

Záró beszámoló

Az OTKA T 43170 számú „A GABAerg és peptiderg rendszerek kölcsönhatásainak morfológiai alapjai a patkány agy lateralis septumában” című pályázatáról

A lateralis septum (LS) a hypothalamikus központok mellett számos vegetatív funkció szabályozásában szerepet játszó agyterület. Az elektrofiziológiai mérések mellett ennek egyik morfológiai bizonyítéka, hogy olyan neuropeptidok (NPY, CART, galanin, enkephalinok) vannak itt jelen nagy mennyiségben, amelyekről a hypothalamusban már kimutatták, hogy részt vesznek a táplálékfelvétel szabályozásában, továbbá jól dokumentált a két agyterület közötti szoros reciprok kapcsolat is. A pályázat fő célja az volt, hogy a fenti neuropeptidok, valamint a LS-ban szintén jelentős lokális GABAerg neuronhálózatok közötti morfológiai kapcsolatokat feltárjuk és fényt derítsünk a táplálékfelvétel körülményeinek változásai nyomán fellépő plasztikus változásokra. Az alábbi eredményeket kaptuk:

A munka első fázisaként megvizsgáltuk a normál, kontroll állatokban a fenti neuropeptidok megjelenését és megoszlását a LS rostrocaudalis tengelye mentén, 60 μm vibratom sorozatmetszeteken. Eredményeink szerint ezek eloszlása nem egyenletes és mindegyik esetben egy, az adott peptidre jellemző görbét ír le (Kovács és mts., 2005, Valcz, 2006, Thuma és Valcz, 2006). Azt is megfigyeltük, hogy az LS területén kizárólag az NPY van jelen immuncytokémiával detektálható mennyiségben neuronális sejtestekben. Ezek az NPY-pozitív sejtek gyakran az ependyma sejtek közé ágyazódva, dendritjeikkel a liquor irányában voltak láthatók, amiből ezek esetleges liquor-monitorozó funkciójára következtettünk.

A későbbiekben a kontroll állatokból vett mintákat elektronmikroszkópiára is feldolgoztuk és a négy neuropeptidet (NPY, Gal, leu-enk, CART) tartalmazó immunreaktív elemek finomszerkezetét megvizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a szinaptikus boutonok a kis agranuláris vesiculák mellett néhány dense-core vesiculát is tartalmaznak, ezek felett látható a legerősebb jelölődés, ami arra utal, hogy ezek a neuropeptidok neuromodulátor, ill. ko-transzmitter szerepet tölthetnek be más, aminosav transzmitterek mellett. Szemikvantitatív vizsgálataink szerint az NPY és CART-tartalmú boutonok szinaptikus célprofiljai többnyire dendritörzsek és dendrittüskék, míg a leu-enk és galanin-tartalmú varicosus rostok gyakran képeznek pericelluláris kosárszerű többszörös axoszomatikus szinaptikus kapcsolatokat is.

A fenti vizsgálatokkal párhuzamosan elvégeztünk néhány éheztetéses kísérletet is. Ezek egyrészt egy hetes teljes, ill. négy hetes részleges éheztetést jelentettek, másrészt figyelemmel voltunk a kísérleti állatok nemére is, mivel az egyes gonadalis hormonok is hatással lehetnek e neuropeptidok esetleges mennyiségi változásaira.

1./ Hím patkányok négy hetes részleges éheztesítésének (a napi átlagfogyasztás 60 %-a) hatása a laterális septum három neuropeptidjének mennyiségére:

Azonos korú, fiatal hím Wistar patkányok két csoportját hasonlítottuk össze: az első csoport kontrollként szerepelt, *ad libitum* normál patkány táphoz és ivóvízhez jutott, míg a másik csoport *ad libitum* vízfogyasztás mellett négy hetes részleges táplálékmevönásban részesült. Négy hét elteltével mindkét csoport állatait perfúziósan fixáltuk, majd a septális területből készített vibratom metszeteken pre-embedding immuncytokémiai módszerrel leucin-enkephalin (Leu-enk), neuropeptid Y (NPY) és galanin (gal) azonosítását végeztük el. Az immunpozitív elemek mennyiségét metszetenként számítógépes denzitometria segítségével kiértékeltük, majd a kapott adatokat összehasonlítottuk a kontroll értékekkel. Ilyen kísérleti körülmények között a leu-enk denzitása már az első hét után szintén fokozatosan csökkent, viszont az NPY és gal mennyisége az első két hét során emelkedő tendenciát mutatott, s csak a 3.-4. hétre csökkent a kontroll értékre, vagy az alá (Kovács és mts., 2005).

