

*Pázmány Péter Katolikus Egyetem*  
*Információs Technológiai és Bionikai Kar*  
*Roska Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori Iskola*



**Hakkel Erzsébet**

*Energiaháztartást szabályozó hipotalamikus  
hálózatok fény- és elektronmikroszkópos vizsgálata  
rágcsálókban*

---

*PhD értekezés tézisei*

*Témavezető:*

**Fekete Csaba D.Sc**

Budapest, 2017

## I. Bevezetés

Napjaink egyik legfőbb egészségügyi problémája a járványszerű elhízás. Az Amerikai Egyesült Államokban és Európában, a lakosság több mint 60%-a túlsúlyos vagy elhízott<sup>1</sup>. Az elhízás nem csak esztétikai probléma, hanem jelentős kockázati tényező például a kettes típusú cukorbetegség, daganatok és szív- és érrendszeri betegségek kialakulásában<sup>2</sup>. Habár az elhízás jelentős hatással van a népesség egészségi állapotára és az egészségügyi költségvetésre, kezelésére nincs mellékhatásmentes, hatékony, non-invazív terápia. A gyógyszergyártó vállalatok folyamatosan fejlesztenek elhízás ellenes gyógyszereket, de az eddigi gyógyszer célpontok nem bizonyultak megfelelőnek. Ezért fontos feltárni új hatóanyag célpontokat a hatékony elhízás ellenes gyógyszerek gyártásához. **Ehhez elengedhetetlen az energiaháztartást szabályozó folyamatok pontosabb megértése.**

### I.1 A hipotalamusz arcuatus magjának szerepe az energiaháztartás szabályozásában

A keringő hormonok, mint a leptin, grelin,olecisztoxin, peptid YY és az inzulin, információt továbbítanak a központi idegrendszer felé az energiaraktárak aktuális állapotáról és az elfogyasztott táplálékról<sup>3</sup>. Ez a kommunikáció kritikus szerepet játszik az energiaháztartás szabályozásában<sup>3</sup>. E hormonok hatásának kialakulásáért felelős rendszerek genetikai hibája kóros elhízáshoz vezet, így állatokban és emberben is a leptin vagy a leptin receptor hiánya és egerekben az inzulin receptor centrális hiánya súlyos elhízást okoz<sup>4-8</sup>. Az arcuatus mag (ARC) az egyik legfontosabb agyterület, mely érzékeli az energiaháztartás változásait közvetítő hormonok hatását<sup>3</sup>. Ezt támasztja alá, hogy az ARC újszülöttkori kiirtása nátrium glutamát kezeléssel elhízást és leptin rezisztenciát okoz<sup>9</sup>. Az ARC-ban legalább két fő, az energiaháztartás szabályozásában jelentős szerepet játszó idegsejtcsoport helyezkedik el<sup>3</sup>. A ventromediálisan elhelyezkedő sejtcsoport serkenti a táplálékfelvételt. E sejtcsoport két fő peptid transzmittere a neuropeptid Y (NPY) és az agouti-related protein (AGRP)<sup>3</sup>. A peptid transzmitterek mellett az ugyancsak táplálkozást serkentő hatású klasszikus ingerületátvivő, a GABA<sup>12</sup> is megtalálható e sejtekben. Az NPY az egyik leghatékonyabb táplálkozást serkentő transzmitter<sup>3</sup>. Az NPY oldalkamrába történő beadása jelentősen fokozza a táplálékfelvételt és a súlygyarapodást és növeli a zsírlerakódást<sup>13</sup>. Az NPY azonban nem kizárólag a táplálkozás serkentő hatása miatt növeli a testsúlyt, ugyanis az NPY jelentősen csökkenti az energialeadást is<sup>14</sup>. Az NPY ezen hatását a G-fehérje kapcsolt posztzinaptikus Y1 és Y5 receptorokon keresztül fejti ki<sup>13</sup>. Az AGRP szintén csökkenti a táplálékfelvételt és gátolja az energialeadást<sup>15</sup>. Az energiaháztartásra kifejtett hatását az AGRP két centrálisan termelődő melanokortin receptorhoz, a melanokortin 3 és 4 receptorokhoz (MC3R és MC4R) kötődve fejti ki. Az AGRP e receptorok endogén antagonistája<sup>15</sup>. Az energiaháztartásban bekövetkező változások minkét peptid expresszióját szabályozzák az ARC idegsejtjeiben. Az éhezés serkenti, a leptin kezelés pedig gátolja az NPY és AGRP expresszióját<sup>3</sup>. Habár, az NPY és az AGRP hiánya knock out (KO) egerekben nincs számottevő hatással az energiaháztartásra; az ARC orexigén sejtjeinek kritikus szerepét mutatja, hogy egerekben e sejtek felnőttkori kiirtása az állatok elhullását eredményező anorexiát (étvágytalanságot) okoz<sup>16,17</sup>. A proopiomelanokortint (POMC) és a kokain- és

amfetamin-regulated transcript (CART) peptidet szintetizáló neuronok az ARC laterális részén helyezkednek el. E sejtek ellentétesen hatnak az energiaháztartásra, mint az NPY/AGRP idegsejtek<sup>3</sup>. Az alfa-melanocita-stimuláló hormon ( $\alpha$ -MSH), a POMC prekursorból keletkezik, és jól ismert az erős táplálkozás gátló hatásáról<sup>3</sup>. Az  $\alpha$ -MSH központi idegrendszerbe való adása csökkenti a táplálékfelvételt és egyidejűleg növeli az energialeadást<sup>3</sup>. Az  $\alpha$ -MSH az MC3R és a MC4R agonistája<sup>18</sup>. A CART szintén gátolja a táplálékfelvételt és teljesen kivédi az NPY-indukálta táplálkozási választ<sup>19</sup>. Jelenleg kevés információ érhető el a CART energialeadásra gyakorolt hatásáról. A CART receptorát még nem azonosították. A POMC/CART idegsejtek is érzékelik a perifériás energiaháztartással kapcsolatos hormonokat, például a leptint és az inzulint<sup>3</sup>. E sejtek azonban másképp szabályozódnak, mint az NPY/AGRP idegsejtek. Az éhezés gátolja a POMC és a CART szintézisét, míg leptin kezelés serkentőleg hat a gének expressziójára<sup>3</sup>. Annak ellenére, hogy a leptin receptor jelen van ezekben az idegsejtekben, a leptin indirekt, GABA sejtek által közvetített hatása is fontos szerepet tölt be a POMC/CART idegsejtek szabályozásában<sup>20</sup>. Genetikai vizsgálatok is alátámasztják a POMC/CART idegsejtek energiaháztartás szabályozásában betöltött fontos szerepét. A POMC vagy a MC4R hiánya KO egerekben kóros elhízást eredményez<sup>21,22</sup>. Hasonlóképp emberben a melanokortin rendszer elemeit érintő mutációk szintén elhízáshoz vezetnek. E mutációk felelősek a kóros mértékű elhízás 6-10 %-ért, így a humán monogénes elhízás szindrómák legnagyobb ismert csoportját alkotják<sup>23</sup>. A CART hiánya kevésbé súlyos fenotípust eredményez<sup>24</sup>. A CART KO egerekben csak időskori elhízás figyelhető meg<sup>24</sup>. Emberben, egy CART gén polimorfizmus (A1475G) és az elhízás asszociációját figyelték meg<sup>24</sup>. Az ARC két táplálkozással kapcsolatos idegsejt csoportja érzékeli és integrálja az energiaháztartással kapcsolatos szignálokat és továbbítja az úgynevezett másodrendű táplálkozásszabályozó idegsejt csoportok felé. Ilyen sejtcsoportok például a hipotalamusz paraventriculáris (PVN) és dorzomediális magjai (DMN) és a tuberomammilláris mag (TMN) hisztaminerg idegsejtjei. Az energiaháztartás homeosztatisz szabályozása mellett, fertőzés és stressz<sup>25,26</sup> esetén is részt vesznek az ARC sejtcsoportjai a táplálékfelvétel és az energialeadás szabályozásában.

