

Szent István Egyetem

Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezetők:

.....

Dr. Zsarnovszky Attila, PhD

Állatélettani és Állat-egészségtani Tanszék

Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Szent István Egyetem

.....

Dr. Frenyó V. László, CSc

Élettani és Biokémiai Tanszék

Állatorvos-tudományi Kar, Szent István Egyetem

Készült 8 példányban. Ez a(z) számú példány.

.....

Dr. Tóth István

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. A kutatás jelentősége és kitűzött célok	5
3. Anyag és módszer	7
4. Eredmények megbeszélése.....	8
5. Összefoglalás	10
6. Új tudományos eredmények	11
7. Publikációk.....	12

1. Bevezetés

A hipotalamusz az agy bazális részén elhelyezkedő, tükörszimmetrikus agyterület, mely számos homeosztatis és reprodukív folyamat irányításban játszik kulcsszerepet. Az azonban máig tisztázatlan, hogy pontosan milyen szerkezeti és/vagy működési jellegzetességek alapján képes egy ilyen, viszonylag kisméretű agyterület olyan sokrétű szabályzó feladat ellátására. Annak ellenére, hogy a nagyagyhoz hasonlóan a hipotalamuszban a jobb és bal oldali térfelén az egyes magcsoportok tükörszimmetrikusan helyezkednek el, a hipotalamusz működését mind a mai napig egységes struktúraként kezelve vizsgálják, feltételezve, hogy a két oldalon található, azonos magokhoz tartozó idegsejtek azonos feladatokat látnak el.

A hipotalamusz által irányított élettani folyamatok közül az egyik legfontosabb a ciklikus női nemi működés szabályozása, amelynek központjában a jobb és bal oldalon tükörszimmetrikusan elhelyezkedő gonadotropin-releasing hormon (GnRH) tartalmú idegsejtek állnak. Ezen az idegsejtek működését egy ún. szatellita rendszer egészíti ki, ami mindkét oldalon a perifériáról származó metabolikus és reprodukív hatásokat képes feldolgozni és továbbítani a GnRH neuronok felé, ezzel támogatva azok ciklikus működését, és így az ovulációt.

A táplálékfelvétel irányítása során szerepet játszó hipotalamikusan neuronok egymással kapcsolódva egy bonyolult hálózatot alkotnak (neuronkörök), amit összefoglaló néven melanocortin rendszernek nevezünk. A melanocortin rendszert alkotó orexigén (táplálékfelvételt serkentő) és anorexigén (táplálékfelvételt gátló) neuronok a korábban említett funkcióhoz hasonlóan a hipotalamusz mindkét oldalán azonos felépítés mellett megtalálhatók, lehetővé téve ezzel, hogy a perifériás orexigén és anorexigén metabolikus jelek mindkét oldalon egyaránt kifejtsék a hatásukat.

Viszonylag régóta ismert, hogy a központi idegrendszer jobb és bal oldala eltérő élettani folyamatok szabályozásában vesz részt (pl.: mozgás irányítása, beszéd). Hasonló

aszimmetrikus jelenségeket a neuroendokrin hipotalamusz esetében is leírtak. Ezen tanulmányok már több mint 40 éve rendelkezésre állnak, azonban a kutatók a hipotalamusz kutatása során annak működését azóta is szimmetrikusan kezelik, feltételezve, hogy a két oldalon található, azonos magokhoz tartozó idegsejtek azonos feladatokat látnak el.

Az említett korai tanulmányok jelentős része a női nemi működéssel kapcsolatos aszimmetriát morfológiai alapokon vizsgálta utalva arra, hogy az ösztrociklus bonyolult irányításában a hipotalamusz két oldala nem azonos módon játszik szerepet. Figyelembe véve az ösztrogén kettős szerepét (fő nemi hormon és anorexigén szignál), illetve azon unilaterális idegrendszeri kapcsolatokat, amelyek a hipotalamusz egyik oldalát kötik össze más ismert aszimmetrikus működésű agyi területekkel, jogosnak látszik feltételezni, hogy a táplálékfelvétellel kapcsolatos hipotalamikus funkciók szintén lateralizált működést mutatnak.

