

Válasz Dr. Gereben Balázs opponensi véleményére és kérdéseire

Először is szeretném megköszönni Dr. Gereben Baláznak a körültekintő munkáját, valamint gondolatébresztő kérdéseit, melyek többek között rávilágítottak az értekezés klinikailag releváns aspektusaira. A feltett kérdésekre válaszaimat az alábbiakban adom meg.

1. Ismertek-e a prolaktin-felszabadító peptidet kódoló emberi génnek fenotípussal rendelkező mutációi?

A human prolaktin-felszabadító peptid/hormon (PrRP/PRLH) génje a 2. (<https://www.ensembl.org>) kromoszómán helyezkedik el. A PrRP-nek egy hasítási variánsa és 181 ortológja ismert. A gén két exont tartalmaz, az mRNS (NM_015893.1) 264 bázispár hosszúságú, melyben az exonok az 1-100. és a 101-264. bázispárokig terjednek. Az 5' vég szignál peptiddel kezdődik (1-66. bázispárok). A lehetséges kétféle érett fehérje keletkezése nem az exonhatároknak megfelelően történik. A 67-159. bázispárokig terjedő transzláció a PrRP31 a 100-159. bázispárok közötti transzláció a PrRP20 nevű fehérje átírásához vezet, ahol a névben a számok a fehérjét felépítő aminosavak számát jelölik. A peptidek C terminális végén található Arg-Phe-NH₂ motívum alapján a PrRP az RFamide peptid családba sorolható. A transzkriptum 432 allél variánssal rendelkezik, ebből 371 tartalmaz aminosav eltérést a többi mutáció csendes. Összesen 33 variáns rendelkezik global minor allele frequency (GMAF) adattal, ezek közül a leggyakoribb 6 variáns gyakorisága 0,1% és 0,8% közé esik, a többi kisebb, mint 0,1%. A variánsok eltérő aminosavainak szekvencia homológiája és fizikai-kémiai adottságai szerint (SIFT adatok) 73 variáns lehetne elméletileg káros hatású. A protein működése fizikai és komparatív elméleti számítások alapján (PolyPhen adatok) 62 variánsban jósolható károsodottnak. A két halmaz metszete 9 variánst ad ki ezek közül összesített értékelésben a Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) érték alapján 1 minősül valószínűleg károsnak ennek előfordulási aránya GMAF =0,0392%. A frekvencia értékekkel rendelkező variánsok közül ezenkívül még 12 tekinthető SIFT érték alapján károsnak, ebből 9-nek a PolyPhen értékelése is a "valószínűleg ártalmas" kategóriába esik. A 0,1% GMAF értéknél magasabb arányban előforduló variánsok közül 3 variáns valószínűsíthető ártalmasnak a SIFT és PolyPhen értékelés alapján is, de a CADD értékelése ezeknek megfelelő. Sajnos, egyik variánshoz sincs ismert klinikai adat (ClinVar adabázis).

A PrRP gén variánsainak vizsgálatáról eddig egy cikk jelent meg, 2003-ban, melyben egyúttal a GPR10 (a PrRP saját receptora) variánsait is vizsgálták [1]. A szerzők 94 súlyosan elhízott gyerek génállományát tanulmányozták. A PrRP génben négy polimorfizmust találtak, melyek mindegyike csendes volt. Ugyanakkor nyolc GPR10 variánst azonosítottak, melyek közül kettő aminosav változást eredményezett. Ezek 1% illetve 7% allélgyakorisággal fordultak elő, mely értékek azonban a normál súlyú kaukázusi populációban (1084 egyén) talált allélgyakoriságoktól nem tértek el szignifikánsan. Egyik polimorfizmus sem mutatott összefüggést

a testtömeg indexszel (BMI), és az éhomi glükóz, inzulin, triglicerid és koleszterin szintek sem mutattak összefüggést a polimorfizmusokkal. Ezzel szemben, a kontroll populációban a két leggyakoribb GPR10 variáns fenotípusosan szignifikánsan alacsonyabb vérnyomással társult. Ez az eredmény jól illeszkedik a PrRP ismert kardiovaszkuláris hatásához, patkányokban ugyanis a PrRP centrálisan alkalmazva emeli a vérnyomást [2].

A fenti adatok tehát nem tükrözik a PrRP, illetve a GPR10 génhiányos egereknél tapasztaltakat, hiszen ezekben az állatokban a vezető tünet a felnőttkorban jelentkező elhízás, amit számos munkacsoport leírt [3-7]. Nemrégiben azonban Talbot és munkatársai 20 db GPR10 variánst vizsgáltak meg. Közleményük a korábbinál nagyságrendekkel nagyobb (152837 fő), heterogén human populáció elemzésén alapszik [8]. A szerzők jelentős mértékű nominális összefüggést találtak a GPR10 ritka kódoló variánsai (MAF<0,1%, 139 variáns) és a súlyos elhízás (BMI>40 kg/m², N=2725/152837 fő) között. A munkacsoport az elhízásra vonatkozó adatokat az egyik ritka génvariáns egerekben való kifejezésével is megerősítette. Figyelemreméltó hogy a funkcióvesztéshez kapcsolódó variánsok egyéb patológias fenotípusokban is manifestálódtak, a hordozók csökkent fájdalomérzettel, alvás-, memória- és hangulatzavarokkal, például szorongással és depresszióval küzdöttek.

