

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar
Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék és Klinika

A kutyák leptinszintjének vizsgálata a kondíció és a hasi zsírraktárak
eloszlásának függvényében

Szerző: Szakács Zsófia

Témavezető: dr. Müller Linda

Budapest

2011.

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|--|-----------|
| 1. BEVEZETÉS | 3 |
| 2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ | 4 |
| 2.1. A LEPTIN HORMON | 4 |
| 2.1.1. <i>A leptin felfedezése</i> | 4 |
| 2.1.2. <i>A leptin receptorok</i> | 5 |
| 2.1.3. <i>A leptin szintézis</i> | 7 |
| 2.1.4. <i>A leptin élettani szerepe</i> | 8 |
| 2.2. A LEPTIN HORMON; JELLEMZŐI KUTYÁBAN | 14 |
| 2.3. A LEPTINSZINT VÁLTOZÁSA KUTYÁBAN | 15 |
| 2.3.1. <i>A kor, a nem, a fajta, az ivari ciklus és az etetés esetleges befolyásoló hatásai</i> | 15 |
| 2.3.2. <i>A kondíció és a zsírraktárak befolyásoló hatása</i> | 16 |
| 2.3.2.1. <i>A viscerális valamint a szubkután zsírraktárak befolyásoló hatása</i> | 17 |
| 2.3.2.2. <i>A zsírsejtek méretének befolyásoló hatása</i> | 18 |
| 2.3.3. <i>Az elhízás hatása a leptinszintre, leptinrezisztencia</i> | 18 |
| 2.3.4. <i>Más leptinszintet befolyásoló tényezők</i> | 19 |
| 2.3.5. <i>Az inzulinérzékenység hatása a leptinszintre</i> | 20 |
| 3. ANYAG ÉS MÓDSZER | 23 |
| 3.1. MINTAGYŰJTÉS..... | 23 |
| 3.2. A VÉRCUKORSZINT MÉRÉS | 23 |
| 3.3. A HORMONSZINTEK VIZSGÁLATA..... | 23 |
| 3.3.1. A LEPTINSZINT MEGHATÁROZÁSA..... | 24 |
| 3.3.2. AZ INZULINSZINT MEGHATÁROZÁSA..... | 25 |
| 4. EREDMÉNYEK | 28 |
| 5. MEGBESZÉLÉS | 34 |
| 6. ÖSSZEFOGLALÁS | 36 |
| 7. SUMMARY | 37 |
| 8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS..... | 38 |
| 9. IRODALOMJEGYZÉK | 39 |

1. BEVEZETÉS

A leptin melyet az ob gén kódol, egyfajta citokin, amit a zsírszövet adipocitái termelnek, fontos szerepet játszik a táplálékfelvétel és a szervezet energiaegyensúlyának szabályozásában. A szervezet energiaegyensúlya nagymértékben befolyásolja a szaporodási funkciókat mind emberben, mind állatokban. Az állatoknak is, úgy mint az embereknek, megfelelő zsírraktárral kell rendelkezniük, hogy átvészeljék a vemhesség és a laktáció energiaigényes időszakát. A zsírszövet mennyiségének túlzott növekedése azonban inzulinrezisztenciához és más káros hatások megjelenéséhez vezethet. Manapság már kutyákban is egyre nagyobb arányban jelentkezik az elhízás és az ehhez kapcsolódó inzulinrezisztencia. Az inzulinérzékenység plazma leptinszinttel való összefüggését társállatokban is feltételezik.

Célkitűzésünk elsősorban annak a kérdésnek a megválaszolása volt, hogy a testzsír mennyisége milyen módon befolyásolja a plazma leptinszintjét, és ez milyen összefüggésben van az inzulinszinttel valamint az inzulinrezisztencia fokával. Továbbá lehetőségünk volt felmérni a testzsír hasi területen jellemző eloszlásának befolyásoló hatását a leptin termelésre. A Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszékén és Klinikáján végzett tanulmányunk célja az volt, hogy meghatározzuk a rendelésre behozott kutyák leptinszintjének változását a testzsír, vagyis a kondíció függvényében az inzulinszint és az inzulinrezisztencia fokának tükrében.

A Kisállatklinika szülészeti rendeléseire behozott betegektől származó vérmintákból azonnali éhomi vércukor szintet mértünk gyorstesztel, majd előre gyártott ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) kit-ekkel vizsgáltuk a leptin- és inzulinkoncentrációt. Az inzulinrezisztencia meghatározásához, egy a humán medicinában széles körben alkalmazott index számítási módszert használtunk. Ez az indexszám, a HOMA-IR (Homeostasis Model of Assessment - Insulin Resistance), adta meg az inzulinrezisztencia fokát. A kapott eredményeket összevetve, elemeztük a lehetséges összefüggéseket a leptinszint, az inzulinszint, az inzulinrezisztencia, és a zsírdepók eloszlása és mérete között.

2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ

2.1. A leptin hormon

2.1.1. A leptin felfedezése

A szervezet energiaegyensúlya nagymértékben befolyásolja a szaporodási funkciókat is. Talán a legfontosabb elhízással kapcsolatos felfedezés a leptin hormon felfedezése volt, ezen keresztül könnyebben megérthettük az étvágy, a test zsírosszététele és az energiabevitel szabályozását. A leptint 1994-ben Friedman és munkatársai fedezték fel. Az áttörést az eredményezte, mikor felfedeztek egy mutáns gént egérben, aminek megléte elhízáshoz vezet.

Az elhízott (ob/ob) egér

Az elhízott egerek először 4-6 hetes korban különböztethetők meg az alomtársaiktól. Ezután négyszer gyorsabban gyarapodnak. Az eredeti jelentés szerint ezek az egerek nem éltek tovább 12 hónapnál, az elhízott egerek terméketlenek voltak, és a heterozigóták utódai 3:1 arányban lettek elhízottak, ezzel bizonyítva az öröklődés recesszív hajlamát. A gént elnevezték ob-génnek. Ezekben az egerekben az endogén leptin produkció hiányzik. Ezen egerek kövérek, hiperfágiások, hiperglikémiások és emelkedett plazma inzulinkoncentráció jellemzi őket.

A diabetikus (db/db) egér

Ez a másik mutáns elhízott egér genotípus, külsőre nagyon hasonlít az ob/ob egerekre, de a tünetek náluk korábban jelentkeznek és nem élnek annyi ideig. A homozigóták szintén kövérek, hiperfágiások, hiperglikémiások és terméketlenek (Castrance – Henson, 2006).

Korábbi megfigyelések során, amikor a hipotalamusz ventromediális részét elroncsolták, ez nagyfokú kövérséget eredményezett, szemben azzal mikor a laterális hipotalamuszt károsították, az állatok leálltak a táplálkozással, és elpusztultak (Hetherington – Ranson, 1940). Az előbbi a jóllakottság, az utóbbi pedig az éhség központja. Egy kísérlet során Hervey és munkatársai két patkány vérkeringését összekapcsolták. A parabiózis során, ha az egyik állatnak elroncsolták a hipotalamusz ventromediális részét, az elhízott, ellenben a másik állat lefogyott. Ebből arra lehet következtetni, hogy az elhízott állat zsírszövetében termelődő szignálfehérje jóllakottság érzetet vált ki az egészséges állat agyában, ezért hipofágia alakul ki nála (Hervey, 1959).

Mikor sikerült klónozni az ob gén által termelt fehérjét, lehetővé vált letesztelni azt a feltételezést, miszerint ez a fehérje részt vesz az elhízás szabályozásában. Pellymouther és munkatársai naponta adtak rekombináns ob fehérjét ob/ob egereknek intraperitoneális injekcióban, különböző dózisokban. Ennek hatására növekedett a metabolikus ráta, a testhőmérséklet, és az aktivitás, az egerek lefogytak (a csökkent táplálékfelvételnek, és a fokozott energiaszabályozásnak köszönhetően) és fertilissá váltak, ami arra utal, hogy az ob fehérje normalizálja a metabolikus állapotot az ob/ob egerekben. Ezek a paraméterek nem változtak a sovány kontroll egerekben, ez valószínűsíti, hogy az ob/ob egerek sokkal szenzitívebbek az ob fehérjére, mint a sovány kontroll csoport (Castrance – Henson, 2006). Ugyanez a fehérje db/db egereknek adva hatástalannak bizonyult (Houseknecht et al, 1998/a). Az egészséges ob gén által kódolt 16kDa, 167 aminosavból álló fehérjét elnevezték leptinnak a görög "leptos" szó után, aminek jelentése „vékony” (Castrance – Henson, 2006).

2.1.2. A leptin receptorok

Tartaglia és munkacsoportja 1995-ben írták le a leptinreceptor génjét (db gén). A leptinreceptoroknak 6 különböző izoformája van (Tartaglia et al, 1995). Minden egyes receptor egy leptin molekulát képes kötni. A 6 izoforma közül az Ob-Rb receptortípus (más néven hosszú forma) 302 aminosavból álló intracellulárisan helyezkedő alegységének köszönhetően képes hatni a sejt metabolizmusára, ellenben a leptinreceptor rövid formáival (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd), ahol nincs jelen ez az intracelluláris rész. A db/db egerekben ez a rövid típus nem károsodott, csak a hosszú forma hibás, ami miatt kialakul a nagymértékű elhízás (Castrance – Henson, 2006), a hiperglikémia és a sterilitás (Houseknecht et al., 1998/b). Az egyik ilyen hiba például, amikor a C57BUKs db/db mutáció során Ob-Rb konvertálódik Ob-Ra alakra, így nem áll rendelkezésre a jelátvitelre alkalmas, hosszú típusú receptor (Friedman, 1998). A receptortípusok közül az Ob-Ra-t, az Ob-Rb-t és az Ob-Rc-t számos fajban azonosították, ám az Ob-Rd-t eddig csak egérben (Castrance – Henson, 2006). Az Ob-Re típus a legrövidebb típus, nem valódi receptor, nem rendelkezik transzmembrán és citoplazmatikus alegységgel így ez a fajta receptor nem membránhoz kötött, hanem a vérben kering, és ott képes megkötni a leptint (Lahlou et al, 2000).

| Szövet típus | Ob-Rb | Ob-Ra, Ob-Rc | Ob-Re |
|-----------------|-------|--------------|-------|
| Zsírszövet | igen | Ob-Ra, Ob-Rc | |
| Mellékvese | igen | | |
| Csont | igen | Ob-Ra, Ob-Rc | igen |
| Agy | igen | Ob-Ra, Ob-Rc | igen |
| Endothel | igen | | |
| Magzat | igen | Igen | |
| Szív | igen | Ob-Ra | igen |
| Hipotalamusz | igen | Ob-Ra | |
| Immunsejtek | igen | Igen | |
| Bél | igen | Igen | |
| Vese | | Igen | |
| Máj | igen | Ob-Ra, Ob-Rc | igen |
| Tüdő | igen | Igen | |
| Tejmirigy | igen | Igen | |
| Izom | nincs | Ob-Ra | |
| Petefészek | igen | Igen | |
| Pancreas | igen | Igen | |
| perifériás ideg | igen | Ob-Ra | igen |
| Hypophysis | igen | Igen | |
| Placenta | igen | Igen | igen |
| Bőr | igen | Ob-Ra | |

1. táblázat: A receptortípusok előfordulási helyei emlősökben az eddigi vizsgálati eredmények ismeretében. Castrance-Henson (2006) nyomán, módosítva

Leptinreceptorok majdnem mindenhol előfordulnak a szervezetben. Az Ob-Ra izoforma szinte minden vizsgált szövetben megtalálható (Tartaglia et al, 1995). Az Ob-Rb receptor típus bőségesen a hipotalamuszban van jelen (leginkább a *nucleus arcuatus* területén), de kisebb mennyiségben máshol is előfordul (1. táblázat). Az a tény, hogy egyes esetekben a receptorok megjelenése függ bizonyos körülményektől, arra enged következtetni, hogy ezek a receptorok fontos szerepet töltenek be bizonyos élettani funkciókban. Például számos leptinreceptor típus expressziója nő a placentában a vemhesség alatt több állatfajban is, többek közt patkányban, páviánban, egérben és denevérben. Továbbá néhány rövid típusú receptor segítségével jut át a leptin a vér-agy gáton (bár nem ez az egyetlen transzport mechanizmus) (Castrance – Henson, 2006). Az Ob-Ra és az Ob-Rc receptorok nagy számban fordulnak elő a *chorioid plexus*ban (Zhang et al, 1994), és az agy kapilláris endotheliumában. A receptorok fontossága a leptin transzportját

illetően állatokban még nem teljesen tisztázott (Castrance – Henson, 2006). A vérben a leptin kötött és szabad formában is előfordulhat (Houseknecht et al, 1998/a). Az Ob-Re-hez kötött leptin nem képes aktiválni az Ob-Rb receptort, bár ezen komplexek jelenléte nem zavarja a hasonló koncentrációban keringő szabad leptin kötődését az Ob-Rb receptorokhoz (Castrance – Henson, 2006). A leptin kövér állatokban kisebb arányban fordul elő a vérben kötött formában, mint sovány állatokban (Houseknecht et al, 1998/a). Számos helyzetben fedezték

fel a leptinreceptorok szabályozó szerepét az emberi egészség fenntartásában. Többek közt rájöttek, hogy a leptinreceptor allélok kapcsolatban vannak az elhízással, és emberben is azonosították azt a receptor mutációt, ami súlyos elhízáshoz, és terméketlenséghez vezet. Ezen kívül, jelentősen kisebb leptinkoncentrációt figyeltek meg például endometriózisos nőkben, számos daganatsejt típusnál viszont leptinreceptorok megjelenéséről számoltak be. Ebből is látszik, hogy a leptin sokrétű feladatot lát el a szervezetben (Castrance – Henson, 2006).

