

Gliasejtek szerepe az energia-háztartás szabályozásában

Doktori tézisek

Stiftné Szilvász-Szabó Anett

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola
Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet
Magyar Tudományos Akadémia



Témavezető:

Dr. Fekete Csaba, M.D., D.Sc.
tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók:

Dr. Dobolyi Árpád, Ph.D.
tudományos tanácsadó
Dr. Gaszner Balázs, M.D., Ph.D., Dr. Habil.
egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Csillag András, M.D., D.Sc.
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Kovács Krisztina, D.Sc.
tudományos tanácsadó
Dr. Patócs Attila, M.D., Ph.D.
egyetemi docens

Budapest
2018

1. Bevezetés

Az energiaháztartás szabályozásában kritikus szerepet játszik az energiaraktárak állapotának és a felvett táplálék mennyiségének, minőségének központi idegrendszeri érzékelése, amit a perifériás szervek és az agy közti kommunikáció biztosít.

E kommunikáció két fő útvonalát a perifériás idegek, elsősorban a nervus vagus és a vérkeringés biztosítja. A nervus vagus egyes gasztrointesztinális hormonok, valamint a gyomor-bél traktus kemo- és mechanoszenzorainak információját továbbítja az agytörzsi nucleus tractus solitarii (NTS) felé. A vér által szállított tápanyagok, mint a glükóz, aminosavak és zsírsavak a táplálékfelvétel során termelődő gasztrointesztinális hormonok, mint a glukagon-like peptid 1 (GLP-1), a peptid YY (PYY) és a ghrelin, valamint elhízás-szignálok, mint a fehér zsírszövet eredetű leptin, és a hasnyálmirigy által termelt inzulin központi célpontja pedig a hipotalamusz arcuatus magja (ARC).

Az ARC a vér-agy gát nélküli eminencia mediána (EM) közvetlen közelében helyezkedik el, így a vér által szállított hormonok és metabolitok könnyen elérik az idegsejteket ezen az agyterületen. Az ARC legalább két, a táplálékfelvétel szabályozásával összefüggésbe hozható idegsejt populációt tartalmaz: az ARC laterális részén elhelyezkedő anorexigén sejtcsoportot, mely sejtek proopiomelanokortin (POMC), valamint cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) termelnek, illetve az ARC ventromediális részén elhelyezkedő, orexigén neuronokat, melyek neuropeptid Y-t (NPY), agouti-related peptidet (AgRP), valamint gamma-amino-vajsavat (GABA) termelnek. Az ARC NPY/AgRP és a POMC/CART neuronjai a perifériás információt az energiaháztartás szabályozásának úgynevezett másodlagos idegsejtjei felé továbbítják. Ezek a neuronok melanokortin és NPY receptorokat is expresszálnak.

Mivel mind az NPY/AgRP, mind a POMC/CART neuronok az agy számos területére vetülnek, másodlagos neuronok is sokfelé előfordulnak az agyban, például a hipotalamusz paraventriculáris magjában (PVN) a hipotalamusz dorzomediális magjában (DMN), valamint a laterális hipotalamusz (LH) sejtcsoportjaiban. E területek szintén fontos szerepet játszanak az energia-homeosztázis szabályozásában. Az ARC orexigén és anorexigén sejtcsoportjainak, valamint ezek intra- és extrahipotalamikus kapcsolatainak szerepe az energia-háztartás szabályozásában intenzíven kutatott téma, az agy gliasejtjeinek pontos funkciója e folyamatokban azonban sokkal kevésbé ismert.

A taniciták speciális gliasejtek, melyek a harmadik agykamra alját és ventrolaterális falait bélelik az EM rostrális és kaudális határai között. Korábban a tanicitákat egyszerűen támasztó és barrierképző sejteknek vélték, azonban az utóbbi évtizedek kutatásai alapján kiderült, hogy a taniciták aktívan részt vesznek a hipotalamusz neuronális funkcióinak szabályozásában is. Többek között, a taniciták részt vesznek a glükóz homeosztázis szabályozásában, ehhez elengedhetetlen, hogy képesek érzékelni a környezetük glükóz szintjét. Emellett érzékeli a leptin- és aminosav szintek változását is és szabályozzák többek között a GnRH és TRH sejtek működését. A taniciták prekursor sejtekként is funkcionálnak, és képesek neuronok képzésére felnőtt állatokban is. A tanicitákból keletkező neuronok jelentős része az ARC-ba vándorol. Mivel az ARC neuronjai részt vesznek az energia-háztartás szabályozásában, valószínű, hogy a taniciták képesek az energia-háztartás szabályozásában részt vevő neuron populációk megújítására.

Az agy másik fontos gliasejt típusa a mikroglia. A mikroglia a perifériás szövetek makrofágjaihoz és monocitáihoz hasonló szerepet lát el az agyban, azaz fő funkciója az idegen anyagok és károsodott sejtek bekebelezése, illetve immunfaktorok szekretálása. Fiziológiai körülmények között a gliasejtek támogatják az ARC neuronjainak energia-homeosztázisát, ugyanakkor egyes kondíciók, mint például a magas zsírtartalmú diéta (high-fat diet, HFD) e glia-neuron együttműködés hibás működéséhez vezet. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a krónikus HFD együtt jár immunsejt mediált gyulladással, amely számos perifériás szerv, mint a máj, vázizomzat és zsírszövet inzulinrezisztenciájához vezetnek. A HFD perifériás következményei mellett ismert, hogy a hipotalamuszt szintén érinti a diéta indukálta gyulladás, sőt, a központi gyulladással jóval gyorsabban kialakul és a gyulladással markerek mellett mikroglia aktiváció is kialakul az ARC-ban. Ez a folyamat fontos lehet a diéta okozta elhízás és az ezzel összefüggő metabolikus változások kialakulásában, azonban az irodalmi adatok ellentmondók a mikroglia szerepével kapcsolatban.

2. Célkitűzés

Az utóbbi évtizedekben az energiaháztartás központi szabályozásában résztvevő idegi hálózatok kutatása nagy figyelmet kapott. Újabban azonban egyre több adat halmozódott fel, amely azt sugallja, hogy az idegsejtek mellett gliális sejtípusok szintén részt vesznek az energia-homeosztázis szabályozó rendszerében. A hipotalamusz speciális glia sejtípusai, a taniciták egy glükóz-, leptin- és zsírsav érzékeny neurogén sejtcsoportot képviselnek, emellett aktív szerepet töltenek be a metabolikus szignálok vér-agy gáton történő átjutásának és a táplálékfelvétel és az energia-egyensúly szabályozásában. Az agy makrofág sejtjei, a mikroglia sejtek szintén részt vesznek az energia homeosztázis szabályozásában, például a HFD-hez kapcsolódó gyulladási folyamatok szabályozásán keresztül. Ugyanakkor ezen glia sejtípusoknak az energiaháztartás szabályozásában betöltött pontos szerepe egyelőre nem ismert.