A PrRP rendszer és a hangulatzavarok szoros összefüggését támasztják alá Bagdy György professzor úr legutóbbi eredményei is, melyeket a 2025. májusi NAP3 beszámoló alkalmával mutatott be. Több, mint háromezer személy élettartam-depresszió diagnózisát és az összes neuropeptid génjeiben vizsgált variánsokat összevetve kiderült, hogy a PrRP gén a legerősebb asszociációt mutató neuropeptidok 25%-ba, azaz Q1 kategóriába esik. A GPR10 receptor génjét szintén vizsgálták. Ehhez egy a depresszió súlyosságát mérő kérdőívet használtak, melyet több, mint százezer ember töltött ki. A pontszámok alapján a GPR10 a neuropeptid receptorok génjei között a legerősebb asszociációt mutató 10%-ba, azaz D1 kategóriába sorolható. Az adatok jelenleg még publikálatlanok, de már véglegesnek tekinthetők.

A fentiek hangsúlyozzák az állatkísérletekből származó korábbi eredmények transzlációs relevanciáját. A PrRP génhiányos egerek kontextuális félelmi kísérletekben erőteljesebb félelmi reakciót mutatnak, mint a vad típusú állatok, vagyis a stressz élménye erősebben rögzül náluk [9]. Ezenfelül, saját korábbi publikációinkban bebizonyítottuk, hogy patkányokban a PrRP-rendszer funkcionális deficitje áll a depresszió-szerű viselkedés kialakulásának hátterében [10]. Ebben a közleményben rámutattunk a PrRP jelátvitel stressz-okozta human hangulati betegségekben való fontosságára is, mivel öngyilkosokban GPR10 receptor expresszió csökkenést mutattunk ki a hipotalamusban. Eredményeink jelentőségét az újonnan megjelenő adatok egyre inkább alátámasztani látszanak.

2. Milyen allél-frekvenciával fordulnak elő a nesfatint kódoló emberi NUCB2 gén testtömeg indexszel összefüggő genetikai variációi?

A human NUCB2 gén a 11. kromoszómán található. Az Ensembl adatbázisban 9 hasítási variánsát és 278 ortológját tartják nyilván (<https://www.ensembl.org/>). A gén 14 exont tartalmaz, és 420 AS hosszúságú. Biológiai aktivitást a prohormon konvertázok feltételezhető hasítási helyei alapján lehetségesen keletkező nesfatin-1 peptid esetében mutattak ki, mely a 3-5. exonról íródik át, és a szignál peptidet követő első 82 AS-ig terjed. A nesfatin-1-et rágsálókban mint anorexigén, táplálék felvételt csökkentő peptidet írták le 2006-ban. Az elhízás etiológiájában a genetikai tényezők meghatározóak, ezért a humán genomban előforduló NUCB2 allévariációk és ezek fenotípussal való összefüggései fontos információt közvetítenek.

A NUCB2 génnek 22576 variánsát tünteti fel az Ensembl adatbázis, a legtöbbhöz nincs klinikai szignifikanciáról szóló adat. Kilenc variáns klinikai szignifikanciája „ismeretlenként”, illetve „valószínűleg jóindulatúként” jelölt. Számos publikáció született azonban a NUCB2 gén polimorfizmusok és a testtömeg index összefüggésével kapcsolatban.

Mariman és munkatársai 30 kaukázusi felnőtt személy genomját elemezték több génre nézve. A kohort (19 nő, 11 férfi) viszonylag fiatal (19,0-40,4 év) és rendkívül elhízott (átlagos BMI=51,1 kg/m²) emberekből állt. A NUCB2 esetében a 339. AS helyén találtak elhízással összefüggően az eredeti glutamin (Gln) helyett glutaminsav (Glu) cserét, melyet egyetlen nukleotid polimorfizmusa okozott (Ensembl adatbázisban nem szerepel). Az allél gyakoriságok (Gln/Glu) a Holland Genom Adatbázisban 67,1% / 32,9% a kohortban 98,3% / 1,7% voltak [11]

