

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM**  
**EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI KAR**  
**EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA**

**Doktori Iskola vezetője:**

Prof. Dr. Bódis József

**Programvezető:**

Prof. Dr. Kovács L. Gábor

**Témavezetők:**

Prof. Dr. Figler Mária

Dr. Ábrahám Hajnalka

**A kokain- és amfetamin regulált transzkript peptid expressziójának  
életkorfüggő változásai patkányok táplálékfelvételét szabályozó agyi  
régióiban**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Armbruszt Simon



**Pécs, 2015**

## BEVEZETÉS

A táplálékfelvétel és a testtömeg gyarapodás precízen szabályozott mechanizmusok eredménye, amelyek életkorfüggő változásokat mutatnak. Fiatal egyedek pozitív energia-egyensúlya az anabolikus folyamatok dominanciáját segíti, de a kor előrehaladtával a katabolikus folyamatok kerülnek előtérbe. Középkorú rágcsálóknál testsúlygyarapodást figyeltek meg, míg idősök esetében táplálékfelvétel és következetes testtömeg csökkenés anorexiás állapothoz vezethet (Blanton és mtsai., 1998, 2001; Pétervári és mtsai., 2009, 2010, 2011). A táplálékfelvétel csökkenése multifaktoriális, melyben perifériás és centrális mechanizmusok is szerepet játszanak, többek közt a központi idegrendszeri neuronok által termelt fehérje, illetve polipeptid mediátorok által. Számos neuropeptid esetében figyeltek meg a különböző korcsoportokban változásokat mind a peptid expresszióját, mind hatását tekintve, amelyek a megváltozott táplálékfelvétel és metabolikus ráta hátterében állhatnak (Scarpace és mtsai., 2000; Teter, 2009). Egyik ilyen polipeptid a cocaine- és amfetamin által regulált trascrypt (CART) peptid, amely az idegrendszerben számos a táplálkozás szabályozásáért felelős területen expresszálódik (Koylu és mtsai., 1997, 1998). Anorexinogén hatását patkánykísérletben igazolták. a CART peptid centrális adása csökkentette a táplálékfelvételt neuropeptid-Y (NPY) stimulált patkányoknak (Kristensen és mtsai., 1998).

A legtöbb genetikai elhízás modellben egereket használnak, de spontán mutáció során patkányban is kialakulhatnak obes állattípusok. Ilyen az Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) patkány, melyben hiányzik a funkcionális cholecystokinin-1 (CCK-1) receptor egy spontán delécio miatt, amely a CCK-1 receptor génjében következett be (Takiguchi és mtsai., 1997; Yamada és mtsai., 2012).

Anatómiai és funkcionális bizonyítékai is vannak a CART és a CCK közti interakciónak. Broberger és mtsai. (1999) leírták, hogy a CART peptid kolokalizál a CCK-1 receptorokkal centrális projekciójú vagus afferens neuronokban a nucleus tractus solitarii (NTS) területén. Továbbá CART peptid negyedik agykamrába történő injektálását követően erősen lecsökken a szacharóz felvétel, és a CCK-hoz hasonlóan stimulálja a c-Fos expresszióját az NTS-ben. A nervus vagus afferens neuronjainak sejttestjében a CCK fokozza a CART peptid szintézisét és szekrécióját (De Lartigue és mtsai., 2007). Kooperatív hatást írtak le a CART peptid és a CCK között a hypothalamus magjaiban is (Maletinska és mtsai.,

2008). A CART peptid és a CCK közötti funkcionális kapcsolat miatt a CART expresszió megváltozik az OLETF patkányokban. Felnőtt (35-40 hetes), obes, diabeteses OLETF patkányokban a CART peptid expresszió szignifikánsan csökkent a nucleus accumbens (NACC) rostralis részén, a basolateralis amygdala (BLA) rostralis területén és a NTS rostromedialis részén a normál testsúlyú kontrollokhoz képest (Ábrahám és mtsai., 2009). A CART immunreaktivitás nem szignifikáns csökkenése emellett számos agyterületen megfigyelhető elhízott, diabeteses OLETF állatokban. Kérdés azonban, hogy a CART expresszió változását elsődlegesen a CCK-1 szignalizáció, vagy az obes, diabeteses fenotípus váltja-e ki idősebb korban, nyitott maradt. További kérdés, hogy vajon a CART peptid expresszió változik-e az életkor függvényében kontroll állatok esetében.

## CÉLKITŰZÉSEK

A CCK-1 receptor deficiens, hiperfágiás, obes és diabeteses OLETF patkányokban korábban megfigyelt CART peptid expresszió csökkenés (Ábrahám és mtsai, 2009) alapján felmerült a kérdés, hogy vajon a CCK-1 receptor gén mutációja és a csökkent mértékű CCK-1 receptoron keresztüli szignalizáció közvetlenül befolyásolja-e az anorexigén CART peptid expressziót, vagy a csökkent CART peptid expresszió a hiperfágia, obesitas, vagy a diabetes mellitus által kiváltott anyagcsere változás következménye.

- 1) Vizsgálni kívántuk, hogy a CCK-1 receptor hiánya hogyan befolyásolja a CART peptid expressziót fiatal, még nem elhízott és nem diabeteses OLETF állatokban. Ezért a CART peptid immunreakciót a táplálkozás szabályozásért felelős központi idegrendszeri területeken összehasonlítottuk fiatal, nem obes, nem diabeteses OLETF és azonos korú kontroll állatokban. Eredményeinket összevetettük az idősebb (35-40 hetes), hiperfág és diabeteses OLETF állatokban megfigyelt változásokkal. A longitudinális követés célja az volt, hogy okozati összefüggést keressünk a megváltozott CART szignalizáció és az elhízás kialakulása között.
- 2) Nem ismert, hogy a CART peptid expressziójának változása a NACC területén szerepet játszik-e az időskori anorexia kialakulásában. Ennek érdekében idős, egészséges patkányokban vizsgáltuk a CART peptid immunreaktivitás eloszlását és intenzitásának

mértékét a NACC területén. Az eredményeket a fiatal és középkorú, egészséges, hím és nőstény patkányokban kapott eredményekhez hasonlítottuk.

