

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

Ivari ciklus során bekövetkező hormonális változások hatása a  
szérum leptin szint változására szuka kutyában

Szerző: Kók Eszter

Témavezető: dr. Müller Linda

Budapest

2013.

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. BEVEZETÉS</b> .....	<b>3</b>
<b>2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ</b> .....	<b>4</b>
2.1. AZ ELHÍZÁS JELENTŐSÉGE ÉS HÁTTERE.....	4
2.2. A KONDÍCIÓ VALAMINT AZ ELHÍZÁS FOKÁNAK MEGHATÁROZÁSA .....	5
2.2.1. Kondíció pontszám (BSC).....	5
2.2.2. Computer tomográfia (CT).....	6
2.2.3. Bioimpedancia mérés .....	6
2.2.4. Nehésvíz módszer.....	8
2.2.5. Ultrasonográfia.....	8
2.2.6. Leptin szint meghatározása vérplazmából .....	8
2.3. A LEPTIN HORMON .....	9
2.3.1. A kor és a fajta esetleges befolyásoló hatásai .....	9
2.3.2. A nem és az ivari ciklus befolyásoló hatása .....	10
2.3.3. A kondíció és az etetés befolyásoló hatása.....	13
2.3.4. Más leptin szintet befolyásoló tényezők.....	15
<b>3. ANYAG ÉS MÓDSZER</b> .....	<b>17</b>
3.1. MINTAGYŰJTÉS.....	17
3.2. A BIOIMPEDANCIA MÉRÉSE .....	18
3.3. A VÉRCUKORSZINT MÉRÉS .....	20
3.4. A HORMONSZINTEK VIZSGÁLATA.....	20
3.4.1. A leptinszint meghatározása.....	20
3.4.2. A progeszteronszint meghatározása .....	22
3.4.3. Az ösztrogenszint meghatározása .....	23
3.4.4. Az összkoleszterinszint meghatározása .....	24
3.4.5. A trigliceridszint meghatározása .....	25
3.5. ÉRTÉKELÉS .....	26
<b>4. EREDMÉNYEK</b> .....	<b>27</b>
<b>5. MEGBESZÉLÉS</b> .....	<b>32</b>
<b>5. MEGBESZÉLÉS</b> .....	<b>32</b>
<b>6. ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	<b>37</b>
<b>7. SUMMARY</b> .....	<b>38</b>
<b>8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	<b>39</b>
<b>9. IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	<b>40</b>

# 1. BEVEZETÉS

A társállatok körében előforduló elhízás egyre gyakrabban és széles körben észlelhető jelenség. A tény, hogy számos betegség kialakulása bizonyítottan összefügg az elhízással, megköveteli, hogy nagyobb figyelmet fordítsunk a kóros súlygyarapodásra és annak vizsgálatára.

A leptin nem olyan régen felfedezett, a zsírszövet által termelt hormon. Mint marker nagyon fontos lehet az elhízottság fokának megállapítása szempontjából, illetve szerepét egyre többször hangsúlyozzák metabolikus betegségek pathogenezisében. A szérum leptin szintet azonban, a zsírraktárak telítettségi fokán kívül több más tényező is befolyásolja. Humán vizsgálatok és patkányokon végzett kísérletek szerint, a nemi hormonok változása módosíthatja ezt a paramétert. A nemi működés során jellemző hormonális változások hatásának vizsgálata tehát elengedhetetlen előfeltétele a leptin későbbi, metabolikus státusz meghatározásakor, illetve a kondíció jellemzésekor használható paraméterként történő alkalmazásának.

A leptin koncentráció a vérből ELISA módszerrel mérhető. Szoros kapcsolatban áll a testzsír mennyiséggel, így kvantitatív markernek tekinthető, mely klinikai körülmények között is elérhető és nem igényel invazív beavatkozást. A leptinszint mérése ezért értékes módszernek bizonyulhat a szervezet zsírmennyiségének meghatározása során.

A dolgozat célja, a szérum leptin szint vizsgálata, az ivari ciklusuk ismert szakában járó szuka kutyákban. A plazmabeli leptin koncentráció alakulásának feltérképezése reményeink szerint nagy segítséget fog nyújtani a későbbiekben, az elhízás vizsgálatában, mivel szuka kutyáknál a leptinszint változása eddig szinte egyáltalán nem volt feltérképezve. A leptin szervezeten belüli bonyolult hatásait és hatásmechanizmusait még a mai napig sem sikerült teljes mértékben megismerni. A dolgozat segítséget nyújthat a leptinnel kapcsolatos, további vizsgálatok eredményeinek helyes értékelésében.

## 2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ

### 2.1. Az elhízás jelentősége és háttere

Az elmúlt 10 évben világszerte számos tanulmány jelent meg a házi kedvencek elhízásával kapcsolatban. Az állatorvoshoz vitt kutyák és macskák elhízásának gyakorisága egyre inkább nő. Az emberhez hasonlóan, az állatok elhízása is nagyban megnöveli számos betegség előfordulási arányát, megrövidíti az állatok életét és rontja az életminőségüket. A túlsúlyos állapot különböző daganatos, ortopédiai és szisztémás betegségekre is hajlamosít. A betegségek kialakulásának megakadályozásában, egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak az elhízás megelőzésének (German, 2006). Ahogy az embereknél már kiderítették, az állatoknál sem egyedül a bevitt energiamennyiség vagy a kevés mozgás a túlsúly kialakulásának egyedüli oka. Az elhízásnak multifaktorális háttere van, amely azt jelenti, hogy a táplálkozáson kívül egyéb külső behatások, úgy mint a genetikai háttér és bizonyos gyógyszeres kezelések is hajlamosító tényezőként hathatnak. Kutyák esetében nagyban számít a fajta. Például a labrador, cocker spániel, west highland white terrier, boxer és beagle fajtájú állatok hajlamosabbak az elhízásra, míg egyes fajták ellenállóak, mint például a grey hound. Számít az életkor is (idősebb egyedek kevesebb energiát igényelnek), ugyanakkor leggyakrabban az ivartalanítás hatását emelik ki. Ivartalanított beagle szukáknál 30 %-kal csökkentett energiatartalmú tápok etetésével érték el az ivartalanítás előtti normál testsúlyt (Jousette és mtsai, 2005).

Az a tény, hogy az állatok, hímek és nőtények egyaránt ivartalanítás után elhíznak, sok gondot jelent. Sokan próbálták már feltérképezni az elhízás hátterét, kevés sikerrel. A leptin felfedezése után felmerült a gondolat, hogy esetleg ez a hormon áll a jelenség mögött. Kanchuk és munkatársai kandúrokon végzett kísérletei azt mutatták, hogy az étvágy drasztikusan fokozódott az ivartalanítás után. A leptin szint ugyan növekedett a zsírtömeggel összhangban, viszont nem csökkentette az állatok energiafelvételét, étvágyát. (Kanchuk és mtsai, 2002). Olyan megfigyelések is léteznek, ahol az ivartalanított állat étvágyfokozódás nélkül növelte a testzsír tömegét. Ezt a jelenséget ivartalanított hörcsögöknél és patkányoknál írták le (Jones és mtsai, 1991; Roy és Wade, 1977).

A nemi hormonoknak (ezeken belül is leginkább az ösztrogénnek) fontos szerepük van az energia felvételben és a metabolismus szabályozásában (Zoran, 2010). Egyes kutatók demonstrálták az ösztrogén hatását a lipogenesis gátlásban és leírták az ösztrogén szerepét a zsírsejtek

mennyiségének meghatározásában (Cooke és Naaz, 2004). Ezért úgy tűnik, hogy az ivartalanítás után az ösztrogén szint csökkenése, egyrészt közvetlenül a központi agyi területeken (mint a hipotalamusz) keresztül tudja befolyásolni az elhízás mértékét - a csökkent metabolizmus szint és az éhségérzet befolyásolásán keresztül - másrészt közvetve, a sejtm metabolizmus és az energia hormonális szabályozásán keresztül, többek között ghrelin és a leptin közreműködésével (Diez és Nguyen, 2006; Houpt és Hintz, 1978; Jeusette és mtsai, 2005; Jeusette és mtsai, 2004; McGreevy, 2005; Edney és Smith, 1986).

## **2.2. A kondíció valamint az elhízás fokának meghatározása**

A kutya faj esetében, a fajták változatos mérete és eltérő testfelépítése szinte lehetetlenné teszi a zsírtömeg fajták közötti összehasonlítását. Kan és szuka, idős és fiatal eb között is eltér a fiziológiás testzsírtömeg. Az ideális, testösszetétel mérésre használt eszköznek pontosnak, megbízhatónak, gyorsnak, nem túl drágának, biztonságosnak és könnyen használhatónak, a mérési eredménynek pedig jól reprodukálhatónak kell lennie. Természetesen még nem fedeztek fel olyan módszert, amely mindegyik feltételnek megfelelné. Az elhízás okának és hatásainak megértéséhez elengedhetetlen egy pontos mérési technika alkalmazása (Elliott, 2006).

A testzsír mennyiség mérésére több módszer is alkalmas lehet. A legelterjedtebb a Body Condition Score (BSC) rendszer alkalmazása. További módszerek, amelyek használatosak klinikai körülmények között: a Computer Tomográfia, a bioimpedancia mérése, a nehézvíz hígítási módszer, az ultrasonográfia, illetve a szérumban a leptin szint meghatározása.

### **2.2.1. Kondíció pontszám (BSC)**

A BSC egy általános állapotfelmérésre szolgáló módszer, amely gyorsan elvégezhető a gyakorlatban. A felmérést végző személy adott pontozási rendszer alapján bírálja az állat kondícióját. A két leggyakrabban használt módszer az 5-ös vagy a 9-es pontskála. A 3-as illetve 5-ös pontszám tekinthető ideálisnak. A szemlélő egy vagy több jellegzetes testrész megvizsgálásával, megtekintéssel és tapintással dönti el, hogy az adott állat milyen pontszámot kaphat, hányas számú kategóriába sorolható be (Laflamme, 1997).

Ennek a módszernek előnye, hogy hamar megtanulható, gyorsan és műszer nélkül kivitelezhető. Hátránya, hogy egyéni véleményen alapszik, így nehezen ismételtető meg, és pontatlan (legfeljebb az dönthető el, hogy az állat kövér, sovány vagy ideális felépítésű-e) (Burkholder, 2001).

### **2.2.2. Computer tomográfia (CT)**

A computer tomográfia nagyon precíz eljárás, amivel a szervezetbeli zsíreloszlást is ki lehet mutatni. Főleg kutatásoknál használatos, amikor a hasüregi és a bőralatti zsírmennyiséget és annak eloszlását vizsgálják elhízással kapcsolatos betegségek esetén. A gép röntgensugarakat bocsájt a szervezetbe, majd egy számítógépen keresztül összerakva az egyes szeletekről készített röntgenképeket, részletdús felvételt kapunk. A gép használata és beszerzése rendkívül drága, de nagyon pontos és megbízható (Ishioka és mtsai, 2005b).

### **2.2.3. Bioimpedancia mérés**

A bioimpedancia mérésének lényege a víz-zsír eloszlása a szervezetben és ezek eltérő áramvezetőképességük. A zsírszövetben található vízmennyiség kevés, így ebben a szövetben keresztül haladó áram másként fog haladni, mint a sok vizet tartalmazó szöveten. A zsírszövet nagyobb elektromos ellenállással rendelkezik (nagyobb a rezisztenciája), ily módon lassítja az áram haladását. Ha alacsony áram segítségével megmérjük, hogy mekkora a szervezet ellenállása, következtethetünk a testzsír mennyiségre. Deuterium-oxiddal történt zsírszázalék mérés segítségével határozták meg a bioimpedancia mérőgép hatékonyságát, pontosságát. Ez a kísérlet a nehéz víz és annak radioaktivitásán alapult. Vért vettek 15 kutya nyaki vénájából, majd a vérszérum deutérium-oxid mennyiségét megmérték összehasonlításként. Ezután 0.2 ml/ttkg deutérium-oxid oldatot injektáltak be a melső láb vénájába, a fecskendő súlya az oldattal és oldat nélkül egyaránt le lett mérve. A nehézvíz diffúziós ideje 90 perc, majd 6 ml vért vettek a másik, érintetlen nyaki vénából. A vérszérum nehézvíz koncentrációját IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry) módszerrel analizálták.

A következő egyenlettel számították ki a test zsírszázalékát:

$$\text{Body fat percentage (\%)} = 100 - \{10^5 W_{D20} / (C_2 - C_1)\} / 0.732 \text{BW}$$

Ahol  $C_1$  a vérszérum nehézvíz koncentrációja az injekció előtt és  $C_2$  az injekció után. BW a kutya testtömegsúlya kilogrammban. A  $W_{D20}$  a befecskendezett nehézvíz grammban.

A kapott eredmények jól megegyeznek a mérőgéppel mért bioimpedanciával, függetlenül a kutya fajtájától és testméretétől (Ban és mtsai, 2009).

Individual		Body weight (kg)	Trunk length (cm)	Body fat percentage (%) by deuterium oxide dilution method	Bioelectrical impedance ( $\Omega$ )	Subcutaneous fat thickness (cm)
No.	Dog kind					
1	Welsh Corgi Pembroke	14.1	39	19.0	110.2	0.8
2	Labrador Retriever	30.2	49	29.3	177.4	1.2
3	Miniature Dachshund	9.6	37	31.5	216.7	0.8
4	Beagle	9.1	34	33.5	189.6	1.05
5	Miniature Dachshund	6.7	34	34.2	165.4	0.8
6	Miniature Dachshund	6.6	31	37.4	223.8	1.2
7	Miniature Dachshund	6.5	34	38.6	213.6	1.6
8	Beagle	15.7	37	39.0	212.3	1.1
9	Miniature Dachshund	6.1	34	39.8	225.6	0.8
10	Cairn Terrier	7.0	30	42.3	282.0	1.6
11	Shih Tzu	7.1	34	25.9	190.0	0.9
12	Miniature Dachshund	6.7	38	30.1	172.0	1.1
13	Chihuahua	4.1	29	22.4	183.2	0.65
14	Maltese	6.5	32	36.7	248.2	1.2
15	Chihuahua	3.5	29	32.6	221.8	0.8

1. Táblázat: Hígított deuterium oxiddal történt zsírszázalék mérés és a bőralatti zsírszövet vastagságának összehasonlítása a bioimpedanciával (Ban és mtsai, 2009).

Ez a módszer meglehetősen új és még igen kevés, az állatorvosi, klinikai felhasználáról szóló szakirodalom. Az állatorvos felhasználásra kifejlesztett gép nem túlságosan drága és könnyen kezelhető, a jövőben nagy valószínűséggel gyakrabban fogják alkalmazni a minden napi gyakorlatban. További előnyei, hogy gyors, viszonylag pontos és alacsony költségű (Stone és mtsai, 2009).

