

Dr. Jászberényi Miklós

a 'Neuropeptidek Modulátor Szerepe az Adaptációs Folyamatok Szerveződésében ' c. MTA doktori értekezésének bírálata

Az értekezés címe igen széles területet ölel át. A Lissák Kálmán akadémikus nevével fémjelzett Iskola mintegy 50 éve indult többek között ezzel a témával. A szerző a Szegedi Tudományegyetem Kórélettani intézetében rendszeres kutató munkával bővítette a neuropeptidek szerepének kutatását az adaptációs élettani és kórélettani folyamatok megértéséhez, ami volumenét és minőségét tekintve is elismerésre méltó és valóban alkalmas egy MTA doktori cím elérésére is.

A disszertáció formailag követi az előírásokat, magyar nyelven foglalja össze a kiválasztott témákhoz kapcsolódó közlemények anyagát egy rövid Bevezetés, egy részletes Anyag és Módszerek valamint Eredmények és Megbeszélésük és végül a Következtetések fejezetek segítségével. Az értekezésben a hivatkozások száma 292, melyet egy tudománymetriai összefoglaló táblázat követ. Ebből a táblázatból kiderül, hogy a jelölt 42 nemzetközi közleményéből 9 került közlésre a korábbi utolsó tudományos fokozat (gondolom PhD) elérése utáni időszakban. Összesített független idézetek száma 441. Ez a tudományos teljesítmény megfelelőnek bizonyult az MTA doktora cím eléréséhez, amivel egyetértek.

A Bevezetés tömören és meggyőzően tárgyalja a neuroendokrinológia rohamos fejlődését, mely az agykutatás egyre több részkerésével foglalkozik és így az idegtudományok szerves része lett. A bevezető áttekintés érinti a saját korábbi kutatásokat is, melyek pl. a PhD disszertációban kerültek összefoglalásra.

A Célkitűzések fejezet 3 csoportba sorolja a vizsgált új neuropeptideket, (1) orexin/hipokretin és ghrelin, eredetileg a táplálkozás szabályozásába sorolt peptidek, (2) a cirkadián szabályozásba szerepet játszó néhány peptid: neuromedinek és RFamidok, (3) a viselkedésre és a neurodegenerációra is ható peptidek közül a növekedési hormon és a gonadotropin 'releasing'hormonok és az apelin.

Az Anyagok és Módszerek fejezet részletes leírásokat ad az alkalmazott széles skálán mozgó módszerekről, melyek a hormonszintek és viselkedési változók mellett morfológiai, biokémiai és genetikai méréseket szolgáltatottak. A formai oldalról lenne megjegyzésem: nem szerencsés, hogy az ábraalírások nagyon szűkszavúak, az Eredmények fejezetek ábráira is vonatkozik ez a

megjegyzés. A részletes leírások a szöveges részben találhatóak, ez nem minden esetben szolgálja a teljes és gyors megértést. Az 55. és 56. ábrák mutatják, milyen hasznos az ábrához kapcsolt közvetlen magyarázat, ráadásul kisebb betűvel is szedhető, ami helykímélést jelent. A jelen formában magyar nyelven kívánt MTA doktori értekezés a gyakorlatban csak nagyon körülményesen tudja visszaadni a több teljes megjelent nemzetközi közlemény teljes igényű kivonatát – ami tehát külön feladat elé állítja a jelöltet.

Megjegyzés: az MWM módszer leírása (10 ábra) mintegy 3,5 oldal terjedelmet kapott. Ez azt is jelentheti, hogy a szerzők ebben a kísérleti módszerben jelentős önálló módosításokat hajtottak végre, ami külön is kiemelhető, megemlíthető lenne. Jelenleg nagyon aktuális a magatartási módszerek továbbfejlesztése, tökéletesítése egy-egy adott kérdés célzottabb megválaszolásában. Kérdésem, hogy ez így történt-e ebben az esetben? És ha igen, akkor miben áll a módszertani továbbfejlesztés lényege? Ugyanakkor, ennél az ábránál 5 egymás utáni napon került bemutatásra egy egér MWM tanulása. Kérdés: a bemutatott eset jellemző-e? Ugyanis, az első társításnál az állat nem találta meg az emelvényt, míg a 2-iktól kezdve nagyon gyorsan tanult. Ez azt jelenti, hogy az első pozitív társítás után az állatok gyakorlatilag megtanulták a tesztet, azaz egy társítási tanulást mutattak! Az is kérdéses, hogy mely életkorból származik ez a példa? Ennek lehet jelentősége a tanulás életkor függése miatt.

Ha már ennél a módszernél tartunk megemlíthető, hogy helyel-közzel bizonyos pontatlanságok is előfordulnak a disszertációban, melyek szinte elkerülhetetlenül jelentkeznek, bár zavaróak lehetnek. Itt a 10. ábra leírásánál az olvasható: hogy „Mivel az 5. tanulási nap nem eredményezett érdemleges változást a 4.-hez mérten” az 5-ik tesztet kihagyták és csak 4 tesztből állt a tanulási blokk. Ugyanez a megjegyzés az értekezés téziseinek füzetében (12. old.) úgy szól, hogy „Mivel az 5. tanulási nap eredményezett érdemleges változást a 4.-hez mérten” ... - nyilván ez a másik kijelentés pontosan ellentéte az előbbinek (ami viszont azért zavaró, mert a legtöbb olvasó csak a tézis füzetet olvassa, és nem érti a logikát).

Eredmények és Megbeszélések

(1) Az orexinek/hipokretinek és a grelin

Az orexinek/hipokretinek funkcionális hatásvizsgálata felvetette, hogy az étvágy fokozódás az az élettani állapot, ami egyrészt a peptidhatások mögött áll, mely szövődik a HAM aktivációval is és

ezek a peptidek csökkentik a testhőmérsékletet, tehát az vegetatív idegrendszer anabolikus mediátoraként is felfoghatóak egyidejűleg. Továbbá összehangolt a hatásuk a CRF és NPY peptid hatásokkal, valamint fokozzák a tanulási képességet is adrenerg és GABA-erg interakcióban. Az itteni eredmények felsorolása között nincs adat arra vonatkozóan, hogy a lokomotoros intenzitás és a magatartási ébredési reakciók milyen irányba változnak? Ez a motoros kimenetű funkció család azért fontos, mert e nélkül nincs sem céltudatos, sem adaptációs viselkedés. Különböző az egész disszertáció egyik alapja és érdeme e funkciók kiemelése a viselkedés szempontjából, amit nagyra értékeltek (más szempontok alapján). Ugyanakkor, kimutatták, hogy egy szorongás-szerű viselkedési állapot jelentkezik a peptid kezelések után, valószínűleg egy fokozott emocionális állapot kialakulásának következtében. Itt felmerül a számos magatartási változó intenzitás-vizsgálatának szükségessége az idő függvényében a peptid kezelések után. Miután ezen orexigén peptidek hatásában fontos az NPY és CRH aktiváció e hormonok hatásának időfüggése is jelentős lehet, és az éberség-stressz fokozódása visszacsapási reakcióként szorongás-szerű állapotot válthat ki. Mi erről a jelölt véleménye? Másrészt, az interakciókban milyen prioritási sorrend körvonalazható a kiváltott hatásokban az egyes vizsgált neuropeptidek között? Nyilván ehhez egyidejű peptid hatások összehasonlítására lenne szükséges, ami bonyolult, de a hatékonyság összehasonlítása szükséges lehet.

