv = egészségügyi törvény

fMRI = functional magnetic resonance imaging (funkcionális mágneses rezonanciás képalkotás)

GPS = Global Positioning System (Globális Helymeghatározó Rendszer)

HBTB = Human Brain and Tissue Bank (Humán Agyszövet Bank és Laboratórium)

HIV = Humán Immundeficiencia Vírus

NBB = NeuroBioBank

NÉBIH = Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal

PCR = polimerase chain reaction (polimeráz láncreakció)

PHFs = paired helical filaments (páros helikális szálak)

RNS = ribonukleinsav

RT-qPCR = Quantitative Real-time polimerase chain reaction (valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció)

SFDP = Senior Family Dog Project (Szenior Családi Kutya Program)

1. Bevezetés

Az agybankok olyan világszerte működő szervezetek, amelyek elsődlegesen agyi szöveteket tárolnak alacsony hőmérsékleten, és ezeket elérhetővé teszik a kutatók számára. Az orvostudomány, az egészségügy és a tudomány fejlődéséhez manapság már elengedhetetlen segítséget nyújtó agybankok szerteágazó módszereket alkalmazva, sokféle kutatási terület igényeit szolgálják. Használhatók egyrészt az agyban lejátszódó különböző kémiai, endokrinológiai, molekuláris biológiai folyamatok mélyebb megismerésére, továbbá szerepük van az idegrendszert érintő, gyulladásos, pszichiátriai, fejlődésbeli és neurodegeneratív betegségek kutatásában, jobban megismerve ezáltal a betegségek hátterében álló sejt- és molekuláris szintű folyamatokat. Az idegrendszert érintő betegségek ilyen mélyreható tanulmányozása pedig elősegítheti az egyes betegségek diagnosztikájában illetve terápiájában eredményesen alkalmazható módszerek létrehozását.

A Magyarországon újonnan létrejött Kutya Agy- és Szövetbank (a továbbiakban: Agybank vagy CBTB, a hivatalos angol név - Canine Brain and Tissue Bank - rövidítésével) jelenleg a kutyák egészséges öregedési folyamatait vizsgálja egy komplex, viselkedéstani, genetikai és idegtudományi komponenseket felsorakoztató kutatás, a Szenior Családi Kutya Program keretében. Mivel a kognitív hanyatlás az emberekhez hasonlóan öregedő kutyákban is jelentkezik és klinikai tünetek formájában is megnyilvánul, így ronthatja az idősödő kutyák életminőségét, emellett befolyásolhatja a kutya-gazda kapcsolatot. Az Agybank célja tanulmányozni a normál öregedés során az agyban bekövetkezett változásokat makroszkóposan, szövettani, molekuláris és génexpressziós szinten egyaránt. Az Agybank jelenleg az alkalmazott mintavételi- és tárolási módszerek alkalmasságát vizsgálja a fehérjék, nukleinsavak, gének megőrzésének szempontjából, Quantitative Real-Time PCR technikát alkalmazva az RNS vizsgálatára. A CBTB működése alapot teremthet többek között a már validált mintavételi eljárások továbbfejlesztéséhez, és az e módszereket alkalmazva kinyert minták széleskörű vizsgálatán keresztül az öregedés során a szervezetben megjelenő biomarkerek kutatásához (így például a kutyák kognitív diszfunkciós szindrómájának – Canine Cognitive Dysfunction, CCD – tanulmányozásához), és további, diagnosztikában is alkalmazható módszerek fejlesztéséhez. Az Agybank célja a fentiekén kívül egy olyan hazai és nemzetközi körökben is elismert gyűjtemény kialakítása, amely jó minőségű és széleskörű mintákkal segítené a kutatók munkáját, ezáltal előremozdítva a biológiai, klinikai és az állatorvos-tudomány fejlődését szolgáló kutatásokat.

2. Irodalmi áttekintés

A humán agybankok története egészen a XIX. századba vezet vissza, amikor az első igazi, tudományos célokat szolgáló agybankot létrehozták. Az alapító yorkshire-i patológus, W. Lloyd Andriezen végezte a gliasejteket érintő első részletes kutatások egyikét (Jarret, 2013). Azóta világszerte jöttek létre agybankok, amelyek az idegtudományi kutatásokat szolgálva járulnak hozzá a gyulladásos, pszichiátriai, fejlődésbeli és neurodegeneratív betegségek mélyebb megismeréséhez. Az Alzforum adatai alapján jelenleg megközelítőleg 115 idegtudományi kutatáshoz agyszövetet szolgáltató intézmény működik a világon. Ebből az amerikai kontinensen 53, Európában 25, Ausztráliában 3, ezenkívül Indiában, Kínában, Japánban, Új-Zélandon és Afrikában is található 1-1 agybank (AlzForum, 2018).

Az agybankok fókuszában a gyulladásos (pl. szklerózis multiplex, HIV fertőzés) és pszichiátriai (skizofrénia, depresszió) betegségeken túlmenően az egyre öregedő népességet fokozottan érintő, gyógyíthatatlan neurodegeneratív betegségek állnak, ide sorolva a különböző demenciákat, az Alzheimer kórt, a Parkinson kórt, a Huntington kórt, a Creutzfeldt-Jacob szindrómát illetve a motoros neuron betegségeket (BrainNet Europe, 2018a). A neurodegeneratív esetek legnagyobb részét a demenciás kórképek teszik ki, ennek is 60-70%-ában az Alzheimer-kór (Medical Research Council, 2018). Az Alzheimer-kór a 65 éves korosztály 2-3%-ban jelentkezik tünetek formájában, míg a 85 éves korosztály már 25-50%-a mutat klinikai tüneteket (BrainNet Europe, 2018b). Az Alzheimer-kór tünetei lappangva, gyakran hónapok, évek alatt kifejlődve, egyre romló kognitív képességek formájában jelentkeznek. A lassan progrediáló tünetek hátterében olyan patológiás elváltozások állnak, amelyek már jóval a viselkedésváltozások fizikai megjelenése előtt kialakulnak az agyban. Tehát a kognitív hanyatlásnak viselkedészavarokban történő megnyilvánulása alapján hozott diagnózis már egy olyan előrehaladott állapotot jelez, amely a terápiás beavatkozások során kevés eséllyel mutat javulást. Az agykutatások célja olyan biomarkerek meghatározása, amelyek a betegség korai stádiumában is alkalmazhatóak a diagnózis felállítására, illetve a megelőzést és a már kialakult betegség kezelését célzó módszerek hatékonyságának a nyomon követésére (Landsberg et al., 2012). Ezenkívül a gyakorlatban eredményesen alkalmazható terápiás szerek, protokollok is a kutatások részét képezik.

Az idegrendszer fejlődési rendellenességén alapuló betegség, az autizmus, a népesség körülbelül 1-2%-át érinti (Harrington et Bora, 2018). Az Egyesült Államokban a 2000-2002-es adatokhoz képest 2010-2012-re több, mint duplájára nőtt a betegség prevalenciája a 8 éves gyermekek között (Baio et al., 2018; Harrington et Bora, 2018). A betegség a szociális interakciók zavarában, kommunikációs deficitek és sztereotíp viselkedésformák alakjában jelentkezik (Krakowiak et al., 2012). A legkorábbi jelek 18-24 hónapos kor környékén vehetőek észre. A gyermek beszédképességének fejletlensége, kommunikációs és kognitív képességének zavarai lehetnek az első betegségre utaló jelek (Harrington et Allen, 2014). Bár az autizmus etiológiája a mai napig kutatás tárgyát képezi, genetikai vizsgálatok arra mutatnak, hogy a genetikai kód és a környezeti faktorok együttműködve alakítják ki a betegséget (Harrington et Bora, 2018). A diagnózis felállítása a klinikai megjelenésen alapul, azonban egyre több információt nyújtanak a betegség patogeneziséről az agy képalkotó eljárásokkal történő és postmortem vizsgálata is (Harrington et Bora, 2018).

Az Alzheimer-kór és az autizmus példáján keresztül bemutatva az egyre bővülő tudás az agyban folyó biokémiai és metabolikus folyamatokról és a különböző betegségek genetikai alapjairól világossá teszi a kutatók fokozott igényét a jó minőségű és megfelelően konzervált központi idegrendszeri szövetek iránt (BrainNet Europe, 2018a). Az agybankok a különböző degeneratív, gyulladásos és pszichiátriai betegségek által érintett és egészségesen öregedő, kontroll központi idegrendszeri szöveteket gyűjtenek a hozzájuk tartozó klinikai és demográfiai adatokkal együtt, megfelelő donorprogramokon keresztül, amelyeket online adatbázisokon keresztül kérvényezhetnek a kutatók (AlzForum, 2018).

A donorprogramok a világ minden területén szigorú jogi- és etikai szabályozás mellett működnek. A magyarországi törvénykezés (Eütv. 222. § (2)) lehetővé teszi, hogy a donor, vagy halála után annak hozzátartozója felajánlhassa testét kutatási célokra. Ezek alapján például a Semmelweis Egyetemen működő Humán Agyszövet Bank és Laboratórium számára érkező felajánlásokat a „Felajánló nyilatkozat holttest anatómiai oktatás és kutatás céljából történő felhasználásához” illetve a „Hozzátartozói beleegyező nyilatkozat holttest anatómiai oktatás és kutatás céljából történő felhasználáshoz” c. formanyomtatványok kitöltésével tehetik meg a donorok, vagy haláluk után a hozzátartozóik (Human Brain Tissue Bank, 2018; Semmelweis Egyetem, 2018).

Az egyes agybankok ugyan különböző protokollok szerint dolgozzák fel a szöveteket, ám az alap eljárások, tartósítási és tárolási módok tekintetében nagy hasonlóságot mutatnak (BrainNet Europe, 2018c; NeuroBioBank, 2018). Az agyszöveten kívül gyakran sor kerül liquor, vér és egyéb szervrendszer mintavételezésére is. A humán szövetek potenciális kockázatot jelentenek a velük dolgozók egészségére, ezért a mintavétel előtt vért vesznek szerológiai vizsgálatokra a fertőző ágensek (HIV-1/2, Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C) jelenlétének kizárására, valamint a levett vérből toxikológiai vizsgálatokat is végeznek (pl. nikotin, alkohol, tiltott drogok, gyógyszerészeti készítmények stb. ellenőrzésére). Az agykoponyából való kivétele után az agyat először makroszkóposan vizsgálják meg, majd két féltekére választják. Az egyik oldali féltekét rendszerint frissen dolgozzák fel, a másikat pedig formalinban fixálják. A frissen feldolgozott agyfélből előre meghatározott területekről, célzottan vesznek mintákat. Az így keletkezett blokkokat ezután azonnal fagyasztják, és felcímkézve, fagyasztva tárolják. A formalinnal fixált féltekét a fixálás után szeletelik. Ezek után kerül sor a neuropatológiai vizsgálatokra, ennek segítségével pedig a neuropatológiai jelentés elkészítésére és a diagnózis felállítására. Ezen eredményekkel együtt lesznek az elkészült minták elérhetők a kutatók számára, és válnak alkalmassá molekuláris biológiai (western-blot, ELISA, PCR, RNS-szekvenálás, DNS-szekvenálás), szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok végzésére.

Számos tényező, köztük perimortem események és post mortem faktorok befolyásolják a minták minőségét és ezáltal a belőlük nyert eredmények pontosságát. Postmortem faktorok közé tartozik a halál beállta és a szövetek feldolgozása között eltelt idő, a minták fixálására használt módszerek valamint a minták tárolásának hossza. Perimortem események például az agóniás állapot hossza és az ezzel összefüggésben jelentkező hypoxia, valamint egyes előzetes ischaemiás folyamatok. A minták minőségének ellenőrzésére több módszer alkalmazható. A perimortem események nagyban befolyásolják a szöveti pH-t, ez többek között elektródák segítségével mérhető. A halál beállta után megkezdődő autolízis is befolyásolja a kinyert minták minőségét, ezért a minták feldolgozását a lehető leghamarabb javasolt megkezdeni, de legkésőbb 24 órán belül. A főleg postmortem faktorok által befolyásolt RNS minőség mérésének eredményei is használhatók a szövetek állapotának felbecsülésére. Az említett befolyásoló tényezők optimalizálása és a folyamatos minőség-ellenőrzés által garantálható a szövetminták lehető legjobb minősége a kutatók számára (Ravid et Park, 2014; Vonsattel et al., 2008).