Zegers és munkatársai 1049 elhízott (BMI > 30 kg/m²) és 315 normál testsúlyú egyén (BMI < 25 kg/m²) genetikai analízisét végezték el belga kaukázusi populációban. A vizsgálatból kizárták a diabetesben, vagy prediabetesben szenvedő betegeket, valamint a posztmenopauza korú nőket [12]. A vizsgált génterület magába foglalta a NUCB2 gén 10 kb hosszúságú 5' és 3' kiterjesztett környezetét is. Csak az 5%-nál nagyobb minor allél frekvenciával (MAF) rendelkező egy nukleotid polimorfizmusokat (single nucleotid polymorphism, SNP) vették figyelembe. Logisztikus regresszió analízissel elemezve az adatokat 3 SNP mutatott szignifikáns összefüggést az elhízással, de csak férfiakban. Ezek gyakorisága viszonylag magas volt, a MAF értékek: rs1330 (A/G) intronikus SNP: 35 % (A); rs214101(C/T) 5'UTR SNP: 44% (C); rs757081(C/G) exonikus SNP (nesfatin-3 fragment): 39% (C). További 3 SNP pozitív eredményt adott multi-teszt analízis során, melyekhez nem tartozik MAF érték. Lineáris regresszióval elemezve a különböző elhízási paraméterekkel való összefüggést csak férfiakban (491 elhízott, 100 kontroll), a BMI-vel szignifikáns korreláció jött ki az intronikus rs214086 G/C SNP esetében is, melynek magas, 43% (G), a MAF értéke. Érdeemes megjegyezni, hogy az rs757081 polimorfizmus összefüggött a súlyos elhízással kínai és belga kaukázusi gyerek populációkban is, és kínaiakban a GG genotípus alacsonyabb BMI-vel társult [13, 14].

Ezenkívül két tanulmányban is összefüggést mutattak ki a 2-es típusú diabetes (2TDM) és a NUCB2 polimorfizmusok között [15, 16]. Bár az elhízás a 2TDM magas kockázati tényezője, a vizsgált alanyok, akik mindkét publikációban a kínai Han populációból kerültek ki, nem voltak túlsúlyosak (átlag BMI~25). A 2TDM-hez társuló polimorfizmusok közül kettő (rs1330 és rs757081) a Zegers és munkatársai [12] által elhízással asszociált polimorfizmussal azonos volt. Az rs1330 polimorfizmus 578 diabetesben szenvedő és 1609 kontroll személy vizsgálata után a korábbiakkal ellentétben kínaiakban csak nőkben mutatott összefüggést a BMI-vel [15]. Az rs757081 polimorfizmus a diabeteses csoporton belül vizsgálva (369 személy) alacsonyabb BMI-vel és éhomi glükóz szinttel társult amennyiben GG genotípussal járt [16].

Összességében tehát a NUCB2 gén több polimorfizmusa is meghatározó lehet a testtömeg szabályozásában, melyek közepes allél frekvenciával fordulnak elő.

3. A jelölt csökkentnek találta a nesfatin neuronok keletkezési rátáját fehérje csökkentett tápon tartott patkányok utódainak hipotalamuszában a 13. embrionális napon (35. oldal). Végeztek-e vizsgálatokat e sejtek érésének nyomonkövetésére további differenciációs markerekkel különös tekintettel arra, hogy az észlelt különbség felnőtt állatok hipotalamuszában kiegyenlítődött? Ez az átmeneti, fejlődéstani különbség összefügghet-e a fehérje csökkentett tápon tartott állatok utódainak nesfatin-1 rezisztenciájával vagy ebből a szempontból a fejlődéstani eltérés egy mellékes jelenségnek tekinthető?

A bíráló által említett publikációban az intrauterin fehérje alultápláltság következtében kialakuló prediabeteses állapot hátterét vizsgálva hipotalamikus nesfatin-rezisztenciát állapítottunk meg. Ezzel párhuzamosan kimutattuk, hogy a 13. embrionális napon keletkezett nesfatin neuronok mennyisége a fehérje csökkentett tápon tartott patkányok utódaiban kevesebb, mint a kontrollokban. Ez az időpont a hipotalamikus neuroendokrin sejtek keletkezésének csúcsidezőszakára esik [17], mely sejtek legtöbbje nesfatint is tartalmaz [18]. A közölt adat egy folyamatról felvett pillanatképnek felel meg és semmit sem árul el a nesfatin neuronok fejlődési dinamikájáról. Mivel felnőtt korban a nesfatin neuronok száma az intrauterin alultáplált állatokban normális volt, több keletkezett más időszakban, vagy kevesebb pusztult el a fejlődés során.

Az intrauterin növekedési retardációval világra jövő állatok hátrányukat a születés utáni néhány hétben a normál állatokénál intenzívebb növekedéssel behozzák (catch-up growth jelenség), amit mi is megfigyeltünk. Ez az időszak egyben az agy fejlődésének érzékeny periódusa is, mivel patkányban egybeesik az intrahipotalamikus neuronális kapcsolatok kifejlődésével [19]. Ugyanakkor ebben az időszakban, sőt szükség szerint az egész élet folyamán is, keletkeznek a hipotalamuszban orexigén és anorexigén neuronok a harmadik agykamrát körülvevő speciális őssejtpopuláció, a taniciták neurogenetikus aktivitása révén. A folyamatot (keletkezési ráta) a táplék minősége és mennyisége alakítja [20, 21]. A terhes anyák zsírdús táplálása például a tubulin β -3 (Tuj-1) immunpozitív neuronális prekursor sejtek és a doublecortin immunpozitív differenciálódó, migráló neuronok számának emelkedését okozza 14 napos patkány embriókban

