

Válasz Dr. Reglődi Dóra opponensi véleményére és kérdéseire

Köszönettel tartozom opponens asszonynak a dolgozat alapos értékeléséért, valamint a hiánypótló és az elgondolkodtató kérdésekért. A kérdések a munkát szélesebb kontextusba helyezték, ezenkívül sok érdekességet tanultam a válaszokhoz szükséges irodalom tanulmányozása során. A dolgozat olvasását nehezítő esetleges hibákért és elírásokért elnézést kérek, sajnos többszöri elolvasás után sem vettem ezeket észre. A feltett kérdésekre az alábbiakban válaszolok:

I. Immunhisztokémia alkalmazásának továbbfejlesztése

1. Van-e olyan módszer/műszer/eszköz, amivel be lehet állítani folyadék belső hőmérsékletét egy konstans értékre mikrohullámú kezelés alatt?

A bevezetett módszer, mely az azonos gazdaállatból származó antitestek keresztreakciójából származó nem specifikus immunhisztokémiai jelölést hivatott megakadályozni, a gyakorlatban megegyezik a hőkezelés indukálta epitop feltárás (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER) módszerével [1, 2]. Ezért nem gondoltam jobban részletezni a módszert a dolgozatban, amit meg kellett volna tenni, így a kritikai észrevétellel teljesen egyetértek.

Az egyszerű konyhai mikrohullámú sütő használatának hátránya, hogy a hő eloszlása a belső térben egyenetlen, „meleg” és „hideg” pontok alakulnak ki. Ennek kiküszöbölésére egyes cégek kifejlesztettek speciális szövettani mikrohullámú sütőket. Az első típusokat 2000-es évek elején már forgalmazták, ezekben vizet keringettek az egyenletes hőmérséklet fenntartásához [3]. A legújabb típusok digitális kijelzővel rendelkeznek (Microwave Tissue Processor LP2850 Energy Beam Sciences, Inc., East Granby, CT, USA) és képernyőn lehet követni a használat közben a hőmérséklet változását, ami 0,5°C-os precizitással állítható.

A publikációban szereplő immunfestésekhez, és azóta is, egyszerű konyhai mikrosütőt használtam. A hőmérséklet egyenletességét az biztosítja, hogy a tárgylemezek egy citromsav pufferral (0,01 M, pH: 6) teljesen feltöltött 5 darabos műanyag tárgylemeztartóban vannak elhelyezve. A lemezeket a tartóval együtt egy citromsav puffert tartalmazó műanyag doboz aljára fektetjük. A doboz mérete akkora, hogy a nyitott tárgylemez tartóból a lemezek helyszűke miatt ne tudjanak kijönni és felülről a tartót a folyadék bőven ellepje. Ily módon a lemezek gyakorlatilag egy folyadékfürdőben rögzítve helyezkednek el. A folyadékterek közlekednek egymással, ez biztosítja, hogy hideg és meleg pontok nem alakulnak ki. A folyadékot gyöngyöző forrásig hevítjük (megfigyelés alapján), majd a mikrohullámú sütő teljesítményét alacsonyabbra állítjuk 5 percre. Ilyenkor a sütő időnként bekapcsol, majd kikapcsol. Mivel a folyadéknak nagy a hőkapacitása, nem hűl le lényegesen az alatt a néhány másodperces időszak alatt, amíg a teljesítményleadás szünetel, de a szünetek megakadályozzák a túl heves forrást. Ez azért fontos,

mert erős forrás során jobban párolog a puffer és a heves buborékolás a metszetek mechanikai sérülését okozhatja. A tökéletesen egyenletes hőmérséklet egyébként nem annyira kritikus, mivel a hatást a kezelés ideje és a hőmérséklet együtt alakítja ki. A valamivel alacsonyabb hőmérséklet is hatásos, de hosszabb időt igényel. Ily módon optimalizáltam a módszert azóta úszó metszetekre is, melyek meghullámosodnak túl magas hőkezelés hatására (publikálatlan információ). Két-három metszetet egy lapos aljú Eppendorf csőbe helyezünk és 1 ml citromsav puffert mérünk rájuk. Az így elkészített csöveket Eppendorf cső melegítőben 75°C-on közepes rázás mellett 1 órán át inkubáljuk, majd hagyjuk kihűlni, mielőtt az immunfestést folytatnánk.

2. Milyen citrát puffer volumen és mely Watt-ban kifejezett mikrohullámú teljesítmény mellett standardizálták a módszert?

A módszer kidolgozásakor a tárgylemezeket, melyek egy 5 darabos műanyag tárgylemez tartóban voltak, egy műanyag edény (hosszúság: 12 cm, szélesség: 9 cm, magasság: 6 cm) aljára helyeztük, amelyet 200 ml citromsav pufferrel (0,01 M, pH: 6) töltöttünk fel, és a folyadékszintet megjelöltük. A folyadék forráspontjának eléréséhez (kb. 2,5 perc) egy 800 W teljesítményű háztartási mikrohullámú sütőt használtunk 100%-os teljesítményen. Amint a folyadék forrni kezdett (megfigyelés alapján), a metszeteket további 5 percig melegítettük 450 W-os teljesítményen. Ezután az elpárolgott folyadékot pótoltuk (néhány ml desztillált vízzel), majd a tárgylemezeket a citromsav pufferben 30 percig szobahőmérsékleten hagytuk kihűlni az immunfestés elkezdése előtt.

