

**Ph.D. értekezés tézisei**

**A ghrelin-indukálta oxitocin elválasztás vizsgálata *in vivo* állatmodellben**

**Dr. Ménesi Rudolf**

**Témavezető:**

**Dr. habil. Pósa Anikó**

*egyetemi docens*

**Biológia Doktori Iskola**

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM**

Természettudományi és Informatikai Kar

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék



**2020**

**Szeged**

## Rövidítések jegyzéke

**ARC:** nucleus arcuatus

**CVO:** cirkumventrikuláris szerv

**GHRP-6:** növekedési hormont felszabadító peptid-6

**GHS-R:** növekedési hormon szekretagóg receptor/ ghrelin receptor

*i.c.v.:* intracerebroventrikuláris kezelés

*i.v.:* intravénás kezelés

**NaCl:** 0,9 %-os fiziológiás sóoldat

**PVN:** nucleus paraventricularis

**SON:** nucleus supraopticus

**VMN:** nucleus ventromedialis

**VTA:** ventralis tegmentalis area

## Bevezetés

A hipotalamusz-hipofízis tengely a szervezet homeosztázisának központi szabályozója. A neurohormonok szekréciónak a fysiológiai stimuláció mellett a neuropeptidek között fellépő interakció is nagymértékben befolyásolhatja. Korábbi tanulmányok igazolták, hogy a neurohipofízisben raktározódó oxitocin felszabadulását számos aminerg és peptiderg neurotranszmitter szabályozhatja, beleértve az adrenalint és noradrenalint, dopamint, szerotonint, hisztamint és a galanint is.

Az utóbbi néhány évtized, a bél-agy tengely szerepének leírásával, új lehetőségeket nyitott a gasztroenterológiai, valamint az idegrendszeri kutatások területén. A 28 aminosavból álló ghrelin elsődleges termelődési helye a gyomor, azonban kisebb mértékben a hasnyálmirigyben, vesékben, vékonybélben és a hipotalamuszban is található hormontermelő sejteket. A ghrelin a G-fehérje kapcsolt növekedési hormon szekretagóg receptor (GHS-R) természetes ligandja, melynek expressziója centrálisan és perifériásan egyaránt igazolt. A központi idegrendszerben a legnagyobb denzitású GHS-R expresszió a nucleus arcuatusban, valamint a dorsalis vagus komplexben figyelhető meg, melyek a ghrelin táplálékfelvételben, vízfogyasztásban és a metabolikus folyamatokban betöltött szerepét közvetítik.

Az oxitocin kilenc aminosavból álló nanopeptid, mely elsősorban a hipotalamusz magnocelluláris sejtjeiben (nucleus supraopticus, SON és nucleus paraventricularis, PVN) termelődik. A magnocelluláris neuronok mellett elkülöníthetünk parvocelluláris oxitocin neuronokat is, melyek axonális terminálisai kiemelt szerepet játszanak a kardiovaszkuláris funkció, légzés, táplálkozás és a nocicepció modulációjában. A központi szabályozási köröket tekintve az oxitocin nemcsak a neurohipofízissel áll axonális kapcsolatban, hanem a nucleus arcuatus (ARC), nucleus ventromedialis (VMN), ventralis tegmentalis area (VTA), nucleus tractus solitarii (NTS), illetve a gerincvelő területeire is projektál. A centrális és perifériás szabályzó folyamatok révén az endogén oxitocin szint szoros összefüggésbe hozható a zsírsanyagcserét érintő folyamatokkal.

A ghrelin-oxitocin interakció vizsgálata hozzájárulhat a fysiológiai és neurobiológiai sajátosságok megértéséhez és elemzéséhez.

## Célkitűzések

Munkacsoportunk korábbi kutatásai a hipofízis szintjén megnyilvánuló ghrelin-oxitocin interakciót egyértelműen alátámasztják, azonban a hipotalamusz-hipofízis tengely közvetítésével megvalósuló kölcsönhatásról kevés adat áll rendelkezésünkre. Munkánk célja a ghrelin-oxitocin interakció tanulmányozása *in vivo* állatkísérletes modellben.