[22]. A catch-up growth időszak tehát befolyásolhatta állatainkban a keletkező nesfatin neuronok számát az intrauterin környezet függvényében. Ezt az elméletet egy POMC neuronok fejlődését vizsgáló tanulmány is alátámasztja [23]. Transzgén egerekben a POMC neuronok elsődleges csillójának korai (E10-E11-től) fejlődéstani gátlása felnőttkorban kezdődő elhízáshoz vezet. Ezekben az egerekben kevesebb POMC sejt keletkezik az E10,5 és E12,5 napok között (BrDU-POMC kettős jelölés), de a felnőttkori POMC sejtszám normális. A POMC neuronok pótlása a születés utáni 3. és 6. hét közötti fokozott neurogenézissel történik. A POMC sejtek apoptózisában E16,5 és P14 között nem találtak eltérést a normál állatokhoz képest [23].

Az embrionális és perinatalis korban lezajló neuronális apoptózis ugyanakkor az idegrendszer normál fejlődéséhez elengedhetetlen folyamat [24]. A központi idegrendszer fejlődése során az idegsejt sorsát aktivitásának mértéke határozza meg. Az aktívabb neuronokban az apoptotikus fehérjék expressziója gátlás alá kerül, a kevésbé aktív sejtek programozott sejthalállal elpusztulnak. A neuronális aktivitás számos neuroprotektív növekedési faktor, például a *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) expresszióját is növeli, segítve a fennmaradást [25]. Mivel hipotalamusz orexigén és anorexigén neuronjainak aktivitása függ a tápláltságtól ez a tényező is befolyásolhatta a nesfatin neuronok végső számát.

Ezenkívül a neuronális progenitor sejtek differenciálódás során történő elköteleződése is befolyásoló tényező lehet, amit számos transzkripciós faktor irányít [20]. A dorsomedialis, ventromedialis és arcuatus magok neuronjainak identitását például az Nkx2.1 és az Ascl1 (korábban Mash1) transzkripciós faktorok alakítják. Fontos molekula a neurogenin 3 (Ngn3) is, ami az Ascl1 aktivátora. Az Ascl1 és az Ngn3 embrionális és posztnatális expressziójáról kimutatták, hogy függ a tápláltsági állapottól, és hiányuk a magok hipopláziájához vezet [26, 27]. A neuronok végső neuropeptid profiljának kialakításában a distal-less homeobox-1 (Dlx1) és az orthopedia homeobox gének (Otp) vezető szerepűek a hipotalamusz paraventricularis és arcuatus magjában is, ahol számos nesfatin neuron található. Ezek a gének befolyásolják az orexigén és anorexigén neuronok arányát. Az anorexigén, és patkányban nesfatint koexpresszáló POMC [18], és az orexigén, nesfatin negatív NPY neuronok például közös elkötelezett progenitorból származnak. Az Ngn3 és az Otp gén csendesítése, illetve a Dlx1 expressziójának fokozódása NPY fenotípust alakít ki, ellenkező esetben nesfatin-pozitív POMC fenotípus keletkezik. Ennélfogva az Otp misszensz mutációt hordozó heterozigóta egerek túlsúlyosak és hiperfágiasak az orexigén neuronális túlsúly miatt [19, 26, 28]. A transzkripciós faktorok expresszióját miRNS-ek és különböző epigenetikus változások modulálhatják. A POMC fenotípus kialakításában fontos miR-103/107 elhízott egerekben fokozott expressziót mutat [19, 29]. Az egér hipotalamuszban születéstől az elválasztásig a géncsendesítést okozó CpG-metiláció széles körű növekedését mutatták ki elsősorban neuronok fejlődését meghatározó géneken, vagyis a DNS-metiláció aktív szerepet játszik a hipotalamusz fejlődésében a gének epigenetikus elnémításával [19].

Mindezekből látható, hogy a további fejlődéstani vizsgálatok rendkívül sokfélék lehetnek. Sorskövetéses vizsgálatokat, ahol az esetleg átmenetileg fellépő nesfatin expressziót is látnánk,

megfelelő transzgenikus modellek hiányában sajnos nem állt módunkban elvégezni. További lehetőség lett volna a különböző korú embriók tanulmányozása, mely a teljes kép megértésének kedvéért a fentiek alapján többféle analízist is magába foglalhat. A publikált munka során nem végeztünk ilyen vizsgálatokat, elsősorban az állatházi kapacitás szűk keresztmetszete miatt. Ezenkívül a fehérje redukált táp beszerzése is anyagilag korlátozó tényező volt. A nesfatin neuronok fejlődéséről általában, és speciálisan ennek intrauterin tápláltságtól való függéséről nincs adat a szakirodalomban. A bíráló által megfogalmazott kérdés tehát hiánypótló munka elvégzését ösztönzi, melyre eddig sajnos nem került sor.

