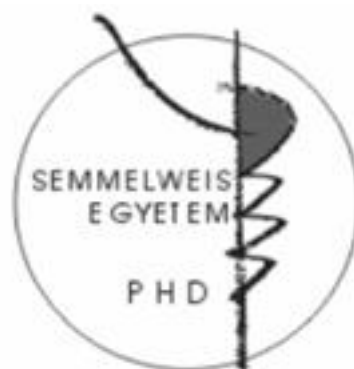


A hipofiziotróf thyrotropin-releasing hormont (TRH) termelő idegsejtek vizsgálata a rágcsáló hipotalamuszban

Ph.D. tézisek

Kádár Andrea

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Fekete Csaba D.Sc.

Hivatalos bírálók: Prof. Dr. Reglődi Dóra egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Alpár Alán egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Nagy M. György egyetemi tanár, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Prof. Dr. Katalin Halasy egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Várnainé Dr. Tóth Zsuzsa tudományos
főmunkatárs, Ph.D.

Budapest
2014

Bevezetés

A hipofiziotróf thyrotropin-releasing hormont (TRH) termelő idegsejtek a hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy (HHP) tengely fő szabályozói. Ezek a neuroszekretoros idegsejtek a hipotalamusz paraventriculáris magjában (PVN) helyezkednek el, axonjaik pedig a vér-agy-gát-mentes eminencia mediána (EM) külső zónájában végződnek, ahol TRH-t ürítenek vérkeringésbe. A TRH serkenti a hipofízis elülső lebenyében található thyreotrop sejtek TSH termelését, ezáltal serkenti a pajzsmirigy hormontermelését. A pajzsmirigyhormonok hatása szerteágazó, többek között az alap anyagcsere, az adaptív hőtermelés és a táplálékfelvétel szabályozása révén irányítják az energiaháztartást. Ezen kívül a pajzsmirigyhormonok részt vesznek a központi idegrendszer fejlődésében és normál működésének fenntartásában is.

A PVN az idegsejtek mérete alapján két fő részre osztható: a magnocelluláris és a parvocelluláris részekre. Patkányban a parvocelluláris részt további hat almagra szokás osztani: anterior, mediális, dorzális, periventriculáris, ventrális és laterális alegységekre. Patkányban a TRH-termelő idegsejtek minden parvocelluláris almagban megfigyelhetők, azonban hipofiziotróf TRH-idegsejtek kizárólag a periventriculáris és mediális parvocelluláris almagokban találhatók. Patkányban a hipofiziotróf TRH-idegsejtek fontos jellemzője a cocaine- and amphetamine regulated transcript (CART) tartalmuk, míg a nem-hipofiziotróf TRH-idegsejtekben ez a peptid nem termelődik. Noha patkány esetében a hipofiziotróf TRH-idegsejtek elhelyezkedése pontosan ismert, a napjaink leggyakrabban használt kísérleti állatában, az egérben ezen idegsejtek eloszlása nem ismert.

A pajzsmirigyhormonok a vér-agy-gáton keresztül az agyba bejutva a hipofiziotróf idegsejtek TRH termelését negatív visszacsatolással szabályozzák. A vér-agy-gát elsődleges pajzsmirigyhormon transzporter molekulája, az OATP1C1, specifikusan a tiroxint transzportálja (T4), a pajzsmirigyhormonok aktív alakját, a trijódtironint (T3) sokkal kisebb hatékonysággal juttatja át a vér-agy-gáton. Ezért a hipotalamusz T3 szintjének meghatározásában fontos szerepe van a centrális T4-T3 átalakítást katalizáló 2-es típusú dehidrogénáz (D2) enzimnek. A hipotalamuszban a D2 elsősorban egy speciális glia sejt típusban, a harmadik agykamra alját és falát bélelő tanicitákban termelődik. Míg ezen sejtek sejtteste a harmadik kamra falában található, addig a hosszú bazális nyúlványaik az arcuatus, a ventromediális, és a dorzomediális idegmagokban vagy az EM külső zónájában végződnek. Mivel a hipofiziotróf TRH-idegsejtek sejtteste a tanicitáktól messze helyezkednek el, a diffúzió a tanicitáktól a TRH-idegsejtekig viszonylag lassú folyamat. Ezzel szemben a tanicita végtalpak és a hipofiziotróf TRH-idegsejtek axonvégződése az EM külső zónájában egymás

közvetlen közelében található. Ezért feltételeztük, hogy a taniciták által termelt T3-at a hipofiziotróf TRH-idegsejtek axon-végződéseinek veszik fel az EM-ban majd retrográd transzporttal szállítják a sejtestükbe. Az idegsejtek fő pajzsmirigyhormon transzporter molekulájának, az MCT8-nak a jelenléte az axon végzésekben alátámasztaná ezt a hipotézist.

