

**MTA doktori értekezés tézisei**

**Neuromodulátorok az energiaháztartás  
és a stresszválasz szabályozásában**

**Dr. Tóth Zsuzsanna**

**Semmelweis Egyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet**



**Budapest**

**2024**



---

## Tartalomjegyzék

---

Bevezetés.....	2
Célkitűzések.....	4
Tézisek.....	5
I. Az immunhisztokémia alkalmazásának továbbfejlesztése.....	5
II. Az energiaháztartás szabályozás vizsgálata.....	6
III. A stresszválasz finomhangolásának tanulmányozása.....	10
A tézisek új tudományos eredményei.....	14
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	16
Rövidítések jegyzéke.....	19
Köszönetnyilvánítás.....	20

---

## Bevezetés

---

A szervezetben a homeosztatis integráció fő agyi központja a hipotalamusz. Számos magot tartalmaz, mely lehetővé teszi a munkafolyamatok hatékony organizálását. A hipotalamusz jelátviteli folyamataiban fontos szerepet játszanak a neuromodulátorként ható neuropeptidok. Egy sejtben többféle neuropeptid is termelődhet, és egy neuropeptid általában többféle működés szabályozásában is részt vesz. Munkám során az energiaháztartás és a stresszválasz szabályozásával foglalkoztam elsősorban két anorexigén neuropeptid, a prolaktin-felszabadító peptid (*prolactin-releasing peptide*, PrRP) és a nesfatin-1 vizsgálatán keresztül.

Nevével ellentétben a PrRP a prolaktin elválasztásra fiziológiásan nem hat. A PrRP-termelő neuronok és az általuk beidegzett területek elhelyezkedése sokkal inkább a stresszválaszban való részvételére utalt. PrRP-t szintetizálnak a nyúltvelői noradrenerg sejtek, az A1 és A2 sejtcsoport nucleus tractus solitarii területére eső neuronjai (A2-NTS). A nyúltvelői PrRP expresszió patkányokban gonadális szabályozás alatt áll, proösztroszos nőstényekben a legmagasabb. Ezenkívül a hipotalamusz nucleus dorsomedialisában (DM) termelődik még PrRP, ahol a sejtek nem tartalmaznak noradrenalin. Az A1 és az A2-NTS noradrenerg sejtjeinek felszálló axonjai alkotják a ventrális noradrenerg köteget, ami a szervezetet érő stressz esetén elsődlegesen felelős a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese (*hypothalamic-pituitary-adrenal*, HPA) tengely aktiválásáért, vagyis a nucleus paraventricularis hypothalami (*hypothalamic paraventricular nucleus*, PVN) kortikotropin-felszabadító hormonon (*corticotropin-releasing hormone*, CRH) tartalmú neuronjainak a stimulálásáért. A portális keringésbe ürülő CRH ezután a hipofízisben adrenokortikotrop hormon (*adrenocorticotrop hormone*, ACTH) felszabadulást idéz elő, melynek következtében fokozódik a mellékvesekéregből a glükokortikoidok szekréciója. Az A1 sejtcsoport látja el továbbá szinte teljes mértékben excitatoros noradrenerg beidegzéssel a vértérfogat szabályozásáért és a

nátrium háztartásért felelős magnocelluláris sejteket a PVN területén és szupraoptikus magban, valamint az ozmoregulációs válaszok központi koordinátorát, az anteroventrális periventrikuláris areát (AV3V). Különböző akut fizikai és pszichés stressz hatására mindhárom PrRP sejtpopuláció aktiválódik. A PrRP stimulálja a HPA tengelyt, és nagymértékben potenciózza a noradrenalin ACTH elválasztást stimuláló hatását. Ezenkívül befolyásolja a kardiovaszkuláris rendszer működését, emeli a vérnyomást és a növeli a szívfrekvenciát. A PrRP saját receptora a PrRPR (GPR10), kardiovaszkuláris hatásait egy rokon peptid, a neuropeptid FF 2-es típusú receptora (NPFF2R) közvetíti.

A nesfatin-1 a nucleobindin<sup>2</sup>-encoded satiety- and fat-influencing protein, más néven NUCB2 fehérje N-terminális szekretábilis fragmense. A nesfatin-1 és prekursora a NUCB2, fehérje- és mRNS- szinten nem különíthető el a sejtekben, ezért ezek kimutatásakor a két molekulát együttesen nesfatinként említjük. Intracerebroventrikuláris (oldalkamrába, icv) kezelések során viszont nesfatin-1 peptidet használtunk. A nesfatin-1 icv alkalmazását követően a patkányok éjszakai táplálékfelvétele erőteljesen csökken, hatását leptin független módon fejt ki. Testsúlycsökkenést csak hosszú távú adagolása okoz. Humán relevanciáját jelzi, hogy a NUCB2 génben a testtömegindexszel összefüggő genetikai variációkat azonosítottak. A központi idegrendszerben számos helyen termelődik nesfatin, és jellemzően több, a táplálékfelvétel szabályozásban fontos hipotalamikus neuropeptiddel koexpresszálódik, például CRH-val, melanin-koncentráló hormonnal (*melanin concentrating hormone*, MCH), oxitocinnal és vazopresszinnel. A táplálékfelvételt csökkentő hatásért elsősorban a hipotalamusz nesfatin neuronjait teszik felelőssé. A nesfatin szerepe felmerült továbbá a glükóz homeosztázis központi szabályozásában, a folyadék háztartás szabályozásában, valamint a szorongás, és depresszió patomechanizmusában is. Receptora máig ismeretlen. Nem tartozik a klasszikus neuromodulátorként ható neuropeptidek közé, mivel axonokba nem transzportálódik. Hatásában dendritikus-szomatikus elválasztás révén lokális, autokrin/parakrin mechanizmusokat feltételeznek.