A talált fejlődéstani eltérés esetleges összefüggése a fehérje csökkentett tápon tartott állatok utódainak nesfatin-1 rezisztenciájával szintén sarkalatos kérdés. Amennyiben a nesfatin rezisztencia a magasabb nesfatin expresszió miatt jött létre, úgy ezt okozhatta a nesfatin neuronok fejlődéstani dinamikájában történő zavar a fent leírt mechanizmusok révén. Az alutáplált újszülöttekben ugyan még nem volt magas a nesfatin expressziója a hipotalamuszban, de az úgynevezett „takarékos” fenotípus a tápanyagellátottság függvényében csak későbbi életkorban manifesztálódik [30], tehát ez nem meglepő. Másrészt, a magasabb hipotalamikus nesfatin expresszió lehetett a nesfatin rezisztenciára adott válaszreakció is. A nesfatin rezisztencia kialakulását és nesfatin expresszió növekedés időbeli viszonyát sajnos nem vizsgáltuk. A szerzett rezisztenciák esetén az ok-okozati összefüggéseket nehéz feltárni, máig ismeretlen például a túltápláltság során az elhízással párhuzamosan kialakuló leptin rezisztencia kialakulásának patomechanizmusa is.

4. A PrRP stresszválaszban betöltött szerepének nemi különbségeit érintő vizsgálatai során a nyúltvelői A1 sejtcsoport PrRP neuronjaiban ERalfa immunpozitivitást mutatott ki, míg sem az A1, sem az A2 sejtcsoport PrRP neuronjaiban nem talált kimutatható ERbéta receptor immunoreaktivitást (49. old.). Történtek-e vizsgálatok ezekben a sejtekben az ERbéta hiányának RNS szintű megerősítésére, továbbá a GPR30 receptor jelenlétének kimutatására?

A nyúltvelői PrRP termelő neuronok az A1 katekolaminerg sejtek ~98,4%-át, az A2 sejtcsoport ~81,7% képezik, ez utóbbiban a nucleus tractus solitarii caudalis (area postremától kezdve) területén helyezkednek el [31]. Bár ezek közül egyik PrRP populáció neuronjaiban sem láttunk ERbéta immunreaktivitást, a nucleus tractus solitarii-ban kimutattunk ERbéta immunpozitív sejteket, melyek PrRP immunnegatívak voltak. Az immunhisztokémiai detekció küszöbe alatt PrRP-t, vagy ERbétát kifejező sejteket *in situ* hibridizációval nem ellenőriztük. Ezért lehetséges, hogy a talált ERbéta immunpozitív sejtek némelyike kis mennyiségben PrRP mRNS-t, a PrRP immunpozitív sejtek némelyike pedig kis mennyiségben ERbéta mRNS-t expresszált. Kettős *in situ* hibridizációs jelöléssel valóban detektáltak tirozin-hidroxiláz (katekolaminerg marker) és ERbéta receptor koexpressziót az A1 noradrenerg sejtek 2,75%-ában és az A2 neuronok 16%-ában [32]. Matematikailag tehát, arányos eloszlást feltételezve, az A1-PrRP sejtek maximum ~2,71%-a, A2-PrRP sejtek maximum ~13,07%-a expresszálna ERbéta receptort. Ebbe azonban

beletartoznak az mRNS-t erősen expresszáló sejtek is melyeket nagy valószínűséggel immunhisztokémiával is detektálni tudtunk volna, tehát a valós elvi érték ennél kevesebb, és az arányos megoszlás követelménye adataink alapján nem teljesül. Megjegyzendő még, hogy a kettős *in situ* hibridizációt ovariektomizált Sprague-Dawley patkányokon végezték, és a petefészkek eltávolítása az ER expressziót növeli, mi pedig diösztrosos és metösztrosos Wistar patkányokat vizsgáltunk. Továbbá, tirozin-hidroxiláz az adrenerg neuronokban is termelődik és az *in situ* hibridizációs vizsgálatokban az area postrema szintjéről is történt kvantálás, ahol a noradrenerg és adrenerg neuronok keverednek egymással, ami a közölt adatokban pontatlanságot okozhatott.

A GPR30 jelenlétét nem vizsgáltuk a PrRP neuronokon. A receptor kötődését az ösztadiolhoz 2005-ben mutatták ki [33], a megelőző pár évben csak közvetett bizonyítékok szolgáltak a GPR30 és az ösztrogénhatás kapcsolatára. A Nemzetközi Alapvető és Klinikai Farmakológiai Szövetség a GPR30-at az összegyűlt bizonyítékok alapján 2008-ban nevezte át G-protein kapcsolt ösztrogén receptornak (GPER) [34]. Kéziratunkat 2007 szeptemberében fogadták el, a GPR30 sajnos korábban nem került a látóterünkbe, és a bírálók sem kérdeztek rá a revízió során. Ebben az időben, kereskedelemben GPR30 antitest nem volt forgalomban. A megjelent kevés cikkben saját gyártmányú antitestekkel dolgoztak, melyet két munkacsoport állított elő, így az mRNS kimutatása lett volna lehetséges. Hím patkányokban, GPR30 immunpozitív sejteket a nucleus hypoglossusban, a nucleus ambiguusban, az area postremában, a nucleus dorsalis nervi vagiban, és a nucleus tractus solitariiában mutattak ki. A motoros magokban gyakorlatilag az összes GPR30 immunpozitív sejt kolin-acetil-transzferázt tartalmazott [35]. Így elvileg csak a nucleus tractus solitariiában lehetséges a PrRP-vel való koexpresszió.