A ghrelin esetében van bemutatott vizsgálat a kiváltott és spontán lokomotoros aktivitás értékelésére, és ez a peptid nagyban mutatott hasonlóságot az orexin/hipokretin hatásokkal minden vizsgált paraméterben kivéve a testhőmérséklet változást. Maga a ghrelin, ami perifériásan is termelődik a 'growth hormone secretagogue receptor'-on (GHS-R) keresztül gátolja a termogenezist, tehát végül is, ezen a ponton is hasonló a hatása az orexin/hipokretin peptidekkel. E receptor hatás révén pl., elősegíti az elhízást főleg időskorban (Lin és mtsai., AGING, December 2014, Vol 6, N 12). Másrészt valóban megerősíthető, hogy a ghrelin a markáns maghőmérsékletet emelő hatásában valószínűleg csak másodlagos utak a jelentősek, mint pl. a szerotonin rendszer hatása, ahogy erre a disszertáció konkludált. A szerotonin szerepe felmerül a HAM működésében is és a ghrelin jelentősen fokozza ennek működését szintén szinte kizárólag másodlagos utakon (5-HT jelentősége). Ezen a ponton lehetne rámutatni a disszertáció egyik erőteljes kutatási erejére, ahogy az összefüggéseket vizsgálta az adaptációs viselkedés és a HAM aktivációja között (ezek már a korábbi kutatások célpontjai is voltak), amihez hozzáadódott a vegetatív funkciók neuroendokrin vizsgálata összefüggésben valószínűleg a legjelentősebb klasszikus neurotranszmitter funkciókkal (amelyek mindenképpen újabb kutatási eredmények). A munka tehát kellően holisztikus ahhoz, hogy a humán patológia számos irányába közvetlen kimenetet szolgáltatson, ami nyilvánvalóan a fő célja az állatkísérleteknek is.

(2) RF amid rokonsági körbe tartozó peptidek

A bemutatott kísérletek második fejezetében vizsgált peptidek tovább erősítik a fent elmondottakat mivel újabb peptid család hatásában jelentkeznek az adaptációs viselkedés és annak peptiderg szabályozására vonatkozó nagyrészt már megismert utak. Itt adatokat látunk a mosakodás viselkedésre is, ami valóban szoros összefüggésbe hozható a magatartási éberségi reakcióval, amit számos neuropeptid támogat, ahogy ezt láttuk a jelen disszertációban. A mosakodási válasz ebben a folyamatban azért érdekes, mert valószínűen egy visszacsapási funkció eredménye (negatív feed-back válasznak is felfogható, az irodalomban 'dearousal' kifejezéssel is illetik) a HAM stimulációjának következtében. Ha mesterségesen, szinte farmakológiailag, adaptációs választ generálunk bioaktív vegyületekkel, akkor a szabályzó rendszer vissza is tér az eredeti állapotba az anyag beadása után. Ez a funkcionális fázis időben eltoltnak, később jelentkezik és a komplex vizsgálata fontos, mivel valószínűen a védekező (gátló) mechanizmusokra hívja fel a figyelmet, ami a patológia felé esetleg több információt szolgáltat. A számos részletes eredmény mellett ebben a fejezetben a vegetatív válaszokat hangsúlyoznám: nevezetesen a markáns testhőmérséklet és a kisebb mértékű szívfrekvencia csökkenéseket, ami jelentős a vegetatív idegrendszeri szabályozás központi idegrendszeri neuroendokrin szerveződése szempontjából, és jelen van az előbb tárgyalt peptideknél is.

(3) A neuroprotekción modulációja

A demencia terápiája jelenleg szinte a legégetőbb gyógyszeres kérdés is, mivel egyszerűen fogalmazva nem létezik még valóban hatékony gyógyszeres terápia. Az átlagéletkor viszont növekszik az idegrendszeri megbetegedések részesedése az egészségügyi keretből ennél még drasztikusabban emelkedik. Tehát minden törekvés, ami hatékony gyógyszerelést céloz kiemelhető tudományos szempontból is. Ráadásul, a jelen disszertáció a legelső között van, mely vállalkozik a neuropeptid kezelés megoldással. A szerzők az Aging folyóiratban megjelent közleménye foglalja össze a publikált eredményeket (Jaszberenyi és mtsai, AGING, November 2012, Vol 4 N 11). Csak pár megjegyzés ehhez a fejezethez:

- A 62. oldalon olvashatjuk, hogy az A β peptid származékok lényegében a sejtmembránban halmozódnak fel és ezen keresztül indul el a toxicitás. Itt az A β fibrillumokra (molekuláris béta-templát alapú struktúrákra) történhetett az utalás, de az is ismert, hogy az oligomér A β molekulák a legtoxikusabbak és ezek oldékonyak vízben. Tehát, főleg a korai stádiumban az oligomér molekulák lehetnek a neuropatológia és a neuronkárosodás célpontjában.

- Az IHC analízisnél a neuronális A β immunfestést vették alapul az A β 1-42 felhalmozódás indikátorának és ez alapján számolták az immunpozitív sejtek számát. Kérdés, hogy a pozitív neuronokban az A β festődés csak a membránra lokalizálódott-e (ahogy ezt a bevezető rész tárgyalta) vagy fellelhető volt az intracelluláris festődés is? Másrészt A β pozitív plakkok kimutathatóak voltak-e az interneurális térben? Ugyanis, az alkalmazott 5XFAD egértörzsben jelen vannak az A β plakkok (Antonios és mtsai., Sci Rep. 2015 5:17338.) és ismert az is, hogy az APP enzimatis lebontás már intracellulárisan is elkezdődik, mely toxikus A β peptidekhez vezet (Zhang és mtsai, Nat Commun. 2015 6:8762.). Ezek a felvetések tehát a mért immunpozitív stuktúrák kiválasztásának indoklására vonatkoznak. Az eredményeket a 45. ábra foglalja össze. Ezen az ábrán kérdéses, hogy a 'B' ábra oszlopaihoz SD vagy SE kapcsolódik-e? További megjegyzés, hogy a 45/C ábrán nincs feltüntetve a nagyítás mértéke. További észrevétel, hogy a kontroll és a kezelt szövettani képek nem összehasonlíthatóak, a kiválasztott morfológiai struktúra túlzottan különbözik a kontroll vs. kezelt csoportokban. Így kérdés, hogy a pozitív sejtek számát mire standardizálták?

- Kérdés, hogy a géneexpressziókat összefoglaló 4. táblázatban növekedés vagy csökkenés van ábrázolva, tehát nőtt vagy csökkent a gének expressziója?