2.1.3. A leptin szintézis

A leptin az egyik legjobban ismert, kutatott adipokin háziállatokban. A zsírszövetet alkotó adipociták végzik a leptinszintézis döntő részét, így a szérumban a leptinszint fő meghatározói. Emellett kevesebb leptint termel még néhány egyéb szövet is, ilyenek a placenta, a tejmirigy, a gyomor mucosája, a máj (Radin et al, 2009), a vázizom, és az agy (Ahima - Flier, 2000). Megállapították, hogy a keringő leptinkoncentráció korrelál a testtömeg indexszel (BMI – body mass index) laboratóriumi rágcsálókban és főemlősökben (Havel et al, 1996). A szervezet magas zsírtartalma, magas leptinkoncentrációt eredményez (a legfontosabb tényező az adipociták nagysága), de átmenetileg emelkedik étkezést követően és csökken koplaláskor (Houseknecht et al, 1998/b). Mind emberben mind állatokban rövid idejű éhezés (24-72óra) a szérumban a leptinszintjének gyors zuhanásához vezet (Castrance – Henson, 2006). Tehát kimondhatjuk, hogy a leptinszintézis függ a tápláltsági állapottól, és a kondíciótól. Ezen felül az ob gén transzkripciója különböző faktorok (metabolikus és gyulladásos mediátorok, hormonok) által szabályozott. Az adipociták leptintermelését fokozza még az inzulin, a glükokortikoidok (Houseknecht et al, 1998/a), egyes citokinek (többek közt a TNF α – tumor necrosis factor- α) de gátló hatást fejt ki a szintézisre a tesztoszteron, illetve a β -adrenerg agonisták is. Emellett nemenkénti különbségek is felfedezhetők a leptinszintet érintően, így nőkben például jelentősen magasabb a szérumban a leptinkoncentrációja mint férfiakban azonos testsúly mellett, ami azzal magyarázható, hogy a szervezet kétféle zsírraktára közül (viszcerális és bőralatti), a leptin nagyobb mértékben szekretálódik a bőralatti zsírszövet adipocitáiban mint a viszcerális adipocitákban, és a nőkben a testzsír eloszlása a bőralatti zsírszövet javára tolódik el. A másik oka korábban említett szexuáliszteroidok szabályozó szerepében le lehet fel (Castrance – Henson, 2006). A

szabályozó faktorok mellett a leptinszint változása napi ritmikusosságot is mutat: a reggeli órákban emelkedett, a mélypont pedig délután figyelhető meg. Emellett az étkezések idejével is összefügg a szintézise (Casanueva - Dieguez, 1999).

2.1.4. A leptin élettani szerepe

„A kutatók napjainkban egyre inkább azt gondolják, hogy a leptin a szervezet túlélését segíti súlyos energiahányos állapotokban. Energiahiányos állapotban ugyanis nő az étvágy, csökkennek a hőtermelő folyamatok, valamint számos olyan folyamat lelassul, ill. leáll, amelyek rendkívül energiaigényesek. Ide sorolhatók például a szaporodásbiológiai folyamatok vagy az immunrendszer működése. Enyhe túlzással azt is mondhatjuk, hogy a szövetek működéséhez megfelelő mennyiségben elérhető leptinre van szükség” (Sayed-Ahmed, Bartha, 2004).

A leptin táplálékfelvételben és az energiaháztartásban betöltött szerepét támasztja alá az a tény is, hogy a hosszú típusú receptora, amely döntő részben felelős a jelátvitelért, a hipotalamusz különféle részeiben található meg, mely területek felelősek többek közt az éhségérzetért. Ilyenek a *nucleus arcuatus*, a *nucleus ventromedialis*, a *nucleus dorsomedialis*, a *nucleus paraventricularis* és a laterális hipotalamusz magjai, ahol a táplálékfelvétel- és testsúly-szabályozás zajlik. A leptin a hipotalamikus orexigén (anabolikus) és anorexigén (katabolikus) peptidekre hatva fejt ki hatását. Általában, a leptin csökkenti az orexigén szignál termelő neuronok aktivitását, és stimulálja az anorexigén neuronokat a hipotalamuszban. Így gátolja a neuropeptid Y (NPY), az agouti-related fehérje (AgRP), a melaninkoncentráló hormon (MCH), a galanin és az orexin termelődését. Ellenben serkenti a pro-opiomelanoortin (POMC), a kokain és az amfetamin által szabályozott fehérjék (CART), az α -melanocytá stimuláló hormon (α -MSH) és a corticotrop-releasing hormon (CRH) termelését (Castrance – Henson, 2006).

Az NPY a legfontosabb endogén orexigén neuropeptid, ami befolyásolja a táplálékfelvételt. Étvágyfokozó hatással bír, emellett csökkenti az energiafelhasználást (Bokori, 2000), gátolja a thermogenezist, és növeli a vér inzulin- és glükokortikoid koncentrációját, ami a zsír akkumulációjához vezet (Houseknecht et al, 1998/a). Ebből következően, folyamatos vagy ismételt centrális NPY infúzió elhízáshoz vezet. A zsírszövet

növekedésével fokozódik a leptin szekréciója, és a leptin bekerülve az agyba gátolja az NPY termelődését, aminek következtében csökken a táplálékfelvétel, fokozódik a hőtermelés, és a fizikai aktivitás rágcsálókban. Az ily módon csökkenő zsírszövet, és az egyéb endokrin mediátorok gátolják a leptin termelődését. A termelődött leptin saját maga is negatív feedback révén gátolja az adipociták leptintermelését (Houseknecht et al, 1998/b).

A leptinnek nem csak centrális hatása van, direkt perifériás hatással is rendelkezik. Többek között a pancreasra is hat. A szervezet energiaegyensúlyának egyik legfontosabb szabályozó faktora a pancreas által termelt inzulin. Leptinreceptorokat találtak a béta-sejteken a hasnyálmirigyben, és úgy tűnik, hogy a leptin az ioncsatorna funkciók megváltoztatásával hatást gyakorol az inzulin szekrécióra. Kimondható, hogy a leptin a hasnyálmirigy béta-sejtjeire hatva csökkenti az inzulinszekréciót (Houseknecht et al, 1998/a). Ugyanígy az inzulin is visszahat a leptin termelődésére (Castrance – Henson, 2006). Az inzulin serkenti a leptin gén kifejeződését a zsírszövetben, és emeli a plazma leptinkoncentrációját (Castrance – Henson, 2006; Houseknecht et al, 1998/a). A leptin a zsírraktárak telítettségétől függően fejti ki gátló hatását az inzulintermelődésre. Ha az adipociták lipidtartalma emelkedik, a termelő leptinnek köszönhetően a vér inzulintartalma pedig csökken. Ellenkező esetben, a kisebb adipociták kevesebb leptint termelnek, így kevésbé akadályozzák az inzulin termelődését. Ezzel magyarázható, hogy leptinhiány esetén hiperinzulinémia figyelhető meg. Leptinrezisztencia a hasnyálmirigy béta-sejtjeinek szintjén szintén hozzájárulhat a hiperinzulinémia kialakulásához és 2-es típusú diabetes kialakulásához elhízásra hajlamos betegekben. Cukorbeteg embereken vizsgálták az intravénásan adott inzulin infúzió hatását a vér leptinkoncentrációjára. Több órás inzulinadagolás után megfigyelhető volt a szérum leptinszintjének emelkedése. A vizsgálatok arra engedtek következtetni, hogy a hosszútávú inzulinkezelés növeli a leptinszintet, de az akut inzulinszint emelkedés (mint például az étkezés utáni), nem szabályozza a plazma leptinkoncentrációját. Ugyanígy sóoldatot adva a betegeknek, a vártnál jóval magasabb leptinkoncentrációt figyeltek meg, ami alapján arra lehet következtetni, hogy a plazma leptinszintjére az inzulinon kívül egyéb faktorok is hatással vannak. Feltételezhető tehát, hogy a leptin egy igen fontos faktor a vizszerális- vagy intraabdominális elhízás és az inzulinrezisztencia kórélettanában, így inzulinrezisztencia esetén hiperleptinémiával is számolni kell (Castrance – Henson, 2006).

Egy másik perifériás hatása a leptinnek, hogy a fehérzsírszövetben növeli a lipolízist, a barnazsírszövetben pedig a glükózfelhasználást (Houseknecht et al, 1998/a). Ezáltal fokozódik az energiafelhasználás, és nő a hőtermelés. A növekvő lipolízis következtében csökken a zsírszövet tömege, a csökkenő zsírszövet csökkenő leptintermelést eredményez.

Ebből következik, hogy a termelődött leptin negatív feedback révén gátolja további leptin termelődését.

A leptin szintén perifériás hatásának tudható be az immunrendszerre gyakorolt hatása is. A leptin az oxigén gyökök szekréciójával, és a *chemotaxis* növelésével direkt és indirekt módon szabályozza a neutrophil granulocyták aktivitását és funkcióját a természetes immunitás során. Továbbá, leptinhiányos ob/ob egereknél immunszuppresszió és *thymus* atrófia is előfordul, ami felveti, hogy a leptin fontos szerepet játszik a természetes immunitás fenntartásában (Castrance – Henson, 2006).

A leptin további perifériás hatásaihoz sorolható a pajzsmirigyre kifejtett hatása, bár a pajzsmirigyre nem közvetlenül hat a leptin, hanem az agyon keresztül, centrálisan fejt ki hatását. A leptin megelőzi a pajzsmirigy hormonok éhezés indukálta csökkenését azáltal, hogy a hipotalamuszban szinten tartja a TRH (thyreotrop releasing hormon) szintézist, ami serkenti az adenohipofízisben a TSH (thyroid stimuláló hormon) termelést, így fokozva a pajzsmirigyben a T3 és a T4 szintézisét. Éhezés esetén kialakuló leptinhiány azonban gátolja ezt az egész folyamatot. A mechanizmus még nem pontosan tisztázott, de feltételezések szerint a leptin indirekt módon fejt ki hatását más neuropeptidek (α -MSH, NPY) által, melyek a *nucleus arcuatus*ban termelődnek (Casanueva - Dieguez,1999), de közvetlenül is hat a TRH neuronokra a *nucleus paraventricularis*ban (Castrance – Henson, 2006). Ezt a feltevést alátámasztja, hogy *nucleus arcuatus* irtása esetén sem tapasztalunk tiroxin szint csökkenést éhezés során. A másik irányból nézve a dolgot, a pajzsmirigy hormonok szintjének változása gyakran együtt jár a testsúly változásával. *Hyperthyreosisos* betegeknél nyolcvanöt százalékban csökkent, míg *hypothyreosisos* betegek esetében ötvenkilenc százalékkal nőtt a testsúly, ám ezek a testsúlyváltozások nem voltak összefüggésben a táplálékbevitellel (Casanueva - Dieguez,1999). A TSH leptinszintézisben betöltött szabályozó szerepét a több tanulmányban is vizsgálták in vitro módszerrel, így patkányból származó adipocitákon, és emberi cseplésből származó zsírszöveten. A két vizsgálat ellentétes eredményeket hozott. De az a tény, hogy a TSH és a leptin termelődése erősen szinkronizált napi ritmikusosságot mutat, magyarázhatja, hogy a TSH stimulálja a leptin termelődését (Castrance – Henson, 2006).