II. Az energia háztartás szabályozásának vizsgálata

1. A szerző azt találta, hogy a hypothalamusban hideg stresszre elsősorban a supraoptikus, paraventricularis és arcuatus magban aktiválódtak a nesfatin tartalmú neuronok, melyekről ismert, hogy a barna zsírszövet hőtermelését befolyásolják, és ebből azt a következtetést vont le, hogy az itt található nesfatin tartalmú neuronok szerepet játszhatnak a hőszabályozási mechanizmusokban. A kérdésem az, hogy ennek mi lehet a humán relevanciája, tekintve a barna zsírszövet minimális előfordulását emberben? A rágcslókban szerepet játszó barna zsírszöveti mechanizmusok hogyan vihetők át általánosságban emberre, és mire gondol ebben az esetben a szerző? Lehet itt esetleg életkori függés is, tekintve, hogy emberi újszülöttekben még nagyobb mennyiségben van jelen a barna zsírszövet?

Ez egy nagyon izgalmas kérdés, tekintettel arra, hogy barna zsírszövetben rejlő lehetőségek miatt ez egy „forró” kutatási terület. Azt intracerebroventrikulárisan alkalmazott akut egyszeri nesfatin-1 injekció kísérleteinkben testhőmérséklet emelkedést okozott és csökkentette a testhőmérséklet cirkadián ritmusának amplitúdóját. A hidegstresszes kísérletek alapján a jelenség egyik lehetséges mechanizmusa a barna zsírszövet aktiválása volt a szimpatikus idegrendszeren keresztül. Azóta bebizonyosodott, hogy a centrális nesfatin-1 valóban fokozza rágcslóban az

interscapuláris barna zsírszövet hőtermelését béta-3 adrenerg receptor függő módon [4], és a barna zsírszövet aktiválhatósága nukleobindin-2/nesfatin-1 knockdown állatokban szignifikánsan csökkent [5]. A centrális nesfatin-1 barna zsírszövetre való hatásában a laterális parabrachiális mag mint átkapcsoló állomás, és a melanokortin $\frac{3}{4}$ receptor szerepét mutatták ki [6].

A világrajövetel az újszülöttek termoregulációs kapacitását jelentős kihívás elé állítja, mivel az anyaméh és a külvilág hőmérséklete közti eltérés több mint 10°C. Az újszülöttek, akiknél a kis mennyiségű izomzat nem teszi lehetővé a reszketéssel történő megfelelő hőtermelést, ezért barna zsírszövetet halmoznak fel, mellyel hőt tudnak termelni. A működőképes barna zsírszövet a babákban csak a terhesség 30. hete után kezd felhalmozódni. A fiatalabb koraszülöttek halálozási arányát, ezért sajnos még a rövid ideig tartó hipotermia is növelheti [7, 8]. A barna zsírszövet a késői gyerekkorra leépül. Felnőttekben csak hosszas hidegnek kitett, illetve bizonyos betegségekben szenvedő egyénekben tudtak barna zsírszövetet kimutatni 2007-ig. A vizsgálati módszerek fejlődésével derült ki, hogy változó mennyiségben a normál felnőtt populációban is előfordul, főleg a nyak hátsó részén a koponya aljától a lapockáig terjedően. Mennyisége nemi (nőkben több), valamint életkori (idős korba csökken) variabilitást is mutat [9]. A csecsemők és felnőttek barna zsírszöveve érdekes módon különbözik; morfológiailag és génexpressziós mintázatát tekintve is eltérő. A felnőttek barna zsírszöveve a rágcslók bézs zsírszövevéhez hasonlít jobban, míg a csecsemőké a rágcslók klasszikus barna zsírszövevéhez. A bézs zsírszöveve sejtek átmeneti alakok, melyek adott esetben „megbarnulhatnak” és aktív termogenezist végezhetnek, majd visszaalakulhatnak bézssé. Az állatházi körülmények kevésbé „kényelmesek” az egerek számára, mint az ember átlagos életkörülményei. Azokban az egerekben, melyeket a tartási körülmények változtatásával „humanizáltak” (kalória dúsabb táplálék, magasabb külső hőmérséklet) a klasszikus barna zsírszövet minden tekintetben a felnőtt emberéhez hasonlóvá alakult, bizonyítva a zsírszövet plaszticitásában rejlő potenciált emberre nézve [7, 10].

A barna zsírszövet hőtermelésének hozzájárulása a teljes emberi test energiafelhasználásához vita tárgyát képezi [9]. Nem ismert az sem, hogy a barna zsírszövet atrófiája hozzájárul-e az obezitás kialakulásához. Számos kísérlet támasztja ugyanakkor alá a humán barna zsírszövet szerepét a táplálkozás indukálta termogenezisben [11]. A potenciális lehetőségek miatt a barna zsírszövet aktivitását specifikusan fokozni képes endogén molekulák és drogok feltérképezése, illetve kifejlesztése folyamatos kutatások tárgya. Új lendületet ad a kutatásnak az úgynevezett „batokinek” felfedezése. Ezek a barna zsírszövet által termelt olyan faktorok, melyek más szervek működésének befolyásolásával hatnak a metabolizmusra, például a májon, illetve a központi idegrendszeren keresztül [7]. A humán barna zsírszövetet ennél fogva jelenleg is fontos terápiás célpontként tartják nyilván az elhízás elleni küzdelemben [11, 12]. A távlatokat ebben a témában tovább tágitja a bézs-barna zsírszöveve transzddifferenciáció mesterséges előidézésének lehetősége. A nesfatin, mivel képes elősegíteni a barna zsírsejtek differenciálódását, ebből a szempontból is figyelemre méltó molekula [13].

2. Másik kérdésem az alvás-ébrenléti vizsgálatokkal kapcsolatos, ismert más neuropeptidekről is hasonló, az alvás fázisaiban ennyire fontos szerep?

