

Válasz Nyakas Csaba bírálataira

Nagyon hálás vagyok a biztató szavakért és az építő kritikáért, melyek számos eredményem újra gondolására késztettek.

2.1. Az AVP funkcionális szerepének vizsgálatára döntően a Brattleboro patkánytörzset használták. A Brattleboro állatok általános állapotában a döntő a folyadékvesztés a vesén át, és a lényegesen megemelkedett vízfelvétel, szomjúság-indukált vízivás, ami testsúlycsökkenéssel is párosul. Az 52-ik ábra napi ritmust ábrázol, és mutatja, hogy mennyire eltorzul a diurnális ritmus (alvás regisztrálása történt ebben a kísérletben). Megváltozik tehát a magatartási ritmus, a megvilágítási periódusban csökken az alvás és nyilvánvalóan fokozódik a vízivási aktivitás, mely számos, ha nem valamennyi endokrin és neuroendokrin szabályozási ritmusra kihat, melyek kötődnek a napi ritmushoz, beleértve a kortikoszteron napi ritmusát is.

Nagyon köszönöm az értékes felvetést. Mivel a nucleus suprachiasmaticus (SCN), mint cirkadian központ első felfedezett molekulája az AVP volt (Sofroniew MV, Weindl A. Identification of parvocellular vasopressin and neurophysin neurons in the suprachiasmatic nucleus of a variety of mammals including primates. J Comp Neurol. 1980 Oct 1;193(3):659-75.; bár ma már sokkal komplexebb molekulaösszetételt ismerünk lásd például Slat E, Freeman GM Jr, Herzog ED. The clock in the brain: neurons, glia, and networks in daily rhythms. Handb Exp Pharmacol. 2013;(217):105-23. doi: 10.1007/978-3-642-25950-0_5.), és a cirkadian ritmus megváltozása mindenre kihat, így különösen fontos erről több szót ejteni.

Érdekes megjegyezni, hogy úgy tűnik, az AVP-hiány nem változtatja meg a ritmust, csak a REM fázis előfordulását (és a lassú hullámú alvás amplitúdóját; Brown MH, Nunez AA. Vasopressin-deficient rats show a reduced amplitude of the circadian sleep rhythm. Physiol Behav. 1989 Oct;46(4):759-62.) csökkenti a világos, passzív periódus alatt (dolgozat 52. ábrája). Ez a REM csökkenés viszont inkább a felborult só-víz háztartásnak, mint az AVP direkt hatásának a következménye lehet, mert folyadékinfúzió is rendezte (Danguir J. Sleep deficits in rats with hereditary diabetes insipidus. Nature. 1983 Jul 14-20;304(5922):163-4.). Ezzel összhangban a motoros aktivitásban nem találtunk különbséget a genotípusok közt, ha telemetriás mintavevővel folyamatosan monitoroztuk az állatokat (lásd alább ábra Demeter és mtsai 2016 Behav Brain Res cikkünkéből). Mások sem találták di/di állatokban megváltozott cirkadian „wheel running” (mókuserékben való futás) aktivitást és ivási ritmust (Grobowski TA, Nunez AA, Gold RM. Circadian rhythms in vasopressin deficient rats. Brain Res Bull. 1981 Feb;6(2):125-30) és érdekes módon a Brattleboro patkányok SCN-jében a kontrollokéhoz hasonló cirkadián AVP mRNS szint változások következtek be (Uhl GR, Reppert SM. Suprachiasmatic nucleus vasopressin messenger RNA: circadian variation in normal and Brattleboro rats. Science. 1986 Apr 18;232(4748):390-3.). A melatonin szintjük ritmusa is nagyrészt megtartott volt (Schröder H, Stehle J, Henschel M. Twenty-four-hour pineal melatonin synthesis in the vasopressin-deficient Brattleboro rat. Brain Res. 1988 Sep 6;459(2):328-32.).

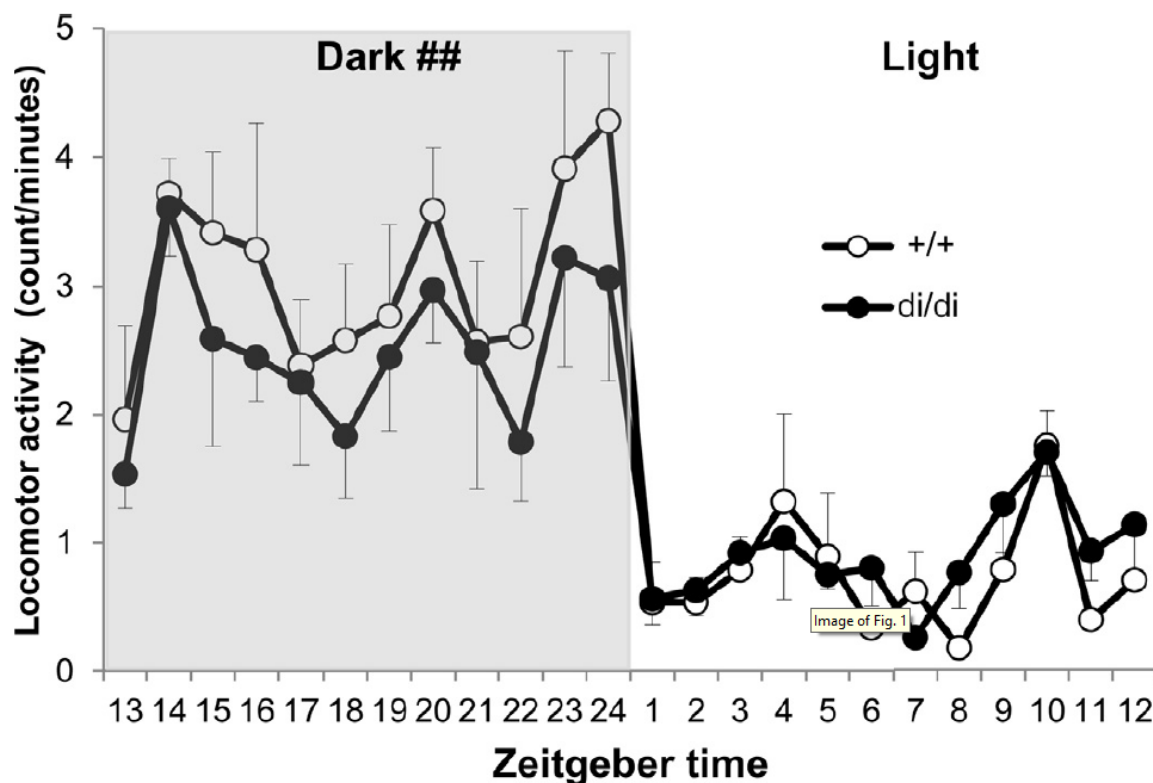


Fig. 1. Daily locomotor activity (counts/minutes in each hour) was monitored in vasopressin-deficient (*di/di*) Brattleboro rats for 24 h by biotelemetric equipment. Measurement was started in the 1st hour of dark period. No significant differences were observed between *+/+* and *di/di* animals. Both genotypes follow the normal circadian rhythm. Grey background denotes the dark period. $##p < 0.01$ vs. light period.

„Normál” patkányban az SCN kiirtása csökkentette az ACTH ritmust (érdekes módon a kortikoszteron ritmusra nem volt ilyen hatása; Szafarczyk A, Ixart G, Alonso G, Malaval F, Nouguiet-Soulé J, Assenmacher I. CNS control of the circadian adrenocortical rhythm. *J Steroid Biochem.* 1983 Jul;19(1C):1009-15.). Ennek ellenére az AVP hiánya sem az ACTH sem a kortikoszteron napi ritmusát nem befolyásolta (lásd alább ábra Zelena és mtsai 2009 *J Endocrinol* cikkből). Tehát az SCN egyéb molekuláinak hiánya (például a VIP) lehetnek felelősek az ACTH-szint csökkenésért SCN irtás után (a VIP potenciózza a CRH ACTH szintézist serkentő hatását: Léonard JF, Bluet-Pajot MT, Oliver C, Kordon C. Interaction of vasoactive intestinal peptide (VIP) and growth hormone releasing factor (GRF) with corticotropin releasing factor (CRF) on corticotropin secretion in vitro. *Neuropeptides.* 1988 Oct;12(3):131-3.).

