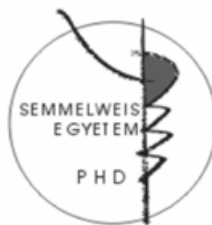


Új peptiderg szignalizációs mechanizmusok a reprodukció szabályozásában

Doktori tézisek

Molnár Csilla

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Hrabovszky Erik tudományos tanácsadó, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Prof. Dr. Párducz Árpád emeritus professzor, D.Sc.
Dr. Dobolyi Árpád tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Csillag András egyetemi tanár, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Ábrahám István egyetemi docens és
tudományos tanácsadó, Ph.D.

Prof. Dr. Köves Katalin egyetemi tanár, D.Sc.

Budapest
2014

Bevezetés

Emlősökben a hipotalamusz gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-t termelő neuronjai alapvető szerepet játszanak a reprodukció központi szabályozásában. A GnRH idegsejtek hipofizeotróp axonjai GnRH-t szekretálnak a portális keringésbe a hipotalamikusan eminens mediana (EM) területén. Innen, a portális vénák szállítják a GnRH-t az elülső hipofízisbe, mely a gonadotróp sejtekhez kötődve szabályozza a gonadotropinok, azaz a follikulus- stimuláló hormon (FSH) és lutenizáló hormon (LH) szintézisét és szekrécióját. Az FSH és LH a vérkeringésbe jutva hat a gonádok működésére, fokozza a gametogenezist és a gonadális szteroidok szintézisét. A gonadális hormonok pedig egy klasszikus negatív visszacsatolási körön keresztül hatnak a hipotalamuszra és a hipofízisre, azáltal, hogy gátolják a GnRH és a gonadotropinok szintézisét.

Az EM területén a GnRH terminálisokból GnRH ürül a portális erek fenesztrált kapillárisaiba minden 30-90 percben. A GnRH epizódikus szekréciója korrelál az LH adenohipofízisből történő pulzatilis szekréciójával. A sejtek ezen összehangolt működése dendro- dendritikus kapcsolatokon keresztül valósulhat meg, mely által a szekréciós események alatt a szabályos pulzusok jönnek létre. GnRH/LH „pulzus generátor”-nak nevezzük azt a neuronális hálózatot, mely felelős a GnRH neuroszekréciós pulzusok létrehozásáért.

A GnRH sejtek működését erősen befolyásolják a neuronális afferenseik. Ezen afferensekből felszabaduló neuropeptidok, valamint klasszikus neurotranszmitterek fontos szerepet játszanak a GnRH sejtek idegi szabályozásában.

A kisszeptin (KP) különösen fontos szerepet játszik a reprodukció központi szabályozásában. KP kezelés, KP antitestek, KP antagonisták, ill. KP-, vagy KP receptor (KISS1R) hiányos transzgenikus állat modellek használatával bizonyították, hogy a KP befolyásolja a GnRH pulzatilis és „surge” ürtését.

A neurokinin B (NKB) a másik kulcsfontosságú neuropeptid, mely a KP-val együttműködve részt vesz a GnRH/LH szekréció neuroendokrin szabályozásában. Fokozza a GnRH hipotalamikusan EM-ből való szekrécióját, ahol a GnRH axonok kontaktusokat hoznak létre az NKB axonokkal patkányokban. Továbbá, a NKB neuronok befolyásolják a reprodukciót azáltal, hogy más NKB idegsejteken hatnak az arcuatus magban (ARC), ahol egymással sűrűn kapcsolatokat létesítenek.

Egy gátló neuropeptidet azonosítottak fűrj hipotalamuszában, melyet gonadotropin inhibitor hormonnak (GnIH) neveztek el; a GnIH dózis-függő módon gátolja a gonadotropin

felszabadulását az agyalapi mirigyből. Emlősökben sikerült azonosítani a GnRH homológjait, az RF-amid kapcsolt peptideket (RFRP-1, RFRP-2, RFRP-3).

A GnRH neuronális rendszer, mely a reprodukció neuroendokrin szabályozásának végső közös kimenete, válaszol a keringő 17β -ösztadiol (E2) visszacsatoló hatásaira. A szexuálsteroidok visszacsatolási hatása a hipotalamusz szintjén a GnRH neuronok szabályozásában, míg az agyalapi mirigy szintjén a gonadotróp sejtek szabályozásában érhető nyomon. Azt a tényt, hogy a gonadális szteroidok plazma szintjének fenntartása negatív fékként hat a GnRH-gonadotropin tengelyre, legegyszerűbben a GnRH és gonadotropin szintek esésével együttjáró gonadektómiával lehet szemléltetni. A szexuálsteroidok agyra kifejtett visszacsatolási hatásait illetően különbségek vannak nőstények és hímek között, a legfontosabb a pozitív feedback jelenléte nőstényekben, illetve annak hiánya hímekben. Ez a pozitív visszacsatolás vezet az ovulációt megelőző GnRH és LH „surge” kialakulásához. Míg az ösztrogén direkt hatása a GnRH idegsejteken ösztrogén receptor β -n (ER- β) keresztül valósul meg, addig azok az interneuronok, melyek kritikus szerepet játszanak a keringő ösztrogén indirekt hatásának érzékelésében és közvetítésében a GnRH rendszer felé, klasszikus ösztrogén receptort (ER- α) expresszálnak.

Hörcsögökön végzett tanulmányokból derült ki, hogy az RFRP neuronális hálózat részt vesz a GnRH neuronokhoz közvetített ösztrogén visszacsatolásban. Ezen rácsálókban az RFRP idegsejtek tartalmaznak ER- α -t és c-Fos expresszióval válaszolnak akut E2 kezelés hatására. Az RFRP axonok bemeneteket küldenek a GnRH neuronokra, mely direkt szabályozásra utal. Ovariektomizált (OVX) hörcsögökben és gonadálisan intakt patkányokban az RFRP-3 intracerebroventrikuláris injekciója csökkentette a plazma LH szintjét. Egyik tanulmányunkban (1. kísérlet), alátámasztandó ezt az állítást, megvizsgáltuk az RFRP neuronális rendszer feltételezett ösztrogén érzékenységét, tanulmányozva az RFRP génextpresszió ösztrogén általi szabályozását és a két ösztrogén receptor izoforma jelenlétét RFRP neuronokban.

