

Diplomamunka

Molnár Gyula

2020

TDK dolgozat

Molnár Gyula, 2018

Állatorvostudományi Egyetem

Élettani és Biokémiai Tanszék

**A hypothalamus funkcionális aszimmetriája a reprodukív
folyamatokkal és a táplálékfelvétellel kapcsolatban hím
patkányokon**

Készítette: Molnár Gyula

Témavezetők: Dr. Kiss Dávid Sándor

ÁTE, Élettani és Biokémiai Tanszék, Adjunktus

Dr. Tóth István

ÁTE, Élettani és Biokémiai Tanszék, Adjunktus

Budapest, 2018

1 Tartalomjegyzék

1	Tartalomjegyzék.....	4
2	Bevezetés és szakirodalmi áttekintés	6
2.1	Agyi aszimmetria.....	6
2.2	A hypothalamus szimmetriájának általános aspektusa.....	7
2.3	Hypothalamus féloldali működése a táplálékfelvétel és anyagcsere irányításával kapcsolatban	8
2.4	A reproduktív funkciók aszimmetriája	9
2.4.1	Nőstények.....	9
2.4.2	Hímek.....	11
2.5	A módszerválasztás háttere	12
3	Hipotézis és célkitűzések	13
4	Anyag és módszer	14
4.1	Kísérleti állatok.....	14
4.1.1	A tápláltsági állapot és a hím nemi hormonok együttes hatása.....	14
4.1.2	A tápláltsági állapot hatásának vizsgálata programozott etetéssel.....	14
4.1.3	A programozott etetés hatása az állatok aktív időszakában (sötét periódus)	15
4.2	Előkészületek.....	15
4.3	A nyers mitokondriális frakciók kinyerése.....	15
4.3.1	Az agy kiemelése	15
4.3.2	Homogenizálás	16
4.4	Differenciál fracionálás	16
4.5	A nyers mitokondriális frakciók megtisztítása	17
4.6	A Percoll eltávolítása a tisztított mintából.....	18
4.7	Mitokondriális légzésmérés	19
5	Eredmények	22
5.1	A tápláltsági állapot és a hím nemi hormonok együttes hatása.....	22
5.2	A tápláltsági állapot hatásának vizsgálata programozott etetéssel	25
5.3	A programozott etetés hatása az állatok aktív időszakában	26
6	Az eredmények megvitatása	27
6.1	A tápláltsági állapot és a hím nemi hormonok együttes hatása.....	27
6.2	A tápláltsági állapot hatásának vizsgálata programozott etetéssel	28
6.3	A programozott etetés hatása az állatok aktív időszakában	28

6.4	Hímek és nőtények közötti különbségek	30
7	Konklúzió.....	31
8	Összefoglalás	32
9	Summary	33
10	Irodalomjegyzék.....	34
11	Köszönetnyilvánítás	37

2 Bevezetés és szakirodalmi áttekintés

2.1 Agyi aszimmetria

A nagyagy szövettanilag és makroszkopikus szinten is szimmetrikus szerv. A nagyagyra jellemző funkcionális aszimmetriát már 1861-ben leírta Broca (1861), aki azt találta, hogy az aphasiát (beszédzavar) a nagyagy frontális részének bal oldalán keletkező sérülések okozzák. Ezt a felfedezést követően számos kutatásban beszámoltak a nagyagyat, hippocampust, habenulát és thalamust érintő aszimmetriáról. Egészséges patkányok hippocampusát vizsgálva azt találták, hogy molekuláris szinten különbség van a jobb és a bal hippocampus között, ami a dopamin szintézisében és felszabadulásában szerepet játszó fehérjék expressziójában nyilvánul meg. Az ismertetett aszimmetria, különböző betegségekben is előfordul, valamint a betegségek során a fehérjék száma is megváltozhat (pl. epilepsziában) (Sadeghi *et al.*, 2017). A habenula aszimmetriája megnyilvánul mind a méretében, mind a funkciójában. Aizawa *et al.* (2013) zebrahalak és rágcsálók habenuláinak vizsgálata során állapították meg, hogy a kétoldalúság már a fejlődés során megmutatkozik, és a neurogenetikus időszakban jelenlevő különböző szabályozási folyamatok hatásainak köszönhető. A thalamus vizsgálata során Galaburda és Eidelberg (1982) megállapították, hogy a thalamusz kapcsolódása az agykéreghez bár szimmetrikus, de azok a thalamikus területek, amelyek bizonyos corticalis mezőkhöz csatlakoznak, aszimmetriát mutatnak.

Számos agyterületen végeztek már kutatásokat, azok aszimmetrikus működésének felderítésére, de a hypothalamus még új terület, kevés kutatás irányult rá, kiváltképp a funkcionális működésére.

2.2 A hypothalamus szimmetriájának általános aspektusa

A hypothalamus az agy középvonalában található terület, melyet tükörszimmetrikusan elhelyezkedő magcsoportok alkotnak, ezáltal zsúfolt felépítést mutat. Ez a legfőbb neuroendokrin szabályozó központ, ezzel együtt fontos szerepet játszik a homeosztázis fenntartásában és az energia háztartásban is.

Hatásai megnyilvánulnak a táplálékfelvétel szabályozásán és a szomjúságérzet kialakításán valamint a reproduktív folyamatok irányításán túl, a cirkadián ritmus kialakításában, az elektrolit egyensúly fenntartásában, a testhőmérséklet és a vérnyomás szabályozásában valamint a hormonrendszer irányításában is.

A zsúfolt felépítés a hypothalamust alkotó magcsoportok révén jön létre. A magcsoportok tulajdonképpen az azonos élettani funkciókat ellátó idegsejtek csoportosulásai a hypothalamusban, melyek szoros kapcsolatban állnak egymással, és hálózatokat alkotnak, de ugyanakkor egy magcsoport több funkciót is elláthat. Ezen rendszerek egy sajátos és rendkívül összetett felépítést eredményeznek a hypothalamuson belül, amelyben az egyes hypothalamicus funkciók egymást is befolyásolni képesek. Ismert a tápláltsági állapot és a szaporodásbiológiai státusz kapcsolata tejelő teheneknél (miszerint minél jobb egy tehén kondíciója, annál könnyebben vemhesül), de éppen úgy embereknél is (pl. anorexia nervosa páciensek ciklicitási problémái, vagy éppen a vékony, általában sportoló lányok később bekövetkező pubertása) (Tóth *et al.*, 2017).

A szimmetrikus felépítés az egész központi idegrendszerben jelen van, mind anatómiai, mind szövettani szinten. A hypothalamus tükörszimmetrikus elrendeződése azt eredményezi, hogy mindkét oldalon találhatóak, anatómiailag egymással párhuzamba hozható magcsoportok. Korábban úgy tartották, hogy a magcsoportok ugyanazon élettani folyamatok ellátását végzik, de számos kutatás igazolta azt a feltevést, hogy a különböző folyamatok ellátásban a kétoldali azonos magcsoportok nem ugyanazon súllyal részesednek, hanem egy bizonyos hypothalamikus funkcionális aszimmetria figyelhető meg. Az aszimmetrikus eltéréseknek az oka lehet a két oldalon eltérő számú sejt vagy mitokondrium, eltérő mitokondriális aktivitás vagy eltérő transzkripciós és/vagy translációs aktivitás.

2.3 Hypothalamus féloldali működése a táplálékfelvétel és anyagcsere irányításával kapcsolatban

A fő idegsejt csoportok, amelyek a táplálékfelvételt szabályozzák, szintén a hypothalamusban találhatóak. A neuronokat két csoportra oszthatjuk, lehetnek orexigének (növelik az éhséget és a táplálékfelvételt) vagy anorexigének (csökkentik az éhséget és a táplálékfelvételt). Az orexigén és anorexigén neuronok a hypothalamus mindkét oldalán komplex neuron köröket alkotnak, ez a melanokortin rendszer (Nasrallah és Horvath, 2014).

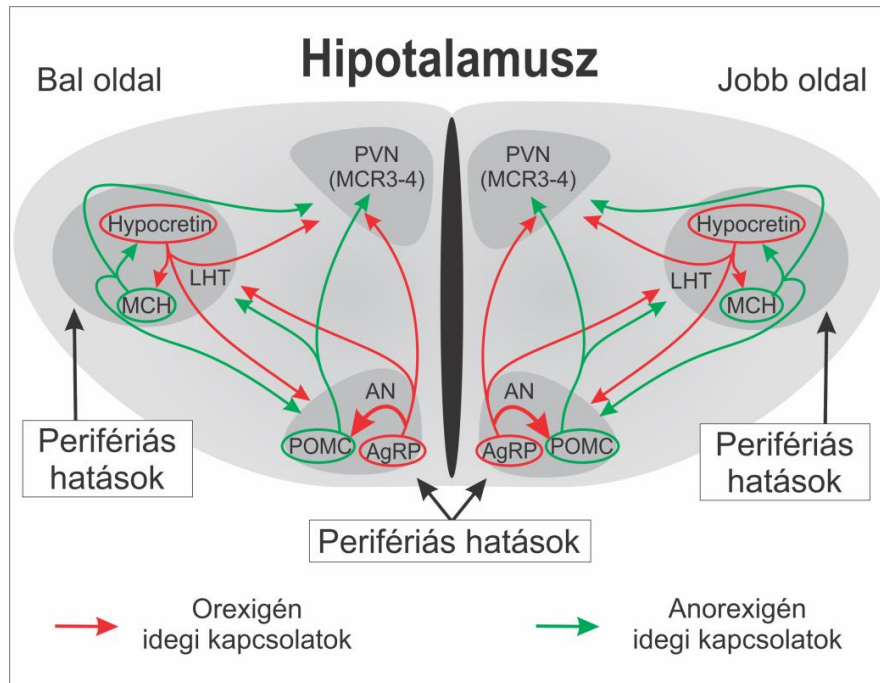
A melanokortin rendszer fő központja és végrehajtója a nucleus arcuatus, ami a hypothalamus mediobasalis részén található. A nucleus arcuatus két fő sejtcsoportja az táplálékfelvétel szabályozásában résztvevő anorexigén POMC (propiomelanokortin) és CART (cocaine- és amphetamine-regulated transcript). Együtt tartalmaznak orexigén NPY (neuropeptid-Y) és AgRP (aguti gén related polypeptide) neuronokat is. Ezek a neuronok perifériás homeosztatis jeleket érzékelnek, azaz a ghrelint és leptint közvetlenül, ha jelen vannak a ghrelin és leptin receptorok (Holst és Schwartz, 2004; Baskin *et al.*, 1999; Elias *et al.*, 2000; Riediger *et al.*, 2003).

A nucleus arcuatus nagyon közel helyezkedik el a hypophysis fenesztrált kapillárisaihoz, amin keresztül metabolikus és hormonális faktorok is könnyen eléri az agyalapi mirigy sejtjeit (Münzberg, 2008). Másrészt a nucleus arcuatus más agyterületekkel is összeköttetésben áll, úgymint a laterális és ventromediális hypothalamus magokkal (LHT, VMH), ahonnan szintén kap perifériás jóllakottsági jeleket (Elias *et al.*, 1998; Sternson *et al.*, 2005). **(1. Ábra)**

Az első tanulmány, amely igazolja a hypothalamicus aszimmetriát a táplálékfelvétel szabályozásában 1996-ban jelent meg, és leírta, hogy a laterális hypothalamicus régió egyoldali elektrostimulációs ingerlésének hatására aszimmetrikusan megváltozott a táplálék felvételi ritmus. Nyulakban a hypothalamus bal oldalának stimulálása alacsonyabb küszöböt és magasabb stabilitást eredményezett éhezés során (Pavlova *et al.*, 1996).