## **ANYAG ÉS MÓDSZER**

### **Kísérleti állatok**

#### **1. *CART* peptid expressziójának vizsgálata a *CCK-1* receptor deficiens patkányokban**

Vizsgálataink során fiatal ( $6,5 \pm 1$  hetes) hím OLETF ( $n=3$ ) és azonos korú LETO kontroll ( $n=3$ ) patkányokat használtunk (testtömeg:  $202,5 \pm 74,25$  g). Az állatok a „Tokushima Research Institute, Otsuka Pharmaceutical, Tokushima, Japan” ajándékai voltak, és a Pennsylvania State University Milton Hershey Orvostudományi Központjának állatházában kerültek elhelyezésre. Az állatok 12:12h világos-sötét ciklusban éltek, és *ad libitum* fogyasztottak csapvizet és patkány-tápot (Teklad 2018).

#### **2. *A CART* peptid expressziójának életkor-függő vizsgálata a NACC-ben**

Ehhez a vizsgálathoz fiatal felnőtt hím (4 hónapos,  $324 \pm 20,22$  g,  $n=4$ ), fiatal felnőtt nőstény (7 hónapos,  $220 \pm 16,01$  g,  $n=3$ ), középkorú nőstény (15 hónapos,  $232 \pm 9,12$  g,  $n=3$ ), idős hím (25-32 hónapos,  $426,6 \pm 24,94$  g,  $n=4$ ), és idős nőstény (26-30 hónapos,  $271,6 \pm 17,44$ g,  $n=3$ ) Long-Evans patkányokat használtunk, amelyeket a Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium állatházában tartottunk a PTE ÁOK Központi Épületében. A 12:12h világos-sötét ciklusban tartott patkányok *ad libitum* fogyaszthattak csapvizet és patkány-tápot. A perfúziót megelőzően az elfogyasztott táplálék mennyiségét 1 hónapon keresztül mértük.

Mindkét kísérletben az állatokat a „National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH Publications No. 80-2959, 2002) irányelvének, és a 2010/63/EU Európai Uniósi direktívának megfelelően kezeltük, a Pennsylvania State University és a PTE ÁOK Állatetikai Bizottságának jóváhagyása mellett.

## **Orális glükóz tolerancia teszt**

Mivel a CART peptid expresszió összefüggésbe hozható a stresszválással is (Gozen és mtsai., 2007; Hunter és mtsai., 2007; Xu és mtsai., 2010), a vérvétel okozta stresszhatás elkerülése végett az OGTT-t, a jelen vizsgálatban használt állatokkal azonos korú és nemű egyedeken végeztük el az alábbi módon: 16 órás éheztetést követően egy vércukorszint mérés és 2 g/kg-os glükóz terhelés következett gyomorszondán keresztül, majd ezt követően 30, 60, 90 és 120 perces vércukorszint mérés történt standard glucometer segítségével (LifeScan, One-Touch Basic). Azon állatok számítottak diabetesesnek, melyeknek a plazmából mért glükóz csúcserőke elérte a 300 mg/dl vagy 16,66 mmol/l-t, és a 120 perces érték meghaladta a 200 mg/dl vagy 11,11 mmol/l értéket (Kawano és mtsai., 1992).

## **Immunhisztokémia**

Mivel a CART peptid szintje a plazmában és az agyszövetekben diurnális változásokat mutat (Vicentic et al., 2004), az állatokat - anesztéziát követően - mindig délután ugyanabban az időben (14 és 16h között) perfundáltuk. A transzkardiális perfúziót 0,1 M foszfát-puffer (PB, pH 7,4) oldattal, majd 4%-os paraform-aldehiddel végeztük el. Az agyat eltávolítottuk a koponyából, majd utófixáltuk 4 °C-on, egy éjszakán át a perfúzióhoz használt fixálószerrel. A fixálás után a mintákból vibratome segítségével 60 µm-es úsztatott metszeteket készítettünk immunhisztokémiai eljárás céljára. A metszeteket előkészítésük után primer anti-CART (55-102) (Phoenix Pharmaceuticals) antitesttel inkubáltuk, 1:10000-es hígításban egy éjszakán át szobahőmérsékleten, folyamatos rázás mellett. Ezt követően biotinilált másodlagos antitesttel (1:100, Vector Laboratories, Burlingame, CA) inkubáltuk 4 órán át szobahőmérsékleten, majd az avidin-biotin peroxidáz komplexszel (1:50, Vector Laboratories, Burlingame, CA) végeztünk 2 órás inkubációt szobahőmérsékleten. Ezután a peroxidáz szubsztrát hidrogén-peroxid és 3,3'-diaminobenzidin (DAB, Sigma-Aldrich) kromogén jelenlétében az immunreakciót láthatóvá tettük. A metszeteket tárgylemezre húztuk fel, levegőn szárítottuk, emelkedő koncentrációjú etil-alkohol oldattal dehidratáltuk, végül xilollal derítettük és Eukitt-tel (Fluka) lefedtük őket.