A *Következtetések* fejezet nagyon hasznos és szemléletes összefoglaló ábrákat mutat be, ami tökéletesen megfelel az elvárásoknak. Jómagam csak egy további szempontot vetnék fel, ami kéri a jelölt véleményezését is:

Ismert, hogy a növekedési hormon (GH) koncentráció meredeken csökken a meno- és andropausa után. A GHRH antagonisták valószínűen tovább csökkentik a növekedési hormon szinteket (GH és IGF-I). Elfogadott, hogy ezek a növekedési hormonok fokozzák az m-Tor intracelluláris jelátvivő útvonal aktivitását. Blagosklonny MV teóriája (pl. Aging, 2010, Vol.2 No.5) szerint az m-Tor intracelluláris útvonal csökkenése késlelteti az öregedést ill. ellene hat az öregedéssel járó patológias állapotoknak (betegségeknek, esetleg a neurodegeneratív betegségeknek is). Mit jelenthet tehát az m-Tor útvonal további involúciója a kapott eredmények értékelése szempontjából?

Összefoglalva, kiemelendő, mint általános értékelés, hogy a disszertáció

(1) bővítette a hipotalamus-adenohipofízis-mellékvesekéreg mind a stressz reakcióban kiemelt hormonális szabályozási tengely funkcionális kapcsolatát további az elmúlt 10-15 évben feltárt

neuropeptidok bevonásával, melyek a táplálékfelvétel, hőszabályozás, motoros aktivitás, továbbá számos viselkedési változó, mint a tanulás, szorongás-depresszió idegi és hormonális szabályozásának megértését segítette elő összefüggéseiben.

(2) Hozzájárult ahhoz is, hogy szisztematikus kutatással feltárták az újabban megismert neuropeptidok és a klasszikus neurotranszmitterek közötti interakciók számos vonatkozását, mely a neuro-pszichofarmakológiai alapokat is szolgálta.

(3) Nyitott számos eddig összességében egyáltalán nem tisztázott neuroendokrin kutatási területek felé is, mint pl. az autonóm idegrendszer agytörzsi struktúrára kiterjesztett neuroendokrinológiája, vagy a lokomotoros szabályozás, valamint az előagyban a bazális ganglionok és agykéregi struktúrák kapcsolatainak hormonális szabályozása. Ezen belül eljutott a neurodegenerációt és a demencia kezelésének hormonális vonatkozásaihoz is, nevezetesen a GHRH és GnRH analógok és az apelin szerepének vizsgálatához.

A fentiek alapján az értekezés nyilvános vitára bocsátását javaslom, továbbá javaslom az MTA doktori cím elnyerését is.

Budapest, 2016. február 2.



Dr. Nyakas Csaba

MTA doktora

Válaszok

Tisztelt Bíráló bizottság, tisztelt bírálók

Szeretném köszönetemet kifejezni a bírálóknak, rendkívül alapos és emellett mértéktartó bírátaikért. A bírálatok egyik közös vonatkozása volt, hogy felvetették, miszerint nem minden esetben élünk a kínáló tudományos lehetőségekkel, a felmerülő kérdések komplex, kerek lezárása érdekében. Ez annak tudható be, hogy intézetünk elsősorban oktató intézet, aminek kutatási feltételei korlátozottak, hiszen oktatási terhelésünk kiemelkedően magas. Ezért számos, Telegdy akadémikus Úrral közösen vitt projektünk esetében az ígéretes indulás és a hivatkozásban tükröződő nemzetközi reflexió ellenére azzal kellett szembesülnünk, hogy a továbblépéshez a témakörökben felmerülő kérdések kimerítő megválaszolásához nem rendelkezünk elégséges erőforrással. Pedig sikeres tudományos törekvések esetén jogos elvárás lenne, hogy a kutató „addig üti a vasat, amíg meleg”. Válaszaiban egyenként reagálok a bírálók kérdésre, azon esetek kivételével, melyek konszenzusosak volt. Ezeket előre is venném.

Válaszaim Prof Dr Nyakas Csaba bírálatára:

Külön köszönöm Prof Dr Nyakas Csaba rendkívül építő jellegű sorait.

1. *A formai oldalról lenne megjegyzésem: nem szerencsés, hogy az ábraalírások nagyon szűkszavúak, az Eredmények fejezetek ábráira is vonatkozik ez a megjegyzés. A részletes leírások a szöveges részben találhatóak, ez nem minden esetben szolgálja a teljes és gyors megértést.*

Teljes mértékben egyet kell értek ezzel a kitételrel. Empatikusabban kellett volna eljárnom, de az ember a szakterületén belül sokszor „nem látja a fától az erdőt”.

2. *az MWM módszer leírása (10 ábra) mintegy 3,5 oldal terjedelmet kapott. Ez azt is jelentheti, hogy a szerzők ebben a kísérleti módszerben jelentős önálló módosításokat hajtottak végre, ami külön is kiemelhető, megemlíthető lenne. Jelenleg nagyon aktuális a magatartási módszerek továbbfejlesztése, tökéletesítése egy-egy adott kérdés célzottabb megválaszolásában. Kérdésem, hogy ez így történt-e ebben az esetben? És ha igen, akkor miben áll a módszertani továbbfejlesztés lényege?*

A Morris water maze esetében azért került sor ilyen részletes leírásra, mert a rendszert én installáltam a University of Miami és a Hospital of Veteran Affairs kísérleti létesítményébe 2010-ben. Ezért számos apróbb módosítást egyszerre volt módom kivitelezni, melyek közül számos már egyedileg közölt adaptáció, de egyszerre nem kerültek alkalmazásra. Ezek közül volt olyan lépés, aminek az engedélyeztetése hónapokig tartott. A barna egereket például hajfesték segítségével egységes feketére festettem. A rendszert egyedül irányítottam, külön a projekt céljára készített speciális távkapcsoló révén. A komputeres rendszer kontrasztérzékelési problémáit (hullámhegy és hullámvölgy tükröződése és árnyéka) külön erre a célra vásárolt, egységes (fénymérővel bemért) szórt fényt biztosító reflektor panelek segítségével oldottuk meg. Ugyanis a beállítás során egyértelművé vált, hogy az érzékelés hibáinak utólagos (bár szoftveresen lehetséges) korrekciója egy-egy munkanapot 10-12 órára nyújt el. Korrekt hardveres beállításokkal azonban a teljes munkamenetet saját magam 8-10 órán belül tudtam kivitelezni. A rendszert Nobel-díjas Schally Professzor Úr intézetében azóta is ennek megfelelően használják és nemrég egy 3 részből álló cikksorozat alapjául szolgáltak a rendszerrel végzett mérések¹.

3. *Ugyanakkor, ennél az ábránál 5 egymás utáni napon került bemutatásra egy egér MWM tanulása. Kérdés: a bemutatott eset jellemző-e? Ugyanis, az első társításnál az állat*

nem találta meg az emelvényt, míg a 2-iktól kezdve nagyon gyorsan tanult. Ez azt jelenti, hogy az első pozitív társítás után az állatok gyakorlatilag megtanulták a tesztet, azaz egy társításos tanulást mutattak!?