Számos tanulmány alátámasztja, hogy a leptin hatással van a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengelyre is. Éhezéskor és stressz hatására ez a tengely aktiválódik, nő az ACTH (adrenocorticotrop hormon) és a kortikoszteron szint. A leptin ezt az aktivációt hivatott megakadályozni. Vizsgálatok során a leptin injekció akután csökkentette a szérum kortikoszteron koncentrációját. Így például a leptin a genetikailag kövér egereknek és

patkányoknak adva, - melyek egyik jellegzetes tulajdonsága a hiperkortikoszteronémia - helyreállította azok kortizolszintjét (Casanueva - Dieguez, 1999). Hosszú távú leptin infúzió szintén csökkentette a plazma kortizol- és adrenocorticotrop hormon (ACTH) szintjét rhesus nőstény majmokban. Egyes tanulmányok szerint a leptin a corticotrop releasing hormon (CRH) szintézisének gátlásával befolyásolja a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely aktivációját. Más tanulmányokban az intracerebroventriculárisan adott leptin akutan növelte a CRH koncentrációt a hipotalamuszban (Castrance – Henson, 2006). A két hormon közti kapcsolat fennállását alátámasztja, hogy intracerebroventriculárisan adott CRH a táplálékfelvétel csökkenéséhez vezetett és növelte az energiafelhasználást, amíg az anti-CRH antitestek csökkentették a leptin anorektikus hatását. Ráadásul a CRH szintéziséért felelős neuronokon, a hipotalamusz *nucleus paraventricularis* részén leptin receptorok jelenlétét mutatták ki. Negatív korrelációt írtak le a kortizol és az ACTH szintje és a plazma leptinszintje között. In vitro kísérletekben bizonyították, hogy a leptin emeli az alap CRH szintet, és gátolja a hiperglikémia CRH csökkentő hatását. Az in vivo vizsgálatok azonban ellentmondásosak. Ezen felül, hosszú típusú leptinreceptorokat fedeztek fel a mellékvese kéregállományában, ami felveti a lehetőségét annak, hogy a leptin direkt módon is gátolja a kortizol szekrécióját (Casanueva - Dieguez,1999; Houseknecht et al, 1998/a). A kortizol is hat a leptinszintézisre. In vitro tanulmányokkal bebizonyították, hogy a glükokortikoidok növelik a leptin mRNS szintet és a leptinszekréciót rágcsálók adipocitáiban. In vivo nyert adatok is azt mutatták, hogy farmakológiai dózisban adott glükokortikoidok emelték a keringő leptin mennyiségét mind normál mind elhízott állapotban (Casanueva - Dieguez,1999).

A leptin centrális hatásának tudható be a növekedési hormonra kifejtett hatása is. A növekedési hormon (GH) szekrécióját a növekedési hormon releasing hormon (GHRH) serkenti, a szomatosztatin pedig gátolja. A leptin szerepe mindkét faktor szabályozására megalapozott. A leptin a szomatosztatin termelődésének gátlásával, és a GHRH szekréció serkentésével növelte a GH kiválasztást éhezett patkányokban. Intracerebroventriculárisan adagolt leptin mérsékelte az éhezés GHRH mRNS csökkentő hatását a hipotalamuszban egy tanulmány szerint, illetve növelte annak expresszióját jól táplált patkányokban. A GHRH termelő neuronokon talált leptinreceptorok alapján feltételezhető a leptin GHRH szekrécióra kifejtett közvetlen hatása. A növekedési hormon is hatással van a leptintermelésre közvetett módon. Növekedési hormon hiány esetén a leptinszint emelkedett, a megnövekedett mennyiségű zsírszövetnek köszönhetően. Növekedési hormonnal történő kezelés eredményeként a leptinkoncentráció alacsonyabb a szérumban, ami a kezelés zsírtömegcsökkentő hatásának tudható be (Castrance – Henson, 2006).

A leptinnek számos hatása van a reprodukcióra is. Az ob/ob egereket vizsgálva, megállapították, hogy a nőstények sterilek, a méh és a petefészek súlya csökkent, ezek fejlődése megállt a pubertás szintjén és csökkent a gonadotropin és szexuálszteroid szint. A hímelekben a Leydig-sejtek atrofizáltak, az ondójuk minősége rossz, és náluk is csökkent a gonadotropin szint (Houseknecht et al, 1998/b). Az ob/ob egerek sterilizálása leptin kezeléssel helyreállítható, a testsúlycsökkenésük mellett újra termékenyek lesznek. Ez hívta fel a figyelmet arra, hogy a leptin szoros összefüggésben van a szaporodással. A testzsír növekedése és a szérumban leptinkoncentrációjának növekedése között pozitív korreláció van. Nőneműekben mindig magasabb a leptinszint, mint hímneműekben. A leptinszintézis ugyanis nagyobb mértékű a bőr alatti zsírszövetben, és a nők nagyobb bőr alatti zsírszövettel rendelkeznek, mint a férfiak. A másik magyarázat az endogén hormonális környezet különbségében keresendő. Az ösztrogének általánosságban növelik a leptin termelődését, a tesztoszteron viszont gátolja a leptin termelődését (Castrance – Henson, 2006). Az alultápláltság okozta szaporodási zavarok leptin kezeléssel helyreállíthatók. Ugyanígy az éhezés kiváltotta ovuláció elmaradás kivédhető leptin adagolással nőstény egerekben (Houseknecht et al, 1998/b). Már régóta tudjuk, hogy a nőknek elegendő zsírraktárral kell rendelkezniük a terhesség és a laktáció lefolyásához és a pubertás korban lévő lányoknál sem elsősorban a kor határozza meg a termékenység kezdetét (Casanueva - Dieguez, 1999). Elhízott lányokban például hamarabb kezdődik a pubertás.

A hipotalamikus GnRH (gonadotropin-releasing hormon) neuronokon nem található leptinreceptorok, így kijelenthető, hogy a leptin nincs direkt hatással azok működésére (Castrance – Henson, 2006). Feltételezhető, hogy a leptin az NPY-n keresztül fejti ki hatását a GnRH szekrécióra (Gamba - Pralong, 2006). Egyes tanulmányok azt mutatták, hogy alacsony leptinkoncentráció stimulálta a GnRH termelődését, de a magas leptinszintek csökkentették azt. Ovariectomia mind rágcsálókban, mind nőkben csökkentette a leptinszintet. Az ob/ob egerek leptin hiányában sosem érik el a pubertás kort. A szérumban leptinszintje a pubertás kor elérése előtti években kezd emelkedni, és a legmagasabb szintet a pubertás kezdete körüli időben éri el. A leptinkötő fehérjét is vizsgálták a szérumban, és azt az eredményt kapták, hogy a pubertás előtti időkben csökkent mennyiségben vannak jelen a vérben, ezzel növelve a szabad leptin koncentrációját, így fokozva a biológiai aktivitást (Castrance – Henson, 2006). Különböző állatcsoportokon (ad libitum etetett, leptinnel kezelt) vizsgálták az ivarérettség időpontját, és arra a következtetésre jutottak, hogy a leptin önmagában nem indítja el az ivarérettséget, mivel a leptinnel kezelt állatoknál sem jelentkezett előbb a pubertás, mint az ad

libitum etetteknél (Casanueva - Dieguez,1999). Feltételezhető tehát, hogy a szaporodási funkciókért felelős neuroendokrin-reproduktív-tengely, több hormon, metabolikus szignál, és faktor együttes működésével szabályozódik (Gamba – Pralong, 2006). Leptinreceptor mRNSt találtak patkányok ováriumában, méhében, heréjében, és emberek here- és petefészkek szöveteiben is, ezzel alátámasztották, hogy a leptin a petefészkekre is direkt hatást fejt ki (Castrance – Henson, 2006). 8 órával a leptin-antitest patkányok agyába való applikálása után, az LH pulzáció és a ciklikus nemi működés is csökkent. Ahima és munkatársai azt találták, hogy exogén leptin adásával az éhezés kiváltotta LH szint csökkenés megelőzhető (Casanueva - Dieguez, 1999).

A terhesség során a szérum leptinszintje emelkedett, ami magyarázható az anyai zsírszövet és testsúly gyarapodásával, legfőképp a harmadik trimeszterben. A leptin az első trimeszterben korrelál a hCG-vel. Mind a placenta mind a magzat termel leptint. A *trophoblast*ban leptin mRNS transzkripció figyelhető meg, ami alátámasztja, hogy az anyai hiperleptinémia kizárólagosan a placentának köszönhető. A terhesség/vemhesség alatt felhalmozódó zsírszövetnek köszönhetően az anya képes lesz átvészelni a laktáció energiahányos időszakát. A gesztáció ideje alatt a leptinkoncentráció nem állandó szinten van. Az első harmadban elkezd emelkedni még mielőtt a testösszetétel számottevően változna. A gesztáció középső szakaszában a leptinszint eléri az alapszint kétszeresét. Az ellés/szülés közeledtével a leptinszint rohamosan elkezd zuhanni, 24 órával az ellés/szülés előtt már az alapszint mérhető. Az ellés/szülés utáni hetekben (emberben nagyjából a 6. hétig) ismét elkezd emelkedni a leptinkoncentráció (Castrance – Henson, 2006). A laktáció során a leptin elveszti diurnális ritmusát, ami miatt relatív hypoleptinaemia alakul ki, aminek köszönhetően fokozódik az étvágy (Casanueva - Dieguez, 1999).

A legtöbb elhízott beteg magas keringő leptinszinttel rendelkezik, ami felveti a leptinrezisztencia létezésének lehetőségét (Castrance – Henson, 2006). Ilyenkor a szervezetben jelen lévő megfelelő mennyiségű, vagy éppen magas koncentrációjú leptin sem fejt ki az elvárt biológiai hatást, valamilyen deficiencia következtében. Az egyik lehetséges oka a leptinrezisztenciának az agyban lévő leptinreceptorok hibája, a vér-agy gáton való átjutás károsodása (Houseknecht et al, 1998/a). A másik lehetséges ok a keringő leptin szállításakor bekövetkező zavar lehet. Ebben az esetben a leptinkötő fehérje lehet hibás valamilyen szinten (Houseknecht et al, 1998/b).