#### **2.2.4. Nehézvíz módszer**

A deuterium-oxid oldat elsősorban kísérleti kutatások során használatos. Ez egy indirekt módszer, ahol elsősorban a szervezet vízmennyiségét mérik egy ismert mennyiségű izotóp (leggyakrabban deuterium oxid) beinjektálása során, és annak maradékát határozzák meg a vérben egy bizonyos idő elteltével. Az alapelv, hogy a deuterium oxid mindenhol képes eloszlani, kivéve a zsírszövetben. E technika hátránya, hogy az eredmények csak laboratóriumi körülmények között számíthatók ki és időigényes. Előnye viszont, hogy ez az eddigi legpontosabb módszere a testzsírmérésnek (Burkholder, 2000).

#### **2.2.5. Ultrasonográfia**

Az ultrahanggal mérhető, bőr alatti zsírréteg vastagság, főleg a lumbális szakaszon, jól tükrözi a szervezetben levő összes zsírmennyiséget. Klinikai körülmények között jól használható, bár nem bevett szokás, annak ellenére, hogy az ultrahang készülék manapság szinte minden klinikán megtalálható. Hátrány, hogy megfelelő tudás és tapasztalat szükséges a gép használatához (Wilkinson és McEwan, 1991).

#### **2.2.6. Leptin szint meghatározása vérplazmából**

Kutyák elhízott egyedeiben is megnövekedik a leptin koncentráció, amely vérmintából könnyen megmérhető ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) módszerrel. A leptin szint és a zsírmennyiség szoros kapcsolatban áll, így kvantitatív módszernek tekinthető. Klinikai körülmények között egyszerűen megmérhető és kevésbé invazív, mint egyéb kvantitatív módszerek, például ultrasonográfia és a deuterium oxid módszer. Ezek hátránya, hogy költséges és laboratórium is szükséges az alkalmazásához (Ishioka és mtsai, 2002b).



## **2.3. A leptin hormon**

A Friedman és munkatársai által 1994-ben felfedezett, főleg fehér zsírsejtekből származó, 16 kDa-os peptid természetű hormon szintjének meghatározása nagy előrelépésnek bizonyult. Miután azon korábbi feltevések bebizonyosodtak, miszerint a zsírszövet egyben endokrin szervként is működik (Castracane és Henson, 2007), az elmúlt években számtalan kísérlet és vizsgálat történt a szervezetben létrejövő, leptin által kiváltott hatásokról. Felfedezték, hogy többek között reguláló hatása van a szervezet energia háztartásában és a jóllakottság érzet kialakításában, negatív feed-back hatás révén csökkentve az étvágyat. További hatása van még az ivari ciklusra, a pubertáció beindításában, ezen kívül aktiválja a szimpatikus idegrendszert, vérnyomás szabályozó hatású és a haematopoézisben is szerepet játszik. Az angiogenezisben, az agy és a csont fejlődésében is szerepet tulajdonítanak a leptinnek (Popovic és Casaneuva, 2002). Kiderült az is, hogy a hormont nem csak a zsírsejtek termelik, hanem számos más szerv is, úgy mint a gyomor, máj, petefészkek, humán placenta és a hipofízis. Ezekben a szervekben a leptin termelés funkciója még nem teljesen ismert (Bado és mtsai, 1998).

A kutya szervezetében termelődő leptin molekula hasonló szerkezetű mint a többi emlősé, 82-92%-os azonosságot mutat más fajokéval. A legnagyobb hasonlóságot a sertés leptin cDNS-sel mutatja. A leptin egy érett- és egy szignál részből áll. Összesen 167 aminosav alkotja, ebből 146 aminosav az érett részét, a maradék 21 aminosav a szignál részét képezi. Egy kutya leptin biológiai aktivitását vizsgáló tanulmány során hasonló biológiai aktivitást állapítottak meg, mint a többi emlősállat esetében (Iwase és mtsai, 2000).

### **2.3.1. A kor és a fajta esetleges befolyásoló hatásai**

Ishioka és munkatársai kutyák leptin szintjét vizsgálták, tekintettel fajtára, korra és nemre. A fajtát illetően alacsonyabb szintet találtak törpetacskóknál, míg a shetlandi juhászkutyáknál az átlagnál magasabb volt a leptin szint. Tehát a fajta némileg befolyásolhatja, de a legtöbb esetben ez nincs így, ezért összességében kijelenthető, hogy fajtától függetlenül egyformán alakul a leptin szint. A normál testsúlyú és különböző életkorú állatoknál nem találtak különbséget (Ishioka és mtsai, 2007). Az egy évnél fiatalabb, normál testsúlyú kölyköknél alacsonyabb szintet mértek, valószínűleg azért, mert relatíve kevesebb zsír található a fiatal szervezetben a felnőttekéhez képest (Ishioka és mtsai, 2007). Humán vizsgálatok során nem találtak korfüggő változást a leptin

szintben (Zhong és mtsai, 2005), ellenben Isidori és munkatársai szerint nők esetében, korral csökken a leptin szint (Isidori és mtsai, 2000). Szarvasmarhában végzett vizsgálat során nem találtak különbséget különböző fajták között a leptin szintben (Delavaud és mtsai, 2002).

### **2.3.2. A nem és az ivari ciklus befolyásoló hatása**

A már korábban emberben elvégzett vizsgálatok bizonyítják, hogy egy bizonyos minimális leptin koncentráció nélkülözhetlen a normális nemiciklus meglétéhez. Ismert jelenség például a sokat edző- és az anorexiás nőknél a menstruáció szünetelése (Cella és mtsai, 2000). A kutatóknak az is feltűnt, hogy ha ivarilag éretlen állatoknak leptint adnak, azok hamarabb válnak ivaréretté (Chehab és mtsai, 1997). A leptin és az ivari ciklus közötti kapcsolat létezése ezért bizonyított, bár a mechanizmus a kettő között még nem tisztázott. Valószínűsíthető, hogy kapcsolatot biztosít a szervezet energiaháztartása és a reprodukciós képesség között. Ez egyfajta visszajelzés a szervezet energiaszintjéről azért, hogy egy esetleges terhesség bekövetkeztekor, megfelelő energiamennyiség álljon rendelkezésre a vehem kihordásához (Blüher és Mantzoros, 2009).

A hipotalamusz ventromediális és laterális régiójában található számos leptinkötő receptor jelenléte azt sugallja, hogy a hormonnak ez az elsődleges agyi területe, ahol negatív visszacsatolással befolyásolni tudja a szervezet energia állapotát és pozitív visszacsatolással a nemi ciklust (Meister, 2000). A hipotalamuszon keresztül a gonadális hormonokat szabályozza, emberben napszakfüggő LH és ösztradiol csúcsokat kialakítva, illetve a GnRH hormon termelésének fokozását indukálja (Popovic és Casaneuva, 2002). Emberben a hipotalamusz-gonadális tengelyt közvetlenül is regulálja a petefészekben és a hipofízisen keresztül. A hipotalamuszban a luteinizáló hormon releasing hormon (LHRH) leadását képes fokozni, hipofízisben a luteinizáló hormon (LH) és a follikulus stimuláló hormon (FSH) leadását stimulálja. A petefészekben csökkenti az ösztradiol-17 $\beta$  szintézisét a granulóza sejtekben (Cella és mtsai, 2000). Patkányokon végzett kísérletek is bizonyítják, hogy a leptinnek nagy jelentősége van az LH csúcs kialakításában. A patkány hipofízisben leptin-receptorok és leptint kódoló régiók egyaránt megtalálhatók, amely felveti a lehetőséget, hogy autokrin és/vagy parakrin módon szabályozhatja az LH termelést (De Biasi és mtsai, 2001).

Az elhízással, illetve metabolikus problémákkal kapcsolatos vizsgálatok szempontjából elengedhetelen a kérdés megfordítása, tehát annak vizsgálata, hogy a nemi ciklus során jellemző

hormonális változások milyen módon határozzák meg, hogyan módosítják a szérum leptin szintet. Az irodalom sok szempontból nem egységes.

Egyes kutatók gyenge, de valószínű összefüggést találtak nőknél az LH és a leptin koncentráció változása között. További kísérletek szükségesek ahhoz, hogy kiderítsék miként hatnak ezek a hormonok egymásra (Teirmaa és mtsai, 1998). Cella és munkatársai nőkben leírták, hogy a luteális fázis alatt, leptin koncentráció növekedés következik be, amit egy korai növekedés előz meg, azzal egyidőben, amikor az LH, FSH koncentráció eléri a maximumot (Cella és mtsai, 2000). Egy 2006-ban közölt tanulmányban patkányokról írták le, hogy humán chorio gonadotropin (hCG) beadása esetén 4 órával később lecsökken a plazma leptinszint. Equine chorio gonadotropin (eCG) hatására, 48 óra elteltével megnőtt a koncentráció (Ricci és mtsai, 2006).

Az ösztrogén leptin szint alakulására kifejtett hatását több állatfajban vizsgálták. Emberben, sertésben és patkányokban egyaránt bizonyították, hogy az ösztrogén növeli a leptin koncentrációját. Ösztrogénnel kezelt patkányokban, kezeletlen intakt állatokhoz képest, megnőtt a vérbeli leptinkoncentráció. De Biasi és munkatársai arra a következtetésre jutottak patkányoknál, hogy az ösztrogén növeli a hipofízisben a leptin koncentrációt és a receptor expressziót, így fokozva a stimuláló jeleket, amelyek szükségesek a preovulációs GnRH csúcs kialakításához (De Biasi és mtsai, 2001). Egy szintén patkányokban végzett kísérlet arra utal, hogy a proösztroz során, a megemelkedett ösztrogén szint hatására a leptin szint is emelkedik, ami majd kiváltja a preovulációs LH-csúcsot (Tanaka és mtsai, 2001). Shimizu és munkatársai kimutatták patkányban és emberben egyaránt az ösztrogén leptin koncentrációt emelő hatását. Ivartalanított patkányoknak beadott exogén ösztrogén hatására megnőtt a szérum leptin koncentráció. Posztmenopauzális nőkben alacsonyabb leptin szintet találtak, mint prémenopauzális nőkben (Shimizu és mtsai, 1997). Mannucci és munkatársai úgy vélik, hogy FSH adagolás nőknél ösztrogén és párhuzamosan leptin szint növekedést eredményez, ami emberben a leptin és az ösztrogén közötti kapcsolat létezését erősíti (Mannucci és mtsai, 1998). A fentebb említett eredményekkel szemben Pellemounter és munkatársai egerekben folytatott vizsgálataik alapján nem tudták kimutatni az ösztradiol leptin szintet befolyásoló hatását. Arra a következtetésre jutottak, hogy az ösztradiol közvetlenül nem változtatja a leptin szintet (Pellemounter és mtsai, 1999). Patkányoknak ivartalanítás után beadott fiziológiás mennyiségű progeszteron és/vagy ösztradiol sem változtatott a leptin szinten (Watanobe és Suda, 1999). Ivartalanított sertésekben vizsgálták, hogy a kor és súly hogyan befolyásolja a vérbeli leptin szintet és a zsírban való receptor expressziót ösztradiol adagolása során. Kimutatták, hogy a szérum leptin koncentráció a

korral nő, illetve hogy az ösztradiol által fokozott leptin mRNA mennyisége zsírban kor- és súlyfüggő. Idősebb kocákban 2.5-szer több mRNA expresszáldott kontroll állatokhoz képest (Qian és mtsai, 1999).

Az emberben történt, az ösztradiol és progeszteron befolyásoló hatását kutató vizsgálatok eredményei szerint, a két hormon együtt, leptin szint növekedést vált ki, külön-külön nem lehetett változást indukálni. Ez magyarázata lehet annak, hogy nőkben a luteális fázisa alatt miért növekszik a leptin mennyisége (Messinis és mtsai, 2001). Ezzel szemben egy-két éve végzett tanulmány eredményei a progeszteron leptin-csökkentő hatását valószínűsítik. Ivartalanított patkányoknak, konstans ösztrogén beadás mellett, különböző mennyiségű progeszteront adagoltak. A növekvő progeszteron koncentráció, a leptin termelés csökkentésére kényszeríti a zsírsejteket, az ösztrogén receptorok expressziójának módosításán keresztül (Rezai és mtsai, 2011). Ez a hatás abból következhet, hogy a progeszteron csökkenti az ösztrogén receptorok mennyiségét a zsírszövetben (Pinilla és mtsai, 1999). Egy korábbi vizsgálat ivartalanított patkányokban, ösztrogén illetve progeszteron kiegészítés esetén, nem mutatott változásokat a leptin szintben. Ők azt a következtetést vonták le, hogy a szteroid hormonoknak nincs nagyobb befolyásoló hatással a leptinre (Luukkaa és mtsai, 2001).

Egy éve végzett vizsgálat sorozat nőstény patkányokban viszont kimutatta, hogy krónikusan megemelkedett progeszteron szintek a leptin-receptorok számának növekedését eredményezi az inguinális zsírszövetekben (Stelmanska és mtsai, 2012). A hypothalamuszban lévő leptin receptorokat is megvizsgálták patkányban ivartalanítás után is, és ösztradiol adagolás után is. Western blot analízissel végzett vizsgálatokkal mérték a receptorok mennyiségét. Egy bizonyos idő eltelte után receptorszám csökkenést detektáltak, ugyanakkor perifériásan emelkedett leptin szintet mértek. Ösztradiol adagolás következtében újra megnőtt a receptorok mennyisége. A szérumban megnövekedett leptin szint az ivartalanítás után centrális leptin rezisztenciára utalhat (Meli és mtsai, 2004).

A szuka petefészkében, a corpus luteumon található leptin receptorokat (LEP-R) és a leptin fehérje (LEP) expresszióját tanulmányozták a sárgatest teljes élettartama alatt. Balogh és munkatársai azt találták, hogy a LEP a nem-vevhes luteális fázis 15.-35. napján felszaporodik. A legalacsonyabb LEP mRNA koncentrációt, az ovuláció utáni 5. napon mérték, míg a közép luteális fázishoz képest jelentősen alacsonyabb koncentrációkat mérték a diösztrusz végén. A LEP-R mRNA nem változott a luteális fázis alatt. A vevhes állatok csoportjában nem változott a LEP-R illetve a LEP sem (Balogh és mtsai, 2012) Emberben is megfigyeltek egy hasonló progeszteron emelkedést, leptin csúcskoncentrációval párhuzamban (Ajala és mtsai, 2013). A

Saleri és munkatársai által olasz nyelven publikált adatok szerint, az ösztroz alatt szignifikánsan magasabb szérumban leptin koncentráció mérhető, míg a proösztroz és a diösztroz szakaszában közel azonos hormonszintet mértek (Saleri és mtsai, 2003).