## **CART peptid immunreaktivitás intenzitásának kvantifikálása**

A metszetek a Pécsi Tudományegyetem Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumában kerültek kiértékelésre. A táplálékfelvétel, jutalmazás és stresszel összefüggésbe hozható agyi területekről digitális fényképet készítettünk Olympus BX51 mikroszkóp segítségével. A Paxinos&Watson által a patkány agyról készített anatómiai atlasz alapján határoztuk meg az egyes magok és agyi területek határait. Ezek a fiatal OLETF és LETO állatok esetében a következők voltak: a NACC rostralis területe; az amygdala medialis, centralis és basolateralis magjai; és a medialis és lateralis NTS rostralis területe. A kvantifikációhoz fekete-fehér felvételeket használtunk, melyeket az AnalySIS (Olympus Corporation) szoftverrel értékeltük ki. Emellett, az idős állatokban található CART immunreaktivitás mérésére a nyílt forráskódú, Java-ban írt program, a National Institutes of Health, USA támogatásával létrehozott ImageJ szoftvert is használtuk. Az eredmények validálása érdekében, a kétféle programmal mért értékeket összehasonlítottuk egymással. Miután meggyőződünk a megbízhatóságukról, a továbbiakban NACC-ben mérhető CART-immunreaktivitását az ImageJ szoftverrel határoztuk meg.

Minden állatban antero-posterior irányba haladva az összes vizsgálni kívánt területről szürke szín intenzitás-méréseket végeztünk. Mivel a CART peptidet a szinaptikus terminálisok is tartalmazzák, a mérések során háttérként az azonos metszetben található, meghatározott területen jól elkülöníthető fehér állományban mért intenzitást használtuk fel. Mindkét szoftver a kijelölt célterületeken található pixelekből vett minták színéhez numerikus értékeket párosít, ezt „intenzitás”-nak neveztük. Az eredményekben említésre kerülő „szürke szín intenzitást” vagy „az immunreakció intenzitását” az adott területen mért átlagos szürke szín intenzitás és a háttér szürke szín intenzitásának különbsége adta. Minden mérést a LETO és OLETF patkányok esetében azonos megvilágítottság mellett és azonos nagyítású objektívvel (20x) készült felvételek alapján végeztünk el.

## **Statisztika**

Az immunreakció intenzitásának meghatározását követően statisztikai szignifikanciát mértünk kétmintás Student t-próba módszerrel, amelyet post-hoc analízissel egészítettünk ki. Az alkalmazott elemszám figyelembevételével azt is számításba vettük, hogy az adatsorunk

esetleg ferde eloszlást mutat, emiatt nem-paraméteres Mann-Whitney U tesztet is végeztünk, amely kevésbé érzékeny az extrém szélsőértékekre. Kiegészítésképpen egyszempontos varianciánalízist (ANOVA) hajtottunk végre a CART-immundenzítások átlagainak összehasonlítására. A statisztikai próbákat SPSS V22.0 for Windows szoftver segítségével végeztük el. Minden adat esetében meghatároztuk a szórást, a standard hibát; statisztikailag szignifikáns eredménynek azt fogadtuk el, ahol  $p < 0,05$ .

## **EREDMÉNYEK**

### **1. Fiatal LETO és OLETF patkányok vizsgálata**

#### ***Orális glükóz tolerancia teszt eredményei a fiatal LETO és OLETF állatokban***

Az OGTT értékei a cukorterhelés előtti 0. percben  $90 \pm 2,00$  mg/dl és  $89 \pm 3,05$  mg/dl voltak a LETO, illetve OLETF állatokban. A fiatal LETO és OLETF patkányok terhelést követő vércukorszint értékeiben nem volt kimutatható szignifikáns eltérés és sem a diabetes, sem a pre-diabetes kritériumát nem teljesítette egyik megvizsgált csoport sem.

#### **A CART peptid immunreaktivitás**

A perikaryon és a dendritek mellett a CART peptid az axonokban és az axon terminálisokban is megtalálható (Smith és mtsai., 1997), emiatt az immunhisztokémia a CART expresszió mértékét az axon kötegekben és különálló rostokban is kimutatja. Vizsgálatainkban CART-pozitív idegsejttesteket és rostokat tartalmazó agyi régiókat tanulmányoztunk fiatal, nem obes, nem diabeteses OLETF patkányokban és az eredményeket összevetettük azonos korú LETO kontrollokkal.

#### ***CART peptid immunreaktivitás az előagy területén fiatal LETO és OLETF állatokban***

Az előagyban mind a LETO, mind az OLETF állatokban a CART immunreaktivitás hasonló volt ahhoz, amit korábbi vizsgálatokban leírtak (Koylu és mtsai., 1997, 1998; Seress és mtsai., 2004; Ábrahám és mtsai., 2009; Janzsó és mtsai., 2010).

A CART peptid immunreaktív neuronok eloszlása a bulbus olfactorius és a piriformis cortex területén hasonló volt a LETO és az OLETF patkányokban. Erős CART immunreaktivitást találtunk az NACC rostralis és a caudalis részén a fiatal LETO és OLETF patkányokban, szemmel látható különbség nélkül. A nucleus caudatus, putamen, globus pallidus és a claustrum számos CART-immunpozitív neuront és axont tartalmaz, az OLETF és LETO állatokban megfigyelhető különbség nélkül. A medialis és a lateralis septum is hasonló CART-immunreaktív idegrost-hálózatot tartalmazott mindkét patkánytörzsben, mint amit korábban leírtak. Erős immunreakciót figyeltünk meg a hypothalamus-ban a paraventricularis-, periventricularis- és arcuatus magokban a LETO és az OLETF patkányokban. A korábban leírtakkal megegyező módon találtunk CART-immunpozitív sejteket és rostokat a paraventricularis mag magno- és parvicelluláris magjában. Az eminentia mediana területén nagyon intenzív CART immunreaktivitás volt megfigyelhető mindkét törzsben. A perifornicalis magban és a hypothalamus dorsomedialis részén a LETO és az OLETF patkányokban is nagyméretű és erősen CART-pozitív neuronokat találtunk.

Az amygdala-ban a CART-pozitív elemek és a kromogén intenzitás a különböző magokban hasonló volt az OLETF és a LETO patkányokban. A medialis, centralis és posterior helyzetű amygdala magokban CART-pozitív rostokat, míg a basolateralis, centralis és corticalis magokban immunreaktív neuronokat és rostokat is találtunk.