Szigorúan térbeli tájékozódásról van szó, amelyben még a szagjelek sem segítettek, hiszen az állatokat minden teszt napon randomizáltan a 3, az égtájaknak megfelelő indítási helyről startoltattam el. Itt tulajdonképpen a helyiség térbeli objektumai által képzett hippocampálisan vetült térképük kialakulásának gyorsaságát, illetve ezen kialakulási folyamat sebességének hanyatlását követtük havi rendszerességgel. A kioltásra maga a próba szolgált, mikor a platformot kivettük. Tehát ez nemcsak a teszt számos adatforrását kizáró cut-off-ot eliminálta, hanem hetente ismételve a 3 pihenési hét alatt további kioltást okozott. Ehhez természetesen társult a megfigyelő helyiség tájékozódási pontként szolgáló tárgyainak áthelyezése. Ezen apró újítások az MWM rendszerben a krónikus kísérletekhez, követéshez történő adaptációt segítették. Az állatok gyorsan tanulnak, de ez így volt Morris eredeti publikációjában is ².

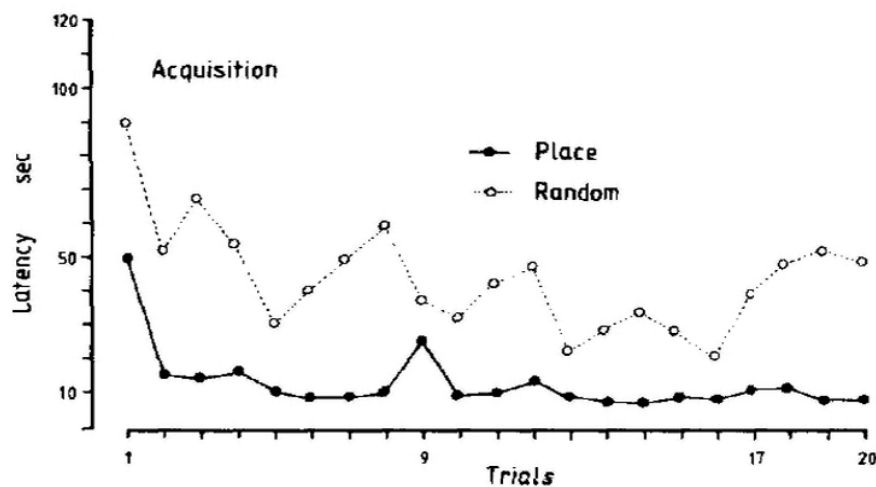


Fig. 4. A: latency to escape from the water over 20 trials of acquisition by Groups Place and Random. The rapid escape by rats of Group Place cannot be due to local cues from the platform, reflected waves etc.

4. *Az is kérdéses, hogy mely életkorból származik ez a példa? Ennek lehet jelentősége a tanulás életkor függése miatt.*

Az állatokat 3 hónaposan kezdtük tesztelni és fél évig (9 hónapos korukig) követtük. A beszoktatás és a lebegésre hajlók kiszűrése két hónapos korukban megkezdődött.

5. *Ha már ennél a módszernél tartunk megemlíthető, hogy helyel-közzel bizonyos pontatlanságok is előfordulnak a disszertációban, melyek szinte elkerülhetetlenül jelentkeznek, bár zavaróak lehetnek. Itt a 10. ábra leírásánál az olvasható: hogy „Mivel az 5. tanulási nap nem eredményezett érdemleges változást a 4.-hez mérten” az 5-ik tesztet*

kihagyták és csak 4 tesztből állt a tanulási blokk. Ugyanez a megjegyzés az értekezés téziseinek füzetében (12. old.) úgy szól, hogy „Mivel az 5. tanulási nap eredményezett érdemleges változást a 4.-hez mérten” ... - nyilván ez a másik kijelentés pontosan ellentéte az előbbinek (ami viszont azért zavaró, mert a legtöbb olvasó csak a tézis füzetet olvassa, és nem érti a logikát).

Köszönöm a téziszüzetben szereplő értelemzavaró hiba korrekcióját. Valóban, itt kihagytam a „nem” tagadószt.

6. Az orexinek/hipokretinek funkcionális hatásvizsgálata felvetette, hogy az étvágy fokozódás az az élettani állapot, ami egyrészt a peptidhatások mögött áll, mely szövődik a HAM aktivációval is és ezek a peptidek csökkentik a testhőmérsékletet, tehát az vegetatív idegrendszer anabolikus mediátoraiént is felfoghatóak egyidejűleg.... Az itteni eredmények felsorolása között nincs adat arra vonatkozóan, hogy a lokomotoros intenzitás és a magatartási ébredési reakciók milyen irányba változnak?

Valóban nem végeztünk vizsgálatokat a spontán és lokomotoros aktivitás és az ébredési reakciók irányába az orexinekkel kapcsolatban. Mikor a rendszer jelentőségét felismertük elsőként hőszabályozási és explorátoros kísérletekbe kezdtünk és Telegdy akadémikus Úr elindította egy telemetriás rendszer beszerzését. Mikorra ezt installáltuk, és kísérleteket elvégeztük addigra sajnos csupán hőszabályozási eredményeinket volt módunk közölni³, mivel addigra a lokomócióra gyakorolt hatás publikálásra került⁴. Ez világosan bizonyította, hogy az orexinek mind a spontán, az explorátoros és a sztereotíp aktivitást fokozzák.

7. Ugyanakkor, kimutatták, hogy egy szorongás-szerű viselkedési állapot jelentkezik a peptid kezelése után, valószínűen egy fokozott emocionális állapot kialakulásának következtében. Itt felmerül a számos magatartási változó intenzitás-vizsgálatának szükségessége az idő függvényében a peptid kezelése után. Miután ezen orexigén peptidek hatásában fontos az NPY és CRH aktiváció e hormonok hatásának időfüggése is jelentős lehet, és az éberség-stressz fokozódása visszacsapási reakcióként szorongás-szerű állapotot válthat ki. Mi erről a jelölt véleménye? Másrészt, az interakciókban milyen prioritási sorrend körvonalazható a kiváltott hatásokban az egyes vizsgált neuropeptidek között? Nyilván ehhez egyidejű peptid hatások összehasonlítására lenne szükséges, ami bonyolult, de a hatékonyság összehasonlítása szükséges lehet.