Az ivartalanítás után bekövetkező hormonális változásokat Rezai és munkatársai is vizsgálták. Patkányokban végzett ovarioectomia után a leptin szint csökken és újra visszaáll ösztrogén beadás után (Rezai és mtsai, 2011). Mások épp az ellenkezőjét írták le patkányokban, miszerint a leptin szint ivartalanítás után megnő. Úgy vélekednek, hogy ez a súlynövekedésnek az eredménye (Pinilla és mtsai, 1999). Meli és munkatársai szintén úgy vélik, hogy a leptin szint növekedése nem kifejezetten az ösztradiol hiányában következik be, hanem sokkal inkább a megnövekedett testzsírtömeg áll a háttérben. A szérumban megnövekedett leptin szint az ivartalanítás után centrális leptin rezisztenciára utalhat (Meli és mtsai, 2004). Kutyáknál az ivartalanított illetve az intakt szukák között nem találtak szignifikáns különbséget, ahogy hímek és nőstények között sem (Ishioka és mtsai, 2007; Jeusette és mtsai, 2005). Ivartalanított beagle szukakutyáknál figyeltek meg nagyfokú elhízást, amit a fokozott táplálékfelvétel mellett alkalmazott ad libitum etetés okozhatott (Jeusette és mtsai, 2006). Ennek hátterében a csökkent ösztrogén szint miatt kialakuló nagyfokú étvágyfokozódás állhat (Haupt and Hintz, 1978). A megnövekedett zsírtömeg emelkedett leptin szintet eredményez kutyában is (Ishioka és mtsai, 2002a; Sagawa és mtsai, 2002).

Többben is beszámoltak a tesztoszteron leptin szint csökkentő hatásáról embereben és patkányban. E jelenség állhat egyéb állatoknál a nemek közötti eltérő leptin koncentrációk mögött (Watanobe és Suda, 1999; Bell és Considine, 2007). Hasonló testtömegű hím- és nőivarú patkányoknál megmért leptin szint kimutatta, hogy a nőivarú egyedeknél szignifikánsan magasabb volt (Watanobe és Suda, 1999). Emberben, nőknél, körülbelül 40%-al volt magasabb, mint férfiaknál, testzsírtól függetlenül (Saad és mtsai, 1997). Ahogy fentebb olvasható, Ishioka és munkatársai, több kutatóval egybehangzóan, nem találtak kutyában nemi különbségeket (Ishioka és mtsai, 2007; Jeusette és mtsai, 2005; Sagawa és mtsai, 2002). Ellenben Saleri és munkatársai szukákban magasabb leptin szintet találtak (Saleri és mtsai, 2003).

### **2.3.3. A kondíció és az etetés befolyásoló hatása**

A leptin legfőképp a fehér zsírsejtekből származik és a szervezet energia homeosztázisában játszik kiemelkedő szerepet. Speciális mutációt hordozó, úgynevezett ob/ob

egerekkel (melyekben nem termelődik leptin) végzett kísérletek alapján kimutatták, hogy az aktív leptin hiánya a vérkeringésben, súlyos elhízáshoz vezet. A beadott leptin képes ezeknél az egereknél visszaállítani a normális testsúlyt. A leptin hiánya, vagy a receptorának mutációja hiperfágiát és csökkentett energia felhasználást eredményez (Pelleymounter és mtsai, 1995). Éhező állatokban, nagymértékben csökken a leptin szint, amely fokozza az étvágyat és a zsírpítést, mivel a hypothalamuszban többek között a neuropeptid Y (NPY) közreműködésével fokozza az energia felvételt. A neuropeptid Y-nak étváagnövelő hatása van, ami alacsony leptin koncentrációnál fokozódik, magas leptin szint esetében pedig, a leptin negatív visszacsatolással gátolja az NPY-t, biztosítva a megfelelő energiaháztartást.

A leptin által vezérelt szabályozó mechanizmus három ponton károsodhat:

1. A szervezet nem képes leptint termelni.
2. Az adott zsírsajt mennyiséghez képest kevesebb leptin termelődik. Ebben az esetben addig fokozódik a zsírsajttermelés (méret és szám) amíg az el nem éri a megfelelő leptin produkciót.
3. Abszolút vagy relatív inszenzibilizáció lép fel. Az inzulin rezisztenciához hasonlóan a leptin iránt is felléphet rezisztencia. Kimutatták, hogy a vér nagymértékben emelkedett leptin szintje ellenére elhízott az állat (Friedman és Halaas, 1998).

Kutyákban végzett kísérletek bizonyítják, hogy ebben a fajban is pozitív korreláció mutatható ki a vérben mérhető leptin szint és a testzsírtömeg között, amely az elhízás mértékének mérése szempontjából bírhat jelentőséggel (Sagawa és mtsai, 2002). A fordítottja is bebizonyosodott. Jeusette és munkatársai ugyanis kimutatták a csökkentett kalóriatartalmú táppal etetett kutyák esetében, hogy a súlycsökkenéssel párhuzamosan csökkent a vérbeli leptin szint is (Jeusette és mtsai, 2006). Pár éve készült tanulmány arra mutat, hogy kutyákban a leptin rezisztencia a leggyakoribb oka az elhízásnak. Ennek a hátterében a leptin transzporterek telítődése állhat, amely a leptin vér-agy gáton keresztüli transzportját teszi lehetővé vagy a hipotalamuszban a leptin jelzőképessége hibásodik (Zoran, 2010).

Jeusette és munkatársai által végzett vizsgálataik kutyában a leptin és a vérbeli lipidek pozitív összefüggését erősítették meg. Súlyosan elhízott kutyákban a triglicerid és a koleszterin plazma szintek nagyfokú emelkedést mutattak, a leptin ezzel összhangban szintén emelkedett volt (Jeusette és mtsai, 2005). Sagawa és munkatársai úgy vélik, hogy a leptin koncentráció összefügg a testsúlyal, BSC-vel és a bőralatti kötőszövettel, viszont, Jeusette-tel ellentétben, nem találtak

szignifikáns korrelációt a leptin és a vérplazma koleszterin-, triglicerid- és szabad zsírsav szint között (Sagawa és mtsai, 2002).

Ahogy más állatokban is kimutatták, így a kutyáknál is kialakul etetés után egy átmeneti leptin koncentráció emelkedés (Ishioka és mtsai, 2005a). Az etetést követő 5-8. órában éri el a maximumot, amely az éhezési leptin szintnek a két-három szorosának bizonyult (Nishii és mtsai, 2006). Egyéb belső ok, amelyet leptinszint mérésnél figyelembe kell venni, a leptin koncentráció napi ingadozása. Rendszeresen etetett kutyáknál is észre lehet venni ezt a jelenséget. Ishioka és munkatársai négy hím beagle kutyát etettek napi egyszer, délelőtt 10:00 órakor és ezt követően három óránként vizsgálták a vérbeli leptinszintet. A legalacsonyabb koncentrációt az etetés előtt egy órával mérték, a legmagasabbat 18:00-kor. Koplaltatott állatokban ez a ingadozás megszűnik és mindaddig alacsony leptin értékek mérhetőek, amíg nem jut újra táplálékhoz (Ishioka és mtsai, 2005a).

#### **2.3.4 Más leptin szintet befolyásoló tényezők**

Többféle exogén és endogén tényező befolyásolhatja a szérumban lévő leptin szint alakulását. Külső behatások, úgy mint gyógyszerek, illetve belső tényezők, így hormonok, például az inzulin, endotoxinok, gyulladáshoz vezető mediátorok (pl tumor necrosis factor és interferonok) és metabolitok egyaránt változtathatják a leptinszintet. Ishioka és munkatársai kiderítették, hogy az embereknél megfigyelt leptin szint emelkedés glükokortikoid kezelés után illetve Cushing kór esetén, kutyáknál is megfigyelhető. Az exogén dexamethason beadása koplaltatott kutyáknál is ilyen hatással bír. A dexamethason hatásmechanizmusa még nem ismert, viszont hosszantartó hatást tulajdonítanak neki. A szövetbeli bomlásideje sokkalta hosszabb mint a vérben, ezért a hatásideje elnyúlt. Dexamethason kezeléseknél ezért ajánlott figyelembe venni, hogy a leptin szint mérés eredménye nem fogja tükrözni a valóságot (Ishioka és mtsai, 2002a). Egy másik glükokortikoid, a prednisolon, orális adagolása hatástalannak minősült (Nishii és mtsai, 2006). A metilprednisolon, ezzel ellentétben dózis dependens hatással bír. Alacsonyabb koncentráció növeli, magasabb koncentráció csökkenti a leptinszintet (Yilmaz és mtsai, 2007).

A tumornekrózis faktor gátolja a zsírsejtek differenciálódását, ezáltal csökken a zsírsav tárolási képessége és megnő a vérbeli szabad zsírsavkoncentráció. A kevesebb zsírsejt csökkenő leptinszintet eredményez. A tumornekrózis faktor endogén és exogén stressz (beleértve a

gyulladást is) miatt termelődik, a zsírsejtek és makrofágok által (Fischer-Posovszky és mtsai, 2007). Hörcsögökben végzett kísérletek alapján, melyek során endotoxinokat adagoltak az állatoknak (LPS-t), szintén kimutatták, hogy drasztikusan fogynak az állatok. Gyulladásakor hasonló folyamatok játszódnak le (Grunfeld és mtsai, 1996).

Az isoproterenol, amely bradycardia esetén használatos, humán területen és állatgyógyászati készítményként is alkalmazott szívgyógyszer, emberben csökkenti a leptin koncentrációt (Stumvoll és mtsai, 2000). Kutyában még nem mutatták ki ezen hatását.

Az inzulin és a leptin koncentráció szoros kapcsolatban áll. Inzulin adagolás vagy endogén inzulin növekedés esetén a leptin koncentráció is kissé megnő (Ishioka és mtsai, 2005a). A kutyáknál egyik leggyakrabban előforduló endokrin betegség a hypothyreózis. Ebben az esetben a csökkent thyroxin termelés leptin- és inzulinaemiát okoz. A megváltozott zsír- és szénhidrát metabolizmus elhízáshoz vezet, amely közvetetten leptin koncentráció növekedést eredményez, de feltételezik, hogy közvetlen hatása is van a pajzsmirigy hormonnak a leptin szint alakulására (Mazaki-Tovi és mtsai, 2010). A zsírok metabolitjai, a szabad zsírsavak, szintén befolyásolhatják a leptin szintet. Emberi zsírsejteken végzett kísérletek arra mutatnak, hogy a zsírsejten belül megnövekedett szabadzsírsav-tartalom csökkenti a leptin receptorok számát (Rentsch és mtsai, 1996). Ilyen jelenség például éhezéskor illetve hideghatás esetén fordulhat elő, amikor bizonyítottan megnő a sejteken belüli szabadzsírsav-tartalom (Trayhurn és mtsai, 1995a). Inzulin által létrehozott intracellularis zsírsavkoncentráció csökkenés viszont pozitív hatással bírhat a leptin termelésre zsírsejteken belül. Rövidtávú összefüggést nem találtak az inzulin és a leptin szint között, viszont vizsgálatok emberben arra mutatnak, hogy hosszútávú hatás létezik (Kolaczynski és mtsai, 1996).



### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

Az ivari ciklusuk ismert szakában járó (proösztroz, ösztroz, diösztroz, anösztroz), 18 beagle fajtájú szuka kutyát vizsgáltunk. Az adott vizsgálati napon, azonos időben fizikális vizsgálatot, valamint éhomi vérvételt végeztünk, 24 órás koplalás után. A fizikális vizsgálat során minden állat esetében mértük és feljegyeztük a testsúlyt, BCS kategóriát, az impedancia mérés eredményét (testzsír %), a medence körméret (PC - pelvic circumference, cm-ben) és térd-csánk távolság (HS - hock to stifle, cm-ben) paramétereit. Vérből meghatároztuk a vércukor -, leptin -, triglicerid -, koleszterin -, ösztrogén - és progeszteron szinteket.

#### 3.1. Mintagyűjtés

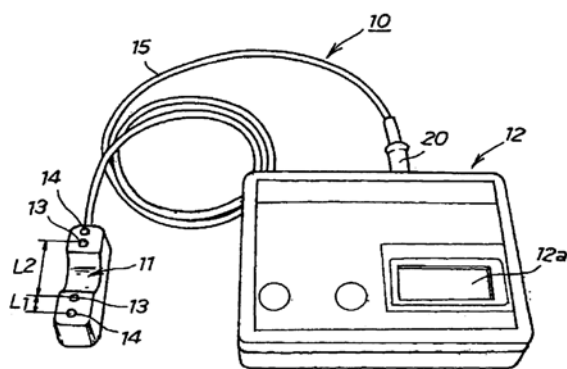
A mintavételeket és a méréseket kéthetes időközönként, összesen 3 alkalommal végeztük a Wobe Kutató Fejlesztő, Állatgyógyászati és Kereskedelmi Kft. Budapesti telephelyén. A vizsgálat során 18, egészséges, 2-9 éves korú, tenyészcélra szánt, az ivari ciklusuk ismert szakában járó beagle fajtájú szuka paramétereit és vérmintáit gyűjtöttük össze. Az állatok vizsgálatát és a mintavételt reggeli időszakban, 8 és 9 óra között végeztük, körülbelül 24 órás koplaltatást követően. Az állatok testsúlyát digitális mérleggel történő mérés alapján rögzítettük, majd a medence körméretet (PC) és csánk-térdízület távolságot (HS) mértük mérőszalaggal. Ezután a bioimpedancia mérővel történő háromszori mérés eredményeit rögzítettük. Minden állat esetében megfigyeltük a külső nemi szervek állapotát, valamint a hüvelybe vezetett vattásvégű mintavételi pálca segítségével, hüvelycitológiai mintát vettünk. A vérvétel a szakma szabályainak megfelelően, a *vena cephalica antebrachi*-ból történt. A vércukorszint azonnal a vérvétel után került meghatározásra. A vérmintákat hűtve tároltuk és szállítottuk. A lítium-heparin szeparátoros csövekbe gyűjtött vérminták, a vérvétel után 2 órával kerültek vizsgálatra. A hormonkoncentrációk mérése az összes minta begyűjtése után került sor, az ehhez szükséges szérum mintákat, a vérvételt követően, 3 órán belül elvégzett, 1500/perc fordulatszámon történő centrifugálás után nyertük, majd lefagyasztva, -86 °C-on tároltuk.

### 3.2.A bioimpedancia mérése

A testzsír-mennyiség meghatározására egy kifejezetten kutya fajra kifejlesztett impedancia mérő kézi készüléket (Healthlab Body Fat Analyzer IBF-D02, Kao Corp, Tokyo, Japan) alkalmaztunk.