Birkákban, kecskékbén, egerekben, majmokban és az emberekben in az ARC KP idegsejtjei NKB-t is szintetizálnak. A nemrégiben bemutatott KNDy (Kisspeptin/Neurokinin B/Dynorphin) neuronok elnevezés arra utal, hogy ezen KP/NKB neuronok többsége dinorfint (DYN) is szintetizál, legalábbis birkákban, patkányokban, egerekben és kecskékbén igen. Birkákban végzett kísérletek arra utalnak, hogy az ARC KNDy idegsejtjei fontos szerepet játszanak a GnRH neuronokra kifejtett negatív feedback hatások közvetítésében, és feltételezhető, hogy az ösztrogén pozitív visszacsatolásában is. Valamint úgy tűnik, hogy a KNDy neuronok fontos résztvevői a GnRH pulzus generátornak.

A KNDy neuropeptidek kolokalizációját leíró anatómiai tanulmányok közelebbi analízise rávilágít, hogy a neuropeptidek és azok receptorainak kolokalizációja gyakran csak részleges és eltér a különböző tanulmányokban, fajokban, nemekben és korcsoportokban. Előzetes adataink alapján, mely szerint fiatal férfi mintákban a KP neuronok száma nagyon alacsony, feltételeztük, hogy a KNDy neuropeptidek közötti átfedés mértéke is sokkal alacsonyabb fiatal férfiakban, mint azt korábbi birka, kecske, vagy egér adatok sugallták. Ezt a felvetést alátámasztva, egyik tanulmányunkban (2. kísérlet) megvizsgáltuk a KNDy neuron elmélet univerzális érvényességét fiatal férfi mintákon végzett immunhisztokémiai analízissel, melyben párhuzamosan vizsgáltuk a KP-, NKB- és DYN immunoreaktivitást az infundibuláris magban (Inf) és az infundibuláris nyúlványban (InfS). További kvantitatív hisztokémiai analízissel tanulmányoztuk a morfológiai nemi- (3. kísérlet) és életkorbeli (4. kísérlet) különbségeket.

Célkitűzések

1. Az RFRP neuronális rendszer ösztrogén-érzékenységeinek vizsgálata egérben
2. Felnőtt férfiak "KNDY" neuronális rendszerének karakterizálása
3. A humán hipotalamikus kisszeptin- és neurokinin B neuronális rendszer szexuális dimorfizmusának vizsgálata
4. A humán kisszeptin és neurokinin B idegsejtek korfüggő anatómiai változásainak leírása

Anyagok és módszerek

Állatok

A kísérletekhez CD1-es egereket használtunk a Kísérleti Orvostudományi Kutató Intézet Orvosi Géntechnológiai Részlegének helyi tenyészetéből. Az állatokat szabványos körülmények között tartottuk. A kísérletek az Európai Közösség Tudományos Tanácsának előírásai szerint (86/609/EEC) és az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Állatjóléti Bizottságának jóváhagyásával zajlottak le.

Az állatokat ovariektomizáltuk, majd a műtét utáni 9. napon szilikon kapszulákat ültettünk bőr alá. A kontrol csoport (OVX) kapszulájában napraforgó olaj, az ösztrogén-kezelt csoport (OVX+E2) kapszulájában 100µg/ml E2 volt.

Az állatokat 4 nappal később transzkardiálisan perfundáltuk 4% paraformaldehidet tartalmazó fixáló oldattal. Ezeket az egereket az ER- α és RFRP-1 immunoreaktivitást vizsgáló kísérleteinkben használtuk. A ER- β és RFRP-1 immunoreaktivitást kimutató kísérleteinkben az OVX és OVX+E2 állatokat 2% paraformaldehid és 4% acrolein keverékével fixáltuk.

Humán szövetek

A humán hipotalamikus szöveteket a Debreceni Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézetéről kaptuk (DEOEC RKEB/IKEB: 3183-2010). Szelekciós kritérium volt a hirtelen halál, a neurológiai és endokrin betegségek kizárása, valamint a kevesebb, mint 48 órás *post mortem* idő.

A felnőtt humán "KNDy" neuronális rendszer jellemzéséhez (2. kísérlet) fiatal férfiakból (kor: 21-37 év) származó mintákat használtunk. A KP és NKB neuronális rendszer nemi különbségeinek vizsgálatához (3. kísérlet) 50 év feletti (50-67 év) férfi és 55 év feletti (57-70 év) posztmenopauzás női mintákat használtunk. A KP és NKB neuronok életkor-függő anatómiai változásainak nyomonkövetéséhez (4. kísérlet) önkényesen definiált "fiatal" (21-49 év) és "idős" (50-67 év) férfi mintákat használtunk.

Boncolás után a humán hipotalamusz szöveti blokkokat immerziósan fixáltuk 4%-os paraformaldehiddel, majd Leica fagyasztó mikrotóm segítségével 30 μ m-es metszeteket készítettünk.

Immunohisztokémia előtt a humán szöveteket permeabilizáltuk és csökkentettük bennük az endogén peroxidáz aktivitást. Továbbá egy 80°C-on történő 0.1M-os citrát pufferes inkubálással feltártuk az antigéneket. Az immunofluoreszcens kísérletekben a metszeteket Szudán-feketével kezeltük, így csökkentve a lipofuszcin lerakódások okozta autofluoreszcenciát.

Immunohisztokémiai módszerek

A metszeteket immuncitokémiához szükséges előkészítés után megfelelő hígítású specifikus elsődleges antiszérumok oldataiban inkubáltunk.

Peroxidáz-alapú immunohisztokémiai egyszeres-jelölés

Az elsődleges antitesthez biotinilált másodlagos antitestet, majd ABC Elite reagenst kötöttünk. A peroxidáz jelet diaminobenzidin (DAB), vagy nikkellel erősített diaminobenzidin (Ni-DAB) kromogénnel tettük láthatóvá. A megfestett metszetek tárgylemezre húztuk, megszártítottuk, dehidratáltuk, xilollal tisztítottuk, majd DPX médiummal fedtük le.

Ni-DAB kromogén erősítése ezüst-arannyal

Néhány kettős peroxidáz alapú kísérletben két különböző antigén (egy sejtmagi és egy citoplazmatikus) elhelyezkedését vizsgáltuk ugyanabban a sejtben (1. és 2. kísérlet). Más esetekben, pedig az afferens kapcsolatait vizsgáltuk két eltérő neuronális fenotípusnak (3. és 4. kísérlet). Ezekben a tanulmányokban a Ni-DAB kromogént utólag felerősítettük ezüst-arannyal.