## I. 2 A PVN szerepe az energiaháztartás szabályozásában

A PVN, egy háromszög alakú, a harmadik agykamra tetejénél szimmetrikusan elhelyezkedő mag. Magnocelluláris és parvocelluláris részre különül el<sup>27</sup>. Az oxitocint és vazopresszint termelő idegsejtek a magnocelluláris részben található, hormonjaikat az agyalapi mirigy hátsó lebenyébe ürítik<sup>27</sup>. A PVN parvocelluláris részét további 6 almagra oszthatjuk: anterior, periventriculáris, mediális, ventrális, laterális almagokra és a dorsal cap régióra<sup>28</sup>. A periventriculáris és a mediális parvocelluláris almagokban hipofiziotróp és nem-hipofiziotróp idegsejtek is megtalálhatók, míg a többi parvocelluláris almagban nem-hipofiziotróp idegsejtek helyezkednek el. A hipofiziotróp idegsejtek az eminencia mediána (EM) külső zónájába vetülnek, ahol a hormonjaikat az extracelluláris térbe ürítik a fenesztrált kapillárisok közelében<sup>27</sup>. E hormonok a portális keringésen keresztül jutnak az agyalapi mirigy első lebenyébe, ahol a hormontermelést szabályozzák. A hormontermelésük alapján a PVN parvocelluláris részében 3 típusú hipofiziotróp idegsejt található: szomatosztatint, kortikotropin-releasing hormont (CRH) és

tirotropin-releasing hormont (TRH) termelő idegsejtek. A szomatosztatin sejtek gátolják az agyalapi mirigy által termelt növekedési hormon szintézisét, míg a hipofiziotróp CRH és TRH sejtek a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg (HHM) és –pajzsmirigy (HHP) tengelyek központi szabályozói. E neuroendokrin tengelyek kritikus szerepet játszanak az energiaháztartás szabályozásában. A PVN parvocelluláris magjában elhelyezkedő nem-hipofiziotróp sejtek jelentős része az autonóm funkciók szabályozásáért felelős. Ezek az úgynevezett preautonóm idegsejtek a gerincvelő és az agytörzs energiaháztartás szabályozásában fontos szerepet játszó területeire vetülnek, mint a gerincvelő intermediolaterális sejtszlopa, a nucleus tractus solitarii (NTS), a nervus vagus dorzális magja, a parabrachialis mag és a ventrális medulla katekolaminerg idegsejtjei<sup>29</sup>. E magok közvetítésével a PVN sejtjei multiszinaptikus kapcsolatok révén szabályozzák a hasnyálmirigy, a fehér és barna zsírszövet (BAT), a máj és az izmok működését<sup>30-32</sup>. Az energiaháztartás változásának hatását több agyterület is közvetíti a PVN felé. Ezek közül az egyik legfontosabb az ARC<sup>3</sup>. A mag orexigén (NPY/AGRP) és anorexigén (POMC/CART) idegsejtjei is dúsan beidegzik a PVN parvocelluláris neuronjait<sup>3</sup>. Gyakran ugyanazt a parvocelluláris idegsejtet az ARC orexigén és anorexigén idegsejtjei is beidegzik<sup>28</sup>. Az energiaháztartás szabályozásában fontos szerepe van az arcuato-paraventriculáris pályának<sup>3</sup>. Az NPY a PVN-ben jelentősen növeli a táplálékfelvételt<sup>14</sup>, fokozza a szénhidrát felhasználást<sup>33</sup>, és csökkenti az energialeadást, illetve az egyes típusú uncoupling fehérje (UCP1) expresszióját a BAT-ban<sup>34,35</sup> és testsúly gyarapodást okoz<sup>36</sup>. Az NPY mindkét poszt-szinaptikus receptora, a Y1 és a Y5, is jelen van a PVN-ben<sup>37</sup>. E pertussis toxin érzékeny Gi/o fehérjéhez<sup>37</sup> kapcsolt receptorok az adenilát cikláz<sup>38</sup> gátlásán keresztül csökkentik a sejt cAMP szintjét. Az NPY energialeadásra kifejtett hatása részben a TRH és a CRH gén expresszió gátlásán keresztül érvényesül, amit a cAMP szint csökkenése közvetít<sup>39-42</sup>. Emellett a PVN-ben az NPY a parvocelluláris sejtek GABA-erg és glutamaterg beidegzését is gátolja<sup>43</sup>. Az NPY-hoz hasonlóan, az AGRP PVN-be történő beadása szintén növeli a táplálékfelvételt<sup>44</sup>. Ellentétben az orexigén peptidekkel, az  $\alpha$ -MSH-nak erős anorexigén hatása van PVN-be adást követően<sup>45</sup>. Az  $\alpha$ -MSH legtöbb hatása az MC4R-on keresztül érvényesül. Az MC4R KO egerek hiperfágiások és csökken az energialeadásuk<sup>22</sup>. Ezekben az egerekben az MC4R-nak kizárólag a PVN-ben történő újratermelése jelentősen csökkenti az MC4R hiánya miatt kialakuló hiperfágiát<sup>46</sup>, bizonyítva a PVN fontosságát a melanokortinok táplálékfelvételre kifejtett hatásának kialakulásában. Az  $\alpha$ -MSH szabályozza a HHM és a HHP tengelyeket is a hipofiziotróp sejtek CRH és TRH gén expressziójának serkentésén keresztül<sup>47,48</sup>.

### I. 3 Retrográd ingerületátvivő rendszerek a PVN parvocelluláris részében

Munkacsoportunk patch clamp elektrofiziológiával kimutatta, hogy az NPY gátolja a parvocelluláris idegsejtek GABAerg és glutamaterg beidegzését is<sup>49</sup>. Ez a hatás teljesen kivédhető a kalcium kelátor BAPTA intracelluláris beadásával, ami azt bizonyítja, hogy az NPY retrográd ingerületátvivő anyagok közvetítésével gátolja a parvocelluláris idegsejtek inputjait<sup>49</sup>. A legtöbb idegsejt által használt retrográd ingerületátvivő rendszer az agyban az endokannabinoid rendszer<sup>50</sup>. A központi idegrendszerben az endokannabinoid rendszer legfőbb receptora az egyes típusú kannabinoid receptor (CB1)<sup>50</sup>. A receptor két leggyakoribb endogén ligandja a 2-

arachidonoylglycerol (2-AG) és az anandamid<sup>50</sup>. A 2-AG a posztzinaptikus idegsejteknek a periszinaptikus régiójában szintetizálódik és hat a preszinaptikus terminális periszinaptikus részén elhelyezkedő CB1 receptorra<sup>50</sup>. A CB1 receptor aktivációja gátolja a preszinaptikus terminális aktivitását<sup>50</sup>. A szinaptikus aktivitás fontos szabályozója az endokannabinoid szintézis. A 2-AG-t szintetizáló enzim, a diacilglicerol lipáz alfa (DAGL $\alpha$ ), a megnövekvő szinaptikus aktivitás következtében aktiválódik, mely hatást a metabotróp receptorokhoz, például a metabotróp glutamát 1 és 5 receptorhoz vagy az acetilkolin muszkarin M1 és M3 receptorához, kapcsolt foszfolipáz C közvetíti<sup>51</sup>. Munkacsoportunk kimutatta, hogy a CB1 jelen van a PVN parvocelluláris idegsejtjeit beidegző gátló és serkentő terminálisokban is<sup>52</sup>. Továbbá kimutatták, hogy az endokannabinoid rendszer közvetíti a grelin és a glükokortikoidok hatását a PVN-ben a parvocelluláris idegsejten<sup>53,54</sup>. Kimutattuk, hogy a CB1 gátlása, AM251-gyel<sup>1</sup>, kivédi az NPY hatását a parvocelluláris idegsejtek GABA-erg beidegzéseire<sup>49</sup>. **Azonban az AM251 koncentráció, ami kivédte a grelinnek a parvocelluláris sejtek glutamáterg beidegzésére kifejtett hatását<sup>53</sup>, nem védte ki az NPY glutamáterg axonokra gyakorolt gátló hatását<sup>49</sup>, ez arra utal, hogy más retrográd szignál rendszer(ek) is részt vehetnek az NPY hatásának közvetítésében.** A nitrogén monoxid (NO) egy gázhalmazállapotú ingerültátvivő anyag<sup>55</sup>. A NO szintáz (NOS) enzimek termelik az NO-t. Három NOS enzim létezik: neuronális NOS (nNOS), indukálható NOS és endoteliális NOS<sup>55</sup>. Ezen enzimek közül az idegsejtek az nNOS-t termelik<sup>55</sup>. Az NO-ra legérzékenyebb receptor a szolubilis guanilát-cikláz (sGC)<sup>55</sup>.

