

Válasz Dr. Csillag András bírálatára

Mindenekelőtt köszönöm, hogy a Tisztelt Bíráló elvállalta munkám értékelését. Külön öröm számomra, hogy a bíráló kiemeli, hogy munkámat nem a ma divatos 'tézis' formában készítettem el, hanem a hagyományos akadémiai disszertáció-formát választottam. Kérdéseire, felvetéseire az alábbiakban válaszolok, a bírálatnak megfelelő sorrendben.

Az értekezés formai megjelenésére ill. tartalmi hibáira vonatkozó kritikai megjegyzésekre adott válaszaim:

Egyetértek azzal, hogy valóban szerencsésebb lett volna, ha az 5. fejezetben megtalálható szöveges összefoglalás mellett az új eredményeimet pontokba szedve kiemelem. Ugyanakkor ennek a fejezetnek a célja pont az új eredmények egységes és tömör bemutatása volt.

Az elütések és hibás ábrákra történő hivatkozások valóban maradtak a dolgozatban, melyek minden bizonnyal figyelmetlenségem következményei, sajnos egy majd 120 oldalas műnél ez szinte elkerülhetetlen. Az egyes szavak esetében előforduló írásmódra vonatkozó megjegyzéseit minden esetben elfogadom és köszönöm. Ugyanakkor hálás vagyok Bírációnak a disszertáció nyelvezetére és közérthetőségére vonatkozó méltató szavaiért, ami mögött észrevette a több évtizedes egyetemi oktatói munkámat is.

Bíráló számos terminológiai elírásra hívja föl a figyelmet, melyek kritikája teljesen jogos. Mentségemre megjegyezném, hogy mint egyetemi oktató ill. kutató nap mint nap találkozunk képletek, molekulák, anatómiai fogalmak, stb. magyar, latin/görög ill. angol változatával, hiszen például Intézetünkben magyarul, németül és angolul oktatunk, latin/görög terminológiát, ugyanakkor a kutatási eredményeinket angol nyelven publikáljuk. Jelen értekezésben sajnos nem mindig sikerült a nevezéktant közös nevezőre hozni, de ez, ahogy Bíráló is megjegyzi, sokszor a „magyarban hibás származtatás eredménye, és nem a jelölt hibája”. Ugyanakkor köszönöm, hogy a bírálat elkészítése során erre – mindnyájunk okulására – külön felhívta a figyelmet. Például, egyetértek abban, hogy egy magyar nyelven írt disszertációban jobb lett volna napszaki ritmust írni cirkadián helyett, vagy az angolból

származtatott oxintikus sejtek helyett megmaradni a magyar fedősejtek vagy a latinos parietális sejtek elnevezés mellett.

A hypothalamus bemutatásánál valóban szerencsésebb lett volna a funkciók bemutatását egységesíteni.

Az állatok tápjára vonatkozó rész sajnos valóban elírást tartalmaz. Természetesen a standard (SD) ill. magas zsírtartalmú táp (HFD) nem ugyanakkora felszabadítható energiát tartalmaz (11.8kJ ill. 16.2kJ). Az, hogy a patkányoknál és az egereknél nem egységes a felszabadítható energia mértékegysége (kJ vs. kcal) azzal magyarázható, hogy a különböző gyártóktól származó tápokon különböző módon vannak megadva ezek az értékek, és ez került be az értekezésbe is.

A Western-blot során alkalmazott PMSF rövidítése valóban kimaradt a leírásából: Phenil-metil-sulfonil-fluorid. Ez az anyag egy szerin proteáz inhibitor, amely a szövetek homogenizálása során alkalmazott oldat egyik komponense. Itt jegyezném meg, hogy az EGTA és az EDTA sem szerepel a rövidítésjegyzékben, de ezek az anyagok legtöbbször már mint rövidítések ismertek, és az ezen módszereket alkalmazóknak szinte evidensek, ezért is kerülhette el a figyelmet. Ugyanakkor a rövidítéslistát sem akartam a végletekig kibővíteni, mert az mindenképp az áttekinthetőséget rontotta volna.