---

## Célkitűzések

---

A homeosztázis központi idegrendszeri szabályozásának megértését új szintre emelte a neuropeptid koexpresszió és a neuromoduláció jelentőségének felismerése, ami lehetővé teszi az árnyalt információátadást, a komplex és flexibilis jelátvitelt. További előrelépést jelentett a felfedezés, miszerint a metabolikus szindrómára, és a stresszbetegségekre való hajlam hátterében gyakran a kedvezőtlen intrauterin és perinatális körülmények állnak, melyek hosszútávon megváltoztatják a homeosztázis centrális szabályozását, például egyes neuropeptidok expresszióját is. A folyamatosan bővülő, de korántsem teljes kép kialakításához a korszerű módszertani eszköztár elengedhetetlen. A vizsgálandó molekulák megfelelő érzékenységgű, sejtszintű kimutatására az immunhisztokémia az egyik legalapvetőbb módszer a kutatásban, mégis a mai napig sok esetben kihívást jelent.

Mindezek figyelembevételével az itt bemutatott, főként állatkísérletes (patkány, egér) munkákban a következő kutatási célokat tűztem ki:

### **I. Az immunhisztokémia alkalmazásának továbbfejlesztése**

### **II. Az energiaháztartás szabályozás vizsgálata**

a. A nesfatin funkcióinak feltárása az energiaháztartás, és azzal összefüggően a cirkadián ritmus szabályozásával kapcsolatban.

b. Az intrauterin alultáplált fenotípus kialakulásának hátterében álló agyi mechanizmusok vizsgálata.

### **III. A stresszválasz finomhangolásának tanulmányozása**

a. A koexpresszió jelentősége akut és krónikus stresszben, két neuromodulátor, a nesfatin és a PrRP szerepének tanulmányozásán keresztül.

b. A PrRP jelátvitel jelentőségének feltárása a krónikus stressz okozta mentális stresszbetegségekben.

---

## Tézisek

---

### **I. Az immunhisztokémia alkalmazásának továbbfejlesztése**

#### **1. Közlemény: *Simultaneous visualization of multiple antigens with tyramide signal amplification using antibodies from the same species***

A többes fluoreszcens immunhisztokémia számos tudományos és klinikai vizsgálatban nélkülözhetetlen módszer. A megbízható antitestek sokszor azonos gazdaállatból származnak, együttes használatuk a keresztreakciók miatt korábbi módszerekkel több akadályba ütközött. Ennek megoldására fejlesztettem ki egy olcsó, és kis mennyiségű szöveti antigén kimutatására is alkalmas, hatékony immunhisztokémiai festési eljárást. Az eljárás alapját a mikrohullámú sütőben történő hőkezelés képezi (MWT). A módszert az teszi lehetővé, hogy kísérleteim alapján a fluoreszcens jel erőssége az MWT következtében nem gyengül, ha tiramid szignál amplifikációt használunk. A technika további előnye, hogy a peroxidáz enzim aktivitás eliminálására is alkalmas, akár másodlagos antitesthez kapcsolt enzimről, akár az endogén peroxidáz aktivitásáról van szó, és egyben ismert antigén feltáró módszer. Ezen az eljáráson alapszanak az Perkin-Elmer Inc (Waltham, MA, USA) és az Akoya Biosciences (Marlborough, MA, USA) cégek Opal Multiplex IHC” KIT-jei és a Leica cég által kínált BOND RX automata immunfestő készülék multiplex immunfluoreszcens festéshez használt programja. A KIT-eket tumor immunológiában elterjedten használják.

#### **2. Közlemény: *Sensitive detection of GFP utilizing tyramide signal amplification to overcome gene silencing***

A sejteikben zöld fluoreszcens proteint (*green fluorescent protein*, GFP-t) expresszáló transzgén egerek megjelenése új távlatokat nyitott a kutatás több területén. A GFP-t expresszáló sejtek transzplantációja nem GFP-transzgén egerekbe megkönnyítette a sejtek további vizsgálatát az akceptor szervezetben, ami végtelenül hasznos a fejlődéstanban (sorskövetés), a tumorkutatásban (rákos