A hipotalamusz homeosztatisz funkciói, más idegi folyamatokhoz hasonlóan, meglehetősen energiaigényesek, ezért a mitochondriális ATP termelés kiemelt fontosságú az idegsejt működése során. A neuronális mitochondriumok aktivitása - a sejtek aktuális igényének megfelelően - minden időpillanatban pontosan szabályozott. Ezt a finomhangolt működést kihasználva, a mitochondriális oxigénfogyasztás kísérletes mérésével lehetőségünk nyílik idegsejtek aktuális aktivitásának vizsgálatára.

2. A kutatás jelentősége és a kitűzött célok

A modern, jelentős megterheléssel járó életükben egyre több ember érintett valamilyen reproduktív vagy metabolikus betegségben, amelynek megelőzése szempontjából kiemelkedő szerepe van a hipotalamusz normális működésének, elősegítve a homeosztázis fenntartását. Az említett eredetű elváltozások megelőzése, továbbá hatékony gyógykezelése feltétlenül szükségessé teszi a hipotalamikus funkciók pontos élettani mechanizmusainak megismerését.

Munkánk célja a hipotalamusz aszimmetrikus működésének bizonyítása volt, kimutatva, hogy az anatómiailag párosan elhelyezkedő régiók egymástól eltérő mértékben vesznek részt az egyes élettani funkciók szabályozásában.

A PhD munka céljai:

- 1:** Annak vizsgálata, hogy jelentkezik-e ösztrofázissal összefüggésbe hozható hipotalamikus metabolikus aszimmetria intakt nőstény patkányokon.
- 2:** Ha az első pont igaz, akkor annak vizsgálata, hogy az ösztrofázis függő metabolikus aszimmetria kialakításában milyen szereppel bír a legfőbb női nemi hormon, az ösztrogén.
- 3:** Annak vizsgálata, hogy nőivarú állatokban jelentkezik-e hipotalamikus aszimmetria táplálékfelvétellel kapcsolatos folyamatok működése során.
- 4:** Annak vizsgálata, hogy hím állatokban jelentkezik-e hipotalamikus aszimmetria a reprodukció irányítása során.
- 5:** Annak vizsgálata, hogy hím állatokban jelentkezik-e hipotalamikus aszimmetria táplálékfelvétellel kapcsolatos folyamatok működése során.

- 6:** Az 1-5 pont vizsgálata alapján szerzett eredményeink összehasonlítása a *hipotalamikus szabályozó folyamatokban* fellelhető nemekkel összefüggő alapvető különbségek elemzése érdekében.
- 7:** Az 1-5 pont vizsgálata alapján szerzett eredményeink összehasonlítása a *hipotalamikus metabolizmusban* fellelhető nemekkel összefüggő alapvető különbségek elemzése érdekében.

3. Anyag és módszer

Normál ciklusú nőstény (1. kísérlet) illetve gonadektomizált hím és nőstény (2. és 3. kísérlet) Wistar patkányokon vizsgáltuk a reprodukzív állapot, illetve a tápláltsági állapot hipotalamikusan működésére kifejtett hatását.

Az intakt nőstény patkányok ciklusstádiumát a kísérlet napján az állatok exterminálását követően állapítottuk meg, elkerülve ezzel azon hormonális változásokat, amelyeket a kenet készítése során a cervix mesterséges ingerlése válthat ki. A hüvelycitológia segítségével 5 ösztrofázist különítettünk el: korai proösztroz, késő proösztroz, ösztroz, metösztroz és diösztroz.

2. kísérletünkben az ösztrogén hatását vizsgáltuk ovariektomizált nőstényeken. A kísérlet során két fő kísérleti csoportot alakítottunk ki: ösztrogén kezelt állatok, és a kontroll csoport, ahol az állatok fiziológiás sóoldatot (vivőanyag) kaptak. Korábbi eredményeink alapján bőr alatti injekció beadására a kísérlet előtt 10 órával került sor (este 10 órakor). Mindkét kísérletes csoportot tovább osztottuk *ad libitum* etetett és éheztetett alcsoportokra, amellyel a tápláltsági állapot hatását tudjuk vizsgálni.

3. kísérletünkben kasztrált és intakt hímeiken vizsgáltuk a tesztoszteron hatását. A nőstényekhez hasonlóan a hímek esetében is kialakítottunk két alcsoportot: *ad libitum* etetett és éheztetett állatok.