A későbbiekben macskákban sikerült igazolni a bal oldali dominanciát éhezés során, a hypothalamus két oldala közötti elektromos aktivitás változásának a mérése során (Vanetsian és Pavlova, 2004). Ezek az eredmények azt sugallták, hogy az unilaterális neuronkapcsolatok kötik össze a hypothalamus éhségközpontját a kortikális régiókkal. Hasonló unilaterális kapcsolatokat írtak le a jutalmazó rendszer és a hypothalamus között is (Mittleman *et al.*,

1985; Stratford és Wirtshafter, 2013). Ezek az adatok habár nem közvetlen bizonyítékok az aszimmetrikus működésre, szorosan magukban foglalják a féloldali feladatmegosztás jelenlétét a hypothalamusban is.



1. ábra A hypothalamus kapcsolatai a táplálékfelvétel és energiaegyensúly (melanokortin rendszer) szabályozásában. Piros nyilak: orexigén jelek; zöld nyilak: anorexigén jelek; AN: nucleus arcuatus; LHT: laterális hypothalamusz; PVN: nucleus paraventricularis (forrás: Dr. Tóth István)

2.4 A reprodukció aszimmetriája

A hypothalamus legösszetettebb, legenergiaigényesebb feladata a reprodukció felügyelete, amely függ az állat nemétől és folyamatos neuronkör átépüléssel jár. Perifériás és centrális utakon futnak a reprodukció és metabolikus jelek a hypothalamusba, majd a GnRH-t tartalmazó idegsejtekbe, hogy fenntartsák a fiziológiai – nőstényekben ciklikus – reprodukció aktivitást, beleértve a reprodukció szervek fejlődését, a szexuális viselkedés megjelenését és a reprodukció folyamatok ciklitását.

2.4.1 Nőstények

A hypothalamus aszimmetria úttörő kutatásai között Gerendai *et al.*(1978) a nőstények reprodukció funkcióit vizsgálták hemigonadectomiával. Az eredményeik szerint patkányokban unilaterális ovariectomia után rendkívül magasabb a GnRH koncentráció a hypothalamus jobb oldalában, a balhoz képest. A féloldaliság mértéke és iránya állandónak bizonyult, és a hemigonadectomiás beavatkozások kiemelték a hypothalamus jobb oldalának a

petefészek szabályozásában mutatott dominanciáját. A féloldali ovariectomia indukálta a GnRH-szint jelentős emelkedését az ivartalanított oldaltól ipsilaterálisan a hypothalamusban. A jobb oldali petefészek eltávolítása fokozta a GnRH koncentrációban tapasztalt aszimmetriát, míg a bal oldali beavatkozás csökkentette azt. Érdekes, hogy a bilaterális ovariectomia a teljes hypothalamicus GnRH-szint csökkenését eredményezte, habár ez a csökkenés csak a jobb oldalon mutatkozott meg.

A korai morfo-funkcionális kutatások között olyan vizsgálatokat is végeztek, amelyek a hypothalamus ivarspecifikus különbözőségének hatását és a viselkedést is tanulmányozták. Kiderült többek között, hogy a hypothalamus bal vagy jobb oldalába beültetett ösztradiol implantátumoknak különböző hatásai vannak az újszülött nőtény kutyakölykökre (Nordeen és Yahr, 1982), és az egy oldalra adagolt ösztradiol injekció jobban kifejezett lordosist okozott, amennyiben a hypothalamus jobb oldalára történt az anyagbeadás (Davis *et al.*, 1979). Mindkét eredményt magyarázhatjuk azzal a ténnyel, hogy újszülött nőtény patkányokban nagyobb aromataz aktivitást találtak a hypothalamus bal oldalán (von Ziegler és Lichtensteiger, 1992).

McCormick és Singh (1996) kísérlete bizonyította, hogy a szexuális fogékonyságot (pl. a lordosis jelensége) a progesteron receptoroknak a hypothalamus két féltekéjében való aszimmetrikus eloszlása befolyásolja. Ebben a tanulmányban a szerzők nem vizsgálták azt, hogy maga a jelenség mely féltekéhez köthető. A korábbi eredményeik alapján azt feltételezték, hogy a hypothalamicus aszimmetria a korábban leírt progesteron receptorok corticalis aszimmetriáján alapul, ami a bal oldal felé tolódik el. Érdeemes megemlíteni, hogy a hypothalamus lehet aszimmetrikus és befolyásolt a progesteron receptorok aszimmetrikus eloszlása miatt. Ők voltak az elsők, akik „hypothalamus féltekét” használtak a „hypothalamus oldalai” helyett, ezzel sejtetve egy erősen egymástól függő, a funkciókat oldalakra osztó kapcsolatot a hypothalamus bal és jobb oldala között, hasonlóan nagyagy kéreghez.

Ahogy a kísérleti módszerek fejlődtek és egyre finomabbá váltak új eredmények jelentek meg a hypothalamicus aszimmetria terén is. 1994-ben, Moran *et al.* csökkent ovulációs rátát mutattak ki nőtény állatokban a hypothalamus jobb oldalának elülső részén található léziókkal összefüggésben (ez a terület felelős a GnRH felszabadulásért) (Morán *et al.*, 1994). Lopez *et al.* (1997) kidolgoztak egy kísérletet, amelyben egy pilocarpin implantátumot ültettek be az agyba és magasabb fokú aszimmetriát tapasztaltak a hypothalamicus progesztin receptorok szintjén. Fukuda léziós tanulmányai alátámasztották

Gerendaiék eredményeit a petefészek működés aszimmetrikus vonatkozásában, a jobb oldalon történt beavatkozások jelentősen hatékonyabbnak bizonyult, míg a bal oldal nem volt olyan mértékben hatékony (Fukuda *et al.*, 1984).

2.4.2 Hímek

A hímek reprodukív folyamatainak a szabályozása nagyon hasonló morfológiai szerkezeten alapul a nőstényekhez (HPG tengely és GnRH neuronok). A fő különbség a nőstényekhez képest a reprodukciós ciklus teljes hiánya, amely az agy korai masculinizációját eredményezi (Jin és Yang, 2014). A nőstény állatokhoz hasonlóan már a '70-es években végeztek kísérleteket hímekben, amelyek a neuroendokrin szabályozásban aszimmetria jelenlétét mutatták ki, mind az ivarmirigyek, mind a reprodukív funkciók szintjén. Az tisztázott, hogy ez az aszimmetria jelen van a GnRH termelésben, ahogy a nőstényekben is láttuk, a GnRH termelést tekintve jobb oldali dominancia van jelen hím patkányokban is (Gerendai *et al.*, 1978).

A GnRH termeléssel kapcsolatban a nőstényekben megfigyelteket Bakalkin és mtsai. 1984-ben igazolták hímekben is, illetve további eredményeket is felmutattak. Az ő eredményeik arra is fényt derítettek, hogy a GnRH szint a hypothalamus jobb oldalán magasabb volt, mint a bal oldalon, de kizárólag abban az esetben, ha a mintavételezés a reggeli órákban (a patkányok nyugalmi időszakának elején) történt. Továbbá azt találták, hogy ha enyhe hideg stressznek tették ki az állatokat 2 órával a mintavételezés előtt, akkor ez aszimmetrikus GnRH felszabadulást eredményezett, azaz míg a jobb oldalon megnőtt a GnRH termelődés, a bal oldalon nem történt változás (Bakalkin *et al.*, 1984). Ezek a kutatások azt sugallták, hogy a hypothalamicus kolinerg rendszer kulcsszerepet játszik a stresszben és a reprodukív viselkedésben illetve a működése aszimmetriát is mutat, hasonlóan ahhoz, amit a nőstény állatokban láttunk (Mayerhofer és Kunz, 2005),.

Hím egerekben Inase és Machida (1992) szintén vizsgálták a GnRH sejteket, az ő eredményeik is egybeváltak a korábban feltártakkal. A jobb here eltávolítása a hypothalamus GnRH sejtjeinek csökkenését eredményezte a kontroll állatokhoz képest. Érdekes, hogy a bal here eltávolítása nem okozott változást a GnRH sejtek számában.

Azon kísérletek, amelyek során féloldali kasztrálást alkalmaztak - ugyanúgy, ahogy a nőstények vizsgálata esetében - a hímeknél is hozzájárult a hypothalamicus aszimmetria megértéséhez (Inase és Machida, 1992; Nance és Moger, 1982). Ezek a kutatások arra engedtek következtetni, hogy az idegi szabályozásban és a két here szteroidválaszában

fennálló lateralizáció az életkor függvényében változik (Gerendai *et al.*, 1995).

2.5 A módszerválasztás háttere

A hypothalamicus funkciók folyamatos neuronális átépülést, neuroplaszticitást (plasztikus folyamatokat) igényelnek, feltételeznek. Ezek a folyamatok különösen jellemzőek azokra a hypothalamicus folyamatokra, amelyek a táplálékfelvétellel és a reprodukív szabályozással kapcsolatosak, valamint ezek a fenti sejtszintű folyamatok rendkívül energiaigényesek (ahogy egyébként a legtöbb idegi folyamat) és ezért ezek a jelenségek véleményünk szerint jól nyomon követhetőek metabolikus vizsgálatokkal.

3 Hipotézis és célkitűzések

A fent vázoltak alapján látható, hogy a hím állatok hypothalamusának aszimmetrikus működését tekintve az eddig végzett nem célzott és rendkívül sporadikus kutatások milyen adatokkal szolgáltak. Ezen korábbi kutatásokat alapul véve a kutatócsoportunk kifejezetten a hypothalamus aszimmetriájának funkcionális aspektusát kívánta feltárni eddig nem alkalmazott, általunk újólag kidolgozott módszerek alkalmazásával.

A nagyaggyal, hipocampusszal, thalamusszal ellentétben a hypothalamust mindig is egységes egészként, egymás identikus módon működő felek alkotta struktúraként vizsgálták, mindannak ellenére, hogy egy igen kisméretű, ugyanakkor széleskörű funkcióval bíró és szembetűnő módon szimmetrikus agyterületről van szó. Kutatócsoportunk nőstény rágcsálóknál korábban már vizsgálta a hypothalamus két féltekéjének eltérő működését, de hímeknél efféle beható metabolikus vizsgálatokat még nem végeztünk.

Hipotézisünk szerint, a morfológiailag szimmetrikus hypothalamus jobb és bal oldalán elhelyezkedő magok eltérő módon, eltérő súllyal vesznek részt az egyes feladatok ellátásban, azaz a hypothalamus két oldala féltekékként működnek együtt hasonlóan, mint a magasabb agyi területek (cortex, thalamus). E feltételezésünket a nőstényeken végzett kísérletek teljes mértékben alátámasztották (Toth *et al.*, 2014, 2015). Jelen vizsgálataink a hímek hypothalamusféltekéinek eltérő működésére próbálnak rávilágítani.

A kutatásunk során hím patkányokban célunk volt megvizsgálni, hogy kimutatható szinten fennáll-e hypothalamicus metabolikus lateralizáció. A kísérleteinket 3 szempontot figyelembe véve terveztük meg:

1. a tápláltsági állapot és a hím nemi hormonok együttes hatása,
2. a tápláltsági állapot hatásának vizsgálata programozott etetéssel, valamint
3. a programozott etetés hatása az állatok aktív időszakában (sötét periódus)

4 Anyag és módszer

A célkitűzésben említett metabolikus vizsgálatokat mitokondriális légzésmérés révén végeztük el. A légzésméréshez hím állatok hypothalamicus szövetmintáiból magas életképességű mitokondriális frakciókat nyertünk ki.

4.1 Kísérleti állatok

A kísérleteinkhez intakt és kasztrált hím Wistar patkányokat (*Rattus norvegicus*, fajta: Crl:[WI]BR) használtunk, csoportokra osztva. A kutatáshoz szükséges állatvédelmi engedély száma: XIV-I-001/2202-4/2012 és PEI/001/665-8/2015.

Az állatokat legalább 5 hétig gondoztuk a feláldozásuk előtt, testsúlyuktól függő mennyiségben általános rágcsálótápot (gyártó: FarmerMix Kft., Zsámbék, Magyarország) és *ad libitum* csapvizet kaptak.