Innervációs és kolokalizációs kísérletek ezüst-arany-erősített Ni-DAB és DAB kromogének kombinációjának felhasználásával

A GnRH neuronokra érkező KP-IR és NKB-IR afferensek tanulmányozása során (2-4. kísérlet) két párhuzamos metszetsorozatban detektáltuk a KP és NKB immunoreaktivitást. A GnRH neuronokat egy új tengerimalac antiszérummal detektáltuk. Az elsődleges antiszérumot biotinilált anti-tengerimalac IgG-vel reagáltattuk és az ABC reagens, majd a peroxidáz szignált DAB kromogénnel hívtuk meg.

Azokban a tanulmányokban, melyekben az ösztrogén receptor izoformáit próbáltuk meg kimutatni RFRP neuronokban (1. kísérlet), a receptorokat nyúlban termeltetett antiszérummal detektáltuk, ezután biotinilált másodlagos antitesttel és ABC Elite reagenssel történő 1 órás inkubálás következett. A jelet Ni-DAB-bal tettük láthatóvá, majd felerősítettük ezüst-arannyal. Az RFRP-1 immunoreaktivitás egy C-terminális ellen termeltetett egér monoklonális antitesttel, majd biotinilált másodlagos antitest-ABC technikával és DAB kromogénnel detektáltuk.

KP és NKB, vagy KP és DYN immunoreaktivitás kolokalizációját vizsgáló kettős immunofluoreszcens kísérletek az Inf-ben

Azokban a tanulmányokban, melyekben a KP és NKB, vagy KP és DYN kolokalizációját vizsgáltuk (2-4. kísérlet), kettős immunofluoreszcens festést alkalmaztunk. Az elsődleges antitestek (nyúl anti-NKB és birka anti-KP, vagy nyúl anti-DYN és birka anti-KP) kottéljában történő inkubáció után fluorokróm-konjugált másodlagos antitestek (anti-nyúl-FITC, anti-birka-Cy3) keveréke következett.

Az érzékenység maximalizálása érdekében néhány kettős immunofluoreszcens tanulmányban (2-4. kísérlet) tiramid szignál amplifikációt végeztünk. Ezekben a kísérletekben a KP-t szekvenciálisan inkubáltuk birka KP antitestben, majd biotinilált anti-birka IgG-vel, ABC Elite reagenssel, biotin tiramid munka oldatban és végül avidin-Cy3-mal. Majd azért, hogy inaktiváljuk a tormagyökér peroxidázt, a metszeteket 30 percig kezeltük 0.5% H₂O₂ és 0.1% Na-azid PBS-es oldatával. Az NKB és DYN kimutatásához nyúlban termeltetett

elsődleges antitesteket használtunk, melyet előbb anti-nyúl-peroxidázzal, végül FITC-tiramiddal reagáltattunk.

A humán GnRH neuronokra érző KP- és NKB afferensek kolokalizációjának vizsgálata hármas immunofluoreszcenciával

Az elsődleges antitestek koktéjlja (nyúl anti-NKB, birka anti-KP, tengerimalac anti-GnRH) után a metszeteket fluorokróm-konjugált másodlagos antitestek koktélijában (mind számban termeltetett; anti-nyúl-FITC, anti-birka-Cy3, anti- tengerimalac -AMCA) inkubáltuk (3. és 4. kísérlet).

Az immunofluoreszcens kísérletekben processzált metszeteket 0.1M Tris–HCl pufferből húztuk fel és a vízdékony Mowiol médiummal fedtük le.

***In situ* hibridizáció** (1. kísérlet)

A 20µm-es hipotalamusz metszeteket kriosztáttal (Leica) készítettünk és szilános tárgylemezre húztuk fel steril körülmények között. Prehibridizációt követően, minden hatodik metszetet 424-bp-os ³⁵S-UTP-jelölt preproRFRP cRNS-sel hibridizáltuk. A metszeteket először Kodak BioMax MR autoradiográfias filmmel exponáltuk, majd 3 nap múlva standard filmhívási technikával meghívtuk. Ezután a metszeteket Kodak NTB autoradiográfias emulzióba mártottuk és az autoradiogramokat 2 hét expozíció után hívtuk elő. Végül a metszeteket megszártottuk, dehidratáltuk, xilollal tisztítottuk és DPX-szel fedtük le.

Mikroszkópia

A fény- (1-4. kísérlet) és fluoreszcens (2. kísérlet) mikroszkópos képeket AxioCam MRc 5 digitális kamerát tartalmazó Zeiss AxioImager M1 mikroszkóppal készítettük, AxioVision 4.6 program segítségével. A kettő- és hármas immunofluoreszcens jelölések (3. és 4. kísérlet) kiértékeléséhez Radiance 2100 konfokális mikroszkópot használtunk. Valamint további konfokális képeket (2. és 4. kísérlet) készítettünk egy A1R konfokális rendszerrel felszerelt invert Nikon Eclipse Ti-E mikroszkóppal.

Adat elemzés és statisztika

ISH jel kvantitatív elemzése (1. kísérlet)

A röntgen filmet beszkenneltük, majd a digitális képet Image J szoftverrel elemeztük. Az RFRP mRNS expresszió kvantitatív elemzéséhez minden állatból a legerősebb jelet tartalmazó

metszetet választottuk ki. Az autográfias jelet minden állatban jellemeztük egy „integrált denzitás” értékkel. Az OVX és OVX+E2 csoportokat hasonlítottuk össze egyutas ANOVA-val.

Az integrált denzitás függ mind a jelölt neuronok számától, mind az egyes RFRP sejtek egyedi RFRP mRNS expressziós szintjétől. Az ezüst szemcsék csoportjainak számát tekintettük az RFRP neuronok számának és a kapott értékeket egyutas ANOVA-val hasonlítottuk össze a OVX és OVX+E2 csoportokban.

Kvantitatív immunohisztokémiai kísérletek elemzése

A digitális képeket Adobe Photoshop CS programmal elemeztük. A kvantitatív adatok átlag \pm SEM értékekkel vannak feltüntetve és a statisztikai összehasonlítást Newman-Keuls post-hoc teszt után egyutas ANOVA-val végeztük el.

Sejttest méret (átlag immunoreaktív profil terület)

A KP- és NKB-IR sejttestek átlagos méretének meghatározásához (3. és 4. kísérlet) digitális képeket készítettünk az Inf régióból. Adobe Photoshop CS program segítségével kitöröltük a sejtek környezetét és Image J program segítségével megmértük a jel területeket, melyeket μm^2 -é alakítottunk a megfelelő kalibráció segítségével.