A hippokampuszban kimutatták, hogy az nNOS és az sGC is előfordul a szinapszisok pre- és posztzinaptikus oldalán is<sup>56</sup>, ami arra utal, hogy a hippokampusz idegsejtjei az NO-t anterográd és retrográd transzmitterként is használják. Ezzel összhangban elektrofiziológiai kísérletek igazolták, hogy az NO a hippokampuszban funkcionál retrográd transzmitterként is, és kimutatták, hogy a preszinaptikus plaszticitás kialakításában az endokannabinoid és az NO szignál rendszerek együttesen vesznek részt<sup>57</sup>. Habár, az nNOS jelen van a PVN-ben, kevés információ érhető el az NO szignál rendszer elemeinek elhelyezkedéséről az idegmagban, és nem ismert, hogy vajon a PVN idegsejtjei használják-e az NO-t retrográd transzmitterként<sup>58</sup>.

#### I. 4 A hipofiziotróp TRH idegsejtek negatív *feedback* szabályozása

A hipofiziotróp TRH idegsejtek kritikus szerepet játszanak az energiaháztartás szabályozásában<sup>28</sup>. Ezek az idegsejtek szabályozzák a pajzsmirigy hormontermelését az agyalapi mirigy első lebenyében elhelyezkedő tirotróp sejtek TSH termelésének és ürítésének szabályozásán keresztül<sup>28</sup>. A pajzsmirigyhormonok fontos szabályozói az energiaháztartásnak<sup>28</sup>. E hormonok hiánya 30%-kal csökkenti az alapanyagcserét, illetve hipotiroid állapotokban nincs hideg indukálta hőtermelés<sup>28</sup>. A HHP tengely fő szabályozója a pajzsmirigyhormonok negatív *feedback* hatása, ez biztosítja a pajzsmirigyhormonok viszonylag állandó szintjét a vérben<sup>28</sup>. Amikor a perifériás pajzsmirigyhormonok szintje növekszik, a *feedback* szabályozás gátolja a TRH szintézist<sup>28</sup>. A hipofiziotróp TRH idegsejtek tartalmaznak pajzsmirigyhormon  $\beta$ 2 receptort (TR $\beta$ 2), ami nélkülözhetetlen a *feedback* szabályozás kialakulásához<sup>28</sup>.

<sup>1</sup> antagonista

Továbbá, T3 pellet beültetése közvetlenül a PVN mellé gátolja a TRH gén expresszióját az implantáció oldalán<sup>28</sup>. Azonban a keringő T3 szint helyreállítása T3 pótlással hipotiroid állatokban, T4 prohormon adagolás nélkül, nem elegendő a TRH gén expressziójának normalizálásához a PVN-ben<sup>28</sup>. Ezen adatok alátámasztják, hogy a TRH idegsejtek negatív feedback szabályozásához szükséges, hogy a hipotalamuszban a T4 prohormon átalakuljon aktív T3-má. A hipotalamuszban, a T4 T3-má való átalakításáért a kettes típusú dehidrogenáz (D2) felelős<sup>59</sup>. Azonban a PVN-ben, ahol a hipofiziotróp TRH idegsejtek találhatóak, nem mutatható ki D2 aktivitás vagy D2 mRNS<sup>60</sup>. A hipotalamuszban speciális gliasejtek, a taniciták termelik a D2-t<sup>60</sup>. A taniciták a harmadik agykamra falában és aljában a látóideg kereszteződése mögött helyezkednek el. E sejtek hosszú bazális nyúlványaikkal az ARC-ba, a DMN-be és a ventromediális magba illetve az EM külső zónájába vetülnek<sup>28</sup>. A TRH idegsejtek sejtteste és a taniciták meglehetősen messze helyezkednek el egymástól. Az EM külső zónájában a tanicita végtagok és a hipofiziotróp TRH idegsejtek axon terminálisai azonban közvetlen kapcsolatban vannak, ami lehetőséget ad arra, hogy a taniciták által előállított és az extracelluláris térbe juttatott T3-at a hipofiziotróp terminálisok felvegyék és eljuttassák a sejttesteikhez, ahol a T3 kapcsolódni képes a magi TR $\beta$ 2 receptorhoz<sup>28</sup>. A pajzsmirigyhormonok transzporterek segítségével képesek bejutni a sejtekbe<sup>28</sup>. A főbb pajzsmirigyhormon transzporterek a monokarboxilát transzporter 8 (MCT8), az OATP1C1 és a Lat1 és 2<sup>61</sup>. Az idegsejtekben az MCT8 a legfőbb pajzsmirigyhormon transzporter. Az MCT8 hiánya súlyos neurológiai tüneteket okoz emberben, továbbá emberben és egerekben is hiánya a HHP tengely túlzott működését eredményezi<sup>62,63</sup>. Ez arra utal, hogy az MCT8 szükséges a HHP tengely negatív *feedback* szabályozásához. **Habár, leírták, hogy a taniciták termelnek MCT8-at<sup>64</sup>, nem volt információ arról, hogy ez a transzporter megjelenik a hipofiziotróp axonterminálisokban. Az MCT8 jelenléte a hipofiziotróp TRH idegsejtek axon terminálisaiiban arra utalna, hogy az EM-ban a T3-at a hipofiziotróp TRH idegsejtek az axon terminálisaikon keresztül felvehetik.** A kérdés jelentőségét az adja, hogy a TRH sejtek a vér-agy gáton belül helyezkednek el, a hipofiziotróp TRH idegsejtek axonjai viszont a vér-agy gát mentes EM-ban végződnek. Továbbá, a T4 hatékonyabban tud keresztüljutni a vér-agy gáton, mint a T3<sup>28</sup>. Így, a pajzsmirigyhormon felvétel helye meghatározza, hogy a hipofiziotróp TRH idegsejtek csak a taniciták által aktivált pajzsmirigyhormont, vagy a lokálisan keletkezett T3-at és a vérből az EM külső zónájába bejutó T3-at együtt érzékelik.

### **I. 5 A TRH idegsejtek szerepe a táplálkozás szabályozásában**

Korábban leírták, hogy az agykamrákba adagolt TRH csökkenti a táplálékfelvételt és csökkenti a táplálkozással töltött időt is<sup>65</sup>. A TRH képes gátolni az éhezést követő fokozott táplálékfelvételt is<sup>65</sup>. **A TRH erőteljes anorexián hatása ellenére sem ismert, hogy mely TRH sejtsoport(ok) és hol fejt(i) ki ezt a hatást.** Munkacsoportunk korábban kimutatta<sup>66</sup>, hogy a perifernikális területen és a BNST-ben elhelyezkedő TRH idegsejtek látszólag folytonos csoportja egy másik szintén anorexián peptidet, az urokortin 3-at (UCN3) is termeli, és e TRH/UCN3 idegsejtek vetülnek az ARC laterális részébe. A két anorexián peptid megjelenése ugyanabban az idegsejtben és az ARC laterális területére való vetülésük, felvetette a lehetőségét, hogy a perifernikális régió/BNST területen elhelyezkedő TRH/UCN3 idegsejtek

részt vehetnek a táplálkozás szabályozásában. Irodalmi adatok felvetik a lehetőségét, hogy a TMN hisztaminerg idegsejtjei részt vesznek a TRH anorexigén hatásának közvetítésében. A TRH-hoz hasonlóan, a központi idegrendszerben hatva a hisztamin is csökkenti a táplálékfelvételt<sup>67-69</sup>. Továbbá, a hisztamin-szintetizáló enzim, a hisztidin-dekarboxiláz, hiánya időskori elhízást és hiperfágiát okoz<sup>70</sup>, ami szintén a hisztamin anorexigén hatására utal. **A TRH amellett, hogy dózisfüggően csökkenti a táplálékfelvételt, növeli a hisztamin és a t-metilhisztamin<sup>2</sup> koncentrációját a TMN-ben<sup>71</sup>, ami arra utal, hogy a TRH a hisztamin sejtek serkentésén keresztül hathat a táplálékfelvételre.** Ezt a feltételezést támasztják alá azok az adatok is, hogy a TRH anorexigén hatása csökkenthető a hisztamin szintézis farmakológiai gátlásával<sup>71</sup>, illetve, hogy a TRH fokozza a hisztaminerg idegsejtek tüzelési frekvenciáját<sup>72</sup>. **Ezen fontos funkcionális adatokra alapozva, feltételezzük, hogy a hisztaminerg idegsejteket beidegző TRH idegsejtek elhelyezkedésének feltérképezése elősegítheti az anorexigén TRH sejtcsoport(ok) feltárását. Nem volt ismert azonban, hogy a TRH idegsejtek valóban beidegzik-e a hisztaminerg idegsejteket, illetve, hogy ez a kapcsolat csak a TMN egy almagjára jellemző-e vagy az összes hisztaminerg idegsejtre.** Ezért, a részletes pályajelölési vizsgálatok elvégzése előtt fel kellett térképezni a TRH axonok és a hisztaminerg idegsejtek kapcsolatát a TMN almagjaiban.