A taniciták és a mikroglia sejtek energia metabolizmussal és táplálékfelvétellel összefüggő mechanizmusokban való szerepének jobb megértése érdekében Ph.D. munkám célja a taniciták kommunikációjának és POMC expressziójának vizsgálata, valamint a mikroglia sejtek fontosságának megértése volt a rövidtávú HFD indukálta metabolikus változások kialakulásában. Ennek elérése érdekében a célunk:

1. A Connexin 43 (Cx43) gap junction kapcsolatok és hemichannelek létének és elhelyezkedésének vizsgálata tanicitákban.
2. A POMC expresszió jellemzése tanicitákban.
3. A mikroglia szerepének vizsgálata a HFD indukálta metabolikus változások kialakulásában.

3. Módszerek

3.1. Kísérleti állatok és altatás

A kísérleteket laboratóriumi egereken vagy patkányokon végeztük. A felhasznált állatokat az 1. táblázatban foglaltuk össze. Az állatokat standard körülmények között tartottuk (06.00-18.00 világos szakasz, hőmérséklet $22 \pm 1^\circ\text{C}$, a táp és a víz szabadon hozzáférhető). Minden kísérlet a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézete Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának engedélyével történt. A kísérleti állatok altatása vagy intraperitoneálisan adagolt ketamin és xilazin (50, illetve 10 mg/kg testtömeg) keverékkel vagy izoflurán inhalációjával történt.

1. táblázat: A kísérleti állatok faja, törzse, forrása, neme, kora és testtömege projektenként

Kísérlet	Állatfaj	Törzs	Forrás	Nem	Kor	Testtömeg (g)
A Cx43 gap junction kapcsolatok és hemichannelek elhelyezkedésének vizsgálata tanicitákban						
	egér	CD1	Charles River Lab	Hím	8 hét	30-35
A POMC expresszió jellemzése tanicitákban						
ISH, fluoreszcens IHC	patkány	Sprague-Dawley	Taconic Farms	Hím/ Nőstény	8-15 hét vagy 31 nap	240-440 vagy 60-95
Immun-elektron-mikroszkópia	patkány	Wistar	ToxiCoop	Hím	8 hét	250-275
A mikroglia fontossága a HFD indukálta metabolikus változások kialakulásában.						
	egér	C57Bl/6J	Charles River Lab	Hím	8 hét	20-25

3.2. Fixálószerrel történő transzkardiális perfúzió

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a kísérleti állatokat elaltattuk, majd transzkardiálisan perfundáltuk őket 10 ml (egér), illetve 50 ml (patkány) 0,01 M-os foszfát pufferes sóoldattal (phosphate buffered saline, PBS, pH 7,4), majd a 2. táblázatban összefoglalt fixálószerrel.

2. táblázat: A projekteken használt fixálószer

Immunohisztológiai projekt	fixálószer
Cx43 immunfluoreszcencia	4% PFA nátrium-acetát pufferben (pH 6), majd 4% PFA Borax pufferben (pH 8,5)
Iba1 immunhisztokémia	4% PFA (pH7,4)
POMC, ACTH, α -MSH immunfluoreszcencia	4% PFA (pH7,4)
POMC immun-elektronmikroszkópia	4% acrolein + 2% PFA (pH 7,4)

3.3. A szövetek előkészítése fénymikroszkópos vizsgálatokhoz

Fénymikroszkópos vizsgálatokhoz a fixálószerrel perfundált agyakat 4% paraformaldehidben (PFA) posztfixáltuk 2 órán keresztül, majd 0,01 M PBS-ben oldott 30%-os cukoroldatban inkubáltuk éjszakán át. Az agyakat porított szárazjégen fagyasztottuk, majd fagyasztó mikrotóm segítségével 30 µm vastag metszeteket készítettünk. A metszeteket 0,01 M PBS-ben oldott 0,5% Triton X-100 és 0,5% H₂O₂ keverékében inkubáltuk, majd 2%-os normál lószérumba (normal horse serum, NHS) helyeztük 20 percre. Az immunfestések során használt antitesteket a 3. táblázatban foglaltuk össze.

3.4. A szövetek előkészítése elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz

Elektronmikroszkópos vizsgálatainkhoz az agyakat 4% PFA-ban posztfixáltuk 4°C-on 24 órán keresztül, majd 25 µm vastag koronális metszeteket készítettünk vibratóm segítségével. Abban az esetben, ha a fixálószer acroleint is tartalmazott, a metszeteket 0,1 M foszfát pufferben (phosphate buffer, PB) oldott 1%-os nátrium-borohidrid oldatban inkubáltuk 30 percen keresztül. A metszeteket minden esetben PBS-sel hígított 0,5%-os H₂O₂ oldatban inkubáltuk 15 percen keresztül. A metszeteket ezután cukoroldatban krioprotektáltuk, majd folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd felolvasztottuk 3 alkalommal az antitest penetrációját elősegítve. A nem-specifikus antitestkötés megakadályozása érdekében a metszeteket PBS-ben hígított 2%-os NHS-ben inkubáltuk 10 percen keresztül. Az immunfestések során használt antitesteket a 3. táblázatban foglaltuk össze.

3.5. Az elektronmikroszkópiához készített preparátumok beágyazása

Az immunjelölt metszeteket 0,1 M PB-vel hígított 1% ozimum-tetroxidban inkubáltuk 1 órán keresztül. A metszeteket ezután 50, majd 70%-os alkoholban mostuk, majd 70%-os alkoholban oldott 2% uranil-acetát oldatban 30 percen keresztül inkubáltuk. Dehidrációt követően a metszeteket Durcupan epoxy gyantába ágyasztuk és 60°C-on 48 órán át polimerizáltuk.

3.6. A szövetek előkészítése *in situ* hibridizációhoz (ISH)

A patkányokat elaltattuk és dekapitáltuk. Az agyakat eltávolítottuk és porított szárazjégen fagyasztottuk. Koronális, 18 µm vastag metszeteket készítettünk kriosztát segítségével, majd Superfrost tárgylemezekre húztuk és szárítottuk. A metszeteket -80°C-on tároltuk az ISH-ig.

3.7. A szövetek előkészítése lézeres mikrodisszekcióhoz (LCM)

Az állatokat elaltattuk és transzkardiálisan perfundáltuk 30 ml (egér) vagy 70 ml (patkány) jéghideg 10%-os RNAlater oldattal. Az agyakat -40°C -on 2-metilbutánban fagyasztottuk. Koronális, 12 μm vastag metszeteket készítettünk kriosztát segítségével. A metszeteket PEN membránnal borított tárgylemezekre húztuk, 70%-os alkoholban oldott 0,6%-os krezilibolya oldattal festettük, felszálló alkoholsorban dehidráltuk. A tárgylemezeket 42°C -os melegítőlapon szárítottuk és -80°C -on tároltuk az LCM-ig.

3.8. LCM és RNS izolálás

A taniciták sejttesteit és az ARC területét Zeiss Microbeam Laser Capture Microdissection rendszer használatával disszekáltuk. A minták lézernyaláb segítségével és x10 objektív segítségével 0,5 ml-es adhezív csövek kupakjába katapultáltuk. A tanicitákat és az Arc területét külön csöbe gyűjtöttük. A mintákból Arcturus PicoPure RNA Isolation Kit használatával RNS-t izoláltunk, RNase-free DNase set használatával megemésztettük az esetleges DNS kontaminációt. Az izolált RNS minőségét és koncentrációját Agilent Bioanalyzer rendszer használatával ellenőriztük. Az 5.0 RNS integritás érték alatti mintákat kizártuk a későbbi vizsgálatokból.