sejtek nyomkövetése) és az őssejterápiában (transzplantált sejtek nyomkövetése) is. A sorskövetéses vizsgálatok korábban sokszor ellentmondásos eredményeket hoztak. Mint kiderült, a kísérleti felállás nagyban befolyásolja a keringő őssejtek hozzájárulását a regenerációhoz, másrészt az „idegen” génként felismert GFP kifejeződését az utódsejtekben különböző szabályozó mechanizmusok csillapítják. GFP ellenes antitest felhasználásával és az immunfestési reakció azelőtt nem alkalmazott erősítésével bebizonyítottuk, hogy a transzplantált GFP-pozitív sejtek megfelelő detektálásához a szövetben a szignál erősítése szükséges, és gyakorlatilag elégséges is. Kísérleti modellként nőstény egereket használtunk, melyekben a jobb arteria cerebri media elzárásával féloldali sztrókot idéztünk elő, majd a farokvénán keresztül, hím GFP-transzgen egerekből származó csontvelői őssejtekkel transzplantáltuk őket. Az általunk javasolt tiramid szignál amplifikációs módszerrel, a donor eredetű csontvelői őssejtek, és a belőlük differenciálódó mikrogliá 90%-os hatékonysággal a kimutathatóvá vált a sztrók szintjén az agyban, szemben a korábbi módszerekkel elérhető maximum 50%-os hatékonysággal. Eredményeinket az Y kromoszóma (*in situ* hibridizáció) és a GFP (immunhisztokémia) sejtekben való egyidejű kimutatásával igazoltuk.

## **II. Az energiaháztartás szabályozás vizsgálata**

### **II.a. A nesfatin funkcióinak feltárása az energiaháztartás, és azzal összefüggően a cirkadián ritmus szabályozásával kapcsolatban**

#### **3. Közlemény: *Nesfatin-1 exerts long-term effect on food intake and body temperature***

Kísérleteinkben a nesfatin-1 energiaháztartásra gyakorolt hatásait vizsgáltuk meg részletesen hím patkányokban. Biotelemetriai mérésekkel bebizonyítottuk, hogy a nesfatin-1 anorexigén hatása a táplálékfelvétel csökkentése mellett, a hőtermelés növelésén is alapszik, viszont a nesfatin-1 az állatok mozgási aktivitását nem befolyásolja. Feltérképeztük a hidegre aktiválódó (cFos



immunpozitivitás) nesfatin-pozitív neuronokat az agyban, és a neuroendokrin PVN területén, valamint az autonóm premotoros nyúltvelői raphe magokban tireotropin-felszabadító hormon koexpressziót mutattunk ki ezekben a sejtekben. Következésképpen, a nesfatin a termoregulációt a neuroendokrin rendszeren és autonóm idegrendszeren keresztül is befolyásolhatja. Farmakokinetikai szempontból fontos adat, hogy a nesfatin-1 mind a táplálékfelvételre, mind a termoregulációra hosszútávú hatást fejtett ki. A hatás függött az alkalmazás időpontjától, vagyis az állatok cirkadián ritmusától. Az összefüggés fordítva is fennállt, a nesfatin-1 kezelés módosította a táplálékfelvétel és a testhőmérséklet cirkadián ritmusát.

#### **4. Közlemény: *Nesfatin-1/NUCB2 as a potential new element of sleep regulation in rats***

A fenti eredmények a nesfatin-1 alvás-ébrenléti ciklus szabályozásban való részvételének tanulmányozására ösztönöztek. A passzív fázis kezdetekor icv beadott nesfatin-1 elektroencefalográfiás mérések alapján jelentős mértékben gátolta a gyors szemmozgásos (*rapid eye movement*, REM) alvást, és kisebb mértékben az intermedier alvási stádiumot is patkányokban, cserébe növelte az ébrenléttel töltött időt. A REM alvás megvonás gátolta a nesfatin mRNS és fehérje expresszióját a dorzolaterális hipotalamuszban (DLH), az azt követő REM alvás pótlás viszont helyreállította a nesfatin expressziót. A DLH területén a nesfatin-termelő sejtek legnagyobb része MCH-immunpozitív volt. A REM alvás pótlás során a nesfatin-pozitív neuronok jelentős számban aktiválódtak (cFos<sup>+</sup>). A REM-aktív nesfatin-termelő sejtek az MCH-t koexpresszáló neuronok közül kerültek ki, míg az MCH-negatív nesfatin populáció csak elenyésző mértékben reagált a REM pótlásra.

Bár a nesfatin-1 receptora még nem ismert, többszörösen bizonyított táplálékfelvételt csökkentő hatása miatt az elhízás elleni küzdelemben potenciális gyógyszeres célpont. A hatások és lehetséges mellékhatások karakterizálása ennél fogva elengedhetetlenül fontos. Munkáink jelentősége, hogy részletes jellemzést adtunk a nesfatin-1 hatásainak farmakodinamikájáról, korábban nem ismert

hatásait tártuk fel, betekintést nyújtottunk ezek lehetséges hatásmechanizmusába, más hatásokat pedig kizártunk. Adataink arra hívják fel a figyelmet, hogy a nesfatin energiaháztartásra gyakorolt hatása összetett, és felvetik a nesfatin integratív szerepét a cirkadián ritmus és az energiaháztartás szabályozás összehangolásában.