A világ különböző területein elhelyezkedő agybankok összehangolt tevékenysége biztosítja a kutatók igényeinek lehető legjobb kiszolgálását. Az Európában, Amerikában és Ausztráliában is több agybank között fennálló nemzetközi kapcsolatok célja az egyre bővülő, tudományos ismeretek gyorsabb és egyszerűbb terjedésének biztosítása az agybankok között, illetve a szövetek feldolgozásának és tárolásának egységesítésén keresztül a lehető legjobb minőségű minták biztosítása a kutatók és a kutatók számára. Az együttműködések révén növekszik az egyes betegségcsoportokon belüli eset-, és következőképpen a kérvényezhető mintaszám.

Az európai agybankokat összekötő szervezet, a BrainNet Europe 19 európai agybank működésének összehangolására jött létre (BrainNet Europe, 2018a). A kapcsolatban résztvevő országok intézményei más és más területekre specializálódva gyűjtenek központi idegrendszeri szöveteket. A szervezetnek a tagok számára kidolgozott irányelvei vannak az összes mozzanatra az agy feldolgozása során, az agy agykoponyából való kiemelésétől kezdve az agy morfológiai és makroszkópos vizsgálatán át az agy- és más szövetekből történő mintavételéig és a kinyert minták tárolásáig. Általános elv, hogy a halál beállta és a szövetek feldolgozása között eltelt idő nem lehet több mint 24 óra. A morfológiai vizsgálatok során először megméri az agy súlyát, majd alaposan megvizsgálják kívülről, mindent fotódokumentálva. A nagyagyról ezután leválasztják a kisagyat és az agytörzset, majd ezek súlyát is feljegyzik. Ha a halál beállta után eltelt idő több, mint 72 óra, akkor az agyat a bazális artériákon keresztül feltöltik 10 %-os pufferezt formalinos sóoldattal legalább egy hónapra. Felnőtt kontroll donor esetében következő lépésként a két agyféltekét elválasztják egymástól, az egyik felet 10%-os pufferezt formalinos sóoldatba helyezés után, míg a másikat frissen 1 cm-es koronális szeletekre vágják. A nagyagyhoz hasonlóan a kisagyat és az agytörzset is kettévágják, majd egyik oldalát frissen, másikat formalinos fixálás után vágják 5 mm-es szeletekre. A frissen felszeletelt nagyagy-, kisagy- és agytörzsféle azonnal rézlapokon fagyasztják, légmentesen záródó, jelöléssel ellátott műanyag zacskókba teszik, majd -70°C-os fagyasztóba helyezik.

A szövetek további vizsgálata nagyban függ az adott szöveten vizsgált betegség típusától. A BrainNet Europe külön protokollokat dolgozott ki a demencia (Alzheimer-kór, Lewy-testes demencia), a pszichiátriai- (depresszió, skizofrénia), a motorosneuron- és a neurodegeneratív betegségek (Parkinson-kór, progresszív szupranukleáris bénulás, sztereotíp mozgászavarok, multiszipstémás atrofia) diagnosztikai vizsgálatához, a betegség stádiumának meghatározására. A betegség típusától függ, hogy mely agyterületekről

értelmes mintát venni, majd a kinyert mintákat hogyan készítik elő, és végül milyen módszerekkel vizsgálják tovább. Az így felállított pontos diagnózist és az agynak a feldolgozása során feljegyzett minden fontos paraméterét szükség szerint a kérvényezett mintákkal együtt elérhetővé teszik a kutatók számára.

A különböző demenciák diagnosztikai vizsgálatára a fixált, majd felszeletelt agyból, vagy agyféltekéből különböző blokkok kerülnek kivételre a CERAD kritériumoknak megfelelően (Fillenbaum et al., 2008) és archiválás céljából. Az összes blokkot azonos oldali agyféltekéből veszik, és ahol csak lehetséges, a minták a sulcus teljes mélységében kerülnek kivételre. A blokkokból készült 7 és 14 μm -es metszeteken szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatokat végeznek hematoxin-eozinnal illetve módosított Bielschowsky-féle eljárással festve. Utóbbi eljárás a módosított Bielschowsky festékkel és β -amyloid, ubiquitin, tau protein és páros helikális szálak (PHFs) detektálására használt antitestekkel sikeres immunhisztokémiai módszer az Alzheimer-kór kutatásában (Suenaga et al., 1990).

Pszichiátriai betegségek (depresszió, skizofrénia) vizsgálatára a friss agy két féltekére történő vágása után előre meghatározott Brodmann-területekről történik a mintavétel. Ezt követően további minták kerülnek kiemelésre a corpus callosum, thalamus, nucleus caudatus, putamen, globus pallidus, capsula interna, hippocampus, nucleus accumbens területéről. Végül az agytörzsi- és a kisagyi területekről történik mintavétel, a híd, nyúltagy, gerincvelő, a kisagy vermisének meghatározott területeiről és a nucleus dentatus-ból. Minden területről három mintát vesznek, ebből kettő fagyasztásra kerül, egyet pedig formalinnal fixálnak, majd paraffinba ágyaznak. Szükség van még továbbá egy-egy mintára a hasúri zsírszövetből, májból, a quadriceps és a psoas izmokból, valamint liquor és vérmintára. A zsír-, máj- és izommintákat metabolikus folyamatok feltérképezésére, míg a vérmintát genetikai analízisre használják fel.

Motorosneuron betegségek esetében akár frissen, akár már fixált állapotban történik a szeletelés és a mintavétel, azt megelőzően a cerebrum precentrális gyrusát megfestik, hogy később a motoros cortex azonosítása könnyebb legyen. Az agy mélyfagyasztásra szánt felét 1 cm-es, a fixált felét 5 mm-es szeletekre vágják, majd a formalinnal fixált félének előre meghatározott, illetve kisagyi-, agytörzsi- és gerincvelői területekről is mintát vesznek. Szükség van továbbá mintára a bulbus olfactoriusból, különböző ganglionokból, idegekből és izmokból is. A mintákból készült metszeteket ezután szövettani- és immunhisztokémiai módszerekkel vizsgálják.

A Kutya Agy- és Szövetbank létrehozása során meglátogattuk a Semmelweis Egyetemen működő Humán Agyszövet Bank és Laboratórium-ot (Human Brain and Tissue Bank, HBTB) is az általuk alkalmazott protokoll megismerésére. A HBTB általában havi egyszer tart mintavételezést. Az előre felszeletelt, szárazjégen fagyasztott agyszeletek hungarocell dobozban érkeznek a mintavétel helyszínére, ahol Dr. Palkovits Miklós micropunch–mikrodisszekciós technikával végzi a mintavételezést 260 különböző agyi régióból és magból (1. ábra). A technika lényege, hogy előre, precízen meghatározott, kicsi területeket, magvakat vágnak ki az egyes agyszeletekből, különböző méretű punch-tűk segítségével, amihez az előre kijelölt területeket lokálisan felmelegítik (Palkovits, 1973). A mikrodisszekciós technikával kiemelt punch-okat színkódos csövekbe helyezik, címkézik, és -80°C -on tárolják. A minták alkalmasak neurokémiai, neuroendokrinológiai, molekuláris biológiai, proteomikai valamint genomikai vizsgálatokra. A kiváló minőséget többek közt az is garantálja, hogy post mortem az agyszeletek fagyasztásáig eltelt idő 2 és 6 óra közé esik. A minták felhasználási területe sokféle, hazai és nemzetközi kutatók számára is igényelhető. Az agybank speciális gyűjteménnyel rendelkezik többek között Alzheimer-kóros, 85 év feletti és kontroll agyszöveti mintákból (Human Brain Tissue Bank, 2018).

1. ábra. Mintavételezés a Semmelweis Egyetem Humán Agyszövet Bank és Laboratóriumában



3. A Kutya Agy-és Szövetbank

3.1 A kezdeményezés háttere

A kutya szoros kapcsolata az emberrel és az emberi környezet, amelyben él, folyamatosan hatással vannak szociális viselkedésére, kognitív és problémamegoldó képességeire. A Csányi Vilmos, Miklósi Ádám és Topál József által 1994-ben alapított Családi Kutya Program célja a családi kutyák viselkedésének és a kutya-ember kapcsolat tanulmányozása, nem csupán etológiai módszerekkel, hanem genetikai és idegtudományi alapon is (Bunford et al., 2017). A kutatás nem pusztán a kutyák viselkedésének mélyebb megismerését szolgálja, hanem az emberrel való évezredes együttélés a kutyát – mint modellállatot – alkalmassá teszi az emberi szociális viselkedések, kognitív és problémamegoldó képességek evolúciójának a tanulmányozására is.

A Családi Kutya Program keretein belül jött létre 2016-ban a Szenior Családi Kutya Program (Senior Family Dog Project, SFDP). A SFDP létrejöttét az Európai Kutatási Tanács (European Research Council, ERC) fiatal kutatóknak szóló 2015-ös Starting Grant pályázata támogatta 1,2 millió euróval. A Szenior Családi Kutya Program családi kutyákon vizsgálja az öregedést és az öregedés során megjelenő kognitív hanyatlást. A kutatás nem korlátozódik csupán etológiai módszerekre (így viselkedéstesztokra vagy kérdőívek kitöltésére), hanem a folyamat genetikai és idegtudományi hátterét is számos módszerrel kutatják. Viselkedéstudományi vonalon többek között GPS-es nyomkövető technikával mérik fel a kutyák szociális interakcióinak megváltozását, érintőképernyő alkalmazásával pedig a kognitív- és viselkedésbeli mintázatukat vizsgálják (Wallis et al., 2017). Viselkedéstesztok segítségével többek között felmérték a projekt során, hogy az életkor előrehaladtával miként változik a kutyák érdeklődése, figyelmének fenntarthatósága különböző szociális- és nem szociális ingerek iránt. A kísérlet során a vizsgált három életkor szerinti csoport közül a legöregebb csoport teljesített a legrosszabbul, ők figyeltek a legrövidebb ideig a stimulusokra, és náluk tartott a leghosszabb ideig a szemkontaktus felvétele a figyelem-teszt során, ezen kívül a rendszeresen tréningezett kutyák teljesítménye jobbnak bizonyult (Chapagain et al., 2017). Az SFDP célja kialakítani egy olyan protokollt, amely előzetes betanítás nélkül, gyorsan, akár állatorvos által klinikai körülmények között is elvégezhető, és képes lehet a kutyák kognitív képességeiben bekövetkezett változások felmérésére (Piotti et al., 2017). A Szenior Családi Kutya Program széles körben terjesztett kérdőívek segítségével is igyekszik felmérni az idősödő kutyák viselkedésében fellépő anomáliákat a

gazdáik közreműködésével (Wallis et al., 2018). Nem invazív idegtudományi módszereket alkalmazva, így elektroencefalográffal (EEG) spontán alvó, és funkcionális MRI (fMRI) vizsgálatokkal mozdulatlan fekvésre képzett, éber kutyákon megfigyelhető akár az agy egészének aktivitási mintázata. Alvás közben a koponyára helyezett elektródákkal már a tanulás és az alvás kapcsolatát is tanulmányozták (Kis et al., 2017), valamint, fMRI vizsgálatokkal az agyban bizonyos külső ingerek hatására bekövetkezett helyi aktivitásváltozásokat mérték fel (Andics et Miklósi, 2018). Molekuláris-genetikai vonalon a vizsgált kutyáktól szőr, nyál, vér, vizelet és bélsármintát is gyűjtenek, melyek alkalmasak lehetnek különböző metabolikus folyamatok nyomon követésére, illetve fehérje, RNS és DNS izolálására, valamint az öregedéshez kapcsolt markerek feltérképezésére. Ezenkívül extrém idős, „matuzsálem” kutyák teljes genomjában keresnek olyan polimorfizmusokat illetve mutációkat, amelyek asszociálhatnak a hosszú életkorral.