Mindhárom nagy kísérletünk során az állatok jobb és bal oldali hipotalamusz feléből elkülönítve izoláltuk a mitochondriumokat, hogy azok oxigénfogyasztását egy ún. Clark-típusú oxigénelektrod segítségével regisztrálni tudjuk (légzési ráták). Egy állatban a jobb- illetve baloldaltól származó légzési rátákat egymáshoz hasonlítottuk, így megállapítva a két oldal közötti különbséget, továbbá azt, hogy melyik oldal volt az aktívabb. Az összehasonlításból kapott eredményeinken statisztikai vizsgálatokat a Fisher egzakt és a két-utas ANOVA módszerekkel végeztük.

4. Eredmények megbeszélése

A munkánkban bemutatott eredmények egy új mechanizmust tárnak elénk, amelyen keresztül a jobb és bal oldali hipotalamusz felek a táplálékfelvétellel kapcsolatos és a szaporodásbiológiai folyamatokat aszimmetrikus módon irányítják.

Aszimmetria a nőstény állatok hipotalamuszában

Intakt, normál ciklusú (1. kísérlet) és ovx (2. kísérlet) nőstényekben egy ösztrofázissal összefüggő és ösztrogén függő metabolikus aszimmetriát találtunk, amely jobb oldali dominanciát mutat. A nőivarú patkányokban a proösztroz során, amikor a keringő ösztrogén szintje magas szinten van, jelentős aszimmetria jellemzi a két hipotalamikus oldal metabolizmusát. Ez a hipotalamikus lateralizáció feltételezhetően kiemelkedő szerepet játszik a női nem ciklus változása során, és valószínűleg összefügg a GnRH szekréció szabályozásával, következményesen az ovuláció kialakulásával.

A reproduktív folyamatokkal összefüggő aszimmetria mellett kísérleteink fényt derítettek egy tápláltsági állapottal összefüggő metabolikus lateralizációra is. Az *ad libitum* etetett csoportokkal ellentétben, ahol a jobboldali mitochondriumok aktivitása bizonyult magasabbnak, az ösztrogén hatására kialakult dominancia éheztetés mellett az állatok egy részében a baloldalra tolódott át. Ezek az eredmények, együtt az unilaterális táplálékfelvételt befolyásoló pályák jelenlétével - amik a hipotalamusz jobb illetve bal oldalát ismertén aszimmetrikus működésű agyterületekkel kötik össze - egyértelműen utalnak egy a táplálékfelvétellel kapcsolatos hipotalamikus aszimmetria létezésére.

Aszimmetria a hím állatok hipotalamuszában

Hím állatokon végzett kísérleteink eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a táplálékfelvételt irányító hipotalamikus folyamatok a nőstény állatokhoz hasonlóan a hím állatokban is lateralizáltan működnek, míg a szaporodásbiológiai állapot (kasztrálás) hipotalamikus aszimmetriára kifejtett hatása elenyésző (3. kísérlet).

Hím állatok esetében a szaporodásbiológiai állapottól függetlenül az *ad libitum* etetés a jobb hipotalamikus oldalon váltott ki magasabb metabolikus aktivitást, míg éheztetés hatására az állatok egy jelentős részében a dominancia baloldalra tevődött át. Ez a jelenség összhangban áll a nőstény állatoknál talált változásokkal, és arra utal, hogy az éhezéssel együtt járó orexigén perifériás hatások a baloldalt erőteljesebben aktiválják, ezzel megbontva az anorexigén hatásra korábban kialakult jobboldali dominanciát.

Nemekkel összefüggő különbségek

Kísérleteink utolsó részében a hím és nőstény állatokból nyert eredményeinket hasonlítottuk össze, ami az állatokra jellemző hipotalamikus metabolikus profilban alapvető nemekkel összefüggő különbségekre derített fényt.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az általunk alkalmazott kísérletes körülmények között a nőstény patkányokban hipotalamikus aszimmetria elsősorban az állat szaporodásbiológiai státuszától illetve a fő nemi hormontól, az ösztrogéntől függ. Ezzel ellentétben, a hímekben főleg a tápláltsági állapot változása befolyásolta erőteljesebben a hipotalamikus aszimmetriát. Nőstényeknél a hímekhez hasonló metabolikus lateralizáció jellemzi a táplálékfelvétel szabályozásával foglalkozó melanocortin rendszert, azonban az éhezés által kialakított változások az ösztrogén erős hatása miatt részben rejtve maradnak.