## **II.b. Az intrauterin alultáplált fenotípus kialakulásának hátterében álló agyi mechanizmusok vizsgálata**

### **5. Közlemény: *Hypothalamic nesfatin-1 resistance may underlie the development of type-2 diabetes mellitus in maternally undernourished non-obese rats***

A túlsúlyosság nélkül, priméren megjelenő 2-es típusú cukorbetegség elsődleges kiváltó oka az intratuterin növekedési retardáció. A kedvezőtlen intrauterin környezet a fejlődés során adaptációra kényszeríti a központi idegrendszert, ami főleg a hipotalamuszt érinti, és a szabályozási mechanizmusok megváltozásához vezet. Kísérleti modellünkben a terhesség alatt fehérje hiányosan táplált patkány anyák hím utódait hasonlítottuk össze normál körülmények között fejlődő társaikkal. A testösszetétel mérése felnőtt, 12 hetes korban nem mutatott eltérést a csoportok között. Az intrauterin alultáplált állatok fiatalon (6 hetesen) még nem, de felnőttkorban már szívesebben fogyasztották a zsírdús tápot, mint a kontrollok, és ekkorra csökkent a glükóztoleranciájuk és az inzulinérzékenységük is. A nesfatin-1 táplálékfelvételre gyakorolt hatásának mérése alapján a kóros állapot hátterében nesfatin-1 rezisztenciát állapítottunk meg. A krónikus centrális nesfatin-1 kezelés kontroll állatokban javította a glükóztoleranciát és inzulin érzékenységet, a nesfatin-1 rezisztens állatokban nem hatott. A nesfatin-1 rezisztencia helyeként a hipotalamuszt, elsősorban a nucleus arcuatust jelöltük meg. A nesfatin-1 rezisztencia kialakulásának hátterében az intrauterin alultáplált állatok hipotalamikus nesfatin-termelő neuronjainak abnormális fejlődési üteme állt.

## **6. Közlemény: *Reward-representing D1-type neurons in the medial shell of the accumbens nucleus regulate palatable food intake***

Az intrauterin alultáplált fenotípus további vizsgálata során az állatokban felnőttkori hiperfágiát mutattunk ki. Megállapítottuk, hogy a hiperfágiás állatok táplálékfelvételében a táplálék mint jutalmi tényező előtérbe került. Az agy jutalomközpontjában, a nucleus accumbens területén, azon belül a hedonikus „forrópontnak” tekintett mediális Héj régióban, egy dopamin-1 receptort (D1R) expresszáló neuroncsoportot fedeztünk fel. E sejtpopuláció neuronjai az elfogyasztott jutalmi táp mennyiségével arányos mértékben aktiválódtak (cFos-pozitivitás), de az intrauterin alultáplált állatokban a kontrollkéval megegyező mértékű sejtaktiváláshoz nagyobb mennyiségű jutalmi táp felvétel társult, vagyis a sejtek ingerküszöbe emelkedett volt. Az állatok édes ízre adott hedonikus reakciói a kontrollkéval egyeztek, tehát az intrauterin alultáplált állatok étvágya növekedett meg. A háttérben a mediális Héj régióban alacsony D1R expressziót találtunk. Kontroll állatok nucleus accumbensének mediális Héj régiójába injektált D1R agonista a jutalmi táplálkozással töltött időt és a megevett jutalom mennyiségét is csökkentette. A nucleus accumbens mediális héjában található D1R-t hordozó neuronok idegzik be a rostrális laterális hipotalamuszt, mely terület a táplálkozás megfelelő időben történő leállításáért felelős. A D1R agonista injekció az e területen található, MCH- és orexin-negatív neuronok aktivitását csökkentette.

Kísérleti modellünkkel bebizonyítottuk, hogy az intrauterin alultáplált fenotípus kialakulásához mind a homeosztaticus, mind a nem-homeosztaticus táplálékfelvétel szabályozás zavarai hozzájárulnak. Ezek a zavarok a hipotalamikus nesfatin-1-rezisztencia és megnövekedett étvágy voltak, és elsődlegesen, normál testsúly mellett jelentek meg a fenotípusban. A nesfatin-1 rezisztencia közvetlen kapcsolatban állt a prediabeteszes állapot kialakulásával. A hedonikus táplálékfelvétel fokozódásához a jutalomközpontban a D1R expresszió csökkenése, a sejtek emelkedett aktivációs küszöbe, és emiatt a táp felvétel laterális hipotalamuszon keresztül történő

leállításának elmaradása vezethetett. Mivel az elégtelen intrauterin környezet a terhességi szövődmények egyik leggyakoribb oka, eredményeink klinikai jelentőséggel bírhatnak.

### **III. A stresszválasz finomhangolásának tanulmányozása**

#### **III.a. A koexpresszió jelentősége akut és krónikus stresszben, két neuromodulátor, a nesfatin és a PrRP szerepének tanulmányozásán keresztül**

##### **7. Közlemény: *Nesfatin-1/NUCB2 may participate in the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats***

Ebben a munkában elsőként azonosítottuk a nesfatin-1 peptidet, mint a HPA tengely szabályozásának új elemét, mely az agytörzs és a PVN szintjén is részt vehet a stresszválasz organizálásában. Az icv beadott nesfatin-1 a vérplazma ACTH- és kortikoszteronszintjének emelkedést idézte elő. A mediális parvocelluláris PVN területén, ahol a nesfatint koexpresszáló CRH-termelő neuronok is elhelyezkednek, a nesfatin kifejeződése negatív glükokortikoid visszacsatolás szabályozása alatt állt, mivel mellékvese irtás hatására a területen belül a nesfatin mRNS expressziója fokozódott. A PVN ezen régiójában akut restraint stressz következtében a nesfatin-pozitív neuronok fele aktiválódott (cFos-pozitivitás), és ugyanitt, valamint a nyúltvelői A1 sejtcsoportban is megemelkedett a nesfatin mRNS expressziója. Az A1 sejtcsoportban és az A2-NTS területén a noradrenerg neuronokban kimutattuk a nesfatin, a PrRP és a katekolamin szintézis markeréül szolgáló tirozin-hidroxiláz (TH) enzim koexpresszióját.