A közelmúltban transzgenikus egérmodellt felhasználva kimutatták, hogy a GPER valószínűleg vezető szerepet játszik a stressz tengely működésének nemi különbségeiben [36], de a vizsgált célterületek közt nem voltak a PrRP sejteket tartalmazó agyterületek. Az irodalomban tehát továbbra sincs adat a PrRP és GPER kapcsolatáról, pedig a GPER szerepét a stresszen kívül még számos olyan funkcióban kimutatták, melyek a PrRP-hez is kapcsolódhatnak. Ilyen a vérnyomás és a testsúly szabályozása, nem beszélve a stressz-okozta pszichiátriai rendellenességekről, mint a szorongás és depresszió [34]. A bíráló tehát lényegi hiányosságra mutat rá, a GPER-PrRP koexpresszió vizsgálatát mindenképpen érdemes lenne elvégezni.

5. A jelölt LPS ip adásán alapuló gyulladásos modellt használt depressziós modellként (61.oldal). Ismert, hogy ez az LPS-modell rágsálókban az „alacsony T3 szindróma” modellje is, ami az energiaháztartás markáns átrendeződésén alapul, ideértve a lecsökkent keringő pajzsmirigyhormon szinteket és az ennek ellenére sem aktiválódó HPT tengelyt, továbbá az akut fázis lázas állapotát. Így az állat létrejövő „depressziószerű” állapota az akut fázison túl is jelentős részben e tényezők következménye. Véleménye szerint ennek alapján mennyiben tekinthető a használt modell depresszió modellnek és mennyiben tekinthetők az észlelt kifáradás jellegű tünetek az egyidejűleg fennálló energiaháztartásban bekövetkező változások következményének?

A rágsálókban használatos depresszió modellek egyike sem tükrözi tökéletesen a human depressziót, melynek etiológiája összetett. Éppen emiatt, munkánkban többféle depresszió modellt is használtunk, ezek egyike volt a gyulladásos modell. A különböző modellek egybehangozón, több oldalról támasztották alá a PrRP rendszer stressz-okozta hangulati betegségekben való fontos szerepét. A gyulladás és a depresszió ok-okozati kapcsolatát számos adat bizonyítja és feltételezik, hogy a szerotonin és noradrenalin visszavételt gátló antidepresszánsok, valamint a ketamin terápia gyulladáscsökkentő képessége hatásmechanizmusuk egyik fontos tényezője [37]. Az LPS injekcióval kiváltott gyulladásos depresszió modell használata, ezért rágsálókban rendkívül elterjedt [38].

Az általunk használt LPS-indukálta modellben a pajzsmirigyet funkcionálisan nem vizsgáltuk. Az irodalom szerint, az LPS okozta akut rosszullét fázisa a kezelést követően 2-6 órával éri el a csúcst [39]. Ebben az időszakban (LPS beadása után 3 órával) a PrRP mRNS expressziójának emelkedését láttuk. Az alacsony T3 szindróma kialakításában az agytörzsi felszálló pálya nem vesz részt [40]. A PrRP mRNS emelkedése valószínűleg tehát a gyulladás okozta stresszre adott válaszreakció volt [40-42]. Az állatok ekkor valószínűleg negatív energia státuszba kerültek, de ezért nem lehetett a PrRP a felelős, mivel negatív energiaháztartás esetén a PrRP mRNS expresszió csökkenése tapasztalható [41, 43]. Kísérletünkben a viselkedési teszteket az LPS kezelés után 24 órával végeztük. Az LPS kezelt patkányok testsúlya ekkor minimálisan, kb. 5%-kal volt alacsonyabb a kontrolloknál, 24 órás táplálékfelvételük pedig nem különbözött szignifikánsan a kontroll csoporttól. Ebből arra következtettünk, hogy az energiaháztartásuk az akut betegség fázis után helyreállt. Fekete és munkatársai eredményei alapján az alacsony T3 szindróma a patkányokban 24 órával az LPS kezelés után is fennáll, jelentős különbség azonban, hogy a közölt adatok az általunk használt javasolt dózis 2,5-szeresére vonatkoznak [44]. Egy nappal kezelést követően az állatok az erőltetett úszás tesztben többet lebegtek, mint a kontrollok, ami a „depresszió-szerű” viselkedést jele. Ennek hátterében a gyulladás következtében megemelkedett citokin expressziót gyanítják [39]. Könnyen lehet, hogy az alacsony T3 szint is hozzájárul a folyamathoz, amennyiben ez még fennáll. A pajzsmirigy hormonok ugyanis csökkentik a gyulladásos folyamatokat [45, 46], hiányuk tehát fokozhatja ezeket. A pajzsmirigyműködés és a depresszió között egyébként is szoros, kétirányú összefüggés mutatkozik

[47]. A pajzsmirigybetegekben szenvedő betegek hajlamosabbak a depresszióra, és a depressziós betegekben gyakoriak a pajzsmirigy működésének rendellenességei. Ennek megfelelően a pajzsmirigyhormon-kiegészítők fokozzák az antidepresszánsokra adott klinikai választ [48, 49].