A fennemlített változásokon túl eredményeink egy másik jelentős különbségre is fényt derítettek: az ösztrogén jelentősen fokozta a mitochondriumok aktivitását úgy, hogy a mitochondriumok védekezéséért felelős biokémiai mechanizmusok aktivitása nem követte ezt a változást. Hímeknél ezzel ellentétben a magas mitochondriális aktivitást még erőteljesebb védekező mechanizmusok kísérik a hipotalamuszban, azaz ösztrogén hiányában (hím állatok) a mitochondrium saját belső védekező mechanizmusai erőteljesebben jelentkeznek, vagyis hatékonyabban lépnek fel a fokozott aktivitással együtt járó emelkedett káros anyag képződés ellen.

5. Összefoglalás

A táplálékfelvétel és szaporodásbiológia irányításában központi szerepet játszó hipotalamusz anatómiailag és funkcionálisan zsúfolt felépítést mutat. A szövettanilag szimmetrikus felépítés ellenére a hipotalamuszt a mai napig egységes területként kezelik, ahol a két oldalon található, azonos magokhoz tartozó idegsejtek azonos élettani feladatokat látnak el.

Vizsgálatainkkal bemutattuk, hogy a párosan elhelyezkedő régiók egymástól eltérő mértékben részesednek az egyes élettani funkciók betöltésében, és a két hipotalamikus oldal az egyes feladatokat aszimmetrikusan szabályozza. Kísérleteink arra engednek következtetni, hogy noha a jobb és bal térfél képes ugyanazon perifériás jelekre reagálni, a kiváltott biológiai válasz a két oldalon eltérő mértékű, így egyes folyamatokban a hipotalamikus féltekéhez köthető dominancia alakul ki.

A központi idegrendszer a gerincvelőtől haladva a magasabb agyi területekig egyre magasabb szintű specializációt mutat, és funkciók félteke szerinti megoszlása egyre markánsabban jelentkezik. Ez az evolúciós folyamat kedvezőbb energiafelhasználás mellett egy pontosabb és gyorsabb szabályozást tesz lehetővé. Az általunk demonstrált eredmények alapján azt feltételezzük, hogy a hipotalamusz a nagyagyhoz hasonló, annál egy kicsit kevésbé specifikus lateralizációt mutat, így a hipotalamikus oldalakat - ebben az összefüggésben - féltekének is nevezhetjük.

Eredményeink nagyban befolyásolják a szaporodásbiológiai és táplálékfelvétellel kapcsolatos korábbi ismereteinket, új távlatokat nyitva ezzel a hipotalamikus folyamatok kutatásában.

6. Új tudományos eredmények

- 1-2: A kutatócsoportunk által kidolgozott metabolikus vizsgálómódszerrel, egy funkcionális aszimmetria detektálható nőstény állatok hipotalamuszában, amely erősen ösztrogén függő és jobb oldali dominanciát mutat.
- 3: A táplálékfelvétellel kapcsolatos hipotalamikus folyamatok szintén lateralizált működést mutatnak, de ez a jelenség kisebb mértékben jelentkezik, mint a reprodukív folyamatokkal összefüggő aszimmetria.
- 4: A tesztoszteron illetve annak hiánya nem befolyásolja a hipotalamusz metabolikus aszimmetriáját.
- 5: Hím állatokban a nőstényekhez hasonlóan aszimmetrikus működés jellemzi a táplálékfelvétellel kapcsolatos hipotalamikus folyamatokat. Jóllakottság esetén a jobb oldal működése erősebb, míg a táplálék megvonása (24 óra éhezés) a bal oldalt aktiválja erősebben.
- 6: Hím és nőstény állatokban a reprodukcióval és a táplálékfelvétellel összefüggő metabolikus aszimmetria a hipotalamuszban alapvető nemekkel összefüggő eltérést mutat: nőstényekben a szaporodásbiológiai folyamatok hatására az hipotalamikus aszimmetriára jelentősebb, míg a hímekben a táplálékfelvétel hatása jelentkezik dominánsabban az általunk alkalmazott kísérletes körülmények között.
- 7: Hím és nőstény állatok mitochondriális működése alapvetően eltér: nőstényekben az ösztrogén hatására kialakuló emelkedett mitochondriális aktivitást nem követik a mitochondrium védelmét szolgáló szabályozó biokémiai mechanizmusok (downregulation), míg hímekben az erősebb aktivitást magasabb szintű védekező mechanizmusok kísérik.