##### **8. Közlemény: *Chronic repeated restraint stress increases prolactin-releasing peptide/tyrosine-hydroxylase ratio with gender-related differences in the rat brain***

Bár a PrRP-t mint stresszmolekulát hamar felismerték, a rendelkezésre álló adatok akut stressz kísérletekre épültek, és ugyan a PrRP expressziót proösztroszos nőstényekben magasabbnak találták, mint hímekben, nőstény állatokat stressz kísérletekben nem tanulmányoztak. Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a krónikus

restraint stressz hím patkányokban mindhárom PrRP sejtpopulációban (A1, A2-NTS, DM) serkenti a PrRP mRNS expresszióját. Metősztuszos, illetve diősztuszos nőstényekben az A2 sejtcsoportban ez az emelkedés nem jelentkezett. A TH enzim expressziója a nyúltvelőben mindkét nemben csak az A1 sejtcsoportban fokozódott, az A2 sejtcsoportban nem. A krónikus stresszre adott adaptációs válasz a PrRP és TH koexpresszió mértékének PrRP javára történő eltolódásában nyilvánult meg a hímekben mindkét nyúltvelői területen, nőstényekben csak az A1 sejtcsoportban. A jelenség összefüggésben állhat azzal, hogy a nem stresszelt kontroll nőstényekben metősztusz, illetve diősztusz alatt is magasabb nyúltvelői (A1, A2-NTS) PrRP mRNS expressziót detektáltunk, mint a hímekben, mely a krónikus stresszre az A2 sejtcsoportban már nem emelkedett tovább. Párhuzamosan, a nem stresszelt nőstényekben a plazma kortikoszteron koncentrációja is magasabb volt, mint a hímekben. A stresszelt nőstények kortikoszteron válasza relatíve kisebb volt a hímekénél, és a krónikus stressz okozta klasszikus testi tünetek nem jelentkeztek náluk, ezzel szemben a hímekben kifejezettek voltak. A jelenség hátterében a nyúltvelői A1 és A2-NTS területén a PrRP és az ösztrogén alfa receptor és koexpresszióját mutattuk ki, a sejtek ösztrogén béta receptort viszont nem expresszáltak. A krónikus stresszre adott választ a PVN léziója nem befolyásolta, de az A2-NTS PrRP és TH mRNS expresszióját csökkentette.

### **9. Közlemény: *Colocalized neurotransmitters in the hindbrain cooperate in adaptation to chronic hypernatremia***

Fenti eredményeink fényében az A1 és az A2-NTS sejtcsoportokban nagyfokú koexpressziót mutató noradrenalin, PrRP és nesfatin szerepét a krónikus hipernatrémiához való adaptációban tanulmányoztuk tovább. Kétféle hipernatrémia modellt választottunk, veleszületetten vazopresszin hiányos Brattleboro állatokat (DI) és sós vízzel itatott (2% NaCl) Wistar patkányokat is vizsgáltunk. A krónikus stressz HPA tengely működésére kifejtett hatását az akut restraint stresszre adott válaszkészséggel mértük. A testi paraméterek és a stresszhormon szintek alapján a sóterhelés (hipervolémiás

hipernatrémia) nagyobb fokú stresszt okozott az állatoknak, mint a DI állapot (euvolémiás hipernatrémia). A krónikus hipernatrémiához való adaptációt a vizsgált területeken megemelkedett PrRP és nesfatin mRNS expresszió jelezte a DI állatokban. A sóterhelés ezen felül a TH mRNS expressziót is fokozta az A1 sejtcsoportban, míg a PrRP mRNS expressziója az A2-NTS területén csökkent volt. A DI állatokban az akut restraintre adott válasz (stresszhormonok elválasztása, a TH és PrRP mRNS expressziók emelkedése az A1 sejtcsoportban) megtartott volt, a sóterhelt állatok az akut stresszre ezekkel a paraméterekkel nem reagáltak. Összességében tehát a krónikus hipernatrémiában a HPA tengely aktiválhatósága az A1 sejtcsoport TH kapacitásával állt összefüggésben, melyet a sóterhelés jobban igénybe vett. A hipotalamuszban mindemellett kimutattuk, hogy a PrRP részt vesz a krónikus hipernatrémiára adott válaszreakcióban a PVN, a szupraoptikus mag és az AV3V területén is.