A CRH aktiváció, a HAM tengely, szorongás viszonylatában hajlanék arra, hogy itt kísérleteink egyedi funkciók válaszait tükrözik. Csakúgy, mint a magno- és parvocelluláris vazopresszin

neuronok, vagy a dopaminerg rendszerek eltérő funkciói esetén, a mezolimbikus és hipotalamikus CRH/CRF neuronok a környezeti kihívásokra adott válasz már erősen elágazott elemeit képezik. Az, hogy mindkét neuron csoport képes reagálni az ébredési reakció egyik legfontosabb peptiderg mediátoraira az orexinekre/hipokretinekre annak icv. beadása után, nem igazol közöttük közvetlen kapcsolatot. Ugyanakkor a stria terminális felé mutató orexinerg projekciók illetve a paraventriculáris talamikus nukleusz valóban integrálhatják a Cannon-féle vészreakciót, a Selye-féle stressz választ valamint az ezeket kísérő szorongást és diszfóriát⁵⁻⁷. Vizsgálataink annyit ugyanakkor megerősítettek, hogy bizonyos mértékig, az NPY transzmisszió felfüggesztésével (antagonistával de különösen antiszérummal) az a bizonyos orexinerg (HMM aktiváció, termogenezis) hatások mérsékelhetőek. Ezt az átvitelt számos tanulmány megerősítette más hatásokkal kapcsolatban is⁸. Ugyanakkor sem a mi eredményeink, sem másokéi nem emelik ezt a jelenséget „törvényerőre”. Hiszem, hogy az általunk vizsgált neuropeptideknek, mint modulátoroknak és transzmittereknek a hatása hely és receptormintázat függő. Az icv. beadás alkalmas lehet egyes funkciók becslésére, de hipotézisek levonására nem. Sőt, más területek egyidejű elárasztása a transzmitterrel az egyedi vizsgálandó hatást maszkírozhatja, szükségtelen változót bevonva az elemzésbe. Ugyanakkor minden kísérletünkben alapvetően állatkísérletekben gondolkodtunk és próbáltunk olyan obszervációs rendszert felépíteni, ahol egy gondos előtanulmányok alapján kiválasztott, ígéretes neuropeptid család komplex vizsgálatait *in vivo* és *ex vivo* elvégezhetjük. Schally Professzor Úr laboratóriumában emellett természetesen már bőven volt alkalmam *in vitro* módszereket is alkalmazni.

8. A ghrelin esetében van bemutatott vizsgálat a kiváltott és spontán lokomotoros aktivitás értékelésére, és ez a peptid nagyban mutatott hasonlóságot az orexin/hipokretin hatásokkal minden vizsgált paraméterben kivéve a testhőmérséklet változást... Ezen a ponton lehetne rámutatni a disszertáció egyik erőteljes kutatási erejére, ahogy az összefüggéseket vizsgálta az adaptációs viselkedés és a HAM aktivációja között (ezek már a korábbi kutatások célpontjai is voltak), amihez hozzáadódott a vegetatív funkciók neuroendokrin vizsgálata összefüggésben valószínűen a legjelentősebb klasszikus neurotransmitter funkciókkal (amelyek mindenképpen újabb kutatási eredmények)... A munka tehát kellően holisztikus ahhoz, hogy a humán patológia számos irányába közvetlen kimenetet szolgáltatson, ami nyilvánvalóan a fő célja az állatkísérleteknek is.

A ghrelinnel kapcsolatosan Nyakas Professzor Úrban felmerülő kérdés elgondolkodtatott és nagyon ösztönzőnek éreztem. A felvetett kérdés, implikálja és hangsúlyozza, hogy az eltérő mediációs útvonalak markánsan különböző válaszokhoz vezethetnek. Ezt különben a korábbi

kérdés is hangsúlyozza, és teljes mértékben egyetértek a stressz válasz és a viselkedési válasz időbeli követésének szükségességével, illetve a visszacsapási reakció lehetőségével. Véleményem az, hogy az icv. beadott ghrelin és orexin a teljes receptor arzenál egyidejű ingerlését az antagonistával való kezelés pedig ezen ingerlés egyes útjainak „kilövését” jelenti. Tehát a perifériásan termelődő, a cirkumventrikuláris szervek és a nucleus arcuatus révén, vagy a vagus afferenciát módosító hipotermiás ghrelin hatás nincs ellentétben a centrális kezelés szerotonerg mediációjú hipertermiás válaszával. Az orexinek általunk észlelt hipotermiás hatása az irodalom alapján ma már egyértelműen fokozott hőleadásnak tudható be^{9,10}.

9. A 62. oldalon olvashatjuk, hogy az A β peptid származékok lényegében a sejtmembránban halmozódnak fel és ezen keresztül indul el a toxicitás. Itt az A β fibrillumokra (molekuláris béta-templát alapú struktúrákra) történhetett az utalás, de az is ismert, hogy az oligomér A β molekulák a legtoxikusabbak és ezek oldékonyak vízben. Tehát, főleg a korai stádiumban az oligomér molekulák lehetnek a neuropatológia és a neuronkárosodás célpontjában.

Teljes mértékben egyetértek a 62. oldalon szereplő kitétel kritikájával. Korai stádiumban valóban az oligomerek toxicitása nagyon jelentős, amit az intézetünkben zajlott kutatások is számos esetben igazoltak¹¹⁻¹⁷.

10. Az IHC analízisnél a neuronális A β immunfestést vették alapul az A β 1-42 felhalmozódás indikátorának és ez alapján számolták az immunpozitív sejtek számát. Kérdés, hogy a pozitív neuronokban az A β festődés csak a membránra lokalizálódott-e (ahogy ezt a bevezető rész tárgyalta) vagy fellelhető volt az intracelluláris festődés is? Másrészt A β pozitív plakkok kimutathatóak voltak-e az interneurális térben? Ugyanis, az alkalmazott 5XFAD egértörzsben jelen vannak az A β plakkok (Antonios és mtsai., Sci Rep. 2015 5:17338.) és ismert az is, hogy az APP enzimatis lebontható már intracellulárisan is elkezdődik, mely toxikus A β peptidekhez vezet (Zhang és mtsai, Nat Commun. 2015 6:8762.). Ezek a felvetések tehát a mért immunpozitív stuktúrák kiválasztásának indoklására vonatkoznak. Az eredményeket a 45. ábra foglalja össze. Ezen az ábrán kérdéses, hogy a 'B' ábra oszlopaihoz SD vagy SE kapcsolódik-e? További megjegyzés, hogy a 45/C ábrán nincs feltüntetve a nagyítás mértéke. További észrevétel, hogy a kontroll és a kezelt szövettani képek nem összehasonlíthatóak, a kiválasztott morfológiai struktúra túlzottan különbözik a kontroll vs. kezelt csoportokban. Így kérdés, hogy a pozitív sejtek számát mire standardizálták?

Felhalmozódást mindenütt láttunk membrán → intracelluláris → plakk sorrendben. A nagyítások 200 szorosak. Másrészt az ábrán valóban szórások (SD) nem pedig az átlag szórásai (SEM-ek) szerepelnek, noha oszlopdiagram esetén, ami nem a halmazt (mint boxplotnál) hanem csak az átlagot reprezentálja, kell feltüntetni. Ez annak tulajdonítható, hogy a kooperációs partnereinkkel (Miami VA Healthcare System GRECC (11GRC) zajló projekt megbeszélésen kifejezetten kérték, hogy az ábrákon szórásokat (SD) tüntessenek fel. Ezzel nem óhajtottam vitába szállni és a kérésnek eleget tettem. Emellett, ekkor még csak a minták egy részének feldolgozásával végeztünk. Az ábrát javítottam és a hiányzó elemszámot is pótoltam, ami ilyen esetben követelmény. A mikroszkópos képeket, amiket végül Kastin Professor Úr és a szerkesztőség jóváhagyott, eredetiben mutatom be, a Peptides most már¹ elérhető végleges ábráival együtt.