#### Háttér elmélet

A bioimpedancia mérésének lényege a víz-zsír eloszlása a szervezetben és ezek eltérő áramvezető képessége. A zsírszövetben található vízmennyiség kevés, így ebben a szövetben áthaladó áram másként fog haladni, mint a sok vizet tartalmazó szövetben. A zsírszövet lassítja az áram haladását - nagy a rezisztenciája. Ha alacsony árammal megmérjük a szervezet rezisztenciáját, megbecsülhető a zsírmennyiség. A mérés lényeges mozzanata, hogy az elektródák között fix távolság legyen, így az állat fiziológiai státuszától függetlenül megmérhető a testzsírszázalék.



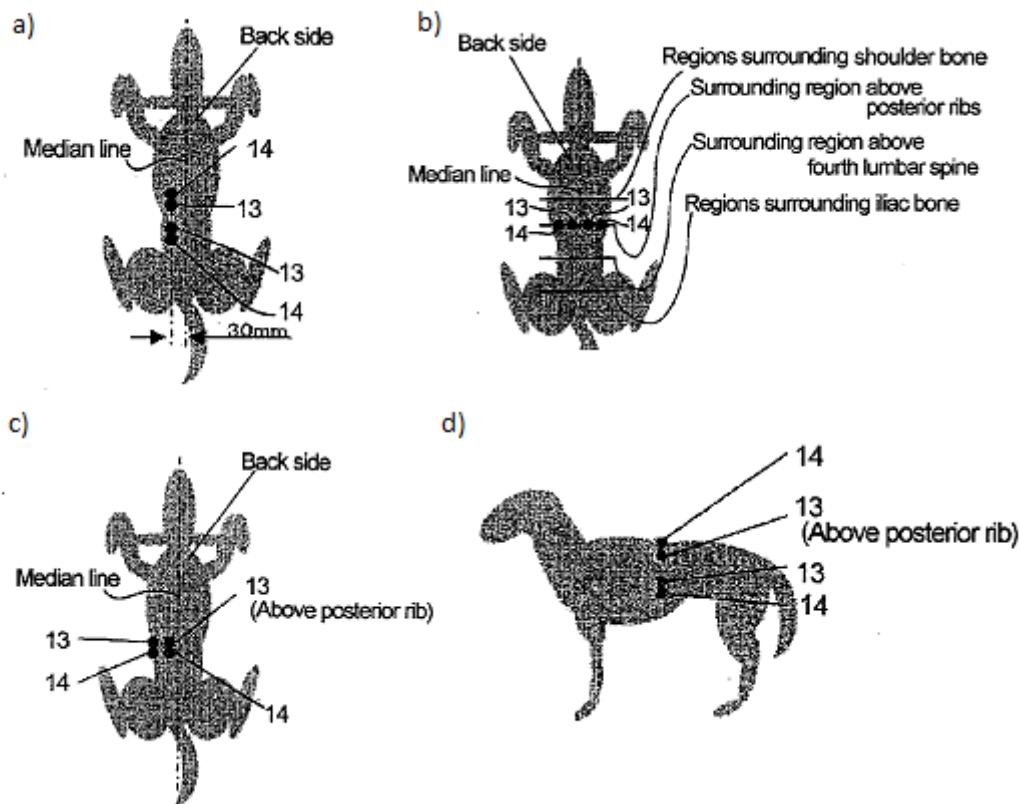
1. kép: A mérőberendezés felépítése

10. Egy kisállat testének zsírmérő eszköze, 11. Elektróda test, 12. Számító egység, 12a képernyő, 13. Két darab feszültségmérő elektróda, 14. Két darab áram elektróda, 15. Az elektródákat és a számító egységet összekötő kábel.

#### Kivitelezés

A gépben beépített számítógép kiszámítja a kísérletek alapján tapasztalt adatok segítségével a mért impedancia értékhez tartozó zsírmennyiséget, melyet százalékban ad meg. Sokáig gond volt az állati szervezetet beborító szőr, ami szigetelőként működik a méréseknél. Ezt a szőr szétfésülésével, valamint a bőr és az elektródák között alkalmazandó elektrolit vagy organikus oldatok használatával, (pl 0.5-5%-os  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$  vagy 50-100%-os etanol, isopropylalkohol) ki lehet küszöbölni. Másik lehetőség a szőr borotválása adott mérőpontok felett, vagy szendvicsszerűen az elektródák és a szőr közé helyezhető egy szivacs, esetleg textilanyag, amely előzőleg át lett itatva elektrolit vagy organikus oldattal. A bőrön levő szennyeződéseket, zsírt ajánlatos a mérések előtt eltávolítani valamilyen oldószerrel (pl. etanol,

isopropylalkohol, shampon, zsír abszorbeáló púder). Az elektródákat javasolt az állat hátsó testfelületén, oldalról nézve a lapockacsont és a csípőcsont közötti területen, az utolsó bordapár mögé helyezni, ahogy a 2. képen, a d) ábra mutatja.



2. kép: Az elektródák felhelyezése négy elrendezésben lehetséges:

- Lineárisan, a gerincvonal mentén, medián síktól 30mm-re.
- Lineárisan, a medián síkhoz viszonyítva vertikálisan, a gerincoszlop két oldalán.
- Négyszögben, a gerincvonal egyik oldalán.
- Lineárisan, mediánsíkhöz képest vertikálisan az állat egyik oldalán, utolsó bordapár mögött.

A bioimpedancia mérőgépet 0.1-1mA-ig terjedő áramot juttat a szervezetbe az elektródákon keresztül, 0.02 - 1.28 s-ig, egy 0.1- 5 s-ig terjedő intervallum alatt. A berendezés az adatok alapján kiszámol egy átlag feszültséget, amely megadja a hozzárendelt zsírszázalékot, előzetes kísérletek révén megkapott görbék alapján (Ban és mtsai, 2009).

### **3.3. A vércukorszint mérés**

A vérvételt követően azonnal mértük az éhomi vérglükóz szintet, Dcont Personal vércukormérő műszerrel.

### **3.4. A hormonszintek vizsgálata**

A hormonszintek meghatározásához ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) teszteket használtunk. A módszer lényege, hogy a polisztirol mikrotitráló lemezek felületére abszorbeált ellenanyag a vizsgálandó vérsavó specifikus antigénjeihez kötődik, amelyhez ezután hozzáadunk korábban torna-peroxidáz vagy egyéb enzimmel konjugált faj specifikus antiglobulin-savót. Az antigén-ellenanyag-antiglobulin-konjugátum komplexet láthatóvá tesszük hozzáadott szubsztráttal. A kialakult színváltozást fotométer segítségével mérjük (Tuboly, 1998).

#### **3.4.1. A leptinszint meghatározása**

A leptin koncentrációt gyári Canine Leptin ELISA Kit-el mértük, amely egy úgynevezett direkt Sandwich ELISA teszt.

A kit tartalma:

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

## Munkamenet:

### Előkészítés:

1. A standard oldathoz hozzáadunk 0,5 ml desztillált vizet, óvatosan összerázzuk, és 5 percig állni hagyjuk. Közben egy hígítási sort készítünk, úgy hogy 6 db kémcsőbe 0,25 ml puffert mérünk, és az elsőhöz hozzáadunk 0,25 ml standard kutya leptint. Alapos összekeverés után átmérünk ebből 0,25 ml-t a második csőbe, majd keverés után 0,25 ml-t kimérünk a második csőből a harmadikba. Ezt folytatva a többi kémcsőben előállítjuk a hígítási sort.

2. Mindkét kutya leptin mennyiségi kontrollhoz (QC1, QC2) 0,5 ml desztillált vizet adunk, óvatosan összekeverjük, 5 percig állni hagyjuk, majd ismételten alaposan összekeverjük.

1. Mindkét mosó puffer koncentrátumot felhígítjuk 450 ml desztillált vízzel.
2. A megfelelő számú lyukat 3x átmoszuk alaposan a hígított mosó pufferrel, 300 µl-t használva alkalmanként.
3. A lyukakba pipetázunk 80 µl puffert.
4. Az üresen hagyott lyukakba két párhuzamosban 20 µl puffert pipetázunk.
5. Két párhuzamosban 20 µl növekvő koncentrációjú kutya leptin standardot, és 20-20 µl QC1-t és QC2-t pipetázunk a megfelelő lyukakba, majd a megmaradt lyukakba belemérjük a 20 µl mintát lyukanként.
6. Lefedjük a lemezt, és szobahőmérsékleten két órán át rázókeverőn rázatjuk, majd leöntjük az oldatokat a lemezről.
7. A lyukakat újból átmoszuk háromszor, alkalmanként 300 µl mosó puffert használva.
8. 100 µl kutya-leptin detektáló antitest oldatot adunk hozzá minden lyukhoz, és egy órán át szobahőmérsékleten rázókeverőn összerázzatjuk. Ezután leöntjük az oldatokat a lemezről.
9. Átmoszuk a lyukakat háromszor, mosásonként 300 µl mosópufferrel.
10. 100 µl enzim konjugátumot pipetázunk minden lyukba, és a lemezt szobahőmérsékleten 30 percre a rázókeverőre helyezzük. Befejeztével leöntjük az oldatot a lemezről.
11. Ezután újra átmoszuk a lyukakat, összesen hat alkalommal, alkalmanként 300 µl mosópufferrel.
12. Ezután minden lyukhoz hozzáadunk 100 µl szubsztrát oldatot és rázókeverőre tesszük 5-20 percre. A leptin hatására megjelenő kék szín intenzitása koncentráció függő.

13. Befejezésképpen hozzáadjuk a sósavas stop oldatot, majd kézzel összerázzuk. A sárgára átváltozott oldatot 5 percen belül 450 nm-n és 590 nm-n fotometriásan megvizsgáljuk.

### 3.4.2. A progeszteronszint meghatározása

A mélyhűtött vérplazmából történő hormonszintek meghatározása a Szülészeti Tanszék laborjában történt. A progeszteronszintek meghatározását Quanti Check Progesterone kittel végeztük.

#### **A kit tartalma:**

- 10 db progeszteron antitestekkel bevont ELISA teszt csík
- 0,5 ml 40 ng/ml P4 tartalmú standard oldat
- 0,5 ml 20 ng/ml P4 tartalmú standard oldat
- 0,5 ml 10 ng/ml P4 tartalmú standard oldat
- 0,5 ml 5 ng/ml P4 tartalmú standard oldat
- 0,5 ml 2 ng/ml P4 tartalmú standard oldat
- 0,5 ml 1 ng/ml P4 tartalmú standard oldat
- 0,5 ml „A” oldat: M82 P4-HRPO (M82 progeszteron torna-peroxidáz)
- 45 ml PBS puffer oldat (foszfát pufferes konyhasó oldat)
- 45 ml citromsav-foszfát puffer
- 0,5 ml TBM (tetra-metil-benzidin)
- 15 ml stop reagens (kénsav)

#### Munkamenet:

1. A progeszteron antitesttel bevont ELISA csíkot, a fagyasztóból való kivétele után lemezmosó berendezéssel, puffer oldattal vagy csapvízzel kimossuk. A mosófolyadékot ezt követően el kell távolítani.
2. Egy kémcsőbe 4 ml PBS puffer oldatot kimérünk csíkonként (egy csík két oszlopban 8-8 lukat tartalmaz), amelyekhez 20 µl „A” oldatot adunk hozzá. A pufferrel hígított folyadékot géppel összerázzuk.
3. Az ELISA csíkokat keretbe helyezzük és 1-40 ng/ml progeszteront tartalmazó standard oldatokból és a szérumokból, 20-20 µl-t a lyukakba pipettázunk. A mintákat legalább két párhuzamos sorban kell mérni, ezért az oldatokat minimum két lyukba kell pipettázni.

4. Az így kapott oldatokra, az előzőleg elkészített hígított "A"-oldatból 200-200 µl-t pipettázunk.
5. A csíkokat letakarva rázógéppel 1 percre rázatjuk, majd egy óra inkubálás következik.
6. Az inkubálási idő letelte után a csíkokat lemezmosóval kimossuk, majd eltávolítjuk a mosófolyadékot.
7. Ezután 5 ml citromsav-foszfát puffert mérünk ki mérőhengerrel és pohárba öntjük, majd 50 µl TMB-t (tetra-metil-benzidin) adunk hozzá. A kapott folyadékot összekeverés után egy vályúba öntjük.
8. A pufferkeverékből minden lyukba 200-200 µl-t mérünk és ezt 6 perc inkubálás követi.
9. A kialakuló kék színváltozást kvalitatív módon értékelhető, amikor is standard színskálával hasonlítjuk össze a kapott szín intenzitását.
10. Kvantitatív meghatározáskor 50-50 µl kénsavat tartalmazó stop reagenst mérünk, amely hatására az oldat sárgává alakul.
11. A szín intenzitását ELISA fotométerrel 450 nm-en mérve, megkapjuk a mintánk progeszteron koncentrációját. A színintenzitás és a hormonszint között fordított arányosság áll fent: a világosabb szín magasabb, míg a sötétebb alacsonyabb hormonkoncentrációt jelent.

### **3.4.3. Az ösztrogenszint meghatározása**

Az ösztradiol meghatározása kvantitatív módszerrel, a DRG Estradiol ELISA (EIA-2693) teszttel történt.

A kit tartalma:

- Mikrotitráló lemez: anti-ösztradiol antitestekkel bevont 12x8 (eltörhető) csík, összesen 96 lyukkal
- 1 ml 0 pg/ml oestradiol tartalmú standard oldat
- 1 ml 25 pg/ml oestradiol tartalmú standard oldat
- 1 ml 100 pg/ml oestradiol tartalmú standard oldat
- 1 ml 250 pg/ml oestradiol tartalmú standard oldat
- 1 ml 500 pg/ml oestradiol tartalmú standard oldat
- 1 ml 1000 pg/ml oestradiol tartalmú standard oldat
- 1 ml 2000 pg/ml oestradiol tartalmú standard oldat

- 25 ml enzim konjugátum (ösztadiol torna-peroxidáz konjugátum)
- 14 ml szubsztrát oldat: TMB (terta-metil-benzidin)
- 14 ml stop oldat (0,5M kénsav)
- 30 ml (40x koncentrált) mosó oldat

#### Munkamenet:

1. 30 ml koncentrált mosó oldatból 1200 ml mosó oldatot állítunk elő. A hígításhoz 1170 ml deionizált vizet használunk.
2. Az ELISA csíkot a keretbe helyezzük. A standardokból, kontrollból és a szérumból 25-25 µl-t mérünk a lyukakba.
3. Az oldatokra 200 µl enzim konjugátumot pipetázunk, majd a csíkokat rázókeverőn 10 másodpercig rázatjuk.
4. Szobahőmérsékleten 120 percig inkubáljuk (nem kell letakarni).
5. Ezután a lyukakat ki kell üríteni, és a felhígított mosófolyadékkal (400 µl/lyuk) háromszor át kell mosni. A maradékot kiütögetjük abszorbens papírra.
6. A lyukakba 100 µl szubsztrát oldatot mérünk, majd szobahőmérsékleten 15 perc inkubálás következik.
7. Az enzimatis reakciót 50 µl stop oldat bemérésével állítjuk le.
8. Az abszorbancia mikrotitráló lemez olvasó segítségével határozható meg. A mérést 10 perccel a stop reagens hozzáadása után végezzük 450±10 nm-en. A kialakult színintenzitás és a minták ösztadiol koncentrációja fordítottan arányos.
9. Ezután standard görbét szerkesztünk, amellyel az eredményeket értékelni tudjuk.

