



Dr. Nagy M. György
egyetemi tanár
az MTA doktora
Semmelweis Egyetem
Budapest

Budapest, 2011. július 22.

Válasz Dr. Nagy György bírálói véleményére

Tisztelt Opponens Úr!

Köszönöm, hogy értekezésem bírálatát elkészítette, és azt nyilvános vitára és az MTA doktora fokozat megszerzésére alkalmasnak minősítette.

Opponens Úr öt pontban megfogalmazott felvetéseire az alábbiakban válaszolok.

„1. A III. kamra rostralis periventricularis területén tirozin hidroxiláz immunpozitív, azaz dopaminerg neuronok is találhatóak, melyek ugyancsak szexuális dimorfizmust mutatnak. Mennyiben van átfedés a kisspeptin immunpozitív és a dopaminerg neuronok között? Amennyiben van átfedés, mit lehet tudni azok projekciós területéről?”

Válasz (A kisspeptin és dopamin neuron populációk átfedéséről):

A III. agykamra rostralis periventricularis területén elhelyezkedő kisspeptin és dopamin idegsejt populációk közötti részleges átfedést Clarkson és Herbison 2011. áprilisában írták le (Clarkson és Herbison, J. Neuroendocrinol. 2011). A közölt megfigyelések, nőstény egérben a terület kisspeptin neuronjainak fele tirozin hidroxiláz-immunreaktív, és fordítva, az itt elhelyezkedő tirozin hidroxiláz-immunreaktív idegsejtek fele kisspeptin-immunreaktív. Hím állatokat a tanulmány nem vizsgált. A kettős-fenotípusú, dopaminerg/kisspeptinerg idegsejtek részt vesznek a GnRH idegsejtek beidegzésében. A GnRH neuronokon megfigyelt kisspeptin-immunreaktív kontaktusok közel 20%-a tirozin hidroxiláz-immunreaktív is volt. Másrészt, a GnRH idegsejteken végződő dopaminerg terminálisok fő forrását is a kettős fenotípusú, kisspeptin/dopamin-tartalmú sejtpopuláció képezheti, mivel a GnRH idegsejteken azonosított kisspeptin-immunreaktív kontaktusok 62-86%-a kisspeptint is tartalmazott ugyanezen tanulmányban.

„2. A ventrolateralis preopticus terület, mely az ébrenlét-alvás szabályozásában játszik fontos szerepet, gazdag hisztaminerg beidegzése ugyancsak a tuberomamillaris magból származik. Azokban a kísérletekben, amikor ovariectomizált nőstény állatokban hisztamin receptor antagonistákat juttattak az oldalsó agykamrába és az ösztrogén által kiváltott LH válasz meglétét, ill. elmaradását vizsgálták, mennyiben érinthette, ill. befolyásolhatta a kapott eredményeket az ébrenlét-alvás szabályozásában bekövetkező esetleges változás?”

Válasz (hisztamin ébrenlét-alvás szabályozáson keresztül kifejtett, esetleges aspecifikus hatásáról):

Az LH surge-re gyakorolt hatásához hasonlóan, a hisztamin az alvási fázisokra (ébrenlét és non-REM alvás fázis fokozása, REM fázis gátlása; Jewett, Exp. Neurol. 1968) is H1 receptor közvetítésével hat, többek közt a híd tegmentumának ébrenlétet szabályozó központjában (Lin és mtsai, J. Neurosci. 1996), a hypothalamus tuberomammillaris magjában (Lin és mtsai, Neuropharmacology, 1988), a bazális előagy kolinerg neuronjain (Ramesh és mtsai, Behav. Brain Res. 2004) és az - alvást fokozó - ventrolateralis preopticus mag GABA/galanin neuronjain (Liu és mtsai, J. Physiology 2010). Mivel a proösztrozus kora délutáni óráiban végzett anesthesia valóban az ovuláció (Everett és mtsai, Endocrinology 1949) és az azt kiváltó LH surge (Van der Schoot, J. Endocr. 1978) elmaradásához vezet, elvben nem zárható ki, hogy H1 antagonisták

jelenléte az alvás fázisok megzavarásán keresztül, indirekt módon is gátolja az LH surge létrejöttét.