2.2. A leptin hormon; jellemzői kutyában

Az emlős leptin cDNS-ről már régebben tudják, hogy 3kbp hosszú vagy még hosszabb, illetve van egy 160-170 aminosavból álló peptideket kódoló része. Iwase és munkatársai Northern blot analízissel alátámasztották, hogy a kutya fehér zsírszövetéből kinyert RNS minták egy körülbelül 3kbp nagyságú mRNS-t tartalmaznak, melyek összevetve egy egérből származó leptin cDNS próbával, nagy hasonlóságot mutatott. A klónozott kutya leptin cDNS (nyilvántartva: GenBank-DDBJ-EMBL, accession no. AB020986) 2925bp nagyságú, ami áll egy 31bp méretű nem lefordított 5'határoló szekvenciából, egy 501bp nagyságú nyitott leolvasási keretből, amely 167 aminosavat kódol, és egy 2393bp nagyságú 3'határoló szekvenciából. A nukleotid sorrend a kódoló szakaszban 82-92%-os azonosságot mutat más fajokéval. A legnagyobb hasonlóságot a sertés leptin cDNS-vel vélték felfedezni. A 167 aminosavból álló fehérje érett leptin részét 146 aminosav alkotja, a maradék 21 aminosav egy szignál rész. Az érett leptin részt vizsgálva 76-88%-os azonosság volt felfedezhető az aminosavsorrendet tekintve más fajokhoz viszonyítva. Kutyában is találtak a leptinben két ciszteint (Cys117, Cys167), melyek intramolekulárisan diszulfid hidat alkotnak, szerepük fontossága vitatott. Habár a kutya leptin szerkezete nagy hasonlóságot mutat más fajok leptin szerkezetével, mégis akad néhány aminosav, amely a többi fajban általában megjelenik (mint például: Thr40, Thr58, His67), kutyában azonban más aminosavakkal helyettesítődik. Ennek az oka és jelentősége ma még nem ismert, de úgy tűnik, hogy a leptin biológiai aktivitásáért nem felelős. A leptin eloszlását vizsgálva a szövetekben, felnőtt hím beagle kutyákból kinyert mintákat vizsgáltak Northern blot analízissel. Négy különböző helyről kimetszett fehér zsírszövet mintában kimutatható volt a jelenléte, míg más szövetek (a gyomor és a placenta nem lett vizsgálva) esetében negatív eredményt kaptak a kutatók. Az eredményekből arra lehet következtetni, hogy a kutyákban a fő leptin termelő szerv a fehér zsírszövet. A tanulmány során a kutya leptin biológiai aktivitását is vizsgálták, amely a többi emlőssállat leptinjéhez hasonló biológiai aktivitásúnak bizonyult (Iwase et al, 2000).

2.3. A leptinszint változása kutyában

2.3.1. A kor, a nem, a fajta, az ivari ciklus és az etetés esetleges befolyásoló hatásai

Ishioka és munkatársai kutyák leptinszintjének változását tanulmányozták egy 166 kutya vérmintáját elemző vizsgálat keretében. Különböző kondíciócsoportokat kialakítva (normál, túlsúlyos és kövér), azt állapították meg, hogy az állatok kora nem mutat szoros összefüggést a leptinszinttel. A kondíciócsoportokat 5 pontos Body Condition Scores (BCS) rendszer alapján alakították ki. A BCS egy nemzetközileg használt kondíciópontozási módszer állatoknál, mely kifejezi a tápláltsági és erőnléti állapotot (Zöldág et al, 2008). Egyszerűen használható rutin vizsgálat, amely szemikvantitatív mérést biztosít. Lényege, hogy tapasztalt megfigyelők előre meghatározott szempontok szerint, megtekintés és gyorsan elvégezhető fizikális vizsgálat után leggyakrabban 5 (Edney és Smith, 1986) vagy 9 pontos skálán (Laflamme, 1997) értékelik az állat tápláltsági állapotát. A vizsgált kutyák életkora 6 hónap és 17 év közé esett. A normál kondíciójú (BCS 3) kutyák vizsgálata során némi összefüggést véltek felfedezni a leptinszint és a kor között, mivel ebbe a csoportba kerültek az 1 évnél fiatalabb kölykök, melyeknek jóval alacsonyabb volt a leptinszintjük, ami talán visszavezethető a kölyköket jellemző alacsonyabb testzsírarányra. Az ebbe a csoportba tartozó felnőtt kutyáknál nem volt észlelhető különösebb kapcsolat a kor és a leptinszint között. A túlsúlyos (BSC 4), és a kövér (BCS 5) csoport esetén sem véltek felfedezni erre utaló eltéréseket.

A kutyák nemét illetően, a vizsgált állatok között előfordult kan, szuka, illetve ivartalanított szuka és herélt állat is. A vizsgálat során nem találtak különbséget (figyelmen kívül hagyva a kondíciót) a leptinszintben a nemeket tekintve, habár a normál kondíciójú (BCS 3) csoportba tartozó nőstény kutyák között, - ellentétben az ivartalanított állatok eredményeivel - emelkedett plazma leptinkoncentráció mutatkozott. Ez a különbség nem volt észlelhető a túlsúlyos, és a kövér csoportnál. Ez azzal magyarázható, hogy az ivartalanítás során bekövetkező csökkent ösztrogén szint befolyással lehet a plazma leptinkoncentrációjára.

Egy másik vizsgálat során arra a következtetésre jutottak, hogy a fajta befolyásolhatja a leptinszintet. A tanulmány során 5 kutyafajta eredményeit vették figyelembe. Golden retriever, Labrador retriever, Törpetacskó, Shitzu, Shetlandi juhászkutya fajtákat

összehasonlítva, azt az eredményt kapták, hogy a Shetlandi juhászkutyák magasabb leptinkoncentrációval rendelkeznek, mint a többi fajta, míg a Törpetacskóknak alacsonyabb a plazma leptinszintjük. Az nem állítható viszont, hogy a testmérettel arányosan nőne a leptinszint, figyelembe véve a kondíciót, hisz a Törpetacskóhoz hasonlóan a Shitzu is kistermetű, mégis hasonló leptinszinttel rendelkezik, mint nagytestű rokonai. Bár ezek az eredmények nem túl meggyőzőek, hiszen a vizsgált fajtánkénti egyedszám túl kevés – tíz körüli érték - volt, és csak nagyon kevés fajtát érintett, mégis megállapítható, hogy a plazma leptinszintjére befolyással lehet a kutyák fajtája (Ishioka et al, 2007).

Egy tanulmányban 4 beagle fajtájú kutya leptinszintjét vizsgálták az etetéssel összefüggésben. Az eredmények arra utalnak, hogy a szérumban napi ingadozást mutat a leptin szint, és ez összefüggésbe hozható az evési-kopplalási ciklussal, mivel az etetés után megemelkedett leptinszintek voltak mérhetőek. Az etetést követő 8. órában volt a legmagasabb a leptinszint (10.5 ± 2.4 ng/ml), és az etetést követő 20-24. órában tért vissza az alapszintre (Ishioka et al, 2005).

Kutyákban egyelőre még nincs információ a plazma vagy szérumban a leptinkoncentráció és az ősztrusz ciklus közötti kapcsolatról (Ricci – Bevilacqua, 2011).

2.3.2. A kondíció és a zsírraktárak befolyásoló hatása

Kutyákban a keringő leptin szintje ugyanúgy korrelál a test zsírtömegével, mint emberekben és rágcsálókban. A kísérletesen kiváltott kövérség hasonlóképp növelte a keringő leptinszintet kutyákban (Radin et al, 2009), mint a magasabb BCS (body condition scores) kategóriába sorolt, kedvenként tartott kutyáknál (Ishioka et al, 2007). Az ob gén kutyában a fehér zsírszövet preadipocitáiban és érett adipocitáiban expresszálódik. Ellentétben más fajokkal, mint a rágcsálók, a csirke vagy például az ember, ahol az ob gén egyéb más szövetekben is expresszálódik, úgy tűnik, hogy a kutyában kizárólag csak a fehér zsírszövetben található meg. A magas zsírtartalmú étrenden tartott kutyáknál, melyeknek súlyuk nőtt, emelkedett plazma leptinszint volt mérhető (Radin et al, 2009). Ishioka és munkatársai vizsgálata során, mikor a kondíciójuk szerint 3 csoportba osztva vizsgálták a kutyák leptinszintjét, a legmagasabb leptinkoncentráció a kövér (BCS 5) csoportba tartozó kutyáknál volt mérhető (12.8 ± 0.8 ng/mL) (Ishioka et al, 2007). Fordított helyzetben, mikor az állatok csökkentett kalóriatartalmú eledelt kaptak, és vesztek a súlyukból, csökkent

plazma leptinkoncentráció volt mérhető (Jeusette et al, 2005). Úgy tűnik kutyákban a keringő leptinkoncentrációt legfőképp a zsírtömeg befolyásolja, habár mint egyéb más fajokban is, az étkezés után átmeneti leptinszint emelkedés figyelhető meg (Ishioka et al, 2005). Ez az étkezés utáni csúcs 5-8 órával az etetés után mutatkozik, és az éhezési leptinszint 2-3szorososa. Érdekes módon a kisebb kondíció ponttal (BCS: 2/5) rendelkező kutyák esetében az étkezés utáni csúcs nem volt annyira erőteljes (Nishii et al, 2006/b).

2.3.2.1. A viscerális valamint a szubkután zsírraktárak befolyásoló hatása

Emberekben számos tanulmány alátámasztotta, hogy a szérum leptinkoncentráció kapcsolatban áll a testzsír eloszlásával. Több tanulmányt végeztek annak feltárására, hogy a zsírszövet eloszlása milyen módon befolyásolja a szekretálódó leptin mennyiségét. A kutatási eredmények néhol ellentmondásosak. Habár néhány kutatás eredménye azt mutatja, hogy a plazma leptinkoncentráció jobban korrelál a viscerális zsírszövet nagyságával (Ronnemaa et al, 1997), a legtöbb tanulmány arra utal, hogy határozottan a szubkután zsírszövet a fő meghatározója a leptinszintnek, de nem zárják ki a viscerális zsírszövet szabályozó szerepét sem (Montague et al, 1997; Couillard et al, 2000). Például nőkben jelentősen magasabb szérum leptinkoncentráció mérhető, mint férfiakban azonos testsúly mellett, ami azzal magyarázható, hogy a szervezet kétféle zsírraktára közül (viscerális és szubkután), nőkben a bőralatti zsírszövet nagyobb arányban van jelen, mint a hasúri, a teljes testzsír arányt tekintve, és a leptin nagyobb mértékben szekretálódik a bőralatti zsírszövet adipocitáiban mint a viscerális adipocitákban (Castrance – Henson, 2006; Couillard et al, 2000). Egereken végzett vizsgálatok eredményei szintén azt mutatták, hogy jóval magasabb volt a leptin mRNS szint a szubkután zsírszövetben, mint a viscerális zsírszövetben, és a kétféle zsírdepó által termelt leptin mennyisége között szignifikáns különbség volt felfedezhető (Guo et al, 2004). Kutyákban eddig még nem írták le, hogy a testzsír eloszlása miképpen befolyásolja a szérum leptinszintjét.

2.3.2.2. A zsírsejtek méretének befolyásoló hatása

Az adipociták egyetlen zsírcseppet tartalmaznak, melyek trigliceridekkel való telítődése során nő meg a méretük. A leptin kutatása során rájöttek, hogy a termelés mértékét nem feltétlenül a zsírszövet mérete szabja meg. Tanulmányokkal alátámasztották mind emberekben (Couillard et al, 2000; Skurk et al, 2007), mind egerekben (Guo et al, 2004), hogy a plazma leptinkoncentráció sokkal inkább összefüggésben van az adipociták méretével, mint az adipociták számával. Minél nagyobb egy zsírsejt, annál több leptint termel. Couillard és munkatársai által végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a nőkben ugyan nagyobb a szubkután zsírszövet aránya, mint férfiakban, de nem ez az oka annak, hogy magasabb a plazma leptikoncentrációjuk, hanem a nőkben kimutatott nagyobb méretű adipociták fokozott leptinszekréciója (Couillard et al, 2000).

2.3.3. Az elhízás hatása a leptinszintre, leptinrezisztencia

A plazma leptinszint jó tájékoztatást ad az elhízás mértékéről kutyában. Egy tanulmány szerint normál kondíciójú (BCS 3) kutyákban 3.0 ± 0.2 ng/ml, a túlsúlyos (BCS 4) kutyákban 8.6 ± 0.7 ng/ml, a kövér (BCS 5) kutyákban pedig 12.8 ± 0.8 ng/ml értéket ér el. Ez alátámasztja, hogy a plazma leptinszint mennyiségi jelzője az elhízás mértékének kutya fajban (Ishioka et al, 2007). Az is megállapítható, hogy a kezdődő zsírfelhalmozódás egyik legelső jelzője a megemelkedett leptinszint. Ivartalanított kutyákban a csökkent aktivitás, és a fokozott táplálékbevitel hatására pozitív energiamérleg alakul ki (több a táplálék felvétel, mint az energiafelhasználás), így a szervezet a testtömeg gyarapodás limitálása végett emelkedő leptinszinttel reagál. A jelentős hízás azonban azt mutatja, hogy a leptin mégsem fejt ki hatását megfelelően (Jeusette et al, 2006). Huszonnégy beagle kutyát vizsgálva, Jeusette és munkatársai megfigyelték az elhízás és a fogyás hatását a plazma ghrelin- és leptinkoncentrációjára. A vizsgált krónikusan kövér kutyákban a leptinkoncentráció 5.8-szor magasabb volt, mint a sovány kontrollcsoportnál. Feltételezhető tehát, hogy ugyanúgy mint kövér embereknél, leptinrezisztencia alakul ki az elhízott kutyáknál is (Jeusette et al, 2005).