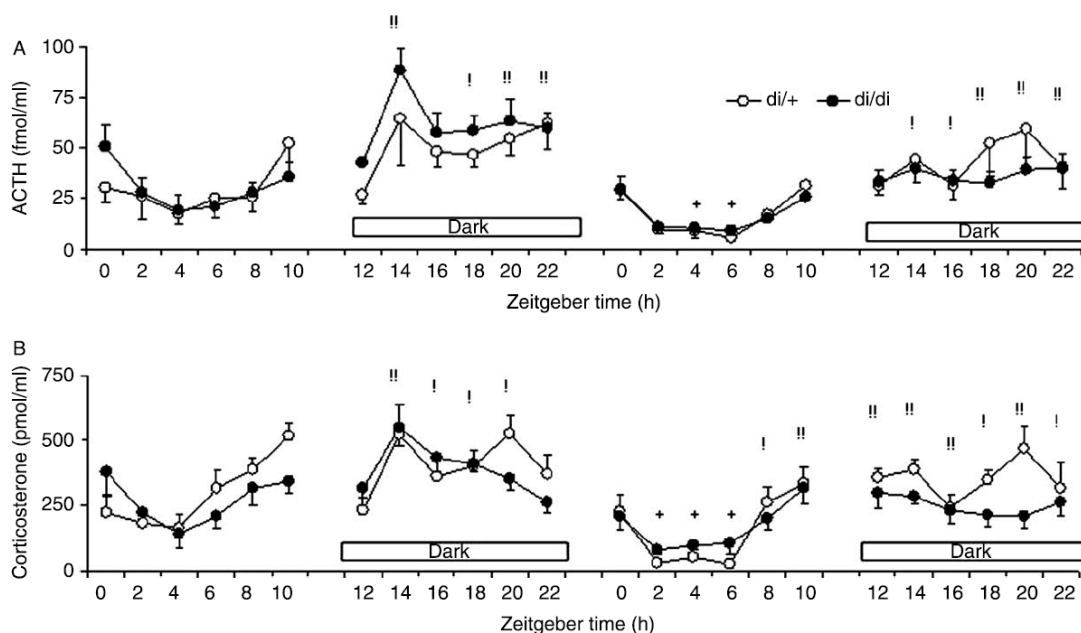


Figure 1 Rhythmic changes in plasma ACTH ((A) fmol/ml) and corticosterone ((B) pmol/ml) levels in Brattleboro rats. Serial blood samples were collected on two consecutive days every 2 h via a catheter in the vena jugularis. Separate group of animals were used for light phase (lights on at 7 h; samples 0–12) and dark phase (kept in reversed cycle, lights on at 22 h; samples 12–24). The time when the lights were switched on is referred to as Zeitgeber time 0. $n=7-9$. The effect of time was statistically significant for both hormones ($P<0.01$). $^+P<0.05$, $^{++}P<0.01$ the time point versus 0 h; $!P<0.05$; $!!P<0.01$ the time point versus 2–4 h (lower levels).

Összeségében tehát azt mondhatjuk, hogy a di/di állatok cirkadian szabályozása nem szenved zavart. Viszont az alvásfázisok (különösen a REM fázis) csökkenése számos pszichiátriai elváltozás (például memóriazavarok) melegágyát képezhetik (erősen kétséges viszont, hogy ezek hozzájárulnának egy kevésbé szorongó-depressziós fenotípushoz).

Felvetődik az is, hogy nem a sötét periódusban kellett-e volna végezni a viselkedéssel kapcsolatos teszteket, mert ebben a fázisban összehasonlíthatóbbak a motoros viselkedések?

Valóban a 47. ábrán bemutatott alacsony nyílt kari aktivitás lehet ennek is a következménye. Kezdeti vizsgálataink során az éjszakai (az állatok számára aktív) periódusban való tesztelés szervezési nehézségekbe ütközött, de később ezt sikerült áthidalni és az állatokat úgynevezett fordított ciklusban tartva (reggel 10-től lekapcsolt villany) a munkaidő alatt, mégis az aktív periódusban végezhattük a teszteket. A kísérleti helységben sem állt kezdetben rendelkezésre sötét felvételek készítésére alkalmas videó, de a KOKI új Viselkedés Vizsgáló Egységét már ezen körülmények figyelembevételével alakítottuk ki (változtatható megvilágítású állat tartó és kísérleti szobák, vörös fény a kísérletező látásának biztosítására stb.).

Ez a patkánytörzs inkább egy patológiás modellnek felel meg véleményem szerint, ami nehezíti a funkcionális szabályozás vizsgálatát és csak áttételesen, és néha körülményesen lehet a funkcionális következtetéseket levonni.

Magam is lényegesnek tartom eredményeink más módszerekkel történő megerősítését és az irodalommal való összevetést.

Egyébként a Brattleboro patkányokat valóban betegségmodellként is alkalmazzák a pszichiátriai betegségek preklinikai kutatása során, „spontán” kialakul bennük számos

skizofrénia-szerű tünet (első publikáció: Feifel D, Priebe K. Vasopressin-deficient rats exhibit sensorimotor gating deficits that are reversed by subchronic haloperidol. *Biol Psychiatry*. 2001 Sep 15;50(6):425-33.; saját munkánk: Demeter K, Török B, Fodor A, Varga J, Ferenczi S, Kovács KJ, Eszik I, Szegedi V, Zelena D. Possible contribution of epigenetic changes in the development of schizophrenia-like behavior in vasopressin-deficient Brattleboro rats. *Behav Brain Res*. 2016 Mar 1;300:123-34. doi: 10.1016/j.bbr.2015.12.007. Epub 2015 Dec 15.)

2.2. A disszertáció monográfia vagy monográfiák megírásához elégséges adat-tömeget tartalmaz, ugyanakkor követi az egyedi kísérletes tudományos közlemények formai követelményeit. Az ismertetett kísérleti adatok olyan mennyiségűek, melyeket nehéz az elkülönített megbeszélés fejezetben felidézni, megtalálni. A forma tehát nehézségeket is generál.

Támogatnám a formai követelmények megváltoztatását (például a módszerek részletes leírása helyett elégséges lenne csak a megjelent publikációra hivatkozni).

2.3. Statisztikával kapcsolatos megjegyzés, hogy a szövegben nem találtam ANOVA/MANOVA értékelést (F értéket), csak két csoport összehasonlításokat, bár ez a statisztikai módszer említésre került a Módszer fejezetben.

A módszerek fejezetben a részletes statisztikai adatok (F, df stb.) tekintetében a megjelent közleményekre hivatkoztam. Az eredmények részénél az ANOVA p értékei szerepelnek (pl. „(26. ábra A, stressz: $p < 0,01$)” esetén a stressz az ANOVA főhatása), míg az ábrán a poszthoc összehasonlítások adatait adtam meg. (lásd 4.8. „A szövegben a fő hatások kerültek feltüntetésre, míg az ábrákon a „post-hoc” összehasonlítások eredménye szerepel.”)

3.1. 26. ábra – 61. old. A szövegben leírt, hogy a Brattleboro állatokban a 14R krónikus stresszt követően megemelkedett a kortikoszteron szint is, de az ábrán (26/B) ez nincs feltüntetve.

Valóban, az ANOVA fő hatása van leírva a szövegben, a poszthoc összehasonlítás nem volt szignifikáns, ezért az ábrán nincs jelölés.

Egy tartalmi kérdés ezen oldalon: a 26-28-as ábrák összehasonlításából látszik, hogy a kontrollok (di/+) kortikoszteron alapszintjei különbözők, míg a di/di csoportoknál ez nem szembetűnő.

A kontrollok alapértékei közti különbség számos tényezőtől adódhat. Az egyes kísérletekre több év különbséggel került sor, az év más-más szakában és más-más napszakban (A szezonális ingadozásra példa: Prendergast BJ, Kay LM. Affective and adrenocorticotrophic responses to photoperiod in Wistar rats. *J Neuroendocrinol*. 2008 Feb;20(2):261-7. Epub 2007 Nov 28.). Ugyan mindegyik állat kontroll, de például a morfin kezelt csoportban ez folyamatos fiziológiás só injekciókat jelentett, míg a mozgáskorlátozásnál a teljes „elhanyagolást”. Nem zárható ki, hogy a stresszelt állatok hangadása (speciálisan a mozgáskorlátozásnál) befolyásolta a kontrollokat is (bár külön helységeben került sor a stresszre). Nem utolsó sorban a hormonméréshez minden alkalommal új kalibrációs görbét készítünk és a standard pillanatnyi hígítása, a tracer minősége a mérés eredményét nagymértékben befolyásolhatja. Ezért nagyon

lényeges, hogy minden egyes kísérletnél legyenek kontroll állatok, és lehetőleg egyszerre legyenek lemérve a minták.

Továbbá csak a morfin kezelési kísérletben került elfogadásra az, hogy a kortikoszteron alapszintek genetikailag különböznek.

Ezt a kérdést a 6.1.1. második bekezdésében próbáltam megválaszolni.

„Az Mo esetén az AVP-hiányos állatok **nyugalmi** kortikoszteron **szintjei** magasabbak voltak, mint kontroll társaiké. A di/di állatok kisebbek, állandó ivási kényszerük van, így feltehető, hogy „nyugalmi” körülmények között is krónikus stressz állapotban vannak. Ezt alátámasztja a (néha tapasztalható; vö 27. ábra emelkedés és 26, 28. ábra normál szint) magasabb „nyugalmi” kortikoszteron szintjük is. Ennek megfelelően feltehetnénk, hogy bennük további, krónikus stresszre utaló elváltozások nem képesek kifejlődni. De ez akkor lenne probléma, ha a di/di állatokban csökkent stresszreaktivitást látnánk, mert nem lehetnénk biztosak benne, hogy ez tényleg az AVP-hiány hatása-e, vagy csak a di/di állatok fokozott „nyugalmi” HHM tengely aktivitása miatt létrejött csökkent reaktivitás. A krónikus Mo kezeléssel kísérletnél a kontroll állatok is kaptak sorozatos injekciókat, amik befolyásolhatták a mért „nyugalmi” szinteket. Továbbá számos kísérletből származó adatunkat összesítve nem volt szignifikáns különbség a genotípusok között a nyugalmi ACTH és kortikoszteron szintjeik tekintetében (7. táblázat), bár mindig tapasztaltunk egy tendenciát a magasabb kortikoszteron szintekre.

	ACTH (fmol/ml)		Kortikoszteron (pmol/ml)	
	dekapitálás	sorozat vérvétel	dekapitálás	sorozat vérvétel
di/+	23,9±3,0 (136)	70,6±10,5++ (83)	137,4±17,6 (142)	277,4±41,4++ (66)
di/di	21,0±1,5 (135)	82,8±10,7++ (75)	175,2±13,7 (140)	332,7±43,5++ (63)

7. táblázat Nyugalmi hormonszintek. Zárójelben az állatok száma.
++p<0,01 vs dekapitálás (Zelena és mtsai, 2009 1. táblázata alapján)

Vizsgálataink összességében arra utalnak, hogy a nyugalmi ACTH és kortikoszteron hormonszintek fenntartásában nincs szerepe az AVP-nek.”