Hivatkozott konkrét kísérletünkben ovariectomizált patkányok „LH surge” kiváltására nagy dózisú (50 µg/200 µl; s.c.) ösztadiol-benzoát pótlást kaptak. Az exogén ösztrogén kezeléssel (progeszteron adása nélkül) végzett surge indukció napi LH surge jelentkezését okozták 1-2 héten keresztül, mely az ösztrogén kezelést követő 2. napon kezdődik, és az állatok cirkadián ritmusától függően, minden nap állandó időpontban, az állatok nappali (inaktív) fázisában jelentkezik. Kísérletünkben a surge kezdete vehikulumaal kezelt állatokban 14 órákor, maximuma 18 órákor volt. A H1 és H2 receptor antagonisták agykamrai infúzióját a 3. napon várt LH surge előtt, 11 órákor kezdtük meg, és 6 órán keresztül folytattuk. Méréseink az aznapi LH surge meglétét (H2 antagonist, ranitidine /100 nmol/30 µl/h adása mellett/) vagy elmaradását (H1 receptor antagonist, mepyramine /100 nmol/30 µl/h adására/) regisztrálták. A mepyramine agykamrai infúziója 100 nmol/30 µl/h dózisban kísérletünkben látható viselkedési változást a következő órákban nem okozott. Véleményem szerint, az akut kísérleti elrendezésből fakadóan, az aznapi surge elmaradása 2-3 órával a H1 antagonist kezelés megkezdését követően nem függ szorosan össze a mepyramine alvás fázisokra gyakorolt hatásával. Az azonban nem zárható ki, hogy az LH surge gátlásáért nem a GnRH idegsejtekre gyakorolt, direkt H1 antagonist hatás, hanem egyéb, H1 receptor-érzékeny pályákra gyakorolt, indirekt hatás felelős.

„3. Kíváncsi lennék arra is, hogy a jelölt és más szerzők kísérleti eredményei tükrében az elmúlt években, mennyiben változott az ösztrogén hypophysis (LH, FSH) és a hypothalamus (GnRH) szintjén megvalósuló „feedback” szabályozó mechanizmusról alkotott felfogásunk? Milyen mechanizmust ellenőriz a szervezet az α -, és melyet a β -receptorokon keresztül? Vajon a GnRH vagy a kisspeptin neuronokon keresztül megvalósuló ösztrogén feedback a domináns? Milyen arányban vesz részt az ösztrogén „feedback” szabályozásban a direkt hipofizeális hatás?”

Válasz (Ösztrogén visszacsatolás hypothalamus és hypophysis szintjén zajló mechanizmusairól):
Noha az egyes fajokban eltér a hypophysisben zajló ösztrogén feedback folyamatok jelentősége, az irodalom meglehetősen egységes ate tekintetben, hogy a visszacsatolás legfontosabb folyamatai a hypothalamusban játszódnak (Christian és Moenter, Endocrine reviews 2010). A hypothalamus ösztrogén szint-függő kimeneti jelét a GnRH szekréció reproduktív ciklus során változó frekvenciája jelenti valamennyi fajban. A pulzus frekvencia függvényében vagy FSH (alacsony frekvenciájú GnRH elválasztás mellett) vagy LH (magas frekvenciájú GnRH elválasztás mellett) termelődik és választódik el a hypophysisből birkában (Clarke és mtsai, Neuroendocrinology 1987), majomban (Wildt és mtsai, Endocrinology 1981), emberben (Marshall és Griffin, Hum. Reprod. 1993) és rágcsálókban (Haisenleder és mtsai, Endocrinology 1991) egyaránt. *In vivo* igen nehéz az ösztrogének direkt hypophysialis hatásait a GnRH neuronok által közvetített indirekt ösztrogén hatásoktól elkülöníteni. Míg az LH β alegység mRNS ovariectomiát követő 10-14-szeres megemelkedését (és az FSH β mRNS kisebb mértékű emelkedését) sokáig a hypophysis szintjén érvényesülő, negatív ösztrogén visszacsatolás kiesésének tulajdonították (Shupnik és mtsai, J. Biol. Chem. 1989), későbbi vizsgálatok hypophysis tenyészetben az ösztrogén LH β génre gyakorolt közvetlen szupresszív hatását nem tudták igazolni. Sőt, ellenkezőleg: a gonadotrop sejtekre gyakorolt közvetlen ösztrogén hatás az LH β átírását éppenséggel serkentette (Shupnik, Biol. Reprod. 1996). A hypophysisben mindkét ösztrogén receptor izoforma előfordul, és közvetíthet közvetlen hypophysialis hatásokat. Saját, nem publikált *in situ* hibridizációs adataink szerint azonban az ösztrogén-függő génexpressziós változásokért főképp az ER- α izoforma felelős, így ez okozza a galanin vagy a progeszteron receptor expresszió növekedését is ösztrogén hatására.