7. Publikációk

A disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények

Impact factorral rendelkező tudományos folyóiratokban megjelent cikkek

Tóth I, Kiss DS, Jócsák G, Somogyi V, Toronyi É, Bartha T, Frenyó LV, Horvath TL, Zsarnovszky A (2015) Estrogen- and Satiety State-Dependent Metabolic Lateralization in the Hypothalamus of Female Rats PLOS One 10(9):e0137462 doi: 10.1371/journal.pone.0137462

Tóth I, Kiss DS, Goszleth G, Bartha T, Frenyó LV, Naftolin F, Horvath TL, Zsarnovszky A (2014) Hypothalamic Sidedness in Mitochondrial Metabolism: New Perspectives. Reprod Sci 21:1492–1498.

Tóth I, Goszleth G, Frenyó LV (2012) A táplálékfölvétel fő szabályzó molekulái: a grelin, a leptin és azok kölcsönhatása: Irodalmi összefoglaló Magyar Állatorvosok Lapja 134:(8) 504-512

Nemzetközi konferencia kiadványokban megjelent összefoglalók

Tóth I, Szabo Cs, Jócsák G, Somogyi V, Kiss DS, Bartha T, Frenyó LV, Zsarnovszky A (2015) Impact of satiety state and testosterone on the metabolic lateralization in the male rat hypothalamus - MITT (2015) Budapest (poszter)

Tóth I, Kiss DS, Jócsák G, Bartha T, Frenyó LV, Zsarnovszky A (2014) A possible way to decrease “crowdedness” through functional asymmetry in the hypothalamus FEPS Budapest (poszter)

Tóth I, Kiss DS, Jócsák G, Bartha T, Frenyó LV, Zsarnovszky A (2014) Metabolic lateralization in the hypothalamus: possible mechanism for cramming multiple functions into a small place FENS Milano (poszter)

Kiss DS, **Tóth I**, Jócsák G, Bartha T, Frenyó LV, Zsarnovszky A (2014) Mitochondrial metabolic lateralization in the rat hypothalamus MITT-IBRO Debrecen (poszter)

Zsarnovszky A, **Tóth I**, Scalise TJ, Somogyi V, Kiss DS, Győrffy A, Goszleth G, Bartha T, Frenyó LV (2012) Possible hypothalamic laterality in the central regulation of GnRH release: thoughts that might lead to a novel approach in hypothalamic studies IBRO Szeged (poszter)

Magyar konferencia kiadványokban megjelent összefoglalók

Kiss DS, **Tóth I**, Jócsák G, Goszleth G, Bartha T, Frenyó LV, Zsarnovszky A (2015) A jóllakottság és tesztoszteron hatása a hypothalamus metabolikus féloldaliságára hím patkányban Akadémiai beszámoló (előadás)

Tóth I, Kiss DS, Bartha T, Frenyó LV, Zsarnovszky A (2014) Tápláltság-függő mitochondriális metabolikus aszimmetria patkányok hypothalamus-féltekéinek sejtjeiben. Akadémiai beszámoló (előadás)

Tóth I, Somogyi V, Győrffy A, Goszleth G, Zsarnovszky A (2013) Biszfenol A, arzén és zearalenon hatása fejlődő patkány kisagysejtjeinek ösztrogén- és pajzsmirigyhormon receptor mRNS-ének expressziójára. Akadémiai beszámoló (előadás)

Kiss DS, **Tóth I**, Goszleth G, Somogyi V, Bartha T, Frenyó LV, Zsarnovszky A (2013) A mitochondriális metabolizmus hypothalamicus aszimmetriája. Akadémiai beszámoló (előadás)