Zavaró, hogy a különbség a szövegben p<0,01, míg az ábraaláírásban p<0,05 szintűnek van említve/jelölve (ellentmondásnak tűnik).

A genotípus főhatása p<0,01 volt, míg az ábrán jelölt poszthoc páros összehasonlítás eredménye p<0,05.

3.2. 5.4. fejezet, gastrointestinális fekélyek kísérlet, 71. old. „...a di/di állatoknál az AVP-hiány fokozta a mortalitást (4-ből 8 di/di állat halt meg 3 napon belül...)” (!) A mortalitás adatok statisztikai értékelésére itt nincs utalás, az eredeti cikkben ez lehetséges, hogy megvan?

Az eredeti könyvfejezetben csak az idős állatokra való utalás szerepelt számadatok nélkül. Elnézést az elírásért, valójában nem 4-ből 8 állat halt meg, hanem 8-ból 4. Mindenesetre nem paraméteres Chi-square 2x2-es táblával lehet összehasonlítani a mortalitási rátát. Az alacsony állatszámok miatt csak marginális különbségeket kapunk, de mindenesetre feltűnő a korral eltérő irányú változás a két genotípusban.

fiataloknál: $\chi^2=0,059$

időseknél: $\chi^2=0,045$

	+/+	di/di
meghalt	1	4
túlél	9	4

	+/+	di/di
meghalt	3	0
túlél	3	6

+/+-nál: $\chi^2=0,074$

di/di-nél: $\chi^2=0,040$

3.3. 5.5. fejezet, szorongás: 71-72.old. Két különböző kísérlet közül az egyikben találtak változást a nyílt karban a genotípusok közt (48. ábra), míg a másikban nem (47. ábra). Melyik eredmény reprodukálható? A kezelések, mint kísérleti körülmények voltak jelentősek a különbségekben?

A kísérleti körülmények változtatásával mindkettőt lehet reprodukálni. A 48. ábrán a DDAVP kezeléssel kombinált eredmények bemutatása során +/+ kontrollokkal és műtét (még ha csak álműtét volt is) után vizsgáltuk a magatartást. Már 2007-es cikkünkben is megjegyeztük, hogy a genotípusok közti különbség abban az esetben jelent meg, ha az EPM tesztet egyéb manipuláció előzte meg (magatartás teszt, placebo injekció stb.) (Mlynarik és mtsai, 2007 Hormones and Behavior). Ennek az lehet az az idegrendszeri mechanizmusa, hogy például a kényszerített úszás teszt (mely megelőzte az EPM tesztet a DDAVP-s kísérletben) bizonyítottan emeli a hipotalamusz AVP „tartalmát”, ezáltal növelheti az állatok viselkedési különbségeit is (lásd dolgozat 6.5.1. és 59. ábra).

Más szorongásteresztéssel és hím-nőstény vizsgálatainkkal összevetve (lásd alább összefoglaló táblázat) azonban azt mondhatjuk, hogy az AVP szerepe szorongásban nem egyértelmű (vö például Griebel G et al., J Clin Psychiatry, 2012;73:1403 humán vizsgálata, melyben a V1b antagonistá szorongásra egyáltalán nem hatott, míg a depresszióban további vizsgálatok tűnnek szükségesnek).

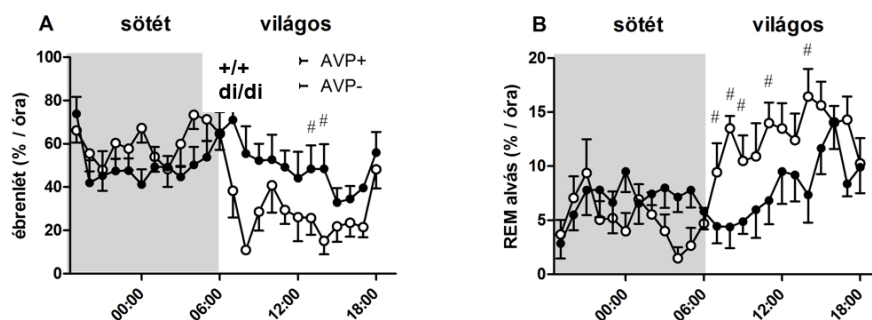
Fodor és mtsai, 2016 Physiology and Behavior

=: no difference between genotypes; ↓: AVP-deficient animal showed lower levels or improved psychopathology-related behavior; ↑: AVP-deficient animal showed higher levels or enhanced psychopathology-related behavior; ND: no data; *: in one out of three studies

Tests	Female	Male
Anxiety-like behavior		
<i>Open-field (OF)</i>	=	=
<i>Elevated plus maze (EPM)</i>	↓	(↓)*
<i>Marble burying (MB)</i>	=	↓
<i>Novelty-Induced Hypophagia (NIH)</i>	=	ND

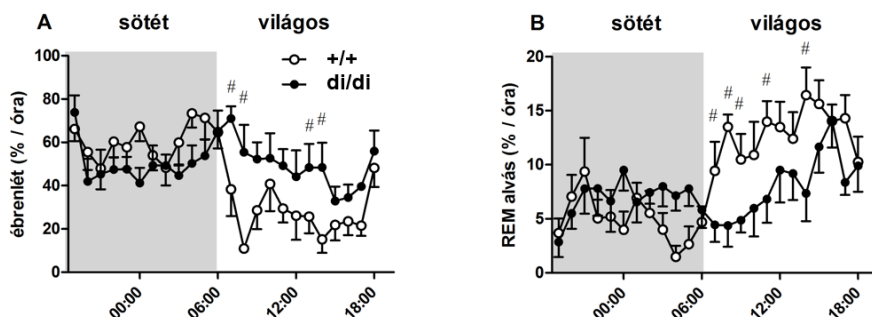
3.4. Az 52. ábrán hiányzik a grafikai csoportmegjelölés, illetve nem érthető.

Úgy látom, szétcsúszott a kép, ezért nem volt megfelelő a csoportmegjelölés.



52. ábra Brattleboro patkányok napi ritmusa (Ébredés és gyors szemmozgásos, REM alvás) A kettős keresztek az AVP+ csoporttól való eltérést ($p < 0,05$) jelzik. (saját, nem közölt adat)

helyesen:



52. ábra Brattleboro patkányok napi ritmusa (Ébredés és gyors szemmozgásos, REM alvás) A kettős keresztek az AVP+ csoporttól való eltérést ($p < 0,05$) jelzik. (saját, nem közölt adat)

3.5. A 2. ábra nagyon kicsire sikerült, a feliratozások nagyon nehezen olvashatók (ha ennek a helyhiány az oka – akkor összevetendő pl. a 3-ik ábrával, mely lehetet volna kisebb).

Egyetértek és sajnálom.

3.6. fejezet: 4.7.2.2.3. Az impulzivitás méréséhez táplálék megvonásra volt szükség, átlagban 6db pelletet kaptak az állatok (20g körül). A Brattleboro patkányok testsúlya lényegesen alacsonyabb, így nem világos, hogy miképp kompenzálták az alacsonyabb testsúlyt a kísérletezők. A testtömeget és a vízfelvételt mérték, kérdés hogy alakult a táplálékfelvétel testsúly kg-ra számítva? Az is kérdés, hogy a Brattleboro állatok táplálékfelvétele hogy alakul általában, tehát a táplálékozási magatartásuk, éhségérzetük? Beck és mtsai 2008 (Brain Res Bull 76:454) adatai szerint pl. növekszik a NPY tartalom a

hypothalamusban, tehát változik az éhség motiváció szintje ezekben a patkányokban.

Az operáns kondicionálásos tanuláshoz ha jutalomfalatért kell dolgozniuk az állatoknak az a konszenzus, hogy a kiindulótestsúly 80% körül kell tartani az állatok súlyát. Azaz ennek megfelelő mennyiségű táplálékot adtunk mindkét genotípusnak. Méréseink alapján nem volt különbség a di/di és di/+ állatok táplálékfelvételének mennyisége közt.

	di/+	di/di
pellet/nap (g)	21,26±1,16	18,24±1,35
pellet/nap/tskg (g/kg)	68,16±3,4	66,98±4,1
n	27	21

Irodalmi adatok azonban arra utalnak, hogy a di/di állatok táplálékpreferenciája más:

Csökkent az etanol preferencia (például Rigter H, Crabbe JC. Vasopressin and ethanol preference. I. Effects of vasopressin and the fragment DGAVP on altered ethanol preference in Brattleboro diabetes insipidus rats. *Peptides*. 1985 Jul-Aug;6(4):669-76.) a keserű íz nagyobb kerülésével együtt (például Gartside IB, Laycock JF. Increased aversion to bitter-tasting fluids in the Brattleboro rat. *Physiol Behav*. 1987;39(5):571-7.).

Nőtt a sópreferenciájuk (Yirmiya R, Holder MD, Derdikarian A. Salt preference in rats with hereditary hypothalamic diabetes insipidus (Brattleboro strain). *Behav Neurosci*. 1988 Aug;102(4):574-9.)

A zsíros „ételeket” kedvelték (valószínűleg galanin túlprodukció miatt; Odorizzi M, Max JP, Tankosic P, Burlet C, Burlet A. Dietary preferences of Brattleboro rats correlated with an overexpression of galanin in the hypothalamus. *Eur J Neurosci*. 1999 Sep;11(9):3005-14.; Odorizzi M, Fernet B, Angel E, Burlet C, Tankosic P, Burlet A. Galanin receptor antagonists decrease fat preference in Brattleboro rat. *Neuropharmacology*. 2002 Jan;42(1):134-41.). Érdekes módon a galanin mRNS szint növekedése alacsonyabb peptidtartalommal (fokozott ürítés?) járt alacsony leptin és magas ghrelin szintek mellett (Beck B, Max JP. Hypothalamic galanin and plasma leptin and ghrelin in the maintenance of energy intake in the Brattleboro rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Dec 7;364(1):60-5. Epub 2007 Oct 1.).