A hipofiziotróf TRH-idegsejtek aktivitásának egyik fő szabályozója a leptin, egy zsírszövetből felszabaduló, táplálkozást csökkentő hatású hormon. A leptin TRH-idegsejtekre kifejtett hatását elsősorban arcuatus mag két idegsejt-populációja közvetíti: a táplálékfelvételt csökkentő hatású α -MSH/CART-idegsejtek, melyek serkentik a TRH expressziót; illetve a táplálékfelvételt serkentő hatású AGRP/NPY-idegsejtek, melyek gátolják a TRH termelődését. Éhezés során az α -MSH/CART-idegsejtek gátolnak, míg az AGRP/NPY-idegsejtek aktivitása fokozódik. Azonban két órával az újratáplálás megkezdését követően az α -MSH/CART-idegsejtek aktivitása fokozódik és serkentik a PVN ventrális parvocelluláris almagjában található idegsejteket. Ugyanakkor az α -MSH/CART-idegsejtek által szintén beidegzett hipofiziotróf TRH-idegsejtek aktivitása nem fokozódik az újratáplálás ezen korai fázisában. Mivel a leptin képes átrendezni néhány hipotalamikus idegsejt-csoport szinaptikus bemeneteit, továbbá fejlődő állatokban részt vesz az axon-növekedés szabályozásában, feltételezzük, hogy éhezés során a leptin hiánya megváltoztatja a PVN-nek az arcuatus magból eredő beidegzését, ami a TRH-idegsejtek melanokortin rezisztenciáját eredményezheti az újratáplálás korai fázisában.

Neuroncsoportok aktivitás fokozódásának markereként gyakran használják c-Fos fehérje megjelenését a sejtek magjában. Mivel a c-Fos a sejtmagban található, a citoplazmatikus jelölődés hiánya miatt fénymikroszkópos vizsgálatokkal nehéz megállapítani, hogy milyen peptideket, transzmittereket tartalmazó axonok létesítenek kapcsolatot e sejtekkel. A Nissl-háttérfestés a bázikus festékek és a nukleinsavak kölcsönhatásán alapul, így jelöli mind a sejtmagokat, mind a citoplazmát. Mégis, immuncitokémiával kombinálva a Nissl-festékek gyakran csak a sejtmagokat jelölik, vagy csak halvány citoplazma festődést eredményeznek. Feltételeztük, hogy az immuncitokémiát követően a citoplazmatikus jelölődés hiányát RNáz szennyeződés okozza, mely megemésztja a szövetek RNS tartalmát. Ez esetben az RNáz-mentes körülmények közt végzett immuncitokémia és az RNáz-gátlók alkalmazása jelentősen javítaná a Nissl-festékek citoplazmatikus jelölését.

Célkitűzések

1. A hipofiziotróf TRH-idegsejtek elhelyezkedésének feltérképezése az egér hipotalamuszban
2. A pajzsmirigyhormont aktiváló taniciták és a hipofiziotróf TRH-idegsejtek közötti T3 transzport útjának felderítése
3. A hipofiziotróf TRH-idegsejteknek az újratáplálás korai fázisában kialakuló melanokortin rezisztenciájának tanulmányozása
4. Az immuncitokémiával kombinált Nissl-háttérfestés módszerének javítása

Anyagok és módszerek

Állatok

Kísérleteinkben felnőtt hím Wistar patkányokat és CD1, illetve TRH/Cre-Z/EG egereket használtunk. Az állatokat a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet állatházában tartottuk szabványos körülmények között (megvilágítás 6:00 és 18:00 között, 22°C-os hőmérséklet, szabadon hozzáférhető víz és táplálék). A Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Állatjóléti Bizottsága az Európai Közösség követelményeivel összhangban megvizsgált és engedélyezett minden kísérleti protokollt.

Az egér hipotalamuszban elhelyezkedő hipofiziotróf TRH-idegsejtek megoszlásának feltérképezéséhez használt módszerek

Fluoro-Gold injekció

A hipofiziotróf idegsejtek azonosítása érdekében négy egérnek adtunk be intravénásan Fluoro-Goldot, olyan retrográd jelölőanyagot, ami nem jut át a vér-agy gáton. A hipofiziotróf sejtestek jelölődésének intenzívebbé tétele érdekében két nappal később azonos dózisu Fluoro-Goldot adtunk be intraperitoneálisan.

