

## Akadémiai Doktori Értekezés

# A hypothalamicus szabályozás egyes funkcióinak vizsgálata

Sótonyi Péter

Budapest 2010

## Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
1.1 A hypothalamus anatómiai felépítése	3
1.2 A hypothalamus funkciói	5
1.3 A nucleus suprachiasmaticus szerkezete és celluláris szerveződésének kialakulása	l
különböző nemű egyedekben	6
1.4 A táplálékfelvétel hypothalamicus szabályozása	8
1.5 A hypothalamicus hypocretin (orexin) szerepe a főemlősök energiaháztartásában.	9
1.6 A ghrelin szerepe a hypothalamicus energia-homeostasis szabályozásában	. 10
1.7 A nucleus arcuatus melanocortin rendszerének neuroanatómiai szerkezete és szere	epe
a hypothalamicus szabályozásban	12
1.8 A hypothalamus plasztikus szabályozóműködésének szerepe az elhízásban	15
1.9 A hypothalamicus NTPDáz-3 purinerg rendszer celluláris szerkezetének	
morfológiai és funkcionális vizsgálata	.17
2. CÉLKITŰZÉSEK	. 19
3. FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	. 21
3.1 Felhasznált gerinces állatok	. 21
3.2 Kísérleti elrendezések és egyéb beavatkozások	. 21
3.3 Felhasznált antitestek	. 24
3.4 Fluoreszcens immunhisztokémia	. 25
3.5 Immunperoxidáz immunhisztokémia	. 25
3.6 Elektronmikroszkópos feldolgozás	. 26
3.7 Pre- és posztembedding (beágyazás előtti és utáni) immunarany jelölés	. 26
3.8 Statisztikai elemzések	. 27
4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	. 28
4.1 A nucleus suprachiasmaticus szerkezetének prenatális kialakulása hím és nőstény	,
egyedekben	. 28
4.2 A hypocretin (orexin) hypothalamicus szabályozó-mechanizmusa főemlősökben.	. 41
4.3 A Ghrelin szerepe a hypothalamus energiaháztartást szabályozó funkciójában	. 48
4.4 A nucleus arcuatus melanocortin rendszerének celluláris szerkezete és szerepe a	
szaporodás és a táplálkozás idegrendszeri szabályozásában	. 63
4.5 A hypothalamus plasztikus szabályozóműködésének szerepe az elhízásban	. 70
4.6 NTPDáz 3 hypothalamicus szerveződése, funkciója és energiaháztartásban betöltő	ött
szerepe	. 82
5. ÖSSZEFOGLALÁS	.92
6. BIBLIOGRÁFIÁK	.96
Hivatkozott irodalom	.96
Az értekezés témakörében megjelent közlemények1	111
A tudományos munkásságot meghatározó egyéb közlemények 1	112
Rövidítések jegyzéke1	116
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 1	117

## 1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 1.1 A hypothalamus anatómiai felépítése

Az emlős köztiagy (diencephalon) három fő részből áll: epithalamus, thalamus és hypothalamus. A hypothalamus neve a görög hypo ( $\dot{\upsilon}\pi \dot{o}$ ) = "alatt" és thalamosz ( $\theta \dot{\alpha} \lambda \alpha \mu o \varsigma$ ) = "szoba, terem" szóösszetételből ered, mivel a hypothalamus a diencephalon ventralis részén, a sulcus hypothalamicus alatt helyezkedik el, a III. agykamra alapját képezi. Minden gerinces állat rendelkezik hypothalamusszal, és funkciói az evolúció során szinte alig változtak. Anterior irányból a preopticus area határolja (*nucleus anterior*-ként is ismert terület), ami a telencephalon része, de funkcionális szempontból a hypothalamushoz soroljuk. Lateral felől a subthalamus anterior területe, a capsula interna és a tractus opticus határolja, míg posterior irányban a subthalamus és a mesencephalon tegmentalis része húzódik. Dorsalis felszínét a nuclei dorsalis thalami határolják.

A hypothalamus számos magcsoportot (nucleust) tartalmaz, a legkülönfélébb funkciókkal. A hypothalamicus magok osztályozása elsősorban phylogenetikai, fejlődéstani, cytoarchitekturális, synapticus és hisztokémiai alapon történik. A legtöbb mag ill. magcsoport felnőtt állatban nem különül el, nehéz elhatárolni őket egymástól, sokszor csak idegsejtek csoportosulása jelzi a neuropilben az egyes magok területét. Néhány erőteljes, myelinizált pályarendszer ugyan megfigyelhető a hypothalamusban, de sokkal jellemzőbb rá a nem myelinizált, diffúz kapcsolatrendszer. Modern immunhisztokémiai, *in-situ* hybrdizációs és pályakövetési módszerek segítségével napjainkra már szinte az összes hypothalamicus magcsoport neurokémiai, anatómiai és funkcionális jellemzőit mélyrehatóan megismertük.

A hypothalamus anteroposterior síkban chiasmaticus (*supraopticus*), tuberalis (*infundibulo-tuberalis*), és posterior (*mammilare*) régiókra, mediolateralis irányban pedig *periventricularis*, *medialis* (intermedier) és *lateralis* zónákra osztható fel (Saper, 1990).

#### Periventricularis zóna

A periventricularis zóna a harmadik agykamrát közvetlenül határolja. A kamra anterior falában található az ún. *organum vasculosum*, ami a lamina terminalis része és

dorsalis irányban a *nucleus preopticus medialisban* és a *subfornicalis szervben* folytatódik. A chiasmaticus régió mindkét oldalán a *nucleus praeopticus* egy része, a viszonylag kisméretű *nucleus suprachiasmaticus (SCN)*, ill. a *nucleus periventricularis* és *paraventricularis* (PVN) található. A tuberalis régióban a periventricularis sejtcsoport kiterjed és a III. agykamra basalis részén létrehozza a *nucleus arcuatus* (ARC) sejtcsoportját, amely az eminentia mediana fölött fekszik. A posterior régióban található keskeny periventricularis zóna laterálisan folytatódik a posterior hypothalamicus areaban és mögötte a periaqueductalis szürkeállományban. A periventricularis zónában prominens, jól látható pályarendszerek futnak. Emberben és rágcsálókban a nucleus suprachiasmaticus határait rutin mikroszkópos készítményen (pl. Nissl festés) nehéz megállapítani, de pl. vasopressin, VIP, somatostatin tartalmú sejtei révén immunhisztokémiai jelöléssel jól elkülöníthető. Fontos megjegyezni, hogy a nucleus suprachiasmaticus szexuálisan dimorph képlet.

#### Intermedier (medialis) zóna

Ez a terület tartalmazza a legjobban elkülöníthető magokat. Itt találjuk a nucleus paraventricularist. а nucleus supraopticust (SON), *'intermedier'* magcsoportokat, melyek szintén szexuálisan dimorph területek, a nucleus ventromedialist (VMN) és dorsomedialist (DMN), a corpus mammillarist (CM) és a nucleus tuberomammillarist (TMN). A chiasmaticus területen a nucleus paraventricularis vastag sejtréteget hoz létre, amely felfelé és posterior irányba kiterjed a kamra aljától egészen a sulcus hypothalami területéig. Rágcsálókban jól elkülöníthetőek az egyes subnucleusok, de emberben csak igen nehezen. Általánosságban elmondható azonban, hogy a parvocellularis sejtek medialisan, míg a magnocellularis neuronok ventrolateralisan helyezkednek el. Hasonló magnocelluláris neuronok alkotják a nucleus supraopticust, amely a tractus opticustól dorsolateralisan helyezkedik el. A paraventricularis és supraopticus magok sokkal jobban vascularizáltak, mint a környezetükben található idegszövet. A tuberalis régióban a nucleus ventromedialis jól elhatárolható, mert egy sejtszegény terület veszi körbe;, a felette található nucleus dorsomedialis határai sokkal kevésbé egyértelműek. A nuclei mammillares mediales, amelyek a corpus mammillaris nagy részét képezik, igen jól láthatóak emberben. Tőlük laterálisan található a nucleus tuberomammillaris, amelyet

immunhisztokémiai módszerekkel hisztamin, galanin és GABA tartalmú neuronjai révén lehet könnyen azonosítani. Érdekes, hogy ez utóbbi mag - csakúgy mint a locus coeruleus, vagy a raphe magok - diffúzan idegzik be a neocortex nagy részét, de a hypothalamust és az agytörzs egyes területeit is elérik.

#### Lateralis zóna

Ez a zóna folyamatos a nucleus preopticustól a *nucleus lateralis hypothalmi*-n keresztül a posterior hypothalamusig. A tuberalis régióban található *nucleus tuberalis lateralis* még emberben is jól definiált képlet.

#### 1.2 A hypothalamus funkciói

A hypothalamus elsődleges és alapvető funkciója a vegetatív idegrendszer és az endocrin rendszer működésének összehangolása illetve a homeostasis fenntartása. Több évtizedes, lassan egy évszázados kutatási eredmények világítottak rá arra, hogy a hypothalamus egyes magjaihoz ill. magcsoportjaihoz jól definiálható, egymástól eltérő szabályozó funkció köthető. Nem a teljességre törekedve néhány fontos és jól ismert, hypothalamicus területhez, anatómiai képlethez köthető funkciót felsorolásszerűen bemutatunk:

- a) táplálékfelvétel és táplálkozási viselkedés szabályozása, testsúlyszabályozás (nucleus lateralis, nucleus ventromedialis, nucleus arcuatus)
- b) folyadékfelvétel szomjúság (nucleus paraventricularis)
- c) testhőmérséklet szabályozása (nucleus anterior et posterior)
- d) alvás-ébrenlét (cirkadián) ciklusos szabályozása (*nucleus suprachiasmaticus*)
- e) részvétel a memóriával és viselkedéssel kapcsolatos folyamatokban ill. szexuális viselkedés (*nucleus mamillaris, nucleus ventromedialis*)
- f) vegetatív idegrendszer szabályozása (tractus hypothalamospinalis, medialis előagyi köteg, fasciculus longitudinalis dorsalis)
- g) endocrin szabályozás (hypothalamo-hypophysealis rendszer: magnocelluláris magok: nucleus paraventricularis et supraopticus, parvocelluláris magok: nucleus arcuatus)

Az értekezés terjedelme és a hypothalamus rendkívüli komplexitása nem teszi lehetővé, hogy az összes hypothalamicus magcsoport bemutatásra kerüljön; ezért csak azok a magok kerülnek funkcionális szempontból bemutatásra, amelyek az értekezésben ismertetett kutatások fókuszában álltak.

## 1.3 A nucleus suprachiasmaticus szerkezete és celluláris szerveződésének kialakulása különböző nemű egyedekben

A nucleus suprachiasmaticus (SCN) áll a legtöbb ciklikus, megvilágítási ritmushoz köthető (nappal-éjszaka) viselkedési, motoros aktivitási, testhőmérsékleti, alvási folyamat és viselkedési mintázat neuronális szabályozásának hátterében. A mag glutamáterg beidegzést kap a retina ganglion sejtjeitől, amelyek a külső megvilágítás mértékéről szállítanak ide információt, de érdekes, hogy nem alapvető fontosságúak ezek a bemenetek a SCN ritmikus működésének szabályozásához (Kornhauser et al., 1996b), mert vak egyedekben is fennmarad a SCN ritmicitása. A SCN-ban számos neurotranszmitter megtalálható, elsősorban vasopressin, vasoaktív intestinalis polypeptid (VIP), neuropeptid-Y (NPY), neurotenzin és rendkívül komplex belső és külső synapticus kapcsolatrendszere van. Leírtak dendro-dendritikus kapcsolatokat is a SCN területén (Guldner and Wolff, 1996). Arról azonban mind a mai napig kevés információ áll rendelkezésünkre, hogy a SCN miképpen képes a cirkadián ritmus létrehozására, fenntartására és szabályozására. Emlősökben a SCN két fő részből áll: a retinából érkező bemenetek a ventrolaterális részen végződnek, ahol elsősorban VIP tartalmú neuronok találhatóak. Ez a terület a SCN ún. bemeneti (input) területe, mert érkeznek még ide axonok a középagyi raphe magyakból ill. a thalamusból, a corpus geniculatum laterale területéről is. A SCN dorsomedialis területe ellenben gyér afferentációval rendelkezik, elsősorban parvocelluláris neuronokat tartalmaz, amelyek arginin-vasopressin (AVP) immunreaktívak.

Ugyanakkor a SCN szerkezetében és méretében a különböző nemű egyedekben anatómiai különbségek figyelhetőek meg: rágcsálókban a hím egyedek lényegesen nagyobb SCN-al rendelkeznek, más emlősökben pedig a hím és nőstény egyedek SCN-ának alakja tér el (Gorski et al., 1978; Robinson et al., 1986; Swaab, 1995; Hofman et al., 1996; Hutchison et al., 1999). Szintén eltérés figyelhető meg a SCN

belső synapticus hálózatában és neuroendocrin sejtcsoportokhoz való projekciós viszonyában is (Devries et al., 1981; Guldner, 1982, 1983; Horvath, 1997; VanderBeek et al., 1997; Horvath et al., 1998). Számos adat utal arra, hogy a különböző nemű egyedekben megfigyelhető egyértelmű különbségek (pl. különböző cirkadián és szezonális ritmusok és ezekhez kapcsolódó lokomotoros aktivitás, ill. viselkedés, alvás-ébrenléti ritmus és endocrin funkciók) hátterében a szexuálisan dimorph SCN szerkezet húzódik (Gentry and Wade, 1976; Zucker and Morin, 1977; Albers, 1981; Sodersten et al., 1981; Davis et al., 1983; Wever, 1984; Davis et al., 1987; Schull et al., 1989; Atkinson and Waddell, 1997). Ezeknek a különbségeknek a humán gyógyászatban is fontos szerepük van, hiszen számos cirkadián ritmust érintő humán pszichiátriai kórkép esetén is megfigyelhetőek nemek közötti különbségek. Éppen ezért különösen fontos, hogy a SCN szexuális dimorfizmusát és annak kialakulását megértsük, alapjait tisztázzuk (Jones, 2001; Parry and Newton, 2001; Turek et al., 2001).

Az agy szexuális differenciálódását szteroid hormonok irányítják, amelyek hatásukat a fejlődő agyszövetre jól meghatározott időközönként fejtik ki (Maclusky and Naftolin, 1981; Arnold and Gorski, 1984; Segovia et al., 1999). Ezek az ún. kritikus periódusok hím egyedek esetében a hím nemi hormon, a tesztoszteron termelés maximumaival (csúcsaival) hozhatók öszefüggésbe (Hutchison et al., 1999; Lephart et al., 2001). A tesztoszteront az aromatáz enzim alakítja ösztrogénné, amely az agy nemi differenciálódásáért nagymértékben felelős. Ezért a kritikus periódusokban emelkedett prenatális tesztoszteron szint "nyersanyag" szerepet tölt be, amely ösztrogénné transzformálódva az egyes agyi területek differenciálódásának kulcsszereplője.

A nucleus suprachiasmaticus koordinálja a cirkadián és szezonális biológiai ritmust és a ritmussal összefüggésbe hozható viselkedési funkciók kialakításában is fontos szerepe van (Moore, 1983). A SCN sejtejei külső ingerek nélkül is (pl. a fény ritmicitásának hiányában) létrehoznak ill. fenntartanak egy majdnem pontosan 24 órás ritmikus aktivitást (Kornhauser et al., 1996b; Kornhauser et al., 1996a).

Számos kísérleti eredmény és vizsgálat utal arra, hogy a SCN (de egyéb agyterületek esetében is) a szteroid hormonoknak rendszerező, struktúra kialakító szerepük van, és ezen funkciójuk a vizuális rendszerből érkező információkon alapul,

legalábbis információk vagy ezen integráló szerepet játszanak hatásmechanizmusukban. Például a korábban már említett aromatáz enzim jelen van a fejlődő SCN, retina, tractus opticus, nucleus geniculatus valamint az ún. intragenicularis lemez (IGL) sejtjeiben is (Horvath et al., 1999b). Az IGL az a terület, amely a thalamicus nucleus geniculatum laterale és dorsale között húzódik, és a SCN cirkadián rendszerének működését szabályozza projekciós kapcsolatai révén (Pickard, 1994; Moga and Moore, 1997; Moore et al., 2000). Felnőttekben mind a SCN, mind a IGL expresszál ösztrogén ill. progeszteron receptorokat (Shughrue et al., 1997; Kruijver and Swaab, 2002). In vitro fenntartott SCN sejtek esetében is kimutatható mindkét receptor típus (Su et al., 2001), ami arra utal, hogy az ösztrogén lokálisan szintetizálódik, és mind a SCN mind az IGL differenciálódásában a tesztoszteron kulcsszerepet játszik, elsősorban az aromatáz aktivitásnak köszönhetően.

Ezért megvizsgáltuk a tesztoszteron idegrendszeri fejlődésre gyakorolt hatását e két hypothalamicus területen. Kísérleteinkben a nemi különbségeket a sejtosztódás jelölésére elterjedten használt 5-bromo-2'-dezoxiuridin (BrDU) segítségével (Dolbeare, 1996) térképeztük fel mind a SCN, mind pedig az IGL területén ill. meghatározzuk, hogy a tesztoszteron milyen moduláló szerepet játszik a SCN és IGL sejtszám kialakulásában a kritikus periódus alatt (patkány esetében a prenatális aromatizációs aktivitásban az embryonalis 18 napon van a kritikus periódus (Lephart et al., 2001).

## 1.4 A táplálékfelvétel hypothalamicus szabályozása

A hypothalamus területén olyan specifikus magcsoportok is találhatók, amelyek a perifériáról (általában vérkeringés útján) érkező szignál molekulákat receptoraikon felfogják és a tápláltsági állapotnak, a szervezet pillanatnyi energiaigényének megfelelően táplálékfelvételre, vagy éppen az étkezés abbahagyására utasítják a szervezetet. Túlzott energia felvétel esetén növekszik a testsúly, ami a leptin felszabadulását fokozza. A leptin elsősorban a fehér zsírszövetben termelődik és elsődleges feladata a hypothalamicus szabályozórendszerek tájékoztatása a szervezet általános energiatartalékairól. Növekvő zsírdepók és nagy zsírsejtek magas leptin szintet eredményeznek, míg kisméretű zsírsejtek és csökkenő zsírdepók csökkentik azt. A leptin képes a nemi működést is befolyásolni. A vér-agy gáton átjutva a hypothalamus nucleus arcuatusában, illetve nucleus paraventricularisában előidézi

olyan anorexigén peptidek felszabadulását, amelyek bonyolult biokémiai folyamatok sorát indítják el. Ennek hatására a szervezet felgyorsítja anyagcseréjét és csökkenti táplálékfelvételét. Éhezéskor a leptin szint lecsökken, ami az előbb említett hypothalamicus magokban növeli a fő orexigén neuropeptid, a neuropeptid Y (NPY) felszabadulását, és ez a raktározó folyamatok felé tolja el a szervezet energiagazdálkodását, ami fokozott táplálékfelvételre ösztönzi az élőlényt. A táplálékfelvétel szabályozásával kapcsolatos kutatások főleg a hypothalamus funkciójának pontos felderítésére irányulnak. Amellett, hogy a hypothalamus energiaháztartásban betöltött szerepéről egyre többet tudunk, vannak más agyterületek is, pl. a nucleus tractus solitarii (Ishizaki et al., 2003), a lateralis septum (Kovacs et al., 2007), valamint az Edinger-Westphal mag (nucleus parasymphaticus nervi oculomotorii) (Kozicz, 2003), amelyek ugyancsak részt vesznek a táplálékfelvétel szabályozásában. A fent említett hypothalamicus területek fontos szerepet játszanak egyes specifikus motivációs cselekvések elindításában, mint pl. a táplálék megszerzésére, felderítésére, illetve elfogyasztására а táplálék irányuló viselkedésmintázatok kialakításában

## 1.5 A hypothalamicus hypocretin (orexin) szerepe a főemlősök energiaháztartásában

Az energia-háztartás (energia-homeostasis) szabályozásában jól körülhatárolható központi idegrendszeri neuronális hálózatok vesznek részt, amelyek elsősorban hypothalamicus területeken lokalizálódnak, és igen érzékenyen reagálnak külső metabolikus jelekre (Kalra et al., 1999). A humán hypothalamus normál és kóros működésről kialakított tudásunk nagy része azonban olyan kísérletekből származik, amelyben rágcsálókat használtak, és nagyon kevés közvetlen ismeretünk van főemlősök energia-háztartásának hypothalamicus mechanizmusairól. Különösképp nem tisztázott az, hogy a hypothalamicus peptiderg energia-szabályozás rágcsálókban már régóta ismert hálózatainak főemlős megfelelője milyen idegrendszeri struktúrákhoz köthető, illetve, hogy a két rendszer hasonló felépítésű és működésű-e?

A hypocretin (HCRT, orexin) nevű peptid kizárólag a hypothalamus területén termelődik (De Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998) és régóta ismert, hogy rágcsálókban kulcsszerepet játszik számos endocrin, autonóm és metabolikus

folyamatban (Sakurai et al., 1998; Chemelli et al., 1999; Lin et al., 1999). Mind a patkány, mind pedig a majom HCRT termelő sejtei expresszálnak leptin receptorokat és synapticus kapcsolatot alakítanak ki számos centrális, az endocrin, metabolikus és autómom szabályozásban résztvevő hypothalamicus ill. agytörzsi központtal (Horvath et al., 1999a; Horvath et al., 1999c). A HCRT és más hypothalamicus területek közötti synapticus kapcsolatok feltérképezése jó alapot szolgáltat ahhoz, hogy tudjuk milyen synapticus kapcsolatok alkotják a hypothalamicus neuronköröket, azonban arról nem szolgáltat információt, hogy az adott kapcsolatrendszer miként működik és hogyan járul hozzá az adott homeostaticus szabályozási funkcióhoz. Igen jól használható ennek tisztázására és vizsgálatára az immuncytokémiailag könnyen kimutatható *c-fos* nevű fehérje, amely megbízható indikátora a különböző metabolikus folyamatokat kísérő sejtaktivitásnak.

Különböző anyagcsere-változásokat követően patkányban számos, jól körülhatárolható hypothalamicus neuronpopulációban *c-fos* termelés indukálódik (Xu et al., 1995), amihez hasonlót majmokban is megfigyeltek (Caston-Balderrama et al., 1998). Ezt a megfigyelést felhasználva arra kerestünk választ, hogy a majom hypothalamicus HCRT sejtek és post-synapticus célsejtjeik vajon aktiválódnak e anyagcsere-változást követően. Kísérleteinkben a HCRT rendszer változását követtük nyomon éheztetés hatására.

## 1.6 A ghrelin szerepe a hypothalamicus energia-homeostasis szabályozásában

A nemrég felfedezett *ghrelin* nevű hormon számos fontos élettani funkció mediátora: befolyásolja a növekedési hormon (growth hormone, GH) szekrécióját, az energiaháztartás szabályozásához pedig elengedhetetlen. Ezt a peptid hormont A-típusú sejtek szekretálják (de la Cour et al., 2001), és elsősorban a gyomor mirigyeinek oxintikus sejtjeiben termelődik (Kojima et al., 1999; Sakata et al., 2002). De nem csak a gyomor, hanem számos más szerv is termel ghrelint, igaz jóval kisebb mennyiségben. Ghrelin termelést találtak a herékben (Tanaka et al., 2001), placentában (Gualillo et al., 2001), vesében (Mori et al., 2000), hypophysisben (Korbonits et al., 2001), vékonybélben (Date et al., 2000), hasnyálmirigyben (Volante et al., 2002), egyes lymphocytákban (Hattori et al., 2001) és az agy is termel kis mennyiségben. A

ghrelin termelése és mRNS expressziója megnövekszik súlyvesztés vagy csökkent energia-bevitel, ill. inzulin-kiváltotta hypoglykémia hatására (Cummings et al., 2001; Toshinai et al., 2001; Tschop et al., 2001). Megnövekedett kalóriabevitel vagy krónikusan pozitív energiamérleg esetén a ghrelin termelése és elválasztása csökken. Ezért azt feltételezzük, hogy a ghrelin egyfajta, a tápcsatornából közvetlenül kiinduló "táplálkozási jelzőfunkció"-val rendelkezik (Horvath et al., 2001). A ghrelin a növekedési hormon szekrécióját serkenti, növeli a táplálékbevitelt és csökkenti a zsír felhasználását a szervezetben (Kojima et al., 1999; Arvat et al., 2000). Fontos kiemelni azonban, hogy a ghrelin súlygyarapodást és zsírfelhalmozódást kialakító működése független a növekedési hormont szabályozó funkciójától (Tschop et al., 2000; Wren et al., 2000; Nakazato et al., 2001). A ghrelin közvetlenül növeli az AGRP és NPY peptidek mRNS expresszióját és a nucelus arcuatusban beindítja a c-fos termelést az AGRP és NPY tartalmú neuronokban (Dickson and Luckman, 1997; Hewson and Dickson, 2000; Wang et al., 2002). Érdekes, hogy a ghrelin a leptinnel ellentétes hatást fejt ki a nucleus arcuatus NPY és AGRP rendszerére (az NPY és AGRP immunpozitív sejtek gazdagok leptin receptorokban) (Horvath et al., 2001; Kamegai et al., 2001; Tung et al., 2001; Tschop et al., 2002). A ghrelin NPY- és AGRP-függő pályarendszerek ko-aktivációja révén valószínűleg endogén étvágyfokozó és energiaellátó funkcióval rendelkezik (Kamegai et al., 2000; Shintani et al., 2001; Wren et al., 2001; Tschop et al., 2002), mivel ghrelin antiszérum vagy ghrelin antagonisták alkalmazása megakadályozza a pozitív energia-mérleg kialakulását (Nakazato et al., 2001).

Mivel ghrelin elsősorban a gyomor és a belek szekréciója révén kerül a vérkeringésbe, de hypothalamicus idegsejteken fejti ki hatását, hatásmechanizmusában igen fontos, hogy hogyan jut át a vér-agy gáton. Egér kísérleti rendszerben meglepő eredmények születtek a ghrelin transzportjával kapcsolatban: acetilált ghrelin minden további nélkül áthaladt a agy  $\rightarrow$  vérkeringés irányban, de az ellentétes, vérkeringés  $\rightarrow$  agy irányú transzport szinte elhanyagolható (Banks et al., 2002). Megfigyelték azonban, hogy vagotómiát követően a perifériás ghrelin hypothalamicus hatása megszűnik (Date et al., 2002), ami azt sugallja, hogy a ghrelin agyra gyakorolt direkt hatása endogén eredetű (Tschop et al., 2000; Nakazato et al., 2001). Ezért azt tűztük ki célul, hogy megvizsgáljuk, hogy a ghrelin milyen centrális mechanizmusokon

keresztül képes a leptin energiaháztartásra gyakorolt hatásainak kiegyensúlyozására. Ehhez megvizsgáltuk a hypothalamicus ghrelin-expresszió mintázatát, azt, hogy mely neuronokon vannak specifikus ghrelinkötőhelyek, és a ghrelin elektrofiziológiai hatását a korábban már leptin-érzékeny idegrendszeri területként azonosított hálózatokra. Továbbá megvizsgáltuk a ghrelin szerepét abban a komplex neuropeptid tartalmú idegrendszeri hálózatban, amelyről régóta ismert, hogy kulcsszerepet játszik a táplálkozás és az anyagcsere szabályozásában, azt remélve, hogy ezáltal jobban megérthetjük a ghrelin energiaháztartás-szabályozásában betöltött szerepét.

### 1.7 A nucleus arcuatus melanocortin rendszerének neuroanatómiai szerkezete és szerepe a hypothalamicus szabályozásban

A negatív energiaegyensúly jellegzetes fenotípusa jelenik meg hypothalamicus hypogonadismus esetén (Bjorkelund et al., 1996; Judd, 1998). Az energiaraktárak megfelelő telítettsége azonban ezt a folyamatot képes visszafordítani. Ez az evolúciós adaptációs mechanizmus teszi lehetővé egyén ill. az egyed számára, hogy túlélje ("kiböjtölje") azokat az időszakokat, amikor nem áll rendelkezésre elegendő mennyiségű táplálék (Wade et al., 1996). Nőstény egyedekben az energiaraktárak megfelelő telítettségének még nagyobb jelentősége van, hiszen legalább 10% testzsír szükséges ahhoz, hogy a normális ovulációs ciklus beinduljon (Frisch and McArthur, 1974). Hypogonadotróp hypogonadismus gyakran fordul elő a genetikus leptinszignalizáció elégtelensége miatt elhízott egyedekben (Caprio et al., 2001; Gao et al., 2004). Leptin-elégtelenség esetén a zsírszövet felhalmozódása és az elhízás fokozódik (Zhang et al., 1994). Olyan reproduktív diszfunkciókkal rendelkező egerekben, amelyek genetikailag nem képesek leptin termelésre (az ún. ob/ob egértörzs), leptin kezelés normalizálja a károsodott repoduktív funkcióikat. Ez egyértelműen arra utal, hogy minimálisak a leptin-deficiencia okozta azon agyi struktúrák fejlődési rendellenességei, amelyek reprodukciós szabályozásban vesznek részt (Chehab et al., 1996). Leptin-elégtelenségben szenvedő betegeknél is megfigyelték, hogy leptin kezelés visszaállítja a gonadotróp hormonok felszabadulását serkentő (ún. releasing) hormon (GnRH) és a luteinizáló hormon (LH) szekrécióját és normalizálja pubertáskori nemi fejlődést is (Chehab et al., 1996), ami arra utal, hogy a leptinnek

kulcsszerepe van a reprodukció hypothalamicus szabályozásában. Normál nemi ciklusú nőkben a leptin perifériás szintjének változásai pozitívan és erőteljesen korrelálnak az LH és az ösztrogén szintjével (Licinio et al., 1998), ugyanakkor hypothalamicus amenorrhoeában szenvedő nőkben mind az átlagos, mind a napon belüli leptin ritmus károsodik ill. megváltozik (Laughlin and Yen, 1997; Miller et al., 1998). Érdekes, hogy a leptin képes visszaállítani a reproduktív funkciókat éhező állatokban és emberekben egyaránt, még akkor is, ha az energiatartalékok nem is töltődnek fel ezzel párhuzamosan. Ad libitum táplált egerekben pedig a leptin felgyorsítja a szexuális érési folyamatokat (Ahima et al., 1997; Chehab et al., 1997). Nemrég figyelték meg, hogy egy rekombináns leptin képes volt az átlag ösztrogén- és LH- szintjének és kibocsátási frekvenciájának (ún. LH 'pulzus') növelésére is, és javította a reprodukciós funkciókat hypothalamicus amenorrhoeában szenvedő nőknél (Welt et al., 2004). Lipodisztrófiás betegeknél leptin-kezelés hatására normalizálódik a hypophysis és a gonádok közötti kommunikáció (Oral et al., 2002). Ismert az is, hogy patkányokban, a leptin közvetlenül a hypothalamusban fejti ki hatását és serkenti a GnRH szekrécióját, *in vivo* (Watanobe, 2002). Ezért úgy gondoljuk, hogy a leptinnek egyfajta "energiaszint-jelző" szerepe van a hypothalamusban, amely a szaporodási funkciók hypothalamicus szabályozásának elengedhetetlen feltétele. Amikor a leptin szintje lecsökken vagy zavart szenved, az agy mintegy kikapcsolja a GnRH és az LH hormonok ciklusát, amelynek eredményeképpen hypothalamicus hypogonadismus és ezzel együtt terméketlenség alakul ki. A leptin GnRH aktivitásra gyakorolt hatását a nucleus arcuatusban található pro-opiomelanocortin (POMC) neuronok közvetítik (Gao et al., 2004; Gao and Horvath, 2007). Ezek a neuronok közvetlen kapcsolatban állnak a GnRH termelő sejtekkel (Leranth et al., 1988).

A GnRH neuronok különleges hypothalamicus sejtek, hiszen fejlődésük során a szaglóplacodból migráció révén jutnak el az előagyi preoptikus / Broca-féle diagonális köteg határterületére (Schwanzel-Fukuda et al., 1992). A GnRH sejtek a mediobasalis hypothalamus eminentia mediana területére projektálnak, ahol a portális keringésbe juttatják az általuk termelt GnRH-t, ezáltal szabályozzák az anterior hypophysis sejtek LH-termelését (Schwanzel-Fukuda et al., 1992). Szinte alig van információnk arról, hogy a GnRH expresszáló sejteknek mely egyéb agyterületekkel van kapcsolata, ha egyáltalán létezik ilyen. Ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy a GnRH sejtek

13

axonterminálisai vajon eljutnak-e a nucleus arcuatus POMC-termelő sejtjeihez, ill. létezik-e kapcsolat a két rendszer között. Mindkét rendszer kulcsszerepet játszik a hyothalamicus funkciókban: a GnRH sejtek a szaparodási funkciókban míg a POMC sejtek a táplálkozás, az energiafelhasználás és a glükóz homeostasis szabályozásához elengedhetelenek (Gao and Horvath, 2007).