Az archicorticalis és neocorticalis területeken a CART-immunreaktív neuronok és axonok elhelyezkedése azonos volt a korábban leírtakkal (Seress és mtsai., 2004; Ábrahám és mtsai., 2007, 2009).

### ***CART peptid immunreaktivitás a középagy területén fiatal LETO és OLETF állatokban***

Nagyszámú és erősen CART-pozitív neuronok találhatóak az Edinger-Westphal magban mindkét törzsben. A periaqueductalis szürkeállományban több, míg a VTA-ban kevesebb CART-immunreaktív rostot találtunk a fiatal OLETF és LETO állatokban. A CART-immunreaktív sejtek és rostok eloszlása hasonló volt a két vizsgált törzsben, ezekben a régiókban is.



### ***CART peptid immunreaktivitás az utóagy területén fiatal LETO és OLETF állatokban***

Mind a dorsalis, mind a ventralis nucleus parabrachialis tartalmazott CART-pozitív rostokat, de a dorsalis területen nagyobb számban voltak megfigyelhetőek az immunreaktív idegrostok a fiatal állatokban. A Kolliker-Fuse mag mindkét törzsben tartalmazott CART-immunpozitív neuronokat. A CART-pozitív elemek eloszlásában és intenzitásában nem volt kimutatható különbség a két törzs között.

A nyúltvelőben a nucleus tractus solitarius (NTS) nagyszámú CART-immunreaktív rostot tartalmazott. Emellett a NTS rostrális területén medialisan egy-egy CART-immunreaktív idegsejt is látható. A CART immunreaktivitás intenzitása az NTS rostralis és caudalis területén medialisan erősebb, mint lateralisan.

### ***CART peptid immunreaktivitásának kvantifikálása fiatal LETO és OLETF állatokban***

A CART immunfestődés mértékének kvantifikálását azokon a területeken végeztük el a fiatal, nem obes, nem diabeteses OLETF és LETO patkányokban, ahol korábban Ábrahám és mtsai. (2009) szignifikáns különbségeket mértek az idősebb (35-40 hetes), elhízott és diabeteses OLETF és a kontrollként használt LETO állatok között. Munkánk során megmértük a CART-immunreakció intenzitását a NACC rostralis területén; az amygdala medialis, centralis és basolateralis magjaiban; és a medialis és lateralis NTS rostralis részén. Emellett megmértük az immunjelölődés intenzitásának mértékét a hypothalamus periventricularis zónájában és az Edinger-Westphal mag területén, mely áréak a stresszválasz szabályozásában vesznek részt; noha utóbbiról feltételezik, hogy a táplálékfelvétel és a jutalmazási funkciókban is szerepet játszhat (Weitemier és Ryabinin, 2005; Giardino és mtsai., 2011).

Nem találtunk szignifikáns különbséget a CART-immunreaktivitás intenzitásában a NACC-ben sem a fiatal, nem diabeteses, nem obes OLETF patkányokban, sem az azonos korú LETO kontrollokban. A CART immunreakció intenzitása megnőtt ugyan a NACC rostralis részén OLETF ( $78,07 \pm 17,54$ ) patkányokban, de a különbség nem volt szignifikáns ( $p = 0,14$ ) a LETO ( $49,48 \pm 1,7$ ) kontrollokhoz képest.

Az immunreaktivitás intenzitását megmértük a basolateralis (LETO:  $44,22 \pm 10,1$ ; OLETF:  $50,78 \pm 9,60$ ), centralis (LETO:  $77,45 \pm 17,77$ ; OLETF:  $78,55 \pm 14,84$ ), és a

medialis (LETO:  $61,08 \pm 14,01$ ; OLETF:  $66,79 \pm 12,62$ ) amygdala magokban is, de nem találtunk szignifikáns eltérést az OLETF és fiatal LETO patkányokban.

A hypothalamus periventricularis zónájában is végeztünk mérést, és a mérési eredmények hasonló CART immunreaktivitást mutattak mindkét törzsből (OLETF:  $113,24 \pm 34,58$ ; LETO:  $124,6 \pm 26,15$ ), szignifikáns különbség nélkül ( $p = 0,056$ ).

A mérhető intenzitás az Edinger-Westphal magban valamivel magasabb volt az OLETF ( $93,27 \pm 21,69$ ) patkányokban, mint a LETO ( $70,96 \pm 27,15$ ) kontrollokban, de a különbség nem érte el a szignifikancia szintet ( $p = 0,056$ ).

Az intenzitás mind a lateralis, mind a medialis rostrális NTS-ben magasabb volt az OLETF állatokban (medialis:  $97,41 \pm 8,57$ ; lateralis:  $59,06 \pm 3,81$ ), mint a LETO kontrollokban (medialis:  $66,73 \pm 9,00$ ; lateralis:  $39,21 \pm 5,26$ ), de szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni (medialis:  $p = 0,11$ ; lateralis:  $p = 0,12$ ).

## **2. Fiatal és idős Long-Evans patkányok vizsgálata**

### ***Az állatok táplálékfogyasztása***

A perfúziót megelőző egy hónapon keresztül tartó napi táplálékfogyasztás mérése során nem találtunk szignifikáns eltérést a fiatal és az idős Long-Evans patkányok között. A fiatal hím állatok  $20,89 \pm 1,69$  gramm tápot ettek naponta, míg az idősek  $21,35 \pm 3,88$  grammot.

A nőtény állatok kevesebb tápot fogyasztottak a hímeknél, és a fiatal nőtények többet ettek ( $18,73 \pm 6,02$  g / nap) mint az idősebb nőtények ( $16,36 \pm 1,52$  g / nap), de a különbség nem volt szignifikáns.