2.3.4. Más leptinszintet befolyásoló tényezők

Számos tanulmány bizonyítja, hogy a leptinszintre különböző hormonok, metabolitok, gyógyszerek is hatással vannak. Egyes vizsgálatok arra engedtek következtetni, hogy a glükokortikoid adagolása képes befolyásolni a keringő leptinszintet. Azt figyelték meg, hogy a hatás függ a dózistól és az applikálás módjától is (Radin et al, 2009). Például a dexamethazon növeli a szérum leptinszintet, és elősegíti az étkezés utáni leptin csúcs kialakulását. Egy kísérletben figyelték a 2ml (1mg/ml dózisu) szubkután beadott dexamethazon injekció hatását a leptinszintre kutyákban. Az állatok injekciót egész éjszaka koplalás után kapták. A beadás előtti leptinszint 2.7 ± 0.8 ng/ml volt, a dexamethazon injekció után fokozatosan emelkedett 4.5-6.7 ng/ml-re az első 6-24 órában. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a dexamethazon tartós hatással van a leptinszintézisre, és a zsírszövetre, ami annak lehet a következménye, hogy az exogén dexamethazon felezési ideje a szövetekben 35-54 óra (Ishioka et al, 2002). Nishii és munkatársai által végzett tanulmányban 0,1 mg/kg dózisu dexamethazont adva intravénásan mind etetett és nem etetett kutyáknak, megfigyelték, hogy az etetett állatok esetében a dexamethazon drasztikusan növelte a plazma leptinkoncentrációt, míg a nem etetett kutyáknál alig volt észlelhető leptinszint emelkedése. Más kísérletben az orálisan adott prednisolon hatását vizsgálták, és azt tapasztalták, hogy a prednisolon nem okoz változást a leptinszintben dózistól függetlenül (Nishii et al, 2006/a). Egy másik tanulmányban a methylprednisolon dózisfüggő hatását bizonyították azzal, hogy 3 különböző dózisu (1-5-10mg/kg) methylprednisolon injekciót adtak intramuszkulárisan kutyáknak. A beadás előtti leptinszint átlagban 2.5 ± 0.1 ng/ml volt. Az alacsony dózisu methylprednisolon injekció hatására egyértelmű növekedés volt észlelhető a leptinszintben a beadást követő 2-12 órában. A közepes dózis először csökkenést okozott, majd progresszíven emelkedett a leptinszint és túllépte a kontroll értéket a 12. órában. A nagy dózis hatására pedig jelentősen csökkent a szérum leptinszint. Kimondható tehát, hogy methylprednisolont adva kutyáknak, alacsony dózissal növekedett, nagy dózissal csökkent a leptinkoncentráció (Yilmaz et al, 2007).

A *hypothyreosis* az egyik leggyakoribb endokrin betegség kutyákban. Az elhízás az egyik legfőbb tünete ennek a betegségnek. A *hypothyreosis* során megváltozik a szervezet zsír- és szénhidrát metabolizmusa, amivel párhuzamosan változik a plazma leptin- és inzulinkoncentrációja is. Feltételezhető, hogy a thyroid hormon közvetlenül is hat a leptinkoncentrációra, emellett a *hypothyreosis* által kialakuló kövérség és hiperinzulinémia is

közrejátszik a hiperleptinémia kialakulásában. *Hypothyreoid* kutyákban is megfigyelhető a pozitív korreláció a plazma leptinszint és a kondíció között. Ellenben nem találtak összefüggést a leptinkoncentráció és a koleszterol- vagy triglycerid koncentráció között, amiből arra lehet következtetni, hogy a hiperlipidémia nem olyan fontos faktor a hiperleptinémia kialakulásában. A tanulmány során 25 újonnan diagnosztizált *hypothyreoid* kutyát vizsgáltak. Az eredmények azt mutatták, hogy *hypothyreoid* kutyákban jelentősen emelkedik a leptin- és inzulinkoncentráció (Mazaki-Tovi et al, 2010).

Bőr alá beadott exogén inzulin hatására is leptinszint emelkedés figyelhető meg koplaltatott kutyákban, habár ennek mértéke nem olyan nagy (Ishioka et al, 2005).

2.3.5. Az inzulinérzékenység hatása a leptinszintre

Az elhízás inzulinrezisztenciát okoz, mind kutyában-macskában, mind emberben és laboratóriumi rágcsálókban. Ezt kompenzálva több inzulin szekretálódik. Kutyákban ez a folyamat még nem teljesen tisztázott. Lehetséges, hogy olyan inzulinserkentő mediátorok, mint a glükóz, egyes hormonok (például a bél által szekretált glukagone-like peptide-1 (GLP-1)) és citokinek (mint a zsírszövet által termelt leptin, adiponectin, és TNF) módosítják az inzulin szekréciót. A természetesen elhízott kutyákban a kompenzáló éhezési hiperinzulinémia nem ismert. Az inzulinszint fő szabályozója a glükóz, de néhány tanulmány, amit elhízott kutyákon végeztek azt mutatja, hogy a glükóznak nincs szerepe az inzulin túltermelés kiváltásában. Ha az inzulin termelése nem megfelelően kompenzálja a koplaláskor kialakult inzulinrezisztenciát, éhezési hiperglikémia alakul ki, ami fontos része a 2-es típusú cukorbetegségnek emberben. Habár már vizsgálták kutyákban a 2-es típusú diabetes-t, nem mutatkozik határozottan ebben a fajban. Elhízott kutyák nem veszítik el az első fázisú inzulin szekréciójukat, ami egy korai jelzője a 2-es típusú DM kialakulásának. Az sem teljesen tisztázott, hogy vajon előfordul-e az éhezési hiperglikémia kutyákban természetes formában vagy sem, mivel az erre irányuló vizsgálatok eredményei alapján még nem tudták megválaszolni a kérdést. Előidézett kövérség esetén például kevesebb idő is elég a kompenzációra, és a magas zsírtartalmú diéta maga is rontja az inzulin szekréciót, így az előidézett kövérség kutyákban nem feltétlenül reprezentálja a természetesen elhízott egyedeket. Verkest és munkatársai vizsgálták a leptin, az adiponectin, és a GLP-1 kórélettani fontosságát az elhízás okozta glükóz homeosztázis-, plazma inzulinkoncentráció-, és

inzulinérzékenység változásában a természetesen előforduló túlsúlyos és kövér kutyákban Path analízissel. A „path analysis” egy olyan módszer, ami modellezi a komplex összefüggéseket egyes adathalmazok között, a megfigyelésen alapuló adatok kielemezésével. 104 kutyát vontak be a vizsgálatba, 29 sovány, 55 túlsúlyos, és 20 kövér kutyától vettek vért egyszer 20 órával az etetésük után. A plazma inzulin- és leptinkoncentrációja pozitív korrelációt mutatott az elhízással, de nem volt fellelhető pozitív kapcsolat az adiponectin koncentráció és az elhízás között. A pancreas β -sejtjeinek aktivitása nőtt, az inzulinérzékenység csökkent az elhízás növekvő mértékével. A plazma glükóz koncentrációja nem változott jelentősen az elhízással, nem volt mérhető hiperglikémia a kutyáknál, habár észlelhető volt némi növekedés, a kövér kutyákban átlagosan magasabb volt a glükózszint. Az eredmények azt mutatják, hogy a kutyák jól kompenzálják az elhízás okozta inzulinrezisztenciát, és fenntartják a normál plazma glükóz koncentrációt. Világos, hogy túlsúlyos és kövér kutyákban létezik inzulinrezisztencia, hisz az alap inzulinkoncentrációjuk emelkedett, de nem hiperglikémiások. A vizsgálat azt is mutatja, hogy az elhízott kutyák kompenzálják az elhízás okozta inzulinrezisztenciát, úgy hogy több inzulint termelnek amikor sok glükóz kerül a szervezetükbe (evés után).

Ez a tanulmány rámutat arra, hogy a leptin kapcsolatban van a kompenzációs hiperinzulinémiával inzulinrezisztens túlsúlyos és kövér kutyákban, függetlenül az elhízástól. Leptinreceptorok találhatóak a pancreas β -sejtjein, tehát a leptinkoncentráció feltehetően befolyásolja az inzulin szekréción, de ellentmondásosak az adatok arról, hogy vajon a leptin növeli vagy csökkenti-e a glükóz által kiváltott inzulintermelést. A leptin elősegíti a β -sejt proliferációt, de a tények azt mutatják, hogy a leptin hatása a β -sejteken eltérő, és attól függ, hogy a szervezet milyen metabolikus stádiumban van éppen. Vékony állatokban és sejt kultúrákban megnövekedett inzulinkoncentráció gátolja az inzulin szekréción, alacsony leptinkoncentráció ugyanakkor serkentőleg hat az inzulintermelésre. Felfedezték, hogy a β -sejteken lévő triglicerid fontos szereppel bír. Ha sok a triglicerid (dagadt a β -sejt és a kutya is) akkor emelkedett leptinszint figyelhető meg, és kevés inzulint termel a β -sejt. Ha kevés a triglicerid, akkor alacsonyabb a leptinszint és sok inzulin termelődik. Ezzel hozható összefüggésbe, hogy a leptin feltételezhetően meggátolja β -sejt apoptózisát, ami azért következne be, mert ectopiás zsírsavak jelennek meg benne. Az eredmények azt mutatják, hogy a leptin nem csökkenti a koplaláskor létrejövő inzulinszekréción mértékét, és talán mediálja a kompenzációs inzulinszekréción növekedést azokban a kutyákban, akik elhízásos inzulinrezisztenciában szenvednek. Összefoglalásképp, a fiziológiánál jóval magasabb leptinkoncentráció gátolhatja az inzulinszekréción normál kondíciójú egyedekben, de úgy

tűnik a leptin szükséges a β -sejtek normális működéséhez. Emelkedő leptinszint kutyában megelőzheti az elhízás indukálta hipertrigliceridémiát az inzulinszekréció gátlásával (Verkest et al, 2011).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. *Mintagyűjtés*

A mintákat a SZIE-ÁOTK Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék és Klinika Kisállatklinikájának a szülészeti szakrendelésére behozott 80 kan és szuka kutyákból gyűjtöttük, melyek az ivari ciklus vagy a vemhesség valamely stádiumában voltak. A vérvételt reggeli időszakban, vagy a műtétet megelőzően végeztük, körülbelül tizenkét óras koplaltatást követően. Az alvadásban nem gátolt vért a *vena cephalica antebrachi*-ből gyűjtöttük. A vércukorszintet rögtön a vérvétel után határoztuk meg. A vérmintákból a hormon szinteket később mértük, emiatt a plazmát 1500/perc fordulatszámon történő centrifugálással elválasztottuk az alakos elemektől, és -18 °C-on tárolva tettük félre a hormon szintek méréséig.

3.2. *A vércukorszint mérés*

A vérvételt követően azonnal mértük az éhomi vérglükóz szintet, gyors, kvantitatív analízist végző Dcont Personal vércukormérő műszerrel.

3.3. *A hormonszintek vizsgálata*

A leptin és az inzulin hormonszintjének kimutatására ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay – enzimhez kötött ellenanyag vizsgálat) módszert vettünk igénybe, mely szilárd fázison lejátszódó színreakcióra alapul. Az eljárás alapja, hogy a polisztirol mikrotitráló lemezek felületére előzőleg ellenanyagot abszorbeálnak, amelyhez a később hozzáadott vizsgálandó vérsavó specifikus antigénjei kötődnek, majd ehhez olyan fajspecifikus antiglobulin-savót adunk, amelyet már előre konjugáltunk torna-peroxidázzal vagy más enzimmal. Ezután az egész ellenanyag-antigén-antiglobulin-konjugátum komplexet

az enzim szubsztrátjának hozzáadásával láthatóvá tesszük színreakció formájában és kolorometrikusan kiértékeljük (Tuboly, 1998).