Tisztázni kívántuk, hogy:

- A centrálisan bejuttatott ghrelin miképpen változtatja meg a plazma oxitocin koncentrációt patkányban?
- Milyen változások figyelhetőek meg a szisztémás ghrelin kezelés következtében a plazma oxitocin szintjében?
- A [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 ghrelin receptor antagonistá alkalmazható-e a ghrelin-közvetített hatások detektálására?
- A különböző időpillanatokban alkalmazott ghrelin receptor antagonistá hogyan módosítja a ghrelin-oxitocin interakciót patkány modellben?

## Anyagok és módszerek

### *Kísérleti protokoll*

Kísérleteinkhez 180-250 gramm tömegű, 3-4 hónapos hím Wistar patkányokat (Gödöllő, Magyarország) használtunk. Az állatokat standard körülmények között (hőmérséklet, világítás, páratartalom) tartottuk, csapvizet *ad libitum* kaptak és standard granulált patkánytápot fogyasztottak.

A ghrelin-oxitocin hatásmechanizmus vizsgálatához az állatok egy csoportjánál centrális, míg a másik csoport esetében szisztémás ghrelin injektálást végeztünk.

A ghrelin centrális bejuttatásához az állatok jobb oldali laterális agykamrájába (intracerebroventrikulárisan, *i.c.v.*) agykanült helyeztünk altatásban. Egyhetes pihenőfázist követően, Hamilton fecskendő segítségével 10 µl végtérfogatban különböző dózisu (1, 10 és 100 pmol) ghrelint injektáltuk az állatok agykamrájába 1 percen keresztül. A vivőanyag kezelésben részesülő állatok 10 µl végtérfogatú fiziológiás sóoldatot (0,9 % NaCl) kaptak a jobb agykamrába.

A ghrelin receptor antagonistá hatékonyságának igazolására, 1 percen keresztül, 10 pmol dózisu [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 antagonistát injekcióztuk az állatok agykamrájába 10 µl térfogatban, 0,9 %-os fiziológiás sóoldatban oldva. A ghrelin receptor antagonistát bejuttatását önállóan, 15 perccel a 10 pmol koncentrációjú ghrelin kezelést megelőzően vagy azt követően végeztük. Az állatok terminálása után az agykanülbe 1%-os metilénkék oldatot (Reanal, Budapest, Magyarország) juttatunk, melynek segítségével ellenőriztük a kanülök pontos helyzetét.

A szisztémás vizsgálatokhoz az állatok farokvénájába 1 és 10 nmol koncentrációjú ghrelint juttattunk 200 µl végtérfogatban, míg a vivőanyaggal kezelt csoportok azonos térfogatú 0,9 % NaCl oldatot kaptak intravénásan (*i.v.*). Az antagonistá kezelés a centrális vizsgálatokhoz hasonlóan zajlott, mely során a 10 nmol koncentrációjú [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 antagonistát 200 µl térfogatban önállóan, 15 perccel a ghrelin kezelést megelőzően vagy pedig azt követően injekcióztuk az állatok farokvénájába 1 percen keresztül.

Az *i.c.v.* és az *i.v.* ghrelin-kezelt, illetve az antagonistá kezelésben részesített csoportok állataiból 30 perccel a kezelést követően plazma vérmintákat gyűjtöttünk a további oxitocin szint meghatározásához.