Egyes-, kettős- és hármas jelöléses immuncitokémia

A TRH-immunreaktív (-IR) idegsejtek sejtestjeinek láthatóvá tételét intracerebroventrikulárisan adott kolhicinnel segítettük elő. A következő napon az egereket 4% akrolein és 2% paraformaldehid (PFA) keverékével fixáltuk meg. Ezt követően fagyasztómikrotómmal 25 µm vastag metszeteket készítettünk. A metszeteken az előkezelést követően az alábbi immuncitokémiai jelöléseket alkalmaztuk:

1. Egyes jelöléses immuncitokémia az egér PVN-ben a TRH-IR idegsejtek elhelyezkedésének feltérképezésére. A TRH-immunreaktivitást Ni-DAB hívó oldattal jelenítettük meg. A metszeteket fénymikroszkópia segítségével vizsgáltuk.
2. Hármás jelöléses immuncitokémia a Fluoro-Gold és TRH együttes előfordulásának vizsgálatához, illetve a parvocelluláris TRH-idegsejtek és a magnocelluláris vazopresszin (AVP)- vagy oxitocin (OT)-idegsejtek megkülönböztetéséhez. A metszeteket TRH-ellenes és Fluoro-Gold ellenes antiszérumokkal és AVP- vagy OT-ellenes antitestekkel kezeltük. A TRH-immunreaktivitást Alexa 555-tel jelölt birka IgG elleni antitesttel jelenítettük meg, a VP vagy OT jelenlétét FITC-cel konjugált egér IgG elleni antitesttel mutattuk ki, míg a Fluoro-Gold-immunreaktivitást biotinnal konjugált nyúl IgG ellenes antitesttel, avidin-biotin-peroxidáz komplexel (ABC) és biotinilált tiramiddal (BT) történő jelerősítés után Cy5-tel jelölt streptavidinnel mutattuk ki. Az idegmagok és almagok azonosítása érdekében DAPI háttérfestést alkalmaztunk. A metszeteket epifluorszcens és lézer pásztázó konfokális mikroszkóppal tanulmányoztuk.
3. Kettős jelöléses immuncitokémia az egér PVN-ben a TRH és a CART együttes előfordulásának a vizsgálatára. A metszeteket birkából származó TRH-elleni szérum és egér monoklonális CART-elleni antitest elegyében inkubáltuk. A TRH-immunreaktivitást Alexa 555-tel jelölt birka IgG elleni antitesttel mutattuk ki, míg a CART-immunjelölölést FITC-cel konjugált egér IgG elleni antitesttel jelenítettük meg. A jelölt idegsejtek elhelyezkedésének meghatározásához DAPI háttérfestést alkalmaztunk. A metszeteket epifluorszcens és lézeres pásztázó konfokális mikroszkóppal tanulmányoztuk.

A pajzsmirigyhormont aktiváló taniciták és a hipofiziotróf TRH-idegsejtek közötti T3 transzport útjának felderítéséhez alkalmazott módszerek

A pajzsmirigyhormon transzporter MCT8 jelenlétének a hipofiziotróf axonvégződéseken történő kimutatásához az alábbi immuncitokémiai jelöléseket alkalmaztuk:

1. Az MCT8 EM-beli elhelyezkedésének fénymikroszkópos vizsgálatához: 4% akrolein és 2%PFA elegyével perfundált egér agyból készült metszeteket előkezeltünk, majd nyúlból származó MCT8-elleni szérumban inkubáltuk. Az MCT8-immunreaktivitást Ni-DAB hívóval jelenítettük meg, majd a Gallyas módszer szerinti jelerősítést hajtottunk végre.
2. Az MCT8-IR képletek ultrastruktúrájának vizsgálata az EM-ban. 4% akrolein és 2%PFA elegyével perfundált patkányagyból vibratómmal készült 30-50 µm vastag metszeteket készítettünk. Az előkezelést követően a metszeteket MCT8-elleni szérummal kezeltük. Az MCT8-immunreaktivitást Ni-DAB hívóval jelenítettük meg, majd Gallyas-féle módszerrel

erősítettük fel a jelet. A metszeteket Durcupan műgyantába ágyasztuk, majd ultravékony metszeteket készítettünk. A metszeteket formvar-ral bevont gridekre gyűjtöttük. Az ultravékony metszeteket transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

3. Kettős-jelölésű immunfluoreszcencia az MCT8 és TRH EM-beli vizsgálatához. 4% akrolein és 2% PFA elegyével fixált patkányanyagokból származó metszeteket készítettünk elő immuncitokémiára. Ezután a metszeteket MCT8 és TRH ellen termeltetett szérumok keverékével kezeltük. Az MCT8-immunoreaktivitást Alexa 555-tel konjugált nyúl IgG elleni antitesttel jelöltük, míg a TRH jelenlétét FITC-cel konjugált birka IgG elleni antitesttel mutattuk ki. A metszeteket lézer pásztázó konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

A hipofiziotróf TRH-idegsejteknek az újratáplálás korai fázisában megfigyelhető melanokortin rezisztenciájának okát vizsgáló kísérletekhez használt módszerek