A PROJEKTEK RÉSZLETES METODIKÁJA

3.9. A Cx43 tartalmú gap junction kapcsolatok és hemichannelek lokalizációja tanicitákban

3.9.1. A taniciták feltöltése Lucifer yellow-val patch pipetta segítségével

Vibratóm segítségével koronális, 250 μm vastag metszeteket készítettünk egéragyak EM-t tartalmazó területéből, majd a szeleteket 36°C -os mesterséges cerebrospinális folyadékba (artificial cerebrospinal fluid, aCSF) helyeztük. Szobahőmérsékletre hűlés után a tanicitákat aCSF-ben vizsgáltuk. A patch pipettákat 1 mg/ml LY tartalmú intracelluláris oldattal töltöttük fel 20 percen keresztül -80 - 85 mV-os tartófeszültségen. Más tanicitákat feltöltésekor a gap junction kapcsolatokat carbenoxolon extracelluláris oldatba adagolásával gátoltuk. A szeleteket 0,1 M PB-ben oldott 4% PFA-val (pH 7,4) fixáltuk és Zeiss LSM 780 konfokális mikroszkóp segítségével elemeztük.

3.9.2. Kettős immunfluoreszcens jelölés (Cx43 és vimentin)

Az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk fixálószerrel (3.2) és a szöveteket előkészítettük immunhisztokémiához (3.3). Ezután Cx43-vimentin kettős immunfluoreszcens jelölést

alkalmaztunk (3. táblázat), a metszeteket Zeiss LSM 780 konfokális mikroszkóppal elemeztük.

3.9.3. A Cx43 immunreaktivitás ultrastrukturális detektálása

Az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk (3.2), a szöveteket előkészítettük elektron mikroszkópos vizsgálathoz (3.4) majd Cx43 immunhisztokémiát végeztünk. A beágyazást követően (3.5), Leica Ultracut UCT ultramikrotómmal 60-70 nm-es ultrametszeteket készítettünk. Az ultravékony metszeteket Formvar hártával borított gridekre gyűjtöttük, 2% ólom-citráttal kontrasztosítottuk és Jeol-100 C transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. A tanicitákat jellegzetes morfológiai tulajdonságaik alapján, a tanicita altípusokat pedig elhelyezkedésük alapján különítettük el.

3.10. A POMC expresszió jellemzése tanicitákban

3.10.1. Radioaktív ISH

A kísérleti állatokat dekapitáltuk, a szöveteket előkészítettük ISH-hoz (3.6). A szöveteket egér *Pomc* cDNS-ről szintetizált 35S jelölt ribopróbával hibridizáltuk. Alapos mosást követően a metszeteket felszálló alkoholsorral dehidratáltuk, szárítottuk majd Kodak NTB autoradiográfiás oldatba mártottuk. Az autoradiogramokat 8 nap után vizsgáltuk.

3.10.2. Immunfluoreszcenciával kombinált fluoreszcens ISH

A kísérleti állatokat dekapitáltuk, a szöveteket előkészítettük ISH-hoz (3.6). A metszeteket digoxigenin-11-UTP jelölt *Pomc* ribopróbával jelöltük. A poszthibridizációs folyamatot követően a metszeteket PBS-ben (pH 7,4) hígított 0,5% Triton X-100 és 0,5% H₂O₂ keverékében inkubáltuk 15 percig, majd PBS-ben mostuk és maleát pufferben majd 1%-os blokkoló oldatban inkubáltuk a nukleinsav hibridizáció érdekében. Az immunfestés során használt antitesteket a 3. táblázatban foglaltuk össze.

3.10.3. A POMC, β -endorfin, α -MSH és adrenokortikotróp hormon (ACTH) immunfluoreszcens detektálása

A kísérleti állatokat fixálószerrel perfundáltuk 3.3(3.2), a szöveteket előkészítettük immunfluoreszcens festéshez (3.3), majd fluoreszcens kettős és hármas jelölést alkalmaztunk. Az immunfestés során használt antitesteket a 3. táblázatban foglaltuk össze.

3.10.4. A POMC-immunreaktivitás ultrastrukturális vizsgálata

A kísérleti állatokat transzkardiálisan perfundáltuk fixálószerrel (3.2) és a szöveteket előkészítettük elektronmikroszkópos vizsgálathoz (3.4), majd POMC immunhisztokémiát végeztünk (3. táblázat). A beágyazást követően (3.5) 60-70 nm vastag ultrametszeteket készítettünk Lecia Ultracut UCT ultramikrotóm segítségével. Az ultravékony metszeteket Jeol-100 C transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk

3.10.5. A tanicita-transzkriptóm vizsgálata

A LCM-mel gyűjtött tanicitákból és ARC mintákból izolált RNS-t ovation V2 RNS-amplifikáló rendszer segítségével amplifikáltuk és átírtuk cDNS-sé. A könyvtárgenerálást, az Illumina új-generációs szekvenálást és a bioinformatikai elemzést az Eurofins készítette. Az egyes gének CPM értékeit Student-féle t-teszttel összehasonlítottuk a tanicita és ARC minták között.

3.11. A mikroglia szerepének vizsgálata a HFD indukálta metabolikus változások kialakulásában

3.11.1. Mikroglia-irtás és rövidtávú HFD

A kísérleti egerek egy csoportját 3 héten keresztül PLX5622-t tartalmazó táppal etettük, ami egy mikroglia pusztulását eredményező CSF1R antagonistá. Az állatok másik csoportját PLX-mentes tápon tartottuk. Mindkét esetben a diéta zsírtartalma alacsony (10%) volt (LF, LF+PLX). A 3 hét letelte után az állatok e két csoportját további csoportokra osztottuk. A csoportok egyik fele változatlan diétát kapott, míg másik felének diétáját PLX tartalmú vagy PLX-mentes 60% zsírtartalmú diétára váltottuk (HFD, HFD+PLX). Annak érdekében, hogy megismerjük a HFD hatását mikroglia jelenlétében és hiányában, a HFD 3 napja során a TSE PhenoMaster rendszer segítségével mértük az egerek víz- és táplálékfogyasztását, mozgási aktivitását, emellett indirekt kalorimetriát végeztünk, amely magában foglalja az O₂-fogyasztás, valamint CO₂-termelés mérését is. A metabolikus adatokat a TSE PhenoMaster szoftver segítségével elemeztük. A metabolikus mérések előtt és után testösszetétel-vizsgálatot végeztünk EchoMRI segítségével.

3.11.2. Iba1 immunhisztokémia

A kísérleti állatokat transzkardiálisan perfundáltuk fixálószerrel (3.2), majd a szöveteket előkészítettük immunhisztokémiához (3.3) és Iba1 immunfestést végeztünk (3. táblázat). A metszeteket Zeiss Axioimager M2 fluoreszcens mikroszkóp segítségével elemeztük.