Mivel a nucleus arcuatus POMC sejtjei alapvető szerepet játszanak a táplálékfelvételben, működésükben bekövetkező zavar alapvetően befolyásolja az energiaháztartás szabályozását. Ismert, hogy az elhízás és a 2-es típusú diabetes egyre nagyobb méreteket ölt az ún. nyugati civilizációban. Mégis, a táplálékfelvétel és az energiafelhasználás közötti egyensúly biológiai hátterét még nem teljesen ismerjük (Gao and Horvath, 2007). Az inzulin és a zsírszövet által termelt leptin számos hypothalamicus központon keresztül fejtik ki hatásukat. Amint azt korábban már említettük, a nucleus arcuatus különösen gazdag leptin- és inzulin recpetorokban. Az ARC területén ezek a receptorok éppen az étvágycsökkentő hatásukról ismert POMCexpresszáló sejtek felszínén fordulnak elő legnagyobb mennyiségben (Gao and Horvath, 2007). A POMC tartalmú idegsejtekhez számos axon tér, közöttük mind a GABA, mind a glutamát tartalmúakat megtaláljuk, amely a ARC neuronok kiterjedt és sokszínű neuronális kontrolljára utal. Számos eredmény támasztja alá a serkentő és gátló bemenetek közötti egyensúly funkcionális jelentőségét és tudjuk, hogy ezen bemenetek befolyásolják az anyagcsere-háztartást (Pinto et al., 2004; Gao et al., 2007; Horvath et al., 2010). Elektronmikroszkópos vizsgálatok kimutatták, hogy a POMC neuronokon található legtöbb asszimetrikus synapsys glutamáterg és ezek a neuronok AMPA receptorokat is expresszálnak (Gao et al., 2007). Érdekes, hogy a legtöbb POMC sejt csak az AMPA receptorok GluR-1-es altípusát expresszálja és csak néhányban fordul elő a GluR-2-es altípus (Gao et al., 2007).

A POMC neuronokon a GluR-1-es altípus dominanciája arra enged következtetni, hogy a glutamát kötődést követően kialakuló calcium beáramlás (influx) egy kalcium-kötő fehérje, a parvalbumin indukcióját okozza (Moga et al., 2002). Arra voltunk tehát a továbbiakban kíváncsiak, hogy a ARC ösztrogén kezelés hatására megnövekedett serkentő bemenetei befolyásolják-e a POMC sejtekben található parvalbumin expresszióját? Ezért kontroll és ösztrogénnel kezelt állatok ARC-nak

14

vizsgálatát végeztük el, és a parvalbumin szintjének változásait követtük ösztrogénkezelés hatására.

### 1.8 A hypothalamus plasztikus szabályozóműködésének szerepe az elhízásban

Az elhízás hatékony és biztonságos gyógyszeres kezelése mind a mai napig nem megoldott, aminek a legfőbb oka az, hogy nem kellően tisztázottak az elhízás hátterében húzódó pathologiás folyamatok. Egyáltalán nem ismert, hogy magas kalóriatartalmú táplálék tartós fogyasztása esetén miért hajlamosak egyesek elhízni, mások pedig ellenállni a súlygyarapodásnak. A legelfogadottabb modell szerint a testsúly-szabályozás hátterében központi idegrendszeri specifikus neuronhálózatok koordinációs működése áll, amelyek a perifériás energia-metabolizmust szabályozzák a környezeti ingerek, a keringő tápanyagmolekulák és az endocrin jelzőrendszer segítségével (Gao and Horvath, 2007).

A patkányokban megfigyelt táplálkozásfüggő elhízás számos tekintetben megfelel az embereknél tapasztalt elhízási folyamatoknak: magas kalóriatartalmú táplálék hatására elhízásra hajlamos (Diet Induced Obesity – DIO), és annak ellenálló (*Diet Resistent* – DR) patkányok ezen tulajdonságai ráadásul genetikailag öröklődnek (Levin et al., 1997; Levin and Keesey, 1998; Levin and Dunn-Meynell, 2000; Levin et al., 2003). Mivel a patkányok ezen két genetikai változata magas kalóriatartalmú táplálék (High Calorie Diet - HCD vagy High Fat Diet - HFD) fogyasztása előtt egyformán soványak, és ezért tulajdonképpen morfológiai és anatómiai paramétereiknél fogya hasonlóak, rendkívül hasznos modellállatok lehetnek az elhízás pathogenesisének és idegrendszeri szabályozásának tanulmányozására (Levin et al., 1997; Levin and Keesey, 1998; Levin and Dunn-Meynell, 2000; Levin et al., 2003). Segítségükkel megérthetjük a humán elhízás hátterében húzódó idegrendszeri folyamatokat.

Jelenlegi ismeretienk szerint a központi idegrendszer melanocortin rendszere a testsúlyszabályozás '*primum movens*'-e (Cone, 2006; Gao and Horvath, 2007). Hibás melanocortin receptorokon (MC4R) keresztül zajló jelátvitel, illetve nem megfelelő mennyiségű funkcionális endogén melanocortin agonista (amely a hypothalamus POMC termelő sejtjeiben termelődik) mind rágcsálókban, mind pedig

emberben elhízási hajlamot alakít ki (DIO, Farooqi et al., 1999). Ezzel ellentétben, a nucleus arcuatus AGRP expresszáló sejtjeinek célzott elpusztítása - amely neuronok termelik az MC4R inverz agonistáját, és fiziológiás körülmények között a POMC neuronokhoz tónikus gátlást közvetítenek - a táplálékfelvétel megszűnését, súlyos testsúlycsökkenést, és végül halált okozhat (Gropp et al., 2005; Luquet et al., 2005). Ugyanakkor a POMC-expresszáló neuronok nem megfelelő afferens stimulációja (pl. nem megfelelő leptin vagy inzulin mennyiség vagy szignalizáció) esetén csökken a melanocortin tónus a központi idegrendszerben, ami bizonyos esetekben hozzájárulhat az elhízási hajlam kialakulásához.

Az AGRP és POMC neuronok transzkripciós szabályozása mellett (melyben elsősorban a leptin, a ghrelin és egyéb afferens szignálmolekulák vesznek részt), a keringési redszerben előforduló metabolitok lehetnek a melanocortin-AGRP rendszerre közvetlen hatással, nevezetesen megváltoztathatják ezen idegsejtek tüzelési ill. aktivitási mintázatát in vitro (Cai et al., 1999; Cowley et al., 2001; Cowley et al., 2003). Mindemellett számos bizonyíték támasztja alá, hogy azok a specifikus hypothalamicus és extrahypothalamicus neuronrendszerek között kialakult reciprok kapcsolatok - amelyek kulcsszerepet játszanak az energiaháztartás endocrin szabályozásának és az ezzel összefüggő viselkedési mintázatok kialakításában megváltoznak metabolikus hormonok, pl. a leptin és a ghrelin hatására (Pinto et al., 2004; Horvath and Gao, 2005; Abizaid et al., 2006; Diano et al., 2006; Gao et al., 2007; Andrews et al., 2008). Különösen a hypothalamicus POMC idegsejtekkel kapcsolatban álló serkentő és gátló bemenetek reagálnak intenzíven a periférás hatásokra, amelynek eredményeképpen a testsúlyszabályozás zavart szenved (Horvath and Diano, 2004). Ezek a megfigyelések vezettek ahhoz a hypothesishez, miszerint a melanocortin rendszer bemeneti synapticus szerveződése ill. plaszticitása alapvetően befolyásolja az ún. "anyagcsere fenotípust" (Horvath, 2005).

Ezt szem előtt tartva, azt vizsgáltuk, hogy vajon a POMC neuronok kvalitatív és kvantitatív bemeneti synapticus szerveződése különbözik-e az elhízásra hajlamos és a nem hajlamos állatok között, még azelőtt, hogy az adott állatra jellemző anyagcsere fenotípus kialakulna, és hogy a különböző metabolikus állapotokra adott válaszuk során van-e különbség a synapticus válasz tekintetében. Ehhez olyan Sprague-Dawley patkány törzseket használtunk, amelyek genetikusan elhízásra hajlamosak (DIO) vagy

annak ellenállóak (DR) voltak, de normál (standard) táplálék fogyasztása esetén (standard diet - SD) nem mutatnak különbségeket (Levin et al., 1997; Levin and Keesey, 1998; Levin and Dunn-Meynell, 2000; Levin et al., 2003). Ugyanezeket a kérdéseket C57Bl6 egértörzs esetében is megvizsgáltuk, amelyek szintén standard vagy magas kalóriatartalmú táplálékot kaptak.

## 1.9 A hypothalamicus NTPDáz-3 purinerg rendszer celluláris szerkezetének morfológiai és funkcionális vizsgálata

A sejten belüli purinerg szignáltranszdukció már évtizedekkel ezelőtt felkeltette a kutatók érdeklődését. Ismert, hogy nukleotid-trifoszfátok (ide tartozik a legismertebb adenozin trifoszfát, ATP is) nem csak intracelluláris energiaraktározási funkcióval rendelkeznek. Az ATP például hydrolizált származékai termelésének (ADP, AMP és adenozin) szubsztrátja is egyben, amelyek specifikus ligandként hatnak különböző purinerg receptorokon (pl. P<sub>2</sub>X, P<sub>2</sub>Y, P<sub>1</sub>) (Burnstock, 2007). Számos adat utal arra, hogy a purinerg volt az evolúció során elsőként kialakult szignáltranszdukciós rendszer (Appelbaum et al., 2007). Purinerg receptorok széles skáláját látják el specifikus liganddal az ATP hidrolizációs aktivitással rendelkező transzmembrán ektonukleotidáz (NTPDázok) és 5'-ektonukleotidáz enzimek. Az ismert purinerg ektonukleotidázok közül, a NTPDáz 1-3 típusát patkány agyban is leírták. NTPDáz-3 expressziót neuronokban, gliasejtekben és hámsejtekben figyeltek meg (Wang and Guidotti, 1998), míg az NTPDáz-2 az idegrendszer fejlődésében játszik fontos szerepet (Braun et al., 2003). Az NTPDáz-3 klónozása először 1998-ban sikerült (Smith and Kirley, 1998), később kimutatták, hogy az NTPDáz-3 mRNS az agyban és a hasnyálmirigyben fordul elő a legnagyobb mennyiségben (Chadwick and Frischauf, 1998). Az NTPDáz-3 idegrendszeri megoszlását és lokalizációját csak nem régóta ismerjük (Belcher et al., 2006). NTPDáz-3 immunreaktivitást kizárólag idegsejtek mutatnak és a legtöbb immunreaktivitás axonra emlékeztető képletekben volt, elsősorban a hypothalamus, a thalamus és a középagyi struktúrák területén. Immunreaktív sejttesteket kizárólag a hypothalamus nucleus lateralisa és nucleus arcuatusa területén lokalizáltak. Mivel ezek a hypothalamicus magyak elsősorban a táplálékfelvétel és a reprodukció szabályozásában játszanak igen fontos szerepet, feltételeztük, hogy az NTPDáz-3 is résztvesz ezen funkciók szabályozásában. Ezek a

NTPDáz-3 következtetések csupán az immunhisztokémiai megjelenésének fénymikroszkópos feltérképezésén alapultak, azonban nincsen információnk ezen fontos purinerg jelátviteli rendszer subcelluláris megoszlásáról, architektúrájáról, ami elengedhetetlenül szükséges az NTPDáz-3 celluláris funkcióinak megértéséhez. Ezért tűztük ki célul, hogy feltérképezzük immunhiszokémia és elektronmikroszkópia segítségével az NTPDáz-3 intracelluláris elrendeződését hím patkányokban. Arra is kíváncsiak voltunk, hogy vajon az NTPDáz-3 a serkentő, gátló, esetleg mindkét rendszerrel kapcsolatban van-e. Ezért kolokalizáltuk az enzimet a glutaminsav dekarboxiláz (GAD) enzimmel, amely a GABA gátló neurotranszmitter előállításához szükséges, és kizárólag GABAerg profilokban lokalizálódik. Mivel a ventrobasalis hypothalamus ismerten ösztrogén érzékeny, arra is kíváncsiak voltunk, hogy ösztrogén (17β-ösztradiol, E2) hatására hogyan változik meg az NTPDáz-3 mennyisége ovariectomizált, ill. ovariectomia után E2-kezelésen átesett nőstény patkányok hypothalamusa esetében.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásunk legfontosabb célkitűzése, hogy felderítsük a hypothalamicus rendszer működésének egyes molekuláris, szerkezeti és celluláris hátterét, hogy ezáltal jobban megértsük ezen komplex agyterület működését és jelentőségét. Kutatásainkat az alábbi kérdések megválaszolása vezérelte.

A hypothalamicus nucleus suprachasmaticus felnőtt állatban szexuálisan dimorph mag, amely dimorphismus az embryonális fejlődés során alakul ki. Igen kevés ismerettel rendelkezünk a nemek közötti különbségek kialakulásának mechanizmusáról, ezért kísérleteink során a következőket vizsgáltuk:

- Nemre specifikus számban és eloszlásban vannak- e jelen késői prenatalis korban újonnan kialakuló SCN és IGL neuronok?
- Megváltoztik-e a késői prenatalis korban újonnan kialakuló neuronok nemre specifikus száma és eloszlása a tesztoszteron hatására?
- Milyen neurokémiai természetűek az SCN-ban és IGL-ben újonnan keletkezett sejtek?

A táplálékfelvétel szabályozásában szerepet játszó hypocretin-expresszáló neuronhálózat rágcsálókban igen jól jellemzett, azonban a főemlősök esetében alig ismert az anyagcsereváltozások hatására létrejövő hypothalamicus synapticus válasz a HCRT rendszerben.

– Megvizsgáltuk tehát, hogy milyen hatással van az anyagcsere-változás a főemlősök hypothalamicus hypocretin (orexin)-tartalmú sejtjeire és azok postsynapticus célsejtjeire?

A gyomor-bélrendszer által termelt ghrelin hormon alapvető szerepet játszik a táplálékfelvétel szabályozásában, képes ellensúlyozni a zsírszövet által termelt leptin hatását. Számos adat utalt arra azonban, hogy endogén eredetű ghrelin is kulcsszerepet játszik a hypothalamus energiaháztartást szabályozó funkciójában. Kísérleteink során a centrális ghrelin rendszer celluláris és funkcionális tulajdonságaira voltunk kíváncsiak és a következő kérdésekre kerestünk válaszokat:

 Milyen hypothalamicus mechanizmusokon keresztül képes a ghrelin a leptin energiaháztartásra gyakorolt hatásainak kiegyensúlyozására?

– Milyen szerepet játszik a ghrelin abban a komplex neuropeptid tartalmú idgerendszeri hálózatban, amelyről régóta ismert, hogy kulcsszerepet játszik a táplálkozás és az anyagcsere szabályozásában?

A hypothalamus nucleus arcuatus melanocortin rendszere kiterjedt specifikus kapcsolatai révén nemcsak az energiaháztartás hanem a szexuális funkciók szabályozásában is alapvető szerepet játszik. Az ARC POMC termelő neuronjainak synapticus környezete, kapcsolatainak jellege és az általuk termelt neuropeptidek és felszíni receptorok mennyiségi és minőségi jellemzői alapvetően befolyásolják ezen hypothalmicus mag funkcióját. Ezért az ARC celluláris és funkcionális vizsgálata során a következő kérdésekre kerestük választ:

- Eljutnak-e a GnRH sejtek axonterminálisai a nucleus arcuatus POMC-termelő sejtjeihez, ill. létezik-e reciprok kapcsolat a két rendszer között?
- Befolyásolják-e a POMC sejtekben található parvalbumin expresszióját a nucleus arcuatus ösztrogén kezelés hatására megnövekedett serkentő bemenetei?
- Különbözik-e a POMC neuronok kvalitatív és kvantitatív bemeneti synapticus szerveződése azelőtt, hogy az adott állatra jellemző anyagcsere fenotípus kialakulna?
- A különböző metabolikus állapotokra adott válaszuk során mutatnak -e különbséget a melanocortin rendszer synapticus átrendeződésében az elhízásra hajlamos és nem hajlamos állatok?

A purinerg jelátviteli rendszer tagja, az NTPDáz-3 ektonukleotidáz rágcsáló agyban kizárólag a hypothalamus nucleus lateralis és nucleus arcuatus területén található idegsejtekben termelődik. Mivel mindkét mag alapvető szerepet játszik a táplálékfelvétel és a szexuális funkcók szabályozásában, az NTPD-áz-3 rendszer vizsgálata során a következő kérdésekre kerestünk választ:

- Milyen a hypothalamicus NTPDáz-3 intracelluláris szerveződése illetve serkentő és gátló rendszerekkel kialakított kapcsolata hím patkányokban?
- Hogyan változik meg ösztrogén hatására a hypothalamicus NTPDáz-3 mennyisége ovariectomizált, ill. ovariectomia után E2-kezelésen átesett nőstény patkányoknál?

## 3. FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1 Felhasznált gerinces állatok

Az emlős agy szerkezeti vizsgálatához a rágcsálók (és főemlősök) tökéletesen megfelelnek, hiszen a legtöbb, protein ellen készült antitestet rágcsáló antigének ellen termelték, ezért ezek az állatok az idegrendszer kutatására a legmegfelelőbb kísérleti modellek. Leggyakrabban Sprague-Dawley patkányokat és egereket használtunk, ill egy esetben majmot (*Ceropithecus aethipos*). A kísérleteket minden érintett intézet etikai és állatvédelmi bizottsága jóváhagyta, azokat a hatályos jogszabályoknak és direktíváknak ill. rendeleteknek megfelelően végeztük.

A kísérleteket embryonalis, valamint felnőtt, 3-5 hónapos Sprague-Dawley patkányokon (230-250g), C57BL/6J egereken (Enriori et al., 2007), ghrelin-KO egereken, NPY neuronokban sapphire-green fluorescent proteint (NPY-SFP) expresszáló transzgenikus egereken, green-fluorescent proteint POMC sejtekben (POMC-GFP) expresszáló transzgenikus egereken (Diano et al., 2003), valamint majmon végeztük (3.5-4.0 kg). A majmok egy másik, kísérleteinktől független vizsgálat során petefészek-eltávolításon estek át (ovariectomia, ovx). Az állatokat általában standard laboratóriumi körülmények között tartottuk, *ad libitum* víz és táplálkozás mellett, 12 órás megvilágítási periódusban.

### 3.2 Kísérleti elrendezések és egyéb beavatkozások

A kísérletekbe vont állatok fájdalmat nem, az exterminálás előtt csupán az altatószer (általában ketamin és xylazine keveréke) beadásával járó kellemetlenséget éreztek. A teljes érzéketlenség megállapítása után, a mellkas megnyitását követően az állatokat a bal szívkamrán keresztül perfundáltuk heparinizált fiziológiás sóoldattal, majd különféle összetételű 0,1M foszfát pufferben (PB) feloldott fixálóval (a leggyakrabban 4% paraformaldehidet, 15% pikrinsavat és 0,1-2% glutáraldehidet tartalmazott). Az agy kiemelése után Vibratómmal készítettünk általában kb. 50-90 μm vastag metszeteket.

#### Tesztoszteronkezelés és BrDU beadás

A vemhes patkányok egyenként, műanyag ketrecekben voltak elhelyezve. A vemhes patkányok egyik fele naponta tesztoszteron proprionát (TP, 10mg/0.1 mL szezám olaj) subcutan injekciót kapott a vemhesség 15. napjától egészen szülésig. A kontroll állatok csak vivőanyagot (szezám olajat) kaptak subcutan (n = 5, csoportonként). Minden vemhes patkány egyszeri, intraperitonealis 5-bromo-2'-dezoxiuridin mitoticus jelzőanyagot tartalmazó injekciót (50mg/kg testsúly, Sigma) kapott a vemhesség 18. napján (E18 – 18. embryonális nap). Mivel a BrDU képes átjutni a placentán és beépül az osztódó sejtekbe, a kezelés gyakorta használatos a fejlődő magzat osztódásban lévő sejtjeinek megjelölésére. Hatvan nappal a születésüket követően a hím és nőstény egyedeket random módon csoportokba osztottuk és extermináltuk.

#### Ösztrogén kezelés

Az ösztrogént bőr alá beültethető kapszulákon keresztül juttattuk az állatokba. A kristályos ösztradiollal (Sigma, Németország) töltött 1cm hosszú, 1.98mm átmérőjű Silastic kapszulákat (Dow Corning, USA) anesztézia alatt ültettük be subcutan, intrascapulárisan. A kontroll állatokba üres kapszulát helyeztünk. Az állatokat a beültetés után 4 héttel dolgoztuk fel.

#### Kolchicin kezelés

Kolchicin beadás mindig a perfúzió előtt 24 órával történt, intracerebroventricularisan, ketamin anesztézia alatt (80µg kolchicin-HCl 20µl fiziológiás sóoldatban).

## Táplálék megvonás ill. speciális táplálás Majmok

A majmokat két csoportba osztottuk (n = 3 csoportonként). Az egyik csoport 24 órán keresztül nem kapott táplálékot, míg a másik csoport *ad libitum* fogyaszthatott. *Patkányok* 

Felnőtt 7 hónapos DIO és DR patkányokat használtunk fel táplálkozási kísérleteinkhez (outbred Srague-Dawley elhízásra hajlamos (DIO) és nem hajlamos (DR)

patkányok, szelekíven tenyésztve). Az állatokat egyesével helyeztük el ketrecekben, 22 °C-ot, és 12 órás megvilágítási ciklust alkalmaztunk. N = 6 db testsúly és életkor szempontjából megegyező patkányt vizsgáltunk egy csoportban, amelyek a következőek voltak: DIO-SD, DIO-HFD, DR-SD, DR-HFD. Az állatok 3 hónapig normál (standard) vagy magas zsírtartalmú táplálékot kaptak (Altromin, Lage, Németország). A standard táp (Art. No. 1324) 4% zsírt, 50.5% szénhidrátot és 19% fehérjét (w/w) tartalmazott 13% (zsírból), 63% (szénhidrátból), ill. 24% (fehérjéből) kinyerhető emésztés során felszabaduló teljes energiával (11.8 kJ/g). A magas zsírtartalmú táp (Art. No. C1057) 15% zsírt, 47% szénhidrátot és 17% fehérjét (w/w) tartalmazott, 34% (zsírból), 48% (szénhidrátból), ill. 17% (fehérjéből) kinyerhető emésztés során felszabaduló teljes energiával (11.8 kJ/g). Az étel és a víz ad libitum az állatok rendelkezésére állt. A testsúly hetente egyszer mértük. A testösszetételt minden patkány esetében NMR technológiával vizsgáltuk (Teljes Testösszetétel Analízis, EchoMRI). A méréseket minden patkány esetében elvégeztük a 3 hónapos táplálási periódus végén.

#### Egerek

Az NPY ill. POMC sejtek synapticus bemenetét elhízásra hajlamos ill. nem hajlamos egereken is vizsgáltuk. Az egerek metabolikus fenotípusára vonatkozó adatok egy korábbi publikáció tárgyát képezik (Enriori et al., 2007). Röviden: 6 hetes C57BL/6J (Jackson laboratoires, Bar Harbor, ME, USA) egerek GFP- NPY (C57Bl ) és GFP-POMC (C57 Bl6) egerekkel keresztezett változatát standard (Purina Lab Chow #5001, Ralston Purina Corp, St. Louis, MO, USA) vagy magas zsírtartalmú (HFD - Rodent Chow #D12451, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA) táplálékkal etettünk ad libitum 20 ill. 37 hétig. A standard táp 12.1% zsírt, 59.8% szénhidrátot és 28% fehérjét (w/w) tartalmazott, 3.3 kcal/g kinyerhető energiával, míg a magas zsírtartalmú táp 45% zsírt, 35% szénhidrátot és 20% fehérjét (w/w) tartalmazott, 4.57 kcal/g kinyerhető energiával. 5db egér került egy ketrecbe, melyek testsúlya hetente lemérésre került. A teljes HFD táplált populáció egy részénél 30%-os testsúlygyarapodást tapasztaltunk 20 hét alatt (DIO egerek), míg másik részénél mindössze 6% gyarapodás volt megfigyelhető (DR egerek) a standard táplálású kontrollcsoporthoz viszonyítva. Az NPY és POMC sejtek szinaptológiáját 20 hét után vizsgáltuk a SD ill. HFD táplált állatok agyából készült metszeteken. A kapillárisok számát és átmérőjét is kvantifikáltuk a metszeteken (a nucleus arcuatus területéről véletlenszerűen készített 813x nagyítású felvételt használtunk, csoportonként n = 5 állatból).

#### Immunoassay

A plazma leptin és inzulinszintje Luminex Multiplex Analizátorral került meghatározásra (Luminex Corp., Austin, TX, USA). A plazma teljes ghrelin szintjének meghatározása kereskedelmi forgalomban elérhető, rutin radioimmunoassay (PhoenixPeptides, Burlingame, CA, USA) vizsgálattal történt.

#### Western blot vizsgálatok

A szövettani mintákat homogenizáltuk 20mM Tris-HCL, pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM PMSF, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 2,5 mM nátrium-pirofoszfát ill. 1-betaglicerol foszfát és 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> oldatban, amelyek a következő antiproteolitikus komponenseket is tartalmazták: 10µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin, 1µg/ml aprotinin, valamint 1% TritonX-100 és 0,05% nátrium dezoxikolát. Az ultrahangos kezelés és centrifugálás után (14000 x g 1 percig 2 celsius fokon) a fehérjekoncentrációt BCA protein assay segítségével határoztuk meg (Pirce Rockfort, USA). A blot-membránt TBS-T ill. 5% zsírmentes tej oldatával blokkoltuk 1 órán át, majd a primer antiszérummal történő inkubáció következett. Az immunreaktív sávokat tisztított, kemilumineszcens röntgenfilmeken detektáltuk. Minden blotról több felvétel készült és a film lineáris tartományába esőket használtuk denzitometriás vizsgálatokra. A bemutatott eredmények reprezentatív felvételek, amelyek legalább három, egymástól független kísérlet eredményét jól tükrözik.

#### 3.3 Felhasznált antitestek

Kísérleteinkben az alábbi antitesteket ill. antiszérumokat használtuk fel immunhisztokémiai jelölésre. Az adott antitest alkalmazott koncentrációját az eredmények fejezetben az egyes kísérleteknél adjuk meg, ill. az adott publikáció tartalmazza.

*Egér anti-BrDU* (Beckton-Dickinson), *Nyúl anti-GAD* (Sigma), *Nyúl anti NTPDáz-3* (KLH14) (Terence Kirley laborjából – ld. (Belcher et al., 2006), nyúl-anti *AVP* (ICN), *egér anti-calbindin-D28K* (Sigma), *nyúl anti-GFAP* (Sigma), *nyúl anti VIP* (Immunostar) *nyúl anti-GnRH*, *egér anti-GFP* (Sigma), *kecske anti-c-fos* (Cambridge Research Biochemichals Inc.), *nyúl anti-HCRT* (De Lecea et al., 1998; Horvath et al., 1999a), *nyúl-anti ghrelin* és *nyúl anti-TRH* (Cowley et al., 2003).

#### 3.4 Fluoreszcens immunhisztokémia

A metszetek 20%-os normál szérumban történő blokkolását szobahőmérsékleten, 4-12 óra hosszan primer antitestekkel történő inkubáció követett. Mosás után fluoreszcens festékkel jelölt szekundér antitestekkel történő inkubáció következett (Texas-Red konjugált anti-nyúl, fluoreszcein-konjugált anti-egér, Vector). Újbóli mosást követően a metszetek tárgylemezre kerültek Vectashield (Vector) beágyazó anyag segítségével.

#### 3.5 Immunperoxidáz immunhisztokémia

A metszeteket a szabad aldehid-csoportok eltávolítása végett 1% NaBH<sub>4</sub> kezeltük, ezt 3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubáció követ, mindez 0,1M PB-ben, majd 20%-os normál szérumban történő blokkolást követően primer antitestekkel történő inkubáció következett, a fent leírt módon. A szekundér antitest ebben az esetben biotinylált, amit mosás után ABC komplexben (Vector) vagy Extravidinben (Sigma) történő inkubáció követett. Az immunpozitív elemeket 3,3'-Diaminobenzidinnel (DAB) vagy többes jelölés esetén először nikkel-ammónium-szulfát-konjugált diaminobenzidinnel (Ni-DAB) jelenítettük meg ismételt mosást követően. Kettős jelölés esetén (Sótonyi et al., 2010b) az első lépést mosás követte, majd a másik vizualizálni kívánt megfelelő szekundér antitesttel inkubáltuk a metszeteket, de ebben az esetben nem Nikkelammónium-szulfát-konjugált diaminobenzidin (Ni-DAB), hanem DAB segítségével jelenítettük meg az immunpozitív elemeket. Így barna - fekete (esetenként sötétkék), egymástól jól és megfelelően elkülöníthető immunjelölt képleteket kaptunk. Hármas jelölés esetén (Diano et al., 2003) a metszeteket először 24 órán keresztül HCRT és cfos antiszérumban inkubáltuk (a HCRT az ARC területén nincsen jelen a sejttestekben, a c-fos viszont csak sejtmagokban lokalizálódik), és az ABC módszer valamint Ni-DAB segítségével vizualizáltuk, ami feketés színt eredményez. Az NPY jelölésére ezt követően került sor, "hagyományos" DAB reakcióval, amely barnás színt eredményezett.

Tükör technika alkalmazása kolokalizáció megállapításához: Egymást követő metszeteket párosítottuk, a pár egyik felét (esetünkben) NTPDáz-3, másik felét GAD

primér ellenanyaggal inkubáltuk, majd a standard immunhiszokémiai (peroxidáz) feldolgozáson mentek keresztül a metszetpárok. A metszetpárokat később összevetettük és a kolokalizáció mértékét meghatároztuk. A mikroszkópos feldolgozás során minden esetben a metszetek felszínére fókuszáltunk és digitális képeket rögzítettünk különböző nagyításokkal. A metszet megfelelő területeit az erek és a sejtek mintázata alapján azonosítottuk.

#### 3.6 Elektronmikroszkópos feldolgozás

OsO<sub>4</sub>-ban történő posztfixálás, majd uranil-acetátos inkubálás következett az elektrondenzitás növelése céljából. Alkoholos és propilén-oxidos dehidrálást követően a metszetek Durcupan ill. műgyantában kerültek beágyazásra, Aclar lapok közé. Polimerizáció és blokk-készítés után Reichert ultramikrotómmal készült 70 nm vékony metszetek réz-gridekre kerültek. A kontrasztozás Sato-féle ólommal történt. A metszetek Philips TECNAI ill. JEOL elektronmikroszkópokban kerültek megtekintésre és analízisre.

## 3.7 Pre- és posztembedding (beágyazás előtti és utáni) immunarany jelölés

A metszetek a peroxidáz immunhisztokémiánál említett módon kerültek feldolgozásra a szekundér antiszérum szintjéig. Mosás után azonban 10 nm-es aranyjelölt antitesttel inkubáltuk 3 óra hosszan, szobahőmérsékleten. A mosást és utófixálást követően OsO<sub>4</sub>-ban történő posztfixálás, majd uranil-acetátos inkubálás következik az elektrondenzitás növelése céljából. Alkoholos és propilén-oxidos dehidrálást követően a metszeteket Durcupan műgyantában ágyaztuk be. Polimerizáció és blokk-készítés után ultramikrotómmal készült 70 nm vékony metszetek réz-gridekre kerültek. A Sato-féle ólommal történt. Posztembedding (beágyazás utáni) kontrasztozás immunarany jelölés során az elektronmikroszkópos metszeteken a következő lépéseket végeztük el, 1 grid/csepp inkubációs konfigurációban: 2% perjód sav 10 perc, mosás duplán desztillált vízben, 2% nátrium-metaperjodát 10 perc, mosás duplán desztillált vízben, mosás pH7.4 TBS 0.1% triton X-100 (TBST) 3x2 perc, TBST + 0.1% nátriumborohydride és 50mM glicin10 perc, =BST + 2% BSA 10 perc, 1-2 óra inkubáció a primer antiszérumban (nyúl-anti ghrelin) + TBST-2%BSA, TBST mosás 2x10 perc, 2 óra inkubáció 25 nm arany konjugált anti-nyúl IgG-vel, mosás duplán desztillált

vízben 3x3 perc. Ezt második immunarany jelölés is követheti, esetünkben GABA, ekkor a fent ismertetett lépéseket kell megismételni, de ekkor tengerimalac-anti GABA antiszérumot használtunk és a szekundér antitest 10 nm-es arany konjugált antitengerimalac IgG volt. Akkor tekintettünk egy axonterminális profilt akár ghrelin akár GABA pozitívnak, ha az adott boutonban látható synapticus vezikulák fölött az aranyszemcsék száma egy 0.5µm<sup>2</sup> területen legalább háromszor magasabb volt, mint egy random, bármilyen egyéb profilokat tartalmazó területen (pl. cytosol, egyéb neuronális vagy astrocyta profilok, stb) és ennek a kritériumnak az adott metszetet megelőző és azt követő metszeten is teljesülnie kellett.

#### 3.8 Statisztikai elemzések

Az adatok átlag  $\pm$  s.e.m.-ként (standard hiba) kerültek megadásra. A statisztikai szignifikancia szintje P <= 0.05, minden kísérletben. A morfometriai analízis a minta csoportba tartozásának tudta nélkül, vakon lett elvégezve. Az adatok kiértékeléséhez Student-féle t-próbát vagy egyutas ANOVA Tukey's összehasonlító vizsgálatot használtunk.