Természetesen a post-embedding immunarany technikát nikkel ill. arany grideken végeztük. Mint arra a későbbiekben is utal a Bíráló, nem feltétlenül járt sikerrel az az erőfeszítésem, hogy az 'Anyag és Módszer' fejezetben egységesen mutassam be a kísérletek során használt technikákat, holott ez számos előnnyel is járhatott volna. Köszönöm, hogy Bíráló is felhívta erre a figyelmet.

A továbbiakban a konkrét kérdések megválaszolásával folytatom:

Kérdés: Mit ért a szerző longitudinális adatokon?

Válasz: Előre tervezett, meghatározott időközönként megfigyelt, a vizsgált objektum/kérdés szintjén bizonyos időintervallum alatt bekövetkezett változásokra vonatkozó adatok. Ez az adatgyűjtés elsősorban a SCN magvak sejtszámlálásos vizsgálatára vonatkozik. Ahogyan Bíráló megjegyzi, *t*-próba ill. egyutas ANOVA vizsgálatokat valóban csak megfelelő előzetes vizsgálatok során lehet alkalmazni. Erre ugyan a disszertációban nem tértem külön ki, de amikor ilyen statisztikai analízist végeztünk, az adatsorokat előzetesen mindig ellenőriztük.

Köszönöm Bírálónak azt az erőfeszítést, hogy a n. suprachiasmaticus BrDU jelölt sejteivel kapcsolatos fogalmazásbeli anomáliákat feltárta. Valóban keveredtek a szegmens és a metszetsík meghatározások. Ugyanitt sajnos valóban felületesen került feltüntetésre a 4. fejezet jelzett ábráin az, hogy mely területekre (shell vagy core) vonatkoznak az egyes grafikonok értékei. Valójában a grafikonok együttesen mért értéket mutatnak be (shell+core).

A szövettani ábrák és az azokat reprezentáló grafikonok közötti eltérésre vonatkozó megjegyzésével egyetértek, de sajnos már az eredeti közleményben is így szerepel, és nem akartam a disszertációban sem megváltoztatni.

A 4.1.5. ábra C részén a léptékre vonatkozó érték valóban nem került feltüntetésre, a 10 μ m az A és B ábrára vonatkozik.

Kérdés: A c-fos sejtszámlásnál hiányoznak bizonyos metodikai részletek, amelyek a bemutatott eredményeket jobban megalapoznák (különös tekintettel az alacsony egyedszámmra): hány párhuzamos metszeten számolták a sejteket, hogyan zárták ki a határokat, alkalmaztak-e korrekciót a 'lost cap' problémára, és az abszolút sejtszámok mennyire vonatkoztathatók a vizsgált magok teljes volumenére?

Válasz: Bírálóval egyetértek, a sejtszámlálás részletei sem a dolgozatban, sem pedig az eredeti közleményben nem kerülnek teljesen kifejtésre. Ezért az észrevételért utólag is

köszönettel tartozom, fontos azonban kiemelni, hogy főemlősből származó anyaghoz igen ritkán lehet hozzáférni, ezért a vizsgált egyedszám szinte minden hasonló kísérletes munkánál alacsony. Ezért az eredményeket mindig nagyobb fenntartással kell kezelni, mint az általában sok rágcsló felhasználásával kapott eredményeket. Ebben a konkrét esetben a metszetek kvalitatív és kvantitatív vizsgálata vakon történt. Sejtszámolás során disszektor technikát alkalmaztunk. Egymást követő metszeten meghatároztuk a sejtek átlagos méretét és ennek az értéknek kb. 30%-át használtuk, mint disszektorok közötti távolság. A sejteket mindig két, egymást követő metszeten számoltuk (*referencia* és *'look-up'* metszetek). Amennyiben egy sejt nem volt fókuszbán, vagy nem tartózkodott teljes terjedelmében az adott látómezőben azt figyelmen kívül hagytuk.

A 4.2.3. ábra magyarázatában valóban szerencsésebb lett volna a kettős jelölésre utalni. De mind a B, mind a C felvételen a sejtmagban egyértelműen látszik a sejtmag *c-fos* immunreaktivitása.