3.3.1. A leptinszint meghatározása

A leptinszint meghatározását gyári Canine Leptin ELISA Kit-el hajtottuk végre. Ez egy úgynevezett direkt Sandwich ELISA teszt.

A kit a következőket tartalmazza:

- Mikrotitráló lemez 96 lyukkal: kecske anti-kutya leptin antitestekkel bevonva
- 2x50ml mosó puffer koncentrátum
- 0,5ml kutya leptin standard
- 2x0,5ml különböző koncentrációjú kutya leptin kontroll
- 10ml puffer oldat
- 11ml kutya-leptin detektáló antitest (kecske anti-kutya leptin antitest) oldat
- 12ml pufferelt, enzim konjugátum
- 12ml TBM (tetra-metyl-benzidin) szubsztrát oldat
- 12ml stop oldat (3M sósav)

Munkamenet:

Előkészítés:

1. A standard oldathoz hozzáadunk 0,5ml desztillált vizet, óvatosan összerázzuk, és 5percig állni hagyjuk. Majd hígítási sort készítünk, úgy hogy 6 kémcsőbe 0,25ml puffert mérünk ki, és az elsőhöz hozzámérünk 0,25ml elkészített standard kutya leptint, összekeverjük, és átmérünk a másodikba 0,25ml-t. Ezt folytatva a többi kémcsőben előállítjuk a hígítási sort.

2. Mindkét kutya leptin mennyiségi kontrollt (QC1, QC2) 0,5ml desztillált vízzel kiegészítünk, óvatosan összekeverjük, és 5percig állni hagyjuk, majd jól összekeverjük.

1. Mindkét mosó puffer koncentrátumot felhígítunk 450ml desztillált vízzel.

2. A megfelelő számú lyukat 3x átmoszuk alaposan a hígított mosó pufferrel, 300 µl-t használva alkalmanként.
 3. Ezután a lyukakba pipettázunk 80 µl puffert.
 4. Az üresen hagyott lyukakba 2 párhuzamosban 20 µl puffert pipettázunk.
 5. Majd 2 párhuzamosban 20 µl növekvő koncentrációjú kutya leptin standardot, és 20-20 µl QC1-t és QC2-t pipettázunk a megfelelő lyukakba, és a megmaradt lyukakba belemérjük a 20 µl mintát lyukanként.
 6. Lefedjük a lemezt, és szobahőmérsékleten 2 órán át rázókeverőn rázatjuk. Ezután leöntjük az oldatokat a lemezepről.
 7. Újra átmoszuk a lyukakat háromszor, alkalmanként 300 µl mosó puffert használva.
 8. Majd 100 µl kutya-leptin detektáló antitest oldatot adunk hozzá minden lyukhoz, és 1 órán át szobahőmérsékleten rázókeverőn helyezük el. Utána leöntjük a lemezepről az oldatokat.
 9. Ismét átmoszuk a lyukakat 3x, 300 µl mosó pufferrel mosásonként.
 10. Ezután 100 µl enzim konjugátumot pipettázunk minden lyukba, és a lemezt ismét 30 percre a rázókeverőre helyezük szobahőmérsékleten. A végén leöntjük az oldatot a lemezepről.
 11. Majd megint átmoszuk a lyukakat 300 µl mosó pufferrel, alkalmanként, összesen 6 alkalommal.
 12. Minden lyukhoz hozzáadunk 100 µl szubsztrát oldatot, és rázókeverőre tesszük 5-20 percre. A kék szín jelzi a leptin jelenlétét, és intenzitása a koncentrációját.
 13. Végezetül hozzáadjuk a stop oldatot, és kézzel összerázzuk.
- A kapott sárga színváltozást 5 percen belül 450nm-n, és 590nm-n fotometriásan vizsgáljuk.

3.3.2. Az inzulinszint meghatározása

Az inzulin szint meghatározására előre gyártott Mercodia Canine Insulin ELISA tesztet alkalmaztunk. Ez egy szilárd fázisú ELISA teszt, és plazmából (vagy szérumból) való inzulin szint kvantitatív meghatározására alkalmas.

A kit a következőket tartalmazza:

- Mikrotitráló lemez: monoklonális egér anti-inzulin antitestekkel bevont, összesen 96 lyukkal
- 1 ml 0,02 µg/l sertés inzulin tartalmú standard oldat
- 1 ml 0,05 µg/l sertés inzulin tartalmú standard oldat
- 1 ml 0,15 µg/l sertés inzulin tartalmú standard oldat
- 1 ml 0,5 µg/l sertés inzulin tartalmú standard oldat
- 1 ml 1,5µg/l sertés inzulin tartalmú standard oldat
- 5 ml sárga színt biztosító standard „0” oldat
- 1,3 ml enzim konjugátum (egér anti-inzulin-peroxidáz konjugátum)
- 13 ml pufferelt, kék színt biztosító enzim konjugátum
- 40 ml mosó puffer oldat
- 22 ml TBM (tetra-metil-benzidin) színtelen szubsztrát oldat
- 7 ml stop oldat (0,5M kénsav)
- kalibrációs görbe

Munkamenet:

1. Szobahőmérsékletűre melegítjük a mintákat és reagenseket.
2. Összekeverjük az enzimkonjugátumot és a pufferelt enzim konjugátumot a megfelelő térfogatban, így előkészítjük az enzim konjugátum oldatot.
3. A lemezt a keretbe helyezzük, ezután a lyukakba 25-25 µl-t pipetázunk a standard oldatokból és a szérum mintákból.
4. Az enzim konjugátumból 100 µl-t pipetázunk a bemért oldatokra, és 2 órán át rázókeverőn rázatjuk, mialatt szobahőmérsékleten inkubáljuk.
5. Lyukanként 700 µl mosópufferrel 6-szor mossuk a lemezt.
6. Az utolsó mosás végeztével a folyadékot a lyukakból kiöntjük, és a maradékot kiütögetjük egy abszorbens papírra.
7. 200 µl TBM szubsztrát oldatot mérünk minden lyukhoz, majd 15 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk.
8. Ezután megállítjuk az enzimátikus reakciót 50 µl stop oldat hozzáadásával, és a lemezt 5 percre rázókeverőre tesszük.

A kapott színelváltozást 30 percen belül fotometriásan vizsgáljuk 450 nm-n, majd a kapott eredményt a kalibrációs görbe segítségével értékeljük.

HOMA-IR (Homeostasis Model of Assessment - Insulin Resistance)

Az éhomi vércukor és az éhomi inzulin szorzatából számolható, az inzulinrezisztencia fokát meghatározó index érték.. Az ELISA vizsgálat során $\mu\text{g/l}$ mértékegységben kapott eredményeket $\mu\text{U/ml}$ -re kell váltani, hogy kiszámolhassuk belőle az indexszámot.

$$\mathbf{HOMA-IR = G_0(\text{éhom}i \text{ plazma glükóz } (\mu\text{U/ml})) \times I_0(\text{éhom}i \text{ plazma inzulin } (\text{mmol/l})) / 22,5}$$

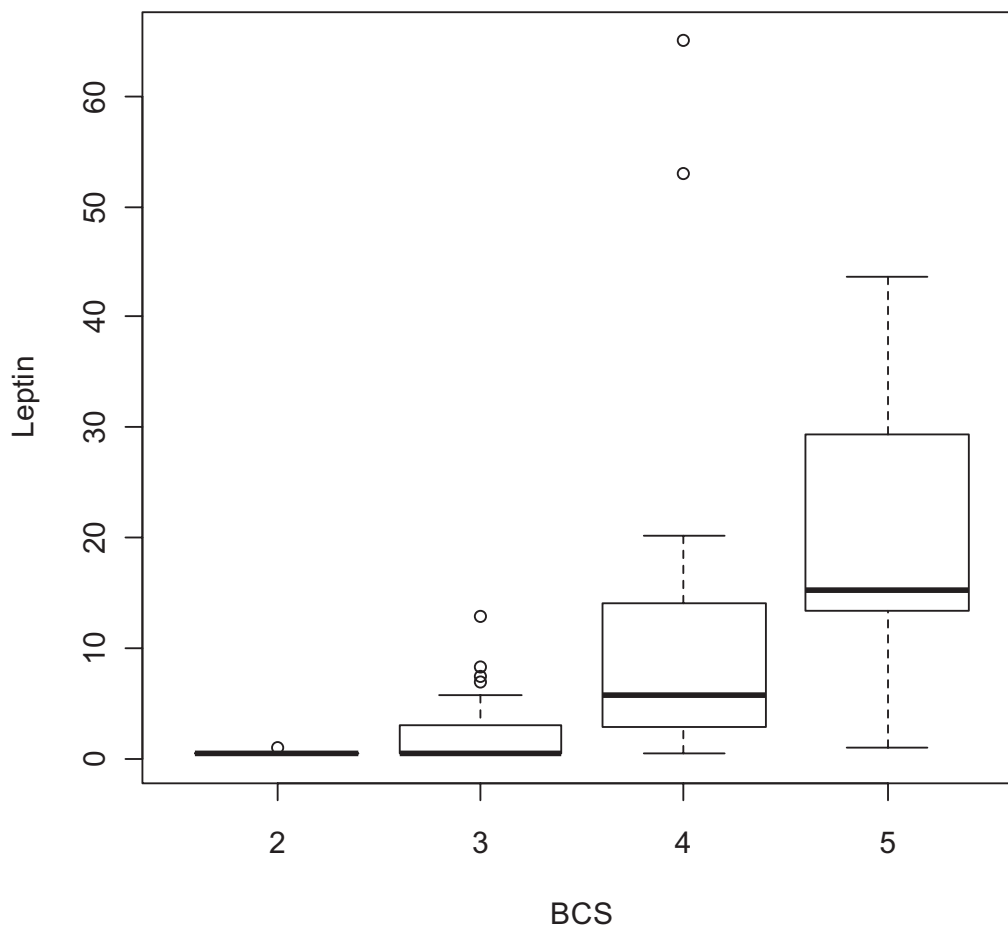
4. EREDMÉNYEK

A vizsgálataink során 78 kutyából származó vérminta mérési eredményét dolgoztuk fel. A kutyákat kondíciójuk szerint BCS (body condition scores) csoportokba soroltuk. A vizsgált kutyák közül 5 volt alultáplált (BCS 2), 29 volt normál kondícióban (BCS 3), 23 volt túlsúlyos (BCS 4), és 6 volt kövér (BCS 5), 15 kutya esetében nem volt ismert azok kondíciója. Az állatok közül 59 szuka, 19 pedig kan volt, az egyedek életkora változó volt. A plazma leptinkoncentráció meglehetősen nagy különbséget mutatott az egyes egyedeknél. A legkisebb mért érték 0,4 ng/ml volt, a legmagasabb pedig 65 ng/ml, átlagnak 7, 764 ng/ml-t kaptunk (3. táblázat). A leptinkoncentráció a BCS 2 csoportban 0,4 ng/ml és 0,93 ng/ml közé esett, az átlag 0,506 ng/ml volt. A BCS 3 csoportba tartozó egyedek leptinszintje 0,4 ng/ml és 12,81 ng/ml között volt, átlagosan 2,282 ng/ml értéket mutatott. A BCS 4 csoportban volt mérhető a legnagyobb szórás, a minimum érték 0,4 ng/ml volt, a maximum érték 65 ng/ml, az átlaguk pedig 12,174 ng/ml volt. A BCS 5 csoportban a leptinszint legalacsonyabb mért értéke 1ng/ml volt, a legnagyobb érték pedig 43,73 ng/ml, átlagosan 19,675 ng/ml (2. táblázat).

| BCS | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------|----------|----------|----------|----------|
| egyedszám | 5 | 29 | 23 | 6 |
| minimum | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 1 |
| maximum | 0,93 | 12,81 | 65 | 43,73 |
| átlag | 0,506 | 2,282069 | 12,17435 | 19,675 |
| Szórás | 0,237023 | 3,122376 | 16,05189 | 14,83266 |

2. táblázat: A leptinszintek (ng/ml-ben) változása BCS csoportonként.