A longitudinális adatokat faktoriális 2 x 2 ANOVA segítségével hasonlítottuk össze, ahol a kezelés (pl. tesztoszteron vs. olaj (vivőanyag) mint az első faktor és a nem (nőstény vs. hím) mint második faktor szerepeltek. 2 x 2 x 2 ANOVA-t használtunk abban az esetben, amikor a kezelés, az állat neme, és pl. az SCN terület (mag. vs. kéreg – core vs. shell) mint faktorok szerepeltek. Fisher LSD post-hoc analízist használtunk post-hoc tesztként, amikor arra stükség volt.

Az adatokat az Excel (Microsoft) és a GraphPad Prism v.4 (GraphPad szoftver, San Diego, CA) programok segítségével elemeztük.

## 4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

## 4.1 A nucleus suprachiasmaticus szerkezetének prenatális kialakulása hím és nőstény egyedekben

#### Eredmények

#### A BrDU-jelölt sejtek megoszlása a SCN és a IGL területén

BrDU jelölés egyértelműen megfigyelhető volt az agy teljes területén, de különösen sok jelölt sejt volt látható a periventricularis régióban, a neocortex területén, az amygdalában és az anterior hypothalamus területén. A neocortex esetében az I. és II. cinguláris és piriform corticalis rétegek jelölődtek különösen intenzíven. Szintén denz jelőlést figyeltünk meg a septum és a caudalis putamen területén. A hypothalamuson belül a BrDU jelölt sejtek egyértelműen azonosíthatóak voltak az area preopticus medialis, area preopticus lateralis, a hypothalamus anterio-lateralis területein, valamint a stria terminalis magvaiban. BrDU jelölt sejtek nagy számban voltak jelen a SCN, a nucleus arcuatus és a nucleus tubero-mammilare területén is. Figyelmünket elsősorban az SCN szexuális differenciálódására forítottuk.

Az 4.1.1. ábra mutatja be a SCN rostralis, medialis és caudalis ún. 'core' (a mag központi része) és ún 'shell' (a mag perifériás, kérgi területe) részeinek egy-egy reprezentatív területét. A SCN előbb említett 3 területét a neuroanatómiában széles körben elterjedt PAXINOS féle Atlasz segítségével (Paxinos and Watson, 1998) ill. az elfogadott felosztás figyelembevételével határoztuk meg (Moore et al., 2002).

A SCN kérgi és központi területeit neuropeptid-Y (NPY) immunfestés segítségével határoztuk meg, amely szelektíven a SCN központi, core területén fordul elő (Moore et al., 2002). A BrDU jelölt sejtek a SCN teljes rostrocaudalis tengelye mentén előfordultak. Sejtszám analízis segítségével megállapítottuk, hogy nem volt különbség a sejtszámban az egyes SCN szegmensekből származó metszetek között (BrDU jelölt sejt/metszet, P > 0.05; M rostralis SCN =  $18.44\pm1.23$ ; M medialis SCN =  $21.81\pm1.26$ , M caudalis SCN =  $19.12\pm1.62$ ). A SCN-on belül, a BrDU jelölt sejtek a dorsalis szegmensben domináltak, a kéreggel (shell) határos területen.



**4.1.1. ábra. Reprezentatív metszetek a rostralis (felső panel), medialis (középső panel) és caudalis (alsó panel) nucleus suprachiasmaticus területéről.** A baloldali oszlopban NPY immunfestett metszetek láthatóak, krezilibolya festéssel kombinálva. Az NPY festés jelenléte különíti el a ventralis rész központi (core - c) területét a dorsalis kérgi (shell - s) területtől. A jobb oldali oszlop képein BrDU jelölés látható a bal oldali terület szintjének megfelelő SCN területről. Skála: 50µm

Ennek ellenére, a SCN központi területének (core) ventralis részén is megfigyeltünk BrDU jelölt sejteket. Az IGL területén a BrDU jelölés sokkal visszafogottabb volt és elsősorban kisebb sejtmagok jelölődtek, ami elsősorban gliális jelölésre utal. Néhány esetben az IGL területéről teljesen hiányzott a BrDU jelölés.

#### Nemi különbségek a SCN és IGL területén a BrDU jelölt sejtek megoszlásában

Statisztikai elemzéssel kimutattuk, hogy a BrDU jelölt sejtek száma csökken a SCN területén prenatalis tesztoszteron kezelés hatására (P < 0.05, 2x2 csoportok közötti ANOVA analízis, ami figyelembe vette a hím-nőstény ill. a vivőanyag ill. tesztoszteron kezelés különbségeit, a SCN teljes területére vonatkozóan). Érdekességképpen, a sejtszám nem különbözött szignifikánsan a hím és nőstény egyedek között (P > 0.05). A BrDU jelölt sejtek száma ugyanakkor egyes alrégiókban különbséget mutatott a nemek között a SCN rostrocaudalis tengelye mentén. Például a nőstények medialis SCN területén magasabb volt a BrDU jelölt sejtek száma, mint a hím egyedek ugyanezen területén (2x2 ANOVA,  $F_{1,21} = 4.23$ , P = 0.05), és a tesztoszteron kezelés csökkentette a BrDU jelölt sejtek össz-számát ( $F_{1,21} = 13.3$ , P < 0.05). Statisztikailag szignifikánsan kimutatható volt, hogy ez a nemek között megfigyelt BrDU jelölésbeni különbség ( $F_{1,21} = 4.176$ , P = 0.05) a prenatális tesztoszteron-kezelés hatásának köszönhető.

*Post-hoc* ANOVA analízis egyértelműen kimutatta, hogy csak vivőanyag beadását követően nőstény egyedekben a BrDU sejtek száma magasabb a SCN területén, mint a hasonlóan kezelt hím állatok esetén, és a prenatálisan bejuttatott tesztoszteron csökkentette a jelölt sejtszámot (Fisher LSD, P < 0.05). A SCN kéreg (shell) és a központi terület (core) jelölt sejtjeinek statisztikai elemzése hasonló eredményre vezetett, vagyis a csak vivőanyaggal kezelt nőstények esetében mind a két területen több BrDU jelölt sejtet találtunk, és ezt a jelölt sejtszámot a prenatalis tesztoszteron kezelés szintén csökkentette (P < 0.05, ld. 4.1.2. ábra).



4.1.2. ábra A metszetenként regisztrált BrDU sejtek átlaga (±SE) a medialis SCN területéről prenatalisan tesztoszteronnal (10 mg/0.1mL) kezelt hím (male) és nőstény (female) patkányoknál. BrDU jelölés elsősorban a SCN dorsolateralis részének központi, 'core' területén ill. a kérgi területeken volt megfigyelhető. A prenatalisan csak vivőanyaggal (olaj - oil) kezelt nőstények esetében sokkal intenzívebb BrDU jelölést detektáltunk a SCN központi részének dorsolateralis és kérgi területén (\*P < 0.05) Skála: 50  $\mu$ m

Hasonlóan, a SCN caudalis részén található BrDU jelölés szignifikánsan több sejtet érintett a csak vivőanyaggal kezelt nőstények esetében, mint a hím egyedek ugyanezen területén, és a különbség tesztoszteron kezelés esetén is megmaradt (P < 0.05). A SCN többi részén tesztoszteron kezelés hatására a BrDU jelölt sejtek száma drámaian csökkent (P < 0.05). Jóllehet a tesztoszteron csökkentette a BrDU jelölt sejtek számát a caudalis SCN területén mind hímekben, mind nőstény állatokban, de sokkal erőteljesebb hatása volt a nőstény egyedekben (4.1.3. ábra). Általánosságban megállapítható azonban, hogy a SCN központi és kérgi területei között nem volt detektálható különbség a tesztoszteron hatás szempontjából.



4.1.3. ábra. A metszetenként regisztrált BrDU sejtek átlaga (±SE) a caudalis SCN területéről prenatalisan tesztoszteron proprionáttal (10 mg/0.1mL) ill. vivőanyaggal kezelt hím és nőstény patkányoknál. BrDU jelölés elsősorban a SCN dorsolateralis részének központi, 'core' területén ill. a kérgi területeken volt megfigyelhető. A prenatalisan csak vivőanyaggal (olaj) kezelt nőstények esetében sokkal intenzívebb BrDU jelölést detektáltunk a SCN központi részének dorsolateralis és kérgi területén (\*P < 0.05) Skála: 50 µm

Nem találtunk szignifikáns különbséget a rostralis SCN BrDU-jelölt sejtszámában a metszetek összehasonlító vizsgálatakor. Tesztoszteron kezelés hatására ugyanakkor szignifikánsan csökkent ebben a rostralis subregioban a BrDU jelölt sejtek száma, és a statisztikai elemzés kimutatta (egyutas post-hoc ANOVA amelyet Fisher LSD teszt követett: P < 0.05), hogy a tesztoszteron ezen hatása sokkal nyilvánvalóbb nőstényekben. Ha a statisztikai analízis során a nemek, a kezelés és a SCN régióit is (core vs. shell) figyelembe vesszük (ún. 2 x 2 x 2 ANOVA-teszt), akkor egyértelműen kimutatható, hogy a hím állatok SCN kérgi (core) területén több BrDU jelölt sejt fordul elő, mint a nőstények ugyanezen agyterületén ( $F_{1,17} = 8.79$ , P < 0.05) ill. tesztoszteron kezelés hatására szignifikánsan csökken a kontroll esetében megfigyelt BrDU jelölt sejtszám ( $F_{1,17} = 10.034$ , P < 0.05). Egyutas post-hoc ANOVA elemzés szintén kimutatta, hogy a tesztoszteron hatásnak kitett *in utero* nőstény embryók szignifikánsan kevesebb BrDU-jelölt sejtet tartalmaztak, mint a többi csoportba tartozó

állatok (Fisher LSD teszt, P < 0.05). Nem volt szignifikáns különbség a SCN anterior területének kérgi részén (4.1.4. ábra).



4.1.4. ábra. A metszetenként regisztrált BrDU sejtek átlaga (±SE) a rostralis SCN területéről prenatalisan tesztoszteronnal (10 mg/0.1mL) kezelt hím és nőstény patkányoknál. BrDU jelölés mind a központi, mind a kérgi területeken megfigyelhető volt a nucleus suprachiasmaticus területén. A prenatalis tesztoszteron kezelés csak nőstényekben csökkentette szignifikánsan a BrDU jelölés mennyiségét a SCN-ban (\*P < 0.05) Skála: 50  $\mu$ m

#### A BrDU jelölt sejtek fenotípusának meghatározása

Az embryonalis fejlődés 18. napján (E18) BrDU-jelölt sejtek neurokémiai tulajdonságainak meghatározásához az agyszövetből készült metszeteken kettős immunhisztokémiai jelölést alkalmaztunk. Számos neurokémai markerről ismert, hogy expresszálódnak a SCN sejteiben, pl. vasoactive intestinális polypeptid (VIP) arginin-vasopressin (AVP), gliális fibrilláris savas fehérje (glial fibrillary acidic protein-GFAP), ill. calbindin. A kettős jelöléses kísérletekhez használt metszetek alacsony száma nem tette lehetővé ezen adatok statisztikai elemzését, mindenesetre azt megállapíthattuk, hogy a SCN BrDU-jelölt sejtei igen változatos neurokémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, és a BrDU beadásakor egyik sejtcsoport sem mutat proliferációt.

#### BrDU és VIP immunreaktivitás

A SCN ventrolateralis területén találtunk kettősjelölt sejteket. A ventralis területen igen szembetűnőek voltak, a chiasma opticumba ágyazódva helyezkedtek el. Ahogyan az 4.1.5. ábrán is jól látszik, számos VIP-et expresszáló sejt tartalmazott BrDU-el jelölt sejtmagot. A legtöbb VIP-BrDU kettősjelölt sejt a ventrolateralis SCN központi területén (core) fordult elő, ill a chiasma opticum területén találtunk még ilyen populációt.

#### BrDU és AVP

A SCN kérgi területén (shell) található BrDU-jelölt sejtek hasonló megoszlást mutattak, mint az AVP immunreaktív sejtpopuláció, de kolokalizációt csak ritkán lehetett megfigyelni a két marker között ezen az agyterületen. A hypothalamus más régióiban azonban, mint például a nucleus supraopticus és a medialis preopticus area területén e két marker kolokalizációt mutatott.

#### BrDU és GFAP immunreaktivitás

BrDU jelölést egyáltalán nem találtunk GFAP-t expresszáló asztorcytákban. GFAP immunoreaktív gliasejtek nagyobb mennyiségben a SCN ventromedialis területén lokalizálódtak, míg a BrDU jelölt sejtek a SCN dorsolateralis részén voltak nagyobb számban jelen. Így a két marker közötti átfedés is minimálisnak bizonyult. Olyan elrendeződés azonban megfigyelhető volt, hogy BRDU-jelölt sejteket GFAP immunreaktív nyúlványok vesznek körbe.

#### BrDU és calbindin-D28K immunraktivitás

A SCN területén mind a kérgi, mind a központi részen előfordultak calbindin immunreaktív sejtek, különösen a medialis területen, az anterio-posterior sík mentén. Kettős immunjelölést alkalmazva jól láthatóvá vált, hogy a két marker igen markáns kolokalizációt mutat. Ez egyébként a többi hypothalamicus magra is jellemző volt, például a preopticus és a supraopticus magokra is. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy nem az összes BrDU pozitív sejt expresszált calbindin-t.



4.1.5. ábra. Kettős immunjelölés BrDU és AVP (A) calbindin-D(28K) (B) és VIP (C) neuronális markerek között a nucleus suprachiasmaticus területén. Nagyon kevés BrDU expresszáló SCN sejt kolokalizál AVP jelölést mutató sejtekkel (fekete nyíl, A), ellenben sokkal több BrDU jelölt sejt expresszál calbindint (B), mind a SCN központi, mind a kérgi területén (fekete nyíl). Ugyan a BrDU jelölés intenzívebb volt a kérgi részen és a dorsolateralis rész központi részén, mégis néhány VIP tartalmú sejtben megfigyeltünk BrDU ko-expressziót (C - a fehér nyilak kettős jelölt sejtekre (VIP-Texas-Red – piros, BrDU-fluorescein – zöld), míg a nyílhegy a csak BrDU jelölt sejtre mutatnak. Skála: 10  $\mu$ m

#### Megbeszélés

BrDU-jelölés segítségével megállapítható tehát, hogy milyen nemek közötti különbségek fordulnak elő a SCN területén, amely elsősorban az embryonalis 18. napon legaktívabb aromatáz-enzim aktivitásnak köszönhető, amelynek eredménye még felnőtt állatban is kimutatható. Eredményeink túlmutatnak azokon az ismereteken, amit a patkány SCN sejtproliferációjáról eddig tudtunk, és egyértelműen jelzik, hogy a kritikus periódus alatt keletkező SCN sejtek szexuálisan differenciáltak.

Patkányban a SCN sejtek proliferációja az embryonális 13. és 17. napok közé esik (Altman and Bayer, 1986). Eredményeink szerint azonban az SCN sejtdifferenciálódása legalább az embryonális 18. napig folytatódik, amit a SCN metszetekben található BrDU-jelölt sejtek jelenléte is alátámaszt. Az a tény, hogy vannak a SCN területén olyan sejtek, amelyek osztódnak amikor az aromatáz aktivitás igen magas a hypothalamusban, ill. amikor az aromatáz immunreaktivitás kimutatható a SCN-ban, arra utal, hogy a lokálisan termelt ösztrogén befolyásolhatja azon sejtek számát, amelyek a SCN-ban az E18. napon osztódnak, és amelyek később megmaradnak még a felnőtt állat synapticus hálózataiban is (Horvath and Wikler, 1999; Lephart et al., 2001). Megjegyzendő, hogy a SCN területén a sejtproliferáció a E15. napon éri el maximumát, ezért eredményeink csak egy igen szűk sejtosztódási fázist érintenek.

Eredményeink egyértelműen kimutatták, hogy a nőstény kontroll állatok több BrDU-jelölt sejttel rendelkeznek a medialis és caudalis SCN területeken, mint a hímek, ill., hogy a kísérletek során alkalmazott tesztoszteron kezelés drámaian lecsökkenti a BrDU jelölt sejtek számát a nőstény SCN teljes területén. Annak a pontos mechanizmusa, hogy hogyan jön létre a SCN-ban a BrDU-jelölt sejtek között nemi különbség, még nem ismert, de valószínűsíthető, hogy szteroid által mediált apoptotikus mechanizmusok húzódnak meg a háttérben. Hasonló következtetésre jutottak egyéb agyterületeken, például az anteroventralis preopticus area (AVPV), vagy a nucleus praeopticus szexuálisan dimorph területén, ahol a szteroid hormonok apoptózist indukálnak és ennek erdményeképpen alakul ki a jól megfigyelhető szexuális dimorphysmus (Jacobson et al., 1985; Dodson et al., 1988; Arai et al., 1994). A hypothalamus területén a legtöbb szexuálisan dimorph nucleus esetén megfigyelhető, hogy hím egyedekben nagyobbak, mint a nőstényekben. Ezekben az idegmagvakban a tesztoszteronból aromatizációval előállított ösztrogén protektív hatását tartják felelősnek azért, hogy a sejtek nem esnek a programozott sejthalál áldozatává azáltal, hogy egyrészt anti-apoptotikus fehérjék szintetizálását (pl. Bcl-2) (Zup et al., 2003), másrészt neuroprotektív anyagok, például calcium-kötő fehérjék termelését serkentik (Stuart and Lephart, 1999; Brager et al., 2000; Zup et al., 2003). Érdekeségképpen megjegyzendő, hogy az AVPV magot, amely nőstényekben nagyobb méretű, mint hímekben, szintén megváltoztatja a prenatalis tesztoszteron kezelés
(Nishizuka et al., 1993; Sumida et al., 1993; Arai et al., 1994). Más, szexuális dimorphismust mutató hypothalamicus régiókkal ellentétben, az AVPV magban a tesztoszteron elősegíti a sejthalált, a SCN-hoz hasonlóan, feltételezhetően a Bcl-2 antiapoptotikus fehérje modulációján keresztül. Megfigyelték ugyanis, hogy olyan hím egerekben, amelyekben a Bcl-2 fehérje túltermelődik (overexpresszált) nagyobb az AVPV mag mérete, mint a fiziológiás mennyiséget termelő egyedekben (Zup et al., 2003). Ugyanakkor számos eredmény mutat rá, hogy az aromatizált androgének neuroprotektív hatása az egyedfejlődés során a célsejtek ERa receptorain keresztül mediálódik, míg a fejlődő neuronok apoptosisát ezen sejtek ERß receptorai közvetítik (Nilsen et al., 2000). Mivel az újszülött patkány SCN sejtei túlnyomórészt ERß receptorokat tartalmaznak, lehetséges, hogy az ösztrogen-szenzitív SCN sejtek fokozott apoptotikus sejtpusztuláson mennek keresztül, pontosan akkor, amikor az aromatáz és tesztoszteron termelés a csúcsán van. Alternatívaként még az is szóba jöhet, hogy az androgének és/vagy metabolitjaik csökkenthetik a SCN idegsejt proliferációját a fejlődő patkány agyban, kitolhatják az SCN idegsejtek proliferációs idejét és/vagy differenciálódását, nagyon korai embryonalis időszakban leállíthatják a sejtproliferációt, ill. megzavarhatják a SCN-ba irányuló post-mitoticus sejtmigrációt (Beyer et al., 1994; Beyer and Hutchison, 1997; Muller and Torrealba, 1998; Brannvall et al., 2002). Végezetül lehetséges, hogy a SCN sejtjeinek proliferációját vagy túlélését indirekt módon a tesztoszteron és metabolitjai irányítják azokon az idegi területeken, ahol magasabb az androgének és az ösztrogén iránti érzékenység és ezen idegi területek kapcsolatban állnak a SCN-al. Ezáltal a szteroid-expressziótól függően megváltozik a SCN beidegzése, ami annak szerkezeti változásával járhat együtt. Ilven területek például az AVPV, a nucleus stria terminalis, vagy a nucleus raphe stria terminalisa (de la Iglesia et al., 1999; Bethea et al., 2002).

Jelen kísérletekben nem találtunk az anterior-posterior tengely mentén különbséget a BrDU jelölt sejtek mennyiségében az egyes SCN szegmensekben. Részletes fejlődéstani vizsgálatok kimutatták azonban, hogy patkányban és hörcsögben a caudalis SCN sejtjei korábban differenciálódnak, mint az anterior SCN-ban található sejtek (Davis et al., 1983; Altman and Bayer, 1986). Ugyanakkor kimutatták, hogy az SCN különböző szegmenseiben differenciálódó és osztódó sejtek között nincsen jelentős különbség, ami alapján arra következtethetünk, hogy a sejtek nagyjából

hasonló mennyiségben keletkeznek a SCN anterior-posterior tengelye mentén, még a SCN késői fejlődési fázisában is. Nemek közötti különbségek viszont csak azokon a területeken figyelhetőek meg, amelyek a fejlődés későbbi fázisában differenciálódnak (mediális és caudalis SCN), jóllehet a tesztoszteron hatása csökkenteni látszik a BrDUjelölt sejteket az egész SCN területén.

A kettős immuncitokémiai jelölésekkel sikerült kimutatnunk, hogy az E18. napon keletkező sejtek neurokémiailag változatosak, és egyik specifikus fenotípus proliferációjához sem köthető kizárólagosan a BrDU-jelölés. A BrDU-jelölt sejtek lokalizációja alapján megállapíthatjuk, hogy a jelölt sejtek közül a VIP pozitívak a SCN központi (core) részén, az AVP-pozitívak a kérgi (shell) területeken, a calbindin D (28K) immunpozitív sejtek pedig mind a központi, mind pedig a kérgi területeken megtalálhatóak (Moore et al., 2002). Jóllehet a BrDU-jelölt sejtek elsősorban a dorsalis régió központi és perifériás területén koncentrálódtak, olyan sejtek, amelyek a ventralis SCN-ban lokalizálódtak szintén expresszáltak VIP-t. Kutatási eredmények rávilágítottak, hogy a patkány és hörcsög SCN ventralis területei korábban kifejlődnek, mint a dorsalis részek, és csak kevés sejt proliferációját figyelték meg a fejlődés kései szakaszában (Altman and Bayer, 1986; Davis et al., 1990). VIP sejteket megfigyeltek az SCN fejlődés korai szakaszában is (Botchkina and Morin, 1995a). Eeredményeink szerint azonban biztosan történik VIP tartalmú sejtproliferáció a patkány SCN fejlődésének kései szakaszában is.

Nem tisztázott, hogy az E18. napon BrDU-jelölt sejtek termelnek-e vasopressint. Megfigyeltünk ugyan néhány sejtet, amely AVP és BrDU kettősjelölést mutatott, de csekély számban fordult csak elő ilyen sejt. Mivel a SCN perifériás, kérgi részén korábban, az E15. nap körül történik a neuronok proliferációja (Altman and Bayer, 1986), eredményeink nem meglepőek. Megjegyzendő, hogy az AVP jelölés hiánya technikai okokra is visszavezethető, mivel jelen kísérleteinkben nem alkalmaztunk kolchicin kezelést az immunfestés előtt. Ismert, hogy kolchicin kezelés hatására a SCN-ban bizonyos neuropeptidek immunhisztokémiai detektálhatósága, mint pl. VIP vagy AVP csökken az idegrostokban és megnő a sejttestekben (Devries et al., 1981).

Különösen érdekes azonban a BrDU és a calbindin kolokalizáció kiterjedt mivolta. A calbindin-D28K azon kalcium-kötő fehérjék közé tartozik, amelyek igen

fontos szerepet játszanak az agy fejlődésében, meghatározzák egyes sejtpopulációk sorsát azáltal, hogy apoptosist, vagy proliferációt indukálnak, esetleg védelmet nyújtanak neurokémiai káros behatások ellen (Mattson, 1992). Az újszülött patkány SCN sejtjei expresszálják ezt a fehérjét, azonban a calbindin-D28K immunreaktivitás felnőtt korra eltűnik erről az agyterületről (Ikeda and Allen, 2003). Érdekes, hogy e fehérje hypothalamicus expressziója szexuálisan különbözik az embryonalis fejlődés kései szakaszában, a hím egyedekben több calbindin D-28K expresszáló sejt található az E17. – től a postnatalis 2. napig (P2) (Lephart, 1996a; Stuart and Lephart, 1999; Brager et al., 2000). Mindezeket az eredményeket figyelembe véve, lehetséges, hogy a calbindin D28K, vagy akár más kalcium-pufferolásra képes kalcium-kötő fehérjék kulcsszerepet játszanak a SCN szexuális dimorphismust eredményező szerkezetének kialakításában.

Mivel a felnőtt nőstény agyban az IGL területén nagy mennyiségben található szteroid hormon receptor, és ez a terület kiterjedt kapcsolatokkal rendelkezik olyan neuroendocrin sejtcsoportokkal, amelyek egyértelműen szexuálisan differenciálódott fiziológiás funkcióval rendelkeznek (Horvath et al., 1999b), azt vártuk, hogy az IGL területén a BrDU-jelölés mintázatban is lesznek a különböző nemű egyedekben különbségek. A SCN-al ellentétben azonban nem tudtunk kimutatni ilyet a E18. napon. A jelölt sejtek alacsony számából következteve valószínűsíthető, hogy az IGL területén a sejtproliferáció nincs szinkronban az SCN-ban zajló hasonló folyamatokkal (Botchkina and Morin, 1995b).

A legújabb fejlődéstani kutatások arra utalnak, hogy a humán hypothalamus fejlődése jóval több analógiát mutat a patkányéval, mint azt korábban gondoltuk (Koutcherov et al., 2003). A biológiai óra szabályozásában résztvevő idegközpontok kifejlődésének szekvenciája hasonló, csupán időpontjában van eltérés. Amíg a rágcsálók esetében a terhesség végén, addig az ember és egyéb főemlősök esetében valamivel hamarabb, a harmadik trimeszter első heteire tehető ezeknek az idegközpontoknak a differenciálódása és aktív működési funkcióiknak beindulása (Weinert, 2005). Az afferens és efferens kapcsolatrendszerek kialakulása mindkét esetben még prenatalisan megkezdődik, de ennek befejeződése túlnyomó részben a postnatalis időszakra tehető. A fejlődés ütembeli eltérése ellenére úgy ítéljük, hogy eredményeink feltehetőleg jól adaptálhatóak humán területre is.

Eredményeink tehát egyértelműen bemutatták, hogy a SCN területén szexuálisan dimorph sejtpopulációk találhatóak, és a nőstény egyedekben több ilyen sejt található, amelyek az aromatizációs aktivitás csúcsán keletkeztek. Ez a sejtpopuláció nagy valószínűséggel résztvesz a szex-specifikus folyamatok szabályozásában, amelyek elsősorban reprodukciós és viselkedési mintázatokban jelentkeznek.

## 4.2 A hypocretin (orexin) hypothalamicus szabályozómechanizmusa főemlősökben

#### Eredmények

Kísérleteinkben először meghatároztuk a keringési rendszerben található leptin mennyiségét, és összehasonlítottuk az éhező és normál táplálású állatok leptin-szintjét. A kísérletek kezdetén a két csoport nem különbözött szignifikánsan (0h; 6.7 $\pm$ 0.9 vs. 6.5 $\pm$ 0.7 ng/ml, P > 0.05), azonban az éheztetett állatokban a 24-órás éhezést követően szignifikánsan lecsökkent a leptin mennyisége (2.5 $\pm$ 0.5 vs. 6.3 $\pm$ 0.8 ng/ml, P < 0.05).

#### HCRT a majom hypothalamusban

Immunhisztokémiai festést követően a majom hypothalamus HCRT mintázata megfelelt a már korábban megfigyelt mintázatnak (Horvath et al., 1999a; Horvath et al., 1999c). HCRT immunpozitív sejttestek kizárólag a lateralis hypothalamusban, a fornix körüli régióban és valamivel kisebb mennyiségben a dorsomedialis hypothalamusban voltak jelen. A HCRT immunpozitív sejtekből projektáló axonok gazdag hálózatot alakítottak ki számos hypothalamicus magban. Nem tapasztaltunk egyértelmű és nyilvánvaló eltérést az éheztetett és kontroll állatok HCRT immunreaktív struktúráiban.

#### *c-fos immunreaktivitás*

A szakirodalomnak megfelelően (Caston-Balderrama et al., 1998), *c-fos* immunreaktivitás számos különböző hypothalamicus területen lokalizálódik, mind a kontroll, mind az éheztetett állatokban.

Kontroll majmokban a medialis preopticus area (MPOA), a periventricularis régió, a paraventricularis terület (mind a parvo- ill. magnocelluláris részek), az anterior hypothalamus, a nucleus suprachiasmaticus, nucleus arcuatus dorsomedialis és ventromedialis területén volt homogén, egyenletes megoszlású, mérsékelt mennyiségű *c-fos* jelölt sejtmag. Az éheztetett állatokban azonban a *c-fos*-jelölt sejtek mennyisége jelentősen különbözött a kontroll állatokban megfigyelt megoszlástól (4.2.1. ábra A,C). Éheztetett állatokban az alábbi területeken figyeltünk meg szignifikánsan

magasabb mennyiségű *c-fos* immunreaktív sejtet: MPOA (235 ±22 vs. 489±35, P < 0.05), lateralis hypothalamus prefornicalis területe (343±17 vs. 889±41, P < 0.05), nucleus arcuatus (205±34 vs. 341±42; P < 0.05), nuclei dorsomediales (276±41 vs. 452±26, P < 0.05). Más magokban is megfigyeltünk különbségeket a *c-fos* immunpozitív elemek mennyiségében, azonban a különbség az alábbi területeken nem bizonyult szignifikánsnak: a nucleus ventromedialis (224±36 vs. 196±13, P > 0.05), a parvocellularis paraventricularis hypothalamicus magvak (246±27 vs. 316±39, P > 0.05) és a magnocellularis paraventricularis hypothalamicus magvak (325±40 vs. 287±33, P > 0.05) területén. Megjegyzendő, hogy a megvizsgált alacsony állat-szám (n = 3) lehet az oka annak, hogy nem tudtunk statisztikailag szignifikáns különbséget kimutatni ezen területeken, és nagy valószínűséggel a mintaszám növelésével ezen utóbbi területek is szignifikáns különbséget mutatnának az éhező és kontroll csoportok között.



**4.2.1.** ábra. Fénymikroszkópos felvételek a majom prefornicalis (pf) területéről *c-fos* immunfestést követően kontrol (A) és éheztetett (fasted) állatokból (B). Skála 100 µm. A C-panelen látható oszlopdiagrammok mutatják a *c-fos* immunreaktív sejtek számát a hypothalamus különböző régióiban ill. magjaiban kontroll (fehér oszlopok) és éheztetett (fekete oszlopok) állatokban.

#### c-fos a HCRT sejtekben

*c-fos* immunreaktivitást mindkét megvizsgált csoport (kontroll és éheztetett) HCRT termelő sejtjeinek sejtmagjaiban ki lehetett mutatni (4.2.2A,D ábra). Nem volt különbség a kontroll és az éheztetett állatok HCRT-jelölt sejtjeinek átlagában sem (502±24 vs. 535±33, P > 0.05, 4.4.2E ábra). Ugyanakkor a *c-fos*-t expresszáló sejtek mennyisége a HCRT sejtek százalékos arányához viszonyítva egyértelműen és szignifikánsan magasabb volt az éheztetett állatokban a kontroll állatokhoz képest (P < 0.05). Kontroll állatokban a lateralis hypothalamus prefornicalis területén átlagban 135±35 HCRT immunreaktív sejtben volt *c-fos* jelölés, amely a teljes HCRT sejtszám 26.8%-át tette ki. Ehhez képest az éheztetett állatokban 418±38 HCRT immunreaktív sejt tartalmazott *c-fos* jelölést, amely a teljes HCRT-jelölt sejtszám 78.1%-a volt (4.4.2 ábra). A kontroll majmokban megfigyelt *c-fos* expresszáló és HCRT-t is tartalmazó sejtek száma (135±35) a teljes *c-fos* expresszáló sejtpopuláció (182±29) kb. 75%-át tette ki a lateralis hypothalamus prefornicalis területen. Ez az arány az éheztetett csoportban is hasonlóan alalkult, mivel 418±38 a teljes *c-fos* expresszáló sejtből (562±42) volt HCRT imunreaktív is (4.4.2F ábra).

#### HCRT-immunreaktív synapsysok a c-fos tartalmú sejteken

Fénymikroszkópos vizsgálataink során felfigyeltünk arra, hogy mind a kontroll, mind az éheztetett állatok esetében a *c-fos* jelölt sejteket gyakran vette körbe számos HCRT immunpozitív bouton (4.2.3 ábra). Azokon a területeken, ahol sziginifikánsan megemelkedett éheztetést követően a *c-fos* szintje (ezek a MPOA, nucleus arcuatus, lateralis hypothalamus prefornicalis területe, nucleus dorsomedialis), akár a kontroll, akár az éheztetett csopotot vizsgáltuk, nem találtunk olyan c*-fos* immunreaktív sejtet, amellyel ne alakított volna ki synapticus kapcsolatokat több HCRT immunopozitív axon is. A synapticus kapcsolat fajtáját elektronmikroszkópos szinten megvizsgáltuk és minden esetben aszimmetrikus synapsysnak bizonyult a kapcsolat (4.2.3F ábra). A nucleus arcuatusban, ahol megemelkedett éheztetést követően a *c-fos* expressziója, és NPY sejtek is jelen vannak, a HCRT tartalmú boutonok az NPY/*c-fos* kettősjelölt sejtek közelében helyezkedtek el (4.2.4 ábra).