Bíráló megjegyzésével, miszerint a 4.3.2 ábrán bemutatott felvételek nem megfelelő méretűek (különösen az elektronmikroszkópos felvételek túl kicsik) ahhoz, hogy a mondanivalót alátámasszák, tulajdonképpen egyetértek. De sajnos a közleményekben, mint az köztudott, szigorúan korlátozzák a megjeleníthető képek számát és méretét. Ez az ábra jól példázza ezt, fény és elektronmikroszkópos felvételekből 12 panelt tartalmaz, összesűrítve mindazt a vizuális információt, amely az eredmények bemutatásához elengedhetetlenül szükséges.

Köszönöm, hogy bíráló felhívta a figyelmet arra, hogy a ghrelin leszorításos kísérletek módszertani része nem került megfelelően kifejtésre. Ebben az esetben az eredeti közleményben azonban megtalálható a részletes leírás, mind ahogy ezt Bíráló már korábban is megjegyezte pl. a tesztoszteron-propionát kezelések sejtszám-csökkentő hatásának esetében is. Köszönöm, hogy mindkét esetben az eredeti közleményeket is részletesen tanulmányozta, hogy az esetleges metodikai félreértéseket tisztázza. Minden részletet valóban nem fejtettem ki a disszertációban, ami a hagyományos disszertáció forma egyik hátránya, mivel a terjedelmet próbáltam kordában tartani, és ami számomra esetleg magától értetődő, az az olvasó számára nem feltétlenül világos.

Kérdés: Az elektrofiziológiai mérések eredményeihez nem tartozik metodikai leírás az Anyagok és Módszerek fejezetben.

Válasz: Az 'Anyagok és Módszerek' fejezet ezen hiányosságára, illetve az ennek következményeként a elektrofiziológiai kísérletek leírásának hiányára vonatkozó megjegyzés természetesen jogos, de ezek az adatok a disszertációhoz csatolt eredeti közleményekben megtalálhatók, s ezzel igyekeztem a disszertáció terjedelmét az elvárt kereteken belül tartani. Az elektrofiziológiai mérések módszertanának kihagyása azonban részben szándékos, hiszen a módszerek leírásánál arra törekedtem, hogy az általam végzett ill. irányításommal történt kísérletek technikai hátterét tárjam az olvasó elé. Ugyanakkor úgy érzem, hogy az eredmények tárgyalásánál vétek lett volna a funkcionális eredmények mellőzése, hiszen, mint az Bíráló a későbbiekben meg is jegyzi, ez a tudományos munka legerősebb és legmesszebbre mutató része. Továbbá valóban célszerű lett volna a fiziológiai eredmények között a ghrelin inszenzitív TRH+ sejtek görbáját is bemutatni.

Kérdés: A szerző felveti a ghrelin preszinaptikus hatásának lehetőségét. Axo-axonikus szinapszisokra gondol?

Válasz: A doktori műben bemutatott kísérletek és eredmények alapján a preszinaptikus hatás mibenléte, ill. megléte valóban nem bizonyítható egyértelműen. Azonban 2011-ben, már a doktori értekezés elkészítését követően látott napvilágot az a kísérleti eredmény (Yang Y. et al., 2011, Cell 146 (6) 992-1003), ahol elegánsan bizonyítást nyert, hogy a ghrelin hatása alapvetően preszinaptikus, elsősorban a perifériáról érkezik, és elsősorban a GABA, ill. NPY neuronokat elérő, serkentő, ghrelin-szenzitív axonterminálisokon keresztül fejti ki hatását. Ez is jól mutatja, hogy a hypothalamicus szabályozó-mechanizmusok kutatása során gyakran találkozunk olyan eredményekkel, amelyek az agyterület működését új megvilágításba helyezik.

Kérdés: Hogyan jelölték egymás mellett a POMC és GnRH tartalmú elemeket elektronmikroszkópos szinten?

Válasz: Az említett elemeket korrelált fény- és elektronmikroszkópos módszerrel jelöltük: a GnRH antigén esetében Ni-DAB (nikkel-DAB) volt a kromogén, míg a POMC antigén esetében DAB jelölést alkalmaztunk. A kétféle csapadék könnyen

megkülönböztethető elektronmikroszkópban, elsősorban a Ni-DAB csapadék erőteljesebb elektrondenzitása miatt.