4.1.1 A tápláltsági állapot és a hím nemi hormonok együttes hatása

Három héttel a kísérlet előtt a 7 hetes állatokat két csoportra osztottuk. Mindkettő csoport szabályozott 12 órás sötét és világos ciklusban tartottuk (a lámpa 7 órakor kapcsolt le). Az egyik csoport intakt maradt, míg a másik csoport egyedeit ivartalanítottuk standard anesztéziában, ketamin+xylazin kombinációban (75 mg/kg ketamin, 0,2 mg/állat xylazin, subcutan beadva). Ezután a heréket egy vágáson keresztül eltávolítottuk a herezacskóból. A seb bezárása után butorphanolt (2,0 mg/kg) adtunk nekik postoperatív analgesia céljából, subcutan fiziológiás sóoldattal együtt. A kísérlet előtt az állatokat véletlenszerűen még két csoportra osztottuk, az egyik csoport maradt *ad libitum* etetve, míg a másikat 24 óráig éhezettük a dekapitálás előtt (ami reggel 7 órakor történt, mély isoflurán anesthesiában), folyamatos vízellátás mellett. Összefoglalásként az alábbi csoportokkal dolgoztunk: intakt *ad libitum* etetett hímek (*T+ad lib.*; n=7); intakt éheztetett hímek (*T+éh.*; n=7); kasztrált *ad libitum* etetett hímek (*cast.+ad lib.*; n=7); kasztrált éheztetett hímek (*cast.+éh.*; n=6).

4.1.2 A tápláltsági állapot hatásának vizsgálata programozott etetéssel

Hathetes intakt hímeket 11 csoportba (6 állat/csoport) osztottunk és programozottan etettünk (világos periódus: reggel 8-este 8, *ad libitum* etetés reggel 8-9) 4 héten át. A 11 csoport közül az egyes csoportokat az etetési ciklusuk egy-egy adott időpontjában áldoztuk fel mintavételezésre. A 11 mintavételezés 2, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18 és 22 órakor történt.

4.1.3 A programozott etetés hatása az állatok aktív időszakában (sötét periódus)

Hathetes intakt hímeket 3 csoportba (7 állat/csoport) osztottunk és programozottan ettünk (világos periódus: délután 15-hajnal 3) 4 héten keresztül. Az etetés a fentiek alapján korlátozott mennyiségű táppal az aktív (sötét) periódusuk alatt történt, 5 órával a lámpakapcsolás után. A mintavételezés a táplálkozási ciklusuk 3 különböző időpontján történt: közvetlenül etetés előtt (reggel 9), egy órával előtte (reggel 8), egy órával később (reggel 10).

4.2 Előkészületek

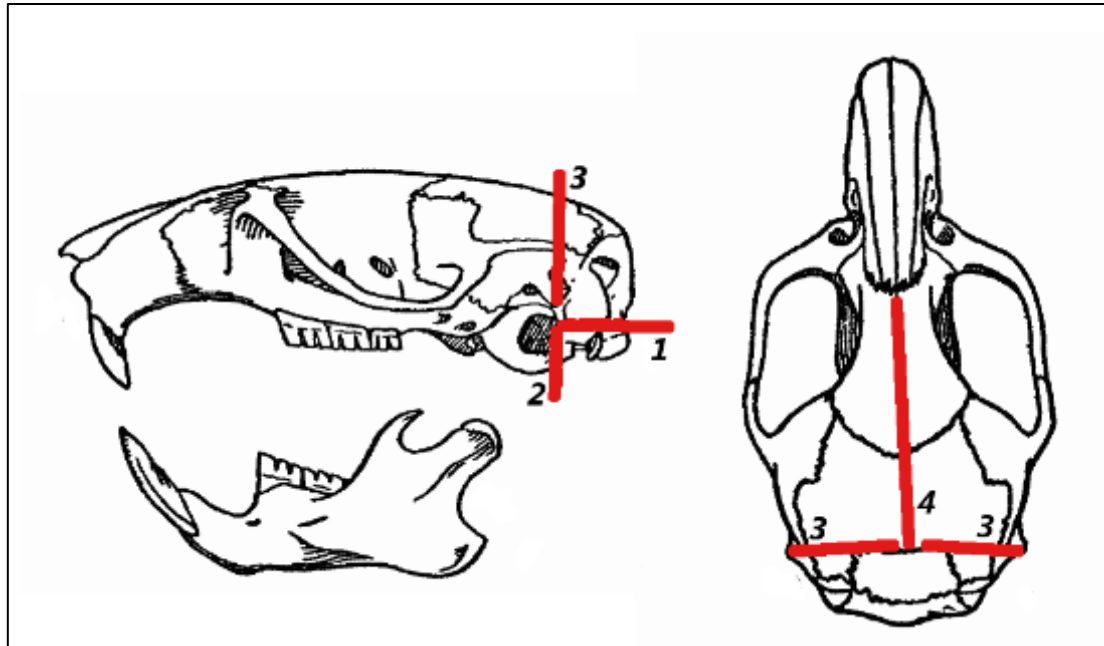
A mitokondriumok kinyerése során használt oldatokat és eszközöket lehűtöttük és 4 °C-on tároltuk a teljes folyamat során, hogy megelőzzük a kísérlet számára káros biokémiai folyamatok beindulását.

A bemutatott módszer három fő lépésből áll: (1) a tisztítatlan (nyers) mitokondriális frakció előállítás; (2) e frakció megtisztítása egyszerűsített Percoll-gradiens frakcionálással; (3) a Percoll eltávolítása a tisztított mintából.

4.3 A nyers mitokondriális frakciók kinyerése

4.3.1 Az agy kiemelése

Az állatot guillotine-nal dekapitáltuk, majd vért vettünk tőle a későbbi szérumszint méréshez. Ezután a koponya parietális és occipitális részéről eltávolítottuk a bőrt és az izmokat. Egy horizontális metszést ejtettünk a foramen magnumtól a hallójárat irányába (1), mindkét oldalon. A metszéstől ventrálisan levő basalis régiót eltávolítottuk (2). A sutura lambdoidea mentén koronálisan metszettük be a koponyacsontot mindkét oldalon (3), majd eltávolítottuk a koponya parietális régióját. A sutura sagittalis mentén ejtettünk egy metszést szétválasztva ezzel a kétoldali os frontale-t és os parietale-t (4). A parietális és frontális csontok kifordításával megnyitottuk a koponyát. **(2. Ábra)** Az agyat a koponya a craniális végéről felemeltük egy spatulával, majd egy éles ollóval elvágtuk a n. opticust. A koponyából kiemelt agyat előre 4 °C-ra hűtött agymátrixba helyeztük, ahol eltávolítottuk a kötőszövetet a hypothalamus basalis részéről. A hypothalamus izolálásához a chiasma opticum caudalis része és a corpus mamillare közötti részt emeltük ki. Az így kapott agydarabot a craniális szélével lefelé Petri-csészére helyeztük, majd az area piriformist, a thalamicus és cortikális régiókat eltávolítva nyertük ki a páros hypothalamust, amelyet bal és jobb részre osztottunk, hogy elkülönítve tudjuk azokat vizsgálni.



2. ábra A hypothalamus kiemeléséhez a koponyán ejtett bemetszések

4.3.2 Homogenizálás

A kinyert hypothalamusfelek tömegét lemértük, amelyek a jelen kísérletes beállítások mellett 18-20 mg tömegűek voltak, majd ezután homogenizáltuk a mintákat.

Az életképes mitokondriumok elkülönítéséhez Potter-Elvehjem üveg-teflon, motorizált homogenizátort használtunk. A folyamat során minden eszközt 4 °C-ra hűtve használtunk, még a homogenizátor szárát is. Minden mintát egyesével homogenizáltunk és a minták között a homogenizátor szárát friss pufferoldattal tisztítottuk meg.

4.4 Differenciál frakcionálás

A homogenizálás után Eppendorf-csőbe töltöttük a sejtalkotókat és sejtörmelék tartalmazó puffert. Ezután a homogenizátum a következő centrifugálási lépéseken esett át (minden lépés 4 °Celsius történik). Azért, hogy megszabaduljunk a nagyobb sejtörmelékektől első lépésként minden homogenizált mintát 3700 rpm (d=100mm) sebességgel centrifugáltunk 4 percig. Centrifugálás után a felülúszót begyűjtöttük üres Eppendorf-csővekbe, majd az üledéket felfuszpendáltuk 750 µl izolációs pufferoldattal (215 mM Mannit, 75 mM Szacharóz, 0,1% BSA (bovine serum albumin), 1 mM EGTA (etilén-glikol-tetraecetsav), 20 mM HEPES (4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav) és újra centrifugáltuk az előző paraméterekkel.

A második centrifugálás után a felülúszót szintén begyűjtöttük és hozzáöntöttük az előzőhöz. Ezután az üledéket tartalmazó csöveket eldobtuk, mert azokban már csak a számunkra érdektelen sejtörmelék volt. A felülúszókat tartalmazó csöveket centrifugáltuk 11800 rpm (d=100mm) sebességgel 11 percig. Centrifugálás közben a mitokondriumok lesüllyedtek az üledékbe, a felülúszóban maradtak a kisebb fajsúlyú sejtörmelékek és sejtorganelumok, amiket leöntöttünk és eldobtunk. Az üledéket újra felfuszpendáltuk 500 µl pufferoldattal és ezzel megkaptuk a nyers mitokondriális frakciót, ami még tartalmazott szennyező részecskéket.

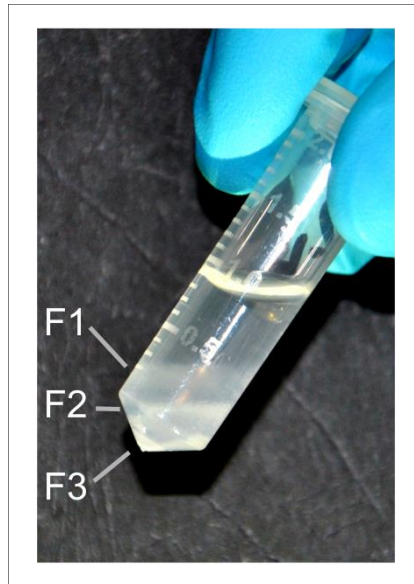
4.5 A nyers mitokondriális frakciók megtisztítása

A következő lépésben a két felülúszóból előkészítettük a kétrétegű Percoll-gradienst (GE Healthcare) egy 2 ml-es centrifugacsőben. A 0%-os Percoll-réteg maga az opaleszkáló minta, azaz nyers mitokondriális frakció, e fölé rétegeztük nagyon óvatosan a 15%-os Percoll-oldatot, úgy, hogy elkerüljük a legkisebb keveredést is. Ezt úgy tudtuk a legkönnyebben megvalósítani, hogy nagyon lassan engedjük bele az oldatot a csőbe, illetve a pipetta hegyét hozzányomtuk a cső falához, ezzel hidat alkotva a folyadéknak.

A Percoll-gradienst tartalmazó csöveket nagyon óvatosan kezeltük, hogy elkerüljünk bármilyen keveredést a gradiensrétegek között. A mintákat 15400 rpm (d=100mm) sebességgel 7 perc 40 másodpercig centrifugáltuk. Annak érdekében, hogy megvédjük a rétegeket a centrifugálás során az összekeveredéstől a rotor gyorsulását a legalacsonyabb szintre állítottuk, és a féket kikapcsoltuk, hagytuk a rotort a tehetlenségénél fogva leállni.

Ez a módszer lehetővé teszi, hogy a szóban forgó igen kis mennyiségű és heterogén összetételű idegszövetből kiindulva is el tudjuk választani a mitokondriumok és a szinaptosómák frakcióját olyan sejtalkotóktól és sejtörmeléktől, amelyek negatívan befolyásolnák a minták metabolizmusának mérését.