3.11.3. Kvantitatív TaqMan PCR

LCM-es szövet előkészítést (3.7), LCM-et és RNS izolálást követően (3.8) az RNS mintákat átírtuk ViLO Superscript III CNS reverz transzkripció kit segítségével. A cDNS preamplifikációs templátként szolgált, amelyet PreAmp Master Mix kit segítségével végeztünk. A mikroglia irtásának sikerességét az ARC-ban az Iba1 és az Emr1 expressziójának kvantitatív PCR segítségével történő mérésével igazoltuk. Ehhez ViiA 7 real-time PCR platformot használtunk Fast 96 blokkal és összehasonlító CT metodikával.

3. táblázat Az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt antitestek, reagensek, fluorokrómok és kromogének

	Antigén	Elsődleges antitest	Kimutatás
Kettős immunfluoreszcens jelölés	Cx43	Cx43 elleni nyúl antiszérum (Invitrogen, 1:400)	Alexa-488 konjugált számár anti-nyúl IgG (Invitrogen, 1:250)
	vimentin	vimentin elleni birka antiszérum (Santa Cruz Biotech, 1:3000)	Biotinilált számár anti-birka IgG (Jackson ImmunoResearch, 1:500), ABC (Vector Laboratories, 1:1000), biotinilált tiramid amplifikáció, Alexa-594 konjugált Streptavidin (Invitrogen, 1:500)
Elektronmikroszkópos vizsgálatok	Cx43	Cx43 elleni nyúl antiszérum (Invitrogen, 1:2000)	Biotinilált számár anti-nyúl IgG (Jackson ImmunoResearch, 1:500), ABC (Vector Laboratories, NiDAB)
Immunfluoreszcenciával kombinált ISH	digoxigenin	Peroxidáz konjugált Dig elleni birka antiszérum (Roche, 1:100)	Biotinilált tiramid amplifikáció, Alexa Fluor 488-konjugált Streptavidin (Life Technologies, 1:500)
	HuC/HuD	HuC/D elleni egér antiszérum (Life Technologies 2 µg/ml)	Alexa Fluor 647-konjugált számár anti-egér IgG (Jackson,
	vimentin	vimentin elleni csirke antiszérum (Millipore, 1:4000)	Cy3-konjugált számár anti-csirke IgG (Jackson)
Hármas immunfluoreszcens jelölés	POMC	POMC elleni nyúl antiszérum (Phoenix Pharma, 1:20.000)	Alexa 488-konjugált számár anti-nyúl IgG (Jackson, 1:400)
	HuC/HuD	HuC/D elleni egér antiszérum (Life Technologies 1 µg/ml)	Cy3-konjugált számár anti-egér IgG (Jackson, 1:200)
	vimentin	vimentin elleni csirke antiszérum (Millipore, 1:20.000)	Alexa 647-konjugált számár anti-csirke IgG (Jackson, 1:200)
Kettős immunfluoreszcens jelölés	β-endorfin	β-endorphin elleni nyúl antiszérum (Phoenix Pharma, 1:10000)	Cy3-konjugált számár anti-nyúl IgG (Jackson, 1:200)
	α-MSH	α-MSH elleni birka antiszérum (Millipore, 1:10.000)	Alexa 488-konjugált számár anti-birka IgG (Jackson, 1:200)
Egyes immunfluoreszcens jelölés	ACTH	ACTH elleni nyúl antiszérum (Phoenix Pharma, 1:10.000)	Cy3-konjugált számár anti-nyúl IgG, Jackson, 1:200)
Elektronmikroszkópos vizsgálatok	POMC	POMC elleni nyúl antiszérum (Phoenix Pharma, 1:15.000)	Biotinilált számár anti-nyúl IgG (Jackson, 1:500), ABC, biotinilált tiramid amplifikáció, NiDAB, Gallyas ezüstöző
Fénymikroszkópos vizsgálatok	Iba1	Iba1 elleni nyúl antiszérum (Wako, 1:2000)	Biotinilált számár anti-nyúl IgG (Jackson, 1:500), ABC, NiDAB

4. Eredmények

4.1. A Cx43 gap junction kapcsolatok és hemichannelek lokalizációja tanicitákban

4.1.1. Funkcionális gap junction kapcsolatok jelenléte tanicitákban

A gap junction permeábilis fluoreszcens festéket, a LY-t, patch pipetta segítségével egyetlen β -tanicitába töltve, a festék nem csak a patch pipettával feltöltött tanicitát jelölte meg, hanem számos egymás mellett elhelyezkedő tanicitát és e sejtek bazális nyúlványait is. Olyan tanicita nyúlványok töltődését is megfigyeltük, melyek csak a végtalpuknál érintkeztek más feltöltött tanicitával. A LY megjelölt továbbá tanicita nyúlványokkal érintkező kapillárisokat is. A gap junction blokkoló carbenoxolon jelenlétében a LY minden esetben csak a patch pipettával töltött tanicitában volt jelen igazolva, hogy a LY gap junction kapcsolatokon keresztül jutott át a szomszédos tanicitákba.

4.1.2. A Cx43 immunreaktivitás kimutatása tanicitákban

Cx43 és vimentin, a gliasejtek, köztük a taniciták molekuláris markere, elleni antitestekkel végzett kettős immunfluoreszcens festés igazolta a Cx43 jelenlétét tanicitákban. A pettyezett Cx43-immunreaktivitás a legnagyobb denzitásban az α -taniciták sejttesteken volt megfigyelhető, elsősorban e sejtek kamra felőli felszínén. De Cx43-immunreaktivitás jelen volt β -tanicitákon is, bár jóval alacsonyabb denzitással. A tanicitákon a Cx43-immunreaktivitás megoszlása jelentősen polarizációt mutatott. Legnagyobb denzitással a Cx43 immunreaktivitás a tanicita sejttestek kamra felőli oldalán, valamint az eminencia mediána külső zónájában a tanicita végtalpakon volt megtalálható. Az α - és a β -taniciták nyúlványain is megfigyelhető volt a Cx43 jelenléte, főként az EM külső zónájában, valamint az ARC-ban, ahol a taniciták kapillárisok közelében végződnek, de alacsonyabb denzitásban, mint a sejttesteken.

4.1.3. A Cx43 immunreaktivitás ultrastrukturális lokalizációja tanicitákban

Ultrastrukturális vizsgálatainkban Cx43 immunreaktivitást figyeltünk meg a taniciták külső sejtmembránjához asszociálva mind α -, mind β -taniciták esetén. Sok esetben a szomszédos taniciták egymáshoz fekvő felszínének mindkét membránján észleltük a Cx43-immunreaktivitást jelölő ezüstszemcsét, ami megerősíti a Cx43 jelenlétét gap junction kapcsolatokban. Konfokális mikroszkópos vizsgálatainkhoz hasonlóan a taniciták kamrai felszíne, valamint a kamrába vetülő kitüremkedései szintén gazdag Cx43 immunreaktivitást mutattak. Jelentős Cx43 immunreaktivitást találtunk a dorzálisabb kamrai részekben, ahol

taniciták és csillós endimasejtek egyaránt jelen voltak. Emellett jelentős Cx43 immunreaktivitás volt jellemző a tanicita végtalpakon, amelyek az ARC és az EM külső zónájában kapillárisokon végződnek, valamint más tanicita végtalpak és axonterminálisok közelében végződő tanicita végtalpakon is

4.2. A POMC expresszió jellemzése tanicitákban

4.2.1. Pomc mRNS expresszió nem-neuronális sejtekben

Az ARC-t és rosztro-kaudális tanicita régiót lefedő koronális patkányagy metszeteken készített radioaktív és fluoreszcens *in situ* hibridizáció alapján az egyes egyedek között nagy variabilitást tapasztaltunk a *Pomc* expresszió kiterjedésében és intenzitásában a taniciták és az EM és a hipofízisnyél nem-neuronális sejtjeiben. Ezért az általunk vizsgált agyakat a *Pomc* mRNS tartalmának intenzitása és kiterjedése alapján alacsony, közepes és magas nem-neuronális *Pomc* mRNS expresszáló csoportokba kategorizáltuk.