A 100 g testtömegre vetített napi táp fogyasztás esetében szignifikáns ( $p < 0,005$ ) életkor-függő változás volt észlelhető a hím és a nőtény csoportban is. A fiatal hím állatok ( $6,44 \pm 0,52$  g / 100 g testtömeg / nap) többet ettek az időseknél ( $5,00 \pm 0,90$  g / 100 g testtömeg / nap), hasonlóan a fiatal ( $8,51 \pm 2,81$  g / 100 g testtömeg / nap) és idős nőtényekhez ( $6,02 \pm 0,52$  g / 100 g testtömeg / nap).

### ***CART peptid immunreaktivitás a nucleus accumbensben***

A NACC-ben mind a fiatal, a középkorú és öreg patkányokban, a CART-immunreaktív sejtek és axonok eloszlása megegyező volt a korábban publikált vizsgálatokban megfigyeltekkel (Koylu és mtsai., 1997, 1998; Ábrahám és mtsai., 2009; Janzsó és mtsai., 2010). A NACC rostralis és caudalis részén is erősen CART-immunpozitív neuronok és rostok találhatóak mindkét korcsoportban. Összehasonlítva a CART immunreaktivitás eloszlását és intenzitását fénymikroszkópban, nem találtunk látható korfüggő elváltozásokat.

### ***CART peptid immunreaktivitásának kvantifikálása a nucleus accumbens-ben fiatal és idős állatokban***

A CART immunreaktivitás fiatal, középkorú és idős állatokban történő összehasonlíthatóság érdekében az immunreakció mértékét szoftveres denzitometria segítségével értékeltük ki a NACC-ben, fekete-fehér felvételeken. A kvantifikálásra használt módszer validálása érdekében két különböző szoftvert használtunk: az ImageJ-t - amely egy nyílt forráskódú program -, és az AnalySYS-t. A szürke-szín intenzitás értékekben a két kiértékelő program között nem találtunk szignifikáns különbségeket.

A CART immunfestett metszeteken nem találtunk szignifikáns életkor-függő intenzitásbeli különbségeket a fiatal és az idős patkányok között. A CART-immunreakció a NACC-ben 4 hónapos patkányokban ( $21,60 \pm 7,07$ ), és 25-32 hónapos patkányokban ( $22,27 \pm 3,81$ ), az ImageJ szoftverrel mérve, azonos értékeket adott. Ezzel a programmal a legmagasabb intenzitás érték  $33,76$  volt a fiatalokban és  $24,38$  az idős állatokban,  $16,60$  illetve  $17,67$ -es minimum értékek mellett. Az ImageJ programhoz hasonlóan az AnalySYS szoftver segítségével sem találtunk jelentős különbséget a CART immunreakció mértékében a fiatal ( $57,04 \pm 5,80$ ) és az idős ( $62,36 \pm 4,17$ ) vizsgált egyedek között. A legmagasabb érték  $61,23$  és  $63,19$  voltak a fiatal illetve az idős állatokban,  $36,86$  (fiatal) és  $53,27$ -es (idős) minimum értékek mellett.

A két szoftver tekintetében megállapítható, hogy az ImageJ magasabb szórás értéket produkál, de statisztikailag értékelve ugyanolyan végeredményt ad az immunfestés intenzitásának mértékéről. Az abszolút értékekben megfigyelhető eltérés oka a két szoftver eltérő programozása és kalibrációs metódusa, amelyet a pixelek intenzitásának meghatározására használnak.

A CART peptid immunreaktivitás vizsgálatokor nem találtunk az idős csoporton belüli (25-32 hónapos) egyedek között sem korfüggő különbséget.

Ezt követően összehasonlítottuk a CART immunreakció mértékét a hím (25-32 hónapos) és nőstény (26-30 hónapos) idős csoportok között az ImageJ szoftver segítségével. Nem találtunk szignifikáns különbséget az intenzitások között a NACC-ben az idős hím ( $22,2 \pm 3,81$ ) és a nőstény ( $19,4 \pm 1,73$ ) patkányok között, amely alapján feltételezhető, hogy nincs nemek közötti különbség a CART expresszióban idős patkányokban.

Szintén összehasonlítottuk a fiatal hímek ( $21,6 \pm 7,02$ ) és nőstények ( $20,0 \pm 6,32$ ) értékeit, ebben sem találtunk szignifikáns különbséget. Végül összehasonlítottuk a fiatal ( $20,0 \pm 6,32$ ), középkorú ( $27,02 \pm 7,29$ ) és idős ( $19,4 \pm 1,73$ ) nőstények denzitometriás eredményeit, és nem találtunk korfüggő, statisztikailag szignifikáns különbséget.

## **EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE**

### **A CART peptid expresszió OLETF patkányokban**

2009-ben Ábrahám és mtsai. CART expresszió változást írtak le a természetes mutáns, CCK-1 deficiens patkány törzsben: a NACC rostralis köpeny zónájában - és annak medialis pólusában - szignifikáns CART-immunreaktivitás csökkenést mértek CCK-1 receptor deficiens, elhízott, diabeteses 35-40 hetes OLETF patkányokban. Továbbá CART peptid immunpozitivitás csökkenést találtak a basolateralis amygdala-ban, és a NTS rostro-medialis részében. Mivel a NTS fogadja az emésztőrendszer felől a mechanoreceptív és kemoreceptív információkat, a megfigyelt CART expresszióbeli eltérés alapján feltételezhető, hogy ezekben az állatokban esetleg a viszceroszenzoros információk integrációjának zavara vezethet a hiperfágiához.

Jelen vizsgálatban arra kerestük a választ, hogy vajon a CCK-1 receptor hiánya az életkor, vagy esetleg a megváltozott anyagcsere állapot által vezet a fenti -az obes és diabeteses, 35-40 hetes OLETF patkányokban megfigyelhető - CART expresszió eltérésekhez. A CART peptid immunreaktivitás intenzitását fiatal ( $6,5 \pm 1$  hetes), nem obes, nem diabeteses OLETF állatokban azokban az agyi régiókban mértük, ahol a középkorú,

megváltozott anyagcserével rendelkező, elhízott és diabeteses állatokban eltérés volt tapasztalható.