A centrifugálási lépést követően három, szemmel láthatóan is elkülönülő réteget kaptunk. Az legfelső rétegben a myelin és más lipid összetevőket tartalmazó szennyeződés, a másodikban maga a szinaptosómális frakció, a legalsóban a sejtmag körüli mitokondriumok találhatóak. **(3. ábra)** A kutatásunk célkitűzésének megfelelően, a két, mitokondriális subfrakciót gyűjtöttük össze egy tiszta Eppendorf-csőbe, a legfelső, sejthártyát és myelin törmelékét tartalmazó réteget eldobtuk.

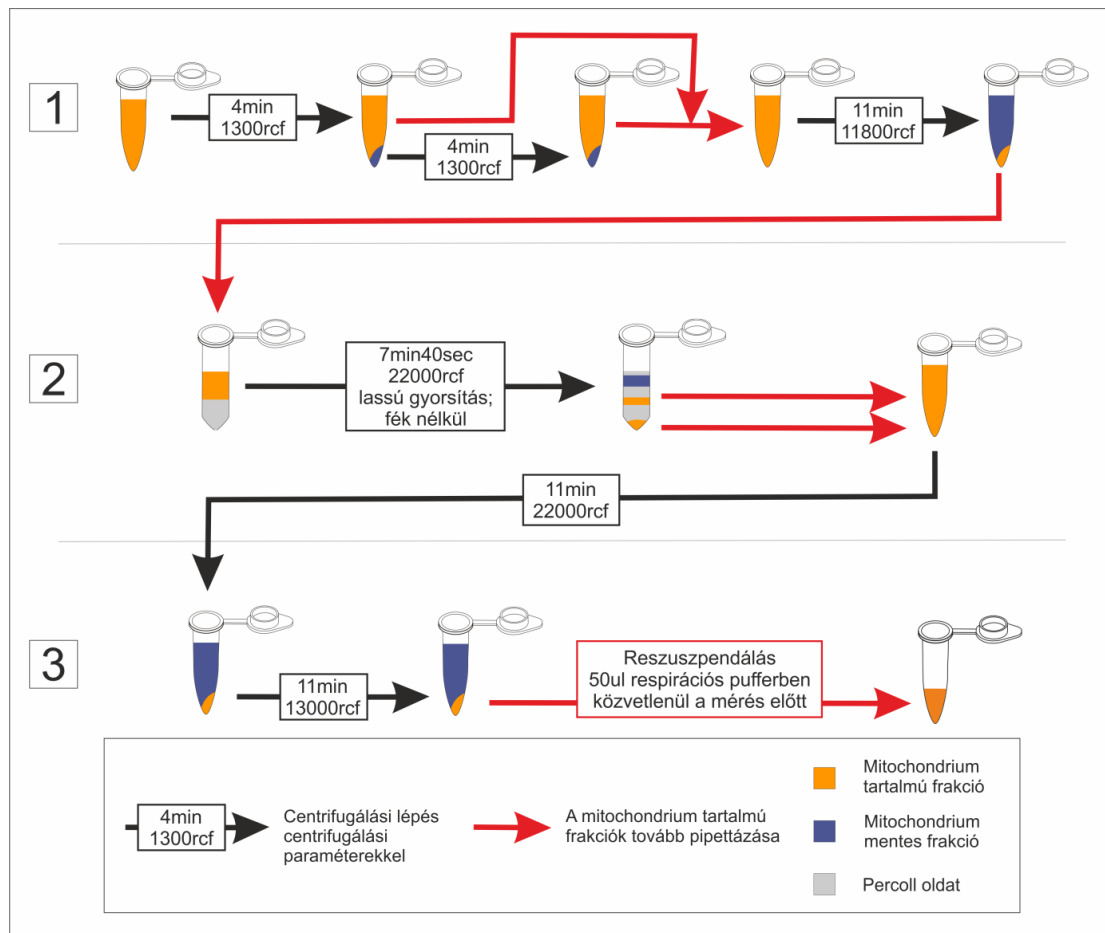


3. ábra F1: myelin és más lipid összetevőket tartalmazó szennyeződés; F2: szinaptoszómális frakció; F3: sejtmag körüli mitokondriumok

4.6 A Percoll eltávolítása a tisztított mintából

Ebben a lépésben begyűjtött frakciók mentesek minden szennyezőanyagtól, de nagy mennyiségű Percollt tartalmaznak, amit el kell távolítanunk a mintákból. Jelenlegi tudásunk szerint a Percoll biológiailag inert anyag, de jelentősen zavarja a méréseket, ugyanis olyan polimer makromolekulákból áll, amelyek viszkozitása és nagy fajlagos helykitöltő képessége miatt megakadályozhatja a légzést módosító anyagok bejutását a mitokondriumokba.

Azért, hogy eltávolítsuk a nem kívánt Percollt egy további nagy G értékű centrifugálási lépéssel egészítettük ki a frakcionálást. A fentiekben összegyűjtött mitokondriális frakciókat újra felfuszpendáltuk, az azokat tartalmazó mikrocentrifuga csöveket 1,5 ml töltöttük izolációs pufferrel, majd centrifugáltuk 15400 rpm (d=100mm, max. gyorsulás, max. fékezés) sebességgel 11 percig. E lépést követően a Percollt tartalmazó felülúszót óvatosan leöntöttük, az üledéket pedig ezúttal 1 ml EGTA-mentes pufferrel (215 mM Mannit, 75 mM Szacharóz, 0,1% BSA, 20 mM HEPES) felfuszpendáltuk, majd 11800 rpm (d=100mm) sebességgel centrifugáltuk 11 percig. Az így kapott, légzésmérésre alkalmas mintákat a mérés megkezdéséig 4 °C-on tároltuk. **(4. Ábra)**



4. ábra A mitokondriális frakciók kinyerésére alkalmazott differenciál- és gradiensfracionálási eljárás lépései (forrás: Dr. Tóth István)

4.7 Mitokondriális légzésmérés

A méréshez való előkészítésként a mintákról a felülúszót leöntöttük és a mitokondriális frakciót tartalmazó üledéket 50 µl respirációs pufferrel (210 mM Mannit, 75 mM Szacharóz, 0,1% BSA, 2 mM MgCl, 2,5 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES) szuszpendáltuk fel, így átlagosan 4,2 mg/ml fehérje koncentrációjú szuszpenziókat kaptunk. A kinyert mitokondriumok metabolikus aktivitását Clark-féle oxigénelektrod segítségével mértük. A metabolikus aktivitást (légzési tevékenységet) 5 különböző légzést módosító vegyület egymást követő alkalmazásával mértük, az eredményeket percenkénti oxigénfogyasztásban fejeztük ki (nmol O₂/ml/min).

Az öt légzésmódosító vegyület 5 különböző ún. légzési stádiumot határoz meg. Minden légzési stádiumot kb. 60 másodpercig mértünk. Ezek a stádiumok a következők voltak:

St1: mitokondriális alap oxigénfogyasztás, légzésmódosító anyag hozzáadása nélkül

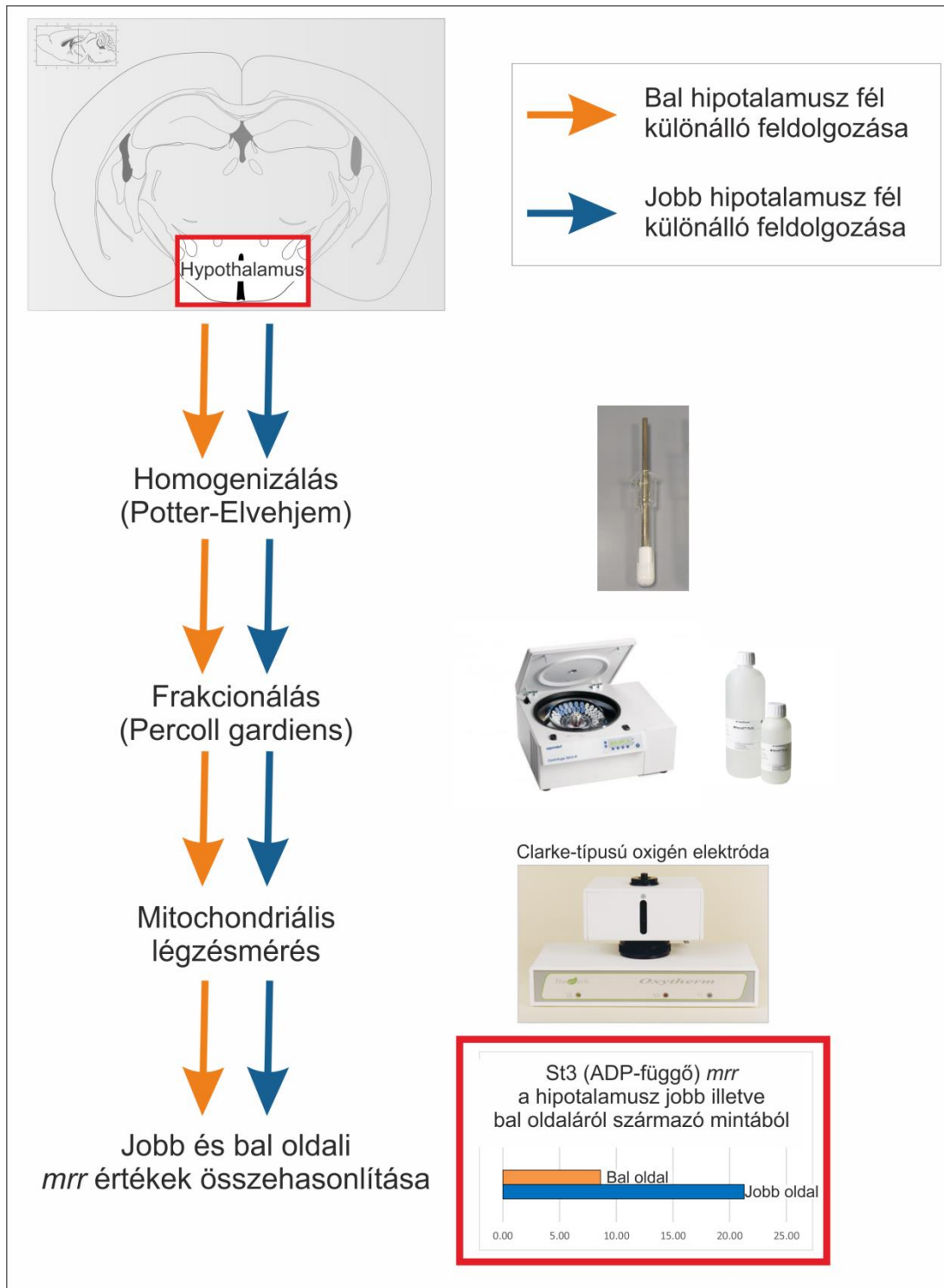
St2: mitokondriális működés a citrát-ciklus oxidatív szubsztrátjai jelenlétében (piroszőlősav és almasav, 5 mM és 2,5 mM végkoncentrációban), de hozzáadott ATP-szintáz szubsztrát (ADP) hiányában. Ilyen körülmények között a citrát-ciklus növekvő aktivitása és növekvő oxigénfogyasztás miatt a terminális oxidáció és az oxidatív foszforiláció is fokozódik, amennyiben más leszabályzó mechanizmusok nem módosítják ezt. Az St2 légzési rátát a mitokondriumok endogén ADP-szintje korlátozza.

St3: a harmadik szakaszban ADP-t adunk a mintákhoz 130 mM végkoncentrációban. Az ADP az ATP-szintáz szubsztrátja, ezáltal a mitokondriális légzés leghatékonyabb serkentője. Az ADP jelenlétében a légzési ráta növekszik, ha a fenti szubsztrátok továbbra is jelen vannak. Ebből adódóan, ha többletben adjuk az ADP-t a mintához az oxidatív foszforilációt gátolja az ATP-szintáz aktivitás.