4.4.2. ábra. Az éheztetés hatására megjelent *c-fos* expresszió kizárólag sejtmagokban volt detektálható (A és C). A perifornicalis régióban számos *c-fos* jelölt sejt (piros sejtmagok a B és D panelen) expresszált HCRT-t is. Skála: A és B 10  $\mu$ m, C és D 100  $\mu$ m. E. *c-fos* immunreaktivitás HCRT neuronokban (fehér oszlop) és teljes HCRT immunpozitív neuron mennyiség (fekete oszlop) kontroll és éheztetett állatokban. F. *c-fos* immunreaktivitás HCRT neuronokban (fehér oszlop) és teljes *c-fos* immunpozitív neuron mennyiség (fekete oszlop) kontroll és éheztetett állatokban.



**4.2.3. ábra.** A majom hypothalamus minden régiójában, ahol *c-fos* indukció történt éheztetés hatására a sejtmagokban, HCRT tartalmú boutonokat figyeltünk meg az aktivált sejtek közelében (**A**). Elektronmikroszkópiás vizsgálatok (**B**, **C**) szerint ezek valóban synapticus kapcsolatok (a C panelen a nyilak a synapticus membránspecializációra mutatnak). Skála: 10  $\mu$ m (A) és 1  $\mu$ m (B, C).



**4.2.4. ábra.** Az éhezés indukálta HCRT (ORX) synapticus boutonokkal körbevett sejtek egy része NPY immunpozitivitást is mutatott a nucleus arcuatus területén. Skála 10 µm

#### Megbeszélés

Kutatási eredményeinknek köszönhetően először nyertünk betekintést a főemlősök anyagcsere-szabályozásában résztvevő HCRT-tartalmú hypothalamicus szignáltranszdukciós rendszerbe. Az, hogy rövid táplálékmegvonás hatására is erőteljesen aktiválódik a lateralis hypothalamicus HCRT rendszer, amelynek ráadásul kiterjedt kapcsolatai vannak a homeostasis szabályozásában fontos szerepet játszó egyéb hypothalamicus központokkal arra enged következtetni, hogy a főemlős hypothalamicus HCRT rendszernek fontos koordináló szerepe van a különböző autonóm, endocrin és metabolikus folyamatokban. Ezt a feltételezést alátámasztja az is, hogy a HCRT szerepe már jól ismert a táplálékfelvétel-, vérnyomás- és egyéb funkciók szabályozásánál. (Sakurai et al., 1998; Chemelli et al., 1999; Lin et al., 1999; Samson et al., 1999; Kukkonen et al., 2002).

Egy korábbi tanulmányban (Horvath et al., 1999a), a majom nucleus arcuatusában erőteljes HCRT innervációt írtak le, ahol a HCRT immunreaktív axonok NPY tartalmú sejteket innerváltak. Hogy ez a főemlősőkben leírt arcuatus-NPY rendszer részt vesz-e a HCRT táplálkozást szabályozó funkciójában még nem tisztázott, de rágcsálókban már nagyrészt bebizonyosodott egy ilyen funkció (Jain et al., 2000; Lopez et al., 2002). Mindenesetre az a jelen munkában megfigyelt szerveződés, hogy a ARC éhezés hatására aktiválódó NPY sejtjei HCRT bemenettel rendelkeznek, alátámasztja ezt a feltételezést. Ugyanakkor az is lehetséges, hogy az éheztetés hatására a HCRT neuronok aktiválódására csak később, a ARC aktiválása után kerül sor. Az ARC NPY sejteit nagy valószínűséggel védelmezi a véragy-gát, ill. az ARC közvetlen lateralis hypothalamicus összeköttetése majmokban nem kifejezett (Horvath et al., 1999a). Az is valószínűsíthető, hogy a HCRT rendszer jól ismert alvás-ébrenléti szabályozási funkcója szenved zavart az éheztetés során, és ez befolyásolja a HCRT szabályozási funkcióit.

Leptin receptorok jelenlétét korábban már kimutatták a lateralis hypothalamus HCRT sejtjein (Horvath et al., 1999a), és a leptinről ismert, hogy képes átjutni a véragy-gáton (Bjorbaek et al., 1998). Ennek megfelelően a HCRT sejtekben megfigyelt *cfos* génexpresszió változás az éheztetés hatására bekövetkező, egyre csökkenő perifériás leptin szint közvetlen következménye lehet. Ugyanakkor az ilyen, különösen

főemlősökön alkalmazott táplálékmegvonásos kísérleti elrendezések nem teszik lehetővé egy adott hormon hatásának pontos behatárolását, mivel számos, komplex endocrin folyamat eredménye lehet a megfigyelt, detektálható eltérés a kontrollhoz képest. Például, rágcsálókban megfigyelték, hogy a keringő inzulin és/vagy glükóz szintje szabályozó hatást gyakorol a hypothalamicus HCRT rendszerre (Cai et al., 1999). Éppen ezért további vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy a főemlős HCRT rendszerének pontos szabályozási mechanizmusát megértsük.

## 4.3 A Ghrelin szerepe a hypothalamus energiaháztartást szabályozó funkciójában

#### Eredmények

#### A ghrelin agyi expressziója

Kojima és munkatársai 1999-es kutatásai bebizonyították (Kojima et al., 1999), hogy a ghrelin mRNS előfordul az agyban, és hasonlóképpen mi is találtuk RT-PCR analízissel a gyomorból és a hypothalamusból származó minták esetében egy 320 bázispár nagyságú terméket (4.3.1A ábra). Szekvenálás után kiderült, hogy a bázissorrend tökéletesen megfelel a ghrelin ismert és publikált szekvenciájának (Kojima et al., 1999). Továbbá ghrelin *knock-out* egerek hypothalamusában nem találtunk ghrelin mRNS-t, de (ugyanabból az alomból származó) vad típusú egértörzs esetében hasonló expressziós mintázatot láttunk.

Ezt követően három, egymástól különböző és egymástól függetlenül előállított antiszérum segítségével vizsgáltuk a ghrelin jelenlétét a hypothalamusban. A western blot vizsgálat 13kDa molekulasúlynak megfelelő területen jelzett mindhárom antiszérum esetében egyetlen sávot, amely megfelel a még nem szekretált ghrelin prohormon molekulasúlyának (4.3.1. A ábra). Ez megerősítette, hogy a hypothalamusban van ghrelin termelés.

Ghrelin-immunreaktív sejttesteket lokalizáltunk mind a patkány, mind pedig az egér hypothalamusban. Ezen sejttestek egy folyamatos sáv mentén helyezkedtek el, amely kitöltötte a lateralis hypothalamus (LaH), a nucleus arcuatus (ARC), a ventromedialis hypothalamus (VMH), a dorsomedialis hypothalamus (DMH) és a nucleus paraventricularis (PVN) közötti területet, ill. benyomult a harmadik agykamra ependymális rétegébe (4.3.1B és 4.3.2A-C ábrák). Ugyanezekkel az antiszérumokkal ghrelin knock-out egerekben nem találtunk sem ezeken az agyterületeken, sem pedig a gyomorban jelölődést (4.3.2D ábra). Kolchicin kezelés hatására a ghrelin-jelölt sejtek száma és a jelölés intenzitása megnövekedett, amely számos egyéb hypothalamicus peptiderg rendszer esetén is megfigyelhető. A ghrelin immunreaktív neuronok leggyakrabban bipoláris alakúak voltak, de előfordultak szögletesek is (4.3.2Cábra).



**4.3.1. ábra. Ghrelin mRNS és peptid expresszió a hypothalamusban. A.** Ghrelin expresszió a patkány gyomor és hypothalamus területén. PCR termékek (felül) 1.5% agaróz gélen lettek szeparálva és ethidium-bromiddal megfestve. A western blot (alul) 13 kDa molekulasúlynál mutat immuneraktív sávot, amely megfelel a pro-ghrelin méretének. A ghrelin szintje a gyomorban több nagyságrenddel magasabb, mint a hypothalamusban. B. Ghrelin immuneraktív sejttestek (piros) és projekcióik (piros pontok) sematikus ábrázolása a hypothalamusban és a környező területeken. A mm értékek Bregmához viszonyítva értendők.

Ghrelin erőteljesen expresszálódott axonokban is (4.3.1B ábra, 4.3.2C insert, 4.3.2E-L ábrák), és az immunjelölés az axonterminálisokban gyakran ún. "denz-core" vezikulákkal asszociálódott.



4.3.2. ábra. Ghrelin a hypothalamicus neuronokban és efferentációjuk. A-C. A ghrelin immunreaktív (IR) sejttestek megoszlása az ARC, PVN, DMH, és VMH magok környezetében. Az ábrák (A-C) három különböző primer antiszérum használatával készült ghrelin immunpozitív sejtek mintázatát mutatják. Skála (A-D) 300µm. A C ábrán látható insertek ghrelin immunpozitív sejttest és axon nagy nagyítású képéit mutatják, skála 10 µm. **D.** Ghrelin immunfestés gyomorban (alsó panelek) és hypothalamusban (felső panelek) vad típusú (wt) és ghrelin knock-out (ko) állatokban. E-G. Ghrelin immunpozitív axonterminálisok (nyílhegyek) NPY- immunpozitív (E), POMC immunpozitív (F) sejttestek közelében a nucleus arcuatus területén illetve CRH immunpozitív sejttest közelében (G) a PVN területén. Skála E-G: 10 µm. H. NPY- immunreaktív axonterminális (piros) ghrelin immunreaktív boutonnal (zöld) közvetlen appozícióban a PVN területén. I. Ghrelin immunreaktivitás axonterminális dense-core vezikuláiban, elektronmikroszkópos felvétel. Skála 1µm az I-L panelekre egyaránt. J. Szimmetrikus synapticus membránspecializáció (fekete nyíl) ghrelin-immunjelölt axonterminális (25nm-es immunarany szemcsék a dense-core vezikulákon) és egy jelöletlen dendrit között. K. Közvetlen synapticus kapcsolat ghrelin (immunperoxidáz) és NPY tartalmú (25nm-es immunarany a dense-core vezikulákon) terminálisok között, elektronmikorszkópos felvétel. L. Közvetlen synapticus kapcsolat GABA (10nm-es immunarany szemcsék) és ghrelin (25nm-es immunarany a dense-core vezikulákon) axonterminálisok között, amely presynapticusan viszonyban áll egy TRH immunjelölt PVN sejttesttel.

A synapticus membránspecializáció nem mindig volt tisztán látható, azonban a mediobasális hypothalamus területén ez szinte megszokott jelenség. Amikor azonban a synapticus kapcsolat látható volt, az Gray II-es típusú, szimmetrikus (gátló) synapsysnak bizonyult (4.3.2J ábra). A ghrelin-tartalmú axonterminálisok számos hypothalamicus magot innerváltak, többek között az ARC, DMH, LaH és PVN magokat. Ghrelin immunoreaktív boutonokat megfigyeltünk a hypothalamuson kívül is (pl. az amygdala, a thalamus paraventricularis magjában és a lateralis habenula-magban), de ezek anatómiai sajátságait és szerepét nem vizsgáltuk tovább.

Az energiaháztartás szabályozásában fontos szerepet játszó hypothalamicus központok közül a nucleus arcuatus területén fordultak elő ghrelin tartalmú boutonok, ahol az NPY/AGRP és a POMC (pro-opiomelanocortin) tartalmú neuronok dendritjeivel és sejttestjeivel hoztak létre synapticus kapcsolatokat. Fény- és elektronmikroszkópos egyes- és kettős-immunhisztokémiai jelölések használatával egyértelművé vált, hogy a ghrelin tartalmú boutonok közvetlen synapticus kapcsolatokat hoznak létre NPY és GABAerg axonterminálisokkal az ARC és PVN területén (4.3.2H,K,L ábrák). A PVN területén néhány ghrelin tartalmú axon corticotropin-releasing hormon (CRH) sejteket innervált (4.3.2G ábra).

#### Ghrelin receptor-kötődés az agy területén

A GH-szekretoros receptor (GHS-R), vagyis a ghrelin-receptor mRNS hypothalamicus lokalizációjáról állnak ugyan rendelkezésre adatok (Guan et al., 1997; Willesen et al., 1999), ezen receptorok subcellularis megoszlását azonban még nem vizsgálták. Hogy a ghrelin-hatás pontos neuronális helyét meghatározzuk, biotyn-kötött ghrelin molekulák kötődését vizsgáltuk coronalis agyi metszeteken. A biotynilált ghrelin olyan hypothalamicus struktúrákhoz kapcsolódott, mint az ARC (4.3.3A,B ábra), LaH (4.3.3c ábra) és PVN (4.3.3E ábra). Mindhárom régió expresszálja a GHS receptort. Ghrelin kötődést a neocortex területén is megfigyeltünk (4.3.3D ábra). A biotynilált ghrelin kötődés specifikus volt, mert nem biotinylált ghrelinnel történő elő-inkubálás után a jelölés (és ezáltal a kötődés) teljes mértékben megszűnt (4.3.3B-E ábra). A hypothalamus területén azok az axonterminálisok, amelyek ghrelin kötődést mutattak igen gyakran NPY immunpozitívnak is bizonyultak

(4.3.3F,G ábra). Gyakran volt megfigyelhető az egész hypothalamus területén, hogy a ghrelin és NPY tartalmú rostok egymáshoz igen közel haladtak (4.3.2H és 4.3.2K ábra).



**4.3.3. ábra. Ghrelin kötődés a hypothalamus területén. A**. Biotinylált ghrelin kötődést mutat a különböző hypothalamicus magvak területén (ARC, DMH, eminentia mediana). Az A panelen látható skála 300  $\mu$ m és az A, H és J panelekre alkalmazandó. **B-E.** Ghrelin kötődés axonterminálisokhoz asszociálódik a nucleus arcuatus (ARC – B), a lateralis hypothalamus (LaH – C), a neocortex (cortex - D) és a periventricularis hypothalamus (PVN – E) területén. A nyílhegyek jelölt boutonokra mutanak. A C panelen látható skála 10  $\mu$ m és a B, C és E-G panelekre alkalmazandó. A D panel skálája 10  $\mu$ m, és a D, I ill. K panelekre alkalmazandó. **F. és G.** A ghrelin kötődést mutató axonterminálisok (F, piros fluoreszcencia, a zöld nyílhegyek jelölt axonterminálisokra mutanak) gyakran NPY immunpozitivitást is mutattak (G, zöld fluoreszcencia, a piros nyílhegyek azokra az NPY-jelölt axonterminálisokra mutanak, amelyek az F panelen piros nyílhegyel voltak jelölve ghrelin pozitivitásuk miatt). H-J. A biotinylált ghrelin kötődése (H és I) teljesen megszűnik, ha nem jelölt ghrelinnel közösen inkubáljuk (J és K panelek). Az I és K paneleken a H és J panelek nagy nagyítású részletét láthatjuk.

#### A ghrelin elektrofiziológiailag mérhető hatása

A ghrelin hypothalamicus hatásmechanizmusának további megértéséhez *in vitro* elektrofiziológiai vizsgálatokat végeztünk egér és patkány hypothalamus szeleteken. Vizsgálatainkat elsősorban az NPY-ban gazdag ill. olyan hypothalamicus területekre koncentráltuk, ahol már jól ismertek a leptin, AGRP ill. az NPY erőteljes fiziológiai hatásai ill. szabályozó funkciói. Ilyen területek az ARC és a PVN (Powis et al., 1998; Ahima et al., 2000; Cowley et al., 2001). Egyes hypothalmus szeleteket zafír-zöld fluoreszcens fehérjét (saphire-green fluorescent protein, SFP) expresszáló transzgenikus egér agyából készítettük. Az általunk használt egértörzs a fluoreszkáló fehérjét kizárólag az NPY termelő sejtekben expresszálja (4.3.4A ábra).

A ghrelin 50 nM koncentrációban 4 percen belül 3.7-szeresére növelte az NPY sejtek aktivitását (4.3.4B ábra; n = 9); a megnövekedett aktivitás a kimosást követően viszatért eredeti szintjére. Ez a hatás azt valószínűsíti, hogy a ghrelin megnöveli az NPY és AGRP felszabadulást a nucleus arcuatus NPY/AGRP célneuronjainál.

Rendelkezésünkre állt olyan transzgenikus egértörzs is (POMC-GFP egér), amely a fent említett SFP-hez hasonló GFP-t, azaz green fluorscent protein-t kizárólag POMC termelő idegsejtekben expresszálta (4.3.4A ábra) (Cowley et al., 2001). Patchclamp elektrofiziológiai beállítást használva, vizuálisan azonosítani tudtunk POMC idegsejteket a nucleus arcuatus területén, és azt figyeltük meg, hogy 50-100 nM ghrelin hatására a POMC neuronokra érkező spontán gátló postsynapticus áramok (spontaneous inhibitory postsynapitc currents (IPSCs) frekvenciája megnövekedett, akár 300%-kal is (átlag 149% $\pm$ 14%, n = 18, P < 0.0006, 4.3.4C ábra). Ismert, hogy ezekért az áramokért az NPY tartalmú neuronok felelősek (Cowley et al., 2001) és a megfigyelt GABA felszabadulás időben korrelált a korábban tapasztalt NPY neuronok aktivitásnövekedésével (4.3.4B ábra). Természetesen a GABA POMC neuronokra gyakorolt hatásával párhuzamosan a POMC idegsejtek spontán aktivitása 65%±19%kal lecsökkent (4.3.4D ábra, n = 6) és egy kismértékű, de szignifikáns hyperpolarizációs hatás jelentkezett (4.3.4E ábra, 0.4-től 13 mV-os tartomány, átlag  $1.47\pm0.7$  mV, P < 0.03, n = 34), amely értelemszerűen ezen neuronok akciós-potenciál frekvenciájának csökkenésével járt.



**4.3.4. ábra. A ghrelin megnöveli az NPY sejtek spontán aktivitását és a gátló tónus növelésével gátolja a POMC sejtek aktivitását. A.** A nucleus arcuatus NPY és POMC sejtjei szelektív GFP immunraktivitást mutattak a két különböző transzgenikus egértözs hypothalamusában. **B.** 50 nM koncentrációban alkalmazott ghrelin megnöveli a ARC NPY sejtek spontán aktivitását. (n = 9). **C.** Ghrelin megnöveli a POMC sejtekre érkező spontán synapticus GABA felszabadulás frekvenciáját (18 kísérlet reprezentatív grafikonja). **D.** 50 vagy 100 nM ghrelin csökkenti a ARC POMC sejtek spontán aktivitását (n = 6). **E.** 100 nM ghrelin csökkenti a POMC sejtek spontán aktivitását és enyhe hyperpolarizációt okoz. 34 kísérlet reprezentatív grafikonja. **F.** Ha a POMC neuronokra érkező NPY és GABA hatást gátolt (BIBP 3026 és pikrotoxin alkalmazásával), akkor a ghrelin depolarizálja a POMC neuronokat. 4 kísérlet reprezentatív ábrázolása.

A GABA<sub>A</sub> receptorok (GABA<sub>A</sub>R) 100  $\mu$ M picrotoxinnal történő blokkolása nem változtatta meg a POMC neuronok ghrelin-kiváltotta hyperpolarizációját (1.9±1.4 mV hyperpolarizáció, n = 9, nem szignifikáns), ami azt valószínűsíti, hogy a ghrelin nem a GABA, hanem valamilyen egyéb faktor felszabadulását serkentette. Legvalószínűbb, hogy az NPY felszabadulás növekedett (Cowley et al., 2001), amely viszont képes a POMC neuronok hyperpolarizációjára. Ha GABA<sub>A</sub>R és a POMC

neuronokon előforduló NPY Y1 receptor altípust (Fuxe et al., 1997) együttesen blokkoltuk (NPY Y1 specifikus blokkoló segítségével – BIBP3226, 500 nM), a ghrelin-kiváltotta hyperpolarizáció eltűnt, ugyanakkor paradox módon a ghrelin POMC neuronokra gyakorolt depolarizációs hatása jelent meg. (4.3.4F ábra). Ez a hatás nagy valószínűséggel a ghrelin NPY/AGRP/GABA terminálisok AGRP szekrécióját serkentő hatásával hozható összefüggésbe (Horvath et al., 1997; Hahn et al., 1998), mivel az AGRP antagonizál a POMC neuronok auto-inhibítoros melanocortin-3-receptorain keresztül kiváltotta tónikus gátlásával (Fong et al., 1997; Cowley et al., 2001).

Megvizsgáltuk a ghrelin hatását a PVN neuronális aktivitására. Ezen a területen végződnek a nucleus arcuatus NPY és POMC tartalmú idegsejteinek axonjai. Konvencionális és perforált teljes-sejt patch-clamp vizsgálatok kimutatták, hogy a ghrelin a medialis PVN neuronok 73%-ánál a GABAerg bemenet aktivitását lecsökkentette (gátolta, 28%±15%, 4.3.5A ábra), míg a sejtek 27%-ánál nem váltott ki a ghrelin ilyen hatást. Korábban már bebizonyítottuk, hogy az NPY-nak igen hasonló hatása van ezekre a POMC neuronokra, amely elsősorban a presynapticus GABA felszabadulás eredménye, tehát nem a GABA-ra adott válasz megváltozása miatt történik (Cowley et al., 1999). Ezt a ghrelin kiváltotta választ ebben az esetben nem követte szignifikáns változás a membrán áram-feszültség viszonyában, ami a ghrelin presynapticus hatásmechanizmusával magyarázható. Mivel azonban a ghrelin kolokalizál a PVN NPY immunreaktiv terminálisaival, megvizsgáltuk, hogy ez a hatás esetleg az NPY-ra gyakorolt serkentésnek köszönhető-e. A 4.3.5A ábra ghrelinkiváltotta választ adó neuronját ezért NPY Y1 és Y5 antagonistával előinkubáltuk (BIBO 3304, 500 nM, Novartis 2, 500 nM), és a ghrelin hatás csökkenését vagy teljes eltűnését figyeltük meg (4.3.5B ábra). 11-ből 5 neuron esetében ez a NPY receptor gátló 'koktél' csökkentette a ghrelin-re adott választ 59% ± 12%-al (n = 5, P < 0.0005), 4.3.5C ábra).



**4.3.5.** ábra. Ghrelin hatása a hypothalamus nucleus periventricularis medialis parvocellularis (mpPVN) neuronjaira. A. 30 Nm ghrelin IPSC-re gyakorolt hatása egy mpPVN neuron esetében. 2 grafikon egymásra vetítve látható, kontroll és ghrelin jelenlétében rögzítve. Insert: a teljes (ghrelin-kontroll) voltage ramp (-110 mV-tól -40 mV-ig) kiváltotta steady-state membrán áram válasz. B. Az (A) panelen bemutatott neuron ghrelin kiváltotta IPSC válasza Y<sub>1</sub> és Y<sub>5</sub> anatagonista jelenlétében. C. NPY antagonisták jelenlétében a ghrelin válasz gyengül az mpPVN neuronokban. D. Ghrelin IPSC-re gyakorolt hatása a PVN neuronok esetében. E. NPY IPSC-re gyakorolt hatása a (D) panelen bemutatott neuron esetében. F. A ghrelin (fekete pontok, 30-100 nM) és NPY (fekete háromszögek, 100-300 nM) IPSC-re gyakorolt időbeni hatása PVN neuronok esetében.

NPY adagolása minden esetben meggátolta a PVN ghrelin szenzitív neuronjainak IPSC-jét. A 4.3.5D ábrán látható a PVN neuronok válasza ghrelin adagolásra, míg a 4.3.5E ábra mutatja az NPY kiváltotta választ ugyanebben a

neuronpopulációban. A ghrelin-szenzitív neuronok ghrelinre (30-100 nM, n = 16) és NPY-ra (100-300 nM) adott válaszának nagyságát és időbeni lefutását a 4.3.5F ábra mutatja be. Megfigyelhető, hogy a ghrelin és az NPY ugyanazon PVN neuronok ugyanazon bemeneteire fejti ki hatását, hasonló módon.



В



**4.3.6. ábra. PVN neuronok perforált-patch felvétel és elektroporációt követő háromszoros immunhisztokémiai jelölése. A.** CRH-pozitív (zöld szín), de TRH negatív (piros szín) neuron, amely az elektrofiziológiás vizsgálat után biocytinnel lett töltve (kék szín). A jobb alsó képen mindhárom marker együttlátható. Skála: 10 µm. **B.** 100 nM ghrelin CRH neuronok IPSC-re gyakorolt gátló hatásának bemutatása

A PVN ghrelin-szenzitív neuronjainak neuropeptid-fenotípusának meghatározásához a perforált patch-clamp kísérletek végén biocytinnel töltöttük fel ezeket a sejteket (n = 20) és CRH ill. TRH (thyreotrop-serkentő hormon, thyrotropin – releasing hormon) tartalmukat vizsgáltuk immuncytokémiai módszerekkel. A húszból nyolc neuron CRH immunpozitív volt, ebből a nyolcból hét mutatott csökkent IPSC-t ghrelin hatására (4.3.6A és 4.3.6B ábrák). A húszból mindössze kettő neuron expresszált TRH-t, és ezek közül egyik sem volt ghrelin-szenzitív (30-10 nM).

#### Megbeszélés

#### A ghrelin neuronok anatómiája

Az általunk megfigyelt ghrelin-immunreaktív neuronok egy folyamatos sáv mentén helyezkedtek el a lateralis hypothalamus (LaH), a nucleus arcuatus (ARC), a ventromedialis hypothalamus (VMH), a dorsomedialis hypothalmus (DMH) és a nucleus paraventricularis hypothalami (PVN) területén. A ghrelin-tartalmú neuronok ilyen elolszlása különbözik a korábban megfigyelt anatómiai leírástól (Kojima et al., 1999) és egy új, ghrelin tartalmú sejtcsoportra hívja föl a figyelmet. Ez a különleges megoszlás nem esik egybe egyik ismert, hypothalamicus energia-háztartást szabályozó neuronpopuláció megoszlásával sem (ilyen rendszerek pl. az NPY, AGRP, POMC, MCH, orexin, dopamin és somatostatin) (Brownstein et al., 1975; Chronwall et al., 1985; Zamir et al., 1986; De Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998; Haskell-Luevano et al., 1999). Feltételezhető ezért ezen új, ghrelin-t expresszáló sejt-hálózat felfedezése alapján, hogy a ghrelin igen fontos szerepet játszik a központi idegrendszerben mint endogén faktor, a már ismert perifériás hormon-hatásán túl (Kojima et al., 1999).

Az elektronmikorszkópos vizsgálatok alapján egyértelművé vált, hogy a ghrelin jelen van hypothalamicus neuronokban, valamint, hogy ghrelin tartalmú axonterminálisok olyan hypothalamicus peptiderg rendszerekkel állnak kapcsolatban, amelyek az anyagcsere szabályozásában alapvető játszanak (mint pl. az AGRP ill. POMC termelő idegsejtek a nucleus arcuatusban, vagy a CRH ill. TRH termelő neuronok a nucleus paraventricularisban). Ezen eredményeink anatómiai bizonyítékot szolgáltatnak a ghrelin pre- és postsynapticus NPY/AGRP/POMC ill CRH rendszerekhez való szoros kapcsoltságára. Ezek a peptiderg rendszerek kulcsszerepet

játszanak a központi idegrendszeri energia-háztartás szabályozásában (Kalra et al., 1999). A ghrelin-tartalmú axonterminálisok jelenléte az anyagcsere-szabályozásban alapvető befolyással bíró hypothalamicus területeken (pl. arcuatus és paraventricularis magok) egyértelműen arra utal, hogy a hypothalamusban termelődő ghrelin befolyásolni tudja ill. modulálhatja az energiaháztartás szabályozásában résztvevő neuronpopulációkat. A ghrelin és az NPY rendszer közötti egyértelmű anatómia kapcsolat mindenképpen megerősíti a ghrelin szerepét a táplálékfelvétel idegrendszeri neuronköreinek szabályozásában (pl. az orexigén hatás szabályozásában).

Érdekes, hogy ghrelin immunjelölés nem csak a hypothalamus területén, hanem extrahypothalamicus területen is megfigyelhető, például a neocortex területén. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a perifériásan keringő ghrelin valamilyen módon átjuthat a vér-agy gáton, és eléri ezeket a corticalis területeket, vagy az is lehetséges, hogy a GHS (growth hormone secretagouge) receptornak más endogén ligandja is létezik, illetve az sem kizárható, hogy a ghrelin a már jól ismert GHS receptoron kívül más receptorhoz is képes kötődni.

#### A ghrelin élettani hatása

A ghrelin-tartalmú boutonok és a hypothalamicus neuronok terminálisai között megfigyelt szoros és kiterjedt appozíció már az anatómiai vizsgálatok során is a ghrelin presynapticus hatására utalt. Mind a kötődési adatok, mind a ghrelin lokalizációja azt sugallta, hogy a ghrelin a hypothalamicus neurotranszmisszió modulációján keresztül fejtheti ki hatását. A ghrelin NPY és AGRP rendszerekhez való kapcsoltsága, amely a táplálékfelvétel szabályozásában is résztvesz (Kamegai et al., 2001; Nakazato et al., 2001; Shintani et al., 2001; Tschop et al., 2002), valamint az a tény, hogy perifériás ghrelin adagolás esetén a *c-fos* expresszálódik az NPY neuronokban (Wang et al., 2002) azt erősíti, hogy a ghrelin hatását az NPY tartalmú idegsejteken fejti ki, ami nagyrészt egybeesik azzal a rendszerrel, amelyen a leptin képes hatását kifejteni (Spanswick et al., 1997). Valóban megfigyeltük kísérleteink során, hogy a ghrelin depolarizációt indukált a nucleus arcuatus NPY neuronjain. A megnövekedett NPY aktivitás következményeit tovább gondolva, a ghrelin POMC-expresszáló neuronokra kifejtett hatását is megvizsgáltuk a nucleus arcuatusban. Elektrofiziológiai megfigyelésünk azt mutatta, hogy a ghrelin hyperpolarizálja ezeket a

POMC idegsejteket az arcuatus magban, amely hatás valószínűleg GABAerg NPY/AGRP neuronokhoz köthető. Ez összhangban áll számos korábbi kutatási eredménnyel, amelyek szerint a ghrelin ill. a GHS-R indukálta korai-gén expresszió elsősorban NPY/AGRP neuronokban figyelhető meg, és nem a POMC tartalmú idegsejtekre jellemző (Dickson and Luckman, 1997; Hewson and Dickson, 2000; Wang et al., 2002).

A POMC neuronokra gyakorolt visszafogott gátló hatása azonban nem valószínű, hogy elegendő a ghrelin igen hatékony orexigén hatásának kiváltásához (Tschop et al., 2000; Kamegai et al., 2001; Nakazato et al., 2001; Wren et al., 2001; Tschop et al., 2002). Ezért részletesebben vizsgáltuk az AGRP/NPY rendszer egy korábban már karakterizált célterületét, a medialis parvocellularis PVN-t (mpPVN), amely a táplálékfelvétel egyik központi szabályozóterülete (Cowley et al., 1999; Pronchuk et al., 2002). Ez a terület a hypothalamicus ghrelin efferensek célterülete, de az itt található vér-agy gát miatt a perifériásan keringő ghrelin nem fér a neuronokhoz, így a perifériás ghrelin hatástól el lehet tekinteni (Banks et al., 2002).

A PVN, CRH és TRH tartalmú sejtjeinek ghrelinre adott egyértelműen különböző válasza megfelel a már ismert ghrelin kiváltotta, szintén eltérő hypothalamus-hypophysis-mellékvese és hypothalamus-hypophysis-pajzsmirigy tengelyeken megfigyelt szintén eltérő hatásnak (Arvat et al., 2000; Wren et al., 2000). Az általunk megfigyelt mpPVN neuronok fele nem mutatott kolokalizációt sem a CRH sem a TRH peptidekkel, és a megfigyelt neuronok közül kilenc mutatott ghrelinkiváltotta IPSC amplitudó csökkenést ill. gátlást. Figyelembe kell azonban venni, hogy a CRH és a TRH immunfestés a parvocelluláris seittestekben kolchicin kezelés hatására megnövekszik, azonban esetünkben ezt nem tudtuk alkalmazni, mert ez a kezelés megzavarta volna az elektrofiziológiai méréseket. Ezért a parvocelluláris neuronok további karakterizálása elengedhetelen ahhoz, hogy a ghrelin pontos hatását megértsük ezen az agyterületen. Mindenesetre a táplálkozásra kifejtett hatásán kívül feltételezhető, hogy a ghrelin megnöveli az NPY felszabadulását a CRH neuronokon terminálisokon, dizinhibíciós végződő GABAerg hatást gyakorolva ezen terminálisokra, amely stimulálja a CRH felszabadulást a portális kapillárishálózatba, végül megnövekedett ACTH szekréciót vált ki a hypophysis megfelelő sejtpopulációjából (Arvat et al., 2001).

60

#### A ghrelin működés központi idegrendszeri modellje

A felvázolt anatómiai és fiziológiai eredmények alapján létrehoztuk a ghrelin energia-háztartás szabályozásában betöltött szerepét bemutató modellt. Munkánk egy új, eddig nem ismert ghrelin expresszáló hypothalamicus sejtpopulációt írt le. Ez a terület egybeesik a hypothalamus internuclearis területével, pont ahová a nucleus suprachiasmaticusból (Watts et al., 1987; Horvath, 1997) ill. a ventralis lateralis thalamus területéről érkezik projekció (Horvath, 1998).