Kettős transzgen TRH/Cre-Z/EG indikátor egereket osztottunk öt csoportba: 1) normál rágcsálótáppal etetett egerek (n=5) 2) két napig éhezett egerek (n=5) 3) 2 napig éhezett, majd 2 órán át újratáplált egerek (n=3) 4) 2 napig éhezett majd 24 órán keresztül újratáplált egerek (n=3) 5) 2 napig éhezett egerek, melyek szubkután ozmotikus minipumpával folyamatosan leptin kezelést kaptak az éhezés alatt (12µg/nap, 2nap) (n=3). A kísérlet végén az egereket 4% PFA-val perfundáltuk és a PVN-ből 25 µm vastag metszeteket készítettünk. Az immuncitokémiai előkezelést követően a metszeteket az alábbi antitestek elegyében inkubáltuk: α-MSH-elleni birkában termeltetett antitest, AGRP-elleni nyúlból származó antitest, GFP-elleni egér antitest. Az α-MSH-elleni antitestet Alexa555-tel jelölt birka IgG-elleni antitesttel mutattuk ki, az AGRP-t biotinilált nyúl IgG elleni antitesttel, ABC-vel és BT-vel való jelerősítés után Cy5-tel konjugált streptavidinnel jelenítettük meg, míg a GFP jelét FITC-cel konjugált egér IgG-elleni antitesttel tettük láthatóvá.

Az immuncitokémia és Nissl-festés együttes alkalmazásának fejlesztése

Patkányokat három napig éhezettünk, majd a 4% PFA-val történő perfúzió előtt két órán át újratápláltuk őket. A PVN-t tartalmazó metszetek egy-egy csoportját jelöltük c-Fos- (Ni-DAB-bal jelölve) és NPY-ellen (DAB-bal jelölve), majd Cresyl-ibolyával háttérfestést végeztünk a metszeteken. A két metszetcsoport kezelése közt a különbség abban állt, hogy míg az első csoportot normál immuncitokémiai anyagokkal és eszközökkel kezeltük, addig a másodikat szigorúan RNáz-mentes körülmények között festettük.

Eredmények

A hipofiziotróf TRH-idegsejtek feltérképezése az egér hipotalamuszban

Az egér PVN szerveződése

Megfigyeltük, hogy az egér PVN szerveződése nagyban eltér a patkányban megfigyelttől. Az egér agy-atlaszban Paxinos és Franklin által alkalmazott nevezéktan a patkány agy nevezéktanán alapul, ezzel szemben mi az egér anatómia alapján az egér PVN-t az alábbi öt részre osztottuk:

- kompakt rész= nagy sejt-sűrűségű terület a PVN középső szintjében, mely egyaránt tartalmaz magno- és parvocelluláris sejteket
- periventrikuláris rész= 3-5 sejt szélességű zóna a harmadik agykamra körül
- elülső rész= a kompakt részhez képest kraniális terület
- középső szint mediális rész= a PVN középső szintjében a kompakt és a periventrikuláris rész közötti terület
- hátsó rész= a kompakt részhez képest kaudális terület

A TRH-IR idegsejtek elhelyezkedése a PVN-ben

A periventrikuláris zóna kivételével a PVN minden részében figyeltünk meg TRH-IR idegsejteket. TRH-tartalmú idegsejtek a PVN mindhárom szintjében (elülső, középső, hátsó) előfordultak, de ezen sejtek sűrűsége az elülső és a középső szintekben volt a legnagyobb. TRH-idegsejtek legnagyobb mennyiségben a PVN kompakt részében fordultak elő. A kompakt és a többi területen előforduló TRH-idegsejtek mérete azonos volt (TRH-idegsejtek mérete a középső mediális részen vs. kompakt részen (μm): $12,15 \pm 0,05$ vs. $12,26 \pm 0,02$; $P=0,31$).

A hipofiziotróf TRH-idegsejtek elhelyezkedése a PVN-ben

A Fluoro-Goldot tartalmazó idegsejtek sejttestjei jól kirajzolódtak a PVN területén. A Fluoro-Gold-immunreaktivitást a sejtekben inhomogén pöttyözött megjelenés jellemezte. Noha a PVN elülső részben számos TRH-idegsejtet figyeltünk meg, közülük csak néhány tartalmazott Fluoro-Goldot is. Hasonló módon, a hátsó rész TRH-idegsejtjei sem tartalmaztak Fluoro-Goldot. A legtöbb kettősen jelölt idegsejt a PVN kompakt részében volt megfigyelhető.