## II. Célkitűzések

Hogy jobban megértsük az energiaháztartást szabályozó hipotalamikus hálózatokat, céljaink a következők voltak:

1. *A NO rendszer elemeinek ultrastrukturális vizsgálata a PVN parvocelluláris részében.*
2. *A NO és az endokannabinoid rendszer kolokalizációjának vizsgálata PVN parvocelluláris részében.*
3. *A PVN NO és endokannabinoid rendszerei szerepének vizsgálata az NPY energiaháztartásra gyakorolt hatásának közvetítésében*
4. *A pajzsmirigyhormon transzporter, MCT8 jelenlétének vizsgálata a hipofiziotróp TRH idegsejtek axonjaiban.*
5. *A perifornikális területen és BNST-ben elhelyezkedő TRH/UCN3 idegsejtek szerepének vizsgálata az ARC táplálkozásszabályozásban szerepet játszó idegsejtcsoportjainak beidegzésében*
6. *A TRH-tartalmú axonok és a TMN hisztaminerg sejtjei közötti kapcsolat vizsgálata.*

---

<sup>2</sup> Fő metabolitja a hisztaminnak

### III. Anyagok és módszerek

A kísérlet számát, melyben a leírt módszert alkalmaztuk, zárójelben tüntettük fel.

#### III.1 Állatok

- Felnőtt, hím Wistar patkányokat (Charles River, **III.7.5-12**), CD1 egereket (Charles River, **III.7.1-5**) és MCT8 KO egereket <sup>73</sup> (Dr. H. Heuer, Jena, Németország) (**III.7.5**) használtunk.

#### III.2 Kolhicin kezelés

- 100 µg (5 µl fiziológias (0,9%) sóoldatban oldva) kolhicint injektáltunk az oldalkamrába, sztereotaxikus készülék segítségével. (**III.7.8-12**)

#### III.3 Állatok fixálása fény és elektronmikroszkópos immuncitokémiai vizsgálatokhoz

- Altatás: ketamin (50 mg/kg) + xylazin (10 mg/kg), ip.
- Az állatokat a szív bal kamráján keresztül az aortába helyezett külön külön keresztül perfundáltuk 10 ml foszfát puffer tartalmazó sóoldattal (PBS, pH 7,4), majd foszfát pufferben (PB, pH 7,4) oldott fixálószerrel (**I. Táblázatban** összegezve).
- A fixálást követően, az agyakat 4% paraformaldehid (PFA) oldatban posztfixáltuk 2 órán keresztül fénymikroszkópos vizsgálatokhoz és 24 órán keresztül elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz. Az akrolein fixált szöveteket 1% nátrium-borohidrid oldattal kezeltük 30 percig.

**I. Táblázat** Kísérletekre lebontva a fixálási módok és a felhasznált állatok száma

Kísérletek	Fixáló oldat	Állatok száma
<b>III.7.1-3</b>	10 ml 4% PFA Na-acetát pufferben, pH 6,0, ezt követően 50 ml 4% PFA Borax pufferben, pH 8,5;	4 egér
<b>III.7.4</b>	4% PFA 0,1 M PB-ben, pH 7,4; 50 ml/egér	3 egér
<b>III.7.5</b>	4% PFA 0,1 M PB-ben, pH 7,4, 50 ml/egér vagy 150 ml/patkány	3 egér 3 patkány
<b>III.7.6</b>	2% PFA + 4% akrolein 0,1 M PB-ben, pH 7,4, 150 ml/patkány	3 patkány
<b>III.7.8 and 9</b>	3% PFA + 1 % akrolein 0,1 M PB-ben, pH 7,4, 150 ml/patkány	3 patkány
<b>III.7.10-12</b>	2% PFA + 4% akrolein 0,1 M PB-ben, pH 7,4, 150 ml/patkány	3 patkány

#### III.4 Fénymikroszkópos immunhisztokémia

- Az agyakat 30%-os cukor oldatba tettük (PBS-ben oldva), 4 °C-on, éjen át.
- Koronális sorozat metszeteket készítettünk (25 µm) fagyasztómikrotómmal (Leica).
- A metszeteket fagyálló folyadékba gyűjtöttük és tároltuk (-20 °C) (30% etilén glikol; 25% glicerol; 0,05 M PB).
- A metszeteket PBS-ben oldott 0,5% Triton X-100 és 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> keverékében 15 percig előkezeltük, majd PBS-ben oldott 2% normál Ió szérummal (NHS) kezeltük 20 percig.
- A metszeteket a megfelelő elsődleges szérumba helyeztük éjen át, majd ezt követően a metszetek a megfelelő másodlagos ellenanyagba kerültek (részletezve **2. Táblázat**).
- A metszetek avidin-biotin komplex-vel kezeltük (ABC, 1:1000, Vector Labs; 1h).
- NiDAB hívó oldattal (0,05% diaminobenzidin (DAB), 0,15% nikkell-ammónium-szulfát és 0,005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,05M TRIS pufferben, pH 7,6) (**III.7.5**) vagy DAB hívó oldattal tettük láthatóvá az immun jelet (0,025% DAB/0,0036% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,05M TRIS pufferben, pH 7,6) (**III.7.10**).
- A metszeteket üveg tárgylemezre húztuk és DPX-vel (Sigma) fedtük le.
- A mintákat AxioCam MRc5 digitális kamerával felszerelt Zeiss AxioImager M1 mikroszkóppal elemeztük (Carl Zeiss Inc.).

#### III.5 Immunfluoreszcens vizsgálatok

- A szöveteket a fent (**III.4 a-d** pontok) leírt módon előkezeltük.



- b. A metszeteket a megfelelő elsődleges szérumba helyeztük éjen át, majd a megfelelő fajspecifikus fluorokróm-konjugált IgG-t tartalmazó oldatban inkubáltuk (részletezve a **3. Táblázatban**).
- c. A megfestett metszeteket üveg tárgylemezre helyeztük és Vectashielddel (Vector Labs) fedtük le.
- d. Az immunfluoreszcens mintákat Radiance 2000 konfokális lézerpásztaóó mikroszkóppal (Bio-Rad) elemeztük.

### III. 6 Ultrastrukturális vizsgálatok

- a. Koronális sorozatmetszeteket készítettünk (25-50 µm) Leica VT 1000S vibratómmal (Leica). A metszeteket PBS-be gyűjtöttük.
- b. A szöveteket előkezeltük 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal (PBS-ben oldva) 15 percig.
- c. A metszeteket 15%-os cukoroldatba (PBS-ben oldva) tettük 15 percre majd 30% cukoroldatba éjen át, 4 °C-ra.
- d. Az antitest penetráció növelése érdekében folyékony nitrogénnel fagyasztottuk a szövetet majd felmelegítettük szobahőmérsékletre (háromszor ismételve).
- e. A nem-specifikus antitestkötődést 2% NHS-val (PBS-ben oldva) blokkoltuk 20 percig.
- f. A szöveteket a megfelelő elsődleges szérumba tettük 4 napra, majd a megfelelő fajspecifikus másodlagos IgG-ben inkubáltuk éjen át. A használt antitesteket és az immunreakció detektálásának módját a **4. Táblázat** foglalja össze.
- g. A mintákat 1% ozmium-tetroxiddal kezeltük (0,1M PB-ben oldva) 30 percig majd 2% uranil-acetáttal (70% alkoholban oldva) 30 percig, dehidratáltuk felszálló alkohol sorban és propilén-oxidban. Végül, a metszeteket Durcupan ACM epoxi gyantába (Sigma-Aldrich) ágyaztuk és két napig 56 °C-on polimerizáltuk.
- h. Leica UCT ultramikrotómmal (Leica Microsystems) 50-70 nm vastag ultrametszeteket készítettünk, melyeket Formvarral-bevont egylyukú gridekre (Electron Microscopy Sciences) gyűjtöttünk.
- i. Az ultrametszeteket JEOL transzmissziós elektronmikroszkóppal elemeztük.