**4.3.7 ábra. A ghrelin és egyéb hypothalamicus neuronkörök kapcsolatának sematikus ábrázolása.** A ghrelin aktivitás hypothalamicus modellje. A hypothalamicus ghrelin tartalmú axonok az NPY tartalmú terminálisokat presynapticusan érik el a ARC és a PVN területén. A ghrelin GHS receptorokhoz kötődik és ezeken keresztül fejti ki hatását, amely által az NPY axonterminálisok aktivitása megnő. A ghrelin a GABA felszabadulását is serkenti, és nagy valószínűséggel az NPY és AGRP felszabadulást is megnöveli. Ez a megnövekedett GABA és neuropeptid felszabadulás szabályozza a POMC és CRH neuronok postsynapticus aktivitását. A véráramból ide jutó ghrelin is a GHS receptorokon keresztül fejti ki hatását, de nem valószínű, hogy ilyen módon fizikailag hozzáfér a PVN területén található GHS-receptorokhoz.

Mivel a cirkadián és napi ritmusért elsősorban a nucleus suprachiasmaticus felel közösen a thalamus ventralis lateralis területével, megalapozott azt feltételezni, hogy az általunk leírt központi ghrelin neuronhálózat felelős a cirkadián ill. vizuális

információk táplálékfelvételt szabályozó célneuronokhoz való eljuttatásáért, amely egybevág a ghrelin táplálkozást/táplálkozási viselkedést aktiváló hatásával is (Cummings et al., 2001).

A hypothalamicus ghrelin neuronok efferens terminálisai megfelelő és hatékony kapcsolatot hoznak létre ahhoz, hogy megváltoztassák ill. modulálják a GABAerg NPY tartalmú terminálisok működését (4.3.7 ábra) Bemutattuk, hogy a stimulálja NPY/AGRP neuronok ghrelin az aktivitását, elsősorban az axonterminálisokra kifejtett hatásán keresztül. Ez a megnövekedett aktivitás nagy valószínűséggel megnöveli az NPY/AGRP neuronokból a neuropeptidek és neurotranszmitterek felszabadulását. Erről a folyamatról viszont igen régóta ismert, integráló szerepet tölt be a táplálékfelvétel beindításában és hogy az energiafelhasználás csökkentésében. Ezért elmondhatjuk, hogy az általunk leírt hypothalamicus ghrelin neuronhálózat kutatása valószínűleg kulcsszerepet játszik majd mind a humán medicinában az elhízás elleni harcban, mind pedig az állati takarmányozás területén.

# 4.4 A nucleus arcuatus melanocortin rendszerének celluláris szerkezete és szerepe a szaporodás és a táplálkozás idegrendszeri szabályozásában

#### Eredmények

#### A melanocortin és a GnRH rendszer anatómiai viszonya

Korábbi megfigyeléseknek megfelelően a nucleus arcuatus területén számos GnRH-immunjelölt profil volt látható. Elektronmikroszkópos vizsgálataink szerint a GnRH rostok gliális elemekkel alakítottak ki kapcsolatot, amelyek nagy valószínűséggel tanycyták, amelyek célprofiljuk felé, az eminentia medialis portális capillárisai felé haladtak (4.4.1. ábra).



**4.4.1. ábra. GnRH rostok elektronmikroszkópos képe a nucleus arcuatusban. (a.)** A GnRH rostok túlnyomó többsége áthalad a ARC területén az eminentia mediana irányába. A rostokat tanycyták (T) veszik körül. Esetenként azonban a rostok felszínén a tanycyta borítás folytonossága megszakad, synapticus vesiculák jelennek meg a GnRH rostokban, amint neuronális profilokkal, pl. dendrittekkel (b) vagy dendrittüskékkel (c) érintkeznek. Skála: 1 μm

Kettős-jelölt fénymikroszkópos anyagon számos esetben figyeltük meg, hogy a POMC jelölt sejttestek közvetlen kapcsolatban voltak GnRH-immunjelölt boutonokkal (4.4.2. ábra). Az 5 állatban megvizsgált 100 bouton közül 25 POMC immunreaktív sejttest és/vagy proximális dendrit alakított ki közvetlen kapcsolatot GnRH- pozitív axonnal. Korrelált elektronmikroszkópos vizsgálataink alátámasztották, hogy ezek direkt, fizikai kapcsolatok GnRH axonterminálisok és a POMC tartalmú sejttestek között (4.4.2. ábra). Ugyanakkor egyik elektronmikroszkópban megvizsgált kapcsolat sem bizonyult klasszikus synapticus membránspecializációnak.



**4.4.2. ábra. GnRH tartalmú axonok POMC expresszáló sejtek közelében. a-c.** Kettős immunjelölés használatával GnRH tartalmú boutonokat (fekete nyilak) figyeltünk meg a nucleus arcuatus POMC neuronjainak (barna neuronális profilok) közelében. Skála 10 µm. **d-e.** Elektronmikroszkóppal megvizsgálva ezeket a kapcsolatokat azt tapasztaltuk, hogy a GnRH axon-profilok (fekete nyíl) közvetlen appozícióban voltak a POMC neuronok perykarionjának membránjával, közöttük nem volt megfigyelhető gliális elem. Skála: 1 µm.

#### Ösztrogén-kezelés hatása a melanocortin rendszer parvalbumin expressziójára

A kontroll (nem ösztrogén- kezelt) patkányok ARC neuronjainak parvalbumintartalmát vizsgálva azt találtuk, hogy hogy csak kevés idegsejt expresszálja ezt a kalcium-kötő fehérjét (4.4.3A,B ábra). Ösztrogén-kezelés hatására azonban a parvalbumint expresszáló sejtek száma drámaian megemelkedett (4.4.3A,C ábra). Kontroll állatokban 143±12 parvalbumin immunpozitív sejtet találtunk/ARC (n = 5), míg ösztrogén kezelt állatokban ez 1235±128-ra növekedett. A jelölt sejtek kisméretű bipoláris morfológiával rendelkeztek, amely az interneuronok jellegzetes morfológiája.

```
dc_25_10
```



**4.4.3. ábra A-D.** Ösztrogén kezelés hatására (amely megnövelte a POMC sejtek glutamáterg, serkentő bemeneteinek számát) megemelkedett a nucleus arcuatus (ARC) parvalbuminimmunreaktivitást (Parv-ir) mutató sejtek száma (A,B kontroll, CD ösztrogén kezelés). Skála A, C: 100 μm, B, D: 10 μm.

Ismert, hogy az ösztradiol megnöveli az arcuatus magban a POMC neuronok serkentő bemeneteinek számát még a GluR-2 receptoraltípus hiányában is (Gao et al., 2007). Mivel a GluR-2–es altípus kalcium influxot indukál amely megnövekedett parvalbumin expresszióval jár (Naftolin et al., 1996), megvizsgáltuk, hogy vajon az ösztrogén megnöveli-e az arcuatus mag POMC neuronjainak parvalbumin expresszióját. Azt találtuk, hogy mindegyik parvalbumin expressziót mutató neuron egyben POMC tartalmú is volt (4.4.4.A,B ábra).



**4.4.4. ábra. A, B Kettős immunfluoreszcens jelölés a nucleus arcuatusban.** A parvalbumintartalmú (Parv-ir) sejtek melanocortint (POMC-ir) is expresszálnak. A nyilak kettős jelölt sejtekre mutatnak.

#### Megbeszélés

#### GnRH immunreaktivitás a nucleusban

A leptinhez hasonlóan, a gonadális szteroid hormon, az ösztrogén is képes hypothalamicus szabályozófunkcióján keresztül - a táplálékbevitelt és a testzsír mennyiségét csökkenteni, ezzel párhuzamosan megnövelni az energiafelhasználást, mind állatokban, mind pedig emberben, nemtől függetlenül (Butera and Czaja, 1984; Dubuc, 1985; Palmer and Gray, 1986; Gao and Horvath, 2007). Természetesen a szaporodásra is alapvető hatása van az ösztrogénnek, de ezt a hatását nem csak mint periférásan keringő hormon, hanem a központi idegrendszeri szabályozást befolyásolva is kifejti. Az ösztrogén szaporodásra kifejtett központi hatása közvetlenül a ciklust szabályozó hormontermeléshez köthető. Valójában az ösztrogén hypothalamicus GnRH neuron-hálózatára kifejtett hatása szükséges ahhoz, hogy megtörténjen a GnRH szakaszos felszabadulása, amely végül is a LH jó ismert pulzáló felszabadulási mintáját eredményezi (Herbison, 1998). A leptin fertilitásra kifejtett jótékony hatása is csak a GnRH rendszer fényében kap értelmet: képes visszaállítani a GnRH és a LH normális szekréciós mintázatát, amely ezáltal visszafordítja a hypothalamicus hypogonadismus tüneteit. Felnőtt nőstényekben a perifériásan cirkuláló ösztrogént elsősorban a petefészek termeli. Bizonyos enzimek, pl. a cytokróm P450 aromatáz (P450aro) képes lokálisan tesztoszteronból vagy androgénekből ösztrogént előállítani. A P450aro mennyisége a hím agyban valamivel magasabb, mint a nőstényekében (Roselli et al., 1984; MacLusky et al., 1985; Lephart, 1996b). Aromatáz-deficienciában szenvedő egerek mindkét neme zsírfelesleget halmoz fel (Jones et al., 2000), és a hím egyedekben nemzőképtelenséget eredményez (Honda et al., 1998; Robertson et al., 1999). Emberek esetében mindkét nemnél hypothalamicus hypogonadismussal és infertilitással hozzák összefüggésbe az aromatáz deficienciát (Simpson, 1998; Bulun, 2000), amelyből arra lehet következtetni, hogy a lokális ösztrogén szintézis nemcsak a homeostasis fenntartásában, hanem a reprodukcióban is fontos szerepet játszik. Ennek megfelelően a P450aro nagy mennyiségben és szelektíven expresszálódik az anyagcserében (ventromedialis hypothalamus) és a reprodukciós szabályozásban (area preoptica) fontos szerepet játszó agyterületeken (Naftolin et al., 2001).

66

Egyértelmű tehát, hogy mind a gonadális input, mind pedig az anyagcsere aktuális állapota (amelyért nagyrészt a leptin felelős) erőteljes hatást gyakorol a GnRH neuronok aktivitására, és ezáltal a gonadális tengely megfelelő működésére. Ugyanakkor nem ismert, hogy ezek a GnRH neuronok vajon kapcsolatban állnak-e azokkal a melanocortin tartalmú neuronokkal, amelyek kulcsfontosságúak az enegiaháztartás szabályozásában. Eredményeink egyértelműen kimutatták, hogy a nucleus arcuatus területén található GnRH tartalmú efferensek közvetlen kapcsolatban vannak a POMC expresszáló sejttestekkel. Ugyan nem láttunk klasszikus, synapticus membránspecializációt a két rendszer között, de a közvetlen fizikai kapcsolat morfológiailag megalapozza, hogy a GnRH axonok befolyásolják tudják a POMC sejtek elektromos tulajdonságait. Természetesen további kutatásoknak kell megbizonyosodni arról, hogy ezek a kapcsolatok serkentő vagy gátló hatást közvetítenek-e a POMC sejteknek, valamint, hogy ez az újszerű kapcsolat milyen hatással van a melanocortin rendszer szabályozó funkcióira.

#### A parvalbumin expresszió változása ösztrogén-hatásra

Kísérleteink során azt is megfigyeltük, hogy ösztrogén hatására megnövekszik a POMC sejtek parvalbumin expressziója. Ismert az ösztrogén táplálékbevitelt és elzsírosodást csökkentő hatása is (Gao et al., 2007). Ennek megfelelően feltételezhető, hogy a magasabb ösztrogén szint megnöveli a POMC sejtekbe irányuló kalcium influxot, ami nagy valószínűséggel a POMC sejtek aktívabb tüzelését és a fent leírt szisztémás hatásokat eredményezi (Gao et al., 2007).

Az ösztradiol hypothalamicus plaszticitást befolyásoló hatását már régóta ismerjük (Naftolin et al., 1996; Gao et al., 2007). A nucleus arcuatusban az ösztradiol szignifikánsan csökkenti a synapticus denzitások méretét (feltehetően GABAerg afferensek érintettek) és a glutamát receptorok számának emelésén keresztül növeli a serkentő neurotranszmissziót (Diano et al., 1997). Éppen a POMC sejtek esetében figyelték meg, hogy az ösztradiol növeli a serkentő synapticus bemenetek számát a sejttestjeiken és a POMC tónust, amely végül csökkenő táplálékbevitelben, valamint testzsír- és súlycsökkenésben realizálódik (Gao et al., 2007). Feltételezhető, hogy a hypothalamicus táplálkozás-szabályozó neuronkörök az energiaháztartás egyik alapvető és nem elhanyagolható részét képezik (Horvath and Diano, 2004; Gao and

Horvath, 2007). A leptin és ösztrogén receptorok hypothalamicus kolokalizációja felveti annak lehetőségét, hogy az ösztradiol, a leptinhez hasonlóan, közvetlenül a melanocortin sejteken hat és ugyanazokat a synapticus plaszticitásért felelős géneket aktiválja, mint a leptin.

Mind az alpha, mind a beta- típusú ösztrogén receptor szerepet játszhat az ösztrogén elhízás-ellenes hatásában (Geary et al., 2001; Liang et al., 2002; Roesch, 2006). Az ösztrogén képes szabályozni a BDNF és a postsynapticus denzitás-95 (PSD-95) fehérjéinek mennyiségét az agyban (Scharfman and MacLusky, 2008; Waters et al., 2009). Mindkét faktor kulcsszerepet játszik a synapsysok kialakításában és működésében ill. a serkentő és gátló kapcsolatok közötti egynsúly létrehozásában. Ismert, hogy az ún. Stat3 transzkripciós faktor, amely a leptin-szignalizáció egyik célpontja, a leptintől, ill. leptin receptoroktól függetlenül is aktiválódik POMC neuronokban (Gao et al., 2007). Valószínű tehát, hogy a klasszikus, nukleáris ösztrogén receptorokon keresztüli szignalizáció kapcsolódik a membránhoz-kötött receptorokon folyó jelátvitelhez (Toran-Allerand et al., 2002) és ez a kettő együttesen változtatja meg a POMC sejtek bemeneti organizációját, tüzelési mintázatát ill. aktivitását. Az ösztrogén POMC neuronokban parvalbumin expressziót fokozó hatása valószínűleg a megnövekedett AMPA-receptor mediálta glutamáterg aktiváció indirekt, valamint a megnövekedett kalcium influx közvetlen következménye lehet. Elképzelhető, hogy a melanocortin sejtek ilyen módon védekeznek a megnövekedett kalcium-influx sejthalált indukáló hatása ellen, tehát a parvalbumin termelés egy protektív mechanizmus a POMC sejtekben.

Az ösztrogén parvalbumin expressziót serkentő hatása rövidtávon ésszerű mechanizmusnak tűnik, hiszen így a POMC sejteket úgy lehet kalcium-influx függő módon gyorsabb tüzelésre bírni, hogy közben nem károsodnak. Azonban, ha ez a kalcium beáramlás krónikus méreteket ölt, a POMC sejtek nem képesek fenntartani a megnövekedett aktivitást és apoptotikus sejtpusztulási folyamatok beindulása várható. Ismert, hogy magas ösztrogén-dózisok hatására a hypothalamus POMC sejtjei szelektíven elpusztulnak (Desjardins et al., 1993). Az még tisztázásra vár, hogy csak az ösztrogén képes ilyen hatást kiváltani a POMC sejtekben, vagy más, ezen sejtek aktivitását növelni képes egyéb faktor is hasonló eredményre vezet. Ennek a folyamatnak a tisztázása döntő fontosságú lehet a különböző táplálkozással,

természetes öregedéssel, elhízással kapcsolatos kórképek kóroktanának megértéséhez, és hozzájárulhat ahhoz, hogy olyan gyógyszereket tudjunk kifejleszteni amely a POMC sejtek tónusát effektíven tudják befolyásolni.

## 4.5 A hypothalamus plasztikus szabályozóműködésének szerepe az elhízásban

#### Eredmények

DIO patkányok több zsírt halmoznak fel magas kalóriatartalmú táplálék fogyasztása esetén, de nem különböznek a DR patkányoktól standard energiabevitel esetén

A DIO és DR patkányok testtömege nem különbözött a kísérletek kezdetén (4.5.1. ábra) és nem volt testsúly-különbség a kísérletek végén sem, abban az esetben, ha standard táplálékot fogyasztottak az állatok (4.5.1. ábra). Ez arra utal, hogy a két állat-törzs közötti anyagcsere és elzsírosodási különbség csak magas kalóriatartalmú vagy magas zsírtartalmú táplálék fogyasztása esetén jelenik meg. Standard táplálkozás (SD) esetén az MRI-vel végzett testtömeg-összetétel vizsgálatok nem mutattak a DIO és DR patkányok között eltérést (4.5.1B ábra). Azonban korábbi tanulmányokkal egybehangzóan, a DIO patkányok szignifikánsan nagyobb testsúllyal (4.5.1A ábra) és több testzsírral (4.5.1B ábra) rendelkeztek DR patkányokhoz képest a 12 hétig tartó magas kalóriatartalmú táplálék fogyasztásakor. Ennek megfelelően a plasma inzulin és leptin szintje emelkedett volt és a keringésben mérhető ghrelin szintje csökkent az elzsírosodás növekedésével párhuzamosan (4.5.1C-E ábra). Érdekes, hogy hyperinsulinaemia csak a DIO patkányokban alakult ki, jóllehet mind a DIO, mind a DR patkányok emelkedett plasma leptin szinttel rendelkeztek magas kalóriatartalmú táplálék hatására (4.5.1C,D ábra). A plasma leptin-szintjének emelkedése azonban a DIO patkányokban sokkal intenzívebb volt (4.5.1D ábra) illetve standard táplálék és hasonló testsúly esetén a DIO patkányokban a ghrelin szintje alacsonyabb volt (4.5.1F. ábra).

#### A POMC sejtek synapticus bemeneti szerveződése DIO és DR patkányokban

Standard táplálékbevitel estén, illetve amikor még a testsúly és az anyagcsereprofil a két patkánytörzs között hasonló volt, a DIO patányok POMC neuronjai több synapticus kapcsolattal rendelkeztek, mint a DR patkányok ugyanezen sejtjei (4.5.2A ábra, P < 0.05). A DR patkányok POMC sejttestjein az aszimmetrikus (4.5.2B ábra) és szimmetrikus (4.5.2C ábra) synapticus kapcsolatok száma nem

különbözött (4.5.2A ábra), azonban DIO patkány POMC sejttestjein szignifikánsan több szimmetrikus, gátló synapticus kapcsolatot találtunk, mint serkentő, asszimetrikusat (4.5.2A ábra, P < 0.05).



**4.5.1. ábra. DR és DIO patkányok metabolikus fenotípusát bemutató ábrák standard (SD) és magas zsírtartalmú (HFD) táplálás során. A.** DR és DIO patkányok testsúly növekedése SD és HFD táplálás során. **B.** DR és DIO patkányok testzsír mennyisége SD ill. HFD táplálás során (a: P < 0.05). **C.** DR és DIO patkányok inzulin szintjének változás SD és HFD táplálást követően. (a: P < 0.05). **D.** DR és DIO patkányok leptin szintjének változás SD és HFD táplálást követően. (a: P < 0.05). E. DR és DIO patkányok teljes ghrelin szintjének változás SD és HFD táplálást követően. (a: P < 0.05). E. DR és DIO patkányok teljes ghrelin szintjének változás SD és HFD táplálást követően. (a: P < 0.05). Minden panelen az átlag ± standard hiba (SE) került feltüntetésre.

dc\_25\_10



2. ábra. POMC sejtek synapticus bemeneti szerveződése DR és DIO patkányok esetében. A. Az oszlopdiagramm standard táplálás (SD) során mutatja a POMC sejtek perikarvonjára érkező szimmetrikus és aszimmetrikus synapticus bemenetek számát DR és DIO patkányok esetében. a,b: P < 0.05. B,C. SD táplált DR és DIO patkányokból származó reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek a POMC sejtekkel synaptyzáló aszimmetrikus, feltehetően serkentő (+, B) és szimmetrikus, feltehetően gátló (-, C) synapsysokról. D. Az oszlopdiagramm magas zsírtartalmú táplálás (HF) során mutatja a POMC sejtek perikaryonjára érkező szimmetrikus és aszimmetrikus synapticus bemenetek számát DR és DIO patkányok esetében. E, F. HFD táplált DR (E) és DIO (F) patkányok POMC sejtjeiről készült reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek. Az E ábrán (DR HFD patkány) esetében axonterminálisokat (A), míg az F ábrán (DIO HFD patkány) esetében zölddel kiemelve gliális borítást figyelhetünk meg a POMC sejtek felszínén. G. Az oszlopdiagramm a POMC sejtek perikaryonjára érkező összes synapticus bemenetek számát mutatja DR és DIO patkányok esetében SD és HFD táplálás során. (a: P < 0.05 DR HFD vs. DR SD; b: P < 0.05 DIO SD vs. DR SD; c: P < 0.05 DIO HFD vs. DIO SD). H. Az oszlopdiagramm a POMC sejtek perikaryonjának gliális takarását mutatja DR és DIO állatok SD ill. HFD táplálása során. a: P < 0.05.

Három hónapos magas zsírtartalmú táplálék (HFD) bevitelt követően a hypothalamicus ARC POMC neuronjainak synapticus kapcsolatai mindkét patkánytörzsben megváltoztak: a DR patkányok esetében megnövekedett a teljes synapsys-szám a standard, kiindulási állapothoz viszonyítva (4.5.2D ábra, P < 0.05).
HFD bevitel során a DIO patkányokban azonban ezzel ellentétes, synapsys-szám csökkenést tapasztaltunk (4.5.2D ábra, P < 0.05). A serkentő (tehát aszimmetrikus) synapticus kapcsolatok száma egyik kísérleti felállásban sem mutatott szignifikáns eltérést (DIO standard táplálékon, DIO HFD táplálékon, DR standard táplálékon, DR HFD táplálékon). Standard táplálékbevitel esetén a DIO patkányok jóllakottságérzés kiváltásáért felelős POMC sejttestjein több gátló synapticus kapcsolat volt, mint a DR patkányok POMC sejtjein, természetesen hasonló táplálkozás esetén (4.5.2A ábra, P < 0.05). Megjegyzendő, hogy ez a különbség eltűnt három hónapos HFD táplálás esetén: a DR patkányok POMC perikaryonjain a gátló synapticus kontaktusok, míg a DIO patkányok POMC sejttestjein a serkentő synapsysok domináltak (4.5.2D ábra, P < 0.05). A POMC neuronok ezen fordított synapticus bemeneti szerveződését paradox módon a DIO patkányok DR állatokéhoz viszonyított magasabb testsúlya kísérte (4.5.1A ábra). Az NPY és AGRP sejttestek jelenléte patkányban sajnos nem mutatható ki megbízhatóan, mivel az antitestek többsége csak az axonokban jelen lévő neuropeptidet jelöli meg. A POMC neuronok felszínén található teljes synapsys-szám a DR állatokban emelkedett volt (4.5.2G ábra, P < 0.05), míg a DIO patkányokban csökkent (4.5.2G ábra, P < 0.05).

#### Asztroglia a DIO és DR patkányokban

A HFD-n tartott DIO patkányok esetében, a POMC sejtek sejttestjein alacsonyabb synapsys-számot regisztráltunk, ugyanakkor a sejtek felszínén a gliaborítottság megnövekedett (4.5.2F ábra). DIO patkányok melanocortin sejtjeinek felszínén szignifikánsan több asztrocyta-végtalp fordult elő, mint a DR állatok neuronjainak felszínén (4.5.2H ábra,  $39.46\pm5.67\mu$ m /100 $\mu$ m vs.  $22.84\pm2.74\mu$ m/100 $\mu$ m; P < 0.001).

## A melanocortin rendszer synapticus bemeneteinek vizsgálata egerekben standard és magas kalóriatrtalmú táplálkozás esetén

A továbbiakban GFP-NPY és GFP-POMC expresszáló egértörzseken (C57BI6; (Pinto et al., 2004) vizsgáltuk meg az NPY/AGRP és POMC sejtek bemeneti synapticus szerkezetét különböző kalóriatartalmú táplálási kondíciókat alkalmazva. Ezen egerek anyagcsere-paramétereit már korábban leírták, itt csak röviden

ismertetjük (Enriori et al., 2007): 20 hét *ad libitum* HFD táplálékfogyasztást követően az állatok elhíztak, hyperleptinémiásak lettek ill. leptin- és inzulinrezisztencia alakult ki bennük (Enriori et al., 2007). Ugyanakkor 20 hetes SD táplálás esetén nem alakultak ki elhízási tünetek és mind leptinre, mind pedig inzulinra nézve érzékenyek maradtak (Enriori et al., 2007). Megfigyeltük azonban, hogy HFD táplálást követően mind a POMC- mind pedig az NPY-expresszáló neuronok felszínére érkező synapsys-szám lecsökkent (P < 0.05 vs. SD; 4.5.3A,B ábra), azonban eltérést tapasztaltunk a két rendszer változásai között: míg a synapsys-szám csökkenés a POMC sejtek esetén a szimmetrikus, gátló kontaktusokat érintette elsősorban (4.5.3A ábra), addig az NPY sejtek esetében az aszimmetrikus, serkentő bemenetek száma csökkent (4.5.3B ábra). Tehát, a HFD táplálít egerek POMC neuronjainak synapticus átrendeződése a DIO patkányoknál megfigyeltekhez hasonlított, ami arra utal, hogy a magas zsírtartalmú táplálékbevitel a gátló tónus csökkenését váltotta ki. Az NPY sejteken pedig csökkent a serkentő bemenetek száma, amely a sejtek aktivitásának csökkenését vonhatja maga után.

# Hypothalamicus gliasejtek vizsgálata egerekben standard és magas kalóriatrtalmú táplálkozás esetén

A patkánytörzseken végzett megfigyeléseinknek megfelelően, HFD táplálás eredményeképpen megnőtt a nucleus arcuatusban a GFAP immunjelölt profilok mennyisége (4.5.3 C,D), a GFP pozitív sejtek környezetében pedig megnőtt a glianyúlványok mennyisége. Mind a POMC mind pedig az NPY-expresszáló sejtek esetében szignifikánsan nőtt a gliális borítottság a HFD táplálású egerek esetében, a standard táplálkozású társaikhoz viszonyítva (POMC:  $0.363\pm0.02$  vs.  $0.246\pm0.03$  um/100µmPOMC-GFP sejttestmebrán, P < 0.05; NPY:  $0.347\pm0.018$  vs.  $0.23\pm0.04$  um/100 µmNPY-GFP sejttestmebrán, P < 0.05). Amikor ezeket a sejteket elekronmikroszkóppal megvizsgáltuk azt találtuk, hogy a nucleus arcuatus POMC és NPY expresszáló sejtjeinek az erekhez való viszonya drámaian megváltozott (4.5.3D-G ábra). Standard táplálás estén gyakran előfordult, hogy a POMC és NPY tartalmú sejtek erek közvetlen szomszédságában helyezkedtek el (4.5.3D ábra). Ilyen elrendeződés esetén, a neuronális profilokat egy vékony glia(nyúlvány)-réteg választotta el az ereket bélelő endothel sejtektől (gliális végtalp, insert a 4.5.3D ábrán).

Ezt a fajta elrendeződést a POMC ill. NPY sejtek sejttestjei és dendritjei között nem lehetett megfigyelni elhízott, HFD táplált egerek esetében (4.5.3F,G ábra). Standard táplálású állatok (n = 4) esetében 25 db fent ismertetett glia- GFP-NPY vagy GFP-POMC appozíció volt megfigyelhető, míg elhízott, HFD táplálású állatok (n = 4) esetében egyszer sem tudtunk ilyen elrendeződést leírni ilyen (P < 0.00001).



**4.5.3. ábra. SD és HFD táplált DIO patkányok NPY és POMC expresszáló neuronjainak szinaptológiája a nucleus arcuatus területén. A, B.** SD ill. HFD táplált patkányok POMC (A) és NPY (B) sejtjeire érkező serkentő és gátló synapticus bemenetek összetétele. a: P < 0.05, HFD vs. SD értékek. **C,D.** GFAP-immunjelölés SD (**C**) és HFD (**D**) táplált állatok nucleus arcuatusának reprezentatív fénymikroszkópos felvételein. Skála: 10 µm. **E.** Reprezentatív elektronmikroszkópos felvétel SD táplált patkány POMC perykarionja és ér között kialakult közvetlen kapcsolatáról. Az inserten nagyobb nagyítású képet láthatunk'glia limitans' és POMC sejt membránja között. A csillag a sejttest és az endothel sejt közötti teret jelzi. A nyilak a glianyúlvány által elfoglalt vékony rétegre mutatnak. Skála 1 µm. **F, G.** HFD táplált állatból származó elektronmikroszkópos felvételek mutatják a GFP-immunopozitív NPY sejttest és ér között kialakult neuropil elrendeződését. Az F panelen a nyilak a sejttestre, míg a G panelen a színek a glianyúlványokat emeli ki. Skála 1µm.

Kvantifikáltuk a kapillárisok mennyiségét is a nucleus arcuatus területén a két eltérően táplált egércsoportnál (ugyanazt az ARC területet vizsgáltuk, ahol a synapticus változásokat is megfigyeltük) és nem találtunk eltérést az erek mennyiségét illetően (n = 5 per SD vagy HFD csoport,  $16.66\pm1.46/400\mu$ m vs.  $12.25\pm2.25/400\mu$ m, P = 0.181, 4.5.4A,B ábra). Az erek átmérőjének tekintetében azonban volt különbség: a HFD táplálású egerek (n = 5) esetében az átlagos kapillárisátmérő szignifikánsan nagyobb volt a SD táplálású egerek (n = 5) kapillárisaihoz viszonyítva (14.69±1.4 µm vs. 8.97± 0.6 µm, P < 0.01, 4.5.4C,D ábra).



**4.5.4. ábra. Kapillárisok** (*vessels*) rendeződése és a GFAP, POMC és NPY transzkriptek szintje a nucleus arcuatusban SD és HFD táplált egerekben. A, B. Kis nagyítású elektronmikroszkópos képek a nucleus arcuatusból SD táplált (A) és HFD (B) táplált egerekben. Az nyilak a kapillárisokra mutatnak. Skála 10µm. C. Az erek számában a két állatcsoport között nem volt szignifikáns eltérés. D. A HFD táplált egerek ereinek az átmérője szignifikánsan nagyobb volt a nucleus arcuatusban, SD táplált társaikhoz viszonyítva. E: A HFD táplált egerek GFAP mRNS mennyisége szignifikánsan nagyobb volt a nucleus arcuatusban, SD táplált egerek POMC mRNS mennyisége szignifikánsan nagyobb volt a nucleus arcuatusban, SD táplált egerek POMC mRNS mennyisége szignifikánsan nagyobb volt a nucleus arcuatusban, SD táplált társaikban. a: P < 0.05. G. A HFD táplált egerek NPY mRNS mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt a nucleus arcuatusban, SD táplált társaikboz képest. a: P < 0.05.

# A GFAP, POMC és NPY mRNS hypothalamicus expressziója SD és HFD táplálás esetén

Mivel változásokat figyeltünk meg a glia (GFAP) és az NPY/AgRP és POMC sejtekre érkező bemenetek synapticus szerkezetében, megvizsgáltuk a nucleus arcuatus területén a GFAP, NPY és POMC transzkriptjeinek mennyiségét 60 napig HFD táplált ill. SD táplált egerekben (4.5.4E-G ábra - GFAP: F.6.291, P < 0.03; POMC: F: 8.067, P < 0.02; NPY F: 12.974, P < 0.002). A HFD táplált egerek GFAP és POMC mRNS szintje szignifikánsan megemelkedett, míg az NPY mRNS szintje lecsökkent standard táplálású alom-társaikhoz képest (4.5.4E-G ábra).

#### Megbeszélés

Világszerte intenzív kutatások folynak annak érdekében, hogy megértsük az energiaháztartás szabályozásának hátterében húzódó pontos molekuláris mechanizmusokat. Ezeknek az erőfeszítéseknek köszönhetően ma már jól behatárolhatóak azok az idegrendszeri területek és kapcsolatrendszerek, amelyek a testsúlyszabályozásban kulcsszerepet játszanak. Azonban az elhízásra hajlamosító tényezők ill. az "elhízási rezisztencia" mögött húzódó molekuláris háttér igen kevéssé ismert. Bizonyos "elhízási-modell"-ként használt genetikusan obéz állatok, mint pl. a monogenetikus ob/ob egértörzs vizsgálata fontos betekintést adott bizonyos szabályozási körök működésébe (Zhang et al., 1994), ugyanakkor nem bizonyult hatékonynak a táplálkozás-kiváltotta elhízás molekuláris mechanizmusainak megértéséhez. A kísérleteinkben használt polygenetikus DIO és DR patkány- és egér modellek sokkal jobban közelítik a humán populációban jelentkező elhízásos pathomechanizmusokat. A legnagyobb előnye ezeknek az állatoknak, hogy még az elhízás előtti állapotban vizsgálhatók rajtuk az elhízás háttérben húzódó molekuláris mechanizmusok. A DIO patkányok számos jellemzőikben eltérnek a hasonló testzsírmennyiséggel rendelkező DR társaiktól (Levin et al., 1997; Levin and Keesey, 1998; Levin and Dunn-Meynell, 2000; Levin et al., 2003). Ugyanakkor a mai napig semmilyen synaptológiát érintő háttérmechanizmust nem sikerült azonosítani, ami a már meglévő ill. HFD táplálás hatására kialakuló különbségekért felelős lenne.