#### **3.4.4. Az összkoleszterinszint meghatározása**

Az összkoleszterinszint meghatározását egy enzimatis kolometriás teszttel végeztük el vérszérumból. A mérési elv alapja, hogy a koleszterin észtereket a koleszterin észter-hidroláz hidrolizálja. Az így keletkezett szabad koleszterint a koleszterinoxidáz kolesztenonná alakítja át, miközben hidrogén-peroxidáz keletkezik. A hidrogén-peroxid a peroxidáz, fenol és 4-aminoantipirin indikátorreakció segítségével 505 nm-en jól mérhető vörös kinon származékká alakul.



A készlet tartalma:

- Felhasználásra kész reagens
- Standard koleszterin oldat

Munkamenet:

1. Először a vakmintát készítjük, úgy, hogy 1 ml felhasználásra kész reagenshez 10 µl desztillált vizet adunk.
2. Külön kémcsőbe 10 µl standard oldathoz 1 ml reagenst mérünk.
3. Egy harmadik kémcsőbe 10 µl mintához 1 ml reagenst mérünk
4. A mintákat jól összekeverjük és 37°C-on 5 percet inkubáljuk.
5. A kialakult vörös színt 505 nm hullámhosszon megmérjük kolorimetriásan.
6. A minta koleszterin koncentrációját kiszámítjuk a következő egyenlettel:  
 $A_{\text{minta}}/A_{\text{standard}} \times C_{\text{standard}}$ , ahol A= abszorbancia, C= koncentráció

### 3.4.5. A trigliceridszint meghatározása

Ez a mérés szintén egy enzimatikus kolorimetriás teszttel végezhető el, vérszérumból. A trigliceridet a lipoprotein-lipáz glicerinre és zsírsavakra bontja. A glicerint a glicerin-kináz foszforilálja adenzin-trifoszfát és Mg-ionok jelenlétében. A keletkezett glicerin-3-foszfátot a glicerin-3-foszfát-oxidáz molekuláris oxigén jelenlétében oxidálja. A felszabaduló hidrogén-peroxid peroxidáz enzim jelenlétében, fenol származék és 4-aminoantipirin indikátor reakcióval színes terméket ad, amely 505 nm-en jól mérhető.

A kit tartalma:

Felhasználásra kész reagens oldat

Standard triglicerid oldat

Munkamenet:

1. Három külön kémcsőbe 1-1 ml munkareagenst mérünk.
2. Az első kémcsőbe 10 µl desztillált vizet pipetázunk. Ez lesz a vakmintánk.
3. A második kémcsőbe 10 µl standard oldatot mérünk.

4. A harmadik kémcső tartalmához 10  $\mu$ l mintát adunk.
5. Összekeverés után a reakcióelegyet 5 percig 37°C-on inkubáljuk.
6. Mérjük le az abszorbanciaértékeket a vakkal szemben.
7. A minta koncentrációját a következő egyenlettel számolhatjuk ki:  $A_{\text{minta}}/A_{\text{standard}} \times C_{\text{standard}}$ , ahol A= abszorbancia, C= koncentráció.

### 3.5. Értékelés

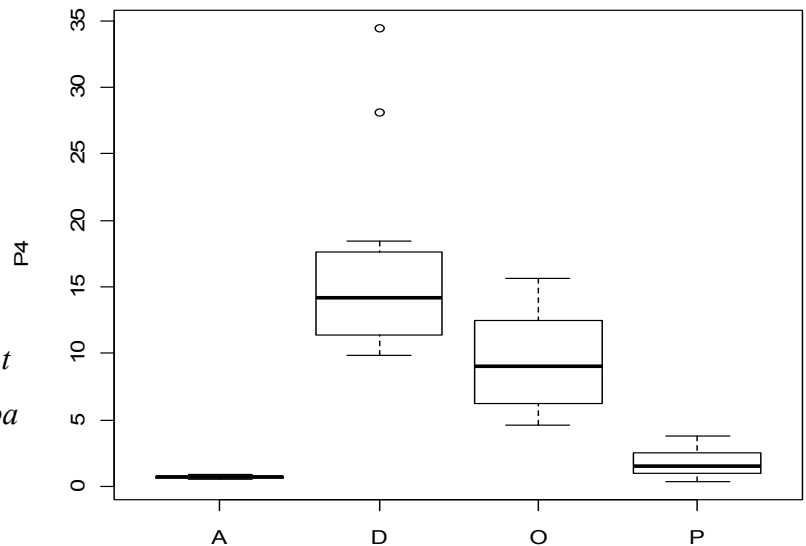
Az eredmények kiértékelését a Microsoft Excel, valamint az R statisztikai program segítségével végeztük.

## 4. EREDMÉNYEK

Munkánk során 18 nem vemhes szuka 3 alkalommal történő ciklus diagnosztikai vizsgálatát végeztük el. Kéthetes időközönként, összesen 3 alkalommal végzett hüvelycitológiai vizsgálat, valamint vérből történő progeszteron szint meghatározás alapján 10 anösztusz, 10 proösztusz, 8 ösztusz és 12 metösztusz szakában járó szukából származó éhomi vérmintát választottunk ki további vizsgálatra. A klinikai tüneteket és a hüvelycitológiai vizsgálatok eredményeit összesítve a progeszteron szintek az 2. táblázatban látható módon alakultak.

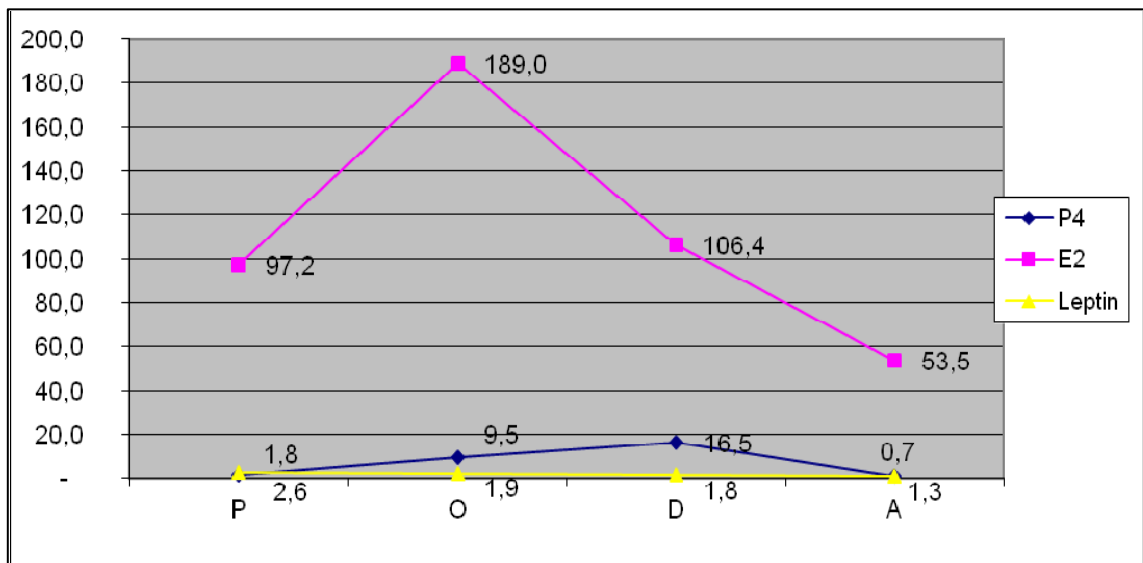
Ciklus	P4 ng/ml
Anösztusz	0,58 - 0,89
Proösztusz	0,41 - 3,83
Ösztusz	4,64 - 15,64
Diösztusz	9,82 - 28,09

2. táblázat: a progeszteron szint változása az egyes ciklusszakokba sorolt állatok vérmintáiban.



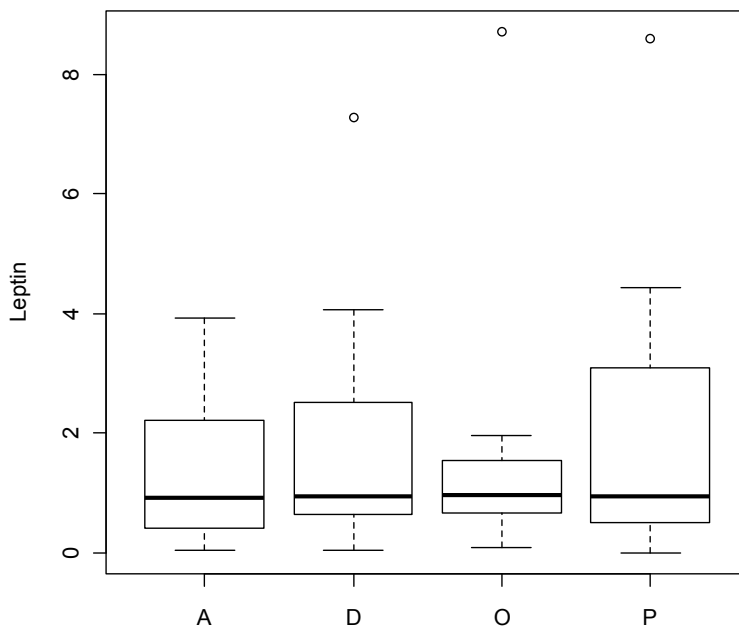
1. ábra: a progeszteron szint változása az egyes ciklusszakokba sorolt állatok vérmintáiban.

Az elvégzett ANOVA teszt alapján, és az 1. ábrán is látható a proösztusz és anösztusz szakában járó állatok progeszteron szintje nem mutat szignifikáns különbséget. Az egyes ciklusszakokba sorolt vérminták esetében nem találtunk szignifikáns különbséget az ösztradiol szintben. Így ezt a paramétert a későbbiekben nem vettük figyelembe. Feltételezve, hogy a továbbiakban vizsgált hormonok és egyes számolt paraméterek összefüggést mutathatnak a ciklus alatt jellemző hormonális változásokkal, ugyanakkor az E2 szint vizsgálata nem adott megbízható eredményeket, egyes statisztikai próbák esetén megpróbáljuk elhagyni az anösztuszos csoport eredményeit.



2. ábra: A progeszteron, ösztrogén és a leptin szérumszintek alakulása az egyes ciklus szakok között.

A vizsgált állatok szérumszintje az egyes vizsgálati időpontokban, a 3. táblázatban foglaltak szerint alakult. Párosított t-próbával az egyes időpontokban történt leptin szint vizsgálatok eredményei között nem volt szignifikáns különbség.



Vizsgálat	átlag	szórás
1.	1,70	2,11
2.	2,07	2,53
3.	1,87	2,22

3. táblázat: a leptin alakulása az egyes vizsgálati időpontok során (ng/ml).

3. ábra: a leptin szint változása az egyes ciklusszakokba sorolt állatok vérmintáiban.

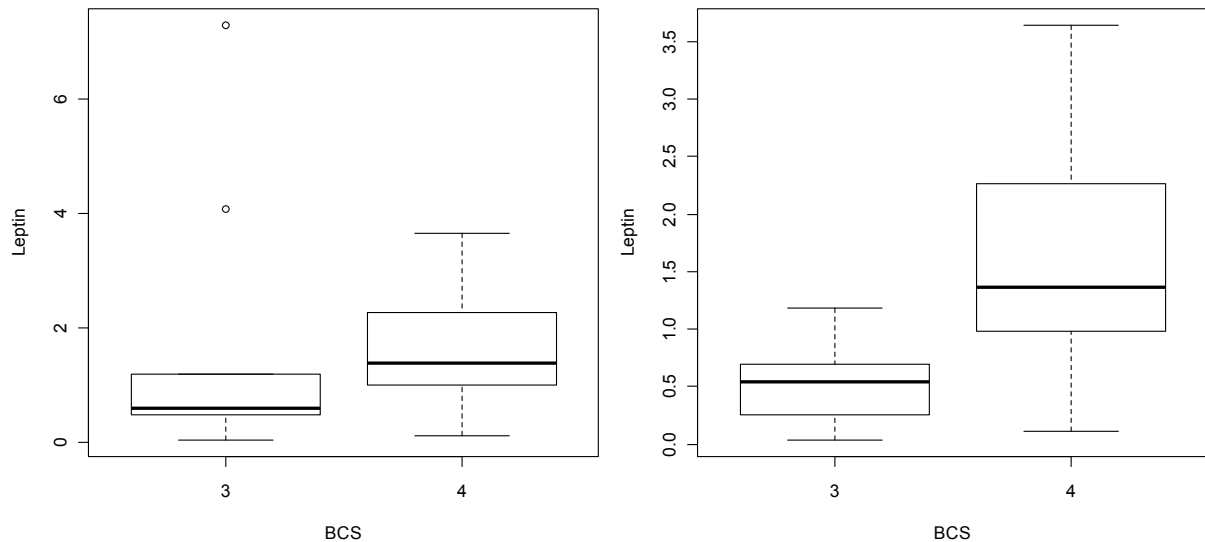
Az egyes ciklusszakokba sorolt vérminták esetében nem találtunk szignifikáns különbséget a leptin szintben sem ANOVA, sem párosított t-próba alapján. A 3. ábrán látható kiugró értékek mindegyike egy egyedből származó vérmintákból kapott mérési eredmény. Az egyedi eltérés okát jelen vizsgálat során nem tudtuk meghatározni.

A BCS besorolás szerint kialakított 3-as kondíciócsoportba 11, míg a 4-es csoportba 7 állat került. A kondíció értékelésekor alkalmazott további mérési eredményeket a 4. táblázat mutatja be.

Minta	BCS	BW	PC	HS	BF%*	BMI	Leptin
228	3	10,2	48	16	22,44	25,67	0,52
1552	3	11,3	46,5	16	21,045	21,00	0,04
2465	3	10,3	43	16,8	16,43	18,67	0,62
2962	3	10,8	41	14,4	18,65	15,00	
3767	3	9,2	42	15,2	18,22	18,67	0,57
4182	3	10,9	48	16	22,44	21,67	0,48
4218	3	11,4	48	16,8	21,08	21,67	7,28
5194	3	10	49	16	23,37	23,00	1,18
6203	3	10	50	16	24,3	34,00	0,78
8260	3	9,6	44	15,2	20,08	15,00	0,04
9467	3	10,3	43,5	15,2	19,615	20,00	4,07
2770	4	15,4	54	14,4	30,74	28,00	0,77
3481	4	15,9	64	16	37,32	29,00	1,2
3906	4	14,2	56	14,4	32,6	32,33	2,57
4048	4	12,3	55,9	14,4	32,507	34,33	1,37
5501	4	11,5	44	12,8	24,16	20,00	3,64
5819	4	12	52	14,4	28,88	20,67	1,96
8966	4	12	48	16	22,44	16,00	0,11

$$*Female\ body\ fat\ (\%) = -1.7\ (HS) + 0.93\ (PC) + 5$$

4. táblázat: Az egyes állatok kondícióbecslésre használt mutatói: Body Condition Score (BCS); testsúly (BW); medence körméret (PC), cm; tarsus patella távolság (HS), cm; testzsír százalék (BF%); Impedanciamérővel meghatározott érték, háromszori mérésből (BMI). Sárgával jelöltük a kiugró értékeket.