Vizsgálatunk során azt találtuk, hogy  $6,5 \pm 1$  hetes korban a CART peptid immunreaktív neuronok és axonjaik eloszlása az OLETF patkányokban hasonló volt az azonos korú sovány LETO kontrollokhoz képest, és ahhoz, amit korábban a Sprague-Dawley illetve Long-Evans patkánytörzsben megfigyeltek (Koylu és mtsai., 1997, 1998; Seress és mtsai., 2004). Szemmel látható eltérés a CART peptid immunreaktivitásában nem volt észlelhető a táplálkozás-szabályozásért, a stresszért, a tanulásért és a memóriáért felelős agyi területeken. Ellentétben azzal, amit az elhízott, diabeteses és idősebb (35-40 hetes) állatoknál megfigyeltek, nevezetesen, hogy a CART peptid expresszió több agyi területen csökkent az azonos korú kontrollokhoz képest (Ábrahám és mtsai., 2009), a fiatal nem obes és nem diabeteses OLETF patkányokban a CART peptid expresszió szignifikánsan nem különbözött ezeken a területeken attól, amit az azonos korú kontrollban mértünk. A NTS-ben, a basolateralis amygdala-ban és a NACC-ben  $6,5 \pm 1$  hetes korban az OLETF és a kontroll LETO patkányokban hasonló CART immunreaktivitás volt megfigyelhető. Érdekes különbség, hogy míg idősebb (35-40 hetes), obes és diabeteses OLETF állatokban a CART peptid expresszió mértéke ezeken a területeken alacsonyabb volt, mint a kontrollokban, addig fiatalabb OLETF patkányokban a CART peptid immunreaktivitás intenzitása az azonos korú kontroll állatokkal összehasonlítva enyhén magasabb volt, szignifikáns különbség nélkül. Ez arra utal, hogy a fenti régiókban, diabetesben és obesitásban megfigyelhető csökkent CART anorexigén peptid expresszió még nem jelentkezik abban a korban, amikor az OLETF állatok testsúlya még nem különbözik a kontrollokétól és még nem alakul ki diabetes mellitus. Mindez arra is utal, hogy a fiatal korban megfigyelhető hiperfágia nem a csökkent CART expresszió következménye. Ellenkezőleg, a fiatal nem obes OLETF állatokban megfigyelhető emelkedett CART expresszió, egy a hiperfágiát kontrollálni próbáló kompenzatórikus reakció lehet. Megállapítható továbbá, hogy a CCK-1 receptoron keresztül ható jelátviteli ágensek nem befolyásolják a CART peptid kifejeződését és megoszlását a magzati fejlődés és a postnatalis érés során.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a CART peptid expresszióját nem szabályozza közvetlenül a CCK-1 receptoron keresztül ható CCK. Feltételezhető, hogy a megváltozott CART peptid expresszióért obes és diabeteses állatokban nem direkt módon felelős a CCK-1 receptor mutációja. Valószínűleg egyéb, az elhízással és/vagy a diabétesszel

összefüggésben álló faktorok, mint pl. megváltozott leptin szignalizáció, megváltozott anyagcsere, tehetők felelőssé az OLETF patkány törzsben.

Mindezek mellett elméletileg a hiperfágia szintén lehetne oka a megváltozott CART expresszióknak az OLETF, diabeteses patkányokban. Ennek ellentmond ugyan, hogy születés után az OLETF patkányok a LETO kontrollokhoz képest több tejet fogyasztanak, testtömegbeli különbség kialakulása nélkül 6 hetes korig (Schroeder és mtsai., 2007; Moran és mtsai., 2008). Ez a 6 hetes kor egybevág az általunk is használt állatok korával ( $6,5 \pm 1$  hét). Ebben a korban a CCK-1 receptor deficiens állatokban csak enyhe, de nem szignifikáns CART peptid expresszió emelkedést láttunk az azonos korú kontroll állatokhoz képest. Ezzel szemben idősebb, obes és diabeteses OLETF-ekben a CART peptid expresszió szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az idősebb kontrollokban. Ezek alapján az feltételezhető, hogy a hiperfágia direktén nem változtatja meg az NACC-ben, amygdala-ban és az NTS-ben a CART expressziót. Feltételezzük, hogy a kis mértékben emelkedett CART peptid expresszió egy kompenzatórikus mechanizmus része lehet, válaszul az emelkedett táplálékbevitelre. Rágcsálókban a táplálékbevitel megszorítása gyors és dinamikus CART expresszió változást és CART szignalizáció csökkenést eredményez, ami a CART peptidet termelő sejtek energia homeosztázisban betöltött szerepére utal (Robson és mtsai., 2002; Higuchi és mtsai., 2008; Dandekar és mtsai., 2012). Megemlítenéd, hogy hasonló kompenzatórikus mechanizmust a hiperfágia esetén még sosem írtak le.

A fiatal ( $6,5 \pm 1$  hét) nem diabeteses és az idős (35-40 hét) diabeteses állatokban a táplálékfelvétel szabályozásáért felelős agyi régiókban megfigyelhető CART peptid immunreaktivitásban megjelenő különbség másik feltételezett oka az elhízás. Ismert, hogy a csökkent CART expresszió bizonyítottan elhízáshoz vezet (Asnicar és mtsai., 2001; Boone és mtsai., 2008; Del Giudice és mtsai., 2001; Guerardel és mtsai., 2005), és más CART-független elhízott állatmodellekben szintén csökkent CART expressziót írtak le (Kristensen és mtsai., 1998; Tian és mtsai., 2004; Schulz és mtsai., 2012). Ez alapján a CART peptid immunreaktivitás intenzitásának csökkenése oka, és következménye is lehet az obesitásnak. Mivel a mi OLETF-LETO állatmodellünkben a hiperfágia már jelen volt miközben a CART expresszió nem változott, arra következtetünk, hogy a CART peptid expresszió csökkenés az obes, diabeteses, CCK-1 receptor deficiens OLETF patkányokban nem oka, hanem következménye az elhízásnak.