Válasz (ER- α és ER- β ösztrogén feedbackben betöltött szerepéről):

Mára egyértelmű, hogy az ösztadiol számos biológiai hatást gyakorol a GnRH neuronokban általunk leírt ER- β -n keresztül. Ilyen hatás a CREB ösztrogén-függő foszforilációja (Ábrahám és

mtsai, J. Neurosci. 2003), a galanin gén indukciója (Merchenthaler és mtsai, Endocrinology 2005 és Neuropeptides 2005). Ugyancsak közvetlenül az ER- β -n át fejt ki gyors hatást az ösztadiol a GnRH idegsejtek tüzelési sajátosságaira (Chu és mtsai, J. Neurosci. 2009). Az eddig felismert közvetlen ösztrogén hatások jelentősége nehezen megítélhető, mert az ER- β gén kiütését az egér képes kompenzálni, és szaporodásában az egyetlen leírt rendellenesség a csökkent utódszám. Ezzel szemben, az ER- α -génkiütött vagy neuron-specifikus módon ER- α -génkiütött egér infertilis (Wintermantel és mtsai, Neuron 2006).

Válasz (A kisspeptin és egyéb neuron rendszerek feedback mechanizmusban betöltött szerepéről): Mindazonáltal, a génkiütött egerek tanulmányozásával nyert adatok értelmezése nagy óvatosságot igényel. A kisspeptin-génkiütött vagy a kisspeptin receptor-génkiütött egér ugyan infertilis (Herbison, Brain Res. Rev. 2008), de a kisspeptin neuronok vagy a kisspeptin receptort tartalmazó neuronok kiütését az egér egyedfejlődése során képes jól kompenzálni, és fertilitása ép marad (Mayer és Boehm, Nature Neuroscience 2011). Az igen meglepő észlelet arra is felhívja a figyelmet, hogy számos párhuzamosan működő jelátviteli rendszer lehet képes az ösztrogén hatásait a reprodukív tengelyre közvetíteni. Moenter munkacsoportja (Moenter és Christian, J. Neuroendocrinol. 2009; Christian és Moenter, Endocrine reviews 2010) ebben kitüntetett szerepet tulajdonít a GnRH neuronokon végződő GABAerg afferenseknek és a GABAerg posztzinaptikus áramok ösztrogén-függő és cirkadián változásainak. Munkacsoportunk idén írta le, hogy az RFRP neuronrendszer is ER- α -t tartalmaz, és a prepro-RFRP mRNS expresszióját ösztrogén kezelés csökkenti (Molnár és mtsai, Endocrinology 2011). Így az RFRP neuronok kapcsolata GnRH idegsejtekkel ugyancsak hozzájárulhat az ösztrogén feedback hatások közvetítéséhez.

„4. A tézisekben összefoglalt, a GnRH neuronok működését szabályozó, ill. befolyásoló mechanizmusok szerepe mennyiben köthető pl. a női ciklus szabályozásához, és mennyiben korlátozódik csupán az élet egy bizonyos szakaszára, um. a pubertás idejére? Lehet-e egyfajta transzmitter és receptoraik, transzportereik expressziójából valamiféle következtetést levonni?”

Válasz (Életszakaszokra korlátozott szabályozási mechanizmusokról):

A III. kamra rostralis periventricularis területének neuronjai a pubertáskori átmenet során kezdik meg kisspeptin termelésüket. Az átmenet során fokozatosan nő a kisspeptin neuronok száma és a termelt kisspeptin mRNS mennyisége (Han és mtsai, J. Neurosci 2005). Míg a kisspeptin/GPR54 és a neurokinin B/NK3 szignalizáció reprodukcióban játszott szerepe is hypogonadotrop hypogonadizmussal járó emberi kórképek kapcsán került felismerésre (Guran et al., J.C.E.M. 2009; Topaloglu et al., Nature Gen. 2009; Seminara et al., N. Engl. J. Med. 2003), ezek a neuronrendszerek a reprodukív életkorban végig mindkét nemből fontos szerepet játszanak a GnRH idegsejtek működésének szabályozásában. Nőstényben/nőben a normál ciklus szabályozásában is részt vesznek. Rágcsálókban (Ciofi és mtsai, Neuroscience 2006; Clarkson és Herbison, Endocrinology 2006; Cheng és mtsai, Endocrinology 2010) és emberben (Hrabovszky és mtsai, Eur. J. Neurosci. 2010; Hrabovszky és mtsai Frontiers in Genomic Endocrinology 2011) egyaránt szexuális dimorfizmust mutatnak, melynek alapját rágcsálókban peri-, emberben prenatális androgén expozíció organizációs hatása jelenti. A here által termelt tesztoszteron, vagy annak hiánya okozza azt a bevésoedést, mely pubertás után a reprodukív tengely nemenként eltérő szabályozását teszi lehetővé az aktuális szexuál szteroid szint aktivációs hatásainak függvényében. Részben organizációs, részben aktivációs hatásnak gondoljuk azokat a megfigyeléseinket, hogy nőkben minden életkorban több kisspeptin idegsejt található az infundibularis magban, mint férfiakban (Hrabovszky és mtsai, Eur. J. Neurosci. 2010; Hrabovszky és mtsai Frontiers in Genomic Endocrinology 2011), és hogy 50 év felett nagyobb a magban a neurokinin B-t tartalmazó idegsejtek száma is nőkben, mint férfiakban (Hrabovszky és mtsai Frontiers in Genomic Endocrinology 2011). Idősebb korban férfiakban a kisspeptin és neurokinin B rendszerek morfológiájának megváltozása a tesztoszteron szint csökkenésének lehet