#### A POMC neuronok synapticus kapcsolatrendszere DIO és DR patkányokban

Eredményeink kimutatták, hogy az elhízásra hajlamos DIO patkányok a DR patkányokhoz képest szignifikáns és tipikus különségeket mutatnak a POMC neuronok synapticus kapcsolatrendszerében, még hasonló anyagcsere állapot és standard táplálási körülmények között is. A még nem elhízott DIO állatok nucleus arcuatus POMC sejtein megnövekedett gátló tónus figyelhető meg DR társaihoz képest. Ez a synapticus organizáció rávilágít arra, hogy miért hajlamosabbak a DIO patkányok elhízásra HFD táplálás esetén. Azonban amint a magas kalória- és zsírtartalmú táplálék bevezetésre került, a DIO és DR állatok POMC neuronjai egészen különböző synapticus plaszticitással reagálnak a megváltozott metabolikus állapotra. Ezt az a tény támasztja alá, hogy a DIO állatok POMC idegsejtei (amelyek működésüket tekintve anorexigén hatásúak!) elvesztik synapticus kapcsolataik egy részét, de a megmaradt bemenetek közül magasabb a serkentő synapsysok aránya, míg a DR állatok POMC neuronjai HFD táplálás hatására több synapticus bemenetet fogadnak, és az újonnan kialakult kapcsolatok között több a gátló hatású. Tehát, míg a POMC idegsejtek bemeneti synapticus kapcsolatainak összetétele pontosan előrejelzi a HFD tápláláskiváltotta elhízási hajlamot, a HFD kiváltotta synapticus változások ugyanakkor nincsenek összhangban a DIO és DR állatok metabolikus fenotípusával. Elképzelehető, hogy ennek hátterében fiziológiás kompenzációs mechanizmusok húzódnak, annak érdekében, hogy a DIO állatokban növekedjen a POMC tónus. Azt is megfigyeltük, hogy a HFD táplálás kiváltotta elhízás synapticus átrendeződést indukált az egér nucleus arcuatus melanocortin rendszerében: mind a POMC, mindpedig az NPY sejtekre érkező teljes synapsys-szám lecsökkent HFD táplálás hatására. Ugyanakkor a synapsys-szám csökkenésének hátterében a POMC sejtek esetében a gátló kontaktusok, az NPY sejtek esetében pedig a serkentő bemenetek számának vátozása játszotta a döntő szerepet. Ugyan a patkány és az egér modell között megfigyeltünk különbségeket, az mindenesetre bizonyosan állítható, hogy a POMC sejteket befolyásoló gátló tónus mindkét rágcsáló-modell esetében megváltozott, nevezetesen lecsökkent.

#### Táplálkozás indukálta astrocyta változások

Mindkét modell-rendszer esetében megfigyelhető volt, hogy megváltozott a sejttestek közvetlen környezetében és a neuropilben megfigyelhető astrocyta-profilok mennyisége ("reaktív gliosis") HFD táplálás hatására. Érdekes párhuzam figyelhető meg a metabolikus változás hatására bekövetkező gliaválasz és a lézió (ill. trauma) hatására kialakuló "távoli glia válasz" (remote astrocytic response) között. Korábbi elektronmikroszkópos vizsgálataink során ugyanis megfigyeltük, hogy a corpus geniculatum laterale kísérletes lézióját követően a primer vizuális kéregben megnövekedett mind a GFAP immunfestés, mind az astrocyta végtalpak mennyisége (Hajos et al., 1990; Hajos et al., 1996). A metabolikus hatás eredményeképpen létrejött reaktív gliosis sok tekintetben megegyezik a korábban megfigyelt távoli gliaválasz esetén megfigyelhető gliosissal. Mindkét esetben a synapticus bemenetek számának lokális változása volt megfigyelhető.

Ugyankkor reaktív gliosis gyakran gyulladásos folyamatok kísérőjelensége is lehet. Annak megértése azonban, hogy HFD táplálás hatására milyen folyamatok zajlanak le a nucleus arcuatusban, amelyek ilyen irányban befolyásolják az asztrocytákat, még várat magára. Feltételezzük, hogy az ARC-ban számos tényező indukálhat reaktív gliosist. Először is, a folyamatosan és ciklikusan változó perifériás metabolit és hormonszint synapticus plaszticitást generálhat, amely ciklikusan követi a változások ritmusát (Horvath, 2005). A gliasejtek megpróbálják követni ezt a megnövekedett plasztikus változási folyamatot, amely ezzel párhuzamosan magasabb fokú celluláris stresszel jár. Ugyanakkor a leptin és más afferens faktorok közvetlenül is hatással vannak a gliasejtekre (Diano et al., 1998; Hsuchou et al., 2009) és elősegíthetik a gliasejtek proliferációját ill. serkentik a GFAP expresszióját. Ez utóbbi lehetőség azért is valószínű, mert megfigyelték, hogy Stat-3 KO egerekben (a Stat-3 egy downstream leptin szignalizációs molekula gliasejtekben) stressz hatására sem alakul ki reaktív gliosis (Herrmann et al., 2008). Továbbá, a leptin receptorok által kiváltott jóllakottság/teltség érzés reaktív oxigéngyökök felszabadulását eredményezi a POMC sejtekből (Andrews et al., 2008), amely közvetlen kiváltó oka lehet a reaktív gliosisnak. HFD táplálás során a POMC neuronok rendkívül aktívak lehetnek, amit synaptológiai vizsgálataink is alátámasztanak: a POMC neuronok felszínén csökkent mindkét fajban HFD táplálás ereményeképpen a gátló synapsysok mennyisége és ezzel

párhuzamosan a gátló tónus. Ugyanakkor a HDF táplált egerek NPY/AGRP neuronjainak alacsonyabb számban jelen lévő serkentő synapticus bemenetei arra engednek következtetni, hogy ezen neuronok aktivitása csökkent. Ezen NPY- ill. POMC transzkriptek mRNS-expresszió megfelelő változásai megerősítik azt feltételezést, hogy a POMC neuronok aktivitása megnövekedett, az NPY tartalmú sejteké lecsökkent, míg a GFAP mennyisége a megfigyelt astrocyta-szám növekedésnek megfelelően megnőtt.

Ha az általunk megfigyelt jelenségeket együtt vizsgáljuk, akkor igen érdekes, paradox helyzettel találjuk szembe magunkat: az elhízásra hajlamos állatok melanocortin rendszerének magas kalóriatartalmú táplálásra adott synapticus változása teljesen, sőt maximálisan adekvát válasz a perifériás leptin-terhelésre (emlékeztetőül, az elhízás megnöveli a periférás leptin szintet). Ez meglepő a manapság elfogadott táplálkozási modellekhez képest, amelyek szerint ezeknek az állatoknak leptinrezisztenciát kellene mutatniuk. Ezzel jelen eredményeink is összhangban vannak, hiszen a HFD táplálás és magas leptin-szint kiváltotta POMC neuronok synapticus átrendeződése hasonlóságot mutat a korábban *ob/ob* egerekben megfigyelt leptinkiváltotta synapticus változásokkal, amely egerek egyébként igen magas leptin érzékenységgel rendelkeznek (Pinto et al., 2004). Az is nyilvánvaló, hogy a leptin rezisztenciának nem az általunk leírt HFD táplálás indukálta gliosis a kiváltó oka (Caro et al., 1996), hiszen az erek megnövekedett gliális borítása ellenére kialakult a POMC sejtek jellemző synapticus átrendeződése, ahogyan az magas leptin szint esetén várható volt.

Elképzelhető továbbá, hogy hypothalamicus szeletek vizsgálata során a felszabaduló  $\alpha$ -MSH detektált mennyiségét a gliosis eltorzíthatja (Enriori et al., 2007), mivel a gliasejt végtalpak fizikailag gátolhatják egyrészt a leptin neuronokhoz jutását másrészt az  $\alpha$ -MSH médiumba kerülését, így a mért eredmények csak megfelelő kritikával használhatóak fel az  $\alpha$ -MSH kibocsátás kinetikájának vizsgálatára. Sőt, a HFD táplálás során megfigyelt csökkent melanocortin receptor (MC4R) kötődés nem szükségszerűen a POMC neuronok csökkent szekretoros aktivitására vezethető vissza. Nemrég leírták, a prolylkarboxipeptidáz (PRCP) enzim jelenlétét azokon a hypothalamicus területeken, ahol az  $\alpha$ -MSH felszabadulás jellemző, amely enzim

hatékonyan inaktiválja az extracelluláris  $\alpha$ -MSH-t (Wallingford et al., 2009), ami alternatív magyarázatot ad a csökkent  $\alpha$ -MSH szintjére.

Az akut és krónikus energia-szükségletről információt szállító afferens szignálok központi idegrendszeri feldolgozása egyre jobban érthetőbbé válik, azonban még mindig nem ismerjük pontosan azokat a neuronköröket, amelyek a testzsír (adipozitás) mennyiségének ill. arányának változását szabályozzák. Nem ismert pontosan az sem, hogy a számos intra-neuronális szignáltranszdukciós útvonal hogyan képes szabályozni az energia-egyensúlyt. A rendszer alapjául szolgáló "neuronális huzalozottság" és a synapticus plaszticitás képviselte "flexibilitás" olyan lehetőségeket rejtenek magukban, amelyek minden bizonnyal hozzájárulnak majd ahhoz, hogy a jövőben megérthessük a testsúly szabályozás pontos mechanizmusát és az elhízás kezelésére megfelelő gyógyszerek kifejlesztésére legyen lehetőség. Ugvan meglehetősen jól ismert, hogy a jóllakottság érzéséért felelős hypothalamicus melanocortin neuronokra serkentő hatást gyakorol a leptin, az ösztrogén és a ghrelin is (Pinto et al., 2004; Abizaid et al., 2006). Szinte bizonyos, hogy a hálózat egyéntől függő variabilitása és ezen neuronkörök általános plaszticitása az egyed fejlődése során alakul ki genetikus, epigenetikus és környezeti tényezők hatására (Horvath, 2006; Plagemann, 2006; Barker, 2007; Bouret et al., 2008).

### 4.6 NTPDáz 3 hypothalamicus szerveződése, funkciója és energiaháztartásban betöltött szerepe

#### Eredmények

#### Fény-és elektronmikroszkópos vizsgálatok

Az NTPDáz-3 immunreaktív elemek megoszlása a korábban már leírtaknak megfelelő volt (Belcher et al., 2006). Fénymikroszkópos szinten mi is megfigyeltük, hogy immunreaktív sejttestek voltak a LaH és a ARC területén, míg a hypothalamus többi területén elsősorban erekkel kapcsolatot kialakító immunpozitív profilokat lehetett vizualizálni (4.6.1. ábra). A sejttestek részletesebb vizsgálata után egyértelműen beazonosíthatóak voltak a cytoplasmában jelen lévő, immunpozitív partikula jellegű struktúrák, valamint a sejtmembránhoz asszociálódott, szintén immunpozitív pontszerű szerkezetek (4.6.2AB ábra). A sejtmembrán elektronmikroszkópos vizsgálata kimutatta, hogy az immunreakció denz végterméke csak a plasma membrán jól körülírt szegmenseiben található (4.6.2Bb1 ábra).

Elektronmikroszkópos vizsgálataink megállapították, hogy a jelölt nyúlványszerű struktúrák között mind dendritek (4.6.2C1ábra), mind pedig axonok előfordulnak (4.6.2C2 ábra). A dendritekben előfordult cytosolban lokalizálódó, ribosomákhoz asszociálódott, ill. mitokondriális jelölés. Myelinizált axonokban és axonterminálisokban azonban csak mitokondriális NTPDáz-3 immunreaktivitás volt megfigyelhető. Immunreaktivitás gyakran fordult elő aszimmetrikus (feltehetően serkentő) synapticus membrán-specializáció közelében, de szimmetrikus, azaz feltehetően gátló synapsysok esetében nem találtunk NTPDáz-3 immunjelölést.

Az LaH és ARC magvak sejttestjeiben megfigyelt szemcsés jelölést további elektronmikroszkópos vizsgálatnak vetettük alá. A megfigyelt, fénymikroszkópban szemcsézett immunreakciónak megfelelő elektrondenz immuncsapadék a cytoplasmában elsősorban szabad ribosomákhoz kötődött, azonban a jelölés döntő többsége endoplasmaticus reticulumhoz asszociálódott ribosomák közelében volt megtalálható. A mitokondriumokhoz köthető NTPDáz-3 immunreakció elsősorban azok belső membránjához asszociálódott (4.6.2D1-2ábra). Az immunjelölt mitokondriumok jellemzően aszimmetrikus synaptycus memránspecializációk

közelében helyezkedtek el (serkentő synapsysok), mind a presynapticus terminális, mind pedig a postsynapticus profilokban, valamint a dendritekben egyaránt előfordultak. Jelölt mitokondriumok a sejttest cytoplasmájában, a sejtmembránhoz közel is gyakran előfordultak.



**4.6.1. ábra. Hypothalamicus NTPDáz-3 immunreaktív sejtek erek közvetlen közelében. A.** NTPDáz-3 immunreaktív sejttest (nyíl) és (**B ill. B1**) nyúlványok (nyílhegyek) gyakran voltak megfigyelhetőek kapillárisok (\*) közelében. Skála 20µm.



4.6.2. ábra. NTPDáz-3 immunreaktív profilok elektronmikroszkópos viszgálata. A. Szemcsézett immunreaktivitás (nyilak) feltehetően riboszómákhoz kötött jelölésre utal. Skála 400 nm. B. Fénymikroszkópos vizsgálatok szemcsézettséget mutattak a sejtek perifériás területeinek közelében (b1, skála: 50 µm). A b1' inserten nyíllal kiemelt pontszerű képletet elektronmikroszkópban megvizsgálva extracellulárisan helyeződő, plasma-membránhoz kötődő Ni-DAB immuncsapadékot találtunk (fehér nyíl, a fehér nyílhegy citoplasmaticus jelölésre mutat). Skála 100 µm. C1. NTPDáz-3 immunreaktív dendrit reprezentatív elektronmikroszkópos képe. Skála 0.5µm. C2. NTPDáz-3 immunreaktív velőhüvelyes idegrost reprezentatív elektronmikroszkópos képe. Az axonban immunreaktivitást mutató mitochondrium látható. Skála 1µm. D1. NTPDáz-3 immunreaktív anyag dendritből származó mitochondrium mátrixában (m) ill. belső membránjához kötődve (nyíl). Skála 200 nm. D2. NTPDáz-3 immunreaktív mitochondrium (nyilak) dendritben (d) ill. egy aszimmetrikus synapsys közelében és egy velőhüvely nélküli idegrostban (a, fehér nyilak). Skála: 400 nm.

#### NTPDáz-3 és GAD kolokalizáció

A megvizsgált 320 NTPDáz-3 immunreaktív sejttest közül 29 szabálytalan, betűrődő (indentált) sejtmagot tartalmazott. Mivel az ARC GABAerg neuronjaira jellemző ez a fajta sejtmag-membrán struktúra (Leranth et al., 1985; Leranth et al., 1991), megvizsgáltuk, hogy az NTPDáz-3 sejtek valóban expresszálnak-e GABA-t, tehát gátló működésűek-e. Az megvizsgált 2540 GAD-immunreaktív sejt egyike sem expresszált NTPDáz-3-at, amely arra utal, hogy az NTPDáz-3 elsősorban serkentő típusú sejtekben termelődik (4.6.3 ábra).



**4.6.3. ábra GAD immunjelölés (A) és NTPDáz-3 immunreakció (B) a hypothalamusban tükörtechnika alkalmazásával.** A nyilak összetartozó sejtpárokra mutatnak. Egyik GAD immunraktív sejt sem mutat NTPDáz-3 immunreaktivitást. A csillagok az összetartozó érprofilokat jelzik. Skála 50 µm.

#### Western blot; az ösztrogén hatása a hypothalamicus NTPDáz expressziójára

Mivel NTPDáz-3 immunreaktív sejtek a hypothalamus területén csak a LaH és az ARC területén fordultak elő, izolált medialis és lateralis hypothalamicus szövetmintákat vettünk az ovariectomizált és az ösztrogén kezelt állatokból, és megvizsgáltuk western blot technikával, milyen hatással van az ösztrogén kezelés a hypothalamicus NTPDáz-3 expressziójára (4.6.4. ábra). Négy immunreaktív sávot detektáltunk a nyúl-anti-NTPDáz-3 polyklonális antitest felhasználásával (160-170 kDa, 82-85 kDa, 60 kDa, és 37 kDa molekulasúlyoknak megfelelő tartományban). Egy korábbi tanulmány, amely western blot vizsgálatokhoz szintén ezt az antiszérumot használta, fibroblastok *in vitro* vizsgálatánál szintén több immunreaktív sáv jelenlétét detektálta, míg ovariectomizált patkány thalamicus membránfrakció vizsgálatakor mindössze egy sáv jelentkezett (Belcher et al., 2006).

Ezért nem meglepő, hogy a rendkívüli ösztrogén-érzékenységéről ismert hypothalamus vizsgálatakor több immunreaktív sáv jelentkezett kísérleteink során. Ez a jelenség nagy valószínűséggel az enzim különböző struktúrális és funkcionális formájának köszönhető. A 85 kDa sáv az enzim teljesen glykozilált formáját tükrözi, míg a 160-170 kDa és a 60 kDa sávok az enzim dimer fromájára utalnak,



**4.4.4. ábra. NTPDáz-3 expresszió szintje a nőstény patkányok hypothalamusában. A.** A mintavétel helye: Med-HT – a hypothalamus medialis része amely a ARC-t tartalmazza; Lat-HT – hypothalamus lateralis része, amely tartalmazta a nucleus lateralist. A mintavétel a Bregma szerinti anterioposterior tengely 2.12 mm- től 4.52. mm között történt. B. Reprezentatív immunoblot a lateralis és medialis hypothalamus területéről 4 órával a 17ß-öszradiol subcutan injekcióját követően. Az enzim 82-85 kDa molekula-tömegnek megfelelő formája került további vizsgálatra.

illetve a központi ('core') proteint detektálják. Vizsgálataink során a 85 kDa molekulasúlyt reprezentáló sáv változásaira fókuszáltunk, és mind idő-, mind pedig ösztrogén-függő eltéréseket figyeltünk meg a lateralis és a medialis hypothalamicus területen (4.6.5. ábra). Ugyanakkor az NTPDáz-3 enzim időbeni változásai eltérő mintázatot mutatott a két terület között. A LaH területén az enzim mennyisége szignifikáns emelkedett az E2 subcutan beadását követő 4-12 óra elteltével, majd a beadást követően 16-26 órával fokozatosan visszatért az eredeti (ovariectomizált állatnál megfigyelt) exressziós szintre (4.6.5A ábra). Ettől eltérő változásokat detektáltunk a medialis hypothalamus területén: 6-10 órával az E2 kezelést követően az enzim szintje megemelkedett, majd gyorsan visszaesett a kontrol szintre, amit egy

második emelkedés követett 22-26 órával az eredeti E2 beadást követően (4.6.5B. Ábra).



**4.6.5. ábra. Az NTPDáz-3 hypothalamicus expressziójának időbeni lefutása egyetlen subcutan 17ß-öszradiol (E2) injekciót követően.** A 82-85 kDa immunreaktív western blot sávok optikai denzitásának vizsgálata ovariectomizált (ovx) és OVX + E2 kezelt állatok hypothalamusában 2-26 órával a beadást követően. A mintákat a beadást követő 2 órás időintervallumokban vételeztük. A. NTPDáz-3 expresszió a *lateralis* hypothalamusban E2 kezelést követően. **B.** NTPDáz-3 expresszió a *medialis* hypothalamusban E2 beadást követően. **C.** Az E2 átlagos szintje a vérplasmában egyetlen subcutan 17ß-öszradiol (E2) injekciót követően (vízoldékony, 23 µg/100g testömeg).

Tehát a lateralis hypothalamus területén csupán egy enzim-expressziós csúcs, míg a medialis hypothalamus területén (ahol a nucleus arcuatus is megtalálható) két ilyen enzim termelési csúcs jelentkezett. Az ösztrogén tehát mindkét hypothalamicus területen hatást gyakorol az NTPDáz aktivitásra, azonban a két terület ösztrogén-indukálta változásai eltérőek.

#### Megbeszélés

#### Fény és elektronmikroszkópia

Korábbi tanulmányok alapján az ismert volt, hogy az NTPDáz-3 kizárólag neuronokban és azok nyúlványaiban van jelen (Belcher et al., 2006). Kísérleteinkben ezt megerősítettük, és leírtuk immunreaktív sejttestek jelenlétét a LaH és a ARC területén, a többi hypothalamicus területen azonban csak immunreaktív nyúlványok (axonok ill. dendritek) jelenlétét detektáltuk, gyakran erek közelében, azokkal szoros morfológiai kapcsolatban. Ez utóbbi megfigyelés azt valószínűsíti, hogy az NTPDáz-3 expresszáló sejtek vagy résztvesznek a periféria felől érkező hormonális szignálok feldolgozásában, vagy a sejtek eddig még nem tisztázott módon előállítanak és a véráramba bocsátanak hormonokoat vagy egyéb jelzőmolekulákat. Ezen feltételezések megerősítéséhez természetesen további vizsgálatok szükségesek, hogy az NTPDáz-3 szignalizációs szerepét ebben a viszonylatban is megismerhessük.

Az általunk végzett korrelált fény- és elektronmikorszkópos vizsgálatok kimutatták, hogy az NTPDáz-3 a sejtmembrán bizonyos, jól körülhatárolható szegmensében van jelen. Ez összhangban van az NTPDázokról kialakult korábbi ismereteinkkel, hiszen ezen enzimek transzmembrán fehérjeként foszforilált nukleotidokat hidrolizálnak a sejten kívül. A sejten belül az NTPDáz-3 kisebb mennyiségben szabad riboszómákhoz asszociálódva, de elsősorban endoplasmaticus reticulum felszínéhez kötött ribosomák közelében fordult elő. Ez nem meglepő, hiszen a kísérletekben használt antitestek elsősorban az NTPDáz központi 'core-' fehérje aminosavsorrendjét ismerték fel, ezért az antitestek specifikus kötődése már közvetlenül a transzláció után lehetségessé vált. Az immunjelölés harmadik fontos helyszíne a sejten belül mitochondriumokhoz asszociálódott. Mivel jelölt mitochondriumok elsősorban serkentő, aszimmetrikus synapsysok közelében fordultak

elő, feltételezhető, hogy az NTPDáz-3 aktivitás elsősorban a serkentő synapticus működéshez kötődik funkcionálisan, és nem játszik jelentős szerepet a gátló funkciókban.

#### NTPDáz-3 és GAD kolokalizáció

Az ún. immunhisztokémiai tükör-technikát alkalmazva meg is bizonyosodtunk arról, hogy egyetlen, GAD expresszáló sejttest sem tartalmazott NTPDáz-3 enzimet. Ugyan nem vizsgáltunk meg minden lehetséges hypothalamicus synapsys-féleséget és gátló funkcióval rendelkező, de GAD-t nem expresszáló sejtet a hypothalamus területén (ilyenek például a dopaminerg gátló sejtek, amelyek nem tartalmaznak GABA-t), eredményeink mindenképpen azt sejtetik, hogy az NTPDáz-3 enzim expressziója elsősorban a serkentő sejtekre és a serkentő neurtranszmisszióra jellemző.

A dendritekben mind szabad riboszómákhoz kötött, mind pedig mitochondriális jelölést megfigyeltünk. Myelinizált axonokban és axonterminálisokban azonban csak mitochondriális jelölés fordul elő. Az axonokban megfigyelhető jelölés mindenképpen arra utal, hogy az axonterminálisokon keresztül történő presynapticus jelátvitel mitokondriális ATP-biztosította energiaszintjének szabályozásában az NTPDáz-3 enzim aktivitása mindenképpen kulcsszerepet játszik.

#### Ösztrogén hatása a hypothalamicus NTPDáz-3 expressziójára

Amint azt már korábban említettük, a western blot számos, egymástól különböző molekulasúlyoknál detektált NTPDáz-3 immunreaktív sávokat. Ez a jelenség arra utalhat, hogy a különböző sávok az enzim különböző érettségű formáit detektálták. Vizsgálataink során az NTPDáz-3 immunreaktivitást számos subcellularis kompartmenthez kötötten megfigyeltük (plasma membrán, ribosomák, endoplasmaticus reticulum, mitochondrium). Ezért az is lehetséges, hogy az egyes blot-sávok az enzim más-más "mikro-környezethez" adaptálódott funkcionális formáját reprezentálják.

Mivel a hypothalamus neuroendocrin tevékenysége nagyfokú E2 érzékenységet mutat, feltételeztük, hogy az ösztrogén az NTPDáz-3 expressziójára is hatást gyakorol. Ezért megvizsgáltuk, hogyan változik az NTPDáz-3 expressziója ösztrogén-kezelés hatására kontroll és ovariectomizált nőstény patkányok lateralis és medialis

hypothalamicus területein. Kísérleteink azt mutatták, hogy egyszeri E2 subcután beadását követően az NTPDáz-3 expresszió megnövekedett mindkét hypothalamicus területen már néhány órával a kezelést követően, azonban az expresszió időbeli lefutása a két területen különböző mintázatot mutatott. Mivel a mediobasalis hypothalamus (ahol a nucleus arcuatus is elhelyezkedik) kulcsszerepet játszik a bifázikus gonadotróp szekrécióban (vagyis a gonadotróp szekréció pozitív- és negatívfeedback szabályozásában is részt vesz), feltételezzük, hogy a hypothalamus medialis részében az NTPDáz-3 részt vesz a gonadotróp hormonok ösztrogén által kifejtett szabályozásában. A két csúcsot produkáló NTPDáz-3 expresszió mindenesetre erre enged következtetni. Például, számos adat utal arra, hogy az NTPDáz-3 szerepet játszik a gonadotróp felszabadulás hypothalamicus szabályozásában. Korábban megfigyeltük, hogy az E2-kiváltotta gonadotropin felszabadulást követően, E2 függő synapticus reorganizáció történik a hypothalmicus neuronokon. Ezt a jelenséget "fázisfüggő synapticus átrendeződésként" írták le (phased synaptic remodeling) (Naftolin et al., 2007), amely a serkentő/gátló synapsysok arányának specifikus, gonadotróp feedback szabályozás függő (pozitív- ill. negatív) megváltozását eredményezte. Az E2 közvetlen hatásaként a serkentő synapsysok számának gyors emelkedését figyeltük meg, és ezen megnövekedett serkentő bemenetek nagy valószínűséggel érintik az NTPDáz-3 expresszáló sejteket is, hiszen több aszimmetrikus serkentő synapticus specializáció több ATP felhasználást jelent, ami értelemszerűen több NTPDáz-3 tartalmú mitochondrium jelenlétét teszi szükségessé.

Mind a lateralis, mind a medialis hypothalamicus funkciók között találunk purinerg jelátviteli rendszerre épülőket (pl. A<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>X receptorok által mediált szabályozások). A lateralis hypothalamus területén található hypocretin (HCRT, orexin) tartalmú, NTPDáz-3 expresszáló sejtek pedig közvetlenül érintettek a purinerg receptorok által közvetített neuronális aktivitásban (Thakkar et al., 2002; Gordon et al., 2005; Wollmann et al., 2005; Florenzano et al., 2006; Kittner et al., 2006; Seidel et al., 2006; Knott et al., 2007). Mivel jelen kutatásainkban neuronális sejmembránhoz kötött NTPDáz-3 immunreaktivitást találtunk mind az ARC, mind a LaH sejtjeiben, és E2 hatására mindkét populációban megnőtt az NTPD-áz expresszió, lehetséges, hogy ösztrogén hatására megnő a membránhoz-kötött NTPDáz-3 mennyisége - legalábbis

átmenetileg - ami nagy valószínűséggel a megnövekedett purinerg jelátvitellel együtt járó sejtaktivitáshoz szükséges. Ennek bizonyításához további kísérletek szükségesek.

A lateralis hypothalamusból származó mintákon az NTPDáz-3 expressziójának szintje 4 órával az E2 beadást követően megemelkedett, majd fokozatosan lecsökkent, és 26 órával később visszaállt az ovariectomizált állatban található szintre. Korábbi tanulmányokból tudjuk, hogy a lateralis hypothalamus NTPDáz-3 expresszáló sejtjeinek túlnyomó többsége (mintegy 97%-a) hypocretint (HCRT, Orexin) is expresszál (Belcher et al., 2006). Ezekről az idegsejtekről ismert, hogy közvetlen befolyást gyakorolnak a nucleus raphe serotoninerg sejtjeire és ezáltal részt vesznek az alvás-ébrenléti ciklus szabályozásában (Liu et al., 2002). Ismert, hogy az E2 is befolyást gyakorol az ébrenléti ("arousal") szabályozásra (Lee and Pfaff, 2008). Tehát elképzelhető, hogy az E2 alvás-ébrenléti ciklust szabályozó hatása az NTPDáz-3 expresszáló sejtek aktivitásán keresztül manifesztálódik. Ugyanakkor a lateralis hypothalamus HCRT ill. NTPDáz-3 expresszáló sejtjei nemcsak az E2 számára jelentenek hatékony szabályozási lehetőséget, de itt hat a gyomor-bélrendszerből felszabaduló ghrelin hormon is. Továbbá ezek a neuronok jelentik a nucleus arcuatus NPY és AGRP tartalmú sejtjeinek egyik legnagyobb serkentő bemenetét, amelyek aktivitása szabályozza a táplálékfelvételt (ld. az értekezésben korábban ismertetett eredményeinket). Ezen neuronok funkcionális aktivitásában bekövetkező változások synapticus átalakulási folyamatokat is indukálhatnak (Horvath, 2005). Ezért több, mint valószínű, hogy az E2-re adott válasz során a LaH NTPDáz-3 tartalmú sejtjei megnövekedett aktivitásuk révén serkentik a ARC NPY/AGRP sejtek működését, ami viszont megnövekedett NTPDáz expressziót eredményez mind a lateralis mind a medialis hypothalamus területén. Nagyon valószínű tehát, hogy az ösztrogének táplálkozás szabályozására gyakorolt hatásában az NTPDáz-3 fontos szerepet játszik.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk célja az volt, hogy jobban megérthessük a hypothalamus homeostasisban betöltött szabályozó funkcióit és olyan új információkhoz jussunk, amelyek elmélyítik ezen igen komplex agyterületről kialakított tudásunkat. Ezért a hypothalamus bizonyos specifikus magcsoportjait vizsgáltuk meg, elsősorban neuroanatómiai módszerekkel, amely által számos új celluláris, szerkezeti és működési elvre bukkantunk.

A hypothalamusban található a cirkadián ritmus kialakításáért felelős *nucleus* suprachiasmaticus. A SCN-ról már régóta ismert, hogy szerkezetében és méretében a különböző nemű egyedekben anatómiai különbségek figyelhetőek meg, nemcsak rágcsálókban, hanem más emlősben is. Ez a szexuális dimorphismus húzódik meg a különböző nemű egyedekben megfigyelhető jellemző különbségek (pl. különböző cirkadián és szezonális ritmusok és ezekhez kapcsolódó lokomotoros aktivitás, ill. viselkedés, alvás-ébrenléti ritmus és endocrin funkciók) hátterében. Ismert tény az is, hogy a nemek közötti eltérés alapvetően az embryonális fejlődés során alakul ki, amikor a hypothalmus egyes magcsoprotjai, ill. azon belül a különböző neuropeptid tartalmú sejtpopulációk differenciálódnak. Mivel a szteroid hormonoknak rendszerező, struktúra kialakító szerepük van a hypothalamicus neuronhálózatok fejlődésére, kézenfekvő volt, hogy megvizsgáljuk, gyakorolnak-e hatást a szetroidok az SCN fejlődésére. Kutatási eredményeink egyértelműen rámutattak, hogy az embryonalis fejlődés kritikus periódusa alatt keletkező SCN sejtek szexuálisan differenciálódnak és hogy a nőstény kontroll állatok több újonnan keletkezett sejttel rendelkeznek a medialis és caudalis SCN területeken, mint a hímek. Eredményeink szerint a tesztoszteron kezelés drámaian lecsökkenti újonnan keletkező sejtek számát a nőstény SCN teljes területén. Továbbá megállapítottuk, hogy az SCN sejtdifferenciálódása legalább az embryonalis 18. napig folytatódik, de az IGL területén a sejtproliferáció nincs szinkronban az SCN-ban zajló hasonló folyamatokkal.