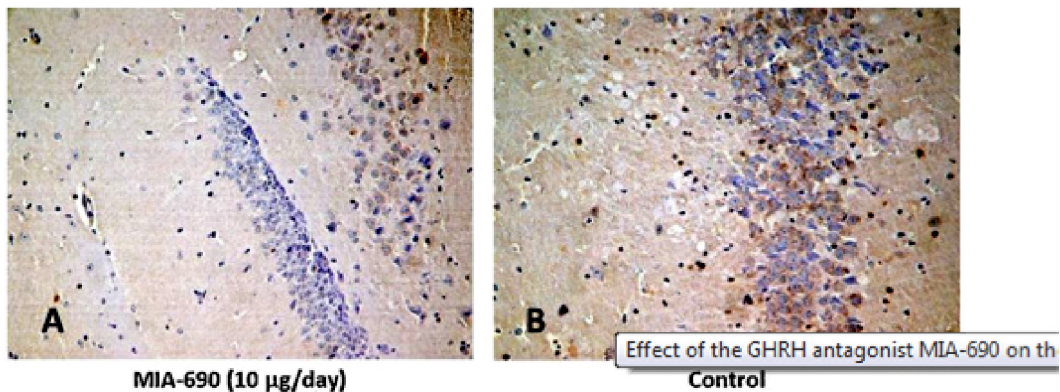
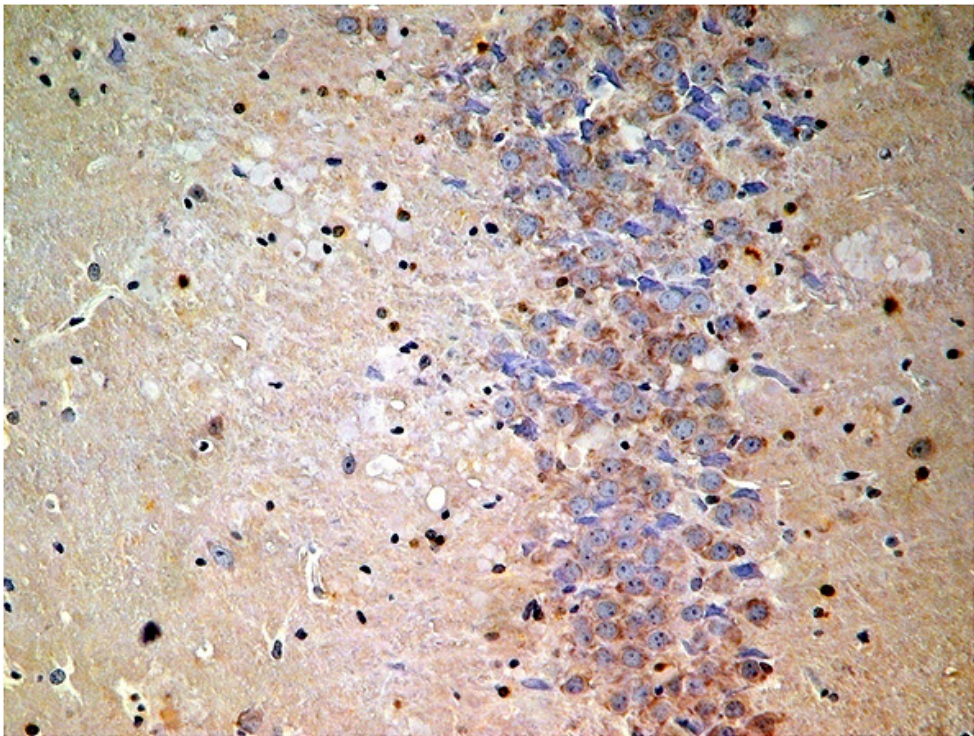
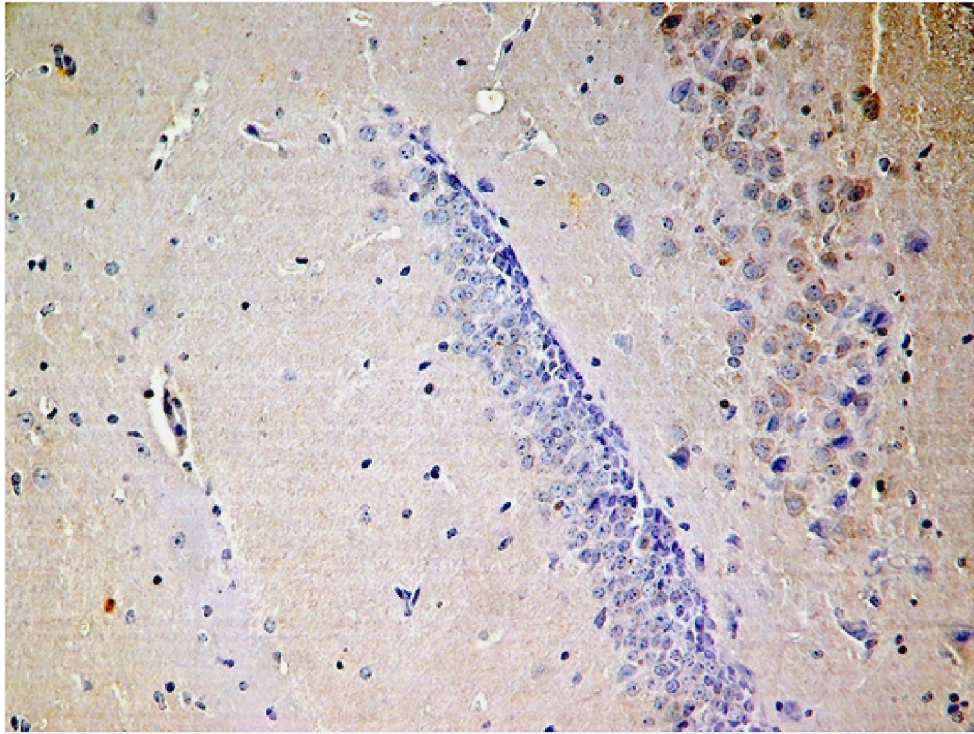
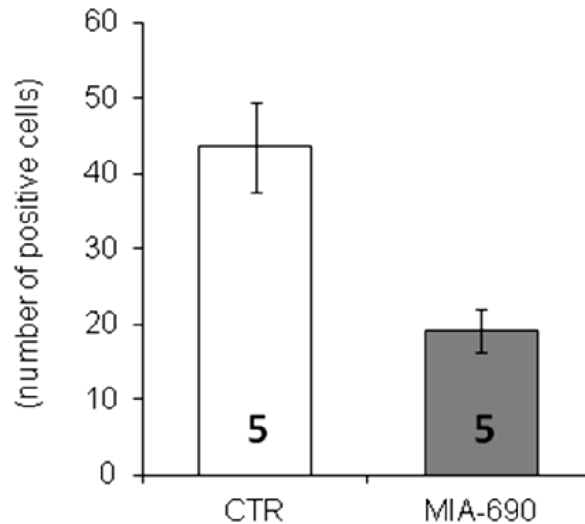


Fig. 2.