### **III.b. A PrRP jelátvitel jelentőségének feltárása a krónikus stressz okozta mentális stresszbetegségekben**

#### **10. Közlemény: *Prolactin-releasing peptide contributes to stress-related mood disorders and inhibits sleep/mood regulatory melanin-concentrating hormone neurons in rats***

Az MCH jelátvitel zavara és a szorongás, depresszió, illetve poszttraumás stresszbetegség patomechanizmusa között szoros összefüggés áll fenn. Morfológiai módszerekkel kimutattuk, hogy a nyúltvelői és DM eredetű PrRP-immunoreaktív axonok közeli kontaktusokat képeznek a DLH területén található MCH-pozitív neuronok sejttestjein patkányokban. Ugyanakkor, az MCH-termelő sejtek nem expresszálták egyik fajta PrRP receptort sem, kizárva a közvetlen beidegzés lehetőségét. Elektrofiziológiai *ex vivo* mérésekkel igazoltuk, hogy a PrRP gátolja az MCH-termelő sejtek neuronális aktivitását. A gátlás a vártak megfelelően preszinaptikusan történt, GABA-A receptor mediálta módon. Nemutolsó sorban, a PrRP fokozta a noradrenalin MCH-termelő sejtekre kifejtett gátló hatását is. Az MCH neuronokra kifejtett gátló hatást alvásmegvont állatokban a REM

alvás pótlása előtt közvetlenül icv beadott PrRP kezeléssel *in vivo* is igazoltuk; a PrRP kezelés következtében a REM-aktív MCH neuronok száma csökkent. A REM alvás megvonás a PrRP expressziót a DM területén fokozta, a REM alvás pótlása pedig helyreállította. Az A1 sejtcsoport PrRP expressziójában az alváshiány okozta stresszhatás tükröződött. Nem alvás megvont állatokban a passzív fázis kezdetekor történő centrális PrRP kezelés elősegítette és meghosszabbította a nem-REM alvást, hatása azonban 30 perc alatt lecsengett, így a REM alvási fázist ebben a kísérletben nem tudtuk vizsgálni. Ezek után három különböző patkány depresszió modell segítségével kimutattuk, hogy a PrRP jelátvitel károsodása a DLH területén az MCH expresszió megváltozásával, ezzel együtt pedig a depressziószerű viselkedés kialakulásával jár. Amennyiben, a DLH területén PrRP jelátvitel megtartott volt, a krónikus stressz ellenére sem alakult ki az állatokban depressziószerű állapot. A PrRP jelátvitel depresszió patomechanizmusában betöltött szerepét öngyilkosok *post mortem* DLH szövetmintáinak analízise is igazolta, kiemelve eredményeink transzlációs jelentőségét.

Stressz kísérleteink eredményei új részletekkel szolgáltak a HPA tengely finomszabályozásáról. Adataink alapján a koexpresszió jelentősége különösen a hangulati betegségek kialakulása szempontjából fontos krónikus stresszhez való adaptációban kerül előtérbe, mivel a neurotransmitter koexpresszió révén a sejtek működése „gazdaságosabbá” tehető, fenntartva a HPA tengely stresszérzékenységét. Ezen túlmenően egy olyan új, PrRP-MCH pályát azonosítottunk, melynek elégtelen működése szerepet játszhat a mentális stresszbetegségek kialakulásában. A szerotonin és noradrenalin visszavétel gátló antidepresszánsokat széles körben alkalmazzák a stresszel összefüggő mentális zavarok kezelésére, bár a mellékhatások gyakoriak és az esetek harmadában a gyógyszerek hatástalanok. A kombinált monoaminerg és peptiderg rendszerekre is ható antidepresszáns gyógyszerek kifejlesztése új irányokat nyithat a kezelésben, melyek egyik célpontja a jövőben a PrRP rendszer lehet.

---

## A tézisek új tudományos eredményei

---

### I. Célkitűzés

#### Az immunhisztokémia alkalmazásának továbbfejlesztése

1. Új könnyen reprodukálható, egyszerű és érzékeny immunhisztokémiai festési eljárást vezettem a keresztreakciók kivédésére.
2. Bebizonyítottuk, hogy a donor eredetű GFP-t expresszáló csontvelői őssejtek transzplantáció utáni nyomonkövetése tiramid szignál amplifikálással kombinált immunhisztokémiai festéssel végezhető el kielégítően.

### II. Célkitűzés

#### Az energiaháztartás szabályozás vizsgálata

3. Kimutattuk, hogy az icv alkalmazott nesfatin-1 növeli a testhőmérsékletet, táplálék- és vízfelvételre gyakorolt hatásai a hosszútávúak és összefüggnek a cirkadián ritmussal.
4. Leírtuk az icv nesfatin-1 alvás-ébrenléti ciklusra gyakorolt hatását. Adataink alapján a nesfatin a REM alvásszabályozás fontos tényezője.
5. Patkány modellben kimutattuk, hogy az intrauterin alultápláltság következtében felnőttkorra elsődlegesen, normál testsúly mellett kialakuló prediabeteses állapot hátterében a hipotalamusz, főleg a nucleus arcuatus nesfatin-1 rezisztenciája áll. Nem rezisztens állatokban a krónikus icv nesfatin-1 kezelés a javítja a glükóztoleranciát és az inzulinérzékenységet.
6. A nucleus accumbens mediális Héj régiójában egy a táplálék jutalmi értékét a tükröző sejtcsoportot azonosítottunk. Kimutattuk, hogy az intrauterin alultáplált, nem-elhízott patkányok jutalmi táplálkozása fokozott, és ennek hátterében a nucleus accumbens



mediális Héj régiójában a D1R jelátvitel károsodása, és ennek következtében a táplálékfelvétel leállításának zavara áll.