Az alacsony nem-neuronális *Pomc* mRNS-tartalmú agyakban a *Pomc* hibridizáció a hipofízisnyél egy sejtpopulációjára, valamint a β -taniciták kaudális csoportjára és a ventrális α -tanicitákra korlátozódott. A hibridizációs szignál ugyancsak jelen volt a kaudális EM nem-neuronális sejtjeiben. A Bregma szintjétől -3,1 mm-re rosztrálisan csak a β -taniciták, valamint a nem-neuronális EM sejtek tartalmaztak hibridizációs jelet. Ezekben az agyakban a tanicitákban megfigyelt hibridizációs jel sokkal alacsonyabb volt a POMC neuronokban tapasztaltakhoz képest. A magas nem-neuronális *Pomc* mRNS-tartalmú agyakban a hibridizációs szignál rosztro-kaudálisan kiterjedt a teljes β -tanicita populációra, dorzálisan az α 2-taniciták nagy részére, valamint több nem-neuronális sejtre az EM és a hipofízisnyél területén. A *Pomc* mRNS ugyanakkor sosem volt jelent a dorzális, α 1-tanicita régióban. A magas expressziójú agyakban a tanicitákban megfigyelt hibridizációs szignál megközelítette a POMC neuronokban tapasztalt szintet. A közepes nem-neuronális *Pomc* expressziójú agyakban az általános mintázat a magas expressziójú agyakéhoz hasonlított, de a tanicita hibridizációs szignál jóval elmaradt a POMC neuronokban tapasztalttól, főleg a taniciták rosztrális régiójában.

Ez a variabilitás eltérő korú és tömegű felnőtt hímek és nőstények esetében is megfigyelhető volt. Az általunk 26 db ISH-val vizsgált agy közül 10 agyban alacsony, 5-ben közepes, 11-ben pedig magas *Pomc* mRNS szintet találtunk a tanicitákban. Ez a variabilitás 8-10 hetes, illetve 15 hetes idős patkányok vizsgálata alapján is megfigyelhető volt. Annak kiderítése érdekében, hogy a nem-neuronális *Pomc* mRNS variabilitása felnőttkor előtt is megjelenik-e, fiatal, 31

napos hím és nőtény patkányokon is elvégeztük az ISH-t. A hibridizációs szignál mind a 8 fiatal patkány esetében az alacsony expressziójú agyakéhoz volt nagyon hasonló. Mérsékelt erősségű jel volt jelen a hipofízisnyélben, illetve a β 1-, β 2-, α 2-tanicitákban és a harmadik agykamra középső és kaudális részén, valamint az EM-ban. A tanicita régió rostrális részében a jel nagyon gyenge volt. A neuronális *Pomc* hibridizációs szignál szintén kevésbé volt intenzív, mint felnőttek esetében.

4.2.2. A nem-neuronális POMC expressziót mutató sejtek vimentin-pozitív taniciták

A *Pomc*-t expresszáló nem-neuronális sejtek identitásának vizsgálatára, valamint annak érdekében, hogy egyértelműen elkülönítsük őket a POMC neuronoktól, a fluoreszcens ISH-t kombináltuk immunfluoreszcenciával a tanicita marker, vimentin, illetve a neuronális marker HuC/D jelölésével. Néhány HuC/D-immunreaktív POMC neuron megtalálható az EM-ban a szubependimális rétegben. A hipofízisnyélben és a β -tanicita rétegben sem találtunk olyan *Pomc* mRNS expresszáló sejteket, amelyek egyaránt tartalmaztak volna vimentint és HuC/D-t is. A *Pomc* mRNS expresszáló sejtek a kamra falában, a β 1-, β 2- és α 1-tanicitákkal megegyező területen mindig tartalmaztak vimentint is. A nem-neuronális *Pomc* expresszáló sejtek a β -tanicita rétegen kívül az EM külső zónájának teljes területén megfigyelhetők voltak és szintén mindig tartalmaztak vimentint. Ezek a sejtek tanicita-szerű megjelenésűek voltak, merőlegesen helyezkedtek el a kamra aljához képest, alakjuk hosszúkás, sejttestük kisméretű, kerek és több nyúlvánnyal rendelkeztek. A *Pomc* mRNS-t expresszáló sejtek a hipofízisnyélben kerek vagy hosszúkás alakúak voltak és mindig tartalmaztak vimentint. E sejtek gyakran nem-ependimális tanicita-szerű sejtek voltak, míg mások a hipofízisnyél rostrális részén lokalizálódó, a 3. kamra mélyedését határoló β -tanicita volt. Annak érdekében, hogy ezeket a sejteket könnyen elkülönítsük más tanicita altípusoktól, a gamma- (γ) tanicita nevet javasoltuk.

4.2.3. Variábilis POMC protein expresszió a felnőtt egerek tanicitáiban

Az immunfluoreszcens festés során a POMC N-terminálisa ellen termelt antitest a *Pomc* ISH-hoz hasonló mintázatot mutatott a sejtes megoszlásban valamint az immunjel variabilitásában. Az alacsony expressziójú agyakban a POMC jelen volt a hipofízisnyél tanicitáiban, valamint a β - és γ -taniciták egy csoportjában a Bregma -3,1 és -3,8 mm közötti területeken. Ettől a területtől rostrálisan a POMC megjelent β -tanicita nyúlványokban és az EM γ -tanicitáiban, amelyek száma az alacsony expressziójú agyakban változatos volt. A magas nem-neuronális

Pomc expressziójú agyakban a POMC immunjel nagy része a β - és $\alpha 2$ -tanicitákban lokalizálódott és megjelent a γ -taniciták jelentős részében, hasonlóan a *Pomc* mRNS megoszlásához. 8 felnőtt hím patkány agya közül 3-ban alacsony, 2-ben közepes és 3-ban magas POMC szintet, míg 7 nőstény közül 5-ben alacsony, 1-ben közepes és 1-ben magas POMC szintet tapasztaltunk.