A hipofiziotróf TRH- és a vazopresszin-, ill. oxitocin-idegsejtek elhelyezkedésének összehasonlítása

AVP- és OT-idegsejtek elsősorban a PVN kompakt részében találhatóak, noha szórványosan a PVN középső szintjének mediális területén is figyeltünk meg ilyen sejteket. A magnocelluláris AVP-idegsejtek átlagos mérete ($16,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$) szignifikánsan nagyobbak bizonyult, mint a TRH-idegsejtek mérete ($p < 0,001$). A Fluoro-Goldot és TRH-t egyaránt tartalmazó idegsejtek jellemzően szintén a PVN kompakt területén helyezkedtek el, ahol a AVP- és OT-idegsejtekkel keveredve fordultak elő, de minden esetben eltérő idegsejtekben. Megfigyeltük, hogy a PVN kompakt részén körülbelül egyforma arányban találhatók $14 \mu\text{m}$ -nél kisebb, parvocelluláris ($49,3 \pm 0,9\%$) és nagyobb átmérőjű, magnocelluláris ($50,7 \pm 0,9\%$) idegsejtek, míg a középső mediális részen a sejtek túlnyomó többsége $14 \mu\text{m}$ -nél kisebb átmérőjű ($96,0 \pm 1,2\%$) volt. Nagyobb átmérőjű, magnocelluláris sejtek csak elvétve voltak megfigyelhetők e területen ($4,4 \pm 1,2\%$).

A CART és a TRH együttes előfordulás a PVN idegsejtjeiben

A CART-ot és TRH-t is tartalmazó idegsejtek eloszlása a PVN-ben nagy hasonló volt, mint a Fluoro-Goldot tartalmazó TRH-idegsejteké. Számos CART-TRH kettős jelölt idegsejtet figyeltünk meg a PVN középső síkjának kompakt részében. A CART jelenléte a TRH-idegsejtekben nem volt megfigyelhető a PVN hátsó síkjában és csupán kevés kettősjelölt sejt fordult elő a PVN elülső részében. A két peptid kolokalizációja szintén megfigyelhető a hipofiziotróf idegsejteknek az EM külső zónájában levő axonterminálisaiban.

A pajzsmirigyhormont aktiváló taniciták és a hipofiziotróf TRH-idegsejtek közötti T3 transzport útjának felderítése

Az MCT8 jelenléte az EM hipofiziotróf axonvégződéseiben

Ahhoz, hogy megállapítsuk, hogy a hipofiziotróf axonvégzések képesek-e a T3 felvételére, megvizsgáltuk az MCT8 jelenlétét az EM-ban. Intenzív és diffúz MCT8-immunreaktivitást figyeltünk meg a tanicitákra jellemző morfológiát és eloszlást mutató sejttestekben és nyúlványokban. Továbbá pöttyözött MCT8-immunreaktivitást figyeltünk meg az EM külső zónájában a tanicita nyúlványok között. Az EM külső zónájának ultrastrukturális vizsgálata kimutatta, hogy az MCT8-immunoreaktivitás megfigyelhető a tanicita nyúlványokban, továbbá axonvégzésekben, ahol az ezüst szemcsék az axonvarikozitásokban, a plazmamembránhoz közel halmozódtak fel.

Az MCT8 és a TRH kolokalizációja a hipofiziotróf axonvégződéseken

Kettős-jelölésű fluoreszcens immuncitokémiával készült a metszetek konfokális mikroszkópos vizsgálatával igazoltuk, hogy az MCT8-immunreaktivitás a TRH-tartalmú axonvarikozitások döntő többségén megfigyelhető az EM külső zónájában.

A hipofiziotróf TRH-idegsejteknek az újratáplálás korai fázisában kialakuló melanokortin rezisztenciáját kiváltó okok vizsgálata

A TRH-idegsejtek AGRP és α -MSH-IR beidegzése

A PVN-ben a TRH-IR idegsejtek körül az AGRP- és az α -MSH-IR axonok sűrű hálózatát figyeltük meg. Az α -MSH-tartalmú axonok sűrűsége a PVN elülső részén egy kissé nagyobb volt, míg az AGRP-IR axonok hálózata a PVN hátsó részén volt sűrűbb. A PVN azonos antero-poszterior szintjében nem figyelhető meg ezen axonok sűrűségében különbség a mediális és a kompakt rész között. A TRH-idegsejtek sejttesteinek és dendritjeinek felszínén számos AGRP- és α -MSH-IR axonvarikozitáció volt megfigyelhető. Konfokális mikroszkópos vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a PVN középső szintjében átlagosan $30,9 \pm 0,3$ AGRP- és $19,3 \pm 0,4$ α -MSH-IR axonvarikozitáció található a TRH-idegsejtek sejttesteinek és elsőrendű dendritjeinek felszínén.

Az éhezés hatása a TRH-idegsejteken megfigyelhető AGRP- és α -MSH-IR boutonok számára

Az éhezés hatására jelentősen megnőtt a TRH-idegsejtek felszínén megfigyelhető AGRP-immunjelölt boutonok száma (éhező vs. táplált: $44,9 \pm 0,3$ vs. $30,9 \pm 0,3$ axonvarikozitáció / TRH-idegsejt; $P < 0,001$) és csökkent az α -MSH-IR boutonok száma (éhező vs. táplált: $13,6 \pm 0,7$ vs. $19,3 \pm 0,4$ axonvarikozitáció / TRH-idegsejt; $P < 0,001$) a TRH-idegsejtek felszínén. Így a TRH-idegsejtek felszínén található AGRP- és α -MSH-IR boutonok aránya 2,07-szeresére nőtt az éhező állatokban (éhező vs. táplált: $3,34 \pm 0,2$ vs. $1,61 \pm 0,03$; $P < 0,001$).