4.-5. ábra: átlag leptin szintek (ng/ml) a két kondíció csoportban: kiugró értékekkel együtt, illetve nélkülük.

Kiugró értékek nélkül (5. ábra), leptin szint tekintetében szignifikáns különbség mutatkozott a két kondíciócsoport között (p-érték = 0.04479).

Míg a BCS 3-as kondíciócsoportban a leptinzint  $0.529 \pm 0.374$  (átlag  $\pm$  szórás), addig a 4-es csoportban  $1.660 \pm 1.178$  ng/ml értéket mutatott. Koleszterin és triglicerid szint tekintetében nem volt szignifikáns különbség a kondíciócsoportok között.

Az egyes kondíciót jellemző paraméterek közötti összefüggés vizsgálatára Spearman féle korrelációs tesztekkel végeztünk, mivel ez a próba a nemlineáris kapcsolatokra is használható és a kiugró értékek nem annyira befolyásolják. Ennek eredményeit a 5. táblázat mutatja be.

n= 15	BW		BMI		BF%		Leptin	
	$\rho$ (rho)	P	$\rho$ (rho)	P	$\rho$ (rho)	P	$\rho$ (rho)	P
BW			0.4008286	0.09926	<b>0.6970483</b>	<b>0.001305</b>	0.4601613	0.08435
BMI	0.4008286	0.09926			<b>0.7792746</b>	<b>0.0001379</b>	0.4883721	0.06473
BF%	<b>0.6970483</b>	<b>0.001305</b>	<b>0.7792746</b>	<b>0.0001379</b>			<b>0.72646</b>	<b>0.002160</b>
Leptin	0.4601613	0.08435	0.4883721	0.06473	<b>0.72646</b>	<b>0.002160</b>		

5. táblázat: A kondíciót jellemző paraméterek közötti összefüggés vizsgálatára Spearman féle korrelációs teszttel.  $\rho$  (rho) : Spearman féle korrelációs koefficiens.

A használt paraméterek közül a számolt testzsír százalék érték mutatta a legszorosabb összefüggést a leptin koncentrációval. Bár ez a paraméter erős korrelációt mutatott a bioimpedancia méréssel kapott eredménnyel, utóbbi gyengébb és csak  $p < 0,1$  szinten szignifikáns korrelációt mutatott a leptinszinttel.

ANOVA teszttel megvizsgálva a BSC és a ciklus leptin szintre kifejtett együttes hatását, azt kaptuk, hogy ezek hatása nem szignifikáns. Kiugró értékek elhagyásával, csak a BSC, tehát a kondíció hatása volt szignifikáns ( $p = 0.001774$ ), a ciklus nem befolyásolta a leptin szint alakulását.

Egyéb metabolikus állapotot tükröző paraméterek vizsgálata során, bár az egyes kondíció csoportok esetében nem voltak különbségek a triglicerid, illetve a koleszterin szintekben, Spearman teszttel megvizsgálva, a koleszterin és a leptin között gyenge korreláció volt kimutatható ( $p = 0,04789$ ),  $\rho = 0,3230676$ ). A triglicerid és a leptin közötti összefüggést szintén gyenge korrelációként írhatjuk le ( $p = 0,01562$ ,  $\rho = 0,3895702$ ).

## 5. MEGBESZÉLÉS

A vizsgálataink célja volt tanulmányozni a szuka kutyák ivari ciklusa során bekövetkező hormonális és metabolikus változások leptin szintre gyakorolt hatásait. Célul tűztük ki az eredményeink irodalmi adatokkal történő összehasonlítását, illetve a más fajokban végzett vizsgálatok ismertetését. Vizsgálataink során először nyílt alkalmunk a kézi bioimpedancia mérő készülék alkalmazására, így munkánk során értékeltük a módszer gyakorlatban történő használhatóságát, a mérési eredmények pontosságát. A leptin szint meghatározásakor kapott eredményeink alacsonyabbak voltak, mint az irodalmi adatok, de nem volt különbség a különböző időpontokban mért értékek között, és kiugró értékeket mindig ugyanazok az egyedek adták. Ishioka és munkatársai 3-as BSC-vel rendelkező kutyáknál  $3.0 \pm 0.4$  ng/ml, 4-es csoportban  $8.6 \pm 0.7$  ng/ml nagyságrendű értékeket mértek (Ishioka és mtsai, 2007). A saját méréseink során a BCS 3-as kondíciócsoportban a leptin szint  $0.529 \pm 0.374$ , addig a 4-es csoportban  $1.660 \pm 1.178$  ng/ml értéket mutatott. A nagyobb szórásértékek oka lehet, hogy ezek az értékek az általunk alkalmazott ELISA teszt mérési tartományának alsó határán vannak. Egy lehetséges magyarázata lehet az alacsonyabb eredményeknek, hogy a telepen mindig reggel 7 és 8 óra között etetnek. A telep munkarendjére való tekintettel a mintavételeket mindig reggel 8 órakor kellett végezni, így a koplaltatás a mintavételek előtt több mint 24 óra volt. Egyes vizsgálati eredmények szerint emberben és patkányokban 48 óra éhezés után, a leptin szint minden esetben csökkenő tendenciát mutat. Kutyában ugyanezt tapasztalták (Ishioka és mtsai, 2005a). Az etetés kimaradása esetén, több mint 24 óra éheztetés után mért leptin szint még alacsonyabb értékeket mutatott (Pasiakos és mtsai, 2011; Elimam és Marcus, 2002). Ishioka és munkatársai négy beagle kannál  $2.3 \pm 0.5$  ng/ml leptin koncentrációt mértek az etetési időpont előtt egy órával, több mint 24 óra koplaltatás esetén lecsökkent 2 ng/ml alá. Saját méréseink, mint fentebb említettem, ennél jóval alacsonyabb értékeket hozott ki. Ezért a saját adatainknál is figyelembe kell venni, hogy a kutyák több mint 24 óra koplaltatása valószínűleg befolyásolta az eredményeinket.

Mivel a kutyákat telepi körülmények között tartották, az adatok értékelése során kérdésként merült fel a hőmérséklet esetleges befolyásoló hatása. A vérvételek tél folyamán történtek és mind a három alkalommal  $0^{\circ}\text{C}$  alatti hőmérséklet volt. Egyes vizsgálatok arra utalnak, hogy a hideg csökkenti a leptin szintet, bár a pontos hatása még vitatott.



Rágcsálókban többen is leírták a leptin szint csökkenését alacsony hőfok hatására (Hardie és mtsai, 1996; MacDougald és mtsai, 1995; Trayhurn és mtsai, 1995b). Juhokban szintén leírtak hasonló hatást (Asakuma és mtsai, 2003). Szarvasmarhában kevesebb leptin mRNS-t találtak a böralatti kötőszövetben (Murdoch és mtsai, 2005), továbbá emberben is ugyan úgy kimutatták mind a két nemből a leptin szint csökkenését (Ricci és mtsai, 2000; Peino és mtsai, 2000). Pizon és munkatársai férfiakban történt vizsgálataik során leírták, hogy a leptinnek nagy szerepe van a szervezet hideghez való adaptációjában (Pizon és mtsai, 2009). Peino és munkatársai szerint a leptincsökkenés lehet az oka a hideg környezetben megnövekedett étváagnak. A hideg a szimpatikus idegrendszeren keresztül hat, és hatásai révén gátolja a zsírszövetekben a leptin szekrécióját (Peino és mtsai, 2000). Bing és munkatársai patkányokban azt találták, hogy a hidegben tartott állatokban alacsonyabb leptin szint arányos volt az ekkor bekövetkezett testsúlycsökkenéssel (Bing és mtsai, 1998). Azonban íródtak olyan cikkek is, ahol pont az ellenkezőjét, a leptin szint növekedését, találták. Hörcsögökről készült tanulmányban leírták a leptinnek egy olyan élettani funkcióját, hogy a hidegben megnő a barna zsírszövet leptin szintézise az energiaszükséglet fedezése érdekében, a magasabb leptin szint következtében az étvágy is nő (Zhao, 2011). Melnyk és Himms-Hagen hasonló jelenséget írtak le egerekben. Hőmérséklet csökkenéskor háromszoros tápanyagfelvételt figyeltek meg az egerekben, bár a leptin szint ennek ellenére nem változott. Feltételezik, hogy a barna zsírszövetben termelődik egy olyan faktor, amely az energiaigényeknek megfelelően megnöveli az étvágyat (Melnyk és Himms-Hagen, 1998). Kecskében is alacsonyabb leptin szintet mértek kora ősszel, mint a többi évszakban. Ekkor testsúlytömegcsökkenés is megfigyelhető volt (Alila-Johansson és mtsai, 2004). Brojler csirkékben emelkedést találtak. Akut meleg és hideghatások következtében a máj leptin mRNS tartalma megnőtt (Dridi és mtsai, 2008). Egy idei vizsgálat emberben kimutatta, hogy tél során, elhízott férfiakban, jobban megemelkedett a leptin szint, mint normál testalkatú férfiakban (Kanikowska és mtsai, 2013). Kutyaiban eddig nem készült tanulmány a hideg hatásáról, ezért úgy véljük, hogy a fentebb említett többi állatfajhoz képest, náluk is csökken a leptin szint.

A legtöbb irodalom megegyezik abban, hogy az ösztrogén leptin szint-növelő hatással bír emberben és patkányban (Tanaka és mtsai, 2001; Mannucci és mtsai, 1998; Shimizu és mtsai, 1997; De Biasi és mtsai, 2001), viszont voltak, akik egérben és patkányban nem találtak kapcsolatot a két hormon között (Pellemounter és mtsai, 1999; Watanobe és Suda, 1999). Kutyaiban egyetlen tanulmány készült a leptin és a nemi hormonok kapcsolatáról.

Saleri és munkatársai olyan eredményeket kaptak, hogy az ősztrusz során a leptin szint növekedik. Saját laborértékeink nem mutatattak semmiféle összefüggést a leptinnel. A leptin nem mutatott szignifikáns változást az egyes ciklusszakokban. Egy szarvasmarhában végzett kísérlet bizonyította, hogy egy olyan leptin kit, amely több fajra használatos, nem elég érzékeny és alacsony értékeket adott. Arra jutottak, hogy a szarvasmarhák leptin szint méréséhez specifikusan erre a fajra fejlesztett RIA szükséges (Delavaud és mtsai, 2002). Kutyában ezért is választottuk a fajspecifikus ELISA tesztet. Ennek ellenére az alacsonyabb eredmények és a magas szórású értékek miatt nagyobb egyedszámmal történő vizsgálat szükségeltetik az összefüggések pontosabb értékelése érdekében.

A progeszteron leptin szint csökkentő hatása patkányban, kutyában és emberben széles körben elfogadott (Watanobe és Suda, 1999; Saleri és mtsai, 2003; Rezai és mtsai, 2011; Stelmanska és mtsai, 2012; Balogh és mtsai, 2012; Ajala és mtsai, 2013), bár a mechanizmusa még nem teljesen világos. Egyes vizsgálatok arra mutatnak, hogy indirekt módon, az ősztrógen receptorok expressziójának csökkentésén keresztül képes csökkenteni a leptin szintet (Pinilla és mtsai, 1999). Olyan eredmények is léteznek patkányban, ahol nem találtak összefüggést a leptin és a progeszteron szint között (Luukkaa és mtsai, 2001). Az egyes ciklusszakokba sorolt saját vérmintáink esetében nem találtunk szignifikáns különbséget a leptin szintben, tehát az általunk nyert adatok nem támasztják alá a progeszteron szint leptin szintre kifejtett hatását.

Ahogy kutyában mások is pozitív korrelációt találtak a leptin és a testzsírtömeg között (Jeusette és mtsai, 2006; Sagawa és mtsai, 2002), mi is ezt tapasztaltuk. A 3-as és a 4-es BSC csoportok között szignifikáns eltérés volt kimutatható a leptin szint tekintetében a 4-es pontszámú kutyák háromszoros leptin szintet mutattak. A koleszterin és a triglicerid is megemelkedett volt ezekben az állatokban, szignifikáns, ámde gyenge korrelációt mutatva a leptin szinttel. A saját értékeink Jeusette és munkatársainak eredményeivel megegyeznek, miszerint elhízott kutyákban megemelkedett a vérbeli lipid koncentráció (Jeusette és mtsai, 2005).

A bioimpedancia mérőgéppel kiszámított BMI (Body Mass Index) változó értékeket mutatott. A háromszor mért értékek átlaga gyengébb és csak  $p < 0,1$  szinten mutatott szignifikáns korrelációt a leptinszinttel. A használt paraméterek közül a számolt testzsír százalék érték mutatta a legszorosabb összefüggést a leptin koncentrációval. Ez a paraméter viszont erős korrelációt mutatott a bioimpedancia méréssel kapott eredménnyel. A BMI és a leptin közötti gyenge összefüggés okának kiderítése további vizsgálatokat igényel.

A bioimpedancia mérés a gyakorlatban, terepen meglepően nehéznek bizonyult. A kutyák szőrét meglehetősen nehéz volt széthajtani, hogy biztosítsuk a gép és a bőr megfelelő érintkezését, ezért kénytelenek voltunk, pontosabb adatok érdekében, az adott ponton a szőrt lenyírni. Tekintettel a kutyák kinti tartására, a bőr szennyezettsége is befolyásolhatta a méréseink eredményeit. Pontosabb adatok érdekében a mérési terület fölött alaposabb tisztítás lett volna indokolt. Ennek ellenére elfogadható értékeket nyertünk. Ahogy fentebb említésre került, a BMI és a testzsír százalék erős korrelációt mutatott. Egy 2010-es tanulmányban, amely a bioimpedancia mérőgép pontosságára irányult, azt tapasztalták DEXA méréshez hasonlítva (Dual-Energy X-ray Absorptiometry), hogy túl alacsony, illetve túl magas testzsír százalékoknál nem elég pontos értékeket mér. Ennek az okát nem tudták megmondni. Ellenben általánosságban véve elfogadható eredményeket szereztek (German és mtsai, 2010). Ezeket az eredményeket megerősíti Stone és munkatársai által készített hasonló tanulmány, mivel általuk leírt eredmények szerint a BSC és a bioimpedancia jól korrelált egymással. Testzsír csökkenéssel kapcsolatban nem végeztek kutatásokat (Stone és mtsai, 2009). German és munkatársai által folytatott vizsgálatai során további hátrány merült fel testzsír csökkenés, fogyás esetén, amikor a gép ezt nem tudta elég pontosan érzékelni. A tanulmány írói úgy vélik, hogy klinikai használatban a BSC pontozás még mindig pontosabb, mint a bioimpedancia mérés (German és mtsai, 2010).