A kapott adatok alapján látható, hogy a kondíció pontok emelkedésével megállapítható a leptinkoncentráció emelkedő tendenciája. Statisztikai módszerrel (Anova) kimutattuk, hogy a BCS 2 és a BCS 3 csoport között nincs szignifikáns különbség a leptinszintet tekintve, ugyanígy nem tapasztalható szignifikáns különbség a BCS 4 és a BCS 5 csoport között sem. Ám a BCS 2 – BCS 3 és a BCS 4 –BCS 5 csoportok között már szignifikáns különbség látható a leptinkoncentráció tekintetében (1. ábra).



1. ábra: A leptinszint változása a különböző BCS csoportokra vonatkoztatva. Az ábra a leíró statisztika öt legfontosabb értékét mutatja az általunk vizsgált csoportokban, így a legkisebb és legnagyobb értékeket a negyedelőket és a mediánt.

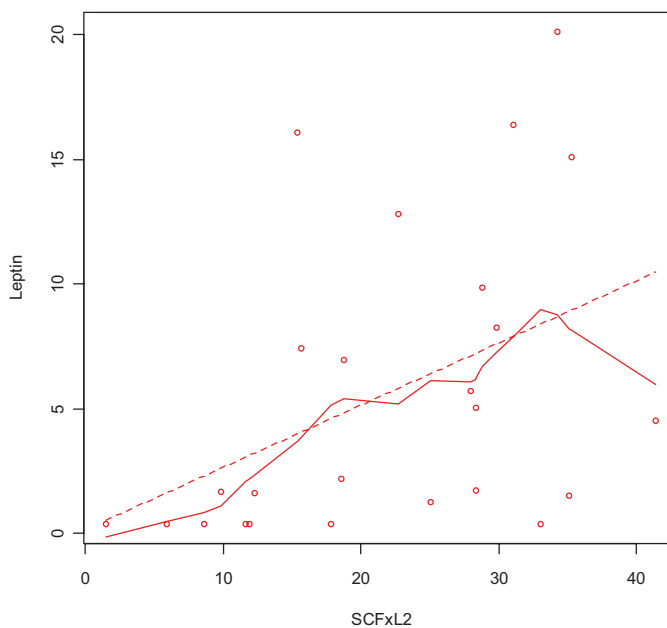
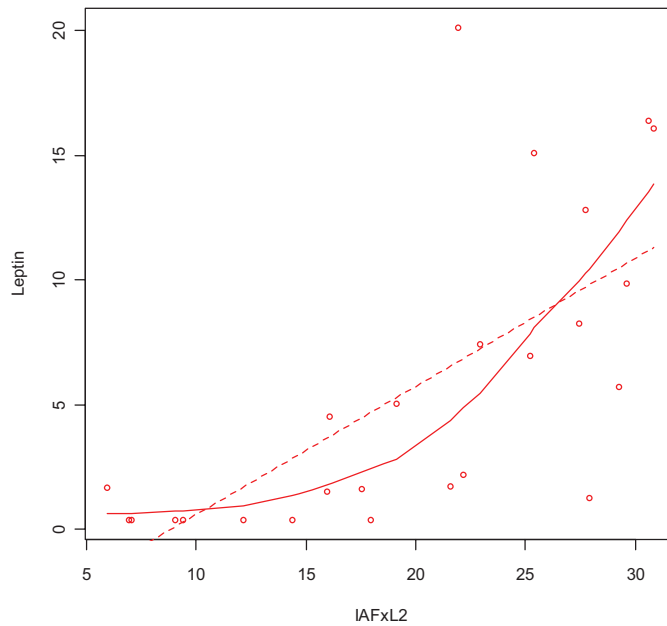
Megállapítható tehát, hogy a BCS növekedésével a leptinszint is emelkedik. A tápláltsági állapot és a szérumban a leptinkoncentráció között pozitív korreláció van. Továbbá nem volt felfedezhető számottevő különbség a plazma leptinkoncentrációjában a kutyák nemét és korát illetően. Az elemzett minták száma pedig nem tette lehetővé, hogy vizsgáljuk a fajták közötti különbséget a leptinszintre vonatkoztatva.

Az inzulinszintek értékeit eredetileg ng/ml-ben mértük, de a HOMA-IR számítása miatt átváltottuk $\mu\text{U/ml}$ -re, így a mért inzulinkoncentrációk átlagértéke $4,15 \mu\text{U/ml}$ lett, a legkisebb mért inzulinszint $0,219 \mu\text{U/ml}$ volt, a legmagasabb mért inzulinszint pedig $32,967 \mu\text{U/ml}$ (3. táblázat).

| | Leptin ng/ml | Inzulin $\mu\text{U/ml}$ | HOMA-IR |
|---------|--------------|--------------------------|----------|
| minimum | 0,4 | 0,21978 | 0,046886 |
| maximum | 65 | 32,96703 | 14,06593 |
| átlag | 7,763924 | 4,150087 | 1,234653 |
| szórás | 11,89174 | 5,434444 | 2,371772 |

3. táblázat: A mért leptin- és inzulinszintek minimum, maximum és átlagértékei, szórásuk, és a számított inzulinrezisztencia foka.

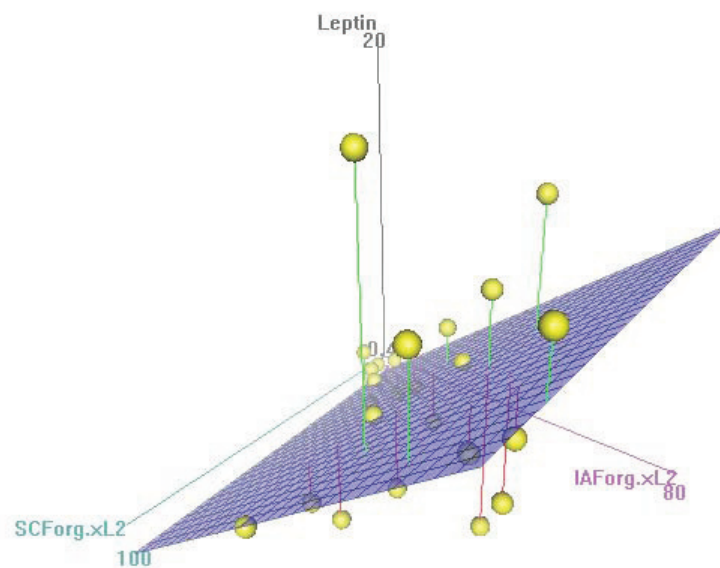
Egy korábban végzett vizsgálat alapján 25 állat esetében az előbbieken felsorolt hormonszintek mellett ismertük a zsírraktárak eloszlásának egyes paramétereit is. Így ezek esetében a kapott eredmények alapján volt lehetőségünk a zsíreloszlás leptinszintre kifejtett hatásának vizsgálatára is. Ezekben az egyedekben korábban, PET/CT vizsgálatok alapján (a lumbális kettes és hármas csigolya magasságában készített keresztmetszeti felvételeken, terület meghatározással) megállapították a has vizszerális valamint szubkután zsírtömeg nagyságát, illetve ezek arányát.



2. ábra: A leptinszint változása a második lumbális csigolya magasságában meghatározott (xL2) viszerális (IAF) és a szubkután (SCF) zsírdepók nagyságának függvényében. A felső grafikonon látható, hogy ugyan nem lineáris az összefüggés a leptinszint és a viszerális zsírszövet mérete között, a leptinszint mégis emelkedik a viszerális zsírdepók méretének növekedésével. Ez az összefüggés kevésbé jellemző a szubkután zsírszövet esetében, ahogy ez látható is az alsó grafikonon.

A 25 vizsgált kutya esetében, a zsírszövet eloszlását illetően alapvető különbségeket figyeltek meg. Függetlenül az állatok kondíciójától, az egyik részükben a zsírszövet nagyobb része a viscerális zsírdepókban, másik részükben pedig a szubkután zsírdepókban raktározódott. A vizsgált kutyák plazma leptinkoncentrációja vizsgálataink szerint 0,4- 20,1 ng/ml közé esett.

Statisztikai próbával teszteltük az egyes zsírdepók mérete és a leptinszint közötti összefüggést. Tekintettel arra, hogy az adatok előzetes grafikai elemzése alapján nem lineáris kapcsolat meglétét valószínűsítettük, a próbák alkalmával (linear model) a leptinszint logaritmusát vettük figyelembe. A vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a plazma leptinszintet sokkal inkább befolyásolja a viscerálisan helyeződő zsírszövet (IAF) mennyisége ($R^2: 0,64, p < 0,05$), mint a szubkután található zsírszövet (SCF) mennyisége ($R^2: 0,34, p < 0,05$) (2. - 3.ábra). Eredményeink szerint a viscerális és a szubkután zsírdepók egymáshoz viszonyított aránya nem befolyásolta a leptinszintet, ilyen típusú összefüggést nem tudtunk kimutatni.



3. ábra: A leptinszint alakulása a kettes lumbális csigolya magasságában, a szervek területéhez viszonyítva megadott szubkután (SCForg.xL2) valamint a viscerális (IAForg.xL2) zsírmennyiség növekedésének függvényében.

Hasonló statisztikai próbával értékeltük a leptinszint és a mérhető inzulinszint, valamint a HOMA-IR index érték összefüggését, illetve vizsgáltuk azt, hogy milyen mértékben befolyásolja a leptinszint és a viszcerális zsírmennyiség összefüggését a mérhető inzulinszint, illetve az inzulinrezisztencia foka. Ezekkel a próbákkal nem tudunk az előbbieken felsorolt tényezők közötti összefüggést kimutatni.

5. MEGBESZÉLÉS

A szakirodalomban leírtaknak megfelelően, vizsgálati eredményeink alapján is kimondható, hogy a leptinkoncentráció pozitív korrelációt mutat a kondícióval, így állítható, hogy a plazma leptinszintje jó mutatóként szolgál az elhízás mértékének kifejezésére kutyákban is. A vizsgált kutyák leptinszintjének az átlaga 7,764 ng/ml volt, ami az irodalmi adatokkal összevetve (Ishioka et al, 2007) alacsonynak mondható. Ez az eltérés magyarázható azzal, hogy a vizsgálatok során más ELISA kitet használtunk, illetve az egyes kondíciócsoportokba sorolt egyedek száma nagy eltéréseket mutatott. A BCS 3 csoport átlag leptinszintje 2,282 ng/ml volt, ami nagyjából megegyezik mások által korábban mért adatokkal. A BCS 4 csoportnál mért leptinszintek átlaga 12,174 ng/ml volt, amely viszont magasabbnak mondható más források adataihoz viszonyítva. A legkövőbb kondícióban lévő csoport (BCS 5) tagjai esetében mért átlag leptinkoncentráció 19,675 ng/ml volt, mely szintén magasabb a mások által mért adatoknál. A BCS 2 (alultáplált) és a BCS 3 (normál kondíciójú) csoport esetén mért adatoknál nem volt felfedezhető szignifikáns különbség, ugyanígy a BCS 4 (túlsúlyos) és a BCS 5 (kövér) csoportban mért adatok között sem volt szignifikáns eltérés. Az előbb említett 2-2 csoport adatai között már ki tudtunk mutatni szignifikáns különbséget. A kapott eredményekből kiderül, hogy a test zsírraktárainak növekedésével emelkedik a leptinszint is. A túlsúlyos és a kövér egyedekben mért magas leptinszint arra enged következtetni, hogy ugyanúgy mint embereknél, kutyáknál is leptinrezisztencia alakul ki az elhízás során. A vizsgált vérminták száma nem tette lehetővé, hogy összefüggést találjunk a plazma leptinkoncentrációja és a kor, a fajta, vagy éppen a nemek közti különbség között.

A szakirodalom elemzése során nem találtunk arra utaló adatokat, hogy a viszceralis, illetve a szubkután zsírdepók telítettsége milyen hatással van a keringő leptinszintre. Bár nem minden irodalom egységes ebben a tekintetben, a humán vizsgálatok szerint a hasüregben belül helyeződő zsírraktárak mérete szorosabb összefüggést mutat a metabolikus szindróma alapját is adó inzulinrezisztencia kialakulásával, míg a szérum leptinszintet inkább a szubkután depókban helyeződő zsír mennyisége határozza meg. A vizsgálati eredményeink alapján kimondható, hogy az emberrel ellentétben, kutya fajban a viszceralisan lerakódó zsírtömeg a fő meghatározója a mérhető leptinszintnek, míg a hasi bőralatti zsírmennyiség ezt kevésbé befolyásolja.