A 2 és 24 órán át tartó újratáplálás hatása a TRH-idegsejtek AGRP- and α -MSH-IR beidegzésére

Két órával az újratáplálás megkezdését követően a TRH-idegsejtek felszínén megfigyelhető AGRP-boutonok száma kissé, de szignifikáns mértékben különbözött az éhező állatban megfigyelttől (2h újratáplált vs. éhező: $46,0 \pm 0,3$ vs. $44,9 \pm 0,3$ axonvarikozitáció / TRH-idegsejt; $P = 0,018$). Ugyanakkor a TRH-idegsejtek AGRP-IR beidegzése jelentősen magasabb volt, mint a táplált állatban megfigyelhető (2h újratáplált vs. táplált: $46,0 \pm 0,3$ vs. $30,9 \pm 0,3$

axonvarikozitás / TRH-idegsejt; $P < 0,001$). Kétórányi újratáplálást követően a TRH-idegsejtek felszínén található α -MSH-IR boutonok száma nem különbözött szignifikánsan az éhező állatban megfigyelt értéktől (2h újratáplált vs. éhező: $13,9 \pm 0,8$ vs. $13,6 \pm 0,7$ axonvarikozitás / TRH-idegsejt; $P = 0,746$). Ebben az időpontban TRH-idegsejtek felszínén megfigyelt AGRP- és α -MSH-IR boutonok aránya azonos volt, mint az éhező állatokban (2h újratáplált vs. éhező: $3,33 \pm 0,2$ vs. $3,34 \pm 0,2$; $P = 0,967$). Ezzel szemben 24 órával az újratáplálás megkezdését követően a TRH-idegsejtek felszínén megfigyelhető AGRP-IR axonvarikozítások számában jelentős csökkenés volt megfigyelhető az éhező állathoz képest (24h újratáplált vs. éhező: $34,4 \pm 0,1$ vs. $44,9 \pm 0,3$ axonvarikozitás / TRH-idegsejt; $P < 0,001$), bár ez a szám egy kissé magasabb volt, mint a táplált állatokban (24h újratáplált vs. táplált: $34,4 \pm 0,1$ vs. $30,9 \pm 0,3$ axonvarikozitás / TRH-idegsejt; $P < 0,001$). Ebben az időpontban a TRH-idegsejtek felszínével érintkező α -MSH-IR boutonok száma jelentősen megnőtt az éhező állathoz képest (24h újratáplált vs. éhező: $20,9 \pm 0,6$ vs. $13,6 \pm 0,7$ axonvarikozitás / TRH-idegsejt; $P < 0,001$) és nem mutatott szignifikáns különbséget a táplált állatokra jellemző értékhez képest (24h újratáplált vs. táplált: $20,9 \pm 0,6$ vs. $19,3 \pm 0,4$ axonvarikozitás / TRH-idegsejt; $P = 0,153$). A TRH-idegsejtek AGRP- és α -MSH-IR beidegzésének aránya jelentősen csökkent az éhező állathoz képest (24h újratáplált vs. éhező: $1,64 \pm 0,01$ vs. $3,34 \pm 0,2$; $P < 0,001$). Továbbá a TRH-idegsejtek AGRP- és α -MSH-IR beidegzésének aránya nem különbözött szignifikánsan a táplált állatokban megfigyelttől (24h újratáplált vs. táplált: $1,64 \pm 0,01$ vs. $1,61 \pm 0,03$; $P = 0,866$).

A leptin-kezelés hatása a TRH-idegsejtek α -MSH- és AGRP-beidegzésének éhezés által kiváltott átrendeződésére

Az éhezés hatását a TRH-idegsejtek α -MSH-IR beidegzésére az éhezés során szubkután ozmotikus minipumpával adott leptin teljesen kivédte (leptin-kezelt éhező vs. éhező: $20,5 \pm 0,1$ vs. $13,6 \pm 0,7$ axonvarikozitás / TRH-idegsejt; $P < 0,001$; leptin-kezelt éhező vs. táplált: $20,5 \pm 0,1$ vs. $19,9 \pm 0,4$ axonvarikozitás / TRH-idegsejt; $P = 0,178$). Továbbá az éhezés során alkalmazott leptin-kezelés jelentősen csökkentette az éhezés hatására a TRH-idegsejtek felszínén található AGRP-boutonok számában beálló változást (leptin-kezelt éhező vs. éhező $34,4 \pm 0,1$ vs. $44,9 \pm 0,3$ axonvarikozitás / TRH-idegsejt; $P < 0,001$; leptin-kezelt éhező vs. táplált: $34,4 \pm 0,1$ vs. $30,9 \pm 0,3$ axonvarikozitás / TRH-idegsejt; $P < 0,001$). A leptin kezelés szintén kivédte az éhezés hatására kialakuló változást a TRH-idegsejtek AGRP- és α -MSH-beidegzésének arányában (leptin-kezelt éhező vs. éhező: $1,67 \pm 0,01$ vs. $3,34 \pm 0,02$; $P < 0,001$; leptin-kezelt éhező vs. táplált: $1,67 \pm 0,01$ vs. $1,61 \pm 0,03$; $P = 0,939$).