A fent felsorolt módszerek mind nem-invazív eljárások, melyek lehetővé teszik, hogy a kutatás során laboratóriumi kutyák helyett családi környezetben élő kutyákon vizsgálják az öregedést. Ez nem csak etikai szempontból előnyös, hanem azért is, mert a laboratóriumi körülmények között tartott kutyák nem mutatnak olyan szociális viselkedési formákat, és nem kötődnek olyan erősen az emberhez, mint a társállatként tartott társaik, így viselkedésük sem reprezentatív a családi kutyákra nézve (Halmágyi, 2010). Ezenkívül a laboratóriumi körülmények között nevelt kutyák életének végigkövetése idős korukig sokkal kevésbé lenne kivitelezhető a jelenleg zajló kutatás során. Családi kutyák alkalmazásakor viszont nagyon sokféle környezeti háttérrel is figyelembe kell venni az egyes kutatási eredmények elemzésekor, hiszen a génkifejeződés- és működést nagyban befolyásolják a környezeti faktorok, tartási körülmények és szokások. Ezért nagyon nagyszámú minta kell ahhoz, hogy reprezentatív eredmények születhessenek.

Az eddig alkalmazott eljárások (viselkedésteszték, kérdőívek, szenzorok, képalkotó-eszközök, vérből és nyálból nyert DNS vizsgálatok) mind közvetett eredményeket nyújtanak az agyi funkciókról, így a patofiziológiai háttérrel tekintve nem informatívak az öregedés során zajló folyamatokkal kapcsolatban. Számos elmélet létezik az öregedés genetikai és molekuláris hátterét illetően (Sergieiev et al., 2015), az SFDP kutatóit jelenleg foglalkoztató autofágia (Vellai et al., 2009) öregedésben betöltött szerepének valamint a retrotranszpozon-elmélet (Sturm et al., 2015) mélyebb vizsgálatához viszont közvetlenül kell magát az agyat (és az érintett szervrendszereket) vizsgálni, tehát a benne zajló folyamatokat makroszkópikus, mikroszkópikus és molekuláris-genetikai módszerekkel is elemezni kell.

A fent felsorolt célok elérése érdekében jött létre a SFDP keretein belül 2017-ben a Kutya Agy-és Szövetbank (CBTB), melynek segítségével olyan jó minőségű mintákhoz juthatnak a kutatók, amelyek alkalmasak az említett kutatások sikeres elvégzésére.

3.2 A Kutya Agy- és Szövetbank működése

Az Agybank létrehozásánál több szempontot is figyelembe kellett venni, úgymint:

- jogszabályi környezetnek való megfeleltetés (állatvédelmi és állategészségügyi szabályok betartása)
- intézményi megfeleltetés és logisztika biztosítása (szállítás, mintavételi helyszín, minta- és tetemtárolási lehetőségek)
- hatékony és egyértelmű kommunikáció az állattartói és állatorvosi közösség irányában (a felajánlási lehetőség ismertetése, gyakori kérdések, médiaszereplések)

3.2.1. Jogszabályi háttér

Állategészségügyi vonatkozások: A korrekt működéshez elsődleges szempont volt a magyarországi jogszabályi rendszernek való megfelelés. Mivel az Agybank a mintavételezést és a kapcsolódó vizsgálatokat az intézmény részére felajánlotta, egyéb állategészségügyi okok miatt elaltatott állatok teteméből végzi, ezért az 1998. évi XXVIII. törvény ("Az állatok védelméről és kíméletéről") szerint a tevékenysége nem minősül állatkísérletnek. Ezt az Állatorvostudományi Egyetem Állattenyésztési, Takarmányozási és Laborállat-tudományi Tanszékének Laborállat-tudományi és Állatvédelmi Osztályának illetékes vezetője is megerősítette. Meg kell említeni, hogy az emberi szövetek felhasználását európai uniós irányelv szabályozza ("Az Európai Parlament és a Tanács 2004/23/EK irányelve az emberi szövetek és sejtek adományozására, gyűjtésére, vizsgálatára, feldolgozására, megőrzésére, tárolására és elosztására vonatkozó minőségi és biztonsági előírások megállapításáról"), ez a szabályozás viszont nem terjed ki az állati szövetek ilyen irányú gyűjtésére. Így a hatályos jogszabályok szerint, amennyiben a biológiai minták tárolása a humán- és az állategészségügyi irányelveknek megfelelően történik, hasonló egység szabadon létrehozható állatoknál. Az Agybank csak olyan kutyák tetemét fogadja, amelyek állategészségügyi okokból (azaz nem a felajánlás miatt) és állatorvos közreműködésével lettek véglegesen elaltatva, így az állategészségügyi törvény (2005. évi CLXXVI. törvény az állategészségügyről) szerint való eljárás biztosítása és az állategészségügyi igazolás kiállítása az eutanáziában közreműködő állatorvos feladata.

Szállítási vonatkozások: Ahhoz, hogy minél rövidebb post mortem idővel érkezzenek az Agybankba a felajánlások, külön engedélyt kellett kérni a hatóságtól a tetemek szállítására. Az engedélyt a NÉBIH (Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal) adja ki az Európai Parlament és a Tanács 1069/2009/EK rendeletének (“A nem emberi fogyasztásra szánt állati melléktermékekre és a belőlük származó termékekre vonatkozó egészségügyi szabályok megállapításáról és az 1774/2002/EK rendelet hatályon kívül helyezéséről”) 5. pontja szerint. A NÉBIH-tól kért állásfoglalás értelmében a tetemszállításhoz külön engedélyeztetni kellett a befogadó intézményt és a tanszéket (Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológiai Intézet, Etológia Tanszék), a szállításra használt gépjárműveket és a szállítást végző személyeket is. A tetemszállításban résztvevők számára a szállítási engedélyeket a fent említett 1069/2009/EK rendelet, valamint a 97/78/EK tanácsi irányelvnek az egyes minták és tételek határon történő állat-egészségügyi ellenőrzése alóli, az irányelv szerint mentesítése tekintetében történő végrehajtásáról szóló 142/2011/EUR rendeletének 17. cikke és a VIII. melléklet I. fejezete alapján adták meg. A szállítást végző személynek az engedélyében szereplő kitételeken túl minden szállítás alkalmával ki kell töltenie a „Kereskedelmi okmány állati melléktermékek és származtatott termékek Magyarországon belül történő szállításához” című formanyomtatványt is igazolásként, illetve a tanszéknek éves beszámolási kötelezettsége van a szállításokról.

3.2.2. Intézményi megfeleltetés


A intézményen belüli engedélyeztetés egyrészt az ELTE jogászain keresztül történt meg (az 1998. évi XXVIII. törvény az állatok védelméről és kíméletéről, a 41/2010. kormányrendelet a kedvtelésből tartott állatok tartásáról és forgalmazásáról, valamint a 40/2013. kormányrendelet az állatkísérletekről rendelkezései alapján), ezen kívül helyszíni bejárást és ismertetést követően az ELTE Biológiai Intézet Állatházának vezetője is jóváhagyta az Agybank mintavételezési és mintatárolási módszereit. Lényeges, hogy a tetemek épületen belül történő szállítása az egyéb személyforgalomtól elkülönülten, külön tetemlifttel történik. A boncolásra és mintavételezésre az Állatház egy elzárt, erre a célra kialakított bonctermében kerül sor, a tetemek ezt követő átmeneti tárolására pedig külön tetemtároló egység szolgál. A tetemek elszállítása hivatalos tetemszállító szolgáltatás igénybevételével történik, a megsemmisítésre vagy egyedi hamvasztásra átadott tetemekről pedig külön átvételi nyilatkozat kerül kitöltésre, amint azok elhagyják az intézmény területét.

3.2.3. Kommunikáció és felajánlás


A fentebb részletezett keretek között működő Agybank működéséről és az állatok ilyen célú felajánlásáról a tulajdonosok többféle fórumon tájékozódhatnak. Az Agybank igyekszik minél szélesebb körű médiamegjelenéssel megismertetni a céljait az állattartó közösséggel. Számos nyomtatott és online sajtómegjelenése volt már, illetve a projektben résztvevők több televíziós műsorban és rádióadásban is szerepeltek. A Kutya Agy- és Szövetbank számára a csoport létrehozott egy olyan külön weboldalt is, ahol röviden és közérthetően magyarázzák el a felajánlással kapcsolatos főbb tudnivalókat, valamint választ adnak a leggyakrabban felmerülő kérdésekre is (ELTE, 2018). Az Agybank több rendelővel közvetlenül is felvette a kapcsolatot, így az ott dolgozó állatorvosok már ismerik azt a protokollt, amit követniük kell, ha egy tulajdonos felajánlási szándékkal keresi fel őket a végleges elaltatás kapcsán. A felajánlási igényt az állattartó akár hetekkel a tervezett elaltatás előtt is megfogalmazhatja egy erre szolgáló online űrlap (Felajánlási szándéknyilatkozat) kitöltésével, ezzel segítve az Agybanknak abban, hogy az eutanázia napján a tetemszállítók és a mintavételt végző csapat koordinálásával felkészülten várhassa a felajánlást.

A felajánláshoz minden esetben kötelezően kapcsolódik az online és offline is elérhető Felajánlási nyilatkozat (2. ábra) kitöltése, melyen mind az állat tulajdonosa, mind az eutanáziában részt vevő állatorvos tudomásul veszi és engedélyezi (utóbbi a szükséges állategészségügyi kitételeket is igazolva) a felajánlásra kerülő tetem további vizsgálatokban való részvételét. Fontos leszögezni, hogy a felajánlás mindkét fél részéről anyagi ellenszolgáltatás nélkül történik. Alapértelmezett esetben a tetemek hamvasztásáról az Agybank gondoskodik saját költségen, amennyiben viszont az állat tulajdonosa egyedi urnás hamvasztást kér, ez esetben ki kell töltenie egy Hamvasztási nyilatkozatot (3. ábra), és a hamvasztással járó költségeket neki kell állnia a szolgáltatást végző cég irányában. A fent részletezettek során, vagy közvetlen az eutanázia után az állatorvos értesíti az Agybankot a felajánlásról (ehhez készült egy külön útmutató segédlet is a résztvevő állatorvosok számára). Fontos, hogy egy felajánlás csak akkor kerül elfogadásra, ha annak sem az állatorvos, sem a tulajdonos részéről nincs akadálya, a nyilatkozato(ka)t hiánytalanul kitöltötték, illetve az Agybank is fogadni tudja aznap a felajánlott tetemet.