Kérdés: Jelölt szerint gyakorlatilag valamennyi parvalbumin sejt kifejez POMC-t is. Fontos volna tudni, hogy ezt milyen körülmények között észlelte, ösztrogénnel kezelt vagy nem kezelt állatokon. Azt ugyanis egyértelműen bizonyítja, hogy ösztrogén hatására erősen emelkedik a parvalbumin sejtek száma. A fenti összefüggés alapján ez egyben azt is jelentené, hogy a POMC sejtek számának is hasonlóan nőnie kell (erre azonban nem utal a szerző). Ha viszont ez nem áll, akkor fel kell tételeznünk, hogy talán még sincs direkt összefüggés a parvalbumin és a POMC expressziója között.

Válasz: A vizsgálatokat természetesen ösztrogén kezelt állatokon végeztük, oly módon, hogy kristályos ösztradiolt tartalmazó subcutan kapszulákat helyeztünk el az intrascapularis területen. A kontroll állatokba üres kapszulákat helyeztünk el ugyanilyen módon. Bíráló felvetésével részben egyet tudok érteni, hiszen parvalbumin expresszió a POMC sejtekben krónikus ösztrogén kezelés hatására alakul ki. Úgy gondoljuk, hogy ez a parvalbumin indukció a POMC sejtekben annak a következménye, hogy a megnövekedett stimuláló szinapszisok a sejten belüli kalcium-szintet megemelik (részben a megnövekedett kalcium-áteresztő AMPA receptor aktivitás miatt), aminek következtében indukálódik a parvalbumin, mint kalcium-pufferoló fehérje termelése.

A 4.5.2. ábrán található glia-lefedettség magyarázata nem egyértelmű, hogy valóban százalékos lefedettségről van szó, nem pedig a végtalpak számáról. Ezért, valamint a 4.5.2. és 4.5.3. ábrák magyarázatában Bíráló által felfedezett pontatlanságokért elnézést kérek.

Kérdés: az SD és HFD állatok közötti különbség leírása ill. bemutatása a POMC ill. NPY sejttestek és kapillárisok közötti glianyúlványok tekintetében nem pontos.

Válasz: Köszönöm bírálónak az észrevételét. Az inkriminált ábrákon véleményem szerint meglehetősen látványosan kerül bemutatásra a sejtek ill. glianyúlványok valamint sejttestek viszonya. Míg az E ábrán valóban a sejttest és a kapilláris endothel között egy alig felismerhető talán gliális eredetű nyúlvány felfedezhető, addig az F és G ábrán egyértelműen látszik a vaskos glia-nyúlvány. Ennek ellenére Bíráló felvetésével egyetérttek, valójában

lehetséges, hogy a glianyúlványok vastagsága változik SD ill. HFD táplálás hatására. Az ábra aláírásában a nyílak funkciója félreérthetően lett feltüntetve, azok is a gliális elemekre mutatnak.

Kérdés: Az NTPDáz-3 fejezet ábráinak jelölései zavaróak. Az NTPDáz-3-mal kapcsolatos kísérletek és a purinerg jelátvitel kérdései csak lazán kapcsolódnak a disszertáció fő vonalához, és sok benne a spekulatív elem.

Válasz: Itt ismét szeretném megköszönni bíráló alaposságát, valóban az ábrák jelölése és feliratozása közben pontatlanságok történtek. Bíráló által jelzett problémák egy része az eredeti közleményben azonban helyesen szerepelnek. A fejezet spekulatív jellegére vonatkozó megjegyzésével tulajdonképpen egyet kell, hogy értsek, azonban ezen spekulációk alakul(hat)nak lassan át hipotézisekké és gyakran meghatározhatják egy kutatás folytatásának az irányát.

Ismételten szeretném megköszönni Dr. Csillag Andrásnak tudományos eredményeim elismerését és tételes összefoglalását, a rendkívül alapos és értékes bírálatot, valamint a hasznos észrevételeket és kritikákat. Külön köszönöm, hogy a disszertáció nyilvános vitára való bocsájtását és elfogadását javasolja.

Budapest, 2012. június 5.

Sótonyi Péter