### **III. Célkitűzés**

#### **A stresszválasz finomhangolásának tanulmányozása**

7. A HPA tengely szabályozás új elemeként azonosítottuk a nesfatint.
8. Kimutattuk, hogy a HPA tengely aktiválásában elsődleges szerepű nyúltvelői noradrenerg neuronokban a PrRP és noradrenalin koexpresszió aránya krónikus restraint stressz hatására a PrRP irányába tolódik. A jelenség nemi különbséget mutat, aminek oka a nyúltvelői PrRP sejtcsoportok ösztrogén alfa receptor-immunpozitivitása lehet.
9. Megállapítottuk, hogy nyúltvelői A1 sejtcsoportban és az A2-NTS területén nagyfokú a TH, PrRP és nesfatin koexpresszió. Hipernatrémiás állatokban az akut restraint stresszre adott válasz a fenti transzmitterek összehangolt működésének eredménye, melyben az A1 sejtcsoport noradrenalin kapacitásának megőrzése mérvadó.
10. Leírtunk és funkcionálisan jellemeztünk egy új agypályát, melyen keresztül a PrRP a hipotalamusz MCH tartalmú neuronjait gátolja és a noradrenalin MCH neuronokra kifejtett gátló hatását fokozza. Patkány modellek felhasználásával bebizonyítottuk, hogy a PrRP jelátvitel károsodása a dorzolaterális hipotalamuszban „depressziószerű” viselkedéssel társul. A PrRP jelátvitel károsodását öngyilkosok megfelelő agymintáiban is kimutattuk.

---

## Az értekezés alapját képező közlemények

---

1. **Tóth ZE**, Mezey E.  
*Simultaneous visualization of multiple antigens with tyramide signal amplification using antibodies from the same species*  
J HISTOCHEM CYTOCHEM, 55(6):545-54. (2007)  
IF: 2,335                      Független idéző: 145
2. **Tóth ZE**, Shahrar T, Leker R, Szalayova I, Bratincsák A, Key S, Lonyai A, Németh K, Mezey E.  
*Sensitive detection of GFP utilizing tyramide signal amplification to overcome gene silencing*  
EXP CELL RES, 15;313(9):1943-50. (2007)  
IF: 3,695                      Független idéző: 18
3. Könczöl K, Pintér O, Ferenczi S, Varga J, Kovács K, Palkovits M, Zelena D, **Tóth ZE**.  
*Nesfatin-1 exerts long-term effect on food intake and body temperature*  
INT J OBES (LOND), 36(12):1514-21. (2012)  
IF: 5,221                      Független idéző: 93
4. Vas S, Ádori C, Könczöl K, Kátai Z, Pap D, Papp RS, Bagdy G, Palkovits M, **Tóth ZE**.  
*Nesfatin-1/NUCB2 as a potential new element of sleep regulation in rats*  
PLOS ONE, 8(4):e59809. (2013)  
IF: 3,534                      Független idéző: 54
5. Durst M, Könczöl K, Ocskay K, Sípos K, Várnai P, Szilvássy-Szabó A, Fekete C, **Tóth ZE**.  
*Hypothalamic Nesfatin-1 Resistance May Underlie the Development of Type 2 Diabetes Mellitus in Maternally Undernourished Non-obese Rats*  
FRONT NEUROSCI, 16:828571. (2022)  
IF: 4,300                      Független idéző: 3

6. Durst M, Könczöl K, Balázs T, Eyre MD, **Tóth ZE**.  
*Reward-representing D1-type neurons in the medial shell of the accumbens nucleus regulate palatable food intake*  
INT J OBES (LOND), 43(4):917-927. (2019)  
IF: 4,419                      Független idéző: 27
  
7. Könczöl K, Bodnár I, Zelena D, Pintér O, Papp RS, Palkovits M, Nagy GM, **Tóth ZE**.  
*Nesfatin-1/NUCB2 may participate in the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats*  
NEUROCHEM INT, 57(3):189-97. (2010)  
IF: 3,601                      Független idéző: 89
  
8. **Tóth ZE**, Zelena D, Mergl Z, Kirilly E, Várnai P, Mezey E, Makara GB, Palkovits M.  
*Chronic repeated restraint stress increases prolactin-releasing peptide/tyrosine-hydroxylase ratio with gender-related differences in the rat brain*  
J NEUROCHEM, 104(3):653-66. (2008)  
IF: 4,500                      Független idéző: 15
  
9. Matuska R, Zelena D, Könczöl K, Papp RS, Durst M, Guba D, Török B, Varnai P, **Tóth ZE**.  
*Colocalized neurotransmitters in the hindbrain cooperate in adaptation to chronic hypernatremia*  
BRAIN STRUCT FUNCT, 225(3): 969–984. (2020)  
IF: 3,270                      Független idéző: 1
  