A neuropeptidek mint neuromodulátorok az alvás-ébrenlét szabályozásban igen fontos szerepet töltenek be, ezért több neuropeptidet is lehet említeni. Biológiai óránk, a biológiai ritmusokat irányító nucleus suprachiasmaticus (NSC), a retinohipotalamikus pályán keresztül közvetlen információt kap a nappalok és éjszakák váltakozásáról. A retinohipotalamikus pálya jelátvivőanyaga a GABA mellett az hipofízis adenilát-cikláz-aktiváló polipeptid, a PACAP. PACAP tartalmú idegvégződések megtalálhatóak a tobozmirigyben is, ahol a PACAP serkenti a melatonin szintézisét, mely hormon a NSC endogén ritmusát az aktuális nappal-éjszaka változáshoz igazítja. A centrálisan alkalmazott PACAP fokozza az alvás REM fázisának hosszát. A PACAP ezen funkciói miatt felvetődött, hogy komoly szerepe lehet az alvászavarokkal járó migrének és a cluster fejfájás patomechanizmusában, annál is inkább, mert intravénás injekciójával emberben migrén váltható ki [14]. Magában a NSC-ban is többféle neuropeptid expresszálódik. A retinoreciciens belső mag részben vazóaktív intesztinális peptid (VIP) és gasztrin-felszabadító peptid (GRP) termelődik, a környező héj területén arginin-vazopresszint (AVP) expresszáló sejtek találhatók. E peptidek termelődésének, illetve jelátvitelének károsodása a NSC működésének elégtelenségével jár és felborítja a cirkadián ritmust [15, 16].

Egyéb neuropeptidek más területeken hatva, az alvás REM, illetve nem-REM fázisának, vagy az ébrenlét kialakításának szabályozásában meghatározóak. A nucleus preopticus ventrolateralis (VLPO) alvást elősegítő agyi központ. A VLPO GABA sejtjeiben termelődő galanin gátló hatást fejt ki azokra az agyterületekre, amelyek az éber állapot kialakításáért és fenntartásáért felelősek [17]. Ugyanakkor az ébrenlétért felelős neuropeptid S a VLPO-ba adva meggátolja az elalvást. A peptid számos helyen, többek közt a hipotalamuszban, agytörzsben és az amygdalában expresszálódik.

A dorsolateralis hipotalamusz két nagy, egymással keveredő sejtpopulációja az orexin és a melanin-koncentráló hormon (MCH) tartalmú neuronok, melyek ellentétes hatásúak az alvás-ébrenlét szabályozásban. Az orexinnek kiemelkedő szerepe van az ébrenlét kialakításában és fenntartásában, gátolja a REM és nem-REM alvásközpontokat és serkenti a felszálló retikuláris aktiváló rendszer (ARAS) elemeit, elsősorban a locus ceruleust. Az orexin hiánya súlyos betegségben, narkolepsziában nyilvánul meg. Ezzel szemben az MCH mint alvást elősegítő peptid ismert. Kritikus szerepű az alvás REM fázisának kialakításában és fenntartásában, a REM központokra, a locus ceruleusra és az orexin neuronokra hatva.

Némely neuropeptid alvás-ébrenlétre gyakorolt hatása nem egyértelmű. Ilyen például a neuropeptid Y (NPY) és a P anyag, melyeknek alvást elősegítő és gátló hatásáról is beszámoltak. Számos egyéb hipotalamikus neuropeptid is befolyást gyakorol az alvás-ébrenléti ciklusra, azonkívül, hogy egyéb funkciókban is részt vesznek. Mindez a neuropeptidek pleiotrop

működésének bizonyítéka, ami a hipotalamusz integratív funkciójához elengedhetetlenül szükséges [17].

3. Harmadik kérdésem, hogy mi lehet az oka annak, hogy az embrionális kor 13. napján kevesebb új nesfatin neuront találtak a stresszelt állatokban, de felnőttben már megegyezett a számuk? Hogyan kompenzálódhat ez, vagy mi okozhatja a késést?

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 csúcsideőszakára esik [18], mely sejtek legtöbbje nesfatint is tartalmaz [19]. 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 időpontban, 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 [20]. 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 tanciták neurogenetikus aktivitása révén. A folyamatot (keletkezési ráta) a táplék minősége és mennyisége alakítja [21, 22]. 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 [23]. 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 [24]. Transzgen egerekben a POMC neuronok elsődleges csillójának korai (E10-E11-től) fejlődéstani gátlása az 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 neurogenesisel történik. A POMC sejtek apoptózisában E16,5 és P14 között nem találtak eltérést a normál állatokhoz képest [24].

Az embrionális és perinatalis korban lezajló neuronális apoptózis ugyanakkor az idegrendszer normál fejlődéséhez elengedhetetlen folyamat [25]. 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 [26]. 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 transzkripció faktor irányít [21]. A dorsomedialis, ventromedialis és arcuatus magok neuronjainak identitását például az Nkx2.1 és az Ascl1 (korábban Mash1) transzkripció 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 [27, 28]. 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 [19], 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 hiperfágiásak az orexigén neuronális túlsúly miatt [20, 27, 29]. A transzkripció faktorok expresszióját miRNS-ek és különböző epigenetikus változások modulálhatják. A POMC fenotípus kialakításában fontos miR-103/107 elhízott egerekben fokozott expressziót mutat [20, 30]. 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 [20].

Összességében tehát intrauterin alultápláltság következtében többféle mechanizmus is közrejátszhatott a nesfatin neuronok végső számának kialakításában.