következménye: 50 év feletti férfiakból származó mintákban az infundibularis mag kisspeptin és neurokinin B idegsejtjei hypertrofizálódnak, számuk is szignifikánsan megnő, és több kontaktust létesítenek GnRH idegsejtekkel, mint az 50 év alatti férfiakban (Molnár és mtsai, publikációra benyújtva; J. Clin. Invest.).

„5. Végezetül meg szeretném kérdezni a jelölt véleményét arról, hogy a tézisekben tárgyalt és bemutatott saját és mások vizsgálati eredményei mennyiben változtathatják meg a reprodukciót szabályozó hipotalamikus neuronhálózat különböző működési zavarainak differenciál-diagnosztikáját és egyes esetek kezelhetőségét? Lát-e a jelölt olyan áttöréres esélyt, mint az a hipotalamikus amenorrhéa esetében, a GnRH pumpa alkalmazásával lehetővé vált?”

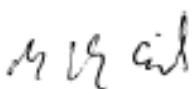
Válasz (A lehetséges klinikai alkalmazásokról):

- A reprodukív tengely új stratégia szerinti gyógyszeres befolyásolására elsősorban a kisspeptin/GPR54, neurokinin B/NK3, és RFRP/OT7T022 peptiderg szignalizációs rendszerek kínálnak lehetőséget. Immuncitokémiai vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az emberi hypothalamusban a kisspeptint tartamazó és a neurokinin B-t tartalmazó axonok az infundibularis nyél területén, a vér-agy gáton kívül is kapcsolatot létesítenek GnRH idegsejtek axonjaival (Hrabovszky és mtsai, Eur. J. Neurosci. 2010). Ez a kapcsolat lehetővé teszi, hogy szisztémásan adott kisspeptin vagy más, a vér-agy gáton át nem jutó, GPR54 receptoron ható szelektív ligandum azonnali hatást gyakoroljon a GnRH- és ezáltal az LH szekrécióra (Dhillon és mtsai, J.C.E.M. 2007). A GPR54-szelektív agonisták hypothalamikus amenorrhéák, a GPR54-szelektív antagonisták új fogamzásgátlási stratégiák alapját jelenthetik. Említést érdemel, hogy a kisspeptin a menstruációs ciklus minden fázisában, ösztrogén szinttől függetlenül képes kiváltani LH hypersecretiót (Dhillon és mtsai, JCEM 2007), mivel hatása közvetlenül a hypothalamus kimeneti jelét adó GnRH neuronon jelentkezik, szemben az ösztrogén- vagy ösztrogén+progeszteron tartalmú fogamzásgátlókkal vagy az ovuláció indukcióban használt klomifén citráttal, melyek a GnRH idegsejteket befolyásoló, ösztrogén-érzékeny interneuronokon hatnak. Az RFRP receptorán, az OT7T022-n ható antagonisták ugyancsak ígéretes fejlesztési lehetőséget jelentenek a gyógyszeripar számára. Így a receptor antagonistái alkalmasak gyógyszeres LH surge indukcióra (Pineda és mtsai, Endocrinology 2010), melynek anovulációs kórképek kezelésében lehet távlati jelentősége.

- Egy másik lehetséges klinikai alkalmazáshoz az ER- β GnRH neuronokon belüli szelektív jelenléte kínálhat alapot. Ugyan a génkiütött egerek normál reprodukív funkcióiból levonható következtetés nem reménykeltő, az ER- β jelentősége fajonként nagymértékben eltérhet. Pont egérben ezidáig csak az igen érzékeny egysejt-PCR megközelítéssel és elektrofiziológiával sikerült a receptor GnRH neuronokon belüli előfordulását kimutatni. Jelenleg folyó kísérleteinkben ezért az ER- β -szelektív agonisták patkány ösztrusz ciklusára gyakorolt hatásait tanulmányozzuk.

Kérem Opponens Urat fenti válaszaim szíves elfogadására.

Tisztelettel:



Dr. Hrabovszky Erik
tudományos főmunkatárs
Endokrin Neurobiológiai Laboratórium