10. Vas S, Papp RS, Könczöl K, Bogáthy E, Papp N, Ádori C, Durst M, Sípos K, Ocskay K, Farkas I, Bálint F, Ferenci S, Török B, Kovács A, Szabó E, Zelena D, Kovács KJ, Földes A, Kató E, Köles L, Bagdy G, Palkovits M, **Tóth ZE**.  
*Prolactin-Releasing Peptide Contributes to Stress-Related Mood Disorders and Inhibits Sleep/Mood Regulatory Melanin-Concentrating Hormone Neurons in Rats*  
J NEUROSCI, 43(5):846-862. (2023)  
IF: 5,300 (2022)              Független idéző: 1

## **Angol nyelvű közlemények tudományometriai adatai**

Tudományos folyóiratcikkek száma: **52**

Összesített impakt faktor: **238,715**

Összes idézettség: **2673**

Független idézettség: **2349**

Hirsch index: **24**

---

## Rövidítések jegyzéke

---

<b>ACTH:</b>	adrenokortikotrop hormon
<b>AV3V:</b>	anteroventrális periventrikuláris harmadik kamrai régió
<b>CRH:</b>	kortikotropin-felszabadító ( <i>releasing</i> ) hormon
<b>D1R:</b>	1-es típusú dopamin receptor
<b>DI:</b>	AVP hiányos homozigóta (-/-) Brattleboro parkány
<b>DLH:</b>	dorzolaterális hipotalamusz
<b>DM:</b>	nucleus dorsomediális hypothalami
<b>GFP:</b>	zöld fluoreszcens protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
<b>HPA tengely:</b>	hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely ( <i>hypothalamic-pituitary adrenal axis</i> )
<b>icv:</b>	intracerebroventrikuláris (oldalkamrába történő)
<b>MCH:</b>	melanin-koncentráló hormon ( <i>melanin-concentrating hormone</i> )
<b>MWT:</b>	mikrohullámú kezelés ( <i>microwave treatment</i> )
<b>NPFF2R:</b>	2-es típusú neuropeptid FF receptor
<b>NTS:</b>	nucleus tractus solitarii
<b>NUCB2:</b>	nucleobindin'-2 fehérje
<b>PrRP:</b>	prolaktin-felszabadító ( <i>releasing</i> ) peptid
<b>PrRPR:</b>	a PrRP saját receptora (GPR10)
<b>PVN:</b>	nucleus paraventricularis hypothalami ( <i>hypothalamic paraventricular nucleus</i> )
<b>REM alvás:</b>	gyors szemmozgásos („ <i>rapid eye movement</i> ”) alvás
<b>TH:</b>	tirozin-hidroxiláz

---

## Köszönetnyilvánítás

---

Szeretnék köszönetet nyilvánítani egykori PhD témavezetőmnek, professzor Palkovits Miklósnak, akitől a kutatómunka alapjait megtanultam. Neki köszönhetem külföldi tanulmányutaimat is, melyek nagy lendületet adtak további fejlődésemnek.

Hálás vagyok dr. Mezei Évának, aki az NIH-ben mentorom volt, és akivel számos eredményes munkát és egy életre szóló barátságot tudhatunk magunk mögött. Ki szeretném emelni dr. Harold Gainert, aki rengeteget segített tudományos gondolkodásom fejlődésében.

Köszönetet szeretnék mondani PhD hallgatóimnak, dr. Könczöl Katalinnak, dr. Durst Máténak, dr. Vas Szilviának, és Sípos Klaudiának lelkes munkájukért, és nemutolsó sorban barátságukért.

Ugyancsak köszönet illeti a volt Neuromorfológiai Laboratórium alapkövét képező munkatársnőimet, dr. Gallatz Katalint és Helfferich Frigyesné, Juditot. Hasonló alapkövét képezi jelenlegi munkacsoportomnak Kerti Judit, az asszisztensnőm, akinek technikai tudása nélkül a bemutatott munkák kivitelezése nem valósulhatott volna meg.

Számos további jelenlegi és volt intézeti munkatársam például dr. Papp Rege Sugárka, dr. Bodnár Ibolya és néhai professzor Nagy György járult hozzá jelentősen az elvégzett munkákhoz, mindezt köszönöm nekik és elnézést kérek azoktól, akiknek a nevét véletlenül nem soroltam fel. A laboratóriumi állatokkal végzett munkáért Deák Szilviát, Gróti Zoltánt illeti köszönet.

Fel sem tudom sorolni az összes kollaborátort, akiknek hozzájárulása a munkákhoz nélkülözhetetlen volt. Mindenképp meg kell említenem közülük dr. Kovács Krisztinát, dr. Ferenczi Szilamért, dr. Zelena Dórát, dr. Fekete Csabát és dr. Gereben Balázst. Dr. Bagdy Györgynek köszönöm, hogy segített az alvásmegvonásos állatkísérletek megvalósításában, amit az Intézet keretei között nem tudtam volna megcsinálni.

Hálás vagyok az Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet volt és jelenlegi intézetvezetőinek, hogy támogatták munkámat az Intézetben.

Végezetül köszönöm családomnak az áldozatvállalást, ami lehetővé tette, hogy a család és munka közti egyensúly olykor a munka javára tolódjon el.