III. A stresszválasz finom hangolásának tanulmányozása

1. A fejezet bevezetőjében a szerző említi, hogy alternatív terápiás célpontokként előtérbe kerültek neuropeptidek. Milyen neuropeptidek jöhetnek szóba?

A központi idegrendszer működésére ható gyógyszerek a szinaptikus transzmissziót módosítják és általában neurotransmitter receptorokat (GABA A receptor: barbiturátok, benzodiazepinek, NMDA receptor: memantin), enzimeket (monoamino-oxigenáz és kolinészteráz gátlók), vagy transzportereket, (szelektív szerotonin- és noradrenalin visszavétel-gátlók) céloznak meg. A központi idegrendszeri betegségek etiológiájának összetettsége miatt azonban a kezelések hatékonysága sokszor elégtelen és gyakoriak a mellékhatások, mivel-e szerek nem elég specifikusak.

A neuropeptidek a klasszikus neurotranszmitterekkel együtt szabadulnak fel a terminálisokból. Terápiás célpontként előnyük lehet, hogy specifikus receptorokon hatnak és a visszavételi mechanizmusok hiánya miatt hosszabb hatásúak. A természetes peptidek alkalmazásának hátránya, hogy kémiai és fizikai stabilitásuk gyenge, keringési felezési idejük többnyire rövid, orális biohasznosulásuk alacsony, és többnyire nem jutnak át a vér-agy gáton. E problémák megoldására különféle megoldások lehetségesek [31]. Ilyen például egy zsírsavlánc csatolása a peptidhez, ami a stabilitás és a felezési idő növekedését eredményezi, és segítheti a perifériásan beadott peptid átjutását a vér-agy gáton. A PrRP molekula különféle lipidált verziói már rendelkezésre állnak, és preklinikai vizsgálatok alapján ígéretesek az elhízás, a metabolikus szindróma, és Alzheimer kór kezelésében is [32-34]. Más peptidmódosítások is sikeresek. Az apolipoprotein B-vel mint vér-agy gát ingapeptiddel fuzionált NPY perifériás beadása visszafordította a neurodegeneratív folyamatokat Alzheimer-kóros egér modellben.

A vér-agy gát megkerülése intranazális adagolással is elérhető. Ez egyben fokozza a biohasznosulást és csökkenti a kezelés mellékhatásait is. Az intranazális oxitocin klinikai vizsgálatokban hatásosnak bizonyult a skizofrénia, poszttraumás stressz és autizmus spektrumzavar kezelésében [31]. A PACAP expresszió mértéke számos központi idegrendszeri betegség, agyi érrendszeri és neurodegeneratív betegségek, szklerózis multiplex, migrén, traumás agysérülés és poszttraumás stressz zavar biológiai markere [35], így e betegségekben a PACAP szint befolyásolása egyben potenciális terápiás cél lehet. A PACAP neuroprotektív hatású, és alkalmazható intranazálisan [36]. Legújabban viszont monoklonális antitestet is fejlesztettek a PACAP ellen, mely a PACAP-38 által kiváltott fejfájásos és egyéb tüneteket enyhítette [37].

Az általunk vizsgált nesfatin-1 ugyan a vér-agy gáton telítődés nélkül átjut [38], de intranazálisan is alkalmazható, mely módon egerekben a táplálékfelvételt 6 órán át csökkentette [39]. A nesfatint kódoló NUCB2 gén több gyakori polimorfizmusa fordul elő a testtömeg indexszel összefüggésben, így a nesfatin-1 az elhízás elleni küzdelemben kiváló terápiás célpont lehet [40, 41].

Az utóbbi időben nagy népszerűsége tettek szert a glukagonszerű peptid-1 (GLP1) agonista gyógyszerek a 2-es típusú diabetes és az elhízás kezelésében. A GLP1 a vékonybél endokrin sejtjeiben és a nyúltvelőben, a nucleus tractus solitariiban (NTS) termelődik. A perifériás hormon fő hatása a posztprandiális inzulin szekréció fokozása, a glukagon szekréció csökkentése és a gyomor ürülésének és sósav termelésének gátlása. A GLP1 receptora a hipotalamusz számos energiaháztartás szabályozásával kapcsolatos magjában, a jutalomközpontokban és a dorsalis vagus mag komplexben is kifejeződik. A centrális GLP1 állatkísérletekben étvágycsökkentő, növeli a jóllakottság érzetét és a vaguson keresztül centrálisan is gátolja a gyomor ürülését [42]. A legújabb humán adatok szerint a GLP1 receptor agonisták, a GLP1 neuroprotektív tulajdonsága miatt reménykeltőek a Parkinson kór és egyes demenciák terápiájában is [43].

A fejlesztések középpontjában állnak továbbá a fájdalom csillapításban használható opioid és nem-opioid peptidek. Az opioid fájdalomcsillapítóknak, például a morfinnak, számos mellékhatása van. Krónikus alkalmazásuk függőséget és fájdalomcsillapító-toleranciát alakít ki. Ezen segíthet az opioid-független hatású peptid gyógyszerek fejlesztése (neurotensin, neuropeptid FF, és P-anyag analógok). Különösen nagy figyelmet érdemelnek a kiméra természetű kémiai struktúrák, melyek többszörös ligandumok révén fokozhatják a terápiás hatást. Tervezhetők lesznek opioid-nem opioid peptid dimer analógok és vegyes, peptid-nem peptid bifunkciós ligandumok is [44].

Az említetteken kívül még számos neuropeptid, illetve receptoraik szóba jöhetnek mint lehetséges terápiás célpontok a legkülönbözőbb idegrendszeri betegségekben. A klinikumban való gyakorlati alkalmazáshoz, a legtöbb esetben még további kutatások szükségesek.