A fentiektől függetlenül természetesen feltételezhető, hogy a fiatal, nem diabeteses ( $6,5 \pm 1$  hetes) és az idősebb (35-40 hetes), elhízott és diabeteses állatok között a CART peptid expressziójában a táplálékfelvételt szabályozó agyi régiókban megfigyelhető különbség az életkor előrehaladtával alakul ki.

### **A CART peptid expresszió életkorfüggő változása a nucleus accumbens-ben**

Annak érdekében, hogy az életkor által okozott CART peptid expresszió változást igazoljuk, vagy kizárjuk, különböző korú kontroll állatokban összehasonlítottuk a CART peptid expresszióját a NACC-ban. Ez az a terület ugyanis, ahol az egyik legmarkánsabb különbség figyelhető meg az OLETF törzsben, ha a fiatal ( $6,5 \pm 1$  hetes) és az idősebb, diabeteses (35-40 hét) állatokban, valamint az azonos korú kontrollokban mért CART-immunreaktivitás intenzitást vesszük figyelembe.

A vizsgálathoz használt fiatal (4-7 hónapos), középkorú felnőtt (15 hónapos) és idős (25-32 hónapos) hím és nőstény állatok esetében a 100 gramm testtömegre számított napi táplálékbevitel szignifikáns eltérést mutatott. Mind a hím, mind a nőstény idős (25-32 hónapos) patkányok szignifikánsan kevesebb tápot fogyasztottak, mint a fiatalabb (4-7 hetes) állatok. A felvett táplálék mennyiségének időskori csökkenése ellenére a NACC-ben CART peptid immunreaktivitás nem különbözött fiatal és idős korban, sem hím, sem nőstény állatokban és ezekben az állatokban talált CART peptid expresszió megegyezett az középkorú (15 hónapos) állatokban találttal.

Ebből arra következtetünk, hogy a CART peptid mennyisége a NACC-ben, normál testalkatú és egészséges patkányokban stabil értéket vesz fel és nem mutat az életkortól függő ingadozásokat.

A NACC-ben a CART-immunreaktív sejteket számos dopaminerg axonterminális innerválja, ami egy másik, a táplálkozás szabályozásért felelős régió területéről, a VTA-ból érkezik. Az idős állatok NACC-ében megfigyelhető dopamin szignalizációt tekintve fontos, hogy csökkent receptorkötődés és alacsonyabb bazális extracelluláris dopamin felszabadulás van jelen, amely arra utal, hogy a VTA-ban kialakulhat életkor függő változás (Diao és mtsai., 1997). Mivel a dopamin receptor agonisták csökkentik a NACC-ban a CART mRNS átírását

(Hunter és mtsai., 2006), az idős állatokban megfigyelhető csökkent dopamin szignál logikusan növelné a CART expressziót. A CART-dopamin interakció tekintetében azonban egy homeosztatisz funkció is szerepet kap a NACC-ban, ami alapján, abban az esetben, ha a dopamin szignalizáció erősödne, a CART peptid felszabadul, mintegy mérsékelve a dopamin reakciót (Hubert és mtsai., 2008). A dopamin-CART szignalizáció egyensúlyban tartása alapján feltételezhető az is, hogy az időskori csökkent dopamin szignalizáció hatására nem történik CART peptid felszabadulás, ami viszont a NACC-ban a CART peptid változatlan expresszióját jelenti. Tekintve, hogy a legtöbb CART-immunreaktív axon terminális a NACC-ban lokális axonkollaterálisokhoz tartozik, a CART peptid NACC-ban betöltött homeosztatisz funkciója logikus magyarázat arra, hogy miért nem látunk életkor függő CART peptid expresszió változást még idős korban sem, amikor is a táplálékfelvétel a fiatalabb korú állatokéhoz képest csökken.

Meg kell azonban jegyezni, hogy a változatlan CART peptid expresszió nem jár szükségszerűen együtt változatlan CART peptid által kiváltott hatással a NACC neuronjain. Ennek, valamint a CART peptid időskori anorexiában betöltött funkciójának tisztázása további kutatásokat tesz szükségessé.

## **ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA**

Jelen kutatásban CART peptid immunreaktivitás életkor függő változását vizsgáltuk az agy egyes, táplálkozás szabályozásért felelős területein.

Először fiatal nem obes, nem diabeteses CCK-1 receptor deficiens OLETF patkányokban, valamint velük azonos korú LETO kontroll állatokban tanulmányoztuk a CART peptid immunreaktivitást. Annak ellenére, hogy korábbi vizsgálatok során az idősebb (35-40 hetes) elhízott és diabeteses OLETF patkányokban, a CART peptid immunreaktivitás a NACC rostralis területén, a rostro-medialis NTS-ben, és a basolateralis amygdalában szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az azonos korú LETO kontrollokban, a fiatal nem obes nem diabeteses OLETF állatokban a CART peptid expresszió nem mutatott szignifikáns eltérést a NTS-ben, a basolateralis amygdala-ban és a NACC-ben a kontroll LETO patkányokban talált immunreaktivitáshoz képest.



A továbbiakban arra kerestük a választ, hogy vajon az életkor változása áll-e a fenti CART expresszió eltérések hátterében. Vizsgálatainkat kiterjesztettük fiatal, középkorú és idős, hím és nőstény nem mutáns állatokra. A különböző korú állatokban nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a CART peptid immunreaktivitásában, sem a hím, sem a nőstény állatok esetén.