A POMC-pozitív γ -taniciták alakjuk és morfológiai tulajdonságaik alapján e sejtek tulajdonságai megegyeznek a többi tanicita típus tulajdonságaival. A hármas immunfluoreszcens jelöléses vizsgálataink megerősítették az ISH/immunfluoreszcens eredményeinket, miszerint a POMC-pozitív γ -taniciták szinte mindig vimentin-pozitívak és a vimentin-negatív, de HuC/D-pozitív POMC neuronoktól térben is elkülönült populációt képeznek. Elhelyezkedésük alapján az EM POMC neuronjai az EM belső zónájában, a β -tanicita réteg közvetlen közelében, míg a POMC-pozitív γ -taniciták a szubependimális zónától távolodva, a külső zónában találhatóak.

4.2.4. A POMC-immunreaktív sejtek ultrastrukturális vizsgálata az EM-ban

Az EM elektronmikroszkópos vizsgálatai alapján mind a β -, mind a γ -taniciták sejttestében és nyúlványaiban POMC-immunreaktivitást tapasztaltunk. Az EM γ -tanicitái a β -tanicitákhoz hasonló ultrastrukturális tulajdonságokat mutattak, hosszúkás mitokondriumaikkal és lipidcseppekkel a nyúlványaikban, amelyek gyakran kapillárisokon végződtek.

4.2.5. A POMC eredetű peptidek vizsgálata tanicitákban

A β -endorfin immunfluoreszcencia a POMC-hez nagyon hasonló mintázatot és variabilitást mutatott, de lényegesen kevesebb tanicitát jelölt ugyanabban az agyban. Az alacsony nem-neuronális *Pomc* expressziójú agyakban a nem-neuronális β -endorfin jelölés elsősorban a hipofízisnyél és az EM néhány γ -tanicitájára korlátozódott, illetve néhány β -tanicita sejttestére és nyúlványára. A magas expressziójú agyakban a β -endorfin több β - és γ -tanicitát jelölt, valamint $\alpha 2$ -tanicitákat és ezek nyúlványát is. Az ACTH elleni immunfluoreszcencia csak ritkán jelölt γ -tanicitákat az EM-ban és a hipofízisnyélben. Ezek száma független volt attól, hogy az adott agy tanicitái alacsony vagy magas POMC szintet mutatnak, néhány agyban mindössze 1-2 jelölt sejtet találtunk, míg más agyakban nem volt egyértelmű ACTH jel a γ -tanicitákban. A γ -taniciták jelölődése minden esetben sokkal gyengébb volt a neuronokhoz vagy axonokhoz képest. Továbbá, magas tanicitális POMC-szintű agyakban nagyon halvány ACTH-immunreaktivitást tapasztaltunk elsősorban az $\alpha 2$ -taniciták sejttesteiben. Az α -MSH immunreaktivitás, amely egyértelműen a háttér szintje alatt volt, nagyon gyengén jelölte csak

a tanicitákat. Gyenge jel fordult csak elő az EM és a hipofízisnyél γ -tanicitáiban és néhány tanicita nyúlványban magas nem-neuronális *Pomc* expressziójú agyakban,

4.2.6. A POMC-processzáló enzimek expressziója tanicitákban

A taniciták gyenge ACTH és α -MSH immunreaktivitása arra utal, hogy a POMC, mint prekursor csak kis mennyiségben vagy egyáltalán nem processzálódhat ezekben a sejtekben. Ez összhangban lenne a korábbi ISH-s vizsgálatokkal, amelyek alapján a POMC prekuzort hasító és ACTH-t, illetve α -MSH-t létrehozó prohormon-konvertáz 1 és 2 (PC1 és PC2) enzimeket nem sikerült kimutatni tanicitákban. Annak érdekében, hogy a POMC processzálásában részt vevő más gének jelenlétét kimutassuk tanicitákban, LCM segítségével izolált, patkány agyból származó taniciták (α 1, α 2, β 1, β 2) RNS-szekvencia analízise alapján transzkriptóm-elemzést végeztünk. Az expressziós szinteket a hasonló módszerrel izolált ARC minták expressziós szintjével hasonlítottuk össze. A PC1, PC2, karboxipeptidáz E, peptidilglicin alfa-amidáló monooxygenáz, illetve a szekretogranin V (vagy 7B2) mRNS szintje tanicitákban szignifikánsan alacsonyabb volt az ARC expressziós értékeihez képest. Ez az eredmény alátámasztja a korábbi ISH eredményeket, miszerint ezek a gének elsősorban neuronális expressziót mutatnak. A *PC2* szintje volt a legalacsonyabb tanicitákban, $7,4 \pm 0,4$, amely jóval a 10-nél meghúzott pozitív határérték alatt volt. A második legalacsonyabb expressziót a *PC1* mutatta $16,2 \pm 0,8$, amely csak alig volt a határérték felett. A *Pomc* mRNS szintek ezzel szemben hasonlóak voltak a tanicita és az ARC mintákban ($347,2 \pm 36,2$ a tanicitákban és $397,2 \pm 37,0$ az ARC-ban).

4.3. A mikroglia szerepének vizsgálata a HFD indukálta metabolikus változások kialakulásában

4.3.1. A HFD és a mikroglia irtásának hatása a testösszetételre és a metabolikus paraméterekre

A 3 hetes PLX előkezelést követően a kísérleti állatokat 4 csoportba soroltuk: LF, HFD, LF+PLX and HFD+PLX, amelyek a speciális, alacsony vagy magas zsírtartalmú tápot fogyasztották 3 napon keresztül.

A speciális diéta kezdetén nem volt szignifikáns eltérés az állatcsoportok testösszetételében. A 3 napos HFD során ugyanakkor az állatok sovány testtömegének változását befolyásolta mind a diéta ($P=0,001$), mind a PLX kezelés ($P=0,025$), ugyanakkor a két faktor között nem volt interakció ($P=0,241$) faktoriális ANOVA alapján. A PLX kezelés szignifikáns csökkenést ($P=0,02$) eredményezett a LF egerek sovány testtömegének változásában ($-0,078 \pm 0,154$ g) a

PLX-mentes LF egerek sovány testtömegéhez viszonyítva ($0,616 \pm 0,239$). Továbbá szignifikáns eltérést találtunk az LF+PLX és HFD+PLX állatok sovány testtömegének változásában ($-0,078 \pm 0,154$ g vs. $0,883 \pm 0,134$ g; $P=0,004$). A teljes víztartalom és a testtömeg változását csak a diéta befolyásolta ($P=0,002$ és $0,003$ faktoriális ANOVA alapján), ugyanakkor ezek az értékek függetlenek voltak a PLX kezeléstől ($P=0,157$ és $0,307$ faktoriális ANOVA alapján). A HFD+PLX egerek teljes víztartalmában nagyobb emelkedést tapasztaltunk, mint a LF+PLX egerek esetében ($0,821 \pm 0,120$ vs. $-0,109 \pm 0,113$ g; $P=0,008$). Hasonlóan, a HFD+PLX egerek szignifikánsan magasabb tömeggyarapodást mutattak a LF+PLX egerekhez képest ($1,819 \pm 0,267$ vs. $0,436 \pm 0,240$ g; $P=0,03$). A HFD tendenciózusan fokozta a víztartalom és a testtömeg változását PLX-mentes állatokban, de ez a változás nem volt szignifikáns.