2. Az 5.3.1. fejezet elején a szerző megemlíti az Edinger-Westphal magot, mely tartalmaz nésfatint is. Az Edinger-Westphal mag közismerten a preganglionaris parasympaticus neuronokat tartalmazza, melyek a n. oculomotoriussal a m. sphinter pupillae és m. ciliaris beidegzéséért felelősek. A mag melyik része vesz részt a stresszválaszokban, és azt hogyan különítik el a preganglionaris sejtcsoportoktól? Vannak itt más neuropeptidek is?

Az Edinger-Westphal mag az oculomotoros komplex preganglionaris paraszimpatikus részeként definiált mag. A pupilla paraszimpatikus beidegzésének első kísérletes bizonyítékai az 1800-as évek elejéről származnak, amikor a nervi ciliares brevis elektromos ingerlésével miotikus, átvágásával mydriasis idéztek elő. Az emberi ganglion ciliare beidegző preganglionaris paraszimpatikus agyterület feltárását Ludwig Edinger és Carl Friedrich Otto Westphal munkásságának tulajdoníthatjuk, bár mindketten támaszkodtak korábbi munkákra. Néhány évvel később Richard Perlia az Edinger-Westphal mag két szubdivíziójaként elkülönítette az anteromedian és centrális almagokat, mely utóbbi ma Perlia magként ismert, és eddigi tudásunk alapján az emberre jellemző sejtcsoport.

A funkció és a nomenklatura viszonyában azonban az elmúlt évtizedek kutatási eredményei ellentmondásokat idéztek elő, mivel az Edinger-Westphal mag szerepét egyéb alapvető fiziológiai és patológiai működésekben is kimutatták, mint a stressz, a szorongás, a depresszió, az alkohol- és táplálékfogyasztás szabályozása és az ezektől való függőségek, valamint az anyai fészeképítő viselkedés [45, 46]. A nevezéktani probléma gyökere abban rejlik, hogy az oculomotoros komplex dorsalis részén elhelyezkedő kolinerg paraszimpatikus preganglionaris neuronokat nehéz körülírtan elkülöníteni a centrálisan vetülő főleg urocortin-1 immunpozitív peptiderg neuronoktól, melyek elhelyezkedése széleskörű faji változatosságot mutat. A két terület különálló elnevezésére több sikertelen próbálkozás született, például a preganglionaris és nem-preganglionaris Edinger-Westphal magok, vagy az urocortin-1 tartalmú és preganglionaris periorbitomotoros magok elnevezések. A cytoarchitectonikai elkülönítés nehézsége és a nem teljesen egységes neurokémiai jelleg (nem minden peptiderg neuron urocortin-1 pozitív) miatt ezek egyike sem volt elfogadható.

A témakör hazai és nemzetközi szakértője, dr. Kozicz Tamás, ezért a Journal of Comparative Neurologyban megjelent összefoglaló közleményében javasolta, hogy a nevezéktan a projekciókhoz igazodjék, és egy Edinger-Westphal preganglionáris (EWpg), valamint egy Edinger-Westphal centrálisan vetítő (EWcp) populációt különítsünk el [46].

A centrális kapcsolatokkal rendelkező Edinger-Westphal mag neuronok az urocortin-1-en kívül többféle neuropeptidet is expresszálnak, mely adatok főleg rágcsálókra és macskára vonatkoznak. Érdekes, hogy a neuropeptid tartalmú sejtekből itt úgy tűnik hiányoznak a klasszikus gyors neurotranszmitterek (GABA, glutamát) markerei (vGlut2 vagy vGat) [45, 47]. Az urocortin-1 immunreaktív sejtek gyakorlatilag mindegyike kokain-és amfetamin-regulált peptidet (CART) ésolecisztokinint is tartalmaz [45, 48], valamint körülbelül 90%-uk nesfatin-1-et is kifejez [49]. Mindhárom neuropeptid szerepet játszik a mag stresszel kapcsolatos működéseiben [46, 49, 50]. Az itt termelődő CART fontos szerepet játszik az anyai fészekrakó magatartás kialakításában [45]. Egérben a CART neuronok közel 67 %-a neuromedin B-t, közel 54 %-a PACAP-ot is koexpresszál [47]. A PACAP génkiütött egerek Edinger-Westphal magjában gyengébb neuronális aktivitás detektálható erőltetett úszás tesztben normál társaikhoz képest [51]. Aolecisztokinin-pozitív neuronokban P anyagot, kis részükben pedig Neuromedin U immunpozitivitást találtak, mely utóbbi a mag alkohol érzékenységeiben játszik szerepet [46, 52]. Emberben az urocortin-1, a CART és nesfatin-1 expressziója meghatározó a magban, a CART neuronokban ezenkívül BDNF koexpressziót is kimutattak [46, 50, 53].

Az urocortin-1, CART, nesfatin-1 és BDNF esetében az expresszió nemi eltéréseket is mutat [46, 53]. Rágcsálóban az urocortin-1 neuronok ösztrogén-alfa receptorral rendelkeznek, emiatt a jelen álláspont szerint az Edinger-Westphal mag e sejtjei fontosak lehetnek stressz érzékenységben mutató nemi különbségek kialakításában. Ezt a feltevést a human mintákban mért kvantitatív mRNS mérési adatok is alátámasztják. Nemi eltérések jellemzik ugyanis a CART, az urocortin-1, a BDNF és a nesfatin mRNS expressziót is az öngyilkosokból származó mintákban [50, 54].

Az Edinger-Westphal magban a kolinerg paraszimpatikus neuronoktól elkülönült peptiderg sejtek tehát sokféle neuropeptidet koexpresszálnak, melyek pontos szerepe további kutatásokat igényel.