2./ Hím patkányok egy hetes teljes éheztesítésének hatása a laterális septum három neuropeptidjének mennyiségére:

Azonos korú, fiatal hím Wistar patkányok két csoportját hasonlítottuk össze: az első csoport kontrollként szerepelt, *ad libitum* normál patkány táphoz és ivóvízhez jutott, míg a másik csoport *ad libitum* vízfogyasztás mellett egy hetes teljes éhezésnek volt kitéve. Egy hét elteltével mindkét csoport állatait perfúziósan fixáltuk, majd a septális területből készített vibratom metszeteken pre-embedding immuncytokémiai módszerrel leucin-enkephalin (Leu-enk), neuropeptid Y (NPY) és galanin (gal) azonosítását végeztük el. Az immunpozitív elemek mennyiségét számítógépes denzitometria segítségével kiértékeltük, majd a kapott adatokat összehasonlítottuk a kontroll értékekkel. Bár az immunpozitív rostok elhelyezkedése nem, sűrűségük változott az éhezés következtében: a leu-enk és NPY denzitása a kontrollnak mintegy 3/4-ére csökkent, míg a gal -pozitív rostok denzitása több mint duplájára emelkedett. Ezek az eredmények eltérnek a 4 hetes, krónikus részleges táplálék megvönás hatásaitól ami arra enged következtetni, hogy a kétfajta éheztesítési körülmény nem egyformán hat a kérdéses neuropeptidekre.

3./ Nőstény és ovariectomizált patkányok négy hetes részleges táplálékmevönásának hatása a három neuropeptid denzitására a laterális septum területén:

Ezen vizsgálatokat fiatal ivarérett nőstény Wistar patkányokon végeztük, négy kísérleti csoportban:

az első csoport intakt nőstény *ad libitum* táplált állatokból állt,

a második csoport négy hetes 40 %-os táplálékmevönásban részesült,

a harmadik csoport ovariectomizált, *ad libitum* táplált,

míg a negyedik szintén ovariectomizált, és 40 %-os táplálékmevönású egyedeket tartalmazott.

Vizsgálatainkat itt kiegészítettük testsúlymérési adatokkal, valamint vér paraméterek (glükóz, triglicerid, szabad zsírsav, keton, koleszterin) változásainak követésével, amelyek változásai megerősítették, hogy a második és negyedik csoport egyedei valóban az éhezés állapotában voltak. A vér és agygerincvelői folyadékminták leptin szintjének meghatározását is terveztük, de az ehhez szükséges kit igen magas költségei miatt lemondunk róla. Négy héten keresztül minden csoportból 2-2 állatot dolgoztunk fel. A kísérleti anyag feldolgozási módja megegyezett az előzőekben ismertetettel (perfúziós fixálás, preembedding immuncytokémia és denzitometriás kiértékelés).

Az éhezés hatására az intakt nőstény egyedekben a leu-enk mennyisége az első hét végén a kontrollhoz képest csökkent, a második héten megnőtt, majd a negyedik hétre újra a kontroll érték alá süllyedt. Az NPY denzitása az első hét végére csökkent, de a második héttől visszaállt közel a kontrollban mért értékhez. A gal denzitása az első és második héten csökkent, a negyedik hétre viszont a kontroll érték fölé emelkedett. A peptidszintek ingadozása valószínűleg a ciklikusan változó mennyiségű gonadális hormonok hatásának tudható be.

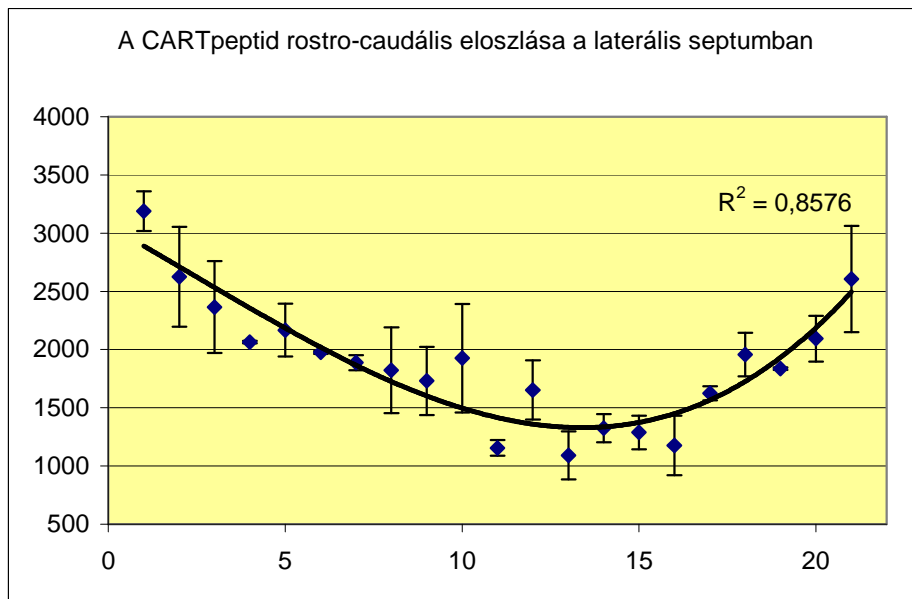
Az ovariectomizált egyedekben a leu-enk és NPY esetében a denzitás változások fő tendenciája megegyezett a hímekben tapasztaltakkal, kivéve a gal-t, ahol már az első héttől kezdve fokozatos csökkenést detektáltunk.