A hypothalamus az energia-háztartást alapvetően a táplálékfelvétel szabályozásán keresztül képes bfolyásolni. Rágcsálók hypothalmicus szabályozórendszerének neuroanatómiai alapjait viszonylag behatóan ismertük, azonban a főemlősök megfelelő szabályozórendszerének hypothalmicus neuoanatómai

alapjairól nem álltak rendslkezésre adatok. Megvizsgáltuk tehát, hogy főemlősökben is megtalálható-e az a hypothalmicus hypocretin rendszer, amelyről rágcsálókban már bebizonyosodott, hogy a táplálékfelvételben alapvető szerepet játszik. Kísérleteink során a hypocretin rendszer hypothalamicus szerveződését és annak reakcióját vizsgáltuk megváltozott anyagcserekörülmények között majomban. Leírtuk a főemlősök metabolikus szabályozásban résztvevő HCRT-tartalmú hypothalamicus szignáltranszdukciós rendszer neuroanatómiai organizációját, megfigyeltük, hogy a nucleus arcuatus éhezés hatására aktiválódó NPY sejtei HCRT bemenettel rendelkeznek, és megállapítottuk, hogy a rágcsálókhoz hasonlóan, rövid táplálékmegvonás hatására erőteljesen aktiválódik a lateralis hypothalamus HCRT rendszere főemlősökben

1999 óta ismert, hogy a gyomor-bélrendszerben felszabaduló ghrelin homonális úton befolyásolni tudja a táplálékfelvételt, és részben kompenzálja a zsírszövet által termelt leptin hatását. Korábbi vuzsgálatok azonban kimutatták, hogy a véragygáton nem képes a keringő ghrelin a hypothalamicus energiaháztartást-szabályozó központokhoz eljutni, ezért felmerült annak lehetősége, hogy létezik egy endogén, centrális ghrelin-expresszáló hálózat a hypothalamus területén. Megvizsgáltuk tehát, a központi idegrendszer ghrelin-termelő sejtjeinek neuroanatómiai szerveződését és funkcionális jellezőit. Munkánk egy új, eddig nem ismert ghrelint expresszáló hypothalamicus sejtpopulációt írt le. Leírtuk a ghrelin hypothalamicus neuroanatómiai organizációját, megoszlását és megállapítottuk, hogy e rendszer nem esik egybe egyik ismert, hypothalamicus energia-háztartást szabályozó neuronpopuláció megoszlásával sem. Elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján egyértelművé vált, hogy a ghrelin jelen van hypothalamicus neuronokban, valamint, hogy ghrelin tartalmú axonterminálisok olyan hypothalamicus peptiderg rendszerekkel állnak kapcsolatban, amelyek az anyagcsere szabályozásában kulcsszerepet játszanak. Bemutattuk, hogy a ghrelin stimulálja a nucleus arcuatus NPY/AGRP neuronok aktivitását, elsősorban az axonterminálisokra kifejtett hatásán keresztül.

A hypothalamicus energia-homeostasis szabályozásában már régóta ismert a nucleus arcuatus melanocortin rendszerének alapvető szerepe. Az arcuatus mag POMC termelő sejtjei nemcsak a táplálékfelvétel, de bizonyos szexuális funkciók során is kulcsszerepet játszanak. A POMC sejtek kiterjedt synapticus kapcsolataik

révén számos hypothalamicus szabályozómechanizmus megkerülhetetlen építőkövei. Pl.: a leptin GnRH aktivitásra gyakorolt hatását a nucleus arcuatusban található proopiomelanocortin (POMC) neuronok közvetítik, de az is ismert, hogy a POMC tartalmú idegsejteket számos GABA (gátló) ill. glutamát (serkentő) axon idegzi be, amely a ARC neuronok kiterjedt és sokszínű neuronális kontrolljára utal és tudjuk, hogy ezen bemenetek befolyással bírnak az anyagcsere-háztartásra. Kíváncsiak voltunk arra, hogy az arcuatus mag POMC sejtjei közvetelen kapcsolatban állnak-e a GnRH rendszerrel és hogyan változik meg ezen sejtek neurokémiai jellege szteroid nemi hormonok (pl. ösztrogén) hatására. Kísérleti eredményeink egyértelműen kimutatták, hogy a nucleus arcuatus területén található GnRH tartalmú efferensek közvetlen kapcsolatban vannak a POMC expresszáló sejttestekkel, azonban ez a kapcsolat nem klasszikus synapticus jellegű. Megfigyeltük, hogy a nucleus arcuatus POMC neuronjainak csak igen kevés százaléka expresszál parvalbumint, azonban

A hypothalamus alapvető szerepet játszik a táplálkozással összefüggő elhízás kialakításában és létrjöttében. Ismert, hogy vannak olyan egyedek ill. egyének, amelyek elhízásra hajlamosabbak, mint társaik, de ennek a különbségnek az okát, esetleges idegrendszeri hátterét nem, vagy csak alig ismertük. Az előbb vázolt jelenség idegrendszeri ill. neuroanatómai hátterét azonban rendkívül jól lehet vizsgálni olyan modellállatokon, amelyek genetikailag ismert elhízási hajlammal rendelkeznek. Amennyiben az ilyen állatok hypothalmicus szabályozórendszerének celluláris szerveződését hasonlítjuk elhízási hajlammal nem rendelkező egyedekhez, számos új információhoz juthatunk, és megérthetjük az elhízás hátterében álló idegrendszeri plasztikus folyamatokat. Eredményeink kimutatták, hogy az elhízásra hajlamos DIO patkányok a DR patkányokhoz képest szignifikáns és tipikus különségeket mutatnak a POMC neuronok synapticus kapcsolatrendszerében, még hasonló anyagcsere állapot és standard táplálási körülmények között is. Megállapítottuk, hogy magas kalóriatartalmú táplálkozás hatására mind a POMC, mindpedig az NPY sejtekre érkező teljes synapsys-szám lecsökkent és ennek a synapsys-szám csökkenésének hátterében a POMC sejtek esetében a gátló kontaktusok, az NPY sejtek esetében pedig a serkentő bemenetek számának vátozása játszotta a döntő szerepet, ill. megfigyeltük, hogy

megnőtt a sejttestek közvetlen környezetében és a neuropilben megfigyelhető astrocyta-profilok mennyisége ("reaktív gliosis").

Mivel a purinerg jelátviteli rendszer tagja, az NTPDáz-3 ektonukleotidáz rágcsáló agyban kizárólag a hypothalamus nucleus lateralis és nucleus arcuatus területén található idegsejtekben termelődik és mindkét mag alapvető szerepet játszik a táplálékfelvétel és a szexuális funkcók szabályozásában, megvizsgáltuk az NTPD-áz-3 rendszer celluláris szerveződését. Megfigyeltük, hogy NTPDáz-3 immunreaktív sejttestek vannak a LAH és a ARC területén, míg a hypothalamus többi területén elsősorban erekkel kapcsolatot kialakító immunpozitív profilokat lehetett vizualizálni, ill kimutattuk, hogy NTPD-áz-3 subcellularisan az elsősorban seitmembrán-szegmensekhez. riboszómákhoz, endoplasmaticus reticulumhoz és mitochondriumokhoz asszociálódik. Megállapítottuk, hogy az NTPDáz-3 elsősorban serkentő típusú sejtekben termelődik. Kísérleteink kimutatták, hogy egyszeri ösztrogén-beadást követően az NTPDáz-3 expresszió már néhány órával a kezelést követően megnövekedett mind az LAH, mind az ARC területen, azonban az expresszió időbeli lefutása a két területen különböző mintázatot mutatott.

# 6. BIBLIOGRÁFIÁK

# Hivatkozott irodalom

- 1. Abizaid A, Mezei G, Sótonyi P, Horvath TL (2004) Sex differences in adult suprachiasmatic nucleus neurons emerging late prenatally in rats. European Journal of Neuroscience 19:2488-2496.
- 2. Abizaid A, Liu ZW, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, Elsworth JD, Roth RH, Sleeman MW, Picciotto MR, Tschop MH, Gao XB, Horvath TL (2006) Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. J Clin Invest 116:3229-3239.
- 3. Ahima RS, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK (2000) Leptin regulation of neuroendocrine systems. Front Neuroendocrinol 21:263-307.
- 4. Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS (1997) Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. J Clin Invest 99:391-395.
- 5. Albers HE (1981) Gonadal-Hormones Organize and Modulate the Circadian System of the Rat. American Journal of Physiology 241:R62-R66.
- 6. Altman J, Bayer SA (1986) The Development of the Rat Hypothalamus. Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology 100:1-173.
- Andrews ZB, Liu ZW, Walllingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM, Tschop MH, Shanabrough M, Cline G, Shulman GI, Coppola A, Gao XB, Horvath TL, Diano S (2008) UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. Nature 454:846-851.
- 8. Appelbaum L, Skariah G, Mourrain P, Mignot E (2007) Comparative expression of p2x receptors and ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in hypocretin and sensory neurons in zebrafish. Brain Research 1174:66-75.
- 9. Arai Y, Murakami S, Nishizuka M (1994) Androgen Enhances Neuronal Degeneration in the Developing Preoptic Area - Apoptosis in the Anteroventral Periventricular Nucleus (Avpvn-Poa). Hormones and Behavior 28:313-319.
- 10. Arnold AP, Gorski RA (1984) Gonadal-Steroid Induction of Structural Sex-Differences in the Central Nervous-System. Annual Review of Neuroscience 7:413-442.
- 11. Arvat E, Di Vito L, Broglio F, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva FF, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E (2000) Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. J Endocrinol Invest 23:493-495.
- 12. Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva FF, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E (2001) Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. J Clin Endocrinol Metab 86:1169-1174.
- 13. Atkinson HC, Waddell BJ (1997) Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: Sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. Endocrinology 138:3842-3848.
- 14. Banks WA, Tschop M, Robinson SM, Heiman ML (2002) Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. J Pharmacol Exp Ther 302:822-827.
- 15. Barker DJ (2007) Obesity and early life. Obes Rev 8 Suppl 1:45-49.

- Belcher SM, Zsarnovszky A, Crawford PA, Hemani H, Spurling L, Kirley TL (2006) Immunolocalization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in rat brain: Implications for modulation of multiple homeostatic systems including feeding and sleep-wake behaviors. Neuroscience 137:1331-1346.
- 17. Bethea CL, Lu NZ, Gundlah C, Streicher JM (2002) Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system. Frontiers in Neuroendocrinology 23:41-100.
- Beyer C, Hutchison JB (1997) Androgens stimulate the morphological maturation of embryonic hypothalamic aromatase-immunoreactive neurons in the mouse. Developmental Brain Research 98:74-81.
- Beyer C, Green SJ, Hutchison JB (1994) Androgens Influence Sexual-Differentiation of Embryonic Mouse Hypothalamic Aromatase Neurons in-Vitro. Endocrinology 135:1220-1226.
- 20. Bjorbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van Bueren A, McCall AL, Flier JS (1998) Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. Endocrinology 139:3485-3491.
- 21. Bjorkelund C, Lissner L, Andersson S, Lapidus L, Bengtsson C (1996) Reproductive history in relation to relative weight and fat distribution. Int J Obes Relat Metab Disord 20:213-219.
- 22. Botchkina GI, Morin LP (1995a) Ontogeny of Radial Glia, Astrocytes and Vasoactive-Intestinal-Peptide Immunoreactive Neurons in Hamster Suprachiasmatic Nucleus. Developmental Brain Research 86:48-56.
- 23. Botchkina GI, Morin LP (1995b) Specialized Neuronal and Glial Contributions to Development of the Hamster Lateral Geniculate Complex and Circadian Visual-System. Journal of Neuroscience 15:190-201.
- 24. Bouret SG, Gorski JN, Patterson CM, Chen S, Levin BE, Simerly RB (2008) Hypothalamic neural projections are permanently disrupted in diet-induced obese rats. Cell Metab 7:179-185.
- 25. Brager DH, Sickel MJ, McCarthy MM (2000) Developmental sex differences in calbindin-D-28K and calretinin immunoreactivity in the neonatal rat hypothalamus. Journal of Neurobiology 42:315-322.
- 26. Brannvall K, Korhonen L, Lindholm D (2002) Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. Molecular and Cellular Neuroscience 21:512-520.
- 27. Braun N, Sevigny J, Mishra SK, Robson SC, Barth SW, Gerstberger R, Hammer K, Zimmermann H (2003) Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain. European Journal of Neuroscience 17:1355-1364.
- 28. Brownstein M, Arimura A, Sato H, Schally AV, Kizer JS (1975) The regional distribution of somatostatin in the rat brain. Endocrinology 96:1456-1461.
- 29. Bulun SE (2000) Aromatase deficiency and estrogen resistance: from molecular genetics to clinic. Semin Reprod Med 18:31-39.
- 30. Burnstock G (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. Physiological Reviews 87:659-797.
- 31. Butera PC, Czaja JA (1984) Intracranial estradiol in ovariectomized guinea pigs: effects on ingestive behaviors and body weight. Brain Res 322:41-48.
- 32. Cai XJ, Widdowson PS, Harrold J, Wilson S, Buckingham RE, Arch JRS, Tadayyon M, Clapham JC, Wilding J, Williams G (1999) Hypothalamic orexin expression - Modulation by blood glucose and feeding. Diabetes 48:2132-2137.

- 33. Caprio M, Fabbrini E, Isidori AM, Aversa A, Fabbri A (2001) Leptin in reproduction. Trends Endocrinol Metab 12:65-72.
- 34. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV (1996) Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. Lancet 348:159-161.
- 35. Caston-Balderrama AL, Cameron JL, Hoffman GE (1998) Immunocytochemical localization of Fos in perfused nonhuman primate brain tissue: Fixation and antisera selection. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 46:547-556.
- 36. Chadwick BP, Frischauf AM (1998) The CD39-like gene family: Identification of three new human members (CD39L2, CD39L3, and CD39L4), their murine homologues, and a member of the gene family from Drosophila melanogaster. Genomics 50:357-367.
- 37. Chehab FF, Lim ME, Lu R (1996) Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. Nat Genet 12:318-320.
- 38. Chehab FF, Mounzih K, Lu R, Lim ME (1997) Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. Science 275:88-90.
- 39. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong YM, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: Molecular genetics of sleep regulation. Cell 98:437-451.
- 40. Chronwall BM, DiMaggio DA, Massari VJ, Pickel VM, Ruggiero DA, O'Donohue TL (1985) The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. Neuroscience 15:1159-1181.
- 41. Cone RD (2006) Studies on the physiological functions of the melanocortin system. Endocr Rev 27:736-749.
- 42. Cowley MA, Pronchuk N, Fan W, Dinulescu DM, Colmers WF, Cone RD (1999) Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. Neuron 24:155-163.
- 43. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. Nature 411:480-484.
- 44. Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sótonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL (2003) The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. Neuron 37:649-661.
- 45. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. Diabetes 50:1714-1719.
- 46. Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Niijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M (2002) The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelininduced feeding and growth hormone secretion in rats. Gastroenterology 123:1120-1128.
- 47. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M (2000) Ghrelin, a novel growth hormone-

releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. Endocrinology 141:4255-4261.

- 48. Davis FC, Darrow JM, Menaker M (1983) Sex-Differences in the Circadian Control of Hamster Wheel-Running Activity. American Journal of Physiology 244:R93-R105.
- 49. Davis FC, Stice S, Menaker M (1987) Activity and Reproductive State in the Hamster Independent Control by Social-Stimuli and a Circadian Pacemaker. Physiology & Behavior 40:583-590.
- 50. Davis FC, Boada R, LeDeaux J (1990) Neurogenesis of the hamster suprachiasmatic nucleus. Brain Res 519:192-199.
- 51. de la Cour CD, Bjorkqvist M, Sandvik AK, Bakke I, Zhao CM, Chen D, Hakanson R (2001) A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. Regulatory Peptides 99:141-150.
- 52. de la Iglesia HO, Blaustein JD, Bittman EL (1999) Oestrogen receptor-alphaimmunoreactive neurones project to the suprachiasmatic nucleus of the female Syrian hamster. Journal of Neuroendocrinology 11:481-490.
- 53. De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao XB, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg ELF, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95:322-327.
- 54. Desjardins GC, Brawer JR, Beaudet A (1993) Estradiol is selectively neurotoxic to hypothalamic beta-endorphin neurons. Endocrinology 132:86-93.
- 55. Devries GJ, Buijs RM, Swaab DF (1981) Ontogeny of the Vasopressinergic Neurons of the Suprachiasmatic Nucleus and Their Extrahypothalamic Projections in the Rat-Brain - Presence of a Sex Difference in the Lateral Septum. Brain Research 218:67-78.
- 56. Diano S, Naftolin F, Horvath TL (1997) Gonadal steroids target AMPA glutamate receptor-containing neurons in the rat hypothalamus, septum and amygdala: a morphological and biochemical study. Endocrinology 138:778-789.
- 57. Diano S, Kalra SP, Horvath TL (1998) Leptin receptor immunoreactivity is associated with the Golgi apparatus of hypothalamic neurons and glial cells. J Neuroendocrinol 10:647-650.
- 58. Diano S, Horvath B, Urbanski HF, Sótonyi P, Horvath TL (2003) Fasting activates the nonhuman primate hypocretin (orexin) system and its postsynaptic targets. Endocrinology 144:3774-3778.
- 59. Diano S, Farr SA, Benoit SC, McNay EC, da Silva I, Horvath B, Gaskin FS, Nonaka N, Jaeger LB, Banks WA, Morley JE, Pinto S, Sherwin RS, Xu L, Yamada KA, Sleeman MW, Tschop MH, Horvath TL (2006) Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. Nat Neurosci 9:381-388.
- 60. Dickson SL, Luckman SM (1997) Induction of c-fos messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue, GH-releasing peptide-6. Endocrinology 138:771-777.
- 61. Dodson RE, Shryne JE, Gorski RA (1988) Hormonal Modification of the Number of Total and Late-Arising Neurons in the Central Part of the Medial Preoptic Nucleus of the Rat. Journal of Comparative Neurology 275:623-629.
- 62. Dolbeare F (1996) Bromodeoxyuridine: A diagnostic tool in biology and medicine .3. Proliferation in normal, injured and diseased tissue, growth factors,

differentiation, DNA replication sites and in situ hybridization. Histochemical Journal 28:531-575.

- 63. Dubuc PU (1985) Effects of estrogen on food intake, body weight, and temperature of male and female obese mice. Proc Soc Exp Biol Med 180:468-473.
- 64. Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Jobst EE, Tonelli-Lemos L, Billes SK, Glavas MM, Grayson BE, Perello M, Nillni EA, Grove KL, Cowley MA (2007) Dietinduced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. Cell Metab 5:181-194.
- 65. Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S (1999) Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. N Engl J Med 341:879-884.
- 66. Florenzano F, Viscomi MT, Mercaldo V, Longone P, Bernardi G, Bagni C, Molinari M, Carrive P (2006) P2X(2)R purinergic receptor subunit mRNA and protein are expressed by all hypothalamic hypocretin/orexin neurons. Journal of Comparative Neurology 498:58-67.
- 67. Fong TM, Mao C, MacNeil T, Kalyani R, Smith T, Weinberg D, Tota MR, VanderPloeg LHT (1997) ART (protein product of agouti-related transcript) as an antagonist of MC-3 and MC-4 receptors. Biochemical and Biophysical Research Communications 237:629-631.
- 68. Frisch RE, McArthur JW (1974) Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset. Science 185:949-951.
- 69. Fuxe K, Tinner B, Caberlotto L, Bunnemann B, Agnati LF (1997) NPY Y1 receptor like immunoreactivity exists in a subpopulation of beta-endorphin immunoreactive nerve cells in the arcuate nucleus: A double immunolabelling analysis in the rat. Neuroscience Letters 225:49-52.
- 70. Gao Q, Horvath TL (2007) Neurobiology of feeding and energy expenditure. Annu Rev Neurosci 30:367-398.
- 71. Gao Q, Wolfgang MJ, Neschen S, Morino K, Horvath TL, Shulman GI, Fu XY (2004) Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. Proc Natl Acad Sci U S A 101:4661-4666.
- 72. Gao Q, Mezei G, Nie Y, Rao Y, Choi CS, Bechmann I, Leranth C, Toran-Allerand D, Priest CA, Roberts JL, Gao XB, Mobbs C, Shulman GI, Diano S, Horvath TL (2007) Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. Nat Med 13:89-94.
- 73. Geary N, Asarian L, Korach KS, Pfaff DW, Ogawa S (2001) Deficits in E2dependent control of feeding, weight gain, and cholecystokinin satiation in ERalpha null mice. Endocrinology 142:4751-4757.
- 74. Gentry RT, Wade GN (1976) Sex-Differences in Sensitivity of Food-Intake, Body-Weight, and Running-Wheel Activity to Ovarian Steroids in Rats. Journal of Comparative and Physiological Psychology 90:747-754.
- 75. Gordon GRJ, Baimoukhametova DV, Hewitt SA, Rajapaksha W, Fisher TE, Bains JS (2005) Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. Nature Neuroscience 8:1078-1086.
- Gorski RA, Gordon JH, Shryne JE, Southam AM (1978) Evidence for a Morphological Sex Difference within Medial Preoptic Area of Rat-Brain. Brain Research 148:333-346.
- 77. Gropp E, Shanabrough M, Borok E, Xu AW, Janoschek R, Buch T, Plum L, Balthasar N, Hampel B, Waisman A, Barsh GS, Horvath TL, Bruning JC (2005)

Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. Nat Neurosci 8:1289-1291.

- Gualillo O, Caminos JE, Blanco M, Garcia-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Dieguez C, Casanueva FF (2001) Ghrelin, a novel placental-derived hormone. Endocrinology 142:788-794.
- 79. Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJS, Smith RG, VanderPloeg LHT, Howard AD (1997) Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. Molecular Brain Research 48:23-29.
- Guldner FH (1982) Sexual Dimorphisms of Axo-Spine Synapses and Postsynaptic Density Material in the Suprachiasmatic Nucleus of the Rat. Neuroscience Letters 28:145-150.
- Guldner FH (1983) Numbers of Neurons and Astroglial Cells in the Suprachiasmatic Nucleus of Male and Female Rats. Experimental Brain Research 50:373-376.
- 82. Guldner FH, Wolff JR (1996) Complex synaptic arrangements in the rat suprachiasmatic nucleus: a possible basis for the "Zeitgeber" and non-synaptic synchronization of neuronal activity. Cell Tissue Res 284:203-214.
- Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW (1998) Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. Nature Neuroscience 1:271-272.
- 84. Hajos F, Jancsik V, Sótonyi P (1996) Remote astroglial response associated with synaptic degeneration results in a net increase of perisynaptic glial fibrillary acidic protein. Acta Biol Hung 47:173-179.
- 85. Hajos F, Kalman M, Zilles K, Schleicher A, Sótonyi P (1990) Remote astrocytic response as demonstrated by glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry in the visual cortex of dorsal lateral geniculate nucleus lesioned rats. Glia 3:301-310.
- 86. Haskell-Luevano C, Chen PL, Li C, Chang K, Smith MS, Cameron JL, Cone RD (1999) Characterization of the neuroanatomical distribution of agouti-related protein immunoreactivity in the rhesus monkey and the rat. Endocrinology 140:1408-1415.
- 87. Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang BH, Kitagawa K, Inagaki C (2001) GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 86:4284-4291.
- 88. Herbison AE (1998) Multimodal influence of estrogen upon gonadotropinreleasing hormone neurons. Endocr Rev 19:302-330.
- 89. Herrmann JE, Imura T, Song B, Qi J, Ao Y, Nguyen TK, Korsak RA, Takeda K, Akira S, Sofroniew MV (2008) STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. J Neurosci 28:7231-7243.
- 90. Hewson AK, Dickson SL (2000) Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. Journal of Neuroendocrinology 12:1047-1049.
- 91. Hofman MA, Zhou JN, Swaab DF (1996) Suprachiasmatic nucleus of the human brain: An immunocytochemical and morphometric analysis. Anatomical Record 244:552-562.
- 92. Honda S, Harada N, Ito S, Takagi Y, Maeda S (1998) Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the cyp19 gene. Biochem Biophys Res Commun 252:445-449.

- 93. Horvath TL (1997) Suprachiasmatic efferents avoid phenestrated capillaries but innervate neuroendocrine cells, including those producing dopamine. Endocrinology 138:1312-1320.
- 94. Horvath TL (1998) An alternate pathway for visual signal integration into the hypothalamo-pituitary axis: retinorecipient intergeniculate neurons project to various regions of the hypothalamus and innervate neuroendocrine cells including those producing dopamine. J Neurosci 18:1546-1558.
- 95. Horvath TL (2005) The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. Nature Neuroscience 8:561-565.
- 96. Horvath TL (2006) Synaptic plasticity in energy balance regulation. Obesity (Silver Spring) 14 Suppl 5:228S-233S.
- 97. Horvath TL, Wikler KC (1999) Aromatase in developing sensory systems of the rat brain. Journal of Neuroendocrinology 11:77-84.
- 98. Horvath TL, Diano S (2004) The floating blueprint of hypothalamic feeding circuits. Nat Rev Neurosci 5:662-667.
- 99. Horvath TL, Gao XB (2005) Input organization and plasticity of hypocretin neurons: possible clues to obesity's association with insomnia. Cell Metab 1:279-286.
- 100. Horvath TL, Cela V, van der Beek EM (1998) Gender-specific apposition between vasoactive intestinal peptide-containing axons and gonadotrophin-releasing hormone-producing neurons in the rat. Brain Research 795:277-281.
- 101. Horvath TL, Diano S, van den Pol AN (1999a) Synaptic interaction between hypocretin (Orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: A novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. Journal of Neuroscience 19:1072-1087.
- 102. Horvath TL, Bechmann I, Naftolin F, Kalra SP, Leranth C (1997) Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. Brain Research 756:283-286.
- 103. Horvath TL, Diano S, Sakamoto H, Shughrue PJ, Merchenthaler I (1999b) Estrogen receptor beta and progesterone receptor mRNA in the intergeniculate leaflet of the female rat. Brain Research 844:196-200.
- 104. Horvath TL, Diano S, Sótonyi P, Heiman M, Tschop M (2001) Minireview: Ghrelin and the regulation of energy balance - A hypothalamic perspective. Endocrinology 142:4163-4169.
- 105. Horvath TL, Peyron C, Diano S, Ivanov A, Aston-Jones G, Kilduff TS, Van den Pol AN (1999c) Hypocretin (Orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. Journal of Comparative Neurology 415:145-159.
- 106. Horvath TL, Sarman B, Garcia-Caceres C, Enriori PJ, Sótonyi P, Shanabrough M, Borok E, Argente J, Chowen JA, Perez-Tilve D, Pfluger PT, Bronneke HS, Levin BE, Diano S, Cowley MA, Tschop MH (2010) Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. Proc Natl Acad Sci U S A 107:14875-14880.
- 107. Hsuchou H, Pan W, Barnes MJ, Kastin AJ (2009) Leptin receptor mRNA in rat brain astrocytes. Peptides 30:2275-2280.
- Hutchison JB, Wozniak A, Beyer C, Karolczak M, Hutchison RE (1999) Steroid metabolising enzymes in the determination of brain gender. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 69:85-96.

- Ikeda M, Allen CN (2003) Developmental changes in calbindin-D28k and calretinin expression in the mouse suprachiasmatic nucleus. European Journal of Neuroscience 17:1111-1118.
- 110. Ishizaki K, Honma S, Katsuno Y, Abe H, Masubuchi S, Namihira M, Honma K (2003) Gene expression of neuropeptide Y in the nucleus of the solitary tract is activated in rats under restricted daily feeding but not under 48-h food deprivation. Eur J Neurosci 17:2097-2105.
- 111. Jacobson CD, Davis FC, Gorski RA (1985) Formation of the Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area - Neuronal Growth, Migration and Changes in Cell Number. Developmental Brain Research 21:7-18.
- 112. Jain MR, Horvath TL, Kalra PS, Kalra SP (2000) Evidence that NPYY1 receptors are involved in stimulation of feeding by orexins (hypocretins) in sated rats. Regulatory Peptides 87:19-24.
- 113. Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson KM, Yao S, Simpson ER (2000) Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. Proc Natl Acad Sci U S A 97:12735-12740.
- Jones SH (2001) Circadian rhythms, multilevel models of emotion and bipolar disorder - An initial step towards integration? Clinical Psychology Review 21:1193-1209.
- 115. Judd SJ (1998) Disturbance of the reproductive axis induced by negative energy balance. Reprod Fertil Dev 10:65-72.
- 116. Kalra SP, Dube MG, Pu SY, Xu B, Horvath TL, Kalra PS (1999) Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. Endocrine Reviews 20:68-100.
- 117. Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I (2000) Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. Endocrinology 141:4797-4800.
- 118. Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I (2001) Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. Diabetes 50:2438-2443.
- 119. Kiss DS, Zsarnovszky A, Horvath K, Gyorffy A, Bartha T, Hazai D, Sótonyi P, Somogyi V, Frenyo LV, Diano S (2009) Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in the ventral and lateral hypothalamic area of female rats: morphological characterization and functional implications. Reprod Biol Endocrinol 7:31.
- 120. Kittner H, Franke H, Harsch JI, El-Ashmawy IM, Seidel B, Krugel U, Illes P (2006) Enhanced food intake after stimulation of hypothalamic P2Y(1) receptors in rats: modulation of feeding behaviour by extracellular nucleotides. European Journal of Neuroscience 24:2049-2056.
- 121. Knott TK, Marrero HG, Fenton RA, Custer EE, Dobson JG, Lemos JR (2007) Endogenous adenosine inhibits CNS terminal Ca2+ currents and exocytosis. Journal of Cellular Physiology 210:309-314.
- 122. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature 402:656-660.
- 123. Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, Jordan S, Adams EF, Lowe DG, Kangawa K, Grossman AB (2001) The expression of the growth hormone secretagogue receptor

ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 86:881-887.

- 124. Kornhauser JM, Mayo KE, Takahashi JS (1996a) Light, immediate-early genes, and circadian rhythms. Behavior Genetics 26:221-240.
- 125. Kornhauser JM, Ginty DD, Greenberg ME, Mayo KE, Takahashi JS (1996b) Light entrainment and activation of signal transduction pathways in the SCN. In: Hypothalamic Integration of Circadian Rhythms, pp 133-146.
- 126. Koutcherov Y, Mai JK, Paxinos G (2003) Hypothalamus of the human fetus. J Chem Neuroanat 26:253-270.
- 127. Kovacs EG, Szalay F, Racz B, Halasy K (2007) Chronic fasting-induced changes of neuropeptide Y immunoreactivity in the lateral septum of intact and ovariectomized female rats. Brain Res 1153:103-110.
- 128. Kozicz T (2003) Neurons colocalizing urocortin and cocaine and amphetamineregulated transcript immunoreactivities are induced by acute lipopolysaccharide stress in the Edinger-Westphal nucleus in the rat. Neuroscience 116:315-320.
- 129. Kruijver FPM, Swaab DF (2002) Sex hormone receptors are present in the human suprachiasmatic nucleus. Neuroendocrinology 75:296-305.
- 130. Kukkonen JP, Holmqvist T, Ammoun S, Akerman KEO (2002) Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. American Journal of Physiology-Cell Physiology 283:C1567-C1591.
- 131. Laughlin GA, Yen SS (1997) Hypoleptinemia in women athletes: absence of a diurnal rhythm with amenorrhea. J Clin Endocrinol Metab 82:318-321.
- 132. Lee AW, Pfaff DW (2008) Hormone effects on specific and global brain functions. Journal of Physiological Sciences 58:213-220.
- 133. Lephart ED (1996a) Dimorphic expression of calbindin-D-28K in the medial basal hypothalamus from perinatal male and female rats. Developmental Brain Research 96:281-284.
- 134. Lephart ED (1996b) A review of brain aromatase cytochrome P450. Brain Res Brain Res Rev 22:1-26.
- 135. Lephart ED, Lund TD, Horvath TL (2001) Brain androgen and progesterone metabolizing enzymes: biosynthesis, distribution and function. Brain Research Reviews 37:25-37.
- 136. Leranth C, Shanabrough M, Naftolin F (1991) Estrogen Induces Ultrastructural-Changes in Progesterone Receptor-Containing Gaba Neurons of the Primate Hypothalamus. Neuroendocrinology 54:571-579.
- 137. Leranth C, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F (1988) Immunohistochemical evidence for synaptic connections between proopiomelanocortin-immunoreactive axons and LH-RH neurons in the preoptic area of the rat. Brain Res 449:167-176.
- 138. Leranth C, Sakamoto H, Maclusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F (1985) Estrogen Responsive Cells in the Arcuate Nucleus of the Rat Contain Glutamic-Acid Decarboxylase (Gad) - an Electron-Microscopic Immunocytochemical Study. Brain Research 331:376-381.
- 139. Levin BE, Keesey RE (1998) Defense of differing body weight set points in dietinduced obese and resistant rats. Am J Physiol 274:R412-419.
- 140. Levin BE, Dunn-Meynell AA (2000) Defense of body weight against chronic caloric restriction in obesity-prone and -resistant rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 278:R231-237.