Effect of the GHRH antagonist MIA-690 on the β -amyloid distribution of 5 \times FAD mouse hippocampus. The figure shows the immunohistochemistry (IHC) of both, (A) hippocampal section of a MIA-690 treated (10 µg/day) and (B) the untreated control B6SJL-Tg mouse. Mice brains sections were obtained at 10 months, immunostained with anti- β -amyloid antibody and developed with peroxidase-DAB. Nucleus was co-stained with hematoxylin. The untreated control hippocampus showed a higher density of A β plaques deposit (brown colored areas). 200 \times magnification (Courtesy of Dr. T. Reiner, Research Health Scientist, Miami VAHCS).





Teljesen egyetértek az IHC minták összevethetőségével kapcsolatos felvetéssel is. Emiatt ezen eredmények megjelentetését első publikációnkban¹⁸ nem is erőltettük, csak később jelentettük meg a kiadó kérésének megfelelően¹. Ugyanakkor mivel kellő számú mintánk volt ugyanezen friss fagyasztott mintákból ELISA méréseket is végeztünk. Ezeknél pedig amyloid β_{1-42} és τ expressziót mértünk NanoDrop készülékkel azonos protein tartalomra standardizálva (Isd. a disszertáció 45/A ábráját).

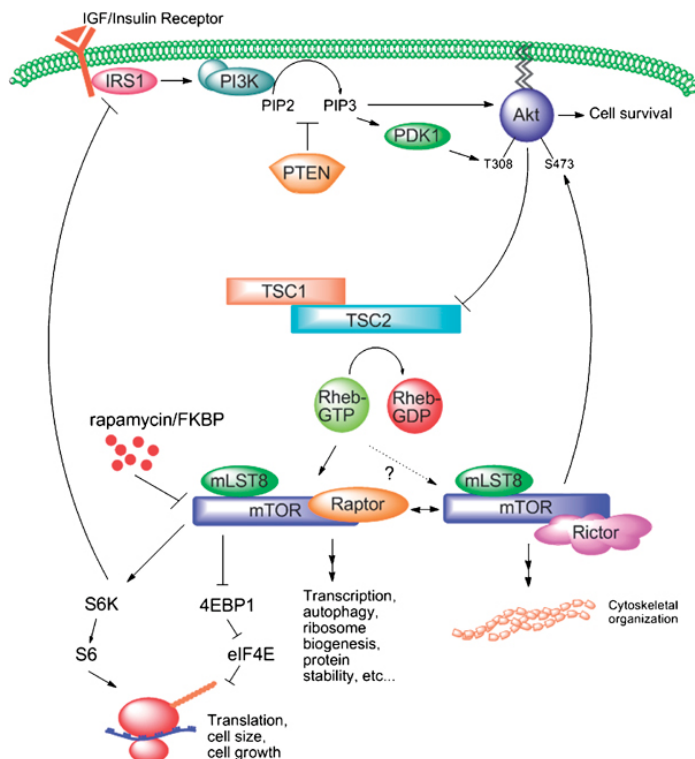
11. *Kérdés, hogy a génexpressziókat összefoglaló 4. táblázatban növekedés vagy csökkenés van ábrázolva, tehát nőtt vagy csökkent a gének expressziója?*

A 4. számú táblázat megfogalmazása valóban nem feltétlenül egyértelmű a gén expressziók tekintetében. Itt 1,00 jelenti a változatlant a Qiagen kit kimenetében. Ha nagyobb az érték, akkor arányos növekedés, ha kisebb, akkor pedig csökkenés volt tapasztalható.

12. *Ismert, hogy a növekedési hormon (GH) koncentráció meredeken csökken a meno- és andropausa után. A GHRH antagonisták valószínűen tovább csökkentik a növekedési hormon szinteket (GH és IGF-I). Elfogadott, hogy ezek a növekedési hormonok fokozzák az m-Tor intracelluláris jelátvivő útvonal aktivitását. Blagosklonny MV teóriája (pl. Aging, 2010, Vol.2 No.5) szerint az m-Tor intracelluláris útvonal csökkenése késlelteti az öregedést ill. ellene hat az öregedéssel járó patológiás állapotoknak (betegségeknek, esetleg a neurodegeneratív betegségeknek is). Mit jelenthet tehát az m-Tor útvonal további involúciója a kapott eredmények értékelése szempontjából?*

Véleményünk szerint a GHRH antagonisták kedvező hatása nem az oldhatatlan amyloid monomerek kialakulásának befolyásolásán keresztül érvényesül. Alapvetően inkább a szisztémás, de talán méginkább a központi idegrendszeri¹⁹ IGF és inzulin szekréció modulálása révén az

inzulin-degradáló enzim hozzáférhetőségét fokozva gyorsíthatják az amyloid fibrillumok lebontását²⁰. Ezen 2012-es feltevésünket messzemenőig alátámasztják későbbi publikációink¹ és más magyar kutatócsoportok nemrég publikált eredményei¹⁹. Blagosklonny Professzor Úr feltevése alapján az mTOR útvonal is szerepet játszhat a kedvező hatásokban: *“Interestingly, while a reduction of insulin/IGF-I signaling can result in diabetes, its reduction can also increase longevity and delay the onset of protein-aggregation-mediated toxicity... This phenomenon, called the “insulin paradox”, can be explained by mTOR mechanisms. Low insulin/IGF-I signaling, which does not activate mTOR is beneficial for longevity and health..”*. Véleményünk szerint az GHRH-GH-IGF-IGF-R jelátviteli út aktiválása, a *milieu interieur* aktuális állapotától függően pozitív vagy negatív hatású is lehet. Egyértelműen pozitívnak tűnhet bizonyos jelátviteli utak (pl. mTOR) szelektív blokkolása onkológiai²¹, és protein aggregációval járó neurodegeneratív kórképekben²². Sőt az mTOR-on keresztül az inzulin receptorokra kifejtett gátlás felfüggesztése növelheti az inzulin iránti érzékenységet és csökkentheti a hiperinzulinémiát²³ (lásd alábbi ábrát). Itt ismét Blagosklonny Professzor Úr szavait idézném: *However, if insulin/IGF-I signaling is low, because of the blockage caused by the feedback of the over-activated mTOR, then it is harmful...*