Szegedi kutatók 2016-ban publikált adatai a ghrelin direkt neurohipofízisre gyakorolt AVP ürítést serkentő hatásáról számoltak be (Gálfi M, Radács M, Molnár Z, Budai I, Tóth G, Pósa A, Kupai K, Szalai Z, Szabó R, Molnár HA, Gardi J, László FA, Varga C. Ghrelin-Induced Enhancement of Vasopressin and Oxytocin Secretion in Rat Neurohypophyseal Cell Cultures. *J Mol Neurosci*. 2016 Dec;60(4):525-530. Epub 2016 Oct 17.)

3.7. Egyetértek és üdvözlöm azt a felvetést a 77. oldalon, hogy a „Brattleborok esetén is felvetődik a kompenzációs mechanizmusok megjelenésének lehetősége”. A CRH esetén annak szintézise, PVN-ben történő felhalmozódása, és kiürülése (transzportja, in situ 'release'-e) merült fel, mint figyelembe vehető

A 335-ös cikk (Mlynarik és mtsai, 2007 Hormones and Behavior) hím állatokat vizsgált, di/+ kontroll állatokat használt és az *in situ* hibridizációs jel integrált denzitását számolta (azaz minden PVN-t tartalmazó metszeten - 16µm-es metszetekből minden 6. lett feldolgozva- megjelenő feketedés erősségét összeadtuk; lásd Barna és mtsai 2003 Brain Res Bull). Bár ez egy érzékenyebb módszer, de jobban érzékeny arra is, ha a feldolgozás során 1-1- metszet elveszik. Épp ezért későbbi munkánk során az irodalomban jobban elfogadott 3 legnagyobb kiterjedésű jel átlagát adtuk meg. A 2008-ban az Endocrinology-ban megjelent cikkünkben 10 napos hím di/di állatok agyában tapasztaltunk alacsonyabb mRNS szinteket, míg a 2015-ben a Psychoneuroendocrinology-ban publikált írásunkban is alacsonyabb CRH mRNS szinteket találtunk felnőtt hím di/di állatok PVN-jében (mindkét esetben di/+ kontrollokkal dolgoztunk). Ennek megerősítése az immuncitokémiai vizsgálat (32. ábra; +/+ kontrollal), illetve a szoptató anyákon kapott eredmények (29. ábra; di/+ kontroll). Összességében ezért azt gondolom, hogy a CRH szint nem tekinthető emelkedettnek a di/di állatok agyában.

VASOPRESSINERGIC CONTROL OF ACTH SECRETION

The diagram illustrates the signaling pathways for AVP and CRF-41 in regulating ACTH secretion. AVP binds to its receptor (R), activating Gq and PLC, leading to IP3 and DAG production. IP3 stimulates the ER to release Ca²⁺, which then stimulates the nucleus (N). CRF-41 binds to its receptor (R), activating AC and Gs, leading to ATP conversion to CAMP and activation of A-Kinase. Both Ca²⁺ and CAMP/A-Kinase stimulate the nucleus. The nucleus promotes POMC promoter RNA, leading to POMC mRNA. POMC mRNA is then translated into POMC, which enters the 'Rapid turnover pool' (containing ACTH) or the 'Stored pool' (containing ACTH).

Antoni Ferenc 1993-ban megjelent munkája (Front Neuroendocrinol. 1993 Apr;14(2):76-122.) molekuláris szinten taglalja az AVP CRH interakcióját az ACTH elválasztás szabályozásában. A Gq (AVP) és Gs (CRH) szignalizációs utak intracellulárisan kapcsolódnak össze. Elképzelésünk szerint ha az AVP szinergizáló hatása kiesik a megnövekedett CRH próbálja pótolni ezt a hatást.

A CRH-n kívül milyen egyéb neuroendokrin kompenzáció létezik? Másképpen szólva, a neuroendokrin szabályozások összehangolt egyensúlya miképpen kompenzál a Brattleboro állatoknál abba az irányba, hogy a robusztus vízszabályozási kiesés kezelhető legyen. Ehhez az állapothoz, nyilvánvalóan, igyekszik adaptálódni a szervezet.

A kompenzáló molekulák részletes ismertetésére a 4.3.-as kérdésre adott válaszomban térek majd ki. Mindenesetre megállapítható, hogy az állat a vízvesztést szemmel láthatóan nem tudja molekuláris szinten teljesen kompenzálni, ezért elődleges a magatartási kompenzáció. Az állat egyfolytában iszik, éjszaka is többször felkel (lásd megzavart cirkadian ritmus), az anyák még a szoptatást is többször megszakítják (Fodor és mtsai, 2012).

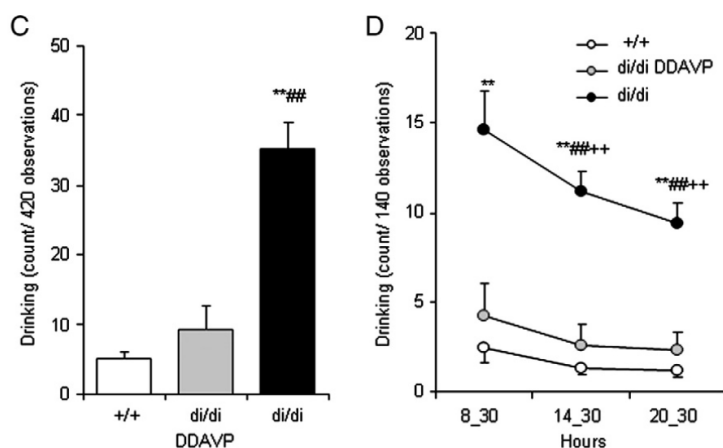


Fig. 3. Frequencies of the arched back posture (A, B) and drinking behavior (C, D) among 420 observations (A, C) and on different periods of the day (B, D; 140 observations/point) in AVP-deficient dams after DDAVP replacement. **p<0.01 vs. +/+; ###p<0.01 vs. di/di; ++p<0.01 vs. 8.30 h.

Továbbá mit tanultunk a humán patológia, a diabetes insipidus, szempontjából a kompenzációt illetően?

Bár nem kifejezetten a Brattleboro patkányokkal kapcsolatos kutatásaimat érinti, de centrális diabetes insipidus humánban kialakulhat traumás hipofízisnyélmetszés következtében is (Wijetilleka S, Khan M, Mon A, Sharma D, Joseph F, Sinha A, Das K, Vora J. Cranial diabetes insipidus with pituitary stalk lesions. QJM. 2016 Nov;109(11):703-708. Epub 2016 Apr 29. Review.).

Ennek a kísérleti modellje a „nyélzúzás” (posterior pituitary denervation, PPD), mely szintén diabetes insipidust okoz. Azonban az elroncsolt axonok a roncsolásnál képesek újabb szinaptikus végbunkókat létrehozni, és így az AVP (és oxitocin) ekkor az eminencia mediana területén képes lesz ürülni (Zelena D., Mergl Zs., Makara GB., Comparison of the Effect of High and Low Vasopressin Levels in Portal Circulation: Studies in Posterior Pituitary Denervated and Brattleboro Rats in New Research on Neurosecretory Systems, Nova Publishers, In New Research on Neurosecretory Systems 2008 Chapter XII. pp. 201-223.). Ez idővel a diabetes normalizálásához vezethet (Jurcovicová J, Kvetnansky R, Dobrakovová M, Jezová D, Kiss A, Makara GB. Prolactin response to immobilization stress and hemorrhage: the effect of hypothalamic deafferentations and posterior pituitary denervation. Endocrinology. 1990 May;126(5):2527-33.).

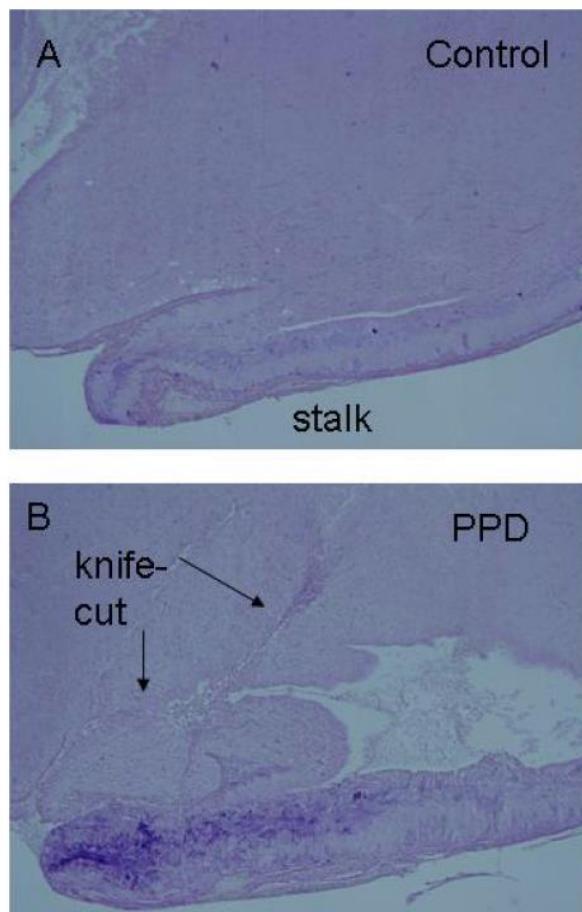


Figure 1. Microscopic picture of the brain 7 days after PPD. Sagittal section, Nissl staining. A. Sham operated, B. posterior pituitary denervated rats. The appearance of neurosecretory granules in the stalk-median eminence region is clearly visible on picture B as a consequences of stalk damage and formation of pseudo-axonterminals.