Sejttestek regionális előfordulása

Az immunoreaktív sejttestek számát (2-4. kísérlet) 100X-es nagyítás mellett, egy 5X5-ös szemlencse rács segítségével egy 0.25 mm²-es területen határoztuk meg. Minden mintát azzal a maximális IR perikarion számmal jellemeztük, amit ezen a területen belül számoltunk.

Jelölt nyúlványok regionális sűrűsége

A KP- és NKB-IR nyúlványok regionális sűrűségének meghatározásához (2-4. kísérlet) digitális képeket készítettünk az Inf régióból. Adobe Photoshop CS program segítségével kitöröltük a sejttesteket és a proximális dendriteket. Image J program segítségével megmértük az immunoreaktív nyúlványok/ teljes terület arányokat. A 2. kísérletben megvizsgáltuk az NKB-IR és KP-IR, valamint a DYN-IR és KP-IR axonok átfedésének arányát konfokális képek segítségével.

Neuropeptid kolokalizáció a sejttestekben

Tiramid amplifikációval jelölt kettős immunofluorszcens metszetekben vizsgáltuk a KP és NKB kolokalizációját (2. és 4. kísérlet) az Inf-ben.

GnRH neuronok afferenseinek neuropeptid tartalma

Kettős immunofluoreszcens metszetekben elemeztük a KP/NKB axonális kontaktusokat a GnRH-IR sejtestjein és dendritjein (2-4. kísérlet). Minden mintát jellemeztünk a GnRH sejtestekre, ill. 100µm GnRH dendritre érkező kontaktusok átlagával.

Azon kísérletekben, melyekben a GnRH neuronális afferenseiben jellemző KP és NKB kolokalizációt szerettük volna jellemezni, konfokális felvételeket készítettünk (3. és 4. kísérlet).

Eredmények

Az ösztrogén csökkenti az RF-amid kapcsolt peptid expresszióját az ösztrogén receptor α -n keresztül

Az RFRP mRNS expressziója csökken ösztrogén hatására

Radioizotópos *in situ* hibridizációs tanulmányok felfedték az RFRP mRNS-t szintetizáló idegsejtek regionális eloszlását az egér hipotalamuszban. A jelölt neuronok nagyrésze a dorzomediális magban (DMN), ezen mag ventrális részén és a kaudális hipotalamusz periventrikuláris magjában helyezkednek el. OVX és OVX+E2 csoportokban is azonosítottuk az eloszlási mintázatot, de a jel sokkal gyengébb volt az E2-kezelt csoportban. Kvantitatív analízissel megállapítottuk, hogy 4 napos ösztrogén kezelés OVX-es egerekben szignifikánsan lecsökkenti a röntgen filmekben detektálható integrált denzitást, mellyel a szignál erősségét mértük.

Emulziós autoradiográfok ezüst szemcséinek csoportjait elemezve határoztuk meg, hogy az ösztrogén kezelés csökkenti-e a detektálható RFRP neuronok számát, az egyes sejtek RFRP mRNS tartalmát, vagy mindkettőt. Az egyedi neuronok felett található ezüst szemcsék integrált denzitásának vizsgálatával kimutattuk, hogy alacsonyabb az egyedi sejtek RFRP mRNS szintje az OVX+E2 csoportban, mint az OVX-ben. Ezzel az analízissel szignifikánsan kevesebb ezüst szemcse csoportot (RFRP idegsejtet) azonosítottunk az OVX+E2 egerekben ($26,4 \pm 2,6$ neuron/állat; $\text{átlag} \pm \text{SEM}$), mint a kontrol OVX csoportban ($39,0 \pm 3,6$ neuron/állat).

Az RFRP neuronok relatív kis csoportja mutat ER- α immunoreaktivitást

Kolokalizációs kísérleteinkben kettős jelöléses immunohisztokémiával azonosítottuk, hogy mely ER izoforma felelős az RFRP mRNS expresszió ösztrogén hatására bekövetkező csökkenéséért. Erős ER- α immunojelölődés volt jelen az ARC és a ventromediális magban (VMN) és néhány elszórt sejtmag a dorzomediális és periventrikuláris magokban, melyek a legtöbb RFRP-1-IR sejtet tartalmazták. Halvány ER- α jel volt detektálható az RFRP-1-IR

sejtek $18,7 \pm 3,8\%$ -ában, míg a legtöbb RFRP neuron nem tartalmazott ER- α jelet. Néhány ER- β -IR sejtmag volt detektálható a hipotalamikus paraventriculáris magban (PVN), és csak elszórtan néhány ER- β -jelölt sejt a dorzomediális magban. Nem mutattunk ki ER- β -pozitív RFRP neuront.

Immunohisztokémiai bizonyíték fiatal férfiakban a “KNDy” neuronok hiányára

KP-, NKB- és DYN-immunoreaktív sejtek elhelyezkedése az Inf-ben

Feltételezzük, hogy a humán mintákon és korábbi állati mintákon végzett kísérleteinkben kapott különböző kolokalizációs mintázat részben tükrözi a reprodukciós folyamatok faji különbségeit. A peroxidáz-alapú immunohisztokémiában sok NKB-IR sejtestet azonosítottunk az Inf-ben. A KP sejtek sokkal kisebb számban jelentek meg a szomszédos metszetekben. Kvantitatív analízissel kimutattuk, hogy a KP neuronok denzitása 5-ször alacsonyabb volt, mint a NKB-IR sejteké. A DYN-IR sejtek vagy teljesen hiányoztak, vagy nagyon ritkán fordultak elő az Inf-ben, ezzel meggátolva a kvantitatív analízist. Ezzel ellentétben, a szupraoptikus mag sok DYN-jelölt sejtestet tartalmazott, mely kizárja, hogy a Inf-ben detektált alacsony DYN szignál technikai korlátok miatt volt jellemző.

Kettős immunofluoreszcens festéssel mutattuk ki a NKB-IR és KP-IR sejtek nem várt szegregációját. Tiramid jel amplifikáció volt szükséges a NKB/KP kettős jelölt sejtek szenzitív kimutatásához, mely az NKB-IR sejtek csak $32,9 \pm 4,7\%$ -ban, a KP-IR sejtek $75,2 \pm 6,6\%$ -ban jelent meg.