St4: A negyedik szakaszban oligomicint (2,5 mM) adunk a mintákhoz, ami blokkolja az ATP szintáz aktivitást, ebből adódóan az oxidatív foszforilációt is, habár a terminális oxidáció tovább folytatódik. Ez a stádium a mintában levő mitokondriumok szétkapcsoltságának mértékéről és az alternatív utak aktivitásáról szolgáltat információt. Élettani körülmények között a szétkapcsolás és az alternatív oxidáció fontos szerepet játszik a mitokondriális energiatermelésének (ATP) finomszabályozásában.

St5: Végül egy cianid származékot, FCCP-t (5 mM) adunk a mintához, ez átjárhatóvá teszi a protonok számára a mitokondriumok belső, ami leállítja a mitokondriális légzést. Az ennél a stádiumnál tapasztalt oxigénfogyasztási ráta függ a szövet kezdeti metabolikus állapotától, a mitokondriumok légzési kapacitásától.

Terjedelmi és technikai okokból ebben a dolgozatban elsősorban az St3 és St4 légzési stádium eredményeit mutatjuk be mivel korábbi eredményeink alapján ez az a két légzési stádium, ami a legmesszemenőbben jellemzi az adott szövetek metabolikus aktivitását. **(5. Ábra)** A statisztikai elemzéseket Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) programban végeztük el. Fisher's exact testet használtunk, hogy értékeljük a féloldaliságot, és two-way ANOVA-t Bonferroni korrekcióval, hogy összehasonlítsuk az aszimmetria mértékét a csoportok között.



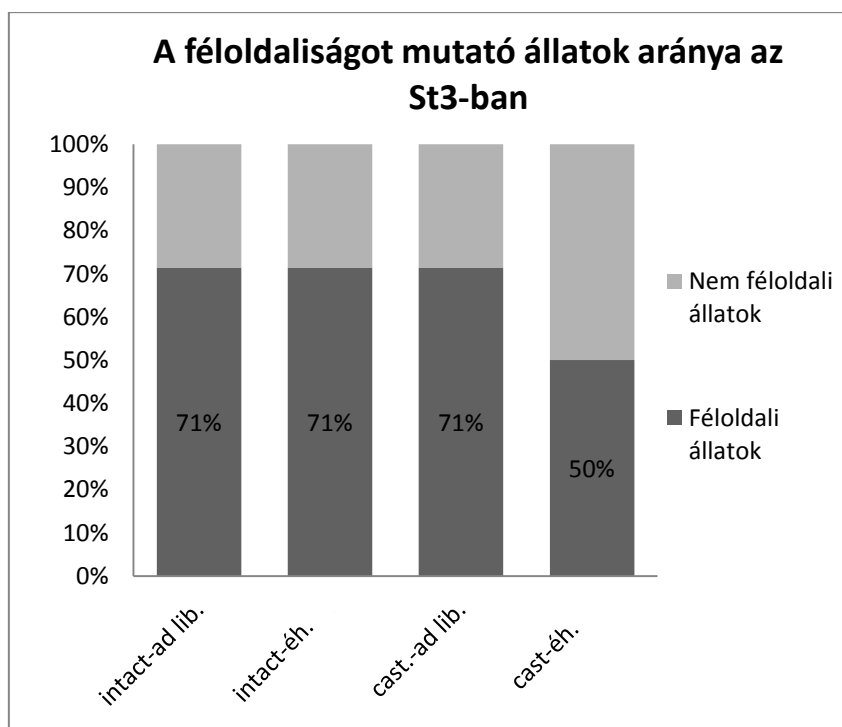
5. ábra A kísérleti felszerelés. A mitokondriális légzési rátát (*mrr*) az elkülönített bal és jobb hipotalamuszfelekből mértük a synaptosomális és mitokondriális frakcióból. (forrás: Dr. Tóth István)

5 Eredmények

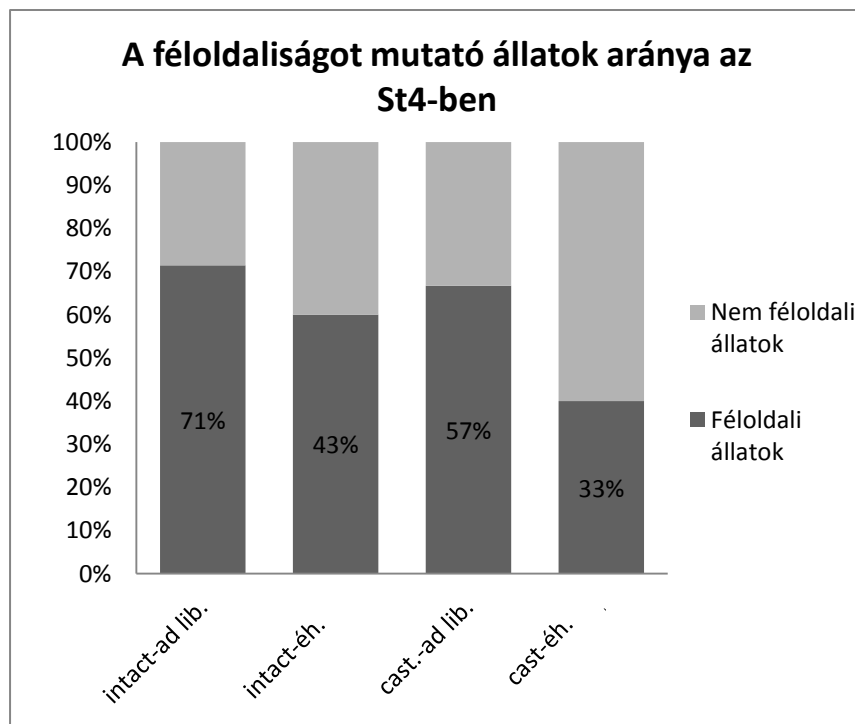
5.1 A tápláltsági állapot és a hím nemi hormonok együttes hatása

Kísérleteink során elsőként az egyes kísérleti csoportokban meghatároztuk a hypothalamicus metabolizmus tekintetében a féloldaliságot mutató állatok százalékos arányát a teljes vizsgált populációban. Azokat az állatokat tekintettük féloldalinak, amelyeknél az egyik oldalnak a metabolikus aktivitása legalább 20 %-kal nagyobb volt, mint az ellenoldali párja. Ezt a százalékhatárt a kutatócsoportom korábbi publikációja alapján határoztuk meg (Toth *et al.*, 2015).

Az St3-ban nem volt változás az arányokban (kb. 70 %) a két fél között tekintettel a kísérleti csoportokra, kivéve a kasztrált és éheztetett állatoknál, ahol mindössze csak az egyedek 50 %-a bizonyult metabolikusan kiegyensúlyozatlannak. (6. Ábra) Ellenben az St4-ben, mindkét éheztetett csoportban jelentősen alacsonyabb volt a féloldaliságot mutató állatoknak a számaránya az *ad libitum* etetett állatokhoz képest. (7. Ábra)

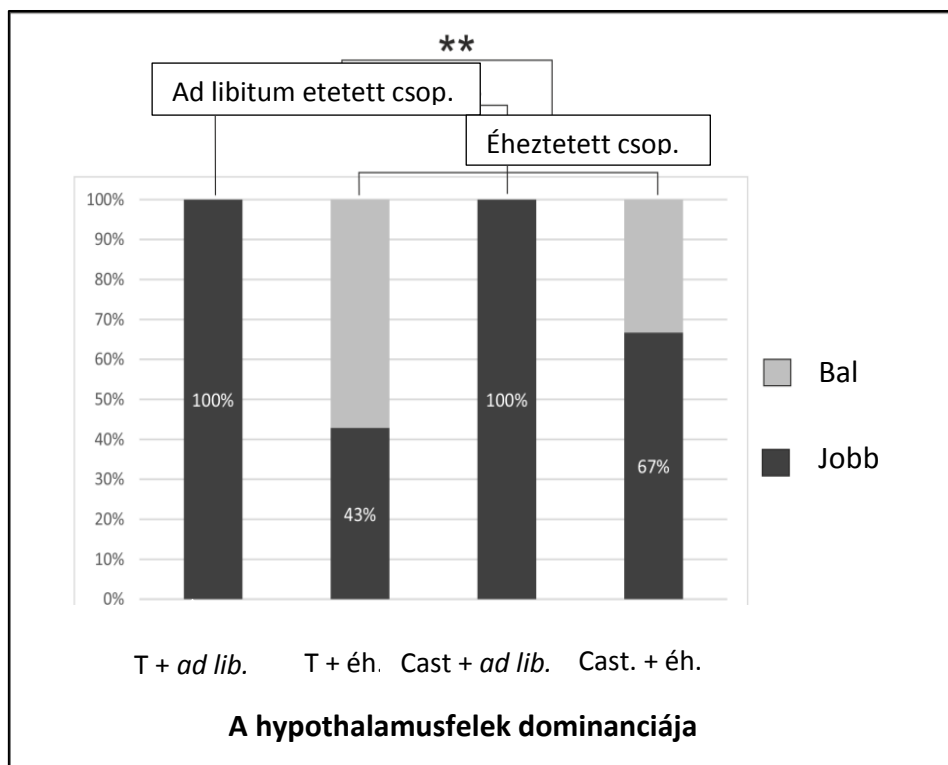


6. ábra A hypothalamicus aszimmetria az St3 fázisban, az állatok százalékában kifejezve a mitokondriális légzés során.



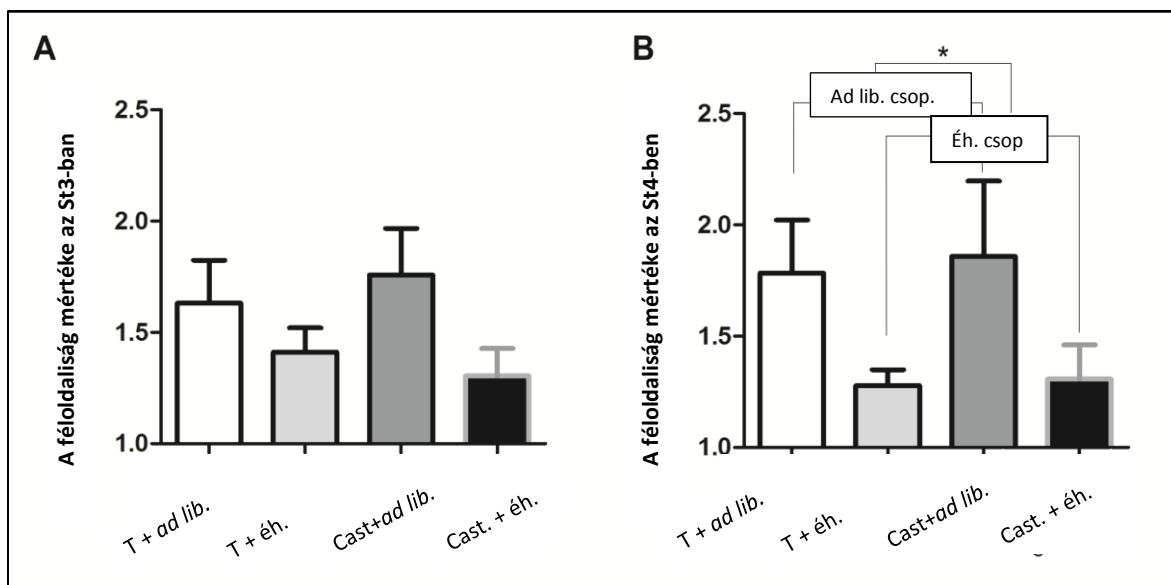
7. ábra A hypothalamicus aszimmetria az St4 fázisban, az állatok százalékában kifejezve a mitokondriális légzés során.