2. ábra. A Kutya Agy- és Szövetbank hivatalos Felajánló nyilatkozata

	<div style="text-align: right;">Iktatási szám:</div> <div style="text-align: center; margin: 10px 0;"> Felajánló nyilatkozat - kutya holttestének felajánlásához - </div> <div style="margin-bottom: 10px;"> Alulírott (a továbbiakban: Felajánló) </div> <p>jelen nyilatkozatomban kijelentem, hogy felajánlom kutyám testét annak halála után az ELTE TTK Etológia Tanszéke részére (Budapest 1117, Pázmány Péter sétány 1/C, a továbbiakban: Tanszék). Felajánlásom önkéntes és anyagi ellenszolgáltatás nélküli, célja a tudományos kutatás, különösen az állatorvos-tudomány és az etológia fejlődésének támogatása, az oktatás és gyógyítás segítése.</p> <p>Kijelentem, hogy az alábbi állat felett tulajdonosi és/vagy rendelkezési jogom van:</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>o A kutya neve:</p> <p>o Neme: <input type="checkbox"/> szuka <input type="checkbox"/> kan</p> <p>o Születési ideje:</p> <p>o Mikrochip száma: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/></p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>o Fajtája:</p> <p>o Ivartalanított-e: <input type="checkbox"/> igen <input type="checkbox"/> nem</p> <p>o Becsült-e a születési dátum? <input type="checkbox"/> igen <input type="checkbox"/> nem</p> </div> </div> <p>Nyilatkozatommal hozzájárulok, hogy a Tanszék a fenti célokkal összhangban rendelkezzen az átvett tetemmel, illetve mintákat vegyen egyes szövetekből, azokat megőrizze, kutatási, oktatási vagy gyógyítási célból felhasználja. Tudomásul veszem, hogy a mintavételt követően a Tanszék a tetemet az állategészségügyi előírásoknak megfelelően elszállíttatja, így a tetem visszakérésére nincsen lehetőség, kivéve a saját költségű egyedi hamvasztás igénylésekor.</p> <p><u>Kapcsolatfelvételi nyilatkozat:</u></p> <p><input type="checkbox"/> Igen, hozzájárulok, hogy amennyiben szükséges, a Tanszék munkatársai felvehessék velem a kapcsolatot azzal a céllal, hogy kérdéseket tegyenek fel a kutyám viselkedéséről, szokásairól és az állatorvosi kórelőzményekről.</p> <p style="margin-left: 40px;">email-cím: telefonszám:</p> <p><input type="checkbox"/> A későbbi kapcsolatfelvételhez nem járulok hozzá, de a kutyámra vonatkozó online kérdőívet kitöltöm.</p> <p><input type="checkbox"/> Nem járulok hozzá a kapcsolatfelvételhez, és nem kívánom kitölteni a kérdőívet.</p> <p>A felajánló nyilatkozatot és a mellékelt tájékoztatót elolvastam, a bennük foglaltakat megértettem és elfogadom.</p> <p>Kelt, év hó nap.</p> <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"> Felajánló aláírása </div>
Az állatorvos tölti ki*	<div style="margin-bottom: 10px;"> Alulírott (pecsétszám:) igazolom, hogy a fenti adatokkal rendelkező elaltatott állat nem szenvedett fertőző betegségben, vagy nem állt fenn annak megalapozott gyanúja, rendelkezett veszettség elleni oltással, az elmúlt 14 naptári napon belül nem mart meg embert, az eutanáziának állatorvosilag indokolt, jelen felajánlástól független egészségügyi oka volt, a nyilatkozatban rögzített céloknak megfelelő felajánlásnak állategészségügyi akadálya nincs. </div> <div style="margin-bottom: 10px;"> <p>o A bódításhoz használt szerek:</p> <p>o Az eutanáziához használt szerek:</p> <p>o A halál időpontja: (óra) (perc)</p> <p>o A felajánláshoz szükséges kórelőzményi adatokról felvilágosítást adok a Tanszéknek: <input type="checkbox"/> igen <input type="checkbox"/> nem</p> </div> <p>A Felajánló döntésének értelmében gondoskodom arról, hogy a Tanszék értesítése legkésőbb az eutanáziát követő 15 percen belül megtörténjen. Tudomásul veszem, hogy amennyiben az értesítés későn történne meg, vagy az elszállítás nem lenne biztosított adott időn belül a rendelőből, akkor a Tanszék a felajánlásról lemondhat. Az elszállítás díjmentesen történik.</p> <p>Kelt, év hó nap.</p> <div style="margin-top: 10px;"> Ez az okmány három példányban készül, és a következők kapják: 1. példány: Tanszék, 2. példány: Felajánló, 3. példány: Állatorvos </div> <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"> Állatorvos aláírása és pecsétje </div>

3. ábra. A Kutya Agy- és Szövetbank hivatalos Hamvasztási nyilatkozata



Iktatási szám:

Hamvasztási nyilatkozat
- kutya holttestének egyedi urnás hamvasztásához -

Az állat tulajdonosa tölti ki*

Alulírott (a továbbiakban: Felajánló)
jelen nyilatkozatomban megbízom az ELTE TTK Etológia Tanszékét (Budapest 1117, Pázmány Péter sétány 1/C, a továbbiakban: Tanszék), hogy az alábbiakban leírtaknak megfelelően gondoskodjanak a Tanszék részére felajánlott kutyám tetemének egyedi hamvasztásának megszervezéséről.

A Felajánló az alábbi kutya egyedi hamvasztását kéri:

o A kutya neve:
o Neme: ☐ szuka ☐ kan
o Születési ideje:
o Mikrochip száma:

o Fajtája:
o Ivartalanított-e: ☐ igen ☐ nem
o Becsült-e a születési dátum? ☐ igen ☐ nem

A Felajánló adatai* (az értesítéshez és adott esetben a hamvak házhoz szállításához):

lakcím:
email-cím:
telefonszám:

* Az azonosításra alkalmas adatokat a Tanszék a vonatkozó adatvédelmi törvény szigorú betartásával, bizalmasan kezeli, harmadik fél részére nem adja át, és a kutatási adatoktól elválasztva tárolja.

A hamvasztásra a Felajánló nyilatkozatban rögzítettek szerint, a mintavételt követően kerül sor, miután a Tanszék átadja a Felajánló által választott hamvasztó cégnek a tetemet. A hamvasztással járó költségeket a Felajánló állja.

Hamvasztási megbízás (kérjük, jelölje meg x-szel a kívánt opciót)

☐ Már kiválasztottam a hamvasztásra a céget, kérem a Tanszék, vegyék fel vele a kapcsolatot:
- cég neve:
- cég telefonszáma:

☐ Kérem a Tanszék, hogy ők gondoskodjanak a hamvasztó céggel való kapcsolatfelvételtől. Ez esetben elfogadom Vancsura Róbert kisállathamvasztási szolgáltatását (<http://tetemszallitasbudapest.com>)

A felmerülő költségeket a Felajánló közvetlenül a hamvasztást végző cégnek fizeti (a Felajánló döntésétől függően árajánlat is tőlük kérhető), a Tanszék nem kér és nem is fogad el semmilyen jellegű anyagi ellenszolgáltatást.

A nyilatkozatot elolvastam, a bennük foglaltakat megértettem és elfogadom.

Kelt , év hó nap.

.....
Felajánló aláírása

A hamvasztó tölti ki*

Alulírott , a hamvasztását végző cég képviselőjében kijelentem, hogy a fenti adatokkal rendelkező állat tetemét a mai napon egyedi hamvasztásra átvettem.

Kelt , év hó nap.

.....
aláírás

16

3.3. Mintavételezés


A felajánlás megtörténtét követően a szállító a tetemet az ELTE Biológia Intézetbe szállítja. A mintavételezés kidolgozott lépések és protokoll alapján történik (1. táblázat), melynek során fényképes és írásos dokumentáció történik a főbb lépésekről, valamint bármilyen felfedezett makroszkópos eltérésről. A boncolást és a minták kiemelését állatorvos végzi. A mintavétel során egy erre szolgáló úrlapon (4. ábra) rögzítésre kerülnek többek között:

- a mintavételezést végző és a jelenlévő személyek nevei;
- az állat alap paraméterei (pl. súly, testhossz, marmagasság);
- craniometriai- és agyi paraméterek (pl. súly, hossz, szélesség, magasság);
- idővonal a főbb fázisokról (eutanázia ideje, intézeti átvétel, boncolás kezdete, agy kivétele, boncolás vége, mintafeldolgozás vége, stb.);
- az egyes kivett minták egyedi adatai (pl.: jellege, súlya, fixálás ideje és közege stb.)

1. lépés: a szőr lenyírása a fejtetőről és a nyakról
2. lépés: a tetem hasi fektetésbe helyezése, a fej megemelése
3. lépés: középvonali metszés ejtése a fejbőrön a tarkótájéktól az orrhát közepéig
4. lépés: a bőr félrehajtása után a temporális izomzat félrehajtása a koponyatetőről
5. lépés: a nyakszirtesonton tapadó izmok leválasztása
6. lépés: rezgőfűrészes körkörös koponyanyitás a nyakszirti bütyköktől (condylus occipitalis) a halántékcsont pikkelyén (squama temporalis) át a rostalemezig (lamina cribrosa)
7. lépés: az agy intakt kiemelése a gerincvelő átvágásával az első gerincvelői idegek eredése mögött, az egyes agyvelői idegpárok és az agyhoz térő erek átvágásával, az agyalapi mirigy (hypophysis, glandula pituitaria) és a szaglóhagyma (bulbus olfactorius) megtartásával
8. lépés: a tetem háti fektetésbe helyezése a nyak ventrális megközelítéséhez
9. lépés: középvonali bőrmetszés a légcső, a gége és a nyelvcsont felett
10. lépés: a főbb izmok (m. sternohyoideus, m. sternothyreoideus, m. sternocephalicus), valamint a tájékon haladó erek és idegek félrehúzósa után a pajzsmirigy (glandula thyroidea), a garat mögötti nyirokcsomó (lymphonodus retropharyngeus medialis) és a nervus vagus ganglion distale-jának feltárása és mintavételezése
11. lépés: mintavétel cerebrálisan (gyrus compositus rostralis), cerebellumból (lobus ansiformis crus caudale) és az agytörzsből (regio pontina), trigeminális ganglionból, temporális izomzatból

1. táblázat. A boncolás főbb lépései a mintavételezés során

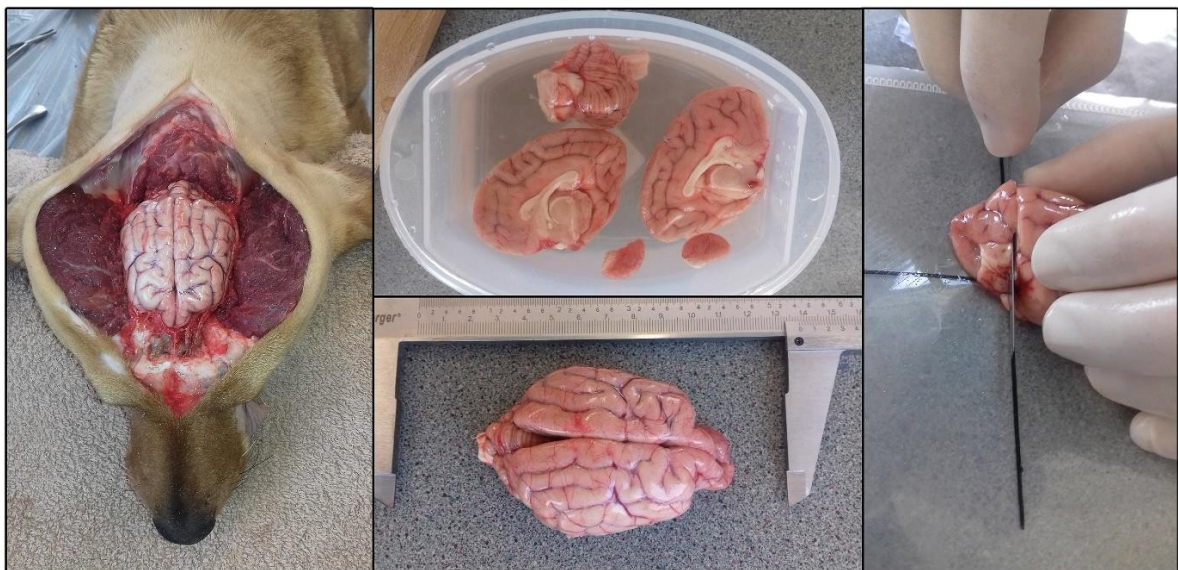
4. ábra. A Kutya Agy- és Szövetbank angol nyelvű mintavételi jegyzőkönyvének egy lapja (részlet)

Canine Brain and Tissue Bank Tissue Sampling Sheet												
CBTB Registration No.:												
												
CBTB Registration No.												
Transport form No.		A-										
Cremation request		yes				no						
Microchip No.												
<i>Main parameters of the dog</i>					<i>Staff during sampling</i>							
body weight (kg)					dissection performed by							
height at withers (cm)					samples processed by							
length of the body 1 (cm) <small>/shoulder-buttock distance/</small>					other participants:							
length of the body 2 (cm) <small>/withers-base of the tail distance/</small>												
<i>Parameters of the skull</i>					<i>Time of the main work phases (h:min)</i>							
skull length (mm)					time of euthanasia							
skull width (mm)					time of takeover							
neurocranial length (mm)					arrived to dissection room							
neurocranial width (mm)					initiate of head region							
					initiate of skull opening							
					removal of the brain							
					laryngeal region							
					dissection was ended							
					sample processing was ended							
<i>Parameters of the brain</i>					cleaning has been finished							
brain length (mm)												
brain width (mm)												
brain height (mm)												
brain weight (g)												
<i>Sample name</i>					<i>TOF 1</i>		<i>TOF 2</i>		<i>type of tube</i>		<i>other</i>	
buccal swab									plain			
hair									plain			
blood									EDTA			
liquor cerebrospinalis									plain			
Frozen samples:												
Photos taken: <input type="checkbox"/> dog <input type="checkbox"/> opened skull <input type="checkbox"/> brain <input type="checkbox"/> teeth												
<input type="checkbox"/> other:												
Remarks:												
<i>Sample name</i>		<i>ESM</i>	<i>ARL</i>	<i>tube</i>	<i>ASM (mg)</i>	<i>TOF (h:min)</i>	<i>ID</i>					
m. temporalis L		100 mg	1 ml									
m. temporalis R		100 mg	1 ml									
prefrontal cortex L		100 mg	1 ml									
prefrontal cortex R		100 mg	1 ml									

A minták feldolgozását a mintavétellel párhuzamosan több ember végzi, akik analitikai mérleg segítségével pontosan lemérik és adott esetben kellő méretre vágják a mintákat RNA-laterben való tároláshoz. A 4 órás post mortem időn belül vételezett mintákat RNA-laterbe helyezés után -80°C -on tárolják a jobb agyféllel együtt, míg a bal oldali agyfél 4%-os pufferolt formalin-oldatban kerül fixálásra 4°C -on. A 4 órás post mortem időn túl feldolgozott mintákat csak 4%-os pufferolt formalin-oldatban fixálják és tárolják szintén 4°C -on. A fixálás módszerének további finomítása jelenleg is folyamatban van: a cél egy olyan fixálási és feldolgozási módszer tökéletesítése, amely segítségével az agyat külön szeletekben vagy nagyobb régiókban lehet megőrizni és tárolni (így az újbóli mintavételhez elég csak egy-egy régiót lokálisan felmelegíteni). Ehhez tesztelésre került már többek között a friss, a formalinnal fixált, a friss agy agaróz gélbe ágyazott, valamint előre lehűtött és hűtés nélküli agyak szeletelése is. A mintavétel után a tetem átmenetileg -20°C -os fagyasztóba kerül, amíg a hivatalos tetemszállító el nem szállítja azt megsemmisítésre vagy egyedi hamvasztásra.