#### 2. Táblázat Az immuncitokémiai vizsgálatokban felhasznált elsődleges és másodlagos antitestek kísérletenkénti összefoglalása

Kísérlet száma	Elsődleges antitest és forrása	Hígítás	Másodlagos antitest	Kromogén
II.7.5	nyúl anti-MCT8 szérúm (Dr. TJ Visser)	1:5000 – 10.000	biotinilált számár anti-nyúl IgG 1:500; (Jackson ImmunoResearch)	Ezüstözött NiDAB
II.7.10	birka anti-TRH szérúm (#08W2) <small>66,74</small>	1:50.000	biotinilált számár anti-birka IgG 1:500; (Jackson ImmunoResearch)	Ezüstözött NiDAB
	birka anti-hisztamin szérúm <small>75</small>	1:1.000	biotinilált számár anti-birka IgG 1:500; (Jackson ImmunoResearch)	DAB

#### 3. Táblázat A fluoreszcens vizsgálatokban felhasznált elsődleges és másodlagos antitestek kísérletenkénti összefoglalása

Kísérlet száma	Elsődleges antitest és forrása	Hígítás	Másodlagos antitest
II.7.4	nyúl anti-CB1 szérúm (Abcam)	1 µg/ml	Alexa 488-konjugált számár anti-nyúl IgG 1:200; Life Technologies
	nyúl anti- DAGLα szérúm (Abcam)	1 µg/ml	Alexa 647-konjugált számár anti-nyúl IgG 1:200; Life Technologies
	egér anti-MAP2	1 µg/ml	Alexa 405-konjugált számár anti-egér IgG

	szérum (Millipore)		1:200; Life Technologies
	tengerimalac anti-nNOS szérum (Abcam)	1 µg/ml	Alexa 555-konjugált számár anti-tengerimalac IgG 1:200; Life Technologies
	kecske anti-VGLUT1 szérum (Abcam, Cambridge UK)	1 µg/ml	Alexa 555-konjugált számár anti-kecske IgG 1:200; Life Technologies
	kecske anti-VGLUT2 szérum (Abcam)	1 µg/ml	Alexa 555-konjugált számár anti-kecske IgG 1:200; Life Technologies
	kecske anti-VIAAT szérum (Abcam)	1 µg/ml	Alexa 555-konjugált számár anti-kecske IgG 1:200; Life Technologies
<b>II.7.7</b>	nyúl anti-MCT8 szérum (Dr. TJ Visser)	1:1000	Alexa 555-konjugált számár anti-kecske IgG 1:500; Life Technologies
	birka anti-TRH szérum #08W2	1:1500	Fluorescein DTAF-konjugált birka IgG 1:50, Jackson ImmunoResearch
<b>II.7.8</b>	nyúl anti-UCN3 szérum (Dr. WW Vale)	1:60.000	Biotinilált számár anti-nyúl IgG 1:500; Jackson ImmunoResearch; Fluorescein DTAF-konjugált Streptavidin 1:300, Jackson ImmunoResearch
	egér anti-TRH szérum	1:4000	Alexa 555 konjugált számár anti-egér IgG 1:500, Jackson ImmunoResearch
	birka anti- $\alpha$ -MSH szérum	1:20.000	Cy5 konjugált számár anti-birka IgG 1:100, Jackson ImmunoResearch
	birka anti-NPY szérum (Dr. I. Merchenthaler)	1:8.000	Cy5 konjugált számár anti-birka IgG 1:100, Jackson ImmunoResearch
<b>II.7.11</b>	egér anti-TRH szérum	1:4.000	Alexa 555-konjugált számár anti-egér IgG 1:500, Jackson ImmunoResearch
	birka anti-hisztamin szérum	1:20.000	Biotinilált számár anti-birka IgG 1:500 fluorescein-konjugált streptavidin 1:250, Vector Lab

### III. 7 Kísérletek

A kísérletek részleteit a 2-5 Táblázatokban összegeztük.

- III.7.1 Az nNOS elhelyezkedésének ultrastrukturális vizsgálata a PVN parvocelluláris részében immunocitokémia alkalmazásával
- III.7.2 A sGC $\alpha$ 1 elhelyezkedésének ultrastrukturális vizsgálata a PVN parvocelluláris részében
- III.7.3 Az nNOS és a CB1 kapcsolatának ultrastrukturális vizsgálata a PVN parvocelluláris részében, kettős-jelölt immunocitokémia alkalmazásával
- III.7.4 Az endokannabinoid és NO szignál rendszerek elemeinek, illetve a glutamáterg és a GABA-erg axonok kapcsolatának vizsgálata a PVN parvocelluláris részében négyes-jelölt immunfluoreszcencia alkalmazásával
- III.7.5 MCT8 előfordulásának fénymikroszkópos vizsgálata az EM-ban
- III.7.6 MCT8-immunreaktivitás ultrastrukturális vizsgálata az EM-ban
- III.7.7 MCT8 előfordulásának vizsgálata TRH axonokban az EM területén
- III.7.8 Az  $\alpha$ -MSH illetve NPY sejtek TRH és UCN3-tartalmú beidegzésének vizsgálata az ARC-ban hármás-jelöléses immunfluoreszcencia alkalmazásával
- III.7.9 Az  $\alpha$ -MSH idegsejtek UCN3-IR beidegzésének ultrastrukturális vizsgálata az ARC-ban
- III.7.10 A TRH axonok és a hisztaminerg idegsejtek kapcsolatának vizsgálata a TMN-ben kettős-jelöléses fénymikroszkópos immunocitokémia alkalmazásával
- III.7.11 A TRH axonok és a hisztaminerg idegsejtek kapcsolatának vizsgálata a TMN-ben kettős-jelöléses immunfluoreszcencia alkalmazásával
- III.7.12 A TRH axonok és a hisztaminerg idegsejtek kapcsolatának ultrastrukturális vizsgálata a TMN-ben
- III.7.13 A PVN NO és az endokannabinoid rendszerei szerepének vizsgálata az NPY energiaháztartásra gyakorolt hatásának közvetítésében
  - a. Kétoldali 0,487 mm vastag, 0,8 mm C/C rozsdamentes acél kanül (Plastics One, Roanoke, VA, USA) ültettünk a PVN-be.
  - b. aCSF-t, AM251-t vagy NPLA-t (0,4  $\mu$ l mindkét oldalra) adtunk be a kanülon keresztül egy minipumpát használatával (sebessége: 0,5  $\mu$ l/perc).
  - c. 10 perccel később, aCSF-t vagy NPY-t (0,4  $\mu$ l mindkét oldalra) adtunk be a kanülon át (0,5  $\mu$ l/perc).
  - d. Test összetételt Echo Medical systems' EchoMRI (Egész Test Összetétel Elemző) alkalmazásával vizsgáltuk.
  - e. A kezelést követően az állatokat indirekt kalorimetriás ketrecekbe helyeztük (TSE Phenomaster rendszer).
  - f. A mért adatokból kiszámítottuk az energialeadást, alapanyagcserét, szubsztrát felhasználást (RER) és lokomotoros aktivitást.

**4. Táblázat** Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz felhasznált elsődleges és másodlagos antitestek és kromogének kísérletenkénti összefoglalása