Annak érdekében, hogy megmagyarázzuk a bal és jobb oldali dominancia megoszlását, csak a féloldaliságot mutató állatokat vettük figyelembe a továbbiakban. Az *ad libitum* etetett állatok esetében teljes mértékben jobb oldali dominancia volt az egyeduralkodó, gonadális hím nemi hormon jelenlététől függetlenül. Ezzel ellentétben az éheztetett állatokban a jobb és bal oldali dominanciát mutató állatok százalékos aránya megközelítőleg egyensúlyban volt, az egyedeknek csak 40-60%-a mutatott jobb oldali dominanciát. A kapott eredmény szignifikáns ($p < 0,01$). **(8. Ábra)**



8. ábra A jobb és bal hypothalamusfél dominanciájának megoszlása hím patkányokban a mitokondriális légzés St3-ban. * * Az eredmény szignifikáns ($p < 0,01$)

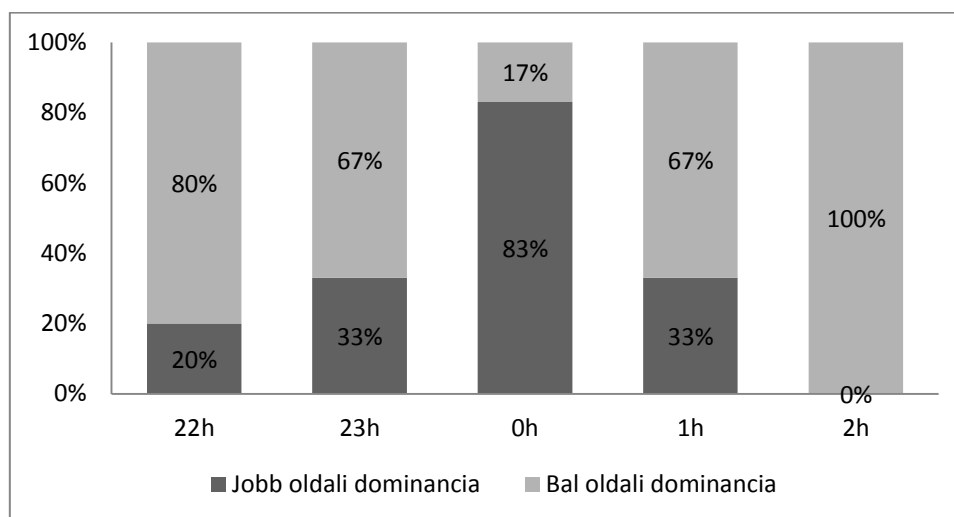
Ezt követően megvizsgáltuk a metabolikus lateralizáció mértékét, azaz, hogy a jobb és bal oldali hypothalamus metabolikus aktivitása milyen mértékben tér el egymástól (kizárólag St3 és St4 vonatkozásában). Azt az eredményt kaptuk, hogy az oldalak közti különbség határozottan magasabb volt az *ad libitum* etetett állatoknál, és elérte a szignifikáns szintet is az St4-ben ($p=0.0384$). Ellenben ezzel az orchiektomia, függetlenül a jóllakottság állapotától csak gyenge változásokat okozott a két oldal közötti metabolikus különbségekben. Itt kell megjegyezni, hogy az *ad libitum* etetett csoportokban – függetlenül a nemi hormon jelenlététől – néhány állat jobb és bal oldali hypothalamusfelei metabolikus egyensúlyt mutattak mind az St3-ban, mind pedig az St4-ben (ezt az ábrán nem jelöltük). **(9. Ábra)**



9. ábra A hypothalamicus aszimmetria mértéke az St3 és St4-ben hím patkányokban. *Az eredmény szignifikáns ($p < 0,05$)

5.2 A tápláltsági állapot hatásának vizsgálata programozott etetéssel

A hypothalamus metabolikus jelenségeinek további tisztázásáért programozott etetést alkalmaztunk intakt hím patkányokon és vizsgáltuk a metabolikus változásokat etetés előtt és után. A mitokondriális légzési ráta a bal oldali dominancia folyamatos (és exponenciális) emelkedését mutatta 20-0 óra között. A táplálékfelvételt követően (0 óra) újra a jobb oldali dominancia fokozatosan megjelent, és két órával később teljesen visszaállt az alapszintre. (10. Ábra)

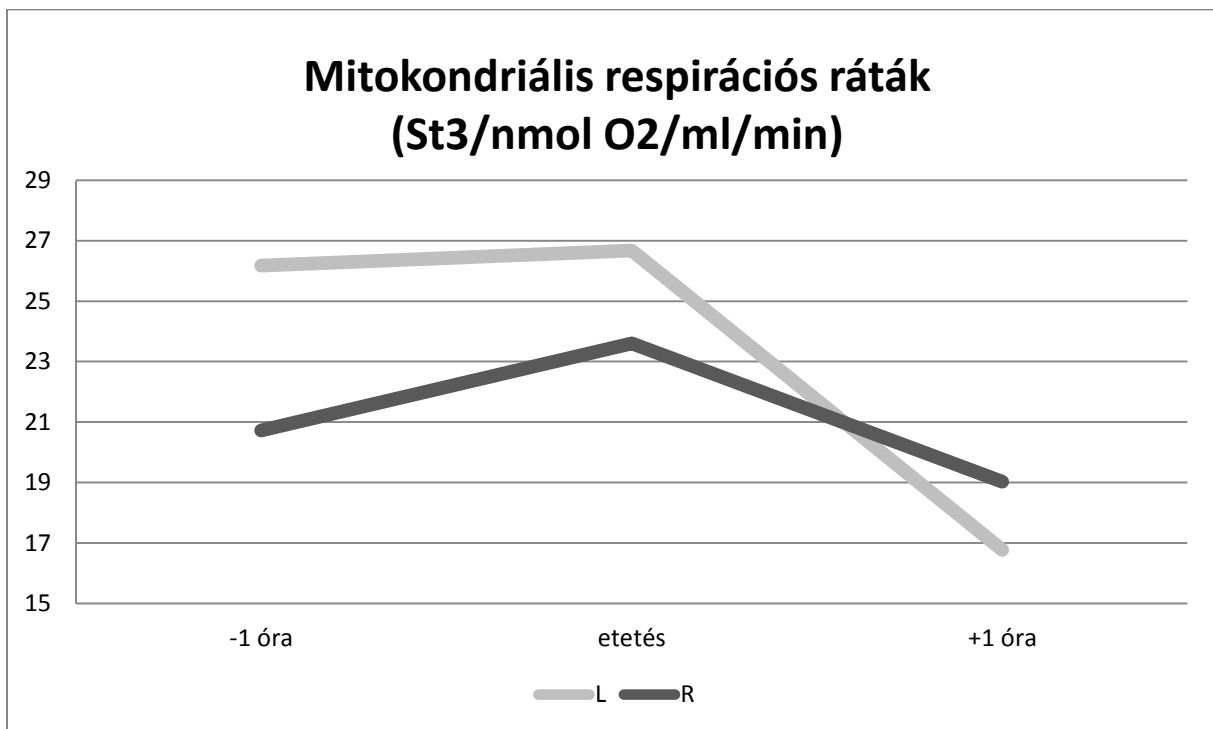


10. ábra A jobb és a bal oldal dominanciájának megoszlása hím patkányokban programozott etetés során, az etetés környékén.

5.3 A programozott etetés hatása az állatok aktív időszakában

Mivel az 5.2-ben mutatott kísérleti beállításnál a cirkadián fázisváltás időpontja egybeesett a táplálékfelvétel időpontjával, ezért annak érdekében, hogy tisztázzuk, melyik tényező van nagyobb befolyással a fent bemutatott dominancia viszonyokra, a harmadik kísérletsorozatunk során megvizsgáltuk, hogy mi történik az egyes oldalak metabolikus aktivitásában, ha az állatok az aktív időszak közepén kapják az élelmet. Ezért rövid etetési periódust alkalmaztunk éjszaka (ez a patkányok aktív időszak) olyan távol a napszakváltásuktól, amennyire csak lehet.

Az eredmények azt mutatták, hogy a táplálékmevönás végső fázisában a bal félteke aktívabb volt, egészen az etetés pillanatáig, miután ez az aktivitás szembetűnő csökkenést mutatott, míg egy órával az etetést követően a jobb oldal dominanciája fokozatosan az alapszintre állt. Továbbá megjegyzendő, hogy mindkét oldal aktívabb volt az etetést megelőzően, majd az etetést követően mindkét oldal aktivitása lecsökkent. (11. Ábra)



11. ábra A mitokondriális respirációs ráták átlagértékei az etetés előtt, közben és után

6 Az eredmények megvitatása

6.1 A tápláltsági állapot és a hím nemi hormonok együttes hatása

Toth *et al.* (2015) kimutatták, hogy a nőstény patkányokban a lateralizált állatok aránya a nemi hormonok jelenlététől vagy hiányától és nem a jóllakottság mértékétől függően változott. Jelen kutatásunkban a nemi hormonok és a jóllakottság állapotát ezúttal hímeken vizsgálva azt az eredményt kaptuk, hogy sem a bilaterális orchiektomia, sem az élelem megvonása nem eredményezett feltűnő eltérést a féloldaliságot mutató és nem mutató egyedek számaránya között. Habár ez a jelenség azt sejteti, hogy az aszimmetrikus hypothalamicus metabolizmus nem változott kísérletes manipuláció során, a bal-jobb dominancia aránya és az aszimmetria mértékének további elemzése volt szükséges ahhoz, hogy a jobb és bal oldal közötti dinamikusan változó aktivitásviszonyok a jóllakottság mértékével és ezzel együtt a szervezet metabolikus állapotával lehetnek összefüggésben.

Az *ad libitum* etetésnél a lateralizált hím állatokban a jobb hypothalamusfélteke metabolikusan aktívabb volt, míg a 24 órás élelemmegvonás során a bal oldal mutatott metabolikus dominanciát, közel az egyedek felében. Ez egybevág a korábbi eredményekkel nőstény állatokban (Toth *et al.*, 2015), ahol az éheztetés kiegyensúlyozta a bal és jobb oldal dominanciáját az St3-ban, ugyanakkor a jóllakottság állapota mindezzel együtt is kisebb hatást gyakorolt a hypothalamicus metabolizmusra a gonadectomia hatásával összehasonlítva. A mi kísérleteinkben a hím patkányokban az élelemmegvonást követően jelentkező bal oldali dominancia egyezik a macskákban, illetve nyulakban találtakkal (Pavlova *et al.*, 1996; Vanetsian és Pavlova, 2004)), amiből arra lehet következtetni, hogy a táplálékkeresés és táplálékfelvétel hypothalamicus szintű irányításának lateralizáltsága általános jelenség lehet az emlősállatokban..

Ezt a megállapítást támogatja a metabolikus aszimmetria mértéke is. Az *ad libitum* etetett állatokban (mind St3-ban, mind St4-ben) az aszimmetria magasabb mértékét figyeltük meg. A metabolikus különbségek a kísérleti csoportok között (tekintettel az etetésre és az ivari feltételekre), jelentősen magasabbak voltak St4-ben, mint St3-ban, habár ennek a jelenségnek a sejszintű háttere tisztázásra szorul.

6.2 A tápláltsági állapot hatásának vizsgálata programozott etetéssel

Habár a dekapitálások reggel ugyanabban az időpontban történtek a mintavételezés előtt, az egyes, *ad libitum* etetett állatok különböző stádiumban lehettek a saját táplálkozási ciklusuk tekintetében. Azaz például egyes állatok éppen a mintavétel előtt táplálkoztak, míg mások már korábban, vagy éppen félbeszakítottuk a táplálkozásukat a beavatkozással. Magától értetődően ugyanez a koncepció fennállhat az éheztetett állatok esetében is. Ez volt az oka annak, hogy felállítsunk egy csoportot intakt felnőtt egyedekből és szigorúan szabályozott etetés mellett tartottuk őket a mintavétel előtt 4 hétig. Ez a felállítás lehetővé tette az irányított és pontosabb jóllakottsági körülményeket.