A teljes mintavételezési protokoll befejeződése után az iktatás fázis következik, amelynek során a dokumentumok megőrzésre kerülnek offline és online módon is. A felajánló- és hamvasztási nyilatkozat, a tetem szállítására vonatkozó iratok és a mintavételi jegyzőkönyv egy közös mappában kerülnek lefűzésre, emellett az előbbiekről készült beszkenelt dokumentumok a mintavételezés során készített fényképekkel (5. ábra) együtt számítógépre is feltöltésre kerülnek (merevlemezre és felhőbe egyaránt). A főbb adatokat a kutatók egy összefoglaló táblázatban is összesítik a gyors indexeléshez. A jövőre nézve a tervek között szerepel a jelenlegi iktatási módszer kereshető online adatbázissá fejlesztése.

5. ábra. Az agy kiemelésének, régiókra bontásának és szeletelésének főbb fázisai



4.1. Célkitűzések

Az Agybank működésével elsősorban a Szenior Családi Kutya Program kutatásai számára kíván olyan, kiváló minőségű, molekuláris vizsgálatokra, génexpressziós-mérésekre alkalmas mintákat szolgáltatni, amelyek például hematoxilin-eozinnal festve alkalmasak a morfológiai vizsgálatra is. Ezenkívül a mintáknak alkalmasnak kell lennie immunhisztokémiai módszerekkel különböző sejtfelületi fehérjék-, és egyéb markerek láthatóvá tételére. Továbbá olyan szövetekre is szükség van, amelyekben eredeti állapotában megőrződött és izolálható fehérje, RNS és DNS van, ezáltal molekuláris biológiai módszerekkel (western-blot, PCR, RNS-szekvenálás, DNS-szekvenálás) alkalmazhatók a sejtekben molekuláris és genetikai szinten zajló folyamatok tanulmányozására (retrotranszpozonok mozgása, autofágia, génexpresszió, mutációk a génállományban, stb.). A fenti feltételek teljesülése a szövetek minőségét befolyásoló összes tényező figyelembe vételével és optimalizálásával érhető el. Így az Agybank a lehető legrövidebb post mortem idővel dolgozik ideális mintavételezési körülmények között, az alkalmazott mintavételezési technikákat, a minták fixálására használt anyagokat és a tárolási körülményeket pedig úgy alakítja, hogy a kivett minták minősége a vizsgálati célnak a legjobban megfeleljen. Ennek ellenőrzésére, a humán agy- és szövetbankok tapasztalatai alapján, a kivett mintákból RNS izolálás és többlépcsős minőség-ellenőrzés történt, melyben a kutatókkal együtt részt vettem. Összefoglalva tehát a minőségellenőrzési (validálási) folyamat célja az volt, hogy konkrét képet adjon a kialakított mintavételezési és fixálási-tárolási protokoll eddigi alkalmazásának sikerességéről.

4.2. Anyag és módszertan

A validálási folyamathoz olyan szöveteket használtunk, amelyek 4 órás post mortem időn belül kerültek feldolgozásra. A mintavétel minden esetben a 3.3-as pontban részletezett mintavételezési eljárásnak megfelelően történt. A minőségellenőrzéshez a kutyák frontális kortexéből, kisagyából, agytörzséből (a híd területéről) és temporális izomzatából származó mintákat használtunk fel. Minden kivett minta pontosan lemért 100 mg-jához 1 ml RNAlater (Thermo Fisher) hozzáadása történt, majd ezután Eppendorf csövekben az RNS izolálásig fagyasztóba kerültek. Ezenkívül a kapott eredmények összehasonlítására teljesen friss, a mintavételezés után tartósítás nélkül azonnal vett mintákból izolált RNS-t használtunk.

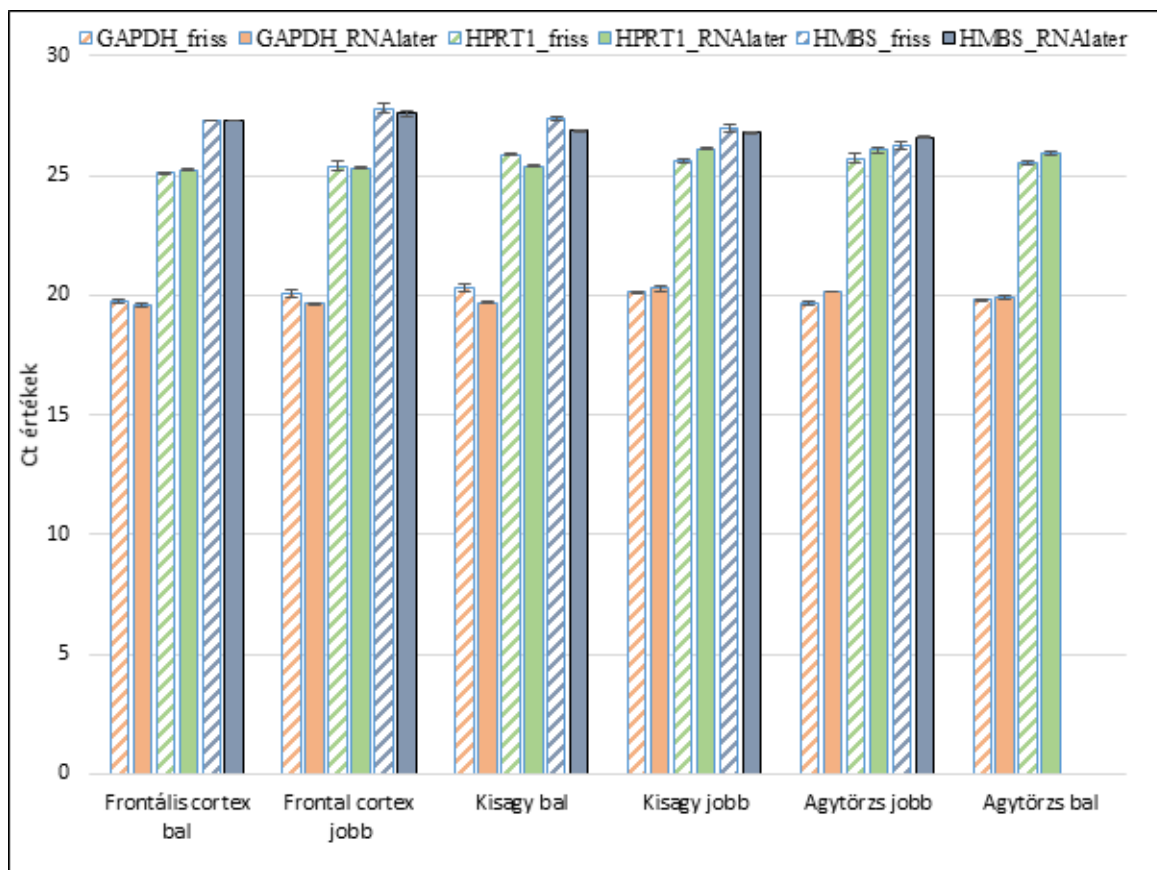
Két különböző mérés történt a minták minőségének ellenőrzésére. Az első mérés során azonos kutyából származó frissen izolált RNS-ek és RNAlater-ben fixált majd lefagyasztott mintából származó RNS-ek expressziójának összehasonlításával vizsgáltuk a kétféle minta RNS minőségét. Ehhez ugyanazon kutya frontális kortexéből, kisagyából és agytörzséből származó frissen illetve RNAlater-es tartósítás után vett mintában vizsgáltuk három háztartási gén (*GAPDH*, *HPRT1* és *HMBS*) expresszióját. A méréseket az agy jobb és bal oldaláról származó mintákon is elvégeztük, minden mintán háromszor. A másik mérés során öt állat frontális kortexéből, kisagyából, agytörzséből és temporális izomzatából származó RNAlaterben tárolt mintákat hasonlítottunk össze, minden állat esetében jobb és bal oldalról származó mintákat is. A mérés során a különböző állatok hasonló szöveteiben mért háztartási gének expressziójának a szintjét hasonlítottuk össze. Az RNS izolálás TRIzol (Thermo Fisher) használatával történt a gyártói előírásoknak megfelelően. Az izolált RNS koncentrációja és tisztasága NanoDrop készülékkel, minősége pedig agaróz gélelektroforézis alkalmazásával lett lemérve. Az izolált RNS-t ezután rövidtávra -20°C-on, hosszabb távra -80°C-on tároltuk el.

A génexpresszió meghatározása előtt minden izolált RNS-ből 1 µg cDNS-sé írása reverz transzkripcióval, RevertAid kit-tel (Thermo Fisher), random hexamer primereket használva történt. A cDNS a további analízist megelőzően tízszeresére hígítva, -20°C-on vagy hosszabb időre -80°C-on lett tárolva. Ezután az RNS minőségmérése TaqMan módszer (Thermo Fisher) alapján Quantitative Real-Time PCR-rel történt. A reakciók 10 µl végtérfogatba lettek összemérve. Minden reakció tartalmazott 5 µl 20x TaqMan Gene Expression Master Mix-et, 0,5 µl 2x TaqMan próbát a cél génekre tervezve, 2,5 µl templát cDNS-t és 2 µl nukleáz mentes vizet. Minden reakció háromszor lett elvégezve. A megbízható eredmények érdekében három stabilan kifejeződő referencia gént használtunk target génként: *GAPDH*, *HPRT1* és *HMBS* (Stassen et al., 2015), ehhez a kereskedelmi TaqMan próbákat (Thermo Fisher) alkalmaztuk.

4.3. Eredmények

A frissen izolált és az RNAlaterben fixált minták összehasonlításakor a kétféle mintából izolált RNS RT-qPCR-es mérése során a háztartási gének stabil génexpressziós szinteket mutattak, az RNAlater alkalmazása az eredmények alapján nem befolyásolta a minták minőségét. A 6. ábrán a Ct (Threshold Cycle) értékeket feltüntetve szerepelnek a kapott génexpressziós szintek a három agyterületre és a három háztartási génre lebontva. A diagramon az egyes minták többszöri lemérése alapján kapott szórás is szerepel.