<b>Kísérlet száma</b>	<b>Elsődleges antitest és forrása</b>	<b>Hígítás</b>	<b>Másodlagos antitest</b>	<b>Kromogén</b>
<b>III.7.1</b>	nyúl anti-nNOS szérúm (Zymed Lab)	1:200	0.8 nm kolloidális arannyal konjugált számár anti-nyúl IgG (1:100; Electron Microscopy Sciences)	R-Gent SE-LM kittel ezüstözött kolloidális arany (Aurion)
<b>III.7.2</b>	nyúl anti-sGC $\alpha$ 1 szérúm (Sigma)	1:4.000	biotinilált számár anti-nyúl IgG (1:500 Jackson ImmunoResearch)	ezüstözött NiDAB
<b>III.7.3</b>	nyúl anti-nNOS szérúm (Zymed Lab)	1:200	0.8 nm kolloidális arannyal konjugált számár anti-nyúl IgG (1:100 Electron Microscopy Sciences)	R-Gent SE-LM kittel ezüstözött kolloidális arany (Aurion)
	birka anti-CB1 szérúm (Dr. M. Watanabe)	1:800	biotinilált számár anti-birka IgG (1:500 Jackson ImmunoResearch)	NiDAB
<b>III.7.6</b>	nyúl anti-MCT8 szérúm (Dr. TJ Visser)	1:20.000	biotinilált számár anti-nyúl IgG (1:500 Jackson ImmunoResearch)	ezüstözött NiDAB
<b>III.7.9</b>	birka anti- $\alpha$ -MSH szérúm (Dr. JB Tatro)	1:1.000	0.8 nm kolloidális arannyal konjugált számár anti-birka IgG (1:100; Electron Microscopy Sciences)	R-Gent SE-LM kittel ezüstözött kolloidális arany (Aurion)
	nyúl anti-UCN3 szérúm (Dr. WW Vale)	1:1.000	biotinilált számár anti-nyúl IgG (1:500 Jackson ImmunoResearch)	NiDAB
<b>III.7.12</b>	egér anti-TRH szérúm	1:10.000	biotinilált számár anti-egér IgG (1:500; Jackson ImmunoResearch)	DAB
	birka anti-hisztamin szérúm	1:2.000	0.8 nm kolloidális arannyal konjugált számár anti-birka IgG (1:100; Electron Microscopy Sciences)	R-Gent SE-LM kittel ezüstözött kolloidális arany (Aurion)

### 5. Táblázat Felhasznált elsődleges antitestek összefoglalása

<i>Felhasznált elsődleges antitest</i>	<i>Forrás</i>	<i>Referencia</i>
<b>kecske anti-VGLUT1 szérúm</b>	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>	76
<b>kecske anti-VGLUT2 szérúm</b>	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>	76
<b>kecske anti-VIAAT szérúm</b>	<i>Life technologies, Waltham, MA</i>	76
<b>tengerimalac anti-nNOS szérúm</b>	<i>Thermo Fisher, Waltham, MA</i>	77
<b>egér anti-MAP2 antitest</b>	<i>Millipore, Billerica, MA</i>	78
<b>egér anti-TRH szérúm</b>	<i>Laboratóriumunkban készült</i>	79,80
<b>nyúl anti-DAGL<math>\alpha</math> szérúm</b>	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>	81
<b>nyúl anti-CB1 szérúm</b>	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>	82
<b>nyúl anti-MCT8 szérúm</b>	<i>Dr. T.J. Visser, Rotterdam, Hollandia</i>	83
<b>nyúl anti-nNOS szérúm</b>	<i>Zymed Laboratories, Waltham, MA</i>	56
<b>nyúl anti-sGC<math>\alpha</math>1 szérúm</b>	<i>Sigma Aldrich, St. Louis, MA</i>	56
<b>nyúl anti-UCN3 szérúm</b>	<i>Dr. W.W. Vale, La Jolla, CA</i>	66
<b>birka anti-CB1 szérúm</b>	<i>Dr. M. Watanabe, Sapporo, Japan</i>	74
<b>birka anti-hisztamin szérúm</b>	<i>Laboratóriumunkban készült</i>	75,80
<b>birka anti-NPY szérúm</b>	<i>Dr. I. Merchenthaler, Baltimore, MD</i>	39,84,85
<b>birka anti-TRH szérúm</b>	<i>Laboratóriumunkban készült</i>	66,74,79
<b>birka anti-<math>\alpha</math>-MSH szérúm</b>	<i>Dr. J.B. Tatro, Boston, MA</i>	10,86

## IV. Eredmények

*I. [C1-C5] Tézis.: A NO rendszer elemeinek ultrastrukturális lokalizációja a PVN parvocelluláris részében arra utal, hogy a PVN parvocelluláris sejtjei a NO-t anterográd és retrográd transzmitterként is használják..*

Az nNOS és az sGC is megtalálható szinapszisok pre-és posztzinaptikusan oldalán is a PVN parvocelluláris részében, ami arra utal, hogy az NO anterográd és retrográd ingerületátvivő anyagként is működhet ezen az agyterületen.

*II. [C1-C5] Tézis.: A PVN-ben elhelyezkedő parvocelluláris idegsejtek egyes serkentő és gátló szinapszisaihoz asszociáltan jelen van az NO és az endokannabinoid retrográd transzmitter is.*

A CB1-IR axonok által a parvocelluláris sejteken alkotott szinapszisok egy részének posztzinaptikus oldalán megfigyelhető az nNOS jelenléte. Ez arra utal, hogy a PVN parvocelluláris sejtjei az NO és az endokannabinoid rendszerek együttes használatával szabályozhatják egyes preszinaptikus terminálisaik aktivitását.

*III. [C1-C5] Tézis.: A NO és az endokannabinoid rendszerek is részt vesznek az NPY energiaházartásra gyakorolt hatásának közvetítésében a PVN-ben*

A PVN-ben mindkét ingerületátvivő rendszernek kritikus szerepe van az NPY energiaházartásra gyakorolt hatásának a közvetítésében, azonban a két transzmitter rendszer szerepe eltérő. A PVN-ben az NO az NPY táplálékfelvételre gyakorolt hatását közvetíti, míg az endokannabinoid rendszer az NPY energialeadást gátló hatásának közvetítésében játszik szerepet. Továbbá, az eredmények arra utalnak, hogy a PVN-ben különböző neuronális hálózatok közvetítik az NPY táplálékfelvételre, energialeadásra és a lokomotoros aktivitásra kifejtett hatását.

*IV. [J1] Tézis.: A pajzsmirigyhormon transzporter, MCT8 jelen van a hipofiziotróp TRH idegsejtek axonjaiban.*

Az MCT8 jelen van az EM külső zónájában lévő hipofiziotróp axon terminálisokban. Mindemellett a hipofiziotróp TRH idegsejtek axonterminálisai is tartalmaznak pajzsmirigyhormon transzportert. Erre az eredményre alapozva, hipofiziotróp TRH idegsejtek negatív feedback szabályozásának új modellje került leírásra.

*V. [J2] Tézis.: A perifornikális területen és BNST-ben elhelyezkedő TRH/UCN3 idegsejtek beidegzik az ARC táplálkozásszabályozásban szerepet játszó POMC idegsejtét.*

A TRH/UCN3 idegsejtek axonjai az ARC-ban csupán az NPY idegsejtek 4%-val létesítenek kapcsolatot, azonban az  $\alpha$ -MSH idegsejtek több mint felének

felszínén található TRH/UCN3 axonok. A TRH/UCN3 idegsejtek axonjai aszimmetrikus szinapszisokat képeznek az  $\alpha$ -MSH idegsejteken.

#### ***VI. [J3] Tézis.: A TRH-tartalmú axonok beidegzik a hisztaminerg sejteket a TMN minden almagjában.***

TRH-IR axonok gazdagon beidegzik a hisztaminerg idegsejteket a TMN összes almagjában. Ultrastrukturális szinten a két rendszer közt gyakran szinaptikus kapcsolat volt megfigyelhető. A szinaptikus kapcsolatok túlnyomó többsége aszimmetrikus típusú, ami a kapcsolat, serkentő jellegére utal, de TRH-tartalmú axonok szimmetrikus szinapszisokat is képeznek a hisztaminerg idegsejteken.

### **V. Az eredmények lehetséges hasznosítása**

Mivel, jelenleg nincs hatékony és mellékhatásmentes terápia az elhízás kezelésére, rendkívül fontos eddig még nem ismert, energiaháztartást szabályozó mechanizmusok feltárása. Az energiaháztartás szabályozásában résztvevő új mechanizmusok és/vagy idegsejt csoportok megismerése új hatóanyag célpontokat eredményezhet a gyógyszergyártó cégek számára. Jól ismert probléma, hogy számos idegpálya a táplálékfelvételt és az energialeadást is szabályozza. Az energialeadás serkentésében fontos a szimpatikus idegrendszer aktivációja. Azonban a szimpatikus idegrendszer serkentése nem csak az energialeadást serkenti, hanem növeli a vérnyomást is. Például az MC4R agonisták hatékonyan csökkentik a táplálékfelvételt és serkentik az energialeadást, így csökkentik a testsúlyt<sup>87</sup>. De ezek az MC4R agonisták növelik a vérnyomást is<sup>88</sup>. Ez komoly problémát okozhat a metabolikus szindróma miatt egyébként is magas vérnyomással küszködő elhízott betegek<sup>89</sup>. Eredményeink, miszerint az NPY táplálékfelvételre és energialeadásra kifejtett hatását eltérő idegpályák közvetítik a PVN-en belül, megteremtik a lehetőségét új kutatásoknak, melyek azonosíthatják e pályákat és ezáltal új gyógyszercélpontokat biztosíthatnak, melyek befolyásolásával gátolható a táplálékfelvétel a szimpatikus idegrendszer serkentése, a vérnyomás emelése nélkül.