Mindent összevetve, bár az LPS indukálta depresszió modell hasonlóan a többi modellhez a betegség patofiziológiájának csak specifikus aspektusát engedi vizsgálni, és a modell működésének hátterében álló molekuláris mechanizmusok nem teljesen tisztázottak, relevanciája nem vitatott [38, 39].

Irodalomjegyzék

1. Bhattacharyya, S., et al., *Association of polymorphisms in GPR10, the gene encoding the prolactin-releasing peptide receptor with blood pressure, but not obesity, in a U.K. Caucasian population*. Diabetes, 2003. **52**(5): p. 1296-9.
2. Samson, W.K., Z.T. Resch, and T.C. Murphy, *A novel action of the newly described prolactin-releasing peptides: cardiovascular regulation*. Brain Res, 2000. **858**(1): p. 19-25.
3. Takayanagi, Y., et al., *Endogenous prolactin-releasing peptide regulates food intake in rodents*. J Clin Invest, 2008. **118**(12): p. 4014-24.
4. Gu, W., et al., *The prolactin-releasing peptide receptor (GPR10) regulates body weight homeostasis in mice*. J Mol Neurosci, 2004. **22**(1-2): p. 93-103.
5. Bjursell, M., et al., *GPR10 deficiency in mice results in altered energy expenditure and obesity*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **363**(3): p. 633-8.
6. Yamashita, M., et al., *Involvement of prolactin-releasing peptide in the activation of oxytocin neurones in response to food intake*. J Neuroendocrinol, 2013. **25**(5): p. 455-65.
7. Dodd, G.T., et al., *The thermogenic effect of leptin is dependent on a distinct population of prolactin-releasing peptide neurons in the dorsomedial hypothalamus*. Cell Metab, 2014. **20**(4): p. 639-49.
8. Talbot, F., et al., *A rare human variant that disrupts GPR10 signalling causes weight gain in mice*. Nat Commun, 2023. **14**(1): p. 1450.
9. Yoshida, M., Y. Takayanagi, and T. Onaka, *The medial amygdala-medullary PrRP-synthesizing neuron pathway mediates neuroendocrine responses to contextual conditioned fear in male rodents*. Endocrinology, 2014. **155**(8): p. 2996-3004.
10. Vas, S., et al., *Prolactin-Releasing Peptide Contributes to Stress-Related Mood Disorders and Inhibits Sleep/Mood Regulatory Melanin-Concentrating Hormone Neurons in Rats*. J Neurosci, 2023. **43**(5): p. 846-862.
11. Mariman, E.C., et al., *Extreme obesity is associated with variation in genes related to the circadian rhythm of food intake and hypothalamic signaling*. Physiol Genomics, 2015. **47**(6): p. 225-31.
12. Zegers, D., et al., *Association between polymorphisms of the Nesfatin gene, NUCB2, and obesity in men*. Mol Genet Metab, 2011. **103**(3): p. 282-6.
13. Zegers, D., et al., *Identification of mutations in the NUCB2/nesfatin gene in children with severe obesity*. Mol Genet Metab, 2012. **107**(4): p. 729-34.
14. Chen, Y.Y., et al., *The association of a nucleobindin 2 gene (NUCB2) variant with childhood adiposity*. Gene, 2013. **516**(1): p. 48-52.
15. Li, X.S., et al., *NUCB2 polymorphisms are associated with an increased risk for type 2 diabetes in the Chinese population*. Ann Transl Med, 2020. **8**(6): p. 290.
16. Wang, C., Y. Wang, and W. Hu, *Association of the polymorphism in NUCB2 gene and the risk of type 2 diabetes*. Diabetol Metab Syndr, 2017. **9**: p. 39.
17. Markakis, E.A., *Development of the neuroendocrine hypothalamus*. Front Neuroendocrinol, 2002. **23**(3): p. 257-91.
18. Foo, K.S., H. Brismar, and C. Broberger, *Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS*. Neuroscience, 2008. **156**(3): p. 563-79.
19. Croizier, S. and S.G. Bouret, *Molecular control of the development of hypothalamic neurons involved in metabolic regulation*. J Chem Neuroanat, 2022. **123**: p. 102117.