Ez jó példa az idegrendszeri plaszticitásra.

3.8. A neonatológiában jelentős a copeptin detektálása azokban az esetekben, amikor AVP szinteket szándékoznak mérni (pl. Everts and Wellman 2016, Frontiers in Pediatrics). Kérdés, hogy experimentálisan, pl. patkánykísérletekben, mi a tapasztalat a copeptin mérés alkalmazásával, segít-e a jobb megértéshez pl. Brattleboro állatoknál?

Állatkísérletekben nem „divatos” copeptin szintek mérése, mivel itt a mintavételezést lehet úgy igazítani, hogy az AVP ne bomoljon le és ezáltal direktben kimutatható legyen.

Azonban állatkísérletek derítettek fényt arra, hogy a copeptin (100nM-1 μ M) alacsony amplitúdójú, elnyújtott kalciumfelszabadulást okoz hipotalamikus idegsejteken (Gao X, Brailoiu GC, Brailoiu E, Dun SL, Yang J, Chang JK, Dun NJ. Copeptin immunoreactivity and calcium mobilisation in hypothalamic neurones of the rat. J Neuroendocrinol. 2008 Nov;20(11):1242-51. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01782.x. Epub 2008 Aug 22.), utalva arra, hogy nemcsak az AVP „dajkamolekulája”-ként van jelen szervezetünkben.

Annak bizonyítása, hogy a copeptin jó biomarker kardiovaszkuláris történésekben elsősorban humán vizsgálatokon alapul (Vargas KG, Kassem M, Mueller C, Wojta J, Huber K. Copeptin for the early rule-out of non-ST-elevation myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2016 Nov 15;223:797-804. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.08.304. Epub 2016 Aug 23. Review.), de például patkány kísérletek utaltak elsőként arra, hogy szívfali „stressz” (hipoxia) során lokálisan is felszabadulhat a szívből, melyet humán vizsgálatok is megerősítettek (Boeckel JN, Oppermann J, Anadol R, Fichtlscherer S, Zeiher AM, Keller T. Analyzing the Release of Copeptin from the Heart in Acute Myocardial Infarction Using a Transcoronary Gradient Model. *Sci Rep.* 2016 Feb 11;6:20812. doi: 10.1038/srep20812.).

3.9. A gyomor-bélrendszeri fekélyképződéssel kapcsolatban számomra nem világos, hogy mi a magyarázat azokra a megfigyelésekre, hogy idős állatban a gyomorfekély, míg fiatal állatokban a bélfekély képződés a kifejezettebb?

Vizsgálataink kiindulópontját a vazopresszin gyomorfekély kialakulására vonatkozó ellentmondó szerepe indukálta (lásd 2.4.2.5.1.). Az ellentmondó eredmények egyik lehetséges magyarázata az eltérő korú állatok alkalmazása lehet. Az AVP sokrétű szerepénél fogva számos ponton csatlakozhat a gyomorfekély kialakulásába támogatva sok védő és sok károsító folyamatot egyaránt. Az egyed kora befolyásolhatja, hogy az AVP károsító vagy védő hatása kerül túlsúlyba. Például a fiatalok mikrocirkulációja jó, ekkor az AVP képes lehet vazokonstriktorként viselkedni (lásd például Buwalda B, Nyakas C, Koolhaas JM, Luiten PG, Bohus B. Vasopressin prolongs behavioral and cardiac responses to mild stress in young but not in aged rats. *Physiol Behav.* 1992 Dec;52(6):1127-31.; a fiatal (de nem az idős) patkányokban szubkután AVP injekció elnyújtotta a stresszor-indukálta bradikardiát és immobilitást). Idősekben a mikrocirkuláció eleve rosszabb lehet és az AVP hatása az ereken kevésbé érvényesül. Ellenben az AVP-hiány hosszantartó következményei, például a stresszhormon-szintek vonatkozásában előtérbe kerülhetnek.

Vizsgálataink további lépését az jelentette, mikor próbáltuk nyomonkövetni a fekély gyógyulását, amit általában a gyomorfekély előidézése után 3 nappal szoktak megtenni. Magunk is meglepődtünk, hogy – bár a gyomorfekély meggyógyult – jelentős bélrendszeri ulcerációval találkoztunk, ami – nemritkán - halálozáshoz is vezetett (Filaretova LP, Bagaeva TR, Morozova OY, Zelena D. The healing of NSAID-induced gastric lesion may be followed by small intestinal and cardiovascular side effects. *J Physiol Pharmacol.* 2011, 62(6):619-25.). Ez már önmagában elég paradox jelenségnek tűnt, és erőteljesen utalt arra, hogy a gyomorban és a belekben zajló folyamatok – legalábbis - időben teljesen eltérő módon zajlanak.

Ezután kezdtük ezt a jelenséget (gyomorfekély gyógyulása, bélrendszeri fekélyek kialakulása) Brattleboro patkányokon is megvizsgálni. Eredményein alátámasztották, hogy a mechanizmusok közt is erőteljes eltérés van a gyomor és bélrendszeri folyamatok kapcsán. Mivel vizsgálatunk primer végpontjának az indometacin fekély utáni 3. napot tekintettük és ekkorra az állatok nagyrésze elpusztult, így nem sikerült megállapítanunk, a gyomor-bélrendszer melyik részén fordultak elő mortalitást növelő elváltozások. Ezért csak nagyobb létszámú Wistar állaton végzett kísérletünk eredményei alapján gondolhatunk a bélrendszeri fekélyek jelenlétére.

Egy lehetséges magyarázat, hogy felnőtt állatokon (kutyák) az AVP lassítja a gyomor ürülést és megzavarja a ritmikus működést (Xu X, Brining DL, Chen JD. Effects of vasopressin and long pulse-low frequency gastric electrical stimulation on gastric

emptying, gastric and intestinal myoelectrical activity and symptoms in dogs. Neurogastroenterol Motil. 2005 Apr;17(2):236-44.), míg ezzel ellentétben a belekben az elektrolit felszívódást elősegítő szerepe jótékony lehet (Xue H, Tang X. Effect of vasopressin on Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter (NKCC) and the signaling mechanisms on the murine late distal colon. Eur J Pharmacol. 2016 Jan 15;771:241-6. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.11.051. Epub 2015 Dec 4.).

Bár a gyomor-bélrendszerben lokálisan jelenlévő AVP szerepe is szóba kerülhetne, de a Brattleboro patkányok csak centrális diabetes insipidusban szenvednek, azaz perifériájukról nem hiányzik az AVP (Friedmann AS, Memoli VA, Cheng SW, Yu X, North WG. Vasopressin and vasopressin-associated neurophysin are present in gastric and duodenal cells of Brattleboro and Long-Evans rats. Ann N Y Acad Sci. 1993 Jul 22;689:522-5.).

4.1. A 75. oldalon, a krónikus stresszre vonatkozó következtetés szerint az „AVP HHM tengely aktivitásának fenntartásában betöltött szerepe nem lényeges krónikus stresszfolyamatok során”. Meglátásom szerint az összes vizsgálat viselkedési paraméter, impulzivitás, szorongás, depresszió, agresszió nem akut fiziológiai-patológiai folyamatokra épül, hanem krónikusra. Pl. a depresszió esetén a CMS-t is használják patkány modellként, ahogy azt hangsúlyozza és idézi is a disszertáció is (21-es citátum). Ezzel összecseng a további konklúzió, a 79-ik oldalon, mely szerint „A PVN ugyanakkor csak korlátozottan vesz részt a viselkedés és a stressz-tengely szabályozásában.”

Teljesen egyetértek a viselkedésre gyakorolt krónikus hatásokkal, megjegyzésem a HHM tengely hormonszintjeinek szabályozására akart vonatkozni. Valóban a krónikus stresszfolyamatok megnevezés szélesebb kategóriát takar.

Kérdésem, hogy az AVP-vel kapcsolatos kutatások végül mennyiben járultak hozzá a viselkedésbeli változások neuroendokrin szabályozásának megértéséhez, illetve humán vonatkozásban melyik irányba segítik a terápiát?

Kutatásaink megerősítették, hogy az AVP a magatartásra valószínűleg nem a HHM tengely hormonjain keresztül hat, azaz hatását nem a hipofízis V1b receptorainak manipulálásával lehet befolyásolni. A gyógyszerfejlesztésben ezért a teljesen szelektív V1b receptor antagonisták helyett a relatíve nagyobb V1a receptor antagonistá hatással bíró vegyületek lehetnek kedvezőbbek (a tisztán V1a antagonisták vazodilatátor, vércsökkentő hatása a pszichés kórképek kezelésénél mellékhatásként jelentkezhet, bár sikeresen alkalmazzák őket szívelégtelenségben, miokardiális infarktuszban, agyi vazospazmusban és strokeban is) (Zelena D. Vasopressin in health and disease with a focus on affective disorders. Cent Nerv Syst Agents Med Chem. 2012 Dec;12(4):286-303. Review.).

4.2. A 'szuprahypothalamikus' neuroendokrinológia, de főleg a pszichoneuroendokrinológia már jópár évtizede kutatja a hormonok szerepét azokban az idegrendszeri szerveződésekben is, melyeket a disszertáció tárgyal: szorongás-depresszió, agresszivitás, impulzivitás, stb. E kutatások megközelítésében, de főleg a tanulás és memória folyamatok szabályozásának kutatásában számos hazai kutatócsoport vett részt és dolgozik jelenleg is, tehát

hazánkban a viselkedés élettan és – kórélettan neuroendokrinológiája hosszú tradíciókra tekint vissza.