3. A PrRP-ről írja a szerző, hogy elhamarkodottnak bizonyult az elnevezése, mivel sem rágcsálókban, sem emberben nem serkenti a prolaktin felszabadítást. Van olyan species, ahol igen? Kíváncsi lennék arra is, hogy akkor az elnevezés később tévesnek bizonyuló kísérleti eredményeken alapult?

A PrRP-t, melynek két biológiailag aktív izoformája a PrRP31 és ennek c-terminális fragmentje a PrRP-20, a GPR10 árva receptor ligandjaként azonosították 1998-ban. A receptor expressziója embereben és rágcsálóban is nagyon erős az elülső hipofízis lebenyben, és az első adatok szerint a PrRP serkentette a prolaktin szekrécióját hipofízis tenyészetben *in vitro* [55]. A

PrRP dózisfüggő módon növelte a plazma prolaktin-szintjét patkányokban intravénásan alkalmazva, legérzékenyebben a proösztrozus időszakában, ami alátámasztani látszott a korábbi felfedezést [56]. A későbbiekben azonban többen cáfolták, hogy emlősökben a prolaktin szekrécióért az agyi PrRP fiziológiásan felelős lenne. A centrálisan alkalmazott PrRP fiziológiás dózisban nem váltott ki prolaktin felszabadulást emlősökben [57, 58]. Hipofízis felé haladó PrRP tartalmú idegrostok az eminentia mediana területén nem mutathatók ki, és az adenohipofízisben sincsenek [59]. Végül, *in vitro* a PrRP gyengébb prolaktin felszabadulást fokozó képességgel bírt, mint az igen gyengének tartott TRH, akár hím, akár a ciklus különböző szakaszaiban lévő nőtény patkányokból származó hipofízis sejteken tesztelték [60]. Egyéb ellentmondásos adatok is napvilágot láttak. Hipotalamusz szeletkultúrában a PrRP növelte a VIP és galanin felszabadulást, melyek serkentik prolaktin szekréciót, intracerebroventrikulárisan alkalmazva pedig stimulálta a tuberoinfundibuláris dopamin neuronokat, így elvileg a prolaktin-szekréciót gátolhatja is [58].

A PrRP és expresszióját csontos halakban tanulmányozva kiderült, hogy ezekben az állatokban csak a PrRP-20 ortológja létezik. Ez a molekula szekvencia homológiát mutat ugyan az emlős PrRP20-szal, de különálló gén kódolja, mely egy ősi gén megkettőződése során vált el a leendő emlős PrRP géntől. Ezért ezt a peptidet, ami emlősökben nem termelődik, PrRP2-nek (korábban C-RFa) nevezték el [58]. A PrRP2 tartalmú sejtek szivárványos pisztrángban a hipotalamusz hátsó részében helyezkednek el, és axonjaik a rostralis pars distalisban prolaktin sejtek körül végződnek [61]. A PrRP2 szisztémás injekciója, illetve hipofízistenyészet kezelése PrRP2-vel különböző halakban jelentős plazma prolaktin és szomatosztatin felszabadulását okoz. Ezzel szemben a human PrRP-nek nincs ilyen hatása a halakban [61-63]. Az adatokból arra következtetnek, hogy a PrRP talán egy ősi mechanizmust képviselhet a prolaktin szekréció közvetlen szabályozásában, melynek édesvízi halakban fő szerepe az ozmoreguláció.

4. Öngyilkos humán agymintákban, melyek a mintabankból rendelkezésre álltak, mutattak ki a munkacsoport tagjai, vagy mások más eltéréseket is?

A professzor Palkovits Miklós által létrehozott és vezetett Humán Agyszövet Bank (<https://semmelweis.hu/hbtb/>) 1992 óta működik a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet-és Fejlődéstani Intézetében. A bankban tárolt minták 260 különböző agyterületről származnak. Izolálásuk főleg a Palkovits professzor által kifejlesztett és sajátkezűleg végzett „punch” technikával történik [64], de friss fagyasztott és fixált szövet blokkok is rendelkezésre állnak. Munkám kezdeti éveiben magam is számos alkalommal vettem részt a koncentrált csapatmunkát igénylő human agyfeldolgozás folyamatában. A minták igen gondos felügyelet mellett készülnek és tárolódnak. A bank különlegessége, hogy a minták post mortem ideje más agybankok mintáihoz képest egyedülállóan rövid, mindössze néhány óra. A minták ellenőrzött minőségűek (RNS integritás szám, és pH adatok), és számos publikáció alapját képezték és képezik a mai napig.

A Humán Agyszövet Bank honlapján (<https://semmelweis.hu/hbtb/>) megtalálható a bankból származó minták felhasználásával készült publikációk listája. Az idei évvel bezárólag

összesen 34 közlemény jelent meg, melyben kontroll és öngyilkosokból származó mintákat hasonlítottak össze. A mi munkacsoportunk csak a dolgozatban szereplő publikációhoz használt fel agybanki mintát, melyben a PrRP receptorok mRNS-einek relatív expressziós szintjét vizsgáltuk a dorsolateralis hipotalamuszban [65]. Mások viszont az öngyilkos mintákban eltéréseket mutattak ki többek között klasszikus neurotranszmitterek, különböző transzkripciósfaktorok, enzimek, egyes miRNS-ek glükokortikoid- és szerotonin receptorok mRNS-einek szintjei között különböző agyterületeken. Összesen 18 öngyilkosokat vizsgáló publikáció származik hazai munkacsoportunktól. Érdekességgéppen 10 publikációban (4 hazai, 6 külföldi munkacsoport) vizsgáltak különböző neuropeptideket (urocortin-1, galanin, BDNF, nesfatin-1, NPY, CART, POMC, CRH, AVP, GRP) vagy azok receptorát (CRH-R).