Megjegyzés: ezen eredmények közül eddig csak az NPY-ra vonatkozó eredmények kerültek publikálásra (Kovács és mts, 2007), mivel az első benyújtott kéziratunkat az alacsony állatszám (n=2 csoportonként) miatt nem fogadták el, és a kísérleteket folyamatosan meg kellett ismételnünk úgy, hogy végül a csoportonként 5 állatból nyert adatok statisztikailag értékelhetőek legyenek. Jelenleg e rész témában egy kézirat készülöben van, amely a galanin változásait követi nyomon.

4./ A CART-peptid és megoszlásának vizsgálata:

Az anorexigén hatású CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript), peptidet, amely a már vizsgált neuropeptidok (NPY, Gal, leu-enk) mellett szintén jelentős mennyiségben fordul elő a lateralis septumban (LS), 2005 évben kezdtük el tanulmányozni. Ez a peptid az eredeti terveinkben nem szerepelt, de ajándékként hozzájutottunk jól működő monoklonális anti-CART antitesthez (J.T. Clausen, Novo Nordisk A/S, Bagdverd, Dánia) és mivel az eddigi kutatásokhoz szorosan kapcsolódott, ezt a peptidet is az előzőekhez hasonlóan megvizsgáltuk. Felnőtt ivarérett hím patkányokon (n=4) a LS-ból készített precíz sorozatmetszeteken kombinált immuncytokémiai és denzitometriás kimutattuk, hogy e peptid rostrocaudalis megoszlása rostralistól a medialis helyzetű metszetekig fokozatosan csökken, majd onnan caudalis irányba haladva ismét megemelkedik a rostralis metszeteken mérttel kb. azonos szintre (a

függőleges tengely a pixelek számát, a vízszintes a metszetek sorszámát ábrázolja rostrocaudális sorrendben):

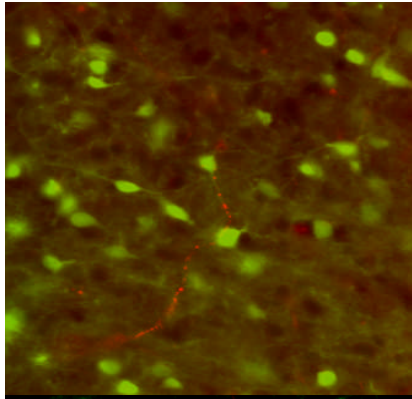


A CART-peptidre vonatkozó éheztetéses kísérletek nemrég kezdődtek el, eddig a hímek részleges táplálékmegvonását és az azt követő immuncytokémiai feldolgozást végeztük el, a denzitometriás kiértékelés folyamatban van.

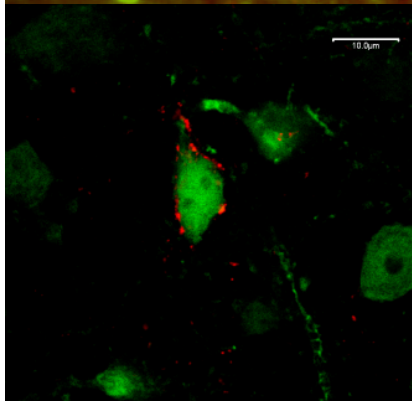
5./ A peptid-GABA interakció morfológiai alapjainak vizsgálata:

A LS GABAerg rendszerének és az orexigén/anorexigén peptiderg rendszerek kölcsönhatásának morfológiai alapjait vizsgálva választásunk azért esett a GAD-65-GFP egértörzsre, mert a GABA és a peptidok fixálása egymásnak ellentmondó: a GABA magas glutáraldehyd-tartalmú, míg a peptid-természetű anyagok csak glutáraldehyd-mentes, vagy igen alacsony glutáraldehyd-tartalmú fixálók alkalmazásával mutathatók ki, így a kolokalizáció sikeressége a pre- és posztembedding kettős immuncytokémia segítségével meglehetősen kétséges. Mivel a transzgenikus egerekben a GABAerg sejteknek egy jelentős része (amelyek a GAD-65 enzimet használják a GABA metabolizmusban) a GFP-vel eleve jelölt, a metodikai nehézségek könnyen áthidalhatók, azaz az anyag fixálható glutáraldehyd-mentes fixálóval. Másrészt az egér és patkány agy neurokémiai térképe nem sokban tér el egymástól. Ha összevetjük a preembedding immuncytokémia segítségével kapott DAB-jelölt peptiderg elemek megoszlását a megfelelő, egérben detektált immunfluoreszcens elemekével, ezek jó egyezést mutatnak. Ezúton sikerült

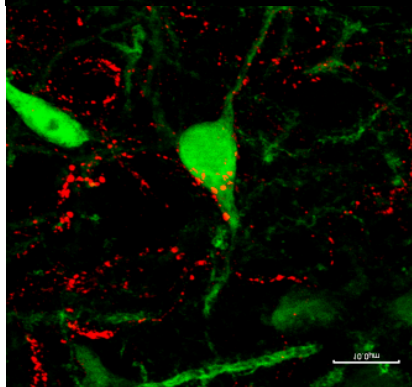
kimutatni, hogy a LS számos GAD-tartalmú, azaz gátló működésű sejtje kap peptiderg innervációt. Az NPY esetében nemcsak peptid-GABA, hanem fordított irányú kapcsolat (GABA-boutonok NPY sejten), sőt kolokalizáció (egy sejten belül mindkét marker) létezésére is fény derült.



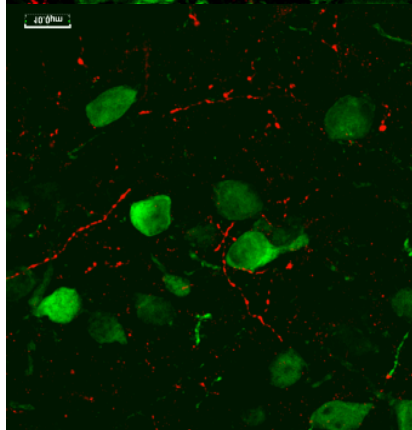
CART peptid (piros) és GAD-GFP (zöld) kapcsolata immunfluoreszcens mikroszkópban: piros boutonok a zöld sejt dendritjén



Galanin(piros) és GAD-GFP (zöld) kapcsolata konfokális mikroszkópban: piros boutonok a zöld sejt szómája körül és proximális dendritjén



Leucin-enkephalin(piros) és GAD-GFP (zöld) kapcsolata konfokális mikroszkópban: piros boutonok a zöld sejt szómája körül és proximális dendritjén



NPY(piros) és GAD-GFP (zöld) kapcsolata konfokális mikroszkópban: egy-két piros bouton a zöld sejt szómája körül

A publikáció elkészítése ebből a témából szintén folyamatban van.

6./ A GFAP immunreaktivitás változásainak vizsgálata éhezés hatására:

E témakörben csak nagyon kezdeti lépések történtek. Párhuzamosan a CART éhezés hatására történő változásaihoz, ezeket a kísérleteket is elkezdtek fiatal hím állatokban. Az első kísérleti anyag elkészült, denzitometriás kiértékelése folyamatban van.

A pályázat eredményeinek publikálása még csak nagyon kis részben történt meg. Eddig csak két publikáció jelent meg, ill. van megjelenés alatt. Eredményeinket 5 nemzetközi és 4 hazai kongresszuson mutattuk be poszterek formájában. A 2007-es évben tervezzük legalább 3, e pályázat által támogatott kézirat beadását. Továbbá nem elhanyagolható jelentőségű az sem, hogy e témából két szakdolgozat készült (Thuma Ákos állatorvos és Valcz Gábor zoológus), egy TDK dolgozat kiemelt díjat nyert és továbbjutott az OTDK-ra (Thuma-Valcz), két PhD disszertáció készül ebből az anyagból (Kovács Éva Gabriella és Janzsó Gergely) és jelenleg is 3 hallgató végzi e témakörben TDK, ill. szakdolgozati munkáját.

Budapest, 2007-02-28.

Halasy Katalin