20. Kim, D.W., et al., *The cellular and molecular landscape of hypothalamic patterning and differentiation from embryonic to late postnatal development*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 4360.
21. Recabal, A., T. Caprile, and M.L.A. García-Robles, *Hypothalamic Neurogenesis as an Adaptive Metabolic Mechanism*. Front Neurosci, 2017. **11**: p. 190.
22. Chang, G.Q., et al., *Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity*. J Neurosci, 2008. **28**(46): p. 12107-19.
23. Lee, C.H., et al., *Primary cilia mediate early life programming of adiposity through lysosomal regulation in the developing mouse hypothalamus*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 5772.
24. Hollville, E., S.E. Romero, and M. Deshmukh, *Apoptotic cell death regulation in neurons*. Febs j, 2019. **286**(17): p. 3276-3298.
25. Yamaguchi, Y. and M. Miura, *Programmed cell death in neurodevelopment*. Dev Cell, 2015. **32**(4): p. 478-90.
26. Burbridge, S., I. Stewart, and M. Placzek, *Development of the Neuroendocrine Hypothalamus*. Compr Physiol, 2016. **6**(2): p. 623-43.
27. Desai, M., G. Han, and M.G. Ross, *Programmed hyperphagia in offspring of obese dams: Altered expression of hypothalamic nutrient sensors, neurogenic factors and epigenetic modulators*. Appetite, 2016. **99**: p. 193-199.
28. Lee, B., et al., *Dlx1/2 and Otp coordinate the production of hypothalamic GHRH- and AgRP-neurons*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 2026.
29. Trajkovski, M., et al., *MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity*. Nature, 2011. **474**(7353): p. 649-53.
30. Gali Ramamoorthy, T., et al., *Developmental programming of hypothalamic neuronal circuits: impact on energy balance control*. Front Neurosci, 2015. **9**: p. 126.
31. Maruyama, M., et al., *Prolactin-releasing peptide as a novel stress mediator in the central nervous system*. Endocrinology, 2001. **142**(5): p. 2032-8.
32. Curran-Rauhut, M.A. and S.L. Petersen, *Oestradiol-dependent and -independent modulation of tyrosine hydroxylase mRNA levels in subpopulations of A1 and A2 neurones with oestrogen receptor (ER)alpha and ER beta gene expression*. J Neuroendocrinol, 2003. **15**(3): p. 296-303.
33. Revankar, C.M., et al., *A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling*. Science, 2005. **307**(5715): p. 1625-30.
34. Prossnitz, E.R. and M. Barton, *The G protein-coupled oestrogen receptor GPER in health and disease: an update*. Nat Rev Endocrinol, 2023. **19**(7): p. 407-424.
35. Brailoiu, E., et al., *Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system*. J Endocrinol, 2007. **193**(2): p. 311-21.
36. Zheng, Y., et al., *GPER-Deficient Rats Exhibit Lower Serum Corticosterone Level and Increased Anxiety-Like Behavior*. Neural Plast, 2020. **2020**: p. 8866187.
37. Beurel, E., M. Toups, and C.B. Nemeroff, *The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble*. Neuron, 2020. **107**(2): p. 234-256.
38. Yin, R., et al., *Lipopolysaccharide-induced depression-like model in mice: meta-analysis and systematic evaluation*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1181973.
39. Dantzer, R., et al., *From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(1): p. 46-56.
40. Fekete, C., et al., *Ascending brainstem pathways are not involved in lipopolysaccharide-induced suppression of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus*. Endocrinology, 2005. **146**(3): p. 1357-63.
41. Morales, T. and P.E. Sawchenko, *Brainstem prolactin-releasing peptide neurons are sensitive to stress and lactation*. Neuroscience, 2003. **121**(3): p. 771-8.
42. Matuska, R., et al., *Colocalized neurotransmitters in the hindbrain cooperate in adaptation to chronic hypernatremia*. Brain Struct Funct, 2020. **225**(3): p. 969-984.
43. Lawrence, C.B., et al., *Alternative role for prolactin-releasing peptide in the regulation of food intake*. Nat Neurosci, 2000. **3**(7): p. 645-6.
44. Fekete, C., et al., *Lipopolysaccharide induces type 2 iodothyronine deiodinase in the mediobasal hypothalamus: implications for the nonthyroidal illness syndrome*. Endocrinology, 2004. **145**(4): p. 1649-55.
45. Marchiori, R.C., et al., *Improvement of blood inflammatory marker levels in patients with hypothyroidism under levothyroxine treatment*. BMC Endocr Disord, 2015. **15**: p. 32.

46. de Castro, A.L., et al., *Thyroid hormones decrease the proinflammatory TLR4/NF- κ B pathway and improve functional parameters of the left ventricle of infarcted rats*. Mol Cell Endocrinol, 2018. **461**: p. 132-142.
47. Ma, Y., M. Wang, and Z. Zhang, *The association between depression and thyroid function*. Front Endocrinol (Lausanne), 2024. **15**: p. 1454744.
48. Hage, M.P. and S.T. Azar, *The Link between Thyroid Function and Depression*. J Thyroid Res, 2012. **2012**: p. 590648.
49. Touma, K.T.B., A.M. Zouha, and J.R. Scarff, *Liothyronine for Depression: A Review and Guidance for Safety Monitoring*. Innov Clin Neurosci, 2017. **14**(3-4): p. 24-29.

Budapest, 2025. május 19.



Dr. Tóth Zsuzsanna, PhD