Köszönöm a felvetést. Földrajzi elhelyezkedésünkénél fogva kutatócsoportunk szoros együttműködést folytat a KOKI-n belül működő más neuroendokrinológiai csoportokkal és az Üllői út másik oldalán található SOTE Anatómia Intézetének számos kiemelkedő neuroendokrinológusával. Nyomon követjük a SOTE Élettan Intézetében humán mutációkon alapuló V2 receptor szabályozás molekuláris mechanizmusaival foglalkozó kutatásokat, valamint az Anatómia Intézetben madarak vazotocinjával foglalkozó közleményeket is. Ezen túl Szegedről származtak az első Brattleboro tenyészpárjaink is. Volt TDK hallgatóm az MTA TTK Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai Intézetében kutyákon folytat oxitocinnal kapcsolatos kutatásokat.

Mi a véleménye a jelöltnek a vazopresszin és oxitocin tanulás és memóriára kifejtett hatásáról?

Az AVP hatásáról kiterjedtebb ismeretekkel rendelkezem, a következőkben a Brattleboro patkányokkal kapcsolatos tudásomat összegzem. A Brattleboro patkányok rosszabb memóriája az egyik eleme annak, hogy megfelelő skizofrénia modellnek tekinthetők (negatív – kognitív tünet, mely a jelenleg elérhető terápiákra rosszabbul reagál) (Demeter és mtsai, 2016 Behav Brain Res; novel object recognition, social recognition). Mivel az AVP a szociális kapcsolatokban fontos szerepet tölt be (lásd dolgozat anyai magatartás, agresszió részei és Zelena D. Vasopressin in health and disease with a focus on affective disorders. Cent Nerv Syst Agents Med Chem. 2012 Dec;12(4):286-303), ezért szinte elvárható volt, hogy a szociális memória vonatkozásában a Brattleboro állatok rosszabbul teljesítsenek. Ezt a kérdést madgeburgi kollaborátorom, Mario Engelmann vizsgálta kiterjedten az általa kifejlesztett szociális diszkrimináció tesztjében (hozzátenném, hogy számomra kicsit értelmezhetetlen az általa rövid távú memóriának tartott fél-egy órás emlékezés, szemben a 24 órás hosszútávú memóriával). Korai munkái a szeptumot tekintették az AVP memóriára gyakorolt fő helyének (Engelmann M, Landgraf R. Microdialysis administration of vasopressin into the septum improves social recognition in Brattleboro rats. Physiol Behav. 1994 Jan;55(1):145-9.), míg 2010-ben a Nature-ban közölt írásukban a bulbus olfactorius vazopresszinerg rendszerét emelték ki a szociális felismerésben (Tobin VA, Hashimoto H, Wacker DW, Takayanagi Y, Langnaese K, Caquineau C, Noack J, Landgraf R, Onaka T, Leng G, Meddle SL, Engelmann M, Ludwig M. An intrinsic vasopressin system in the olfactory bulb is involved in social recognition. Nature. 2010 Mar 18;464(7287):413-7. doi: 10.1038/nature08826. Epub 2010 Feb 24.). Bár mindezek alapján azt gondolhatnánk hogy az AVP jó lehet például az Alzheimer kór okozta memóriefunkciók javítására, de nem igazán befolyásolja az Alzheimerre jellemző markerek megjelenését (Varga J, Klausz B, Domokos Á, Kálmán S, Pákáski M, Szűcs S, Garab D, Zvara Á, Puskás L, Kálmán J, Tímár J, Bagdy G, Zelena D. Increase in Alzheimer's related markers precedes memory disturbances: studies in vasopressin-deficient Brattleboro rat. Brain Res Bull. 2014 Jan;100:6-13. doi: 10.1016/j.brainresbull.2013.10.010. Epub 2013 Oct 28.), valamint adása számos mellékhatással járhat (lásd a dolgozat alapján a stressz-tengely aktiválódása, szorongás, depresszió).

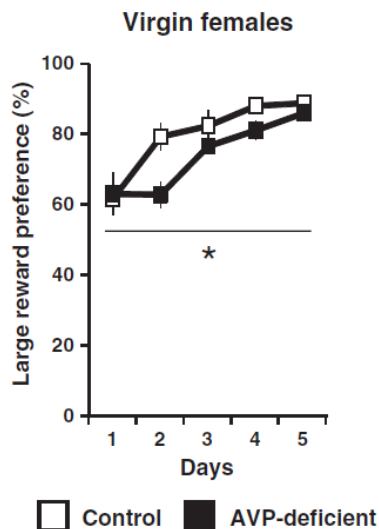


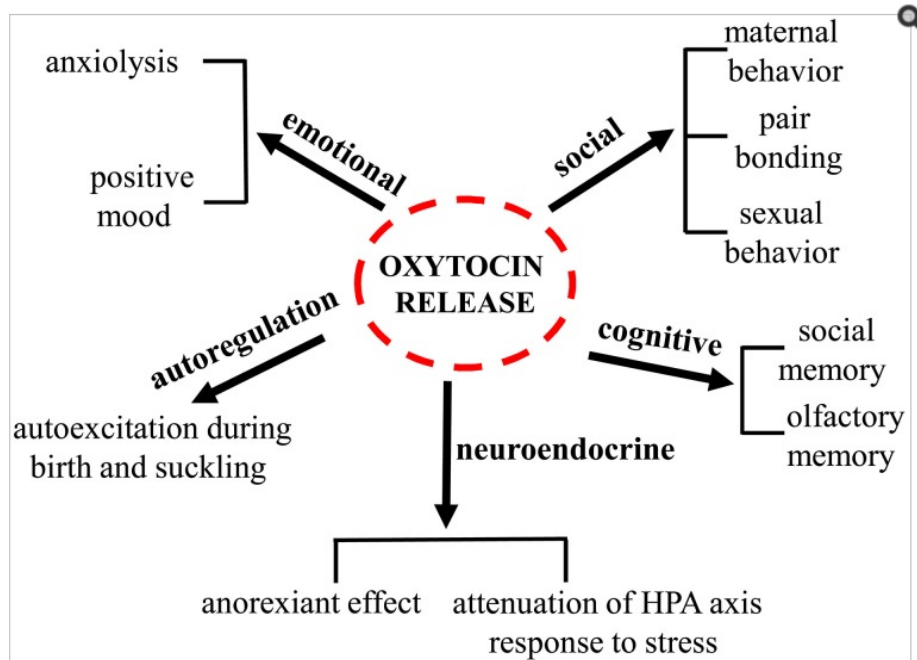
Fig. 1. Effects of vasopressin (AVP) deficiency on learning in virgin female Brattleboro rats in the training phase of the delay discounting paradigm (*Experiment 1*). AVP-deficient rats showed an overall decreased learning ability. * under the line denotes an overall significant difference between the two genotypes ($p < 0.05$).

Továbbá az impulzivitás vizsgálatának első fázisa, az operáns tanulás során nem volt hatása az AVP-hiálynak (Aliczki M, Fodor A, Balogh Z, Haller J, Zelena D The effects of lactation on impulsive behavior in vasopressin-deficient Brattleboro rats *Horm Behav* 2014 Aug 10;66(3):545-551. doi: 10.1016/j.yhbeh.2014.08.002.), és a nőstény állatokban a tárgydiszkriminációs, de még a szociális felismerési teszteket sem befolyásolta (lásd korábban bemutatott táblázat: Fodor és mtsai, 2016 *Physiology and Behavior*). Ezért az AVP-t csak nagy fenntartással lehet terápiás célra használni.

Az oxitocin talán az AVP-nél kicsit divatosabb molekula a szociális kötődés, bizalom kialakításban játszott kulcsszerepe miatt. Szociális szerepével összhangban ez a molekula is fontos a szociális felismerés, memória kialakulásában. Valóban, az AVP-vel ellentétben ez nőstényekben is javította a rövidtávú (max 3 óráig) szociális felismerő képességet (Engelmann M, Ebner K, Wotjak CT, Landgraf R. Endogenous oxytocin is involved in short-term olfactory memory in female rats. *Behav Brain Res*. 1998 Jan;90(1):89-94.). A Pécsi Egyetem Élettan intézetéből nemrég közölt cikk szerint a centrális amygdala oxitocin receptorai fontosak a helypreferencia, mint egyfajta kondicionálásos tanulás kialakulásában (László K, Kovács A, Zagoracz O, Ollmann T, Péczely L, Kertes E, Lacy DG, Lénárd L. Positive reinforcing effect of oxytocin microinjection in the rat central nucleus of amygdala. *Behav Brain Res*. 2016 Jan 1;296:279-85. doi: 10.1016/j.bbr.2015.09.021. Epub 2015 Sep 16.). Mindesetre a terápiás próbálkozások során itt is figyelembe kell venni a molekula szerteágazó szerepét (lásd alább idézet ábra: Romano A, Tempesta B, Micioni Di Bonaventura MV, Gaetani S. From Autism to Eating Disorders and More: The Role of Oxytocin in Neuropsychiatric Disorders. *Front Neurosci*. 2016 Jan 12;9:497. doi: 10.3389/fnins.2015.00497. eCollection 2015.).

Igaz, ez sokszor egyöntetűen pozitív, a stresszcsökkentéstől a szociális kötődés növelésén át az édességkerülésig terjedően (Leng G, Sabatier N. Oxytocin - The Sweet Hormone? *Trends Endocrinol Metab*. 2017 Mar 7. pii: S1043-2760(17)30024-3. doi: 10.1016/j.tem.2017.02.007.).