6. ábra. Génexpressziós szintek összehasonlítása frissen izolált és RNAlaterben tárolt mintákban

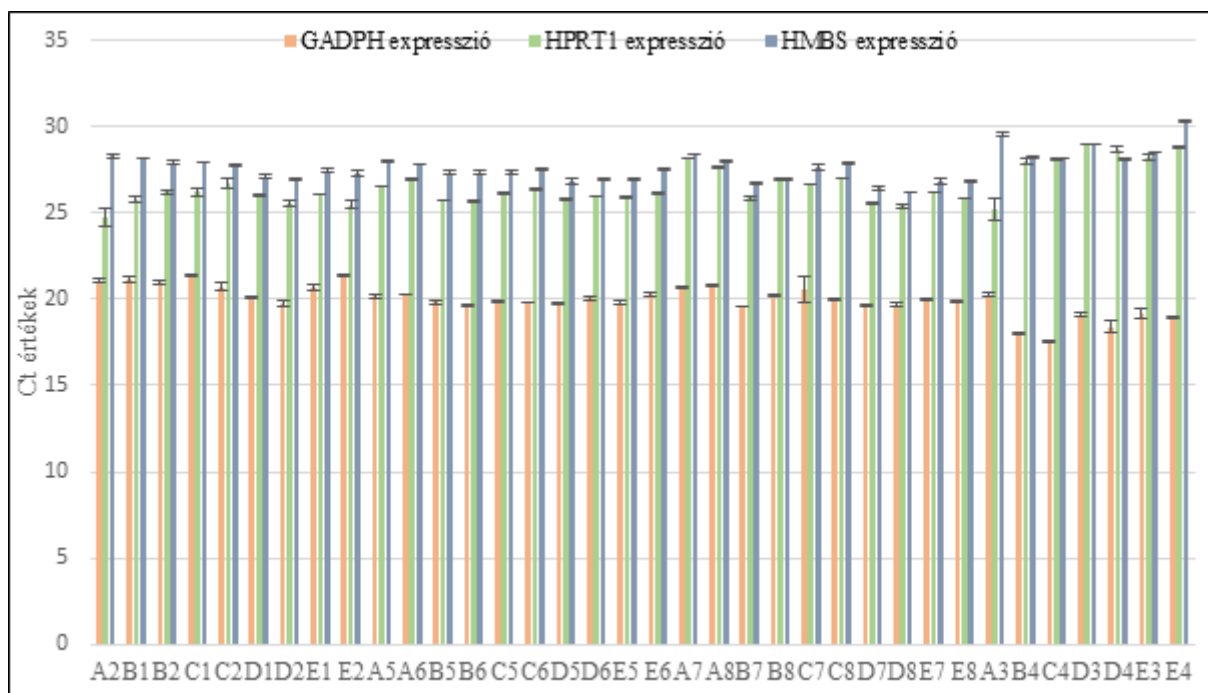


Magyarázat: Az y-tengelyen a gének mért expressziójának megfelelő Ct érték szerepel, az x-tengelyen az aggyterületek vannak feltüntetve. A csíkozott oszlopok a frissen, az aggy kivétele után azonnal TRIzolba helyezett mintákat jelölik. A tömör oszlopok azon aggyterületeket jelölik, amelyek az aggy kivétele után RNAlater-es fixálásra kerültek.

Az öt különböző kutyából származó minták RT-qPCR-es vizsgálata alapján kimondható, hogy az azonos szövetekben a különböző állatok között is hasonlóak voltak a génexpressziós értékek. A 7. ábra alapján látszik, hogy egy alap szórásat leszámítva a szövettípusokon belül (2. táblázat), és az ugyanazon mintát többször megmérve tapasztalt szórástól eltekintve a szövettípusokon belül nem tapasztaltunk jelentős eltérést a génexpressziós (Ct) értékek tekintetében.

A RT-qPCR-rel mért eredményeken kívül agaróz gélelektroforézissel született eredmények alapján is megfelelő minőségűnek bizonyultak a futtatott RNS-ek (8. ábra). A minták jó minőségét jelzi továbbá, hogy a formalinnal fixált mintákból készült metszeteken immunhisztokémiai és hematoxin-eozin festés is alkalmazható volt (9. ábra).

7. ábra. Három célgén expressziójának összehasonlítása különböző állatokból származó szövetekben

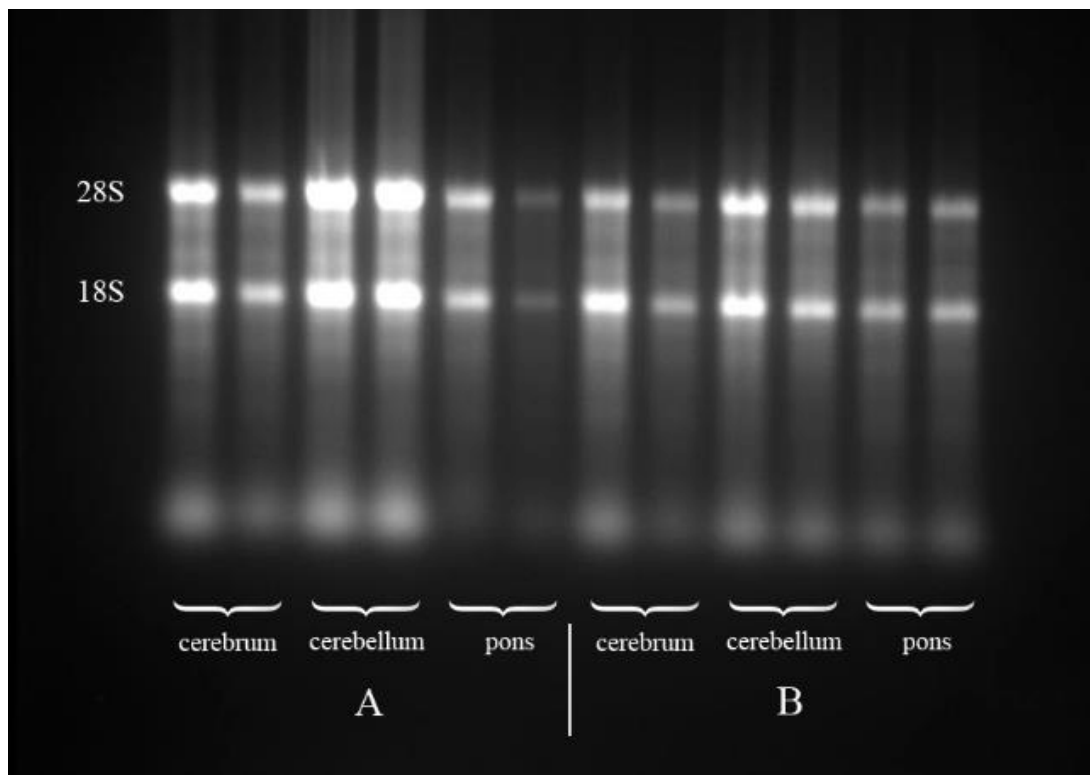


Magyarázat: Az y-tengelyen a gének mért expressziójának megfelelő Ct érték szerepel, az x-tengelyen az egyszerűsített minta azonosítók (minta információkat lásd a 2. táblázatban). A különböző színek a különböző célgéneket jelölik.

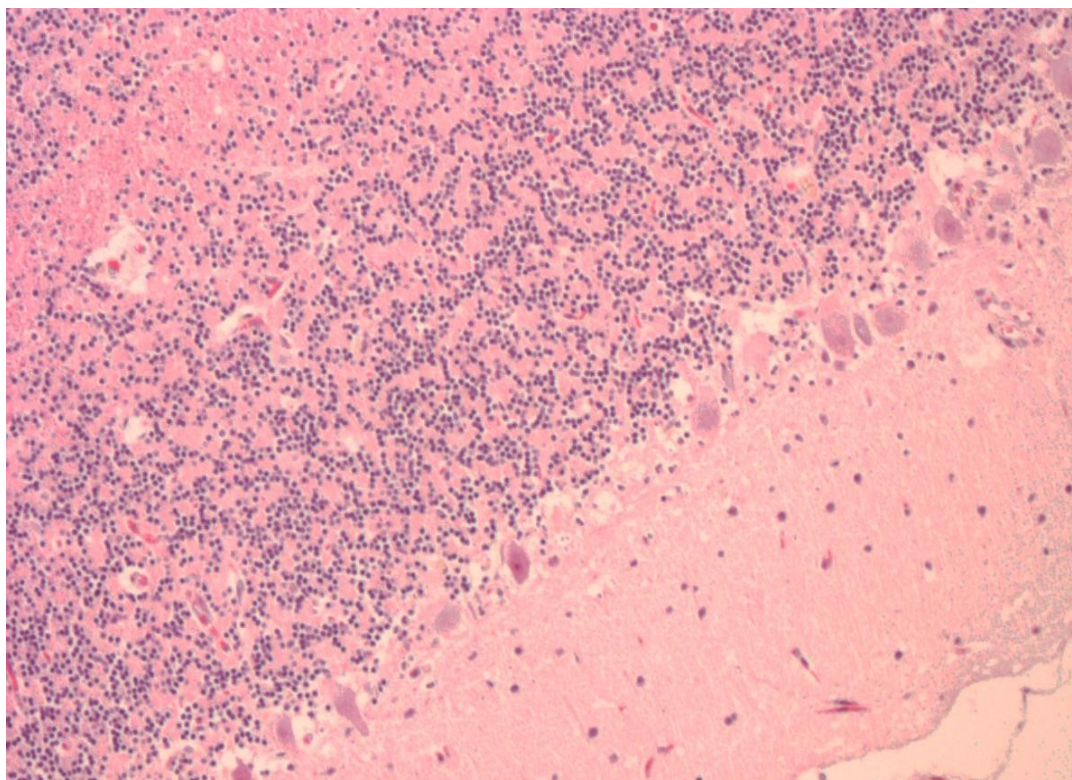
Minta azonosítója	Állat azonosítója	Szövettípus	Minta azonosítója	Állat azonosítója	Szövettípus
A2	170529-1	frontális kortex	C7	170905-1	agytörzs
A3	170529-1	temporális izomzat	C8	170905-1	agytörzs
A5	170529-1	kisagy	D1	171102-1	frontális kortex
A6	170529-1	kisagy	D2	171102-1	frontális kortex
A7	170529-1	agytörzs	D3	171102-1	temporális izomzat
A8	170529-1	agytörzs	D4	171102-1	temporális izomzat
B1	170713-1	frontális kortex	D5	171102-1	kisagy
B2	170713-1	frontális kortex	D6	171102-1	kisagy
B4	170713-1	temporális izomzat	D7	171102-1	agytörzs
B5	170713-1	kisagy	D8	171102-1	agytörzs
B6	170713-1	kisagy	E1	171102-2	frontális kortex
B7	170713-1	agytörzs	E2	171102-2	frontális kortex
B8	170713-1	agytörzs	E3	171102-2	temporális izomzat
C1	170905-1	frontális kortex	E4	171102-2	temporális izomzat
C2	170905-1	frontális kortex	E5	171102-2	kisagy
C4	170905-1	temporális izomzat	E6	171102-2	kisagy
C5	170905-1	kisagy	E7	171102-2	agytörzs
C6	170905-1	kisagy	E8	171102-2	agytörzs

2. táblázat. A 7. ábra egyszerűsített mintaaazonosítóinak mintainformációi

8. ábra. Agaróz gélelektroforézissel futtatott különböző koncentrációjú RNS-ek friss (A) valamint fagyasztott (B) mintákban



9. ábra. 17 éves golden retriever kisagyából készült metszet hematoxin-eozin (HE) festéses mikroszkópos képe (20x nagyítás)



5. Megbeszélés

A Kutya Agy- és Szövetbank a Szenior Családi Kutya Program keretében folyó komplex öregedéstudományi kutatás támogatására jött létre, működésével alapot biztosítva a kutyák öregedési folyamatainak neuropatológiai és molekuláris biológiai módszerekkel történő vizsgálatához. Az Agybank működési felépítéséhez komoly alapot adtak a nagy múlttal rendelkező humán agybankok, amelyek tevékenységükkel régóta biztosítanak megfelelő alapanyagokat többek között a különböző központi idegrendszeri betegségek és rendellenességek kutatásához, illetve az agyban lejátszódó molekuláris és genetikai folyamatok feltérképezéséhez. A humán agybankok által kialakított működési alapelvek, mintavételi, tárolási és feldolgozási módszerek nem egységesek, felépítésük a világ minden területén más és más a vizsgálati céloknak megfelelően, ezenkívül a tudomány fejlődésével párhuzamosan a kutatók újabb és újabb mintafeldolgozási- és tárolási protokollokat fejlesztenek ki. Annak tudatában, hogy a humán viszonyok nem adaptálhatóak teljes egészében a kisállatos területre, a Kutya Agy- és Szövetbank a humán agybankok eddigi tapasztalatait felhasználva és a folyamatosan bővülő ismeretek szem előtt tartásával alakult meg. Jelen Agybank a működésében az elvárt jogi és logisztikai környezethez alkalmazkodott, valamint saját protokollokat fejlesztett a lehető legjobb mintaminőség elérése érdekében.