Az immuncitokémiával kombinált Nissl-festés módszerének fejlesztése

Az RNáz-mente immuncitokémia hatása a hipotalamikus c-Fos immunjelölésre az újratáplálást követően

Két órával az újratáplálás megkezdését követően a c-Fos-IR idegsejtek eloszlása a PVN ventrális parvocelluláris almagjában a korábban leírttal megegyező eloszlást mutatott. Az RNáz-mentes eljárás nem befolyásolta a c-Fos-immunreaktivitás elhelyezkedését.

Az újratáplálást követően c-Fos-IR idegsejtek és a NPY-IR axonvarikozitások kapcsolatának vizsgálata hagyományos immuncitokémia és Nissl-háttérfestés segítségével

A hagyományos immuncitokémiát követő Nissl-festés csupán a sejtmagokat jelölte. A neuronok citoplazmája nem vagy csak nagyon halványan jelölődött. Noha nagyszámú NPY-IR rost látszódt a c-Fos jelölt idegsejtek körül a vPVN-ben, a gyenge citoplazmatikus festődés miatt ezen sejtek határai nem látszódtak, így nem lehetett meghatározni, hogy a NPY-IR axonvarikozitások kapcsolatban vannak-e a c-Fos-IR sejtekkel.

Az újratáplálást követően c-Fos-IR idegsejtek és a NPY-IR axonvarikozitások kapcsolatának vizsgálata RNáz-mentes immuncitokémia és Nissl-háttérfestés segítségével

Az RNáz-mentes immuncitokémiát követően a Cresyl-ibolya nem csupán a sejtmagokat, hanem az idegsejtek citoplazmáját is megfestette. Ez a citoplazmatikus festődés elősegítette a PVN különböző alegységeinek az azonosítását és a jelölt sejtpopulációk pontos helyzetének meghatározását. A módszer továbbá az erős citoplazmatikus jelölődés által láthatóvá tette a sejtek határait. A módszer segítségével megállapítottuk, hogy a vPVN-beli c-Fos-IR idegsejtek számos NPY-IR rosttal kapcsolatban állnak. A vPVN-beli c-Fos-IR idegsejteknek $84,99 \pm 2,35\%$ -a létesített a felszínén kapcsolatot NPY-IR axonvarikozitásokkal.

Következtetések

Eredményeink arra utalnak, hogy az egér PVN szerveződése jelentősen eltér a patkányban megfigyelttől. Ennek az idegmagnak az úgynevezett magnocelluláris része megközelítőleg azonos mennyiségben tartalmaz parvo- és magnocelluláris idegsejteket. Így javasoljuk a PVN e területének elnevezését, az idegsejtek nagy sűrűsége miatt, kompakt részre változtatni. A hipofiziotróf TRH-idegsejtek elhelyezkedése szintén eltér egérben és patkányban. Ezen idegsejtek jellemzően a PVN középső szintjében fordulnak elő. Csak szórványosan figyelhetők meg hipofiziotróf TRH-idegsejtek a PVN elülső részében, míg a hátulsó részben egyáltalán nem fordulnak elő. Egérben a PVN periventrikuláris zónájában nem fordultak elő TRH-idegsejtek, míg patkányban számos hipofiziotróf TRH idegsejt található a periventrikuláris parvocelluláris almagban. A hipofiziotróf TRH-idegsejtek többségét a kompakt részben, a magnocelluláris idegsejtekkel keveredve figyeltük meg. Ugyanakkor nem volt megfigyelhető a TRH és a AVP vagy az OT kolokalizációja és a hipofiziotróf TRH-idegsejtek mérete is a parvocelluláris tartományba esett. A CART és TRH kolokalizációjának eloszlása megegyezik a hipofiziotróf TRH-idegsejtekével, ami azt sugallja, hogy patkányhoz hasonlóan egérben is a hipofiziotróf funkciójú TRH-idegsejtekben fordul elő ez a peptid.