Összeségében kimondható, hogy ezen dolgozat alapján összegyűjtött adatok szerint, szuka kutyában a nemi ciklus leptin szintre kifejtett hatását nem lehetett kimutatni. A kapott eredmények gyenge korrelációt mutattak a leptin szint és a nemi ciklus között. Egy korábban elvégzett patkány-kísérlethez hasonlóan (Luukkaa és mtsai, 2001), mi sem találtunk összefüggést kutyában a leptin szint és a nemi ciklus során bekövetkező hormonális változások között. Más tanulmányban leírt nemi ciklus során előforduló ösztrogén fluktuáció (Concannon, 2012) ebben a tanulmányban nem volt kimutatatható, így a leptinre való hatását sem tudtuk bizonyítani. A leptin szint sem változott szignifikánsan az ösztroz ciklus során, így a progeszteron leptin koncentrációra való hatása sem bizonyított általunk. A testzsírtömeg és a leptin szint szoros kapcsolatát viszont sikerült kimutatnunk és mérési eredményeink nem mutattak szignifikáns különbséget az egyes egyedekben a 4 hét alatt történt 3 vizsgálat során. Ebből kiindulva az irodalomban ismert értékekhez képest alacsonyabb eredményeink más paraméterekkel történő korrelációjának vizsgálatával kapott eredményinket megbízhatónak tartjuk. A bioimpedancia készülék mérései és a leptin szintek közti kapcsolatot nem tudtuk egyértelműen kimutatni, de ennek ellenére a bioimpedancia alkalmas lehet a testzsír százalék

meghatározására. A bioimpedancia mérővel kapott eredményeink gyengén korreláltak a leptin szinttel. A készülék használata terepi körülmények között nehézkes volt, kórházi körülmények között valószínűleg pontosabb adatokat lehetne mérni.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A fehér zsírszövetek által termelt hormon, a leptin, mint marker nagyon fontos lehet az elhízottság fokának megállapítása szempontjából, illetve szerepét egyre többször hangsúlyozzák metabolikus betegségek pathogenezisében. A szérumban lévő leptin szintet azonban, a zsírraktárak telítettségi fokán kívül több más tényező is befolyásolja. A nemi hormonok változása módosíthatja ezt a paramétert, ezért kutatásunk célja a szukakutya nemi ciklus működése során jellemző hormonális változások vizsgálata volt, illetve ezek hatása a leptin szintre. Munkánk során először alkalmaztunk egy olyan alternatív testzsírtömeg mérő szerkezetet, amely a szervezet impedancia mérésén alapul.

18 nem vemhes beagle szuka 3 alkalommal történő ciklus diagnosztikai vizsgálatát és vérvételét végeztük el, kéthetes időközönként, összesen 3 alkalommal. Az éhomi vérmintákból megmértük a progeszteron, ösztrogén, triglicerid, koleszterin és leptin szintet. A kutyákat 3-as és 4-es BCS kategóriába beosztottuk, majd testtömegmérés után megmértük a testzsírtömegüket bioimpedancia mérővel.

A nemi ciklus és a leptin a vizsgálatunk során nem mutatott összefüggést, ellentétben az egyetlen, miénkhez hasonló, szuka kutyákban végzett vizsgálattal (Saleri és mtsai, 2003). Továbbá nem találtunk az egyes egyedekben sem az ösztrogén, sem a leptin koncentrációk tekintetében számottevő változásokat. A vizsgálataink során mért leptin szintek alacsonyabb értékeket mutattak az irodalmi adatokhoz képest (3-as BCS:  $0.529 \pm 0.374$ , 4-es BCS:  $1.660 \pm 1.178$  ng/ml). Ennek oka lehetett a mérések előtt több mint 24 óra éheztetés és az alacsony külső hőmérséklet hatása a kutyák szervezetére. Az impedancia mérőgéppel mért testzsírszázalék a számolt testzsírszázalékkal szoros kapcsolatot mutatott, a leptin szinttel viszont gyengén korrelált. Telepi körülmények között nem adott elég pontos értékeket.

Összeségében megállapítottuk, hogy nem lehetett a nemi ciklus és a leptin szint között kapcsolatot kimutatni. A bioimpedancia mérőgép értékei a számolt testzsírszázalékkal jól egyeztek, viszont a leptin szinttel nem. További vizsgálatok szükségesek, hogy kiderüljön az impedancia mérés hasznossága és pontossága klinikai körülmények között.

## 7. SUMMARY

The hormone called leptin is mainly produced by white fat cells and could be important as a marker for determining the grade of obesity. It's role is more often emphasized in the pathogenesis of metabolic diseases. Besides the saturation of fat storages in the body, the serum leptin level is also influenced by other factors, such as the female sexual hormones during the ovarian cycle. Our goal was to determine these hormonal fluctuations in the bitch and their influences on the blood leptin level. A further goal of our investigation was to determine whether an alternative percentage body fat measuring tool, which is based on impedance measuring, could be useful in clinical practice.

18 non-pregnant female Beagle 's cycle diagnostics were made and after an overnight fasting period blood samples were taken every two weeks in a six week period. The progesterone, oestrogen, triglyceride, cholesterol and leptin levels were determined. The dogs were divided into two groups according to their body condition scores (BCS 3 and 4) and after a weight determination their body fat percentages were measured.

The ovarian cycle and the leptin didn't show any connections, despite of the only paper written about a similar topic as our own (Saleri et al., 2003), where they found correlation. We did not notice any significant changes in leptin or oestrogen values either. The leptin levels where significantly lower than what can be found in the literature (BCS 3 :  $0.529 \pm 0.374$ , BCS 4:  $1.660 \pm 1.178$  ng/ml). This could have been due to more than 24h fasting and the cold temperature, since the samples were taken outdoors during winter. The results of the bioimpedance measuring tool showed strong correlations with the counted percentage body fat, but not with the leptin levels. Our measurements under farm conditions did not show enough accuracy.

In overall, we determined that there is no connection whatsoever between the dog's ovarian cycle and leptin level. The bioimpedance measuring tool's values correlated well with the counted body fat percentage, but not with the leptin level. Further investigations are needed to assess the usefulness and accuracy of this device during clinical practice.

## **8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Elsősorban szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Müller Lindának a segítőkészségét, kitartását, véleményét és szakmai iránymutatását. Bízató észrevételeire folyamatosan számíthattam a munkám során. Nagy hálával tartozom Wobe telephely tulajdonosainak, amiért engedélyezték és lehetővé tették a vizsgálatainkat. Hálás vagyok a telep dolgozóinak, a mintavételekben nyújtott segítségükért. Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Bognár Gábornak, aki türelmével és szaktudásával hatalmas segítséget nyújtott a telepi látogatásaink során. Továbbá köszönettel tartozom Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék és Klinika Kisállatklinikája munkatársának, Wölfling Annának, aki az ELISA vizsgálatok elvégzésében és kiértékelésében nyújtott pótolhatatlan segítséget. Nem utolsó sorban köszönöm még mindazoknak, akik támogatásukkal segítettek, hogy elkészíthessem a szakdolgozatom.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

1. AJALA, O.M., OGUNRO, P.S., ELUSANMI, G.F., OGUNYEMI, O.E., BOLARINDE, A.A.: Changes in Leptin Serum During Phases of Menstrual Cycle of Fertile Women: Relationship to Age Groups and Fertility. *Int J Endocrinol Metab.* 2013. 11. p. 27-33.
2. ALILA-JOHANSSON, A., ERIKSSON, L., SOVERI, T., LAAKSO, M.L.: Daily and annual variations of free fatty acid, glycerol and leptin plasma concentrations in goats (*Capra hircus*) under different photoperiods. *Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol.*, 2004, 138. p. 119-131.
3. ASAKUMA, S., MORISHITA, H., SUGINO, T., KUROSE, Y., KOBAYASHI, S., TERASHIMA, Y.: Circulating leptin response to feeding and exogenous infusion of insulin in sheep exposed to thermoneutral and cold environments. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2003. 134. p. 329–335.
4. BADO, A., LEVASSEUR, S., ATTOUB, S., KERMORGANT, S., LAIGNEAU, J.P., BORTOLUZZI, M.E., MOIZO, L., LEHY, T., GUERRE-MILLO, M., LE MARCHAND-BRUSTEL, Y., LEWIN, M.J.M.: The stomach is a source of leptin. *Vitam Horm.*, 2000. 59. p. 265-304.
5. BALOGH, O., KOWALEWSKI, M.P., REICHLER, I.M.: Leptin and Leptin Receptor Gene Expression in the Canine Corpus Luteum During Diestrus, Pregnancy and after Aglepristone-Induced Luteolysis. *Reprod Dom Anim*, 2012. 47. p. 40–42.
6. BAN, T., OKAWA, M., UMEDA, T., OTSUYI, K.: Patent application publication. Pet body fat measuring tool. 2009.
7. BELL, N.L., CONSIDINE, V.R.: Leptin and obesity. In: CASTRACANE, V.D., HENSON, M.C.: *Leptin*. USA, New York: Springer, 2007. p. 33-51.



8. BING, C., FRANKISH, H.M., PICKAVANCE, L., WANG, Q., HOPKINS, D.F.C., STOCK, M.J., WILLIAMS, G.: Hyperphagia in cold-exposed rats is accompanied by decreased plasma leptin but unchanged hypothalamic NPY. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 1998. 274. p. 62-68.
9. BLÜHER, S., MANTZOROS, C.S.: Leptin in humans: lessons from translational research. *The American Journal of clinical nutrition*, 2009. 89. p. 991-997.
10. BURKHOLDER, W.: Use of body condition scores in clinical assessment of the provision of optimal nutrition. *JAVMA*, 2000. 5. p.650-654.
11. BURKHOLDER, W.: Precision and practicality of methods of assessing body composition of dogs and cats. *Suplement to Compendium on Continuing Education for the Practicing veterinarian*, 2001. 23. p. 1-9.
12. CASTRACANE, V.D., HENSON, M.C: The obese mouse and the discovery of leptin. In: CASTRACANE, V.D., HENSON, M.C: *Leptin.USA*, New York: Springer, 2007. p. 1-9.
13. CELLA, F., GIORDANO, G., CORDERA, R.: Serum leptin concentrations during the menstrual cycle in normal-weight women: effects of an oral triphasic estrogen–progestin medication. *European Journal of Endocrinology*, 2000.142. p. 174–178.
14. COOKE, P.S., NAAZ, A.: Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med*, 2004. 229. p. 1127–1135.
15. DE BIASI ,S.N., APFELBAUM, L.I., APFELBAUM, M.E.: In vitro effect of leptin on LH release by anterior pituitary glands from female rats at the time of spontaneous and steroid-induced LH surge. *European Journal of Endocrinology*, 2001. 145. p. 659-665.

16. DELAVAUD, C., FERLAY, A., FAULCONNIER, Y., BOCQUIER, F., KANN, G., CHILLIARD, Y.: Plasma leptin concentration in adult cattle: effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. *J Anim Sci.*, 2002. 80. p. 1317-1328.
17. DIEZ, M., NGUYEN, P.: The epidemiology of canine and feline obesity. *WalthamFocus*, 2006. 16. p. 2–8.
18. DRIDI, S., TEMIM, S., DEROUET, M., TESSERAUD, S., TAOUIS, M.: Acute cold- and chronic heat-exposure upregulate hepatic leptin and muscle uncoupling protein (UCP) gene expression in broiler chickens. *J Exp.Zool.A Ecol.Genet.Physiol*, 2008. 309. p. 381-388.
19. EDNEY, A.T., SMITH, P.M.: Study of obesity in dogs visiting veterinary practices in the United Kingdom. *Vet Rec*, 1986.118. p. 391–396.
20. ELLIOTT, D.A.: Techniques to assess body composition in dogs and cats. *Waltham Focus*, 2006. 16. p. 16-20.
21. ELIMAM, A., MARCUS, C.: Meal timing, fasting and glucocorticoids interplay in serum leptin concentrations and diurnal profile. *European Journal of Endocrinology*, 2002. 147. p. 181–188
22. FARID, F., CHEHAB, F.F., MOUNZIH, K., LU, R., LIM, E.M.: Early Onset of Reproductive Function in Normal Female Mice Treated with Leptin. *Science*, 1997.275. p. 88-90.
23. FISCHER-POSOVSZKY, P., WABITSCH, M., HOCHBERG, Z.: Endocrinology of adipose tissue - an update. *Horm Metab Res.*, 2007. 39. p. 14-21.
24. FRIEDMAN, J.M.: Leptin, Leptin Receptors, and the Control of Body Weight. *Nutrition Reviews*, 1998. 56. p. 38-46.

25. FRIEDMAN, J.M., HALAAS, J.L.: Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 1998. 395. p. 763-770.
26. GERMAN, A.J.: The growing problem of obesity in dogs and cats. *J Nutr.*, 2006. 136. p. 1940-1946.
27. GERMAN, A.J., HOLDEN, S.L., MORRIS, P.J., BIOURGE, V.: Comparison of a bioimpedance monitor with dual-energy x-ray absorptiometry for noninvasive estimation of percentage body fat in dogs. *AJVR*, 2010. 71. p. 393-398.
28. GRUNFELD, C., ZHAO, C., FULLER, J., POLLACK, A., MOSER, A., FRIEDMAN, J., FEINGOLD, K.R.: Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *J Clin Invest*, 1996. 97. p. 2152–2157
29. HARDIE, L.J., RAYNER, D.V., HOLMES, S., TRAYHURN, P.: Circulating leptin levels are modulated by fasting, cold exposure and insulin administration in lean but not Zucker (fa/fa) rats as measured by ELISA. *Biochem.Biophys.Res Commun*, 1996. 223. p. 660-665.
30. HOUP, K. A., HINTZ, H. F.: Obesity in dogs. *Canine Practice*, 1978. 5. p. 54–58.
31. a) ISHIOKA, K., SOLIMAN, M.M., HONJOH, T., SHIBATA, H., KIMURA, K., SAITO, M.: Dexamethasone increases serum leptin concentration in dogs. *Vet J.*, 2002. 164. p. 295–297.
32. b) ISHIOKA, K., SOLIMAN, M.M., SAGAWA, M., NAKADOMO, F., SHIBATA, H., HONJOH, T., HASHIMOTO, A., KITAMURA, H., KIMURA, K., SAITO, M.: Experimental and clinical studies on plasma leptin in obese dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 2002. 64. p. 349-353.
33. a) ISHIOKA, K., HATAI, H., KOMABAYASHI, K., SOLIMAN, M.M., SHIBATA, H., HONJOH, T., KIMURA, K., SAITO, M.: Diurnal variations of serum leptin in dogs: effects of fasting and re-feeding. *Vet J.*, 2005. 169. p. 85–90.