Az Inf-ben található KP- és NKB-immunoreaktív nyúlványok sűrűsége

Az Inf-ben található immunojelölt nyúlványok előfordulása hasonló, mint a jelölt sejteké. Itt is az NKB-IR volt a legjellemzőbb fenotípus. Ezek az axonok számos appozíciót létesítenek az NKB-IR sejteken és dendritikus nyúlványaikon. Az immunohisztokémiai szignál által borított terület kvantitatív analízise kimutatta, hogy az NKB-IR nyúlványok sűrűsége 5-ször nagyobb, mint a KP-IR nyúlványoké. DYN-IR nyúlványokat is detektáltunk az Inf-ben, bár kevésbé gyakran, mint az NKB-IR, vagy KP-IR axonokat.

Immunofluoreszcens kísérletekben a kettős jelölt axonok mellett sok NKB-IR nyúlvány volt megfigyelhető KP immunojelölés nélkül, valamint olyan KP-IR nyúlványok, melyek nem tartalmaznak NKB-t. A DYN-IR nyúlványok csak tiramid szignál amplifikálás mellett jelölődtek erősen. A legtöbbjük különbözött a KP-IR axonoktól, bár kettősen jelölt KP/DYN-IR nyúlványok is megjelentek egyszer- egyszer. Hasonlóan, a KP-IR nyúlványok nagy része dinofin B immunoreaktivitás mentes volt az Inf-ben és az InfS-ben is.

A KP- és NKB-immunoreaktív nyúlványok sokasága az InfS-ben

Az InfS-be beleértjük a postinfundibuláris eminencia felszíni és mély kapilláris gócait. Mindkettőt bőven innerválják a GnRH-IR axonok, ezzel arral utalva, hogy hozzájárulnak az adenohipofízis gonadotrop sejtjeinek GnRH ellátásához. A két kapilláris hálózat körüli különböző jelölt nyúlványok relatív sűrűsége emlékeztet az Inf-ben megfigyeltre. Ezek szerint a portális erek sűrűn körbe vannak véve NKB-IR nyúlványokkal és csak mérsékelten KP-IR nyúlványokkal. Nagyon kevés DYN-IR nyúlvány található a portális kapillárisok közelségében.

Az immunofluoreszcens kísérletek megerősítették, hogy az NKB domináns a KP-hez képest a portális erek körül és az NKB-IR nyúlványokból gyakran hiányzik a KP jelölődés. Az Inf-hez hasonlóan az InfS is tartalmaz egyes- és kettős jelölt KP-IR nyúlványokat is tartalmaz. KP- és DYN-kettős jelölt metszetekben a jelölt nyúlványok nagyrésze különböző, bár ritkán kolokalizáció is detektálható.

A GnRH-IR neuronokra érkező KP-IR és NKB-IR appozíciók gyakorisága

A GnRH neuronokra érkező NKB-IR és KP-IR bemenetek kvantitatív elemzéséhez ezüst-arany intezifikált Ni-DAB és DAB kromogénnel jelölt kettős festett metszeteket vizsgáltunk. A mikroszkópos analízis megerősítette, hogy az Inf-ben az NKB-IR és KP-IR axonok axoszomatikus és axo-dendritikus bemeneteket küldenek a GnRH-IR neuronokra. Kvantitatív elemzéssel kimutattuk, hogy a GnRH-IR perikarionok és dendritek 6-szor, ill. 5-ször több NKB-IR innervációt kapnak, mint KP-IR-et.

A kisszeptin és neurokinin B rendszer nemi dimorfizmusa idős egyéneknél

Nemi különbségek a KP és az NKB neuronok sejttest méreteiben

Tanulmányaink egyikében a KP-IR és NKB-IR neuronok morfológiai analízise során erős nemi különbséget mutattunk ki a KP-IR és NKB-IR neuronok méretében (átlagos terület) az Inf-ben idős férfiak és nők között. A KP-IR sejttestek, akárcsak az NKB-IR sejttestek megnöttek és a profil területük szignifikánsan nagyobb volt idős nőkben ($284,2 \pm 27,3 \mu\text{m}^2$ a KP-IR és $298,1 \pm 19,7 \mu\text{m}^2$ az NKB-IR neuronok), mint férfiakban ($154,8 \pm 19,2 \mu\text{m}^2$ a KP-IR és $190,4 \pm 20,4 \mu\text{m}^2$ az NKB-IR neuronok).

A KP-IR és az NKB-IR sejttestek előfordulása az Inf-ben

A jelölt sejttestek kvantitatív elemzésével a következő eredményeket kaptuk:

- Férfiakban az NKB-IR sejttestek előfordulása szignifikánsan nagyobb volt, mint a KP-IR sejttesteké (120%-kal).

- Nőkben az NKB-IR sejtek előfordulása csak 23%-kal nagyobb, mint a KP-IR sejteké, de ez a különbség nem szignifikáns.
- A KP-IR sejtek átlagos sűrűsége (sejtek előfordulása egy 0.25mm²-es kereten belül) 170%-kal nagyobb nőkben, mint férfiakban. Ez a komoly nemi különbség statisztikailag szignifikáns.
- Az NKB-IR sejtek sűrűsége 51%-kal nagyobb nőkben, mint férfiakban és ez a különbség statisztikailag szignifikáns.

A KP-IR és az NKB-IR nyúlványok regionális sűrűsége

Idős férfiakban az Inf-ben csak kevés KP-IR rost mutatható ki, ezzel ellentétben, posztmenopauzás nőkben sűrű rosthálózat jellemző. Az NKB-IR axonok nem mutatják ezt a komoly nemi különbséget. A jelölt axonok kvantitatív elemzésével a következő eredményeket kaptuk:

- A férfi Inf-ben az NKB-IR axonok átlag sűrűsége 280%-kal nagyobb, mint a KP-IR nyúlványoké és ez a különbség statisztikailag szignifikáns.
- A női Inf-ben az NKB-IR és a KP-IR nyúlványok sűrűsége statisztikailag nem különbözik.
- A KP-IR nyúlványok komoly nemi különbséget mutatnak, 161%-kal nagyobb a sűrűségük nőkben, mint férfiakban. Ez a különbség statisztikailag szignifikáns.
- Az NKB-IR nyúlványok csupán 8,4%-kal sűrűbbek nőkben, mint férfiakban és ez a különbség statisztikailag nem szignifikáns, ellentétben a KP-IR nyúlványok hálózatának nagyon komoly és szignifikáns nemi különbségével.