A POMC idegsejtek TRH/UCN3 beidegzését kimutató eredményeink tették lehetővé munkacsoportunk elektrofiziológiai vizsgálatait, melyek kimutatták, hogy a TRH kivédi az UCN3 POMC idegsejteket serkentő hatását. Ez alapján tovább kívánjuk vizsgálni az intracelluláris mechanizmusokat, melyek a két peptid interakciójáért felelősek. E mechanizmusok megismerése lehetőséget biztosíthat az anorexigén POMC sejtek aktivitásának gyógyszeres finomhangolására.

A hisztaminerg idegsejtek TRH beidegzésének részletes leírása lehetővé teszi, hogy pályajelölési vizsgálatokkal azonosítsunk olyan TRH-t szintetizáló idegsejt csoportokat, melyek szabályozzák a táplálékfelvételt. Ezen TRH idegsejtek szabályozásának megértése további új hatóanyag célpontot eredményezhet a jövőben.

## VI. Köszönetnyilvánítás

Először szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Fekete Csabának**, munkám irányítását, türelmét és értékes támogatását.

Köszönettel tartozom **Farkas Imrének**, **Gereben Balásznak** és **Liposits Zsoltnak** a munkáim során nyújtott segítségükért.

Köszönöm a jelenlegi és korábbi munkatársaimnak a közös munkát: **Bardóczi Zsuzsának**, **Bálint Flórának**, **Beliczai Zsuzsának**, **Hrabovszky Eriknek**, **Juhász Andreának**, **Kádár Andreának**, **Kalló Imrének**, **Kiss Enikőnek**, **Maruzs Verának**, **Mohácsik Petrának**, **Molnár Csillának**, **Péterfi Zoltánnak**, **Simon Ágnesnek**, **Skrapits Katának**, **Szabon Juditnak**, **Szilvásszabó Anettnek**, **Tóth Mónikának**, **Vastagh Csabának**, **Vida Barbarának**, **Zeöld Anikónak**, **Zseli Györgyinek**.

Szeretném továbbá megköszönni a közös cikkeink szerzőinek a közlemények létrejöttéhez nyújtott fontos hozzájárulásukat: **Sárvári Anna**, **Wittmann Gábor**, **Nagyunyomi-Sényi Kata**, **Barna László**, **Masahiko Watanabe**, **Motokazu Uchigashima**, **Palkovits Miklós**, **Raphaël G. P. Denis**, **Ronald M. Lechan**, **Serge Luquet**, **Füzesi Tamás**, **Ann Marie Zavacki**, **Rafael Arjojo e Drigo**, **Liping Dong**, **Beáta A. Borsay**, **László Herczeg**, **Antonio C. Bianco**.

Továbbá, köszönettel tartozom a Doktori Iskolának, különösképpen prof. Szolgay Péternek a lehetőségért, hogy részt vehettem a doktori programban. Köszönöm **Vida Tivadarné Katinkának** a segítőkészségét.

Hálás vagyok Anyukámnak és a barátaimnak, hogy mindig hittek bennem és támogattak.

Végül pedig, köszönöm férjem, **András** szeretetét, türelmét, támogatását és bátorítását még a legnehezebb pillanatokban is.

## VII. Publikációk és konferencia absztraktok

### VII. 1 A tézis alapját képező publikációk

\*Megosztott szerzőség.

[J1] Kallo, I; Mohacsik, P; Vida, B; Zeold, A; Bardoczi, Z; Zavacki, AM; **Farkas, E**; Kadar, A; Hrabovszky, E; Arjojo, e Drigo R; et al. A Novel Pathway Regulates Thyroid Hormone Availability in Rat and Human Hypothalamic Neurosecretory Neurons Plos One 7: (6) Paper: e37860, 16 p. (2012)

[J2] Zoltán Péterfi\*, **Erzsébet Farkas\***, Kata Nagyunyomi-Sényi, Andrea Kádár, Szenci Ottó, András Horváth, Tamás Füzesi, Ronald M. Lechan, Csaba Fekete Role of TRH/UCN3 neurons of the perifornical area/ bed nucleus of stria terminalis region in the regulation of the anorexigenic POMC neurons of the arcuate nucleus in male mice and rats Brain Structure and Function Accepted (2017)

[J3] Sarvari\*, A; **Farkas, E\***; Kadar, A; Zseli, G; Fuzesi, T; Lechan, RM; Fekete, C. Thyrotropin-releasing hormone-containing axons innervate histaminergic neurons in the tuberomammillary nucleus Brain Research 1488 pp. 72-80. (2012)

### VII. 2 Konferencia absztraktok

[C1] Zoltán Péterfi\*, Imre Farkas\*, Raphael Denis\*, **Erzsébet Farkas\***, Motokazu Uchigashima, Masahiko Watanabe, Ronald M Lechan, Zsolt Liposits, Serge Luquet and Csaba Fekete Endocannabinoid and Nitric Oxide Retrograde Signaling Systems in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus Have a Critical Role in Mediating the Effects of Npy on Energy Expenditure Endocrine Reviews Volume 37, Issue 2 Supplement, April 2016



- [C2] **Erzsébet, Farkas,** Fekete, C; Lechan, RM. Subcellular localization of the components of the nitric oxide system in the hypothalamic paraventricular nucleus of mice Phd Proceedings Annual Issues Of The Doctoral School Faculty Of Information Technology And Bionics 10 pp. 29-32. (2015)
- [C3] **Erzsébet, Farkas,** Fekete, C; Lechan, RM. Structural and functional characterization of the retrograde signaling system in the hypothalamic paraventricular nucleus Phd Proceedings Annual Issues Of The Doctoral School Faculty Of Information Technology And Bionics 2014 pp. 15-18. (2014)
- [C4] **Erzsébet, Farkas,** Fekete, C; Lechan, RM. Subcellular localization of the components of the nitric oxide system in the hypothalamic paraventricular nucleus of mice Pázmány Péter Catholic University Phd Proceedings pp. 21-24. (2013)
- [C5] **E. Farkas,** R. M. Lechan, C. Fekete Subcellular localization of the components of the nitric oxide system in the hypothalamic paraventricular nucleus of mice. Society of Neuroscience (2012)

### VII. 3 Egyéb a témához kapcsolódó publikációk

Wittmann, G; **Farkas, E;** Szilvasy-Szabo, A; Gereben, B; Fekete, C; Lechan, RM. Variable proopiomelanocortin expression in tanycytes of the adult rat hypothalamus and pituitary stalk. Journal Of Comparative Neurology 525: (3) pp. 411-441. (2017)

Farkas, I; Vastagh, C; **Farkas, E;** Balint, F; Skrapits, K; Hrabovszky, E; Fekete, C; Liposits, Z. Glucagon-Like Peptide-1 Excites Firing and Increases GABAergic Miniature Postsynaptic Currents (mPSCs) in Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neurons of the Male Mice *via* Activation of Nitric Oxide (NO) and Suppression of Endocannabinoid Signaling Pathways. Frontiers In Cellular Neuroscience 10 p. 214 (2016)

McAninch, EA; Jo, S; Preite, NZ; **Farkas, E;** Mohacsik, P; Fekete, C; Egri, P; Gereben, B; Li, Y; Deng, Y; et al. Prevalent Polymorphism in Thyroid Hormone-Activating Enzyme Leaves a Genetic Fingerprint that Underlies Associated Clinical Syndromes. Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism 100: (3) pp. 920-933. (2015)

Singru, PS; Wittmann, G; **Farkas, E;** Zseli, G; Fekete, C; Lechan, RM. Refeeding-Activated Glutamatergic Neurons in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus (PVN) Mediate Effects of Melanocortin Signaling in the Nucleus Tractus Solitarius (NTS) Endocrinology 153 pp. 3804-3814. (2012)

**Farkas E,** Ujvarosi K, Nagy G, Posta J, Banfalvi G. Apoptogenic and necrogenic effects of mercuric acetate on the chromatin structure of K562 human erythroleukemia cells. Toxicol In Vitro. 1 pp:267-75. (2010)