A mért inzulinszintek, és a vércukorszintek segítségével meghatározott, az inzulinrezisztencia fokára utaló index érték leptinkoncentráció változással mutatott feltételezett összefüggését nem tudtuk kimutatni. Voltak olyan egyedek melyekben a magas leptinszint mellett alacsony inzulinszint volt mérhető, ám általánosságban elmondható az adatokról, hogy a leptinszint emelkedést nem követte az inzulinszint csökkenés, illetve ezek között az adatok között szabályszerű összefüggést nem találtunk. Ezen vizsgálatok eredményei alapján nem tudjuk alátámasztani, hogy a magas leptinszint segítene megelőzni az inzulinrezisztencia kialakulását. Az is megállapítható, hogy emelkedett inzulinszint sem minden esetben járt emelkedett leptinszinttel, így az sem állítható, hogy az inzulin egymagában képes lenne serkenteni a leptin termelődését.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Közel egy éves vizsgálat keretében vizsgáltuk a kutyák testzsír mennyiségének befolyásoló hatását a leptinszintre, valamint ennek esetleges összefüggését az inzulinszinttel és az inzulinrezisztenciával. Emellett 25 kutya esetében lehetőségünk volt vizsgálni, hogy a leptin mely zsírdepó méretével mutat szorosabb összefüggést, a vizcerális vagy a szubkután zsírszövet határozza-e meg jobban a plazma leptinszintet.

Célunk volt rávilágítani az összefüggésre az elhízás foka és a leptinszint között, és alátámasztani azt a feltevést, miszerint az inzulinrezisztencia hatással van a plazma leptinkoncentrációjára.

A kapott eredmények alapján kijelenthető, hogy a leptinszint pozitív korrelációt mutat a test zsírszövetének növekedésével. A legmagasabb leptinszint a kondíciópontosítási rendszerben legmagasabb pontot (BCS 5) kapott egyedekben volt mérhető. A normál kondíciójú (BCS 3) és a túlsúlyos (BCS 4) illetve a kövér (BCS 5) egyedek mért leptinkoncentrációi között szignifikáns különbség volt felfedezhető. Emellett az eddig még kutyában nem vizsgált kérdésben, új eredményként tudunk beszámolni arról, hogy ebben a fajban is kimutatható a zsírdepók eloszlásának befolyásoló hatása a szérum leptinszintre. A vizsgálati eredmények azt mutatják, hogy a kutyákban - ellentétben az emberrel - a leptin koncentráció fő meghatározója nem a szubkután zsírszövet, hanem a vizcerális zsírszövet mennyisége. A vizsgálati eredmények alapján nem tudtuk kimutatni, hogy lenne összefüggés a leptinszint és az inzulinszint, valamint az inzulinrezisztencia foka között.

7. SUMMARY

Almost one-year investigation of the dogs we examined the effects of the amount of body fat on leptin production, and this possible associated between insulin levels and insulin resistance. With 25 dogs, we had the opportunity to examine whether the effect of leptin which adipose tissue produce higher levels of visceral or subcutaneous adipose tissue in order to better determine whether plasma leptin levels.

Our aim was to elucidate the relationship between the degree of obesity and leptin levels, and support the hypothesis that insulin resistance is closely related to plasma leptin concentration.

The findings suggests that leptin levels correlated positively with increased body fat. The highest leptin levels was measured in individuals whos has the highest point of body condition scoring system (BCS 5). Between the normal condition (BCS 3) dogs, and the overweight (BCS 4) dogs, respectively the obese (BCS 5) dogs measured leptin levels, there was a significant difference. In addition, the dog has not been investigated adipose tissue distribution of the influence of leptin synthesis was also verified. The test results show that in dogs - unlike human - the main synthesis of leptin is not in the subcutaneous adipose tissue, it is in the visceral adipose tissue. The findings will not be able to show a relationship between leptin levels and insulin levels and insulin resistance.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megragadni az alkalmat arra, hogy köszönetemet és tiszteletemet fejezzem ki mindenkinek, aki a szakdolgozatom elkészítéséhez nagyban hozzájárult.

Szeretném megköszönni témavezetőm, dr. Müller Linda segítségét és útmutatásait.

Köszönettel tartozom dr. Kulcsár Margitnak, aki rendelkezésemre bocsátotta a szakdolgozatomhoz szükséges könyv saját példányát. Szeretném megköszönni dr. Gabriel Cuevas-nak, a Toulouse-i Állatorvosi Egyetem tanárának, aki segítséget nyújtott a szakirodalomban való tájékozódásban. Továbbá köszönettel tartozom a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Könyvtár, Levéltár és Múzeum dolgozóinak a segítségéért.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Ahima R.S., Flier J.S., 2000: Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Trend sin Endocrinology and Metabolism* 11, 327-332.

Bokori, J., 2000: A leptin szerepe az élettani folyamatok szabályozásában és a takarmányozásban. *Magyar Állatorvosok Lapja* 122., 436-441.

Casanueva, F. F., Dieguez, C., 1999: Neuroendocrine Regulation and Actions of Leptin. *Frontiers in Neuroendocrinology* 20, 317–363.

Castrance, V.D., Henson, C.M., 2006: *Leptin*. New York: Springer Science+Business Media

Couillard, C., Mauriège, P., Imbeault, P., Prud'homme, D., Nadeau, A., Tremblay, A., Bouchard, C., Després, J.P., 2000: Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *International Journal of Obesity* 24, 782-788.

Edney A.T.B., Smith P.M., 1986: Study of obesity in dogs visiting veterinary practices in the United Kingdom. *Veterinary Record* 118, 391-396.

Friedman, J.M., 1998: Leptin, Leptin Receptors, and the Control of Body Weight. *Nutrition Reviews* 56, 38-46.

Gamba, M., Pralong, F.P., 2006: Control of GnRH neuronal activity by metabolic factors: The role of leptin and insulin. *Molecular and Cellular Endocrinology* 254-255, 133-139.

Guo, K.Y., Halo, P., Leibel, R.L., Zhang, Y., 2004: Effects of obesity on the relationship of leptin mRNA expression and adipocyte size in anatomically distinct fat depots in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, 112–119.

Havel, P.J., Kasim-Karakas, S., Mueller, W., Johnson, P.R., Gingerich, R.L., Stern, J.S., 1996: Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 81, 4406-4413.

Hervey, G. R., 1959: The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J. Physiol.* 145, 336-352.

Hetherington A.W., Ranson S.W., 1940: Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *The Anatomical Record*. 78, 149-172.

(a) Houseknecht, K.L., Portocarrero, C.P, 1998: Leptin and its receptors: Regulation of whole-body energy homeostasis. *Domestic Animal Endocrinology* 15, 457-475.

(b) Houseknecht, K.L., Baile, C.A., Matteri, R.L., Spurlock, M.E., 1998: The Biology of Leptin: A Review. *J. Anim. Sci.* 76, 1405–1420.

Ishioka K., Soliman M.M., Honjoh T., Shibata, H., Kimura, K., Saito, M., 2002: Dexamethasone increases serum leptin concentration in dogs. *Vet J.* 164, 295–297.

Ishioka K., Hatai H., Komabayashi K., Soliman, M.M., Shibata, H., Honjoh, T., Kimura, K., Saito, M., 2005: Diurnal variations of serum leptin in dogs: effects of fasting and re-feeding. *Vet J.* 169, 85–90.

Ishioka K., Hosoya K., Kitagawa H., Shibata, H., Honjoh, T., Kimura, K., Saito, M., 2007: Plasma leptin concentration in dogs: effects of body condition score, age, gender and breeds. *Res Vet Sci.* 82, 11–15.

Iwase M., Kimura K., Sasaki N., Komagome R., Ishioka K., Morimatsu M., Murakami T., Saito M., 2000: Canine leptin: cDNA cloning, expression and activity of recombinant protein. *Research in Veterinary Science.* 68, 109-114.

Jeusette I.C., Detilleux J., Shibata H., Saito, M., Honjoh, T., Delobel, A., Istasse, L., Diez, M., 2005: Effects of chronic obesity and weight loss on plasma ghrelin and leptin concentrations in dogs. *Res Vet Sci.* 79, 169–175.

Jesuette I., Daninet S., Nguyen P., Shibata H., Saito M., Honjoh T., Istasse L., Diez M., 2006: Effect of ovariectomy and ad libitum feeding on body composition, thyroid status, ghrelin and leptin plasma concentrations in female dogs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 90, 12-18.

Laflamme D. 1997: A Clinical Tool – Development and Validation of a Body Condition Score System for Dogs. *Canine Practice* **22**: 10-15.

Lahlou, N., Clement, K., Carel, J-C., Vaisse, C., Lotton, C., Le Bihan, Y., Basdevant, A., Lebouc, Y., Froguel, P., Roger, M., Guy-Grand, B., 2000: Soluble Leptin Receptor in Serum of Subjects With Complete Resistance to Leptin. *Diabetes* 49, 1347-1352.

Mazaki-Tovi, M., Feuermann, Y., Segev, G., Klement, E., Yas-Natan, E., Farkas, A., Kol, A., Shamay, A., 2010: Increased serum leptin and insulin concentrations in canine hyperthyroidism. *The Veterinary Journal* 183, 109-114.

Montague, C.T., Prins, J.B., Sanders, L., Digby, J.E., O’Rahilly, S., 1997: Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for control of regional fat distribution, *Diabetes* 46, 342-347.

(a) Nishii N., Takasu M., Ohba Y., Maeda, S., Kitoh, K., Ohtsuka, Y., Honjo, T., Saito, M., Kitagawa, H., 2006: Effects of administration of glucocorticoids and feeding status on plasma leptin concentrations in dogs. *Am J Vet Res.* 67, 266–270.

(b) Nishii N., Nodake H., Takasu M., Soe, O., Ohba, Y., Maeda, S., Ohtsuka, Y., Honjo, T., Saito, M., Kitagawa, H., 2006: Postprandial changes in leptin concentrations of cerebrospinal fluid in dogs during development of obesity. *Am J Vet Res.* 67, 2006–2011.

Radin, M.J., Sharkey, L.C., Holycross, B.J., 2009: Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. *Vet. Clin. Pathol.* 38/2, 136-156.

Ricci R., Bevilacqua F., 2011: The potential role of leptin and adiponectin in obesity: A comparative review. *The Veterinary Journal.* 10, 10-17.

Ronnemaa, T., Karonen, S.L., Rissanen, A., Koskenvuo, M., Koivisto, V.A., 1997: Relation between Plasma Leptin Levels and Measures of Body Fat in Identical Twins Discordant for Obesity, *Ann Intern Med.* 126, 26-31.

Skurk, t., Alberti-Huber, K., Herder, C., Hauner, H., 2007: Relationship between Adipocyte Size and Adipokine Expression and Secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92, 1023–1033.

Syed-Ahmed, A.; Rudas, P.; Bartha, T. 2004: A leptin hormon expressziója különböző fajú kerdzok egyes szoveteiben. *Magyar Allatorvosok Lapja* 126, 589-597.

Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K.J., Smutko, J.S., Mays, G.G., Woolf, E.A., Monroe, C.A., Tepper, R.I., 1995: Identification and Expression Cloning of a Leptin Receptor, OB-R. *Cell* 83, 1263-1271.

Verkest, K.R., Fleeman, L.M., Morton, J.M., Ishioka, K., Rand, J.S., 2011: Compensation for obesity-induced insulin resistance in dogs: assessment of the effects of leptin, adiponectin, and glucagon-like peptide-1 using path analysis. *Domestic Animal Endocrinology.*

Yilmaz Z., Ilcol Y.O., Golcu E., 2007: Serum leptin and ghrelin levels in response to methylprednisolone injection in healthy dogs. *Res Vet Sci.* 82, 187–194.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M., 1994: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-423.

Zöldág, L., Seregi, J., Gáspárdy, A., Maróti-Agóts, Á., 2008: Állatorvosi genetika és állattenyésztés. *Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar* 376p.