Megállapítottuk, hogy a NACC-ben a CART peptid expressziója nem mutat életkorfüggő elváltozásokat a fiatal, a középkorú, az idős és a nagyon időskorú patkányokban, ellentétben más táplákozás szabályozást befolyásoló neuropeptidekkel.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk továbbá, hogy a CART expresszió nincs közvetlen kapcsolatban a CCK-1 receptorral, és az azon keresztül történő szignalizációval, és feltételezhető, hogy a megváltozott CART expresszióért egyéb, az elhízással és/vagy diabetéssel összefüggésben álló faktorok tehetők felelőssé ezekben a patkány törzsekben.

#### A disszertáció legfontosabb eredményei az alábbiak:

- 1./ Fiatal CCK-1 receptor deficiens OLETF patkányokban, melyekben - ellentétben az idősebbekkel - még nem alakult ki sem elhízás, sem diabetes, nem tapasztaltunk a kontrollhoz képest CART immunreaktivitás-csökkenést sem a nucleus tractus solitariiben, sem a basolateralis amygdalában, és a nucleus accumbensben sem.
- 2./ Megállapítottuk, hogy a CART peptid immunreaktivitás intenzitása független az életkortól és a nemtől nem mutáns patkányok nucleus accumbensében.
- 3./ Megállapítottuk, hogy a CART expresszió nincs közvetlen kapcsolatban a CCK-1 receptoron keresztül történő szignalizációval.

## PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

- Armbruszt S., Figler M., Ábrahám H. (2015) Stability of CART peptide expression in the nucleus accumbens in aging. *Acta Biologica Hungarica*. 66(1):1-13.  
**IF: 0,563**
- Armbruszt S. (2015) A humán táplálkozás mechanizmusa, táplálékaink szerepe a betegség megelőzésben. *Dietetika a háziorvosi gyakorlatban* (Figler M., Kubányi J. szerk.). SpringMed Kiadó, Budapest. 21-44.
- Armbruszt S. (2013) A táplálékfelvétel központi idegrendszeri szabályozása. *Új Diéta*. 4:26-27.
- Armbruszt S., Ábrahám H., Figler M., Kozicz T., Hajnal A. (2013) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide immunoreactivity in feeding- and reward-related brain areas of CCK-1 receptor deficient young rats. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 50-51:75-84.  
**IF: 2,520**
- Armbruszt S. (2012) Az elhízás biológiája: ideális állatmodellek. *Új Diéta*. 5-6:16-17.

---

**Kumulatív IF (publikációk): 3,083**

### Az értekezés alapjául szolgáló konferencia absztraktok

- Armbruszt S., Ábrahám H., Figler M., Hajnal A. (2013) Életkortól függő változások a CART (cocaine- and amphetamine regulated transcript) peptid immunreaktivitásában a táplálkozás-szabályozásért felelős agyi központok területén. *PTE Egészségtudományi Doktori Iskola III. Tudományos Fóruma*, Pécs.

- Armbruszt S., Ábrahám H., Figler M., Hajnal A. (2013) A cocaine- and amphetamine regulated transcript (CART) peptid immunreaktivitásának vizsgálta a táplálkozás-szabályozásért felelős agyi központok területén cholecystokinin-1 receptor deficiens patkányokban. *Fiatal Oktatók Kutatói Fóruma*, Pécs.
  - Armbruszt S., Ábrahám H., Figler M., Kozicz T., Hajnal A. (2012) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide immunoreactivity in feeding- and reward-related brain areas of CCK-1 receptor deficient rats. *1st International Doctoral Workshop on Natural Sciences*, Pécs. Poster Prize Second Place
  - Armbruszt S., Ábrahám H., Figler M., Hajnal A. (2011) Age-related change of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide immunoreactivity in the rat nucleus accumbens. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 5:638.  
**IF: 0,896**
  - Armbruszt S., Ábrahám H., Figler M., Hajnal A. (2010) Investigation of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide immunoreactivity in feeding-related brain areas of CCK-1 receptor deficient rats. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 5:597.  
**IF: 1,131**
  - Armbruszt S., Ábrahám H., Figler M., Hajnal A. (2010) CART (Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript) peptid immunreaktivitásának vizsgálata a táplálkozás-szabályozásért felelős agyi központok területén CCK-1 receptor deficiens patkányokban. *Magyar Táplálkozástudományi Társaság XXXV. Vándorgyűlése*, Balatonőszöd.
  - Armbruszt S., Ábrahám H., Figler M., Hajnal A. (2010) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide immunoreactivity in feeding-related brain areas of CCK-1 receptor deficient rats. *Frontiers in Neuroscience, Conference Abstract: IBRO International Workshop 2010*. doi: 10.3389/conf.fnins.2010.10.00002
-

## **KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Prof. Dr. Figler Máriának és Dr. Ábrahám Hajnalkának áldozatos munkájukért és a folyamatos iránymutatásért melyet számomra nyújtottak. Köszönettel tartozom Dr. Hajnal Andrásnak, a PennState University Milton S. Hershey Medical School College of Medicine professzorának, hogy rendelkezésünkre bocsátotta az OLETF patkányokat, és számtalan jó tanáccsal ellátott minket. Köszönöm Prof. Dr. Seress Lászlónak a támogatást, hogy a szövettani munkát a PTE ÁOK Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumában végezhettem. Köszönöm a PTE ÁOK Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumában dolgozó asszisztenseknek, különösen, Papp Emesének, hogy a szövettani munkában a segítségemre volt. Szeretném megköszönni a PTE ÁOK Gyógyszertani Intézetében Prof. Dr. Pintér Erikának, hogy az intézetben működő mikroszkópot és a hozzá tartozó AnalySIS szoftvert használhattam. Köszönöm továbbá a PTE ETK Tudományos Bizottságának, hogy a kutatást anyagilag is támogatta.