## VIII. Referenciák

- 1 Commission, E. <[ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/food/docs/nutrition\\_obesity\\_examples.pdf](ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/food/docs/nutrition_obesity_examples.pdf)>
- 2 Kopelman, P. G. *Nature* 404, 635-643, (2000).
- 3 Schwartz, M. W. *et al. Nature* 404, 661-671, (2000).
- 4 Zhang, Y. *et al. Nature* 372, 425-432, (1994).
- 5 Lee, G. H. *et al. Nature* 379, 632-635, (1996).
- 6 Montague, C. T. *et al. Nature* 387, 903-908, (1997).
- 7 Farooqi, I. S. *et al. The New England journal of medicine* 356, 237-247, (2007).
- 8 Bruning, J. C. *et al. Science* 289, 2122-2125, (2000).
- 9 Dawson, R. *et al. The American journal of physiology* 273, E202-206, (1997).
- 10 Fekete, C. *et al. Endocrinology* 143, 3846-3853, (2002).
- 11 Kelly, J. *et al. Pharmacol Biochem Behav* 7, 537-541, (1977).
- 12 Horvath, T. L. *et al. Brain Res* 756, 283-286, (1997).
- 13 Chambers, A. P. *et al. Handbook of experimental pharmacology*, 23-45, (2012).
- 14 Stanley, B. G. *et al. Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 3940-3943, (1985).
- 15 Wilson, B. D. *et al. Molecular medicine today* 5, 250-256, (1999).
- 16 Luquet, S. *et al. Science* 310, 683-685, (2005).
- 17 Gropp, E. *et al. Nat Neurosci* 8, 1289-1291, (2005).
- 18 Fan, W. *et al. Nature* 385, 165-168, (1997).
- 19 Kristensen, P. *et al. Nature* 393, 72-76, (1998).
- 20 Vong, L. *et al. Neuron* 71, 142-154, (2011).
- 21 Smart, J. L. *et al. Ann N Y Acad Sci* 994, 202-210, (2003).
- 22 Huszar, D. *et al. Cell* 88, 131-141, (1997).
- 23 O'Rahilly, S. *et al. in Endotext* (eds L. J. De Groot *et al.*) (MDText.com, Inc., 2000).
- 24 Larsen, P. J. *et al. Peptides* 27, 1981-1986, (2006).
- 25 Rorato, R. *et al. Exp Physiol* 94, 371-379, (2009).
- 26 Liu, J. *et al. Endocrinology* 148, 5531-5540, (2007).
- 27 Fink, G. *et al. 894* (Academic Press, London, UK, 2012).
- 28 Fekete, C. *et al. Endocrine reviews* 35, 159-194, (2014).
- 29 Geerling, J. C. *et al. J Comp Neurol* 518, 1460-1499, (2010).
- 30 O'Hare, J. D. *et al. Am J Physiol Endocrinol Metab* 310, E183-189, (2016).
- 31 Hill, J. W. *Indian journal of endocrinology and metabolism* 16, S627-636, (2012).
- 32 Xiang, H. B. *et al. International journal of clinical and experimental pathology* 7, 2987-2997, (2014).
- 33 Currie, P. J. *et al. Brain Res* 737, 238-242, (1996).
- 34 Bishop, C. *et al. Brain Res* 865, 139-147, (2000).
- 35 Kotz, C. M. *et al. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278, R494-498, (2000).
- 36 Stanley, B. G. *et al. Physiol Behav* 46, 173-177, (1989).
- 37 Holliday, N. D. *et al. in Neuropeptide Y and Related Peptides* (ed M.C. Michel) 45-73 (Springer, 2004).
- 38 Pedragosa-Badia, X. *et al. Front Endocrinol (Lausanne)* 4, 5, (2013).
- 39 Fekete, C. *et al. Endocrinology* 142, 2606-2613, (2001).
- 40 Fuzesi, T. *et al. Endocrinology* 148, 5442-5450, (2007).
- 41 Harris, M. *et al. J Clin Invest* 107, 111-120, (2001).
- 42 Spengler, D. *et al. Molecular endocrinology* 6, 1931-1941, (1992).
- 43 Melnick, I. *et al. Neuron* 56, 1103-1115, (2007).
- 44 Shrestha, Y. B. *et al. Regulatory peptides* 133, 68-73, (2006).
- 45 Wirth, M. M. *et al. Peptides* 22, 129-134, (2001).
- 46 Balthasar, N. *et al. Cell* 123, 493-505, (2005).
- 47 Fekete, C. *et al. J Neurosci* 20, 1550-1558, (2000).
- 48 Fekete, C. *et al. Neurosci Lett* 289, 152-156, (2000).
- 49 Péterfi, Z. *et al. in Endocrine Society's 98th Annual Meeting* (Boston, MA, 2016).
- 50 Piomelli, D. *Nature reviews. Neuroscience* 4, 873-884, (2003).
- 51 Araque, A. *et al. Neuropharmacology*, (2017).
- 52 Wittmann, G. *et al. J Comp Neurol* 503, 270-279, (2007).
- 53 Kola, B. *et al. PLoS One* 3, e1797, (2008).
- 54 Di, S. *et al. J Neurosci* 23, 4850-4857, (2003).
- 55 Hardingham, N. *et al. Front Cell Neurosci* 7, 190, (2013).
- 56 Szabadits, E. *et al. J Neurosci* 27, 8101-8111, (2007).
- 57 Makara, J. K. *et al. J Neurosci* 27, 10211-10222, (2007).
- 58 Affleck, V. S. *et al. Neuroscience* 219, 48-61, (2012).
- 59 Gereben, B. *et al. Endocr Rev* 29, 898-938, (2008).
- 60 Tu, H. M. *et al. Endocrinology* 138, 3359-3368, (1997).
- 61 Visser, T. J. *in Endotext* (eds L. J. De Groot *et al.*) (MDText.com, Inc., 2000).
- 62 Friesema, E. C. *et al. Lancet (London, England)* 364, 1435-1437, (2004).

- 63 Di Cosmo, C. *et al. J Clin Invest* 120, 3377-3388, (2010).
- 64 Heuer, H. *et al. Endocrinology* 146, 1701-1706, (2005).
- 65 Lechan, R. M. *et al. Prog Brain Res* 153, 209-235, (2006).
- 66 Wittmann, G. *et al. J Comp Neurol* 517, 825-840, (2009).
- 67 Itoh, Y. *et al. Neuroscience letters* 125, 235-237, (1991).
- 68 Ookuma, K. *et al. Brain research* 490, 268-275, (1989).
- 69 Yasuda, T. *et al. Endocrinology* 146, 2744-2748, (2005).
- 70 Fulop, A. K. *et al. Endocrinology* 144, 4306-4314, (2003).
- 71 Gotoh, K. *et al. J Neurochem* 103, 1102-1110, (2007).
- 72 Parmentier, R. *et al. J Neurosci: the official journal of the SFN* 29, 4471-4483, (2009).
- 73 Trajkovic, M. *et al. J Clin Invest* 117, 627-635, (2007).
- 74 Deli, L. *et al. Endocrinology* 150, 98-103, (2009).
- 75 Fekete, C. *et al. Brain Research* 969, 70-77, (2003).
- 76 Miura, E. *et al. J Neurochem* 97, 1431-1446, (2006).
- 77 Narushima, M. *et al. J Neurosci* 27, 496-506, (2007).
- 78 Dehmelt, L. *et al. Genome Biology* 6, 204-204, (2005).
- 79 Wittmann, G. *et al. J Comp Neurol* 515, 313-330, (2009).
- 80 Sarvari, A. *et al. Brain Res* 1488, 72-80, (2012).
- 81 Yoshida, T. *et al. J Neurosci* 26, 4740-4751, (2006).
- 82 Fukudome, Y. *et al. Eur J Neurosci* 19, 2682-2692, (2004).
- 83 Kalló, I. *et al. PLoS ONE* 7, e37860, (2012).
- 84 Fekete, C. *et al. Endocrinology* 143, 4513-4519, (2002).
- 85 Fekete C. *et al. Endocrinology* 142, 7, (2001).
- 86 Wittmann, G. *et al. Endocrinology* 146, 2985-2991, (2005).
- 87 Fosgerau, K. *et al. J Endocrinol* 220, 97-107, (2014).
- 88 Nordheim, U. *et al. Peptides* 27, 438-443, (2006).
- 89 Han, T. S. *et al. JRSM cardiovascular disease* 5, 2048004016633371, (2016).