Tóth I, Kiss DS, Somogyi V, Goszleth G, Bartha T, Frenyó LV, Zsarnovszky A (2012) A hipotalamikus GnRH szekréció unilaterális szabályozása. Akadémiai beszámoló (előadás)

Az értekezésben nem tárgyalt közlemények

Somogyi V, Horvath TL, **Tóth I**, Bartha T, Frenyó LV, Kiss DS, Jócsák G, Kerti A, Naftolin F, Zsarnovszky A (submitted) Influence of bisphenol A on thyroid hormone receptors in rat cerebellar cell culture. J Expo Sci Environ Epidemiol (tudományos cikk)

Somogyi V, Horvath TL, **Tóth I**, Bartha T, Frenyó LV, Kiss DS, Jócsák G, Kerti A, Zsarnovszky A (2015) Glial modulation of estrogen receptor beta mRNA expression is influenced by individual and combined effects of bisphenol A, zearalenone, arsenic and camphor in the developing rat cerebellum. - MITT (2015) Budapest (poszter)

Somogyi V, Jócsák G, **Tóth I**, Kiss DS, Goszleth G, Bartha T, Frenyó LV, Zsarnovszky A, Sterczler A (2015) A hepaticus encephalopathia hatása a fejlődő idegrendszerre: az ösztrogén- és pajzsmirigyhormon-receptorok mrns expressziójának vizsgálata kisgyi sejttenyészetben Akadémiai beszámoló (előadás)

Mándoki M, Jócsák G, Somogyi V, Kiss DS, **Tóth I**, Bartha T (2014) Use of virtual patients in teaching veterinary physiology at the Faculty of Veterinary Science, Szent István University, Budapest FEPS Budapest (előadás)

Jócsák G, **Tóth I**, Somogyi V, Kiss DS, Bartha T, Frenyó LV, Zsarnovszky A (2014) Identification of a likely mechanism for endocrine disruption: Effects of bisphenol A on the expression level of estrogen- and thyroid hormone receptors in the developing cerebellum FENS (2014) Milano (poszter)

Tóth I, Kiss DS, Jócsák G, Bartha T, Frenyó LV, Zsarnovszky A (2014) Effects of Bisphenol A on the regulation of estrogen- and thyroid hormone receptor expression in presence of estrogen and/or thyroid hormones on the developing cerebellum IBRO Budapest (poszter)

Scalise TJ, Gyórfy A, **Tóth I**, Kiss DS, Somogyi V, Goszleth G, Bartha T, Frenyó LV, Zsarnovszky A (2012) Ligand-induced changes in oestrogen and thyroid hormone receptor expression in the developing rat cerebellum: a comparative quantitative PCR and Western blot study. Acta Veterinaria Hungarica 60:(2) 263-284. (tudományos cikk)

Zsarnovszky A, **Tóth I**, Scalise TJ, Somogyi V, Gyórfy A, Kiss DS, Goszleth G, Bartha T, Frenyó LV (2012) Analysis of ligand-dependent changes in estrogen receptor- and thyroid hormone receptor mRNA and protein expression in the developing rat cerebellum MÉT (2011) Pecs (poszter)

Tóth I, Scalise TJ, Gyórfy A, Kiss DS, Somogyi V, Goszleth G, Bartha T, Frenyó LV, Zsarnovszky A (2011) Comparative analysis and functional implications of ligand dependent changes in estrogen- and thyroid hormone receptor expression in the developing cerebellum IBRO, Firenze (poszter)

Diplomamunka és TDK munka irányítása

Knyihár V: Kisméretű agyszövet-minták mitochondriális metabolizmusának vizsgálati módszere és annak gyakorlati jelentősége, TDK dolgozat, 2012, Témavezetők: Kiss DS, **Tóth I**

Nyitrai Berdin B.: A hypothalamus funkcionális aszimmetriája, TDK dolgozat, tervezett bemutatás ideje: 2015, Témavezetők: **Tóth I**, Kiss DS

Pope H: Functional asymmetry of the hypothalamus, a literature review, DVM thesis, tervezett bemutatás ideje: 2015, Témavezetők: Kiss DS, **Tóth I**