Figure 1



Oxytocin regulatory control of different and complex processes.

4.3. A 78-ik oldalon a 8. táblázat az AVP-vel kolokalizált peptideket foglalja össze. Az itt felsorolt bioaktív anyagok között vannak olyanok, melyek „átvehetik a hiányzó AVP HHM szabályozó szerepét”, ahogy ezt a megbeszélés állítja, de a táblázatban szereplő peptidekre nincs utalás, csak pl. az atriális natriuretikus peptid, hisztamin, katecholaminok szerepelnek példaként, melyek nem találhatók a táblázatban. Tehát kérdésem az, hogy a kolokalizált peptidek közül melyekről állítható, hogy átveszi az AVP szerepét pl. a HHM tengely szabályozásában, vagy valamelyik más vizsgált funkcióban?

Valóban a külön felsorolt molekulák nem kolokalizálnak az AVP-vel, hanem mintegy a „rendszer szintjén” helyettesíthetik az AVP HHM tengelyt szabályozó szerepét. Félrevezető volt ebben a tekintetben a táblázat említése után szereplő összekötő mondat („Így tanulmányok mutatnak rá, hogy…”).

A szervezet szintjén a stresszadaptáció kompenzálására megemlíthetjük, hogy a di/di állatokban fokozott a szimpatikus idegrendszeri aktivitás (Kvetnansky R, Jezova D, Oprsalova Z, Foldes O, Michajlovskij N, Dobrakovova M, Lichardus B, Makara GB (1990) Regulation of the sympathetic nervous system by circulating vasopressin. AdvExpMedBiol 274:113-134.).

Az AVP-hez hasonlóan a PVN-ben és SON-ben szintetizáló „testvérpeptid” az oxitocin a di/di állatok vízvesztésének kompenzálására is képes lehet, hiszen az AVP receptorokhoz is kötődik (Mouillac B, Chini B, Balestre MN, Jard S, Barberis C, Manning M, Tribollet E, Trumpp-Kallmeyer S, Hoflack J, Elands J, et al. Identification of agonist binding sites of vasopressin and oxytocin receptors. Adv Exp Med Biol.

1995;395:301-10. „the agonist binding site is similar in all members of the receptor family”). Az AVP receptorokon hatva tulajdonképp más AVP funkciókat is helyettesíthet, bár ezen hatásait ellensúlyozhatja az oxitocin receptorok keresztül megvalósuló hatás (lásd HHM tengely gátlás a PVN szintjén; Zelena D., Jain SK., Oxytocin and Vasopressin in Stress and Stress-Related Diseases: Yin/Yang Counterpairs or Substitutes? Nova Publisher, In: Handbook of Oxytocin Research Editor: Hugo Jastrow and Daniela Feuerbach, 2009 Chapter 1. p 1-34). Illetve az oxitocin saját receptorán keresztül is befolyásolhatja a vízvisszaszívást (Han JS, Maeda Y, Knepper MA. Dual actions of vasopressin and oxytocin in regulation of water permeability in terminal collecting duct. *Am J Physiol.* 1993 Jul;265(1 Pt 2):F26-34.). Meg kell állapítanunk, hogy az oxitocin nem kolokalizál AVP-vel (Dierickx, K; Vandesande, F. Immunocytochemical localization of the vasopressinergic and the oxytocinergic neurons in the human hypothalamus. *Cell Tissue Res*, 1977 184, 15-27.), így ez is „rendszer-szintű” kpmenzációt jelent.

A következőben idézek készülő könyvfejezetünkből (Zelena D and Engelmann M: The Brattleboro rat: The first and still up-to-date mutant rodent model for neuroendocrine research).

A PVN idegsejtjei a központi idegrendszerben előforduló csaknem összes peptidet tartalmazzák. Tipikus az AVP-dynorphin és oxitocin-kolecisztokinin (CCK) kolokalizáció (Sherman TG, Day R, Civelli O, Douglass J, Herbert E, Akil H, Watson SJ. Regulation of hypothalamic magnocellular neuropeptides and their mRNAs in the Brattleboro rat: coordinate responses to further osmotic challenge. *J Neurosci.* 1988 Oct;8(10):3785-96.). Érdekes, hogy a di/di állatok dynorhin szintje nem változik, míg az oxytocin-CCK szintek nőnek a kontroll állatokhoz képest (Day NC, Hall MD, Hughes J. Modulation of hypothalamic cholecystokinin receptor density with changes in magnocellular activity: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience.* 1989;29(2):371-83.). A “nerve growth factor inducible peptide” (VGF) szintje is emelkedik, ami hozzájárulhat a Brattleboro állatok magnocelluláris sejtjeinek hipertrófiájához (van den Pol AN, Decavel C, Levi A, Paterson B. Hypothalamic expression of a novel gene product, VGF: immunocytochemical analysis. *J Neurosci.* 1989 Dec;9(12):4122-37).

Korábban volt szó a CRH-ról és az esetleges kompenzációról (3.7.).

Az angiotenzin II szintje alacsonyabb a di/di állatban, mely hozzájárul az aldoszteron-szint csökkenéshez (Bundzykova és mtsai, CEMN 2008). Így ez nem tűnik jó kompenzáló faktornak.

A galaninról korábban szoltunk (3.6. táplálék preferencia változás).

Bár a nesfatin-szintről nincs adatunk di/di állatban, de ez a peptid kolokalizál AVP-vel és vizsgálataink szerint képes lehet a HHM-tengelyt aktiválni (Könczöl K, Bodnár I, Zelena D, Pintér O, Papp RS, Palkovits M, Nagy GM, Tóth ZE. Nesfatin-1/NUCB2 may participate in the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Neurochem Int.* 2010 Oct;57(3):189-97. doi: 10.1016/j.neuint.2010.04.012. Epub 2010 May 6.).

Végül, de nem utolsó sorban a vazóaktív intestinális peptid (VIP) szint is emelkedett a di/di állatban (Mezey E. Vasoactive intestinal polypeptide immunopositive neurons in the paraventricular nucleus of homozygous Brattleboro rats. Neuroendocrinology. 1986;42(1):88-90.) és képes potenciózni a CRH ACTH-szint emelő hatását (Léonard JF, Bluet-Pajot MT, Oliver C, Kordon C. Interaction of vasoactive intestinal peptide (VIP) and growth hormone releasing factor (GRF) with corticotropin releasing factor (CRF) on corticotropin secretion in vitro. Neuropeptides. 1988 Oct;12(3):131-3.), azaz a di/di állatban jól kompenzálhatja a kieső AVP hatást.

És még sokan mások, „de ez már egy másik történet és elbeszélésére más alkalommal kerül majd sor...” (Michael Ende: Végtelen történet).

4.4. 79-ik oldalon a következtetés így hangzik: A PVN ugyanakkor csak korlátozottan vesz részt a viselkedés és a stressz-tengely szabályozásában.” Gondolom az mPVN-ről állítható ez, mivel a PVN szubstruktúrák tárgyalásáról van itt szó.

Igen, az egész bekezdés a magnocelluláris PVN-re vonatkozik.

4.5. A 99. oldalon 6.5.1. „Szorongás-szerű viselkedés” tárgyalásának első sorában irodalmi idézeteket találunk arra, hogy az AVP-nek szorongás csökkentő szerepe van. A következő mondat, ezzel ellentmondásban, azt idézi, hogy a V1 antagonistáknak is szorongáscsökkentő hatása van (263-as idézet). Ez utóbbi eredmények megfelel a 48-as ábra, ami azt mutatja, hogy a di/di állatok több időt töltenek a megemelt keresztpalló nyílt karjában, tehát az AVP hiánya csökkenti a szorongást.

Sajnos elírtam az első mondatot. Az irodalmi adatok az AVP hatás kiiktatásának szorongáscsökkentő szerepére utalnak.

259-es idézet V1a receptor KO egérben

262-es idézet V1 receptor antisense

554-es idézet nem-peptid AVP antagonisták

Ebben a kísérletben DDAVP-t alkalmaztak s.c. ozmótikus minipumpában, ami nem változtatott a di/di állatok viselkedésén. A disszertáció következtetése az, hogy a perifériáról nem jut be az agyba a DDAVP ezért centrális hatásmechanizmusra lehet következtetni.

Érdekes megjegyezni, hogy a DDAVP akut adása szorongáskeltő is lehet (Mak P, Broussard C, Vacy K, Broadbear JH. Modulation of anxiety behavior in the elevated plus maze using peptidic oxytocin and vasopressin receptor ligands in the rat. J Psychopharmacol. 2012 Apr;26(4):532-42. doi: 10.1177/0269881111416687. Epub 2011 Sep 2.), bár a szerzők maguk is elismerik, hogy az általuk alkalmazott 1 és 5mg/kg (szemben a miáltalunk használt 10ng/h dózissal) az agyba is bejuthat, illetve a hipofízis V1b receptorain a HHM tengely működését befolyásolhatja, valamint a simaizmok V1a receptorain keresztül erősszehúzódást is okozhat. Ez esetünkben nem áll fenn.

Csak érdekességként jegyezném meg, hogy újabb vizsgálatok szerint DDAVP adása csökkenti az operáció alatt a vérzést, és a von Willebrand faktornak, mint a metasztázis

ellenállóképesség fő komponensének szintjét emeli, ezáltal a keringő tumorsejtek száma is csökken (Weinberg RS, Grecco MO, Ferro GS, Seigelshifer DJ, Perroni NV, Terrier FJ, Sánchez-Luceros A, Maronna E, Sánchez-Marull R, Frahm I, Guthmann MD, Di Leo D, Spitzer E, Ciccia GN, Garona J, Pifano M, Torbidoni AV, Gomez DE, Ripoll GV, Gomez RE, Demarco IA, Alonso DF. A phase II dose-escalation trial of perioperative desmopressin (1-desamino-8-d-arginine vasopressin) in breast cancer patients. Springerplus. 2015 Aug 19;4:428. doi: 10.1186/s40064-015-1217-y. eCollection 2015.).