### ***Radioimmunassay***

A plazma oxitocin koncentrációt radioimmunassay (RIA) módszerrel határoztuk meg. Méréseinkhez szintetikus oxitocint használtunk referencia preparátumként, míg az izotópos jelölést specifikus oxitocin antitesttel végeztük. A jelzett hormon tisztítását reverz fázisú kromatográfiás módszerrel végeztük. A felülúszó hormontartalmát Amprep C8 oszlop segítségével határoztuk meg, több mint 95 %-os visszanyeréssel. Az extrahált mintákat 125 µl térfogatú RIA pufferben oldottuk, majd a RIA mérésekhez 50 µl-es duplikátumokat használtunk. A fehérje meghatározást a korábbi vizsgálataink során is alkalmazott, Lowry módszer alapján végeztük. A módszer érzékenysége 1 pg/ml, melynek intra-assay koefficiense 13,3%, inter-assay koefficiense pedig 16,3%. Az oxitocin értékeket pg/mg fehérjeként fejeztük ki.

### ***Statisztikai analízis***

Az adatokat átlag  $\pm$  S.E.M.-ként fejeztük ki. A statisztikai analízist Tukey-Kramer próba alapján többszörös összehasonlítást végeztünk, az eltéréseket  $p < 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

## Eredmények

### *A centrális (i.c.v.) ghrelin kezelés hatása a plazma oxitocin felszabadulására*

A jobb oldali laterális agykamrába juttatott 1 pmol koncentrációjú ghrelin szignifikáns növekedést eredményezett a plazma oxitocin szintjében a kontroll/intakt csoporthoz viszonyítva. A ghrelin koncentrációjának emelése (10 pmol és 100 pmol) tovább fokozta az oxitocin elválasztását, azonban a két dózis között már nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. Kísérletünkben a vivőanyaggal (NaCl) történő kezelés nem eredményezett oxitocin változást az oxitocin koncentrációban a kontroll/intakt állatokhoz viszonyítva, ezzel kizárható a vivőanyag esetleges befolyásoló hatása az oxitocin mérések tekintetében.

### *A centrális [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 antagonistá kezelés hatása a plazma oxitocin felszabadulásra*

A ghrelin-oxitocin hatásmechanizmus igazolására az állatokat 10 pmol koncentrációjú [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 antagonistával kezeltük. Az önmagában beinjektált, valamint a ghrelin kezelést megelőző antagonistá szignifikáns csökkenést eredményezett a plazma oxitocin elválasztásában a 10 pmol koncentrációjú ghrelin-kezelt csoporthoz képest. A ghrelin kezelést megelőző antagonistá beadása egyértelműen igazolja, hogy az oxitocin szint csökkenése a ghrelin moduláción keresztül érvényesül.

A ghrelin beadását követő antagonistá kezelés nem okozott változást az oxitocin szintben.

### *A szisztémás (i.v.) ghrelin kezelés hatása a plazma oxitocin felszabadulásra*

A szisztémás vizsgálatok során az állatok laterális farokvénájába 1 nmol és 10 nmol koncentrációjú ghrelint injektáltunk. Mindkét dózis esetén hasonló mértékű növekedést tapasztaltunk a plazma oxitocin szintben a kontroll/intakt csoporthoz viszonyítva. Az *i.c.v.* kezeléshez hasonlóan látható, hogy a vivőanyag (0,9 % NaCl) nem eredményezett változást az oxitocin koncentrációjában a kontroll csoporthoz képest.

***A szisztémás [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 antagonistá kezelé hatása a plazma oxitocin felszabadulásra***

Eredményeink egyértelműen szemléltetik, hogy a 10 nmol koncentrációjú ghrelin kezelésben részesülő állatok oxitocin elválasztása jelentősen magasabb volt a kontroll/intakt csoporthoz képest. Míg a 10 nmol [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 antagonistá utókezelés hatására nem tapasztaltunk változást, az önmagában, illetve megelőző kezelésként alkalmazott antagonistá szignifikáns csökkenést eredményezett a ghrelin-kezelé csoport oxitocin szintjéhez viszonyítva. A szisztémás antagonistá kezelé következtében a kontroll csoport oxitocin szintjéhez hasonló értékeket detektáltunk.