A hazai jogszabályoknak való megfelelés, így az állategészségügyi és higiéniai alapelvek betartása, valamint a logisztikai rendszer megszervezésével létrejött optimális szállítási-, mintavételezési- és tárolási környezet biztosítja a minták lehető leggyorsabban és kontamináció, valamint számottevő szöveti degradáció nélkül történő kinyerését. Az Agybank validálásához használt RT-qPCR technikával sikerült alátámasztani, hogy a kialakított rendszer megfelelően működik, az elemzéshez kivett mintákból izolált RNS-ekben a mérések során a vizsgált három háztartási gén (*GAPDH*, *HPRT1*, *HMBS*) mind megfelelő expressziós szinteket mutatott. Ez azt bizonyítja, hogy a feltételként támasztott maximum 4 órás post mortem időt betartva a szövetek minősége nem csak szövettani, immunhisztokémiai, DNS- vagy fehérjeanalízist is lehetővé tesz (amint az a dolgozat ábrái is mutatják), hanem az egyik leggyorsabban bomló struktúrát, az RNS-t is épen ki lehet nyerni az eltárolt (akár már fagyasztásra is került) szövetekből.

Az elmúlt évek során több, a CBTB-hez hasonló kezdeményezés is megindult, amelyek az állati szöveteket más kutatókkal, kutatásokkal történő megosztásra, illetve az állatorvoslásban történő felhasználásra gyűjtik. A Sydney Egyetem honlapján említésre kerül egy kutya agyszövet bank, amely a kutyák kognitív diszfunkciójának kutatásában kíván segíteni, azonban további publikáció vagy részletesebb leírás nem található a szerveződésről (University of Sydney, 2018). Megemlítendő emellett az Edinburgh Companion Animal Brain Bank, amelynek működése egy előadás keretében került ismertetésre (Rzechorzek et al., 2016), bővebb információ azonban erről a kezdeményezésről sem jelent meg idáig.

Az Agybank rövidtávú tervei között szerepel a mintavételezési protokoll tökéletesítése, vagyis a szöveteknek az agy kivétele utáni feldolgozása során egy olyan eljárás kialakítása, mellyel a szövetek metszetekben vagy nagyobb régiók szerint kerülnének megőrzésre. Ezzel párhuzamosan folyamatosan zajlik az Agybank befogadó kapacitásának és belső struktúrájának fejlesztése, valamint tevékenységének népszerűsítésével a felajánlások számának a növelése. Egy másik, a közeljövőben megvalósításra váró terv az egyes mintákról tárolt adatok online adatbázissá fejlesztése. A fentiek megvalósulásával az Agybank egy, a hazai és külföldi kutatók számára elérhető, és széleskörű nemzetközi kutatásokhoz mintákat szolgáltató egységgé válna. A CBTB már most is kapcsolatban van egy prágai és egy svéd kutatócsoporttal, akiknek különböző mintákat szolgáltató az ottani intézetekben folyó kutatásokhoz. Az egyik fő előnye ezeknek az együttműködéseknek az, hogy egy újonnan induló kutatásnak például nem kell éveket töltenie a megfelelő minták összegyűjtésével, vagy nem szükséges hozzá invazív állatkísérlet vagy laborállatok bevonása – ami az állatvédelmi szempontokból, a 3R irányelvet szem előtt tartva (European Medicines Agency, 2018) lényeges elbírálási szempont egy kísérlet engedélyeztetésénél –, valamint az egyidejű kutatások lényegesen több információt szolgáltatnak rövid időn belül.

A bevezetőben említett betegségek tanulmányozásához (különböző humán betegségek mélyebb megismeréséhez, kezelési lehetőségek és diagnosztikai markerek kutatásához) is számos kutatás felhasználja a kutyát, mint modellállatot (Head, 2013; Head et al., 2002). A kutyák kognitív diszfunkciós szindrómája (CCD) is sok hasonlóságot mutat a humán Alzheimer-kórral, mind klinikai tünetek terén, mind patofiziológiájában (Head, 2013). Azonban a CCD állatorvosi szemszögből egy gyakran aluldiagnosztizált és sokszor kezeletlenül maradt betegség, amely 11-12 éves kutyák közel harmadában, 15-16 éves kutyák megközelítőleg 70%-ában okoz klinikai tüneteket viselkedésmintázatuk

megváltozásának formájában (alvásmintázat felborulása, szociális interakciók megváltozása, térbeli dezorientáció, szobatisztaság elvesztése) (Landsberg et al., 2012). Az Agybank működése lehetőséget adhat olyan biomarkerek kutatásához, amelyek a CCD diagnosztikájában alkalmazhatóak lennének, ezáltal a terápia megválasztását és a prognózis felállítását is segítenék.

A CBTB a kognitív diszfunkción túl számtalan központi idegrendszeri betegség (például epilepszia, tumorok, keringési zavarok, tárolási betegségek stb.) kutatásához is hasznos alapul szolgálhat a kórfejlődés mélyrehatóbb megismerésével, illetőleg akár az eredményes kezeléshez szükséges diagnosztikai vagy terápiás irányelvek meghatározásával. Az etológiai kutatásokhoz társulva pedig a különböző morfológiájú agyak és a felajánlott kutyák tulajdonosaival kitöltött személyiség-kérdőív összehasonlítása alapján párhuzamot lehet vonni az adott agyi régió mérete, morfológiája, és a kutya személyiségjegyei vagy viselkedése között (Latzman et al., 2015).

Az Agybank kialakítása és az engedélyeztetési folyamat során megszerzett tapasztalatok segítséget nyújthatnak továbbá más hazai kisállat szövet- vagy szervátültetéshez alapot adó egységek létrehozásában is (pl. vese-, máj- vagy szaruhártya transzplantációkhoz történő donor felajánlásnál). Külföldön már léteznek hasonló intézmények, amelyek a szöveteket gyógyítási célból veszik és tárolják, így az Egyesült Királyságban működő Veterinary Tissue Bank kutyák szövetátültetési szükségletei miatt jött létre. Ez a szövetbank különböző ortopédiai műtétekhez biztosít ín-, szalag- és csontszövetet, valamint összejteket osteoarthritis kezelésére kutya és macska részére (Veterinary Tissue Bank, 2018), Amerikában pedig a University of Illinois Veterinary Teaching Hospital-jában végeznek cornea-beültetéseket kutyákban, és ehhez gyűjtenek donorokból szöveteket (University of Illinois, 2018).

A célom a jelen hazai kutyaagybankos kezdeményezés bemutatásával az volt, hogy áttekintést adjak arról, hogy miként lehetséges új kutatások alapjait lefektetni az etológia és az állatorvos-tudomány területeinek hatékony ötvöztetésével, és ez miként járulhat hozzá egyes betegségek minél jobb megismeréséhez, az ebből fakadó diagnosztikai és terápiás lehetőségek szélesítéséhez, és ezáltal végeredményében a társállatként tartott kedvencek jóllétének minél hosszabb távú biztosításához.

6. Összefoglaló

A magyarországi kutyaetológiai kutatások alapjait lefektető, 1994-ben alapított Családi Kutya Program új ágaként jött létre 2016-ban, egy ERC-pályázat keretében a Szenior Családi Kutya Program az Eötvös Loránd Tudományegyetem Etológia Tanszékén. A kutatás célja a kutyák öregedési folyamatainak minél mélyrehatóbb megismerése viselkedéstudományi-, képalkotó-diagnosztikai-, genetikai- és idegtudományi módszerek segítségével. Az öregedés során az agyban bekövetkezett változásokról közvetett adatokat nyújtó eljárások kiegészítésére jött létre 2017-ben, a Szenior Családi Kutya Program keretein belül a vizsgált folyamatokról már közvetlen információt is szolgáltatató kezdeményezés, a Kutya Agy- és Szövetbank (röviden: Agybank, angol rövidítéssel CBTB, mint Canine Brain and Tissue Bank).

Humán agykutatások segítésére régóta, nagy számban működnek agybankok a világ különböző pontjain. Az egyes agybankok kiforrott, ám mégis szerteágazó módszereket alkalmaznak az emberi központi idegrendszeri szövetek feldolgozására. A Kutya Agy- és Szövetbank a nagy múltú humán agybankok tapasztalataira támaszkodva, ám mégis egyedi, saját módszereket alkalmazva jött létre.

A több állatorvosi rendelővel- és központtal megvalósult jogilag és etikailag is stabil kapcsolat következtében a beteg vagy öreg kutyák gazdái az állatorvosokkal közreműködve, eutanázia után felajánlhatják állataikat az Agybank számára. Az állatorvos a tulajdonos beleegyezésével információt szolgáltat a kutya kórelőzményéről, betegségeiről, esetleges viselkedésbeli anomáliáiról, így fontos információkhoz juttatva a kutatókat és támogatva a munkájukat. A mintavétel állatorvosi részvétellel történik. Az agy kiemelésén kívül összehasonlító vizsgálatok elvégzése céljából mintavétel történik többek között a temporális izomzatból, a pajzsmirigyből, retropharyngeális nyirokcsomóból, ganglionokból, bőrből, szőrből és liquorból. A makroszkópos elváltozások értékelésén túl lehetőség nyílik a minták szövettani, valamint molekuláris biológiai vizsgálatára is különböző módszerekkel (fehérjeanalízis, RNS-vizsgálat, génexpressziós vizsgálatok).

A minták feldolgozása nagyban függ a post mortem eltelt időtől. A 4 órán belül feldolgozott minták RNS vizsgálatokra is alkalmasak (ahogy ezt a validálási folyamat során a vizsgálataink megerősítették), míg 4 óra elteltével csak formalinos fixálásra kerül sor. 2018 szeptember végéig összesen 39 olyan felajánlás érkezett az Agybankba, ahol a 4 órán belüli mintavételezés lehetséges volt, további 77 esetben pedig a 4 órán felüli feldolgozásból formalin fixált minták készültek.

A jövőre nézve a projekt célja (a már folyó genetikai és immunhisztokémiai vizsgálatok mellett) az Agybank népszerűsítésén keresztül a felajánlások számának növelése, ezzel párhuzamosan pedig a befogadó kapacitás bővítése. A kutatás további célkitűzései között szerepel egy hazai és külföldi kutatók számára is elérhető online adatbázis kialakítása, amely adott esetben mintaigénylésre is szolgálna. A Kutya Agy-és Szövetbank a világon egyedülálló kezdeményezés, melyben még számtalan lehetőség rejlik a kutyaetológiai ismeretek bővítésén túl az állatorvos-tudomány támogatására is. Az Agybank a jövőben fontos szerepet tölthet be különböző neurodegeneratív betegségek (kognitív diszfunkció, epilepszia, agyi tumorok, keringési zavarok a központi idegrendszerben) kutatásában, vagy éppen az állati szövetátültetés alapjainak a megteremtésében.

Dolgozatom az Agybank létrehozásának szükségességét, körülményeit, illetve működésének részleteit tárgyalja. Továbbá célja még bemutatni ezen úttörő kezdeményezésnek a tudományban betöltött jelenlegi, valamint a jövőben várható szerepét.

7. Summary

The Senior Family Dog Project was established in 2016 at the Department of Ethology, Budapest, ELTE, funded by an ERC Starting Grant. The project is part of the Family Dog Project which was founded in 1994 to study profoundly the aspects of dog-human relationship. The aim of the Senior Family Dog Project is to study the biological background of canine cognitive aging, including behavioral, genetic and neuroscientific aspects. The Canine Brain and Tissue Bank (CBTB) was established as a part of this project.

Human brain banks exist worldwide to facilitate human brain research since a long time. Brain banks have comparable methods to process human brain tissue, yet these techniques are quite diverse. The setting-up of the CBTB relies on the experiences of these prestigious human brain banks, while creating its own methods.

The CBTB established a legally and ethically stable relationship with many veterinary medical stations according to the Hungarian law. Dog owners can donate the body of their euthanized pets for the CBTB with both of the owners' and their veterinarians' consent. In cooperation with the veterinarians and the dog owners the CBTB acquires information about the medical history and behavioral anomalies of the dog. Dissections and tissue samplings are performed with the participation of a veterinarian. Besides dissecting

the whole brain, samples are obtained from other organs, too (muscles, thyroid gland, lymph nodes, ganglia, skin, hair, liquor). Samples are evaluated macroscopically, histologically and with molecular biological methods (protein analysis, RNA analysis, gene expression assays).