Kérdés, akkor alkalmaztak-e ozmotikus minipumpát a DDLVP i.c.v. bejuttatására vagy sem?

További vizsgálataink során részben mikrodialízissel a PVN és a szeptum területére juttatunk AVP-t, részben adenoasszociált vírus vektor segítségével tartósan pótoltuk a PVN AVP termelését.

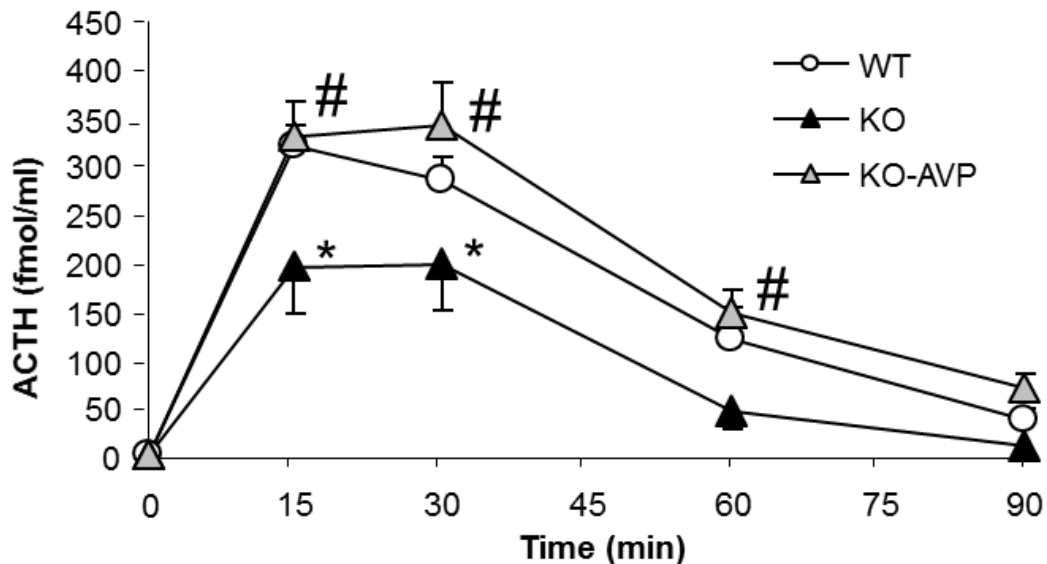
Magatartási válaszok összefoglalása: (Csikota és mtsai, 2016 Stress)

di/+ = heterozygous; +/+ = homozygous AVP-synthetising Brattleboro rat; DW = defensive withdrawal; EPM = elevated plus maze; FS = forced swimming; sucrose = sucrose preference/anhedonia test; DDAVP = desmopressin, V2 receptor agonist; ND = not determined; PVN = paraventricular nucleus of the hypothalamus; + = $p < 0.05$, ++ = $p < 0.01$ significant difference between di/di and control animals; (+) = tendency towards, - = no difference

Experimental subject	Treatment	Control genotype	DW	EPM	FS	Sucrose	Publication
Male	None	di/+	ND	-	++	+	Mlynarik 2007
Female	None	+/+	ND	+	+	+	Fodor 2015
Lactating	None	+/+	ND	-	+	+	Fodor 2012
Male	DDAVP	+/+	+	+	++	-	Balázsfői 2015
Male	Retrodialysis of AVP into the PVN	+/+	+	+	ND	ND	
Male	Retrodialysis of AVP into the septum	+/+	-	(+)	+	ND	
Male	AVP synthesis rescue in the PVN	+/+	(+)	(+)	(+)	ND	

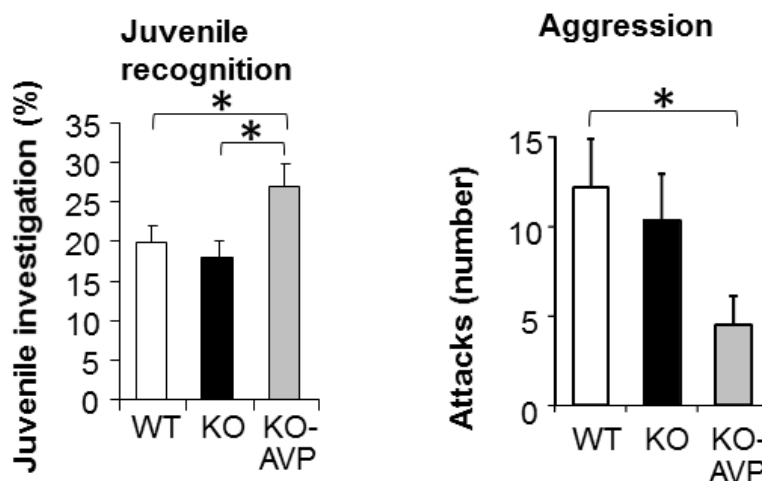
Némi csúsztatással (mivel sok helyen csak marginális hatások voltak láthatók) a PVN-be és szeptumba juttatott AVP nem befolyásolta az AVP-hiányos állatok kevésbé szorongó és depressziós fenotípusát, míg a tartósabb AVP-szint helyreállítás a +/+ fenotípushoz közelebbi magatartásprofilot hozott létre.

Legutóbbi, közlés alatt álló munkánk során a tisztán magnocelluláris SON-be pótoltuk vírus vektorral az AVP-t. Legmeglepőbb eredményünk, hogy ez normalizálta a csökkent stressz-indukálta ACTH-szint emelkedést (aminek szabályozásában a CRH-val kolokalizáltan a PVN kissejtes állományából ürülő AVP-t szokás figyelembe venni).

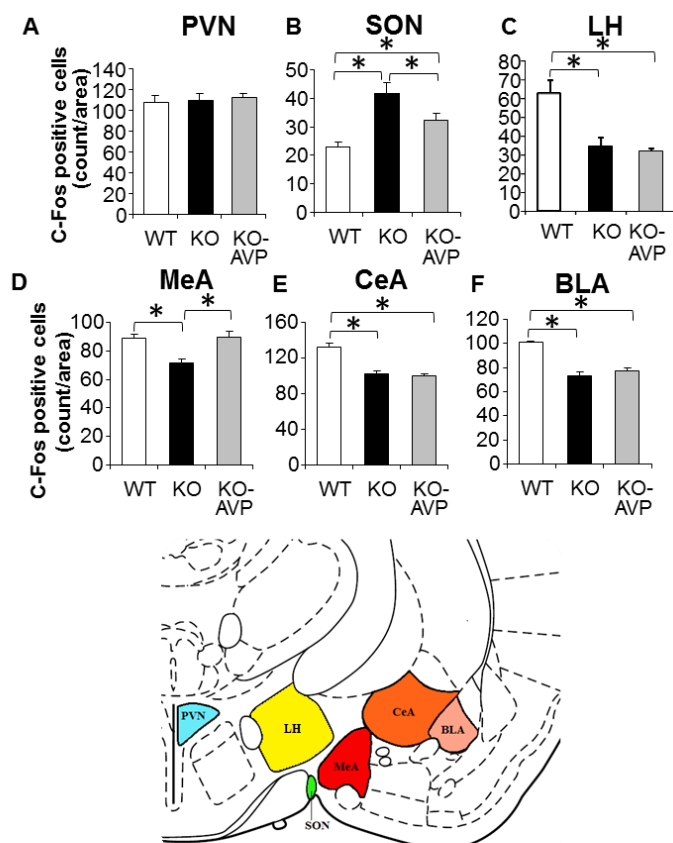


Immun stressz (iv tojásfehérje) és sorozat vérvétel a véna jugulárison keresztül. WT: +/+; KO: di/di, AVP-hiányos, KO-AVP: di/di az SON-be adanoasszociált vírus vektorral AVP visszajuttatása min 2 héttel a vizsgálat előtt.

Még érdekesebb, hogy míg alapvetően nem különbözött a +/+ és di/di állatok szociális érdeklődése és agressziója, az SON-be adott AVP - mintegy az agyi AVP egyensúly megbomlása révén - egy érdeklődőbb, kevésbé agresszív állatot hozott létre.



Úgy tűnik, hogy ebben a folyamatban a mediális amigdalának juthat nagyobb szerep, mert c-Fos méréseink során ennek a területnek az aktivációja „normalizálódott” az SON kezelt di/di állatokon. Szeretnénk tisztázni a vonatkozó receptor altípust, mely feltételezésünk szerint V1a és a GABAerg sejteken fordulhat elő.



Hipoglikémiás stresszor után 60 perccel perfundált állatok agyain c-fos immuncitokémiát végeztünk +/- (WT) és di/di (KO) állatokon összehasonlítva őket az SON-be vírus vektor segítségével visszahelyezett AVP hatásával (KO-AVP) (n = 7-8/csoport) SON: nucleus supraopticus, PVN: paraventricular nucleus of the hypothalamus, LH: lateral hypothalamus, MeA: medial amygdala, CeA: central amygdala, BLA: basolateral amygdala. * legalább $p < 0,05$ szignifikáns különbség a csoportok közt

Még egyszer nagyon köszönöm a bíráló munkáját és remélem, hogy válaszaim kielégítően világították meg a dolgozatomban nyitva maradt kérdéseket.

Budapest, 2017. április 20.

Zelena Dóra

Magatartás Neurobiológiai Osztály
Magyar Tudományos Akadémia
Kísérleti Orvostudományi
Kutatóintézet

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