A szigorúan programozottan etetett állatokból kapott eredmények támogatták azt az elgondolást, miszerint az éhezés fokozza bal oldal metabolikus aktivitását, és elnyomja a jóllakottság karakterisztikus jobb oldali dominanciáját. Eszerint ez a metabolikus változás fokozatosan lépett fel, ahogy az éhezés kicsúcsosodott, majd az etetés után a jobb oldali dominancia visszatért a jóllakottság esetén tapasztalt szintre.

6.3 A programozott etetés hatása az állatok aktív időszakában

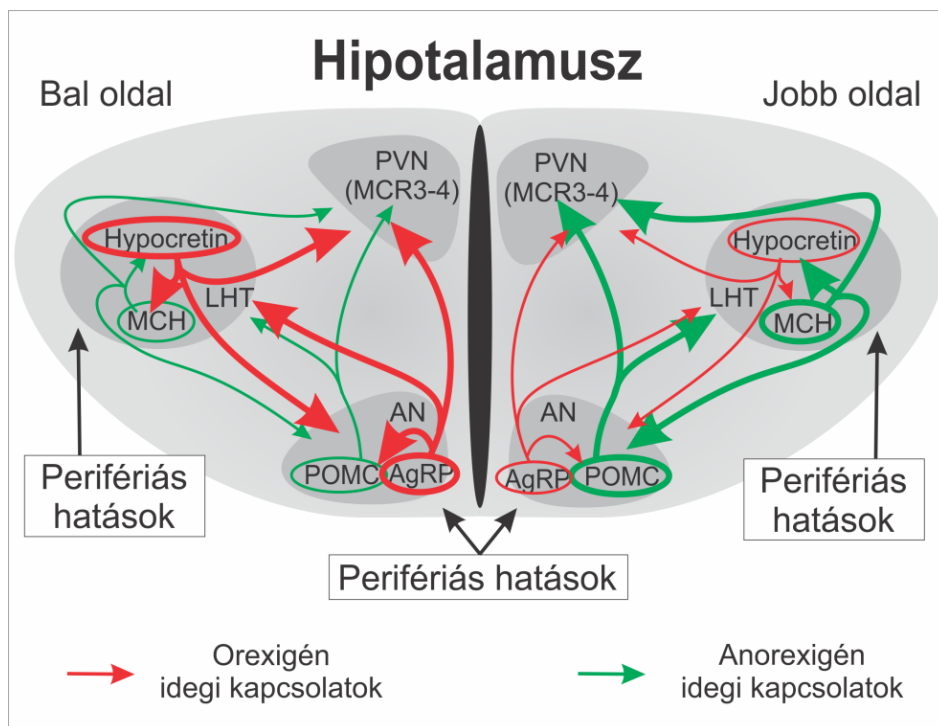
Abban az esetben, amikor programozott etetéssel kikerültük a cirkadián ritmus feltételezhető hatását a kísérletre, maga a programozott etetés egymagában is előidézte a lateralizált metabolikus változásokat a két hypothalamusfélteke között. Csakúgy, mint az 5.2 kísérletben a táplálékmegevonás hatására erősödött a bal oldali dominancia, míg jóllakottságnál ez éppen fordítva történt, a jobb oldal dominált. Ebből arra következtethetünk, hogy a táplálékkereső viselkedés valamilyen módon összefüggésben áll a bal oldali hypothalamusféllel, míg a jóllakottsághoz köthető eseményekben a jobb oldal dominál.

Korábbi tanulmányok alapján a jóllakottság és a kapcsolódó jutalmazó mechanizmus lehet a kapocs a féltekék lateralizációja és a különböző agyterületek között, a hypothalamuson kívül is. Emberekben például a jobb prefrontális cortex játszik döntő szerepet a jutalomgeneráló mechanizmusban, míg ezt nem tudták igazolni a bal ellenoldalon. Ezzel párhuzamban az emberi gourmand szindróma (abnormális szenvedély az ízletes ételek evéséhez) összefüggésben áll jobb oldali frontális sérüléssel (Regard és Landis, 1997; Uher és Treasure, 2005). Továbbra is tisztázásra szorul, hogy ez a funkcionális aszimmetria megjelenhet-e a perifériás autonóm idegrendszerben vagy a hypothalamus és a cortex közötti aszimmetrikus kapcsolatokban, esetleg mindkettőben.

Összefoglalásképpen, az éhezés elnyomta a jobb oldali dominanciát (legalábbis a jelen kísérleti körülmények között), feltételezhetően orexigén folyamatok aktiválásával a bal oldali hypothalamusfélben. A táplálékfelvételt követően ez az orexigén aktivitás bizonyára megszűnt és ezáltal visszaállt a jobb oldali dominancia. Ezen eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a már alaposan kutatott dinamikus kölcsönhatások az orexigén és anorexigén hypothalamicus központok között eltérhetnek a bal és jobb oldalon.

Ad libitum etetés során az állatokban alacsony a keringő orexigén faktorok száma (pl.: ghrelin) (Ariyasu *et al.*, 2001). Ebben az állapotban a POMC sejtek megszabadulnak az AgRP tonikus gátló hatásától, és ez az MCR3 és MCR4 melanokortin receptorok aktiválódását eredményezi (Horvath, 2005). Habár ez a neuronális aktiváció megtörténhet mindkét hypothalamusfélben, a mitokondriális légzésmérés során kapott eredményeink azt jelzik, hogy erősebb az aktiváció a jobb oldalon, mint a balon, tehát az állat jóllakottság érzése elsődlegesen a hypothalamus jobb oldalától függ.

Másrésről táplálékmegevonás esetén az éhség jeleit a ghrelin keringésben emelkedett szintje okozza (Ariyasu *et al.*, 2001). A ghrelin aktiválja az AgRP és hypocretin neuronokat, míg a POMC neuronok gátolva vannak, ami a melanokortin rendszer orexigén útjainak aktivációját eredményezi (Seoane *et al.*, 2003; Toshinai *et al.*, 2003). A mi kísérletünkben azt tapasztaltuk, hogy az éhezés az állatok 50 %-ában bal oldali dominanciát okozott. Ez arra utal, hogy a melanokortin rendszer ghrelin indukálta orexigén aktivációja dominál a bal oldalon (habár valószínűleg mindkét oldalon létrejön). **(12. Ábra)**



12. ábra Az orexigén és anorexigén folyamatok változása a hypothalamus bal és jobb oldalán (forrás: Dr. Tóth István)

6.4 Hímek és nőstények közötti különbségek

A legszembetűnőbb eredmény az, hogy a hypothalamicus aszimmetria nőstényekben erősen E2 (ösztrogén) függő, míg hímekben a nemi szteroidoknak kevésbé van meghatározó szerepük. Ellenben a lateralizáltság mértéke az aszimmetrikus működésben kevésbé függ a jóllakottsági állapottól nőstényekben, a hímekhez képest. Másik különbség, hogy nőstényekben, hogy az E2 növelte az unilaterális hypothalamicus metabolizmust, anélkül, hogy ez jelentősen befolyásolta volna az St4-et. Másrészt, hímek esetében az aszimmetrikus változás az St3-ban főként jóllakottsági állapot függő és szignifikánsan emelkedett az St4. Hímekben a táplálékfelvétel szabályozása magasabb szintű metabolikus változásokat vált ki a hypothalamusban, és befolyásolja a lateralizált metabolikus változásokat ellenben az erős nemi szteroid változások hatásaival, és nem utolsó sorban az élelem megvonás kimutatható csökkenést eredményezett a két hypothalamusfél közötti különbségben még E2-velkezelt egyedekben is.

Hasonlóság a nőstényekkel, hogy az éheztetés az állatok 50%-ában okozott bal oldali dominanciát, de ez a jelenség összefügg a magasabb mértékű lateralizáltsággal.

7 Konklúzió

Kísérleteink alapján kijelenthető, hogy a hím patkányokban a nőtényekhez hasonlóan a hypothalamus funkcionális aszimmetriát mutató féltekékből áll, amely lateralizáció metabolikus szinten is megnyilvánul. Ugyanakkor a hímeknél tapasztalt metabolikus különbségek a nőtényekkel ellentétben nem a gonadális szteroidok szintjétől, hanem a jóllakottsági állapottól és az energiaháztartás szervezetszintű állapotától függenek.

Eredményeink igazolták, hogy míg igény szerinti tápláltság esetén a jobb oldali hypothalamus mutatott nagyobb metabolikus aktivitást, addig a táplálékmegevonás ezt az állapotot megfordította, amely bal oldali metabolikus dominanciát eredményezett.

A dolgozatban bemutatott eredményeink alapján elmondható, hogy a már számos aspektusból behatóan tanulmányozott hypothalamicus orexigén-anorexigén folyamatok a neuroendokrin központ két féltekéjében eltérő hangsúllyal zajlanak le. Azt csak későbbi beható vizsgálatok révén tudjuk világossá tenni, hogy a táplálékfelvétel és az energiaháztartást szabályozó mechanizmusok pontosan hogy és milyen felállásban oszlanak meg a hypothalamus két térfele között, és azt hogy e tekintetben milyen mértékű a két féltekék közötti munkamegosztás.

8 Összefoglalás

A hypothalamus funkcionális aszimmetriája a reprodukív folyamatokkal és a táplálékfelvétellel kapcsolatban hím patkányokon

A hypothalamus jóllehet szerteágazó neuroendokrin folyamatok vezérlésért felelős, mégis a központi idegrendszer aránylag igen kis kiterjedésű, anatómiailag „zsúfolt” részét alkotja. Bár sok más agyterülethez hasonlóan a hypothalamus magcsoportjai is szimmetrikusan, az agy jobb és bal térfelén helyezkednek el, működését funkcionálisan egységes, identikus felek párhuzamosan dolgozó struktúrájaként kezeljük.

Elgondolásunk szerint a hypothalamust a felsőbb agyterületekhez hasonlóan nem redundánsan identikus működésű felek, hanem egymással valamilyen, eddig jobbára ismeretlen rendezőelv alapján egymással „munkamegosztásban” dolgozó féltekék alkotják. A kutatócsoport korábbi munkái alapján fény derült arra, hogy a női reprodukív folyamatok vezérlése a fenti hipotézist alátámasztva a két hypothalamicus félteke között aránytalanul oszlik meg. A jelen munkában arra a kérdésre keressük a választ, hogy ez a fajta funkcionális aszimmetria hím állatokban is megfigyelhető-e a szóban forgó agyterület által vezérelt két legenergiaigényesebb funkció, a táplálékfelvétel és a reprodukív irányítással kapcsolatban.

Hipotézisünk igazolásához metabolikus vizsgálatokat végeztünk mitokondriális légzési tevékenység elemzésén keresztül. Ehhez hím patkányok elkülönített jobb és bal hypothalamusából a kutatócsoport által kifejlesztett módszert alkalmazva, differenciál- és Percoll-alapú gradiensfrakcionálás révén életképes, mitokondriális frakciókat nyertünk. A kísérletbe vont állatokat különböző reprodukív (bilaterális orchietomia, tesztoszteronkezelés) és jóllakottsági (táplálékmegvonás, programozott etetés, etc.) állapotokban vizsgáltuk.

Eredményeink a reprodukív folyamatok tekintetében a hím állatok (a nőstényekkel szemben) nem erősítették meg a hypothalamus lateralizált működésére vonatkozó feltevésünket. Ezzel szemben a jóllakottság-táplálékfelvétel vonatkozásában igazoltuk, hogy az éhezés és a táplálékmegvonás fokozza bal oldali hypothalamus metabolikus aktivitását elnyomva ezzel a jóllakottsági fázis karakterisztikus jobb oldali dominanciáját. Fény derült arra, hogy ez a metabolikus változás fokozatosan állt be, az éhezés időtartamával párhuzamosan erősödve. A táplálékfelvételt követően pedig a jobb oldali metabolikus dominancia fokozatosan visszatér.