The processing protocol of the samples depends on the post mortem delay. When tissues can be processed within 4 hours post mortem, RNA species can be preserved and analysed (as we proved during the validation procedure), while after 4 hours samples are fixed in formalin. Until September, 2018 CBTB received 39 donations where within 4 hours sampling were possible and 74 donations where over 4 hours sampling were performed.

The aim of the project for the future (beside the ongoing researches) to gain more donations, while increasing their capacity. Other objective is to create an online database where samples would be available for Hungarian and foreign researchers. The Canine Brain and Tissue Bank is a unique initiative with countless potentials in the area of canine ethology researches and veterinary sciences. The CBTB could also have an important role in the field of studying neurodegenerative diseases such as cognitive dysfunction, epilepsy, brain tumors, circulatory disturbances in the central nervous system.

The aim of my thesis is to provide detailed information about the necessity and circumstances of establishing the CBTB as well as demonstrating the operational methods it formed. In addition it describes the current and expected future position of this pioneer initiative in science.

8. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban dr. Kubinyi Enikőnek szeretnék köszönetet mondani a sok segítségért, és, hogy részt vehettem és betekintést nyerhettem a SFDP kutatócsoportjának munkájába. Köszönöm dr. Adorján Andrásnak a segítséget a témaválasztásban és a munka során felmerült kérdéseim megválaszolásában. Külön köszönet illeti dr. Czeibert Kálmánt, aki a kutatásom során mindig a segítségemre volt, és, aki rengeteg munkát fektetett az Agybank létrehozásába és működtetésébe. Köszönöm továbbá dr. Sándor Sárának és Tátrai Kittinek a molekuláris biológiai és genetikai tartalmakhoz nyújtott segítségüket és tanácsaikat, valamint dr. Fekete Szilviának és az egész Szenior Családi Kutya Program csapatának a munkáját.

9. Irodalomjegyzék

- AlzForum, 2018. <https://www.alzforum.org/brain-banks>. Utolsó lekérés ideje: 2018.10.16.
- Andics, A., Miklósi, Á., 2018. Neural processes of vocal social perception: Dog-human comparative fMRI studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 85, 54–64.
- Baio, J., Wiggins, L., Christensen, D.L., Maenner, M.J., Daniels, J., Warren, Z., Kurzius-Spencer, M., Zahorodny, W., Robinson, C., Rosenberg, White, T., Durkin, M.S., Imm, P., Nikolaou, L., Yeargin-Allsopp, M., Lee, L.-C., Harrington, R., Lopez, M., Fitzgerald, R.T., Hewitt, A., Pettygrove, S., Constantino, J.N., Vehorn, A., Shenouda, J., Hall-Lande, J., Van, K., Naarden, Braun, Dowling, N.F., 2018. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill. Summ.* 67, 1–23.
- BrainNet Europe, 2018a. Scientific background of BNE (https://www.brainnet-europe.org/index3043.html?option=com_content&view=article&id=91&Itemid=91). Utolsó lekérés ideje: 2018.10.16.
- BrainNet Europe, 2018b. Alzheimer's Disease (https://www.brainnet-europe.org/indexd807.html?option=com_content&view=article&id=112&Itemid=112). Utolsó lekérés ideje: 2018.10.16.
- BrainNet Europe, 2018c. Protocols of BNE (https://www.brainnet-europe.org/index25b3.html?option=com_content&view=article&id=99&Itemid=99). Utolsó lekérés ideje: 2018.10.16.
- Bunford, N., Andics, A., Kis, A., Miklósi, Á., Gácsi, M., 2017. Canis familiaris As a Model for Non-Invasive Comparative Neuroscience. *Trends Neurosci.* 40, 438–452.
- Chapagain, D., Virányi, Z., Wallis, L.J., Huber, L., Serra, J., Range, F., 2017. Aging of Attentiveness in Border Collies and Other Pet Dog Breeds: The Protective Benefits of Lifelong Training. *Front. Aging Neurosci.* 9.
- ELTE, 2018. Kutya Agy- és Szövetbank tájékoztató (<https://kutyaetologia.elte.hu/szovetbank/>). Utolsó lekérés ideje: 2018.10.16.
- European Medicines Agency, 2018. Guideline on the principles of regulatory acceptance of 3Rs (replacement, reduction, refinement) testing approaches (https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-principles-regulatory-acceptance-3rs-replacement-reduction-refinement-testing-approaches_en.pdf). Utolsó lekérés ideje: 2018.10.16.
- Fillenbaum, G.G., van Belle, G., Morris, J.C., Mohs, R.C., Mirra, S.S., Davis, P.C., Tariot, P.N., Silverman, J.M., Clark, C.M., Welsh-Bohmer, K.A., Heyman, A., 2008. CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease) The first 20 years. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 4, 96–109.

- Halmágyi, E., 2010. Családi és laboratóriumi Beagle kutyák személyiségének összehasonlító elemzése. ELTE. Szakdolgozat.
- Harrington, J.W., Allen, K., 2014. The Clinician's Guide to Autism. *Pediatr. Rev.* 35, 62–78.
- Harrington, J.W., Bora, S., 2018. Autism Spectrum Disorder, in: *Integrative Medicine*. Elsevier, pp. 64-73.e4.
- Head, E., 2013. A canine model of human aging and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1832, 1384–1389.
- Head, E., Liu, J., Hagen, T.M., Muggenburg, B.A., Milgram, N.W., Ames, B.N., Cotman, C.W., 2002. Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. *J. Neurochem.* 82, 375–381.
- Human Brain Tissue Bank, 2018. Human Brain Tissue Bank (<http://semmelweis.hu/hbtb/>). Utolsó lekérés ideje: 2018.10.16.
- Jarret, C., 2013. The first brain collectors (<https://www.wired.com/2013/11/the-first-brain-collectors>). Utolsó lekérés ideje: 2018.10.16.
- Kis, A., Szakadát, S., Gácsi, M., Kovács, E., Simor, P., Török, C., Gombos, F., Bódizs, R., Topál, J., 2017. The interrelated effect of sleep and learning in dogs (*Canis familiaris*); an EEG and behavioural study. *Sci. Rep.* 7.
- Krakowiak, P., Walker, C.K., Bremer, A.A., Baker, A.S., Ozonoff, S., Hansen, R.L., Hertz-Picciotto, I., 2012. Maternal Metabolic Conditions and Risk for Autism and Other Neurodevelopmental Disorders. *PEDIATRICS* 129, e1121–e1128.
- Landsberg, G.M., Nichol, J., Araujo, J.A., 2012. Cognitive Dysfunction Syndrome. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 42, 749–768.
- Latzman, R.D., Hecht, L.K., Freeman, H.D., Schapiro, S.J., Hopkins, W.D., 2015. Neuroanatomical correlates of personality in chimpanzees (*Pan troglodytes*): Associations between personality and frontal cortex. *NeuroImage* 123, 63–71.
- Medical Research Council, 2018. Neurodegenerative diseases and dementia (<https://mrc.ukri.org/funding/science-areas/neurosciences-mental-health/our-science-and-contacts-nmh/neurodegenerative-diseases-and-dementia>). Utolsó lekérés ideje: 2018.10.16.
- NeuroBioBank, 2018. NeuroBioBank Best Practices (<https://www.neurobiobank.nih.gov/about-best-practices/>). Utolsó lekérés ideje: 2018.10.16.
- Palkovits, M., 1973. Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Res.* 59, 449–450.
- Piotti, P., Szabó, D., Wallis, L., Bognár, Z., Stiegmann, B.S., Egerer, A., Marty, P., Kubinyi, E., 2017. The effect of age on visuo-spatial short-term memory in family dogs. *Pet Behav. Sci.* 17.

- Ravid, R., Park, Y. mok, 2014. Brain banking in the twenty-first century: creative solutions and ongoing challenges. *J. Biorepository Sci. Appl. Med.* 17.
- Rzechorzek, N., Flook, M., Pennycook, C., Jeffery, E., Smith, S., Smith, C., Marioni-Henry, K., 2016. The Edinburgh Companion Animal Brain Bank - a new resource for cross-translational neurology. *J. Vet. Intern. Med.* 30, 1953.
- Semmelweis Egyetem, 2018. Holttest felajánlása oktatásra (<http://semmelweis.hu/anatomia/tetemfelajanlas-aktualis/>). Utolsó lekérés ideje: 2018.10.16.
- Sergiev, P.V., Dontsova, O.A., Berezkin, G.V., 2015. Theories of aging: an ever-evolving field. *Acta Naturae* 7, 9–18.
- Stassen, Q.E.M., Riemers, F.M., Reijmerink, H., Leegwater, P.A.J., Penning, L.C., 2015. Reference genes for reverse transcription quantitative PCR in canine brain tissue. *BMC Res. Notes* 8.
- Sturm, Á., Ivics, Z., Vellai, T., 2015. The mechanism of ageing: primary role of transposable elements in genome disintegration. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 1839–1847.
- Suenaga, T., Hirano, A., Llana, J.F., Yen, S.-H., Dickson, D.W., 1990. Modified Bielschowsky stain and immunohistochemical studies on striatal plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 80, 280–286.
- University of Illinois, 2018. Eye tissue bank for dogs and horses (https://vetmed.illinois.edu/pet_column/corneal-bank/). Utolsó lekérés ideje: 2018.10.16.
- University of Sydney, 2018. University of Sydney School of Medicine, Research aims. (<http://sydney.edu.au/medicine/people/academics/profiles/thomas.duncan.php>). Utolsó lekérés ideje: 2018.10.16.
- Vellai, T., Takács-Vellai, K., Sass, M., Klionsky, D.J., 2009. The regulation of aging: does autophagy underlie longevity? *Trends Cell Biol.* 19, 487–494.
- Veterinary Tissue Bank, 2018. The Veterinary Tissue Bank (<http://vtbank.org/>). Utolsó lekérés ideje: 2018.10.16.
- Vonsattel, J.P.G., del Amaya, M.P., Keller, C.E., 2008. Twenty-first century brain banking. Processing brains for research: the Columbia University methods. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 115, 509–532.
- Wallis, L.J., Range, F., Kubinyi, E., Chapagain, D., Serra, J., Huber, L., 2017. Utilising dog-computer interactions to provide mental stimulation in dogs especially during ageing, in: *Proceedings of the Fourth International Conference on Animal-Computer Interaction - ACI2017*. Presented at the the Fourth International Conference, ACM Press, Milton Keynes, United Kingdom, pp. 1–12.
- Wallis, L.J., Szabó, D., Erdélyi-Belle, B., Kubinyi, E., 2018. Demographic Change Across the Lifespan of Pet Dogs and Their Impact on Health Status. *Front. Vet. Sci*

NYILATKOZAT

Alulírott, Kubinyi Enikő igazolom, hogy Czakó Lenke Egy új hazai kezdeményezés: Kutya Agy- és Szövetbank létesítése és működtetése című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2019. november 15.

A handwritten signature in purple ink, reading "Kubinyi Enikő", written over a dotted line.

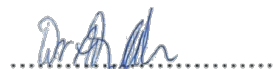
a témavezető neve és aláírása

ELTE, Etológia Tanszék

NYILATKOZAT

Alulírott, Adorján András igazolom, hogy Czakó Lenke Egy új hazai kezdeményezés: Kutya Agy- és Szövetbank létesítése és működtetése című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2019. november 15.



a témavezető neve és aláírása

Állathigiéniai, Állomány-egészségtani és
Állatorvosi Etológiai Tanszék

NYILATKOZAT

Alulírott, Czakó Lenke nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe Egy új hazai kezdeményezés: Kutya Agy- és Szövetbank létesítése és működtetése tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2018. évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2019. november 15.



.....
a hallgató neve és aláírása

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: Czakó Lenke

Elérhetőség (e-mail cím): czakolenke1@gmail.com

A feltöltendő mű címe:

Egy új hazai kezdeményezés: Kutya Agy- és Szövetbank létesítése és működtetése

A mű megjelenési adatai: 2018.

Az átadott fájlok száma: 1 db

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédtett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (**egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel**):



engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,



az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,



a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,



csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2019. év november hó 15. nap



aláírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

*A **HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive** az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.*

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*