Az egerek teljes mozgási aktivitását mind a diéta ($P=0,00048$), mind a PLX kezelés befolyásolta ($P=0,0004$), ugyanakkor faktoriális ANOVA alapján a két faktor között nem volt interakció ($P=0,948$). A 3 napos HFD során a HFD csoport egereinek mozgási aktivitása jelentősen fokozódott a LF csoportokéhoz képest. A LF vs. HFD egerek teljes mozgási aktivitásának átlaga $2405,98 \pm 234,68$ vs. $3170,24 \pm 552,18$ fénysugár-megszakítás/óra ($P=0,013$) volt, míg a LF+PLX vs. HFD+PLX csoportokban ez az érték $1432,23 \pm 244,57$ vs. $2246,73 \pm 567,09$ fénysugár-megszakítás/óra ($P=0,01$) volt. A PLX kezelés szignifikánsan csökkentette a mozgási aktivitást mind a LF+PLX, mind a HFD+PLX csoportokban a PLX-mentes csoportokhoz viszonyítva. A teljes mozgási aktivitás átlaga a LF vs. LF+PLX egerek esetén $2405,98 \pm 234,68$ vs. $1432,23 \pm 244,57$ fénysugár-megszakítás/óra ($P=0,007$) volt, míg a HFD vs. HFD+PLX csoportban $3170,24 \pm 552,18$ vs. $2246,73 \pm 567,09$ ($P=0,009$). A LF és LF+PLX csoportok szignifikáns eltérést tapasztaltunk mind a nappali, mind az éjszakai periódusban, nappal $1652,92 \pm 257,72$ vs. $914,79 \pm 161,74$ ($P=0,02$), illetve éjszaka $3136,05 \pm 267,14$ vs. $1949,66 \pm 347,06$ fénysugár-megszakítás/óra ($P=0,02$). Ugyanakkor a HFD és HFD+PLX csoportok között az eltérés csak éjszaka volt szignifikánsan eltérő ($4027,00 \pm 435,52$ vs. $2668,54 \pm 662,20$ fénysugár-megszakítás/óra, $P=0,009$). A HFD szignifikánsan fokozta a HFD+PLX egerek aktivitását a LF+PLX egerekhez képest a nappali szakaszban ($P=0,01$), illetve szignifikánsan emelte a HFD egerek aktivitását a LF egerekhez képest az éjszakai szakaszban ($P=0,047$). Hasonló eltéréseket találtunk a PLX-mentes és PLX-et fogyasztó csoportok mozgási aktivitása között, ha a teljes mozgási aktivitás komponensei közül a helyváltoztató és a helyzetváltoztató, finom mozgásokat külön elemeztük.

A HFD csoport táplálékfelvétele emelkedő tendenciát mutatott a LF csoportéhoz képest a mérés első napján ($P=0,06$), de ez a különbség nem volt szignifikáns és eltűnt a későbbi időpontokban. A HFD kezelt egerek kumulatív táplálékfelvétele a mikroglia jelenlététől vagy hiányától függetlenül a LF állatok fogyasztása felett maradt a kezelés 2. napjáig, ugyanakkor a kísérlet végén minden kezelési csoport kumulatív táplálékfelvétele hasonló volt. Mivel a LF táp energiatartalma 3,85 Kcal/g, a HFD tápé pedig 5,24 Kcal/g volt, a HFD csoport szignifikánsan több kalóriát fogyasztott, mint az LF csoport tagjai ($P=0,0000$ faktoriális ANOVA alapján). Ezt a PLX-kezelés nem befolyásolta ($P=0,637$) és a két faktor között nem volt interakció ($P=0,567$) faktoriális ANOVA alapján. A HFD állatok kumulatív kalóriabevitele nappal és éjszaka szignifikánsan magasabb volt a LF csoportokéhoz képest (LF vs. HFD $P < 0,01$ és LF+PLX vs. HFD+PLX $P < 0,05$).

Az egerek energiafelhasználást sovány testtömegükre normalizáltuk. A teljes energiafelhasználás átlagát befolyásolta a diéta típusa ($P=0,0003$), de nem befolyásolta a PLX-kezelés ($P=0,162$) és a két faktor között nem volt interakció ($P=0,917$). A csoportok éjszakai energiafelhasználása között nem volt szignifikáns eltérés ($P=0,066$ és $P=0,073$), ugyanakkor a nappali és az átlagos energiafelhasználást szignifikánsan befolyásolt a diéta. Nappal a HFD egerek szignifikánsan fokozták energiafelhasználásukat ($P=0,0002$), amit a PLX-kezelés nem befolyásolt ($P=0,162$) és faktoriális ANOVA alapján nem volt interakció a két faktor között ($P=0,647$). Hasonló eltéréseket tapasztaltunk az egész napos energiafelhasználás adatainak elemzése során. Az LF vs. HFD egeres átlagos energiafelhasználása $23,15 \pm 1,51$ vs. $25,15 \pm 0,37$ Kcal/kg sovány testtömeg/óra ($P=0,02$) volt, míg a LF+PLX vs. HFD+PLX állatoké $22,34 \pm 0,63$ vs. $24,25 \pm 0,33$ Kcal/kg sovány testtömeg/óra ($P=0,03$) volt.

Mivel a nyugalmi energia felhasználást nem lehet mérni közvetlenül indirekt kalorimetriával, ezt az értéket az energiafelhasználás értékéből számoltuk azokban az időpontokban, amikor az ezt megelőző fél órában az állat a teljes mozgási aktivitásának 1%-ánál átlagosan kevesebbet mozog, illetve 0,1 g-nál kevesebb tápot fogyaszt. Az energiafelhasználás értékeihez hasonlóan a becsült nyugalmi energia felhasználás értékeit is sovány testtömegre normalizáltuk. A HFD szignifikáns hatást gyakorolt a nyugalmi energiafelhasználás értékeire ($P=0,0000$), míg a PLX-kezelés ezt nem befolyásolta ($P=0,903$). A két faktor között nem volt interakció ($P=0,934$) faktoriális ANOVA alapján. A diéta magas zsírtartalma szignifikáns emelkedést okozott mind a PLX-et fogyasztó, mind a PLX-mentes egerek nyugalmi energia metabolismusában nappal, éjszaka és átlagos értékeiben is. A LF vs. HFD egerek átlagos

nyugalmi energiafelhasználása $19,56 \pm 1,07$ vs. $22,08 \pm 0,51$ Kcal/kg sovány testtömeg/óra ($P=0,0001$), a LF+PLX vs. HFD+PLX csoportoké pedig $19,46 \pm 0,65$ vs. $22,30 \pm 0,43$ Kcal/kg sovány testtömeg/óra ($P=0,0001$) volt.