## Összefoglalás

In vivo vizsgálataink igazolják a ghrelin moduláló szerepét a hipotalamusz-hipofízis tengely által közvetített hatásokban. A központi idegrendszerbe injektált ghrelin, a lokálisan kifejeződő receptoraihoz kapcsolódva, valamint a szomszédos idegi területekre projektálva szabályozza a plazma oxitocin elválasztást. Ellentétben az *i.c.v.* kezeléssel, a szisztémásan szervezetbe juttatott ghrelinnek át kell jutnia a vér-agy gáton, hogy oxitocin-serkentő hatását kifejthesse. A ghrelin penetrálása megvalósulhat a cirkumventrikuláris szervek (CVO) fenestrált kapillárisain átdiffundálva vagy a vér-cerebrospinális folyadék barrierjén történő átjutással. Mind a vér-agy gáton, mind pedig a vér-cerebrospinális folyadékon keresztüli átlépéssel a ghrelin a nucleus paraventricularisban termelődő oxitocin elválasztás fokozására, valamint a neurohipofízis oxitocin felszabadítására képes.

A ghrelin, receptorához kapcsolódva *in vitro* sejttenyészetben és *in vivo* állatmodellben is serkenti az oxitocin elválasztást. A peptidhormonok interakciója új utakat nyithat a metabolikus folyamatok szabályozásában, mely a táplálékfelvétellel- és felhasználással kapcsolatos rendellenességek kezelésének egy potenciális célpontja.

## A közlemények csoportosítása

Ménesi Rudolf MTMT azonosító:

<https://m2.mtmt.hu/gui2/?type=authors&mode=browse&sel=10066795>

### 1. A doktori eljárás alapját képező 2 db közlemény

1. Szabó R.\*, Ménesi R.\*, Molnár H A., Szalai Z., Daruka L., Tóth G., Gardi J., Gálfi M., Börzsei D., Kupai K., Juhász A., László F A., Varga C., Pósa A.

**New Metabolic Influencer on Oxytocin Release: The Ghrelin**

*Molecules* 2019 Feb 18;24(4)

\*= megosztott elsőszerzőség

2. Pósa A., Kupai K., Ménesi R., Szalai Z., Szabó R., Pintér Z., Pálfi G., Gyöngyösi M., Berkó A., Pávó I., Varga C.

**Sexual dimorphism of cardiovascular ischemia susceptibility is mediated by heme oxygenase**

*Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:521563

### 2. Referált folyóiratban megjelent közlemények

2.1. A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények

Szabó R.\*, Ménesi R.\*, Molnár H A., Szalai Z., Daruka L., Tóth G., Gardi J., Gálfi M., Börzsei D., Kupai K., Juhász A., László F A., Varga C., Pósa A.

**New Metabolic Influencer on Oxytocin Release: The Ghrelin**

*Molecules* 2019 Feb 18;24(4)

IF: 3,060

\*= megosztott elsőszerzőség

## 2.2. Egyéb közlemények

Pósa A., Kupai K., Ménesi R., Szalai Z., Szabó R., Pintér Z., Pálfi G., Gyöngyösi M., Berkó A., Pávó I., Varga C.

### **Sexual dimorphism of cardiovascular ischemia susceptibility is mediated by heme oxygenase**

*Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:521563

IF: 4,58

Pósa A, Szabó R, Kupai K, Baráth Z, Szalai Z, Csonka A, Veszelka M, Gyöngyösi M, Radák Z, Ménesi R, Pávó I, Magyariné Berkó A, Varga C:

### ***Cardioprotective effects of voluntary exercise in a rat model: role of matrix metalloproteinase-2,***

*Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:876805., doi: 10.1155/2015/876805.

IF: 4,44

Pósa A, Szabó R, Csonka A, Veszelka M, Magyariné Berkó A, Baráth Z, Ménesi R, Pávó I, Gyöngyösi M, László F, Kupai K, Varga C:

### ***Endogenous estrogen-mediated heme oxygenase regulation in experimental menopause,***

*Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:787063., doi: 10.1155/2015/429713.

IF: 4,44

Összesített IF: 16,52