A GnRH neuronokra érkező KP-IR és NKB-IR appozíciók gyakorisága

A KP és GnRH, valamint az NKB és GnRH kettős jelölt metszeteken ezüst-arany-intenzifikált Ni-DAB-ot és DAB kromogéneket használtunk. A nagy nagyítású fénymikroszkópos analízis megerősítette a laboratóriumunk által korábban tett megfigyelést, mely szerint a KP-IR axonok axo-szomatikus és axo-dendritikus kontaktusokat létesítenek a GnRH neuronokkal az Inf-ben. Jelen tanulmányban hasonló axo-szomatikus és axo-dendritikus appozíciókat figyeltünk meg az NKB-IR axonok és GnRH sejtek között.

A GnRH-IR sejtekre és dendritekre érkező KP-IR kontaktusok szemikvantitatív analízisével megállapítottuk, hogy szignifikánsan erősebb KP-IR inputot kapnak a GnRH neuronok sejtestjei és dendritjei nőkben, mint férfiakban.

Mindkét nemben a GnRH-IR sejtek és dendritek is szignifikánsan több NKB-IR inputot kapnak, mint KP-IR inputot.

Ellentétben a KP-IR inputoknál megfigyelt drámai nemi dimorfizmussal, a GnRH-IR neuronokkal létesített NKB-IR axo-szomatikus és axo-dendritikus juxtapozíciók előfordulásában nem volt szignifikáns különbség. Bár megfigyelhető egy trend, mely szerint nőkben több NKB-IR kontaktus jellemző.

A KP és az NKB kolokalizációja a GnRH neuronok afferenseiben

A hármás immunofluoreszcens metszetek számos KP-IR és NKB-IR nyúlványt tartalmaznak. A KP és NKB immunojelölés csak részleges átfedést mutat és a GnRH neuronok főleg egyes jelölt axonokkal vannak kapcsolatban, mind nőkben, mind férfiakban. A GnRH-IR sejtesteken és dendriteken megfigyelhető afferens kapcsolatok szemikvantitatív analízise kimutatta, hogy férfiakban az NKB-IR afferensek $8,8\pm 5,5\%$ -a tartalmaz KP immunoreaktivitást is. Ez az arány nőkben $31,3\pm 4,9\%$ volt. Hasonlóan az NKB szignállal kolokalizáló KP kontaktusok aránya is magasabb volt nőkben ($25,8\pm 2,4\%$), mint férfiakban ($10,2\pm 4,6\%$).

Az emberi hipotalamikus kisszeptin és neurokinin B neuronális rendszer korfüggő változásai

Az Inf-ben lévő KP-IR és NKB-IR sejtestek előfordulása

Az NKB-IR sejtestek sűrűsége szignifikánsan nagyobb a KP-IR sejtestekénél fiatal férfiakban, és ez az arány 3,7-szeres. Idős férfiakban is nagyobb az NKB-IR sejtestek sűrűsége, mint KP-IR perikarionoké, de csak 2,2-szer nagyobb.

Az öregedéssel növekedik a perikarionok száma. 2,6-szor nagyobb a KP-IR sejtestek átlagos sűrűsége idős férfiakban, mint fiatalokban. Az NKB-IR sejtestek sűrűsége is nagyobb idős emberekben, de ez a különbség csak 1,5-szörös.

Az NKB-IR neuronok sejtest mérete

Az Inf-ben az átlagos NKB-IR sejtest terület $22,1\%$ -kal nagyobb az idős férfiakban ($204,2\pm 10,6\mu\text{m}^2$), mint a fiatalokban ($167,3\pm 9,6\mu\text{m}^2$). A két korosztály közötti különbség statisztikailag szignifikáns.

Regionális KP-IR és NKB-IR nyúlvány sűrűség

Az immunojelölt nyúlványok kvantitatív analízisével az alábbi különbségeket kaptuk:

- Az NKB-IR axonok átlagos sűrűsége 6,1-szer volt nagyobb, mint a KP-IR nyúlványok sűrűsége fiatal férfiakban. Idős férfiakban magas volt az NKB-IR axonok sűrűsége is, bár csak 2,85-ször nagyobb, mint a KP-IR axonok sűrűsége.

- Az öregedéssel együtt jár a KP és NKB nyúlványok sűrűségének növekedés. A KP-IR nyúlvány sűrűsége 3,1-szer nagyobb idős férfiakban, mint fiatalokban; míg az NKB-IR axonok 1,5-szörös korfüggő növekedést mutatnak.

A KP és NKB kolokalizációja neuronális perikarionban az Inf-ben

A kettős immunofluoreszcens kísérletek kvantitatív analízise megerősítette az NKB-IR sejttetek dominanciáját a KP-IR sejttetekhez képest mind fiatal, mind idős férfiakban.

Fiatal férfiakban a KP-IR sejttetek 72,7±6,0%-a tartalmaz NKB immunoreaktivitást is. Hasonlóan, fiatal férfiakban a KP sejttetek 77,9±5,9%-a tartalmaz NKB immunojelet. Ellenkező irányban alacsonyabb az átfedés. Fiatal férfiakban az NKB-IR sejttetek csupán 35,8±5,1%-a tartalmaz KP immunoreaktivitást, a perikarionok nagyrésze egyes jelölt. Idős férfiakban a kettős jelölt NKB sejtek aránya 68,1±6,8%. Ezen korfüggő növekedés a KP-IR NKB neuronok százalékában statisztikailag szignifikáns.

A KP-IR és NKB-IR appozíciók előfordulása a GnRH-IR neuronokon

A KP és GnRH, valamint az NKB és GnRH kettős jelölt metszeteken ezüst- arany-intenzifikált Ni-DAB és DAB kromogének kombinációját használtuk. Ezen metszetek fénymikroszkópos analízise megerősítette, hogy a KP-IR és NKB-IR axonok axoszomatikus és axodendritikus kapcsolatokat létesítenek a GnRH neuronokkal az Inf-ben.

Az appozíciók kvantitatív analízisével kimutattuk, hogy az NKB-IR innerváció erősebb, mint a KP-IR beidegzés. Fiatal férfiakban a GnRH sejttetek 6-szor több NKB-IR appozíciót kapnak, mint KP-IR-et és a GnRH dendritek 6,4-szer többet. Idős férfiakban a GnRH sejttetek 5,3-szor több NKB-IR appozíciót kapnak, mint KP-IR-et és a GnRH dendritek 6,4-szer több NKB-IR bemenetet, mint KP-IR-et.