Irodalomjegyzék

1. Brown, R.W. and R. Chirala, *Utility of microwave-citrate antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry*. Mod Pathol, 1995. **8**(5): p. 515-20.
2. Cuevas, E.C., et al., *Microwave antigen retrieval in immunocytochemistry: a study of 80 antibodies*. J Clin Pathol, 1994. **47**(5): p. 448-52.
3. Muñoz, T.E., et al., *Microwave-assisted immunostaining: a new approach yields fast and consistent results*. J Neurosci Methods, 2004. **137**(2): p. 133-9.
4. Levata, L., et al., *Nesfatin-1 Acts Centrally to Induce Sympathetic Activation of Brown Adipose Tissue and Non-Shivering Thermogenesis*. Horm Metab Res, 2019. **51**(10): p. 678-685.
5. Stephan, D., et al., *Knockdown of Endogenous Nucleob2/Nesfatin-1 in the PVN Leads to Obese-Like Phenotype and Abolishes the Metformin- and Stress-Induced Thermogenic Response in Rats*. Horm Metab Res, 2022. **54**(11): p. 768-779.
6. Yuan, J.H., et al., *Nesfatin-1 in the Lateral Parabrachial Nucleus Inhibits Food Intake, Modulates Excitability of Glucosensing Neurons, and Enhances UCP1 Expression in Brown Adipose Tissue*. Front Physiol, 2017. **8**: p. 235.
7. Scheele, C. and C. Wolfrum, *Brown Adipose Crosstalk in Tissue Plasticity and Human Metabolism*. Endocr Rev, 2020. **41**(1): p. 53-65.
8. Bienboire-Frosini, C., et al., *The Role of Brown Adipose Tissue and Energy Metabolism in Mammalian Thermoregulation during the Perinatal Period*. Animals (Basel), 2023. **13**(13).
9. Fernández-Verdejo, R., et al., *Contribution of brown adipose tissue to human energy metabolism*. Mol Aspects Med, 2019. **68**: p. 82-89.
10. Cannon, B., et al., *Human brown adipose tissue: Classical brown rather than brite/beige?* Exp Physiol, 2020. **105**(8): p. 1191-1200.
11. Saito, M., et al., *Brown Adipose Tissue, Diet-Induced Thermogenesis, and Thermogenic Food Ingredients: From Mice to Men*. Front Endocrinol (Lausanne), 2020. **11**: p. 222.
12. Moonen, M.P.B., E.B.M. Nascimento, and W.D. van Marken Lichtenbelt, *Human brown adipose tissue: Underestimated target in metabolic disease?* Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2019. **1864**(1): p. 104-112.
13. Wang, Y., et al., *Nesfatin-1 promotes brown adipocyte phenotype*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 34747.
14. Holland, P.R., M. Barloese, and J. Fahrenkrug, *PACAP in hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythm: importance for headache*. J Headache Pain, 2018. **19**(1): p. 20.
15. Hastings, M.H., E.S. Maywood, and M. Brancaccio, *Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus*. Nat Rev Neurosci, 2018. **19**(8): p. 453-469.
16. Rusnak, M., et al., *Depolarization and neurotransmitter regulation of vasopressin gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro*. J Neurosci, 2007. **27**(1): p. 141-51.
17. Shen, Y.C., et al., *Roles of Neuropeptides in Sleep-Wake Regulation*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(9).
18. Markakis, E.A., *Development of the neuroendocrine hypothalamus*. Front Neuroendocrinol, 2002. **23**(3): p. 257-91.

19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Recabal, A., T. Caprile, and M.L.A. García-Robles, *Hypothalamic Neurogenesis as an Adaptive Metabolic Mechanism*. Front Neurosci, 2017. **11**: p. 190.
23. 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.
24. 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.
25. Hollville, E., S.E. Romero, and M. Deshmukh, *Apoptotic cell death regulation in neurons*. Febs j, 2019. **286**(17): p. 3276-3298.
26. Yamaguchi, Y. and M. Miura, *Programmed cell death in neurodevelopment*. Dev Cell, 2015. **32**(4): p. 478-90.
27. Burbridge, S., I. Stewart, and M. Placzek, *Development of the Neuroendocrine Hypothalamus*. Compr Physiol, 2016. **6**(2): p. 623-43.
28. 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.
29. Lee, B., et al., *Dlx1/2 and Otp coordinate the production of hypothalamic GHRH- and AgRP-neurons*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 2026.
30. Trajkovski, M., et al., *MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity*. Nature, 2011. **474**(7353): p. 649-53.
31. Yeo, X.Y., et al., *Potentials of Neuropeptides as Therapeutic Agents for Neurological Diseases*. Biomedicines, 2022. **10**(2).
32. Pflimlin, E., et al., *Design of a Long-Acting and Selective MEG-Fatty Acid Stapled Prolactin-Releasing Peptide Analog*. ACS Med Chem Lett, 2019. **10**(8): p. 1166-1172.
33. Mráziková, L., et al., *Lipidized Prolactin-Releasing Peptide as a New Potential Tool to Treat Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus: Preclinical Studies in Rodent Models*. Front Pharmacol, 2021. **12**: p. 779962.
34. Mengr, A., et al., *Palmitoylated Prolactin-releasing Peptide Reduced A β Plaques and Microgliosis in the Cerebellum: APP/PS1 Mice Study*. Curr Alzheimer Res, 2021. **18**(8): p. 607-622.
35. Toth, D., et al., *Role of endocrine PACAP in age-related diseases*. Front Endocrinol (Lausanne), 2023. **14**: p. 1118927.
36. Cherait, A., W.A. Banks, and D. Vaudry, *The Potential of the Nose-to-Brain Delivery of PACAP for the Treatment of Neuronal Disease*. Pharmaceuticals, 2023. **15**(8).
37. Rasmussen, N.B., et al., *The effect of Lu AG09222 on PACAP38- and VIP-induced vasodilation, heart rate increase, and headache in healthy subjects: an interventional, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled study*. J Headache Pain, 2023. **24**(1): p. 60.
38. Schalla, M.A. and A. Stengel, *Current Understanding of the Role of Nesfatin-1*. J Endocr Soc, 2018. **2**(10): p. 1188-1206.
39. Shimizu, H., et al., *Nesfatin-1: an overview and future clinical application*. Endocr J, 2009. **56**(4): p. 537-43.
40. 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.
41. 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.
42. Nauck, M.A. and J.J. Meier, *Incretin hormones: Their role in health and disease*. Diabetes Obes Metab, 2018. **20 Suppl 1**: p. 5-21.
43. Hammoud, R. and D.J. Drucker, *Beyond the pancreas: contrasting cardiometabolic actions of GIP and GLP1*. Nat Rev Endocrinol, 2023. **19**(4): p. 201-216.
44. Kleczkowska, P., et al., *Hybrid opioid/non-opioid ligands in pain research*. Curr Pharm Des, 2013. **19**(42): p. 7435-50.
45. Topilko, T., et al., *Edinger-Westphal peptidergic neurons enable maternal preparatory nesting*. Neuron, 2022. **110**(8): p. 1385-1399.e8.