34. b) ISHIOKA, K., OKUMURA, M., SAGAWA, M., NAKADOMO, F., KIMURA, K., SAITO, M.: Computed tomographic assessment of body fat in beagles. *Vet Radiol Ultrasound*, 2005. 46. p. 49-53.
35. ISHIOKA, K., HOSOYA, K., KITAGAWA, H., SHIBATA, H., HONJOH, T., KIMURA, K., SAITO, M.: Plasma leptin concentration in dogs: effects of body condition score, age, gender and breeds. *Res Vet Sci.*, 2007. 82. p. 11–15.
36. ISIDORI, M.A., STROLLO, F., MORE` M., CAPRIO, M., AVERSA, A., MORETTI, C., FRAJESE, G., RIONDINO, G., FABBRI, A.: Leptin and Aging: Correlation with Endocrine Changes in Male and Female Healthy Adult Populations of Different Body Weights. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2000. 85. p. 1954-1962.
37. IWASE, M., KIMURA, K., SASAKI, N., KOMAGOME, R., ISHIOKA, K., MORIMATSU, M., MURAKAMI, T., SAITO, M.: Canine leptin: cDNA cloning, expression and activity of recombinant protein. *Research in Veterinary Science*, 2000. 68. p. 109-114.
38. JONES, A. P., MCELROY, J. F., CRNIC, L., WADE, G. N.: Effects of ovariectomy on thermogenesis in brown adipose tissue and liver in Syrian hamsters. *Physiol. Behav.*, 1991. 50. p. 41–45.
39. JEUSETTE, I.C., DETILLEAUX, J., CUVELIER, C.: Ad libitum feeding following ovariectomy in female Beagle dogs: effect on maintenance energy requirement and on blood metabolites. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 2004. 88. p. 117–121.
40. JEUSETTE, I.C., LHOEST, E.T., ISTASSE, L.P., DIEZ, M.O.: Influence of obesity on plasma lipid and lipoprotein concentrations in dogs. *Am J Vet Res*, 2005. 66. p. 81-86.
41. JEUSETTE, I.C., DAMINET, S., NGUYEN, P., SHIBATA, H., SAITO, M., HONJOH, T., ISTASSE, L., DIEZ, M.: 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*, 2006. 90. p. 12–18.
42. KANCHUK, M.L, BACKUS, R.C., CALVERT, C.C., MORRIS, J.G., ROGERS, Q.R.: Neutering Induces Changes in Food Intake, Body Weight, Plasma Insulin and Leptin Concentrations in Normal and Lipoprotein Lipase–Deficient Male Cats. *J. Nutr.*, 2002. 132. p. 1730-1732.
43. KANIKOWSKA, D., SATO, M., IWASE, S., SHIMIZU, Y., NISHIMURA, N., INUKAI, Y., SUGENOYA, J.: Effects of living at two ambient temperatures on 24-h blood pressure and neuroendocrine function among obese and non-obese humans: a pilot study. *Int J Biometeorol*, 2013. 57. p. 475-481.
44. KOLACZYNSKI, J.W., NYCE, M.R., CONSIDINE, R.V., BODEN, G., NOLAN, J. J., HENRY, R., MUDALIAR, S.R., OLEFSKY, J., CARO, J.F.: Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro. *Diabetes Journals*, 1996 45. p. 699-701.
45. LAFLAMME: A Clinical Tool – Development and Validation of a Body Condition Score System for Dogs. *Canine Practice*, 1997. 22. p. 10-15.
46. LUUKKAA, V., SAVONTAUS, E., ROURU, J., VIRTANEN, K.A., BOSS, O., HUHTANIEMI, I., KOULU, M., PESONEN, U., HUUPPONEN, R.: Effects of estrous cycle and steroid replacement on the expression of leptin and uncoupling proteins in adipose tissue in the rat. *Gynecol Endocrinol.*, 2001. 15. p.103-110.
47. MACDOUGALD, O.A., HWANG, C.S., FAN, H., LANE, M.D.: Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 1995. 92. p. 9034-9037.
48. MANNUCCI, E., OGNIBENE, A., BECORPI, A.F., CREMASCO, F., PELLEGRINI, S., OTTANELLI, S., RIZZELLO, S.M., MASSI, G., MESSERI, G., ROTELLA,

- C.M.: Relationship between leptin and oestrogens in healthy women. *Eur J Endocrinol*, 1998. 139. p. 198-201.
49. MAZAKI-TOVI, M., FEUERMAN, Y., SEGEV, G., KLEMENT, E., YASNATAN, E., FARKAS A., KOL, A., SHAMAY, A.: Increased serum leptin and insulin concentrations in canine hyperthyroidism. *The Veterinary Journal*, 2010. 183. p. 109-114.
50. MCGREEVY, P.D., THOMSON, P.C., PRIDE, C.: Prevalence of obesity in dogs examined by Australian veterinary practices and the risk factors involved. *Vet Rec*, 2005. 156. p. 696–707.
51. MEISTER, B.: Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. *Vitam Horm.*, 2000. 59. p. 265-304.
52. MELI, R., PACILIO, M., MATTACE RASO, G., ESPOSITO, E., COPPOLA, A., NASTI, A., DI CARLO, C., NAPPI, C., DI CARLO, R.: Estrogen and Raloxifene Modulate Leptin and Its Receptor in Hypothalamus and Adipose Tissue from Ovariectomized Rats. *Endocrinology*, 2004. 145. p. 3115–3121.
53. MELNYK, A., HIMMS-HAGEN, J.: Temperature-dependent feeding: lack of role for leptin and defect in brown adipose tissue-ablated obese mice. *Am.J Physiol*, 1998. 274 p. 1131-1135.
54. MESSINIS, E. I., PAPAGEORGIOU, I., MILINGOS S., ASPRODINI, E., KOLLIOS, G., SEFARIADIS, K.: Oestradiol plus progesterone treatment increases serum leptin concentrations in normal women. *Human reproduction*, 2001. 16. p. 1827-1832.
55. MURDOCH, G.K., DIXON, W.T., OKINE, E.K., CHRISTOPHERSON, R.J.: Bovine tissue mRNA abundance related to acute cold exposure and acute feeding restriction. *Canadian Journal of Animal Science*, 2005. 85. p. 157-164.
56. NISHII, N., TAKASU, M., OHBA, Y., MAEDA, S., KITO, K., OHTSUKA, Y., HONJO, T., SAITO, M., KITAGAWA, H.: Effects of administration of

- glucocorticoids and feeding status on plasma leptin concentrations in dogs. *Am J Vet Res.*, 2006. 67. p. 266–270.
57. PASIAKOS, M.S., CARUSO, M.C., KELLOGG, D.M., KRAMER, F.M., LIEBERMAN, R.H.: Appetite and Endocrine Regulators of Energy Balance After 2 Days of Energy Restriction: Insulin, Leptin, Ghrelin, and DHEA-S. *Obesity Journal*, 2011. 6. p. 1125-1130.
58. PEINO, R., PINEIRO, V., GUALILLO, O., MENENDEZ, C., BRENLLA, J., CASABIELL, X., DIEGUEZ, C., CASANUEVA, F.F.: Cold exposure inhibits leptin secretion in vitro by a direct and non-specific action on adipose tissue. *European Journal of Endocrinology*, 2000.142. p. 195-199.
59. PELLEYMOUNTER, M.A., CULLEN, M.J., BAKER, M.B., HECHT, R., WINTERS, D., BOONE, T., COLLINS, F.: Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, 1995. 269. p. 540-543.
60. PELLEYMOUNTER, M.A., BAKER, M.B., MCCALED, M.: Does estradiol mediate leptin's effects on adiposity and body weight? *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 1999. 276. p. 955-963.
61. PINILLA, L., SEOANE, L.M., GONZALEZ, L., CARRO, E., AGUILAR, E., CASANUEVA, F.F., DIEGUEZ, C.: Regulation of serum leptin levels by gonadal function in rats. *European Journal of Endocrinology*, 1999. 140. p. 468–473.
62. PIZON, M., TOMASIK, P.J., SZTEFKO, K., SZAFRAN, Z.: Low ambient temperature lowers cholecystokinin and leptin plasma concentrations in adult men. *The Open Nutrition Journal*, 2009. 3. p. 5-7.
63. POPOVIC, V., CASANUEVA, F.F: Leptin, nutrition and reproduction: new insights. *Hormones*, 2002. 1. p. 204-217.

64. QIAN, H., BARB, C.R., COMPTON, M.M., HAUSMAN, G.J., AZAIN, M.J., KRAELING, R.R., BAILE, C.A.: Leptin mRNA expression and serum leptin concentrations as influenced by age, weight and estradiol in pigs. *Domestic Animal Endocrinology*, 1999. 16. p. 135–143.
65. RICCI, M.R., FRIED, S.K., MITTLEMAN, K.D.: Acute cold exposure decreases plasma leptin in women. *Metabolism*, 2000. 49. p. 421-423.
66. RADIN, M.J., SHARKEY, L.C., HOLYCROSS, B.J.: Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. *Vet. Clin. Pathol.*, 2009. 38. p. 136-156.
67. RENTSCH, J., CHIESI, M.: Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *Febs lett.*, 1996. 379. p. 55–59.
68. REZAI, S., BABABEI, H., GHARACHORLOU, A., BABAPOUR, V., AREFI, A.: The Effect of Varying Levels of Progesterone with Fixed Level of Estrogen on Concentrations of Serum Leptin in Ovariectomized Rats. *Advances in Environmental Biology*, 2011. 5. p. 2561-2565.
69. RICCI, A.G, DI YORIO, M.P., FALETTI, A.G.: Inhibitory effect of leptin on the rat ovary during the ovulatory process. *Reproduction*, 2006. 132. p. 771–780.
70. RICCI, R., BEVILACQUA, F.: The potential role of leptin and adiponectin in obesity: A comparative review. *The Veterinary Journal*. 2011. 10. p. 10-17.
71. ROY, E.J., WADE, G. N.: Role of food intake in estradiol induced body weight changes in female rats. *Horm. Behav.*, 1977. 8. p. 265–274.
72. SAAD, M.F., DAMANI, S., GINGERICH, R.L., RIAD-GABRIEL, M.G., KHAN, A., BOYADJIAN, R., JINAGOUDA, S.D., EL-TAWIL, K., RUDE, R.K., KAMDAR, V.: Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J Clin Endocrinol Metab.*, 1997. 82. p. 579-84.



73. SAGAWA, M.M., NAKADOMO, F., HONJOH, T., ISHIOKA, K., SAITO, M.: Correlation between plasma leptin concentration and body fat content in dogs. *AJVR*, 2002. 63. p. 7-10.
74. SALERI, R., TIRELLI, M., GRASSELLI, F., DONDI, M., ARISI, M.: Sexual dimorphism in leptin blood levels in the dog (in Italian). *Veterinaria*, 2003. 17. p. 47–51.
75. SHIMIZU, H., SHIMOMURA, Y., NAKANISHI, Y., FUTAWATARI, T., OHTANI, K., SATO, N., MORI, M.: Estrogen increases *in vivo* leptin production in rats and human subjects. *Journal of Endocrinology*, 1997. 154. p. 285–292.
76. STONE, R., BERGHOFF, N., STEINER, J.M., ZORAN, D.: Use of a Bioelectric Impedance Device in Obese and Lean Healthy Dogs to Estimate Body Fat Percentage. *Veterinary Therapeutics*, 2009.10. p. 59-70.
77. STUMVOLL, M., FRITSCH, A., TSCHRITTER, O., LEHMANN, R., WAHL, H. G., RENN, W., HÄRING, H.: Leptin levels in humans are acutely suppressed by isoproterenol despite acipimox-induced inhibition of lipolysis, but not by free fatty acids. *Metabolism*, 2000. 49. p. 335-341.
78. STELMANSKA, E., KMIECB, Z., SWIERCZYNSKIA, J.: The gender- and fat depot-specific regulation of leptin, resistin and adiponectin genes expression by progesterone in rat. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2012. 132. p. 160–167
79. TANAKA, M., NAKAYA, S., KUMAI, T., WATANABE, M., TATEISHI, T., SHIMIZU, H., KOBAYASHI, S.: Effects of Estrogen on Serum Leptin Levels and Leptin mRNA Expression in Adipose Tissue in Rats. *Horm Res*, 2001. 56. p. 98–104
80. TEIRMAA, T., LUUKKAA, V., ROURU, J., KOULU, M., HUUPPONEN, R.: Correlation between circulating leptin and luteinizing hormone during the menstrual cycle in normal-weight women. *European Journal of Endocrinology*, 1998. 139. p. 190–194.

81. a) TRAYHURN, P., THOMAS, M.E.A., DUNCAN, J.S., RAYNER, V.D.: Effects of fasting and refeeding on *ob* gene expression in white adipose tissue of lean and obese (*ob/ob*) mice. *Febs lett.*, 1995. 368. p. 488–490.
82. b) TRAYHURN, P., DUNCAN, J.S., RAYNER, D.V.: Acute cold-induced suppression of *ob* (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. *Biochem.J*, 1995. 311. p. 729-733.
83. WATANOBE, H., SUDA, T.: A Detailed Study on the Role of Sex Steroid Milieu in Determining Plasma Leptin Concentrations in Adult Male and Female Rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999. 259. p. 56–59.
84. WILKINSON, M.J.A, MCEWAN, N.A.: Use of Ultrasound in the Measurement of Subcutaneous Fat and Prediction of Total Body Fat in Dogs. *J. Nutr.*, 1991. 121. p. 47-50.
85. YILMAZ, Z., YESIM, O.I., ESIN, G.: Serum leptin and ghrelin levels in response to methylprednisolone injection in healthy dogs. *Research in Veterinary Science*, 2007. 82. p. 187-194.
86. ZHAO, Z.J.: Serum leptin, energy budget, and thermogenesis in striped hamsters exposed to consecutive decreases in ambient temperatures. *Physiol Biochem.Zool.*, 2011. 84. p. 560-572.
87. ZHONG, N., WU, X.P., XU, Z.R., WANG, A.H., LUO, X.H., CAO, X.Z., XIE, H., SHAN, P.F., LIAO, E.Y.: Relationship of serum leptin with age, body weight, body mass index, and bone mineral density in healthy mainland Chinese women. *Clin Chim Acta.*, 2005. 351. p. 161-168.
88. ZORAN, D. L.: Obesity in Dogs and Cats: A Metabolic and Endocrine Disorder. *Vet Clin Small Anim*, 2010. 40. p. 221–239.