Mind a KP-IR, mind az NKB-IR kapcsolatok szignifikáns korfüggő növekedést mutatnak. A KP-IR appozíciók kvantitatív analízise kimutatta, hogy az Inf-ben a GnRH sejttetekre érkező KP-IR inputok 2,2-szer, míg a GnRH dendritekre érkező bemenetek 2-szer erősebbek idős férfiakban, mint fiatalokban. Emellett, a legalább egy KP-IR axoszomatikus appozíciót kapó GnRH neuronok százaléka megemelkedik; fiatalokban 53,7%, míg az idős férfiakban 84,9%. A legkevésbé drámai, bár szignifikáns korfüggő növekedés figyelhető meg a GnRH sejtekre érkező NKB-IR axoszomatikus appozíciók számában. Az axoszomatikus kapcsolat 2-szer, míg az axodendritikus kapcsolat 1,9-szer volt több idős férfiakban, mint fiatalokban.

A KP és NKB kolokalizációja a GnRH neuronok afferenseiben

Hármas jelölés immunfluoreszcens kísérletekben az axonális KP és NKB immunjelölés csak részleges átfedést mutatott. Mind fiatal, mind idős férfiakban a GnRH neuronokra főleg egyes jelölt axonok érkezik. A KP/NKB kolokalizáció kvantitatív analízise során kimutattuk, hogy fiatal férfiakban az NKB-IR afferensek $7,3 \pm 1,5\%$ -a KP immunoreaktív. Idős férfiakban is hasonló a kettős jelölt afferensek aránya ($9,5 \pm 3,7\%$), és nincs szignifikáns kor-hatás a kolokalizációs százalékokban. Fiatal férfiakban a KP-IR afferensek $7,9 \pm 2,8\%$ -ban figyeltünk meg NKB jelet, míg az idős férfiak KP-IR afferenseinek $11,6 \pm 4,6\%$ -ában.

Következtetések

Tézisem alapjául szolgáló tanulmányainkban új részleteket fedtünk fel a hipotalamikus GnRH neuronok peptiderg szignalizációjával kapcsolatban egerekben és emberekben.

Bebizonyítottuk, hogy 4 napos szubkután E2 kezelés szignifikánsan csökkenti a RFRP mRNS expresszióját. Ovariektomizált egerekben, az RFRP idegsejtek 20%-ában detektáltunk sejtmagi ER- α immunreaktivitást. A legtöbb RFRP neuron nem mutatott ER- α pozitivitást, ER- β immunreaktivitást pedig egyáltalán nem. Ezen új adatok növelik a lehetőségét annak, hogy az RFRP neuronok részesei annak a neuronális hálózatnak, mely közvetíti az ösztrogén hatását a GnRH idegsejtekhez.

Immunohisztokémiai analízissel teszteltük a KNDy neuron koncepció érvényességét emberben. Leírtuk az NKB-IR sejtestek és nyúlványok regionális denzitását és a GnRH neuronokkal alkotott afferens kontaktusok gyakoriságát, mely utóbbi 5-ször gyakoribb, mint a KP-IR elemek. Kettős immunofluoreszcens vizsgálatokkal megerősítettük, hogy a NKB-IR és KP-IR sejtestek és nyúlványok egy komoly hányada különálló és csak kb. 30%-a a NKB-IR, ill. 70%-a a KP-IR sejtesteknek kettős jelölt. Továbbá nagyon kevés DYN-IR sejtest tehető láthatóvá az Inf-ben. A DYN-IR nyúlványok is nagyon ritkák, és pár kivételtől eltekintve, különböznek a KP-IR nyúlványoktól. A három immunoreaktivitás hasonló előfordulást, ill. kolokalizációs arányt mutat az InfS-ben és a portális vénák körül. Ezen adatok arra utalnak, hogy a laboratóriumi állatokban megfigyelt kolokalizációs mintázat nem szükségszerűen egyezik meg az emberével. Például a fiatal férfi NKB neuronjai ritkán tartalmaznak KP immunoreaktivitást. Továbbá, a birkában és rágcsálókban leírt DYN jelenléte a KP/NKB idegsejtekben talán irreleváns emberekben. Hasonló fajok közötti különbségek miatt szükséges lenne egy új modellt, mely magyarázza a negatív visszacsatolás mechanizmusát és a GnRH pulzus generátor működését emberekben.

Immunohisztokémiai festésekkel tanulmányoztuk a KP/NKB rendszer nem-függő változásait az Inf-ben. Leírtuk, hogy a KP sejtek száma, a KP nyúlványok sűrűsége és a GnRH neuronokon található kontaktusai előfordulása sokkal magasabb idős nőkben, mint férfiakban. Az NKB sejtestek száma alig volt nagyobb nőkben és nem volt nemi különbség az NKB nyúlványok regionális denzitásában, valamint a GnRH sejteken található bemenetek számában. Az NKB sejtek, nyúlványok és GnRH neuronokra érkező bemenetek száma többszöröse volt a KP-IR elemekének férfiakban. Nőkben is több NKB bemenet jellemzi a GnRH sejteket, mint KP. Immunofluoreszcens kísérleteinkben csak részleges átfedést tudunk kimutatni a KP és NKB axonok között. Nőkben nagyobb százalékban mutattunk ki KP és NKB kolokalizációt a GnRH afferenseiben, mint férfiakban. A régóta fennálló nézettel ellentétben, miszerint az emberi hipotalamusz nem mutat jelentős nemi különbségeket, jelen adataink világosan megmutatják e két, az emberi szaporodási folyamatokban kulcsfontosságú szerepet betöltő peptiderg rendszer nemi különbségeit. További tanulmányok szükségesek ahhoz, hogy eldönthessük, mi okozza ezen különbségeket.