A hipofiziotróf TRH-idegsejtek axonterminálisain előforduló MCT8 pajzsmirigyhormon-transzporter molekula jelenléte felveti a lehetőséget, hogy a hipofiziotróf TRH-idegsejtek ezen terminálisokon keresztül veszik fel a T3-t az EM területén az extracelluláris térből és retrográd axonális transzporttal juttatják a sejtmagjukba. Mivel az EM a vér-agy-gáton kívül fekszik és tartalmaz D2-t termelő tanicitákat, ezen agyterület T3 tartalma különleges eredetű: a forrása a taniciták és a perifériás keringés együttesen. Így a hipofiziotróf TRH-idegsejtekre közvetlenül hatnak a perifériás T3 koncentráció változásai és a taniciták aktivitása, ezáltal a TRH-idegsejtek negatív visszacsatolós szabályozása rugalmasan valósulhat meg.

Azon túl, hogy az éhezés és a leptin szabályozza az arcuatus mag táplálkozással kapcsolatos idegsejtjeinek aktivitását, az energiaháztartással összefüggő perifériás szignálok azáltal is befolyásolják a hipofiziotróf TRH-idegsejtek működését, hogy átrendezik ezen idegsejtek arcuatus magból eredő szinaptikus bemeneteit. Az éhezés növeli a TRH-idegsejtek AGRP- és csökkenti az α -MSH-beidegzését, ami hozzájárulhat a hipofiziotróf TRH-idegsejtek gátlásához az éhezés során. Mivel ez a változás a TRH-idegsejtek beidegzési mintázatában két órával az újratáplálás megkezdését követően is megfigyelhető, felmerül a lehetőség, hogy ez a változás áll a TRH-idegsejtek melanokortin rezisztenciájának hátterében az újratáplálás korai fázisában. 24 órával az újratáplálás kezdetét követően a TRH-idegsejtek AGRP- és α -MSH-

beidegzésének aránya elérte a táplált állatokra jellemző értéket és ezzel egyidőben a TRH-termelés is normalizálódott. A leptin kezelés kivédte TRH-idegsejteken megfigyehető AGRP- és α -MSH-boutonok arányának éhezés általi eltolódását, ami arra utal, hogy a leptin szintje lehet a fő tényező, ami a TRH-idegsejtek szinaptikus bemenetinek átrendeződését szabályozza.

Eredményeink alátámasztják, hogy az immuncitokémiával kombinált Nissl-festés során az immuncitokémiához használt anyagok RNÁ-zsal való szennyezettsége vezet a Nissl-festék általi citoplazmatikus jelölődés hiányához. Az RNÁ-z-mentes körülmények közt végzett immuncitokémia azt eredményezi, hogy a Nissl-festék jelöli a citoplazmát is, ezáltal lehetővé válik a sejtmagi fehérjetartalmuk alapján azonosított idegsejtek beidegzésének vizsgálata.

Saját publikációk listája

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Kádár, A., Wittmann, G., Liposits, Z., Fekete, C. (2009) Improved method for combination of immunocytochemistry and nissl staining, *Journal of comparative neuroscience methods*. 184: (1) pp. 115-118.
2. Kádár, A., Sanchez, E., Wittmann, G., Singru, P., Füzesi, T., Marsili, A., Larsen, R., Liposits, Z., Lechan, R., Fekete, C. (2010) Distribution of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH)-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the mouse, *Journal of comparative neurology*. 518: pp 3948-3961
3. Kalló, I., Mohácsik, P., Vida, B., Zeöld, A., Bardóczi, Z., Zavacki, AM., Farkas, E., Kádár A., Hrabovszky, E., Arrojo e Drigo, R., Dong, L., Barna, L., Palkovits, M., Borsay, B.A., Herczeg, L., Bianco, A.C., Liposits, Z., Fekete, C., Gereben, B. (2012) A novel pathway regulates thyroid hormone availability in rat and human hypothalamic neurosecretory neurons, *PLoS One* 7: (6) Paper e37860. 16 p.

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

1. Fekete, C., Freitas, B.C., Zeöld, A., Wittmann, G., Kádár, A., Liposits, Z., Christoffolete, M.A., Singru, P., Lechan, R.M., Bianco, A.C., Gereben, B. (2007) Expression patterns of WSB- ϵ and USP-33 underlie cell-specific post-translational control type 2 deiodinase in rat brain, *Endocrinology* 148: pp. 4865-4874
2. Fekete, C., Zséli, G., Singru, P., Kádár, A., Wittmann, G., Füzesi, T., El-Bermani, W., Lechan, R. (2012) Activation of anorexigenic POMC neurons during refeeding is independent of vagal and brainstem inputs, *Journal of neuroendocrinology* 24: (11) pp. 1423-1431
3. Sárvári, A., Farkas, E., Kádár, A., Zséli, G., Füzesi, T., Lechan, R., Fekete, C. (2012) Thyrotropin-releasing hormone-containing axons innervate histaminergic neurons in the tuberomammillary nucleus, *Brain research* 1488: pp. 72-80