- Levin BE, Dunn-Meynell AA, Balkan B, Keesey RE (1997) Selective breeding for diet-induced obesity and resistance in Sprague-Dawley rats. Am J Physiol 273:R725-730.
- 142. Levin BE, Dunn-Meynell AA, McMinn JE, Alperovich M, Cunningham-Bussel A, Chua SC, Jr. (2003) A new obesity-prone, glucose-intolerant rat strain (F.DIO). Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 285:R1184-1191.
- 143. Liang YQ, Akishita M, Kim S, Ako J, Hashimoto M, Iijima K, Ohike Y, Watanabe T, Sudoh N, Toba K, Yoshizumi M, Ouchi Y (2002) Estrogen receptor beta is involved in the anorectic action of estrogen. Int J Obes Relat Metab Disord 26:1103-1109.
- 144. Licinio J, Negrao AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wong ML, Bongiorno PB, Mulla A, Cearnal L, Veldhuis JD, Flier JS, McCann SM, Gold PW (1998) Synchronicity of frequently sampled, 24-h concentrations of circulating leptin, luteinizing hormone, and estradiol in healthy women. Proc Natl Acad Sci U S A 95:2541-2546.
- 145. Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin XY, Qiu XH, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E (1999) The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. Cell 98:365-376.
- 146. Liu RJ, van den Pol AN, Aghajanian GK (2002) Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. Journal of Neuroscience 22:9453-9464.
- 147. Lopez M, Seoane LM, Garcia MD, Dieguez C, Senaris R (2002) Neuropeptide Y, but not agouti-related peptide or melanin-concentrating hormone, is a target peptide for orexin-A feeding actions in the rat hypothalamus. Neuroendocrinology 75:34-44.
- Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD (2005) NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. Science 310:683-685.
- 149. Maclusky NJ, Naftolin F (1981) Sexual-Differentiation of the Central Nervous-System. Science 211:1294-1303.
- 150. MacLusky NJ, Philip A, Hurlburt C, Naftolin F (1985) Estrogen formation in the developing rat brain: sex differences in aromatase activity during early post-natal life. Psychoneuroendocrinology 10:355-361.
- 151. Mattson MP (1992) Calcium as Sculptor and Destroyer of Neural Circuitry. Experimental Gerontology 27:29-49.
- 152. Miller KK, Parulekar MS, Schoenfeld E, Anderson E, Hubbard J, Klibanski A, Grinspoon SK (1998) Decreased leptin levels in normal weight women with hypothalamic amenorrhea: the effects of body composition and nutritional intake. J Clin Endocrinol Metab 83:2309-2312.
- 153. Moga D, Hof PR, Vissavajjhala P, Moran TM, Morrison JH (2002) Parvalbumincontaining interneurons in rat hippocampus have an AMPA receptor profile suggestive of vulnerability to excitotoxicity. J Chem Neuroanat 23:249-253.
- 154. Moga MM, Moore RY (1997) Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. Journal of Comparative Neurology 389:508-534.
- 155. Moore RY (1983) Organization and Function of a Central Nervous-System Circadian Oscillator - the Suprachiasmatic Hypothalamic Nucleus. Federation Proceedings 42:2783-2789.
- 156. Moore RY, Weis R, Moga MM (2000) Efferent projections of the intergeniculate leaflet and the ventral lateral geniculate nucleus in the hat. Journal of Comparative Neurology 420:398-418.

- 157. Moore RY, Speh JC, Leak RK (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. Cell and Tissue Research 309:89-98.
- 158. Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, Hosoda K, Ariyasu H, Yahata K, Mukoyama M, Sugawara A, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2000) Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. Febs Letters 486:213-216.
- 159. Muller C, Torrealba F (1998) Postnatal development of neuron number and connections in the suprachiasmatic nucleus of the hamster. Developmental Brain Research 110:203-213.
- 160. Naftolin F, Horvath TL, Balthazart J (2001) Estrogen synthetase (aromatase) immunohistochemistry reveals concordance between avian and rodent limbic systems and hypothalami. Exp Biol Med (Maywood) 226:717-725.
- 161. Naftolin F, Mor G, Horvath TL, Luquin S, Fajer AB, Kohen F, Garcia-Segura LM (1996) Synaptic remodeling in the arcuate nucleus during the estrous cycle is induced by estrogen and precedes the preovulatory gonadotropin surge. Endocrinology 137:5576-5580.
- 162. Naftolin F, Garcia-Segura LM, Horvath TL, Zsarnovszky A, Demir N, Fadiel A, Leranth C, Vondracek-Klepper S, Lewis C, Chang A, Parducz A (2007) Estrogeninduced hypothalamic synaptic plasticity and pituitary sensitization in the control of the estrogen-induced gonadotrophin surge. Reproductive Sciences 14:101-116.
- 163. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. Nature 409:194-198.
- 164. Nilsen J, Mor G, Naftolin F (2000) Estrogen-regulated developmental neuronal apoptosis is determined by estrogen receptor subtype and the Fas/Fas ligand system. Journal of Neurobiology 43:64-78.
- 165. Nishizuka M, Sumida H, Kano Y, Arai Y (1993) Formation of Neurons in the Sexually Dimorphic Anteroventral Periventricular Nucleus of the Preoptic Area of the Rat - Effects of Prenatal Treatment with Testosterone Propionate. Journal of Neuroendocrinology 5:569-573.
- 166. Oral EA, Ruiz E, Andewelt A, Sebring N, Wagner AJ, Depaoli AM, Gorden P (2002) Effect of leptin replacement on pituitary hormone regulation in patients with severe lipodystrophy. J Clin Endocrinol Metab 87:3110-3117.
- 167. Palmer K, Gray JM (1986) Central vs. peripheral effects of estrogen on food intake and lipoprotein lipase activity in ovariectomized rats. Physiol Behav 37:187-189.
- 168. Parry BL, Newton RP (2001) Chronobiological basis of female-specific mood disorders. Neuropsychopharmacology 25:S102-S108.
- 169. Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sydney.
- 170. Pickard GE (1994) Intergeniculate Leaflet Ablation Alters Circadian-Rhythms in the Mouse. Neuroreport 5:2186-2188.
- 171. Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, Friedman JM, Horvath TL (2004) Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. Science 304:110-115.
- 172. Plagemann A (2006) Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. Horm Res 65 Suppl 3:83-89.
- 173. Powis JE, Bains JS, Ferguson AV (1998) Leptin depolarizes rat hypothalamic paraventricular nucleus neurons. American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology 274:R1468-R1472.

- 174. Pronchuk N, Beck-Sickinger AG, Colmers WF (2002) Multiple NPY receptors Inhibit GABA(A) synaptic responses of rat medial parvocellular effector neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. Endocrinology 143:535-543.
- 175. Robertson KM, O'Donnell L, Jones ME, Meachem SJ, Boon WC, Fisher CR, Graves KH, McLachlan RI, Simpson ER (1999) Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. Proc Natl Acad Sci U S A 96:7986-7991.
- 176. Robinson SM, Fox TO, Dikkes P, Pearlstein RA (1986) Sex-Differences in the Shape of the Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area and Suprachiasmatic Nucleus of the Rat - 3-D Computer Reconstructions and Morphometrics. Brain Research 371:380-384.
- 177. Roesch DM (2006) Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. Physiol Behav 87:39-44.
- 178. Roselli CE, Ellinwood WE, Resko JA (1984) Regulation of brain aromatase activity in rats. Endocrinology 114:192-200.
- 179. Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, Sakai T (2002) Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. Peptides 23:531-536.
- 180. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JRS, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998) Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. Cell 92:573-585.
- 181. Samson WK, Gosnell B, Chang JK, Resch ZT, Murphy TC (1999) Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain. Brain Research 831:248-253.
- 182. Saper CB (1990) Cholinergic system. In: Paxinos G (ed) The human nervous system Academic Press: New York:1095-1114.
- 183. Scharfman HE, MacLusky NJ (2008) Estrogen-growth factor interactions and their contributions to neurological disorders. Headache 48 Suppl 2:S77-89.
- 184. Schull J, Walker J, Fitzgerald K, Hiilivirta L, Ruckdeschel J, Schumacher D, Stanger D, McEachron DL (1989) Effects of Sex, Thyro-Parathyroidectomy, and Light Regime on Levels and Circadian-Rhythms of Wheel-Running in Rats. Physiology & Behavior 46:341-346.
- 185. Schwanzel-Fukuda M, Jorgenson KL, Bergen HT, Weesner GD, Pfaff DW (1992) Biology of normal luteinizing hormone-releasing hormone neurons during and after their migration from olfactory placode. Endocr Rev 13:623-634.
- 186. Segovia S, Guillamon A, del Cerro MCR, Ortega E, Perez-Laso C, Rodriguez-Zafra M, Beyer C (1999) The development of brain sex differences: a multisignaling process. Behavioural Brain Research 105:69-80.
- 187. Seidel B, Biql M, Franke H, Kittner H, Kiess W, Illes P, Krugel U (2006) Expression of purinergic receptors in the hypothalamus of the rat is modified by reduced food availability. Brain Research 1089:143-152.
- 188. Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2001) Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. Diabetes 50:227-232.

- 189. Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I (1997) Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. Journal of Comparative Neurology 388:507-525.
- 190. Simpson ER (1998) Genetic mutations resulting in estrogen insufficiency in the male. Mol Cell Endocrinol 145:55-59.
- 191. Smith TM, Kirley TL (1998) Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology 1386:65-78.
- 192. Sodersten P, Hansen S, Srebro B (1981) Suprachiasmatic Lesions Disrupt the Daily Rhythmicity in the Sexual-Behavior of Normal-Male Rats and of Male-Rats Treated Neonatally with Antioestrogen. Journal of Endocrinology 88:125-130.
- 193. Sótonyi P, Gao Q, Bechmann I, Horvath TL (2010a) Estrogen Promotes Parvalbumin Expression in Arcuate Nucleus POMC Neurons. Reprod Sci.
- 194. Sótonyi P, Mezei G, Racz B, Dallman MF, Abizaid A, Horvath TL (2010b) Gonadotropin-Releasing Hormone Fibers Contact POMC Neurons in the Hypothalamic Arcuate Nucleus. Reprod Sci.
- 195. Spanswick D, Smith MA, Groppi VE, Logan SD, Ashford MLJ (1997) Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. Nature 390:521-525.
- 196. Stuart E, Lephart ED (1999) Dimorphic expression of medial basal hypothalamicpreoptic area calbindin-D-28K mRNA during perinatal development and adult distribution of calbindin-D-28K mRNA in Sprague-Dawley rats. Molecular Brain Research 73:60-67.
- 197. Su JD, Qiu J, Zhong YP, Chen YZ (2001) Expression of estrogen receptor -alpha and -beta immunoreactivity in the cultured neonatal suprachiasmatic nucleus: with special attention to GABAergic neurons. Neuroreport 12:1955-1959.
- 198. Sumida H, Nishizuka M, Kano Y, Arai Y (1993) Sex-Differences in the Anteroventral Periventricular Nucleus of the Preoptic Area and in the Related Effects of Androgen in Prenatal Rats. Neuroscience Letters 151:41-44.
- 199. Swaab DF (1995) Development of the Human Hypothalamus. Neurochemical Research 20:509-519.
- 200. Tanaka M, Hayashida Y, Nakao N, Nakai N, Nakashima K (2001) Testis-specific and developmentally induced expression of a ghrelin gene-derived transcript that encodes a novel polypeptide in the mouse. Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression 1522:62-65.
- 201. Thakkar MM, Winston S, McCarley RW (2002) Orexin neurons of the hypothalamus express adenosine Al receptors. Brain Research 944:190-194.
- 202. Toran-Allerand CD, Guan XP, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, Singh M, Connolly ES, Nethrapalli IS, Tinnikov AA (2002) ER-X: A novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. Journal of Neuroscience 22:8391-8401.
- 203. Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S (2001) Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. Biochemical and Biophysical Research Communications 281:1220-1225.
- 204. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. Nature 407:908-913.
- 205. Tschop M, Flora DB, Mayer JP, Heiman ML (2002) Hypophysectomy prevents ghrelin-induced adiposity and increases gastric ghrelin secretion in rats. Obes Res 10:991-999.
- 206. Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML (2001) Circulating Ghrelin levels are decreased in human obesity. Diabetes 50:707-709.
- 207. Tung YCL, Hewson AK, Dickson SL (2001) Actions of leptin on growth hormone secretagogue-responsive neurones in the rat hypothalamic arcuate nucleus recorded in vitro. Journal of Neuroendocrinology 13:209-215.
- 208. Turek FW, Dugovic C, Zee PC (2001) Current understanding of the circadian clock and the clinical implications for neurological disorders. Archives of Neurology 58:1781-1787.
- 209. VanderBeek EM, Horvath TL, Wiegant VM, VandenHurk R, Buijs RM (1997) Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: Combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. Journal of Comparative Neurology 384:569-579.
- 210. Volante M, Allia E, Gugliotta P, Funaro A, Broglio F, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E, Papotti M (2002) Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 87:1300-1308.
- 211. Wade GN, Schneider JE, Li HY (1996) Control of fertility by metabolic cues. Am J Physiol 270:E1-19.
- 212. Wallingford N, Perroud B, Gao Q, Coppola A, Gyengesi E, Liu ZW, Gao XB, Diament A, Haus KA, Shariat-Madar Z, Mahdi F, Wardlaw SL, Schmaier AH, Warden CH, Diano S (2009) Prolylcarboxypeptidase regulates food intake by inactivating alpha-MSH in rodents. J Clin Invest 119:2291-2303.
- 213. Wang LX, Saint-Pierre DH, Tache Y (2002) Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. Neuroscience Letters 325:47-51.
- 214. Wang TF, Guidotti G (1998) Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. Brain Research 790:318-322.
- 215. Watanobe H (2002) Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate gonadotropin-releasing hormone secretion in vivo in rats. J Physiol 545:255-268.
- 216. Waters EM, Mitterling K, Spencer JL, Mazid S, McEwen BS, Milner TA (2009) Estrogen receptor alpha and beta specific agonists regulate expression of synaptic proteins in rat hippocampus. Brain Res 1290:1-11.
- 217. Watts AG, Swanson LW, Sanchez-Watts G (1987) Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. J Comp Neurol 258:204-229.
- 218. Weinert D (2005) Ontogenetic development of the mammalian circadian system. Chronobiol Int 22:179-205.
- 219. Welt CK, Chan JL, Bullen J, Murphy R, Smith P, DePaoli AM, Karalis A, Mantzoros CS (2004) Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. N Engl J Med 351:987-997.
- 220. Wever RA (1984) Sex-Differences in Human Circadian-Rhythms Intrinsic Periods and Sleep Fractions. Experientia 40:1226-1234.
- 221. Willesen MG, Kristensen P, Romer J (1999) Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. Neuroendocrinology 70:306-316.

- 222. Wollmann G, Acuna-Goycolea C, van den Pol AN (2005) Direct excitation of hypocretin/orexin cells by extracellular ATP at P2X receptors. Journal of Neurophysiology 94:2195-2206.
- 223. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillo WS, Ghatei MA, Bloom SR (2001) Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. J Clin Endocrinol Metab 86:5992.
- 224. Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR (2000) The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. Endocrinology 141:4325-4328.
- 225. Xu B, Li BH, Rowland NE, Kalra SP (1995) Neuropeptide-Y Injection into the 4th Cerebroventricle Stimulates C-Fos Expression in the Paraventricular Nucleus and Other Nuclei in the Forebrain Effect of Food-Consumption. Brain Research 698:227-231.
- 226. Zamir N, Skofitsch G, Jacobowitz DM (1986) Distribution of Immunoreactive Melanin-Concentrating Hormone in the Central-Nervous-System of the Rat. Brain Research 373:240-245.
- 227. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372:425-432.
- 228. Zucker I, Morin LP (1977) Photoperiodic Influences on Testicular Regression, Recrudescence and Induction of Scoto Refractoriness in Male Golden-Hamsters. Biology of Reproduction 17:493-498.
- 229. Zup SL, Carrier H, Waters EM, Tabor A, Bengston L, Rosen GJ, Simerly RB, Forger NG (2003) Overexpression of Bcl-2 reduces sex differences in neuron number in the brain and spinal cord. Journal of Neuroscience 23:2357-2362.

### Az értekezés témakörében megjelent közlemények

- 1. Sótonyi P, Mezei G, Racz B, Dallman MF, Abizaid A, Horvath TL. (2010) Gonadotropin-Releasing Hormone Fibers Contact POMC Neurons in the Hypothalamic Arcuate Nucleus. REPRODUCTIVE SCIENCES (in press) Pubmed ID: 20713970 IF: 2.314 Független hiv. száma: -
- Sótonyi P, Gao Q, Bechmann I, Horvath TL (2010) Estrogen Promotes Parvalbumin Expression in Arcuate Nucleus POMC Neurons. REPRODUCTIVE SCIENCES (in press) Pubmed ID: 20713969 IF: 2.314 Független hiv. száma: -
- Horvath TL, Sarman B, García-Cáceres C, Enriori PJ, Sótonyi P, Shanabrough M, Borok E, Argente J, Chowen JA, Perez-Tilve D, Pfluger PT, Brönneke HS, Levin BE, Diano S, Cowley MA, Tschöp MH. (2010) Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. PROC. NATL. ACAD. SCI. (PNAS) USA. 107(33):14875-80. IF: 9.432 Független hiv. száma: -
- Kiss DS, Zsarnovszky A, Horvath K, Gyorffy A, Bartha T, Hazai D, Sótonyi P, Somogyi V, Frenyo LV, Diano S (2009) Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in the ventral and lateral hypothalamic area of female rats: morphological characterization and functional implications. REPRODUCTIVE BIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY 7: p. 31. IF: 2.077 Független hiv. száma: -
- 5. Abizaid A, Mezei G, Sótonyi P, Horvath TL (2004) Sex differences in adult suprachiasmatic nucleus neurons emerging late prenatally in rats. EUR. J. NEUROSCIENCE 19:2488-2496. IF: 3.872 Független hiv. száma: 12
- 6. Diano S, Horvath B, Urbanski HF, Sótonyi P, Horvath TL (2003) Fasting activates the nonhuman primate hypocretin (orexin) system and its postsynaptic targets. ENDOCRINOLOGY 144:(9) pp. 3774-3778. IF: 5.063 Független hiv. száma: 27
- Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sótonyi P, Friedman JM, Liu HY, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL (2003) *The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis*. NEURON 37(4) pp. 649-661. IF: 14.109 *Független hiv. száma: 315*
- Horvath TL, Diano S, Sótonyi P, Heiman M, Tschop M (2001) Minireview: Ghrelin and the regulation of energy balance - A hypothalamic perspective. ENDOCRINOLOGY 142:(10) pp. 4163-4169. IF: 4.971 Független hiv. száma: 307

- Hajos F, Jancsik V, Sótonyi P (1996) Remote astroglial response associated with synaptic degeneration results in a net increase of perisynaptic glial fibrillary acidic protein. ACTA BIOL. HUNG. 47:(1-4) pp. 173-179. IF: 0.239 Független hiv. száma: -
- 10. Hajos F, Kalman M, Zilles K, Schleicher A, Sótonyi P (1990) Remote astrocytic response as demonstrated by glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry in the visual-cortex of dorsal lateral geniculate-nucleus lesioned rats.GLIA 3:(4) pp. 301-310. IF: 4.010 Független hiv. száma: 30

### A tudományos munkásságot meghatározó egyéb közlemények

Külföldi impakt faktoros lapokban megjelent közlemények

Fokozat megszerzése után

- Hajós F, Gerics B, Sótonyi P (1992) Slices from the rat olfacctory bulb maintained in vitro. Morphological aspects. JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS, 44. 225-232. IF: 1.567 Független hiv. száma: 2
- Zilles K, Hajós F, Csillag A, Kálmán M, Sótonyi P, Schleicher A (1993) Vasoactive intestinal polypeptide immunoreactive structures in the mouse barrel field. BRAIN RES 618, 149-154 IF: 2.854 Független hiv. száma: 2
- Hajós F, Zilles K, Zsarnovszky A, Sótonyi P, Gallatz K, Schleicher A (1998) Modular distribution of vasoactive intestinal polypeptide int he rat barrel cortex: Changes induced by neonatal removal of vibrissae. NEUROSCIENCE 85, 45-52 IF: 3.591 Független hiv. száma: 1
- Szatmári V, Németh T, Kótai I, Károly V, Sótonyi P. (2000) Doppler ultrasonographic diagnosis and anatomy of congenital intrahepatic arterioportal fistula in a puppy. VETERINARY RADIOLOGY & ULTRASOUND, 41. (3), pp. 284-286., 2000 IF: 0.526 Független hiv. száma: 7
- 5. Szatmari V, Sótonyi P, Fenyves B, Vörös K (2000): Doppler-ultrasonographic detection of retrograde pulsatile flow in the caudal vena cava of a puppy with cor triatriatum dexter. VETERINARY RECORD, 147., pp. 68-72. IF: 1.236 Független hiv. száma: 3
- 6. Szatmari V, Sótonyi P, Vörös K (2001) Normal duplex Doppler waveforms of major abdominal blood vessels in dogs: a review. VET RADIOL ULTRASOUND. 2001, 42(2): 93-107. IF: 0.731 Független hiv. száma: 25
- Szatmari V, van den Ingh TS, Fenyves B, Sótonyi P, Kotai I, Petrasi Z, Vörös K (2002) Portal hypertension in a dog due to circumscribed fibrosis of the wall of the extrahepatic portal vein. VETERINARY RECORD. 11: 150(19):602-5 IF: 1.221 Független hiv. száma: 1

## dc\_25\_10

Horváth TL, Diano S, Leranth C, Garcia-Segura LM, Cowley MA, Shanabrough M, Elsworth JD, Sótonyi P, Roth RH, Dietrich EH, Matthews RT, Barnstable CJ, Redmond DE Jr (2003) Coenzyme Q induces nigral mitochondrial uncoupling and prevents dopamine cell loss in a primate model of Parkinson's disease. ENDOCRINOLOGY, 2003 Jul; 144 (7): 2757-60. IF: 5.063 Független hiv. száma: 26

#### Hazai idegen nyelvű impakt faktoros közlemények

#### Fokozat megszerzése után

- Bodó G, Hangody L, Szabó Zs, Peham CH, Schinzel M, Girtler D, Sótonyi P. (2000) Arthroscopic autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of subchondral cystic lesion in the medial femoral condyle in a horse. ACTA VET. HUNG, 48.(3), pp. 343-354. IF: 0.511 Független hiv. száma: 13
- 2. Balogh E, **Sótonyi P** (2003) *Histological studies on embryonic development of the rabbit heart*. ACTA VET. HUNG. 51 (1) 1-13. **IF: 0.535 Független hiv. száma: 1**
- 3. Balogh E, Sótonyi P (2003) Multiple cardiac anomaly in sheep: A case study and review of the literature. ACTA VET. HUNG. 51 (1) 15-27. IF: 0.535 Független hiv. száma: -
- Halmay D, Sótonyi P, Vajdovich P, Gaál T (2005) Morphological evaluation of canine platelets on Giemsa and Pas-stained blood smears. ACTA VET. HUNG. 53 (3), 337-350 IF: 0.530 Független hiv. száma: -
- Kutasi O, Vörös K, Biksi I, Szenci O, Sótonyi P (2007) Common atrioventricular canal in a newborn foal — Case report and review of the literature ACTA VET. HUNG. 55. (1)51-65. IF: 0.474 Független hiv. száma: -

#### Hazai magyar nyelvű impakt faktoros közlemények

Fokozat megszerzése után

- Szladovits Zs, Szladovits B, Gaál T, Sótonyi P (2006) Az agy-gerincvelői folyadék (liquor cerebrospinalis) vizsgálatának jelentősége a kutyák idegrendszeri betegségeinek kórjelzésében 1. A liquorvétel módszere, indikációi és a liquor vizgsálata MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA 10, 624-631 IF: 0.155 Független hiv. száma: -
- Szladovits Zs, Szladovits B, Gaál T, Sótonyi P (2006) Az agy-gerincvelői folyadék (liquor cerebrospinalis) vizsgálatának jelentősége a kutyák idegrendszeri betegségeinek kórjelzésében 1. A liquorvétel módszere, indikációi és a liquor vizgsálata MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA 11, 649-654 IF: 0.155 Független hiv. száma: -

### dc\_25\_10

#### Önálló fejezetek külföldi és hazai kiadású könyvekben, monográfiákban

- 1. Sótonyi P: *A fejlődés genetikája és szabályozása*, Fehér, Gy.: Háziállatok fejlődéstana. Egyetemi jegyzet, Budapest, 1979. 113-161.
- Sótonyi P: A tejmirigy anatómiája és a tejtermelés élettana c. fejezet. Tejgazdasági kézikönyv 17-42, Gazda Kistermelői Lap és Könyvkiadó Kft Bp. 1996
- 3. Sótonyi P: A tőgy funkcionális anatómiája és élettana. In: Simon F. (szerk.): A tőgyegészségtan és a minőségi tehéntej-termelés alapjai. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 2000. P. 12-56.
- 4. Sótonyi P: Mitarbeiter In: Thomas David (Hrsg.), *Atlas der Kleintierchirurgie*. Hannover, Schlütersche, 2000. Oktober 12., p. 408.
- Sótonyi P: Lymfaticky systém psa (The lymphatic system of the dog). In: F. Lesník, J. Danko: Medicinska lymfológia, Hajko & Hajková Bratislava 2005. pp. 72-83.
- 6. **Sótonyi P,** Petneházy Ö, Szladovits Zs, *Lymfaticky systém potkana* (The lymphatic system of the rat). In F. Lesník, J. Danko: Medicinska lymfológia, Medicinska lymfológia, Book chapter, Hajko & Hajková Bratislava 2005. pp. 64-68.
- Horn P, Sótonyi P, Repa I. Cross-sectional CT and MR Anatomy Atlas of the Domestic Pig. University of Kaposvár, Láng Publishing and Holding Company, 2005.
- Sótonyi P: Az állatok mozgásának elemzése (A csirke kikelésétől a Spanyol Lovasiskoláig). Mindentudás Egyeteme, Hatodik kötet Kossuth Kiadó 2006. pp. 185-208
- König HE, Sótonyi P, und Liebich HG, Verdauungsapparat pp. 301-366. Herausgegeben von: Horst Erich König, Hans-Georg Liebich: Anatomie der Haussaugetiere, német nyelvű Schattauer GmbH, Stuttgart, Germany, 2009 ISBN 978-3-7945-2650-5
- König HE, Sótonyi P, Probst A, Maierl J, und Liebich HG, Topographischklinische Anatomie pp. 657-719. Herausgegeben von: Horst Erich König, Hans-Georg Liebich: Anatomie der Haussaugetiere, német nyelvű Schattauer GmbH, Stuttgart, Germany, 2009 ISBN 978-3-7945-2650-5
- 11. König HE, Sótonyi P und H.-G. Liebich: *Digestive system* (apparatus digestorius) pp. 301-368. Editors: Horst Erich König, Hans-Georg Liebich: Veterinay Anatomy of Domestic Mammals, angol nyelvű Schattauer GmbH, Stuttgart, Germany 2009 ISBN 978-3-7945-2677-2
- König HE, Sótonyi P, A. Probst, J. Maierl und H.-G. Liebich: *Topographical-clinical anatomy* pp. 661-726. Editors: Horst Erich König, Hans-Georg Liebich: Veterinay Anatomy of Domestic Mammals, angol nyelvű Schattauer GmbH, Stuttgart, Germany 2009 ISBN 978-3-7945-2677-2
- Sótonyi P: A magyar állatorvosi szaknyelv változása pp. 44-52 Járomfa, mozvány, nőtövény... A nyelvújítás során született szaknyelvünk "szokott és szokatlan" szavai, Magyar Mezőgazdasági Múzeum, Budapest, 2009. ISBN: 978-963-7092-68-8
- 14. König HE, Sótonyi P, Liebich HG Digestive system (apparatus digestorius) pp. 331-434 In: König HE, Liebig HG (szerk.) Veterinary Anatomy of Domestic

Mammals, japán nyelvű. Stuttgart; New York: Schattauer Verlag, 2010. ISBN:978-4-88500-671-5

- 15. König HE, Sótonyi P, Probst A, Maierl J, Liebich HG Topographical-clinical anatomy pp 737-804 In: König HE, Liebig HG (szerk.) Veterinary Anatomy of Domestic Mammals, japán nyelvű. Stuttgart; New York: Schattauer Verlag, 2010. ISBN:978-4-88500-672-2
- 16. Sótonyi P: Anatomie und Physiologie. In: Tóth J, Hollerrieder J, Sótonyi P Augenheilkunde beim Pferd. Schattauer GmbH, Stuttgart, Germany 2010. pp. 3-31. ISBN:978-3-7945-2638-3
- 17. Sótonyi P: Széchényi a magyar lóversenyzés meghonosítója. In: Gróf Széchenyi István hatása hazánk sportkultúrájára. Kiadó: Magyar Sporttudományi Társaság Szerkesztő: dr. Szőts Gábor (2010 *in press*) ISBN: 978-963-87701-6-5

### Multimédiás CD-ROM-ok

- 1. Sótonyi P: Anatomia canis CD-ROM I.: Extremitas cranialis, magyar, német, angol és japán nyelven. Székesfehérvár, Kisállatklinika Kft., 1999-2010.
- 2. Sótonyi P: Anatomia canis CD-ROM II.: Extremitas caudalis, magyar, német, angol és japán nyelven. Székesfehérvár, Kisállatklinika Kft., 1999-2010.

Egyéb szakcikkek, tanulmányok nem impakt faktoros osztálylistás folyóiratokban

Fokozat megszerzése után

- Sótonyi P (2010) A ló anatómiai sajátosságainak összefüggése a ló teljesítményével. ÁLLATTENYÉSZTÉS ÉS TAKARMÁNYOZÁS 59:(4) pp. 317-333.
- Langer D, Faludi J, Tóth M, Sótonyi P (2010) Ló sportélettani kutatások, a sportteljesítmény megalapozásának egyik módja. ÁLLATTENYÉSZTÉS ÉS TAKARMÁNYOZÁS 59:(4) pp. 253-262.

# Rövidítések jegyzéke

AGRP:	aguti related protein
AMPA:	α-amino-3-hydroxil-5-metil-4-isoxazol-propionát
ARC:	nucleus arcuatus
ATP:	adenozin trifoszfát
AVP:	arginin-vasopressin
AVPV:	anteroventralis preopticus area
<b>BDNF:</b>	brain derived neurotrophic factor
BrDU:	5-bromo-2'-dezoxiuridin
CRH:	corticotropin-releasing hormon
DAB:	3,3'-Diaminobenzidin
DIO:	diet induced obesity - elhízásra hajlamos állat
DMH:	dorsomedialis hypothalamus
DR:	diet-resistent – elhízásra nem hajlamos állat
E2:	17β-ösztradiol
GABA:	gamma amino-butiric acid - gamma-amino vajsav
GAD:	glutamin acid decarboxylase - glutaminsav dekarboxiláz enzim
GFP:	green fluorescens protein – zöld fluoreszkáló fehérje
GH:	growth hormone – növekedési hormon
GluR:	glutamát receptor
GnRH:	gonadotropin realising hormone
HCD:	high calorie diet – magas kalóriatartalmú táplálék
HCRT:	hypocretin (másnéven orexin)
HFD:	high fat diet – magas zsírtartalmú táplálék
IGL:	intragenicularis lemez
IPSC:	spontán gátló postsynapticus áram - spontaneous inhibitory postsynapite current
IR:	immunreaktív
LH:	luteinizáló hormon
LaH:	lateralis hypothalamus
MC4R:	melanocortin receptor 4-es altípus
MPOA:	medialis preopticus area
NPY:	neuropeptid Y
OVX:	ovariectomia, ovariectomizált (értelemszerűen)
P450aro:	P450 aromatáz
POMC:	pro-opiomelanocortin
<b>PVN:</b>	nucleus paraventricularis
SFP:	sapphire fluorescent protein - zafírzöld fluoreszkáló fehérje
SCN:	nucleus suprachiasmaticus
SD:	Standard diet – normál/standard táplálás
VIP:	vasoaktív intestinalis polypeptid
VMH:	ventromedialis hypothalamus

### dc\_25\_10

# 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt hálával és köszönettel tartozom szüleimnek, szeretetével és elfogult bizalmával mindig mellettem álló **édesanyámnak**, az oktató és tudományos kutató munka iránti érdeklődésemet felkeltő **édesapámnak**, valamint erőt adó szeretetükkel nyugalmat és harmónikus hátteret biztosító **feleségemnek** és **gyermekeimnek**.

Köszönettel tartozom összes tanszéki munkatársamnak, akiknek támogatását és segítségét mindvégig éreztem. Közülük is ki kell emelnem Dr. Rácz Bence egyetemi adjunktus nevét, aki különösen a disszertáció összeállításában volt nélkülözhetetlen segítségemre. Köszönöm Dr. Halasy Katalin egyetemi tanárnak hasznos tanácsait és külön köszönet illeti Dr. Hajós Ferenc egyetemi tanárt, aki húsz évvel ezelőtt a neurobiológia irányába terelte érdeklődésemet. Köszönöm Kováts Adriennek áldozatkész munkáját az adminsztráció átvállalásáért.

Nagy szeretettel és hálával gondolok **Dr. Horváth Tamásra**, a Yale Egyetem professzorára valamint feleségére, egyben munkatársára, **Sabrina Dianora**, akik több alkalommal is befogadtak, nem csak laboratóriumukba, de otthonukba is. Köszönettel tartozom a Yale Egyetem Horváth professzor által vezetett tanszék és laboratórium **összes dolgozójának**, akik segítségemre voltak a kísérletek végzésénél, és akik nélkül disszertációm el sem készülhetett volna. A Yale Egyetem szellemiségének meghatározó szerepe volt abban, hogy a tudományos gondolkodást más szemmel nézzem.