Ennek értelmében elmondható, hogy míg a nőstényeknél a hypothalamicus aszimmetria erősen ösztrogénfüggő, addig a hímek esetében ebben döntően a jóllakottsági állapot bír meghatározó szereppel. Az általunk kapott eredmények alapjaiban újraírhatják azt a szemléletet, amely révén ma a hypothalamust vizsgáljuk, mindez pedig új diagnosztikai és terápiás lehetőségeket is magába rejt.

9 Summary

Functional hypothalamic asymmetry with regard to reproduction and satiety state in male rats

Although the hypothalamus is responsible for the control of many neuroendocrine processes, it is a relatively small, anatomically "crowded" part of the central nervous system. Like many other areas of the brain, the nuclei of the hypothalamus are symmetrically located in the right and left side of the brain and the hypothalamus is functionally considered as a parallel structure of identical parties.

According to our hypothesis, the hypothalamus, as the upper brain regions, is not redundantly identical in function, but it is formed by two hemispheres that share their tasks in yet mostly unknown hierarchies. Based on previous works of our research group, it has become apparent that control of female reproductive functions is disproportionately divided between the two hypothalamic hemispheres, supported by the above hypothesis. In the present study, we will find the answer to the question whether this type of functional asymmetry in male animals can be observed in the two most energy-demanding functions controlled by the concerned brain region, in terms of food intake and reproductive control.

To verify our hypothesis, we performed metabolic examinations through the analysis of mitochondrial respiratory activity. In order to obtain viable mitochondrial fractions from the isolated left and right hypothalamus of male rats for this purpose, we applied differential and Percoll-based gradient fractionation procedure developed by our research group. The experimental animals were examined in different reproductive (bilateral orchietomy, testosterone treatment) and satiety states (food deprivation, scheduled feeding, etc.).

Our results on reproductive processes with male animals (compared to females) did not confirm our assumption of lateralized operation of the hypothalamus. On the other hand, with regard to satiety state, it has been proved that starvation and fasting increase the metabolic activity of the left hypothalamus by suppressing the characteristic right side dominance. It became clear that this metabolic change was gradually increased, throughout the starvation period. After refeeding, metabolic dominance of the right side was gradually reverted.

Based on these results, while hypothalamic functional asymmetry in females showed strong estrogen-dependence, in case of males, state of satiety played a predominant role. Our results can basically redefine our point of view of the hypothalamic functions, and therefore offering new diagnostic and therapeutic options.

10 Irodalomjegyzék

Aizawa, H. (2013). Habenula and the asymmetric development of the vertebrate brain. *Anat. Sci. Int.* *88*, 1–9.

Ariyasu, H., Takaya, K., Tagami, T., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Suda, M., Koh, T., Natsui, K., Toyooka, S., et al. (2001). Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *86*, 4753–4758.

Bakalkin GYa, null, Tsibezov, V.V., Sjutkin, E.A., Veselova, S.P., Novikov, I.D., and Krivosheev, O.G. (1984). Lateralization of LH-RH in rat hypothalamus. *Brain Res.* *296*, 361–364.

Baskin, D.G., Hahn, T.M., and Schwartz, M.W. (1999). Leptin sensitive neurons in the hypothalamus. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* *31*, 345–350.

Broca, P.P. (1861). Remarques sur le siège de la faculté du langage articulé, suivies d'une observation d'aphémie (perte de la parole).

Davis, P.G., McEwen, B.S., and Pfaff, D.W. (1979). Localized behavioral effects of tritiated estradiol implants in the ventromedial hypothalamus of female rats. *Endocrinology* *104*, 898–903.

Elias, C.F., Saper, C.B., Maratos-Flier, E., Tritos, N.A., Lee, C., Kelly, J., Tatro, J.B., Hoffman, G.E., Ollmann, M.M., Barsh, G.S., et al. (1998). Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J. Comp. Neurol.* *402*, 442–459.

Elias, C.F., Kelly, J.F., Lee, C.E., Ahima, R.S., Drucker, D.J., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (2000). Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* *423*, 261–281.

Fukuda, M., Yamanouchi, K., Nakano, Y., Furuya, H., and Arai, Y. (1984). Hypothalamic laterality in regulating gonadotropic function: unilateral hypothalamic lesion and ovarian compensatory hypertrophy. *Neurosci. Lett.* *51*, 365–370.

Galaburda, A.M., and Eidelberg, D. (1982). Symmetry and asymmetry in the human posterior thalamus. II. Thalamic lesions in a case of developmental dyslexia. *Arch. Neurol.* *39*, 333–336.

Gerendai, I., Rotsztejn, W., Marchetti, B., Kordon, C., and Scapagnini, U. (1978). Unilateral ovariectomy-induced luteinizing hormone-releasing hormone content changes in the two halves of the mediobasal hypothalamus. *Neurosci. Lett.* *9*, 333–336.

Gerendai, I., Csaba, Z., Vokó, Z., and Csernus, V. (1995). Involvement of a direct neural mechanism in the control of gonadal functions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *53*, 299–305.

Holst, B., and Schwartz, T.W. (2004). Constitutive ghrelin receptor activity as a signaling set-point in appetite regulation. *Trends Pharmacol. Sci.* *25*, 113–117.

Horvath, T.L. (2005). The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. *Nat. Neurosci.* *8*, 561–565.

Inase, Y., and Machida, T. (1992). Differential effects of right-sided and left-sided orchidectomy on lateral asymmetry of LHRH cells in the mouse brain. *Brain Res.* *580*, 338–340.

- Jin, J.-M., and Yang, W.-X. (2014). Molecular regulation of hypothalamus-pituitary-gonads axis in males. *Gene* 551, 15–25.
- López, E., Cruz, M.E., and Domínguez, R. (1997). Asymmetrical effects of the unilateral implant of pilocarpine on the preoptic-anterior hypothalamic area on spontaneous ovulation of the adult rat. *Arch. Med. Res.* 28, 343–348.
- Mayerhofer, A., and Kunz, L. (2005). A non-neuronal cholinergic system of the ovarian follicle. *Ann. Anat. Anat. Anz. Off. Organ Anat. Ges.* 187, 521–528.
- McCormick, C.M., and Singh, P. (1996). Asymmetry in progesterin receptor levels and sexual behavior in female rats. *Physiol. Behav.* 59, 349–354.
- Mittleman, G., Fray, P.J., and Valenstein, E.S. (1985). Asymmetry in the effects of unilateral 6-OHDA lesions on eating and drinking evoked by hypothalamic stimulation. *Behav. Brain Res.* 15, 263–267.
- Morán, J.L., Cruz, M.E., and Domínguez, R. (1994). Differences in the ovulatory response to unilateral lesions in the preoptic or anterior hypothalamic area performed on each day of the estrous cycle of adult rats. *Brain Res. Bull.* 33, 663–668.
- Münzberg, H. (2008). Differential leptin access into the brain—a hierarchical organization of hypothalamic leptin target sites? *Physiol. Behav.* 94, 664–669.
- Nance, D.M., and Moger, W.H. (1982). Ipsilateral hypothalamic deafferentation blocks the increase in serum FSH following hemi-castration. *Brain Res. Bull.* 8, 299–302.
- Nasrallah, C.M., and Horvath, T.L. (2014). Mitochondrial dynamics in the central regulation of metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 650–658.
- Nordeen, E.J., and Yahr, P. (1982). Hemispheric asymmetries in the behavioral and hormonal effects of sexually differentiating mammalian brain. *Science* 218, 391–394.
- Pavlova, I.V., Volkov, I.V., and Mats, V.N. (1996). [The effect of stimulation of the lateral hypothalamus on the spike trains of the rabbit neocortical neurons]. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I. P. Pavlova* 46, 1068–1075.
- Regard, M., and Landis, T. (1997). “Gourmand syndrome”: eating passion associated with right anterior lesions. *Neurology* 48, 1185–1190.
- Riediger, T., Traebert, M., Schmid, H.A., Scheel, C., Lutz, T.A., and Scharrer, E. (2003). Site-specific effects of ghrelin on the neuronal activity in the hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci. Lett.* 341, 151–155.
- Sadeghi, L., Rizvanov, A.A., Salafutdinov, I.I., Dabirmanesh, B., Sayyah, M., Fathollahi, Y., and Khajeh, K. (2017). Hippocampal asymmetry: differences in the left and right hippocampus proteome in the rat model of temporal lobe epilepsy. *J. Proteomics* 154, 22–29.
- Seoane, L.M., López, M., Tovar, S., Casanueva, F.F., Señarís, R., and Diéguez, C. (2003). Agouti-related peptide, neuropeptide Y, and somatostatin-producing neurons are targets for ghrelin actions in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 144, 544–551.
- Sternson, S.M., Shepherd, G.M.G., and Friedman, J.M. (2005). Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat. Neurosci.* 8, 1356–1363.

- Stratford, T.R., and Wirtshafter, D. (2013). Injections of muscimol into the paraventricular thalamic nucleus, but not mediodorsal thalamic nuclei, induce feeding in rats. *Brain Res.* *1490*, 128–133.
- Toshinai, K., Date, Y., Murakami, N., Shimada, M., Mondal, M.S., Shimbara, T., Guan, J.-L., Wang, Q.-P., Funahashi, H., Sakurai, T., et al. (2003). Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* *144*, 1506–1512.
- Toth, I., Kiss, D.S., Goszleth, G., Bartha, T., Frenyo, L.V., Naftolin, F., Horvath, T.L., and Zsarnovszky, A. (2014). Hypothalamic sidedness in mitochondrial metabolism: new perspectives. *Reprod. Sci.* Thousand Oaks Calif *21*, 1492–1498.
- Toth, I., Kiss, D.S., Jocsak, G., Somogyi, V., Toronyi, E., Bartha, T., Frenyo, L.V., Horvath, T.L., and Zsarnovszky, A. (2015). Estrogen- and Satiety State-Dependent Metabolic Lateralization in the Hypothalamus of Female Rats. *PloS One* *10*, e0137462.
- Uher, R., and Treasure, J. (2005). Brain lesions and eating disorders. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *76*, 852–857.
- Vanetsian, G.L., and Pavlova, I.V. (2004). Functional asymmetry of the frontal cortex and lateral hypothalamus of cats during an operant food-related conditioned reflex. *Neurosci. Behav. Physiol.* *34*, 703–710.
- von Ziegler, N.I., and Lichtensteiger, W. (1992). Asymmetry of brain aromatase activity: region- and sex-specific developmental patterns. *Neuroendocrinology* *55*, 512–518.

11 Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani Prof. Bartha Tibor tanszékvezető úrnak, hogy lehetővé tette számomra a jelen TDK dolgozat elkészítését és a tanszéki dolgozóknak, hogy mindig a segítségemre voltak.

Külön köszönöm a témavezetőimnek Kiss Dávid Sándornak és Tóth Istvánnak a rengeteg szakmai segítséget, amit nyújtottak az ismertetett munka során.

Szeretném megköszönni a családomnak, hogy mindig mellettem álltak ez alatt a nehéz időszak alatt.

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: MOLNÁR GYULA
Elérhetőség (e-mail cím): MOLNAR.GYULA@GMAIL.COM
A feltöltendő mű címe: A. Kórházgymn. funkcionális aszimmetria a reproduktív folyamatokkal és a téralképzéssel kapcsolatban tanulmányok
A mű megjelenési adatai: 2018.
Az átadott fájlok száma: 1.

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatssa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

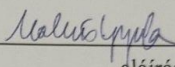
Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:

Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörő módon visszaélne.

Budapest, 2020. év November. hó ...20... nap


aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutjra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgálta, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;
- a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;
- az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;
- a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,
- a nyílt hozzáférés támogatása.

NYILATKOZAT

Alulírott MOLNÁR GYULA..... nyilatkozom, hogy diplomamunkám,
melynek címe A hyperbolicus konklusionális aszimmetriája a reprodukció
szervezetével és a társulási felülettel kapcsolatban lévő patkányokban
tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2018..... évi
TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2020 November 20.....

MOLNÁR GYULA, Molnár Gyula.....

a hallgató neve és aláírása