A légzési hányados (respiratory exchange ratio, RER) az egerek által termelt CO_2 és az elfogyasztott O_2 térfogatának hányadosa, amely fontos információt ad az egerek által felhasznált szubsztrát minőségéről. A diéta szignifikáns hatást gyakorolt az állatok RER-jére ($P=0,0000$), ugyanakkor a PLX-kezelést ezt a paramétert nem befolyásolta ($P=0,872$) és faktoriális ANOVA alapján nem volt interakció a két faktor között ($P=0,410$). A kísérlet 3 napja során a HFD egerek RER értéke szignifikánsan magasabb volt a LF-et fogyasztókéhoz képest. A legnagyobb eltéréseket az éjszaka során tapasztaltuk, amikor a LF vs. HFD egerek RER-je $0,99 \pm 0,02$ vs. $0,79 \pm 0,02$ ($P=0,0001$) volt, míg a LF+PLX vs. HFD+PLX egerek RER-je $0,99 \pm 0,02$ vs. $0,81 \pm 0,01$ ($P=0,0001$) volt. Ez a szignifikáns eltérés látszott az átlagértékekben is, amikor mind a nappali, mind az éjszakai értékeket figyelembe vettük. A LF vs. HFD átlagos RER értéke $0,93 \pm 0,01$ vs. $0,77 \pm 0,01$ volt, a LF+PLX vs. HFD+PLX egereké pedig $0,92 \pm 0,01$ vs. $0,79 \pm 0,01$. Mivel a HFD csoportok zsírfogyasztása messze meghaladta a LF csoportokét, nem meglepő módon a HFD csoportok zsírsav oxidációja is magasabb volt ($P=0,00001$), ugyanakkor a PLX kezelés nem befolyásolta az egerek zsírsav oxidációját ($P=0,353$) és nem volt interakció a két faktor között ($P=0,167$) faktoriális ANOVA alapján. A HFD állatok átlagos zsírsav oxidációja csaknem négyszer magasabb volt, mint a LF egereké: a LF vs. HFD egerek esetében $0,07 \pm 0,01$ vs. $0,33 \pm 0,01$ Kcal/óra, míg a LF+PLX vs. HFD+PLX egerek esetén $0,08 \pm 0,01$ vs. $0,29 \pm 0,01$ Kcal/óra.

4.3.2. A mikroglia irtásának validálása Iba1 immunhisztokémiával és PCR-rel

A mikroglia marker, Iba1 immunreaktivitás alapján a PLX-kezelt egerek mikroglia irtása hatékony volt függetlenül a táp zsírtartalmától. A mikrogliairtás jelentősen csökkentette a mikroglia marker Emr1 és Iba1 szintjét az ARC-ban szintén függetlenül a táp zsírtartalmától. Az PLX-kezelt állatok Emr1 expressziója a kontroll csoportban mért expresszió 20%-ára csökkent ($0,209 \pm 0,04$; $P=0,0001$ a LF+PLX csoportban, illetve $0,223 \pm 0,08$; $P=0,0003$ a HFD+PLX csoportban). Az Iba1 expresszió a LF csoporténak mindössze 10%-ára csökkent ($0,114 \pm 0,01$; $P=0,0001$ a LF+PLX csoportban, illetve $0,152 \pm 0,06$; $P=0,0002$ HFD+PLX csoportban).

5. Következtetések

Eredményeink arra utalnak, hogy a tanciták Cx43 tartalmú gap junction kapcsolatokon keresztül összeköttetésben állnak egymással, biztosítva e sejtek hatékony kommunikációját. A Cx43 immunreaktivitás jelenléte a tanciták kamra felőli oldalán, valamint a kapillárisokon és axonterminálisokon végződő tancita-végtalpakon tovább erősíti azt az elképzelést, hogy a tanciták és az extracelluláris tér különböző alkotói között kis molekulák aktív szállítása valósulhat meg Cx43 tartalmú hemichanneleken keresztül. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy a tanciták feladata sokkal összetettebb a korábban feltételezett barrier szerepnél. A környezet hemichannelek segítségével történő monitorozása fontos szerepet játszhat a neuroendokrin rendszerek szabályozásban.

Vizsgálataink továbbá kimutatták, hogy tancitális termelnek POMC mRNS-t és fehérjét. Ezen expresszió jelentős egyedek közti variabilitást mutat felnőtt állatokban. A tancita eredetű POMC szerepének a lehetséges célterületétől függően három lehetséges szerepét feltételezzük: az első, hogy szabályozza a hipofizeotróp hormonok release-ét az EM hipofizeotróp axonjain hatva. A második lehetséges szerep, hogy a tancita eredetű POMC autokrin/parakrin módon hat és közvetlenül vesz részt a tanciták saját proliferatív/neurogén funkciójában. Végül, a tanciták által az EM portális ereibe szekretált N-terminális POMC szabályozhatja a hipofízis működését. További vizsgálatokra van azonban szükség ahhoz, hogy felderítsük a POMC expresszió egyedek közti variábilis expressziójának okát, a POMC-poszttranszlációs módosításának pontos módját e sejtekben, valamint a tancita POMC-expresszió funkcionális jelentőségét és más fajokban való előfordulását.

A mikroglia PLX-tartalmú táp fogyasztásával történő irtása hatékonynak bizonyult, amit immunhisztokémiai és PCR adataink is alátámasztottak. Ugyanakkor eredményeink arra utalnak, hogy a mikroglia hiánya nincs hatással az egerek metabolikus paramétereinek nagy részére rövidtávú HFD esetén. Ugyanakkor a rövidtávú HFD jelentős metabolikus változásokat eredményezett, magában foglalva az energiafelhasználás, RER, zsírsav oxidáció és a metabolikus paraméterek kontroll állatokban megfigyelt nappali-éjszakai változásait. Mivel az ARC gyulladási folyamatának jelenlétét nem tudtuk egyértelműen kimutatni. további kísérletekre van szükség a tanciták szerepének e folyamatban való felderítéséhez.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. Publikációk a doktori értekezés témájában

Szilvásy-Szabó A, Varga E, Beliczai Z, Lechan RM, Fekete C. (2017) Localization of connexin 43 gap junctions and hemichannels in tanycytes of adult mice. Brain Research, 1673:64-71. IF: 2,746

Wittmann G, Farkas E, Szilvásy-Szabó A, Gereben B, Fekete C, Lechan RM. (2016) Variable proopiomelanocortin expression in tanycytes of the adult rat hypothalamus and pituitary stalk. J Comp Neurol, 525(3):411-441 IF: 3,266

6.2. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények

Mohácsik P, Füzesi T, Doleschall M, Szilvásy-Szabó A, Vancamp P, Hadadi É, Darras VM, Fekete C, Gereben B. (2016). Increased thyroid hormone activation accompanies the formation of thyroid hormone-dependent negative feedback in developing chicken hypothalamus. Endocrinology, 157(3):1211-21. IF: 4,286

Kalló I, Vida B, Bardóczi Z, Szilvásy-Szabó A, Rabi F, Molnár T, Farkas I, Caraty A, Mikkelsen J, Coen CW, Hrabovszky E, Liposits Z. (2013) Gonadotropin-releasing hormone neurones innervate kisspeptin neurones in the female mouse brain. Neuroendocrinology, 98(4):281-9. IF: 4,934

Zséli G, Vida B, Szilvásy-Szabó A, Tóth M, Lechan RM, Fekete C. (2017) Neuronal connections of the central amygdalar nucleus with refeeding-activated brain areas in rats. Brain Struct Funct. IF: 4,698

Kumulatív IF: 19,93

Összidézetttség: 10