Végezetül megvizsgáltuk a humán KP/NKB neuronális elemek korfüggő morfológiai változásait is. Kvantitatív immunohisztokémiai kísérleteinkben kimutattuk, hogy az NKB-IR sejtestek és nyúlványok regionális sűrűsége, a GnRH neuronokkal alkotott afferens kapcsolataik száma többszöröse a KP-IR elemekének. Határozott korfüggő növekedés figyelhető meg a KP-IR sejtestek és nyúlványok regionális sűrűségében és a GnRH neuronokon megfigyelhető bemenetek számában. Az NKB-IR sejtestek, nyúlványok és GnRH neuronokkal alkotott axonális appozíciók száma is nő idősebbekben, habár kisebb mértékben. Kettős immunofluoreszcens kísérleteinkben kimutattuk, hogy a KP-IR NKB sejtestek száma fiatal férfiakban ~40%, mely ~70%-ra nő idős férfiakban. A humán KP és NKB neuronok morfológia és fehérje expressziós változásai vagy eredményei, vagy okai a későn kezdődő hipogonadizmusnak, mely gyakran előfordul középkorú férfiakban. Állatkísérletek szükségesek ahhoz, hogy el tudjuk dönteni, ezek korfüggő, elsődlegesen hipotalamikus történések hatásai, vagy a csökkentő tesztoszteron szint következményei.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Molnár C.S., Kalló I., Liposits Z., Hrabovszky E. (2011) Estradiol down-regulates RFamide related peptide (RFRP) expression in the mouse hypothalamus *Endocrinology* 152(4):1684-90
2. Hrabovszky E., Molnár C. S., Sipos M. T., Vida B., Ciofi P., Borsay B. A., Sarkadi L., Herczeg L., Bloom S. R., Ghatei M. A., Dhillo W. S., Kalló I. and Liposits Z. (2011) Sexual dimorphism of kisspeptin and neurokinin B immunoreactive neurons in the infundibular nucleus of aged men and women *Frontiers in Endocrinology* 2:80
3. Hrabovszky E., Sipos M. T., Molnár C. S., Ciofi P., Borsay B. A., Gergely P., Herczeg L., Bloom S. R., Ghatei M. A., Dhillo W. S. and Liposits Z. (2012) Low Degree of Overlap Between Kisspeptin, Neurokinin B, and Dynorphin Immunoreactivities in the Infundibular Nucleus of Young Male Human Subjects Challenges the KNDy Neuron Concept *Endocrinology* 153(10):4978-4989
4. Molnár C. S., Vida B., Sipos M. T., Ciofi P., Borsay B. A., Rácz K., Herczeg L., Bloom S. R., Ghatei M. A., Dhillo W. S., Liposits Z. and Hrabovszky E. (2012) Morphological evidence for enhanced kisspeptin and neurokinin B signaling in the infundibular nucleus of the aging man *Endocrinology* 153(11):5428-39

Egyéb közlemények

1. Kocsis Z. S., Molnár C. S., Watanabe M., Daneels G., Moechars D., Liposits Z. and Hrabovszky E. (2010) Demonstration of vesicular glutamate transporter-1 in corticotroph cells in the anterior pituitary of the rat *Neurochemistry International* 56(3):479-86
2. Dickson S. L., Hrabovszky E., Hansson C., Jerlhag E., Alvarez-Crespo M., Skibicka K. P., Molnar C. S., Liposits Z., Engel J. A., Egecioglu E. (2010) Blockade of central nicotine acetylcholine receptor signaling attenuate ghrelin-induced food intake in rodents *Neuroscience* 171(4):1180-6
3. Kalló I., Vida B., Deli L., Molnár C. S., Hrabovszky E., Caraty A., Ciofi P., Coen C. W., Liposits Z. (2012) Co-localisation of kisspeptin with galanin or neurokinin B in afferents to mouse GnRH neurones *Journal of Neuroendocrinology* 24(3):464-476
4. Hrabovszky E., Molnár C. S., Nagy R., Vida B., Borsay B. Á., Rácz K., Herczeg L., Watanabe M., Kalló I., Liposits Z. (2012) Glutamatergic and GABAergic innervation of human gonadotropin-releasing hormone-I neurons *Endocrinology* 153(6):2766-76
5. Derks N. M., Pintér O., Zuure W., Ledent C., Watanabe M., Molnár C. S., Wei Y., Roubos E. W., Wu S., Hrabovszky E., Zelena D., Kozicz T. (2012) Cannabinoid modulation of midbrain urocortin 1 neurones during acute and chronic stress *Journal of Neuroendocrinology* 24(11):1447-1461

6. Alvarez-Crespo M., Skibicka K. P., Farkas I., Molnár C. S., Egecioglu E., Hrabovszky E., Liposits Z., Dickson S. L. (2012) The amygdala as a neurobiological target for ghrelin in rats: neuroanatomical, electrophysiological and behavioral evidence PLoS One 7(10):e46321
7. Hrabovszky E., Molnár C. S., Borsay B. A., Gergely P., Herczeg L., Liposits Z. (2013) Orexinergic input to dopaminergic neurons of the human ventral tegmental area PLoS One 8(12):e83029

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Hrabovszky Eriknek, a lehetőségért, hogy doktori munkámat az ő kutatócsoportjában végezhettem. Oktatómként a Ph.D. évek során, értékes ötletekkel és praktikus tanácsokkal látott el, sokat tanultam tőle.

Hálámat szeretném kifejezni Liposits Zsolt professzor úrnak, az Endokrin Neurobiológiai Kutatócsoport vezetőjének, hogy maximális támogatása mellett fejlődhettem a tudományos kutatásban.

Hálás vagyok Bekóné Hajninak, laboratóriumunk asszisztensének, precíz munkájáért.

Külön köszönöm munkatársaimnak, Beliczai Zsuzsának, Farkas Erzsébetnek, Dr. Farkas Imrének, Juhász Andreának, Kádár Andreának és Mohácsik Petrának segítőkész tanácsaikat és a vidám hangulatot.

Szeretném megköszönni az Endokrin Neurobiológiai Kutatócsoport, a Lendület Integratív Neuroendokrinológiai Kutatócsoport és a Molekuláris Sejt Metabolizmus Laboratórium összes kollégájának tanácsaikat, tudományos észrevételeiket, technikai támogatásukat és nagyszerű társaságukat, név szerint: Bálint Flóra, Bardóczy Zsuzsanna, Barkóczy Balázs Zoltán, Csillag Veronika, Deli Levente, Egri Péter, Dr. Fekete Csaba, Dr. Füzesi Tamás, Dr. Gereben Balázs, Hársfalvi Vivien, Dr. Kalló Imre, Kiss Enikő, Kvártá-Papp Zsuzsanna, László Barna, Maruzs Veronika, Maurnyi Csilla, Molnár Tamás, Nagyunyomi-Sényi Kata, Novák Viktória, Rab Fruzsina, Sárvári Anna, Dr. Sárvári Miklós, Simon Ágnes, Sipos Máté, Skrapits Kata, Szabon Judit, Szabó Edit, Szilvássy-Szabó Anett, Tóth Mónika, Turek Márta, Dr. Vastagh Csaba, Dr. Vida Barbara, Wilhelm Tamás, Dr. Zeöld Anikó, Zséli Györgyi.

Végezetül, mindig hálás leszek nagyszerű férjemnek, szeretett családomnak és barátaimnak végtelen szeretetükért és támogatásukért.