46. Kozicz, T., et al., *The Edinger-Westphal nucleus: a historical, structural, and functional perspective on a dichotomous terminology*. J Comp Neurol, 2011. **519**(8): p. 1413-34.
47. Priest, M.F., et al., *Peptidergic and functional delineation of the Edinger-Westphal nucleus*. Cell Rep, 2023. **42**(8): p. 112992.
48. Van Wijk, D.C., et al., *Ultrastructural and immunocytochemical characterization of the rat non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus*. Gen Comp Endocrinol, 2009. **164**(1): p. 32-9.
49. Okere, B., et al., *Restraint stress alters the secretory activity of neurons co-expressing urocortin-1, cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and nesfatin-1 in the mouse Edinger-Westphal nucleus*. Brain Res, 2010. **1317**: p. 92-9.
50. Bloem, B., et al., *Sex-specific differences in the dynamics of cocaine- and amphetamine-regulated transcript and nesfatin-1 expressions in the midbrain of depressed suicide victims vs. controls*. Neuropharmacology, 2012. **62**(1): p. 297-303.
51. Gaszner, B., et al., *The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger-Westphal nucleus, ventral lateral septum, and dorsal raphe nucleus*. Neuroscience, 2012. **202**: p. 283-99.
52. Medrano, M., et al., *Neuromedin U Neurons in the Edinger-Westphal Nucleus Respond to Alcohol Without Interfering with the Urocortin 1 Response*. Neurochem Res, 2024. **49**(12): p. 3277-3296.
53. Derks, N.M., et al., *Sex-specific expression of BDNF and CART in the midbrain non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus in the rat*. Peptides, 2009. **30**(12): p. 2268-74.
54. Kozicz, T., et al., *Gender-related urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor expression in the adult human midbrain of suicide victims with major depression*. Neuroscience, 2008. **152**(4): p. 1015-23.
55. Hinuma, S., et al., *A prolactin-releasing peptide in the brain*. Nature, 1998. **393**(6682): p. 272-6.
56. Matsumoto, H., et al., *Stimulation of prolactin release by prolactin-releasing peptide in rats*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **259**(2): p. 321-4.
57. Dodd, G.T. and S.M. Luckman, *Physiological Roles of GPR10 and PrRP Signaling*. Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: p. 20.
58. Tachibana, T. and T. Sakamoto, *Functions of two distinct "prolactin-releasing peptides" evolved from a common ancestral gene*. Front Endocrinol (Lausanne), 2014. **5**: p. 170.
59. Jarry, H., et al., *Prolactin-releasing peptides do not stimulate prolactin release in vivo*. Neuroendocrinology, 2000. **71**(4): p. 262-7.
60. Samson, W.K., et al., *Gender-biased activity of the novel prolactin releasing peptides: comparison with thyrotropin releasing hormone reveals only pharmacologic effects*. Endocrine, 1998. **9**(3): p. 289-91.
61. Moriyama, S., et al., *A homolog of mammalian PRL-releasing peptide (fish arginyl-phenylalanyl-amide peptide) is a major hypothalamic peptide of PRL release in teleost fish*. Endocrinology, 2002. **143**(6): p. 2071-9.
62. Sakamoto, T., et al., *Intra-arterial injection of prolactin-releasing peptide elevates prolactin gene expression and plasma prolactin levels in rainbow trout*. J Comp Physiol B, 2003. **173**(4): p. 333-7.
63. Seale, A.P., et al., *Isolation and characterization of a homologue of mammalian prolactin-releasing peptide from the tilapia brain and its effect on prolactin release from the tilapia pituitary*. Gen Comp Endocrinol, 2002. **125**(3): p. 328-39.
64. Palkovits, M., *Punch sampling biopsy technique*. Methods Enzymol, 1983. **103**: p. 368-76.
65. 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.

Budapest, 2025. május 19.



Dr. Tóth Zsuzsanna, PhD