A model illustrating how mTOR fits within the insulin/Akt signaling network. Insulin or insulin-like growth factor initiates signaling at the insulin receptor, leading to activation of IRS1 and PI3K. The lipid products of PI3K, PIP3 (i.e. phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate and phosphatidylinositol 3,4 bisphosphate), recruit both PDK1 and Akt to the plasma membrane. Akt is subsequently phosphorylated on T308 by PDK1 and by mTORC2 (consisting of mTOR, mLST8 and Rictor) on S473, leading to full activation. Akt then phosphorylates numerous targets to promote growth and survival, including the TSC1/2 complex. By phosphorylating TSC2, Akt inactivates TSC2s GAP activity for the small G protein Rheb. GTP-bound Rheb is a potent activator of the rapamycin-sensitive complex mTORC1 (consisting of mTOR, mLST8 and Raptor). mTORC1 phosphorylates several targets, including the translation control proteins S6K and 4EBP1. By phosphorylating

S6K, Akt inactivates TSC2s GAP activity for the small G protein Rheb. GTP-bound Rheb is a potent activator of the rapamycin-sensitive complex mTORC1 (consisting of mTOR, mLST8 and Raptor). mTORC1 phosphorylates several targets, including the translation control proteins S6K and 4EBP1. By phosphorylating

and activating S6K, mTORC1 initiates a negative feedback loop to modulate its own activity, via S6K-mediated reduction in the activation of PI 3-kinase.

Ugyanakkor mindenképp hangsúlyoznám, hogy a kognitív folyamatok vizsgálatokor az akut memóriára gyakorolt hatás mindenképp modulálja a krónikus háttérfolyamatra gyakorolt hatás észlelését. Mivel a GHRH inkább pozitív intrinsic hatású a memóriára^{24, 25} ezért ez a jelenség akár még tompíthatta, maszkolhatta is a GHRH antagonisták kedvező *per se* befolyását az Alzheimer-kór tanulási tüneteinek progressziójára.

Köszönettel

Jászberényi Miklós

Hivatkozások

1. Schally AV. Endocrine approaches to treatment of Alzheimer's disease and other neurological conditions: Part I: Some recollections of my association with Dr. Abba Kastin: A tale of successful collaboration. *Peptides* 2015;72:154-63.
2. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984;11:47-60.
3. Jaszberenyi M, Bujdoso E, Kiss E, Pataki I, Telegdy G. The role of NPY in the mediation of orexin-induced hypothermia. *Regul Pept* 2002;104:55-9.
4. Sunter D, Morgan I, Edwards CM, Dakin CL, Murphy KG, Gardiner J, Taheri S, Rayes E, Bloom SR. Orexins: effects on behavior and localisation of orexin receptor 2 messenger ribonucleic acid in the rat brainstem. *Brain Res* 2001;907:27-34.
5. Hsu DT, Kirouac GJ, Zubieta JK, Bhatnagar S. Contributions of the paraventricular thalamic nucleus in the regulation of stress, motivation, and mood. *Front Behav Neurosci* 2014;8:73.
6. Zitnik GA. Control of arousal through neuropeptide afferents of the locus coeruleus. *Brain Res* 2015.
7. Lungwitz EA, Molosh A, Johnson PL, Harvey BP, Dirks RC, Dietrich A, Minick P, Shekhar A, Truitt WA. Orexin-A induces anxiety-like behavior through interactions with glutamatergic receptors in the bed nucleus of the stria terminalis of rats. *Physiol Behav* 2012;107:726-32.
8. Palus K, Chrobok L, Lewandowski MH. Orexins/hypocretins modulate the activity of NPY-positive and -negative neurons in the rat intergeniculate leaflet via OX1 and OX2 receptors. *Neuroscience* 2015;300:370-80.
9. Behrouzvaziri A, Fu D, Tan P, Yoo Y, Zaretskaia MV, Rusyniak DE, Molkov YI, Zaretsky DV. Orexinergic neurotransmission in temperature responses to methamphetamine and stress: mathematical modeling as a data assimilation approach. *PLoS One* 2015;10:e0126719.
10. Federici LM, Caliman IF, Molosh AI, Fitz SD, Truitt WA, Bonaventure P, Carpenter JS, Shekhar A, Johnson PL. Hypothalamic orexin's role in exacerbated cutaneous vasodilation responses to an anxiogenic stimulus in a surgical menopause model. *Psychoneuroendocrinology* 2016;65:127-37.
11. Palotai M, Telegdy G, Bagosi Z, Jaszberenyi M. The action of neuropeptide AF on passive avoidance learning. Involvement of neurotransmitters. *Neurobiol Learn Mem* 2016;127:34-41.

12. Telegdy G, Schally AV. Involvement of neurotransmitters in the action of growth hormone-releasing hormone antagonist on passive avoidance learning. *Behav Brain Res* 2012;233:326-30.
13. Telegdy G, Schally AV. Neurotransmitter-mediated action of an antagonist of growth hormone-releasing hormone on anxiolysis in mice. *Behav Brain Res* 2012;233:232-6.
14. Tanaka M, Schally AV, Telegdy G. Neurotransmission of the antidepressant-like effects of the growth hormone-releasing hormone antagonist MZ-4-71. *Behav Brain Res* 2012;228:388-91.
15. Telegdy G, Tanaka M, Schally AV. Effects of the growth hormone-releasing hormone (GH-RH) antagonist on brain functions in mice. *Behav Brain Res* 2011;224:155-8.
16. Telegdy G, Adamik A, Tanaka M, Schally AV. Effects of the LHRH antagonist Cetrorelix on affective and cognitive functions in rats. *Regul Pept* 2010;159:142-7.
17. Telegdy G, Tanaka M, Schally AV. Effects of the LHRH antagonist Cetrorelix on the brain function in mice. *Neuropeptides* 2009;43:229-34.
18. Jaszberenyi M, Rick FG, Szalontay L, Block NL, Zarandi M, Cai RZ, Schally AV. Beneficial effects of novel antagonists of GHRH in different models of Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY)* 2012;4:755-67.
19. Molnar G, Farago N, Kocsis AK, Rozsa M, Lovas S, Boldog E, Baldi R, Csajbok E, Gardi J, Puskas LG, Tamas G. GABAergic neurogliaform cells represent local sources of insulin in the cerebral cortex. *J Neurosci* 2014;34:1133-7.
20. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2010;362:329-44.
21. Inoki K, Corradetti MN, Guan KL. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat Genet* 2005;37:19-24.
22. Mp S, Bc H, Ra I, 3rd, Jp S, C A, S S, U B, M L, Mg FH, Rv F. Brain Insulin Signaling is Increased in Insulin-Resistant States and Decreases in FoxOs and PGC-1alpha and Increases in Abeta1-40.42 and Phospho-Tau May Abet Alzheimer Development. *Diabetes* 2016.
23. Corradetti MN, Guan KL. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene* 2006;25:6347-60.
24. Chen DY, Stern SA, Garcia-Osta A, Saunier-Rebori B, Pollonini G, Bambah-Mukku D, Blitzer RD, Alberini CM. A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature* 2011;469:491-7.
25. Hallschmid M, Wilhelm I, Michel C, Perras B, Born J. A role for central nervous growth hormone-releasing hormone signaling in the consolidation of declarative memories. *PLoS One* 2011;6:e23435.