

Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola

**A szaporodásbiológiai működés, és egyes tápláltsági és
anyagcsere paraméterek közötti összefüggés vizsgálata
kutyában**

Interactions between nutritional status, metabolic biomarkers
and reproductive function in dogs

PhD értekezés

dr. Müller Linda

2021

Témavezetők és témabizottsági tagok:

.....
dr. Balogh Orsolya PhD, DACT
Department of Small Animal Clinical Sciences,
Virginia-Maryland College of Veterinary Medicine, USA
témavezető

.....
dr. Farkas Szilvia PhD, Egyetemi Adjunktus
Állatorvostudományi Egyetem,
Szülészeti Tanszék és Haszonállat-Gyógyászati Klinika
témavezető

dr. habil. Thuróczy Julianna PhD, Dipl. ECAR, Egyetemi Docens
Gamma-Vet Kft.
korábbi témavezető

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

.....
dr. Müller Linda

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Összefoglalás.....	6
2. Bevezetés és célkitűzések.....	8
3. A kondíció és a tápláltsági állapotot jellemző endokrin tényezők vizsgálata kutyában	10
3.1. Irodalmi áttekintés	10
3.1.1. A kondíció meghatározásának lehetőségei kutya fajban	10
3.1.2. A tápláltsági állapot endokrin háttere kutyában: leptin, inzulin, IGF1	13
3.1.3. A testzsíreloszlás és a zsírdepókat alkotó zsírsejtek méretének jelentősége	20
3.1.3.1. A testzsíreloszlás jelentősége	20
3.1.3.2. A testzsíreloszlás vizsgálatának módszerei kutyán	25
3.1.3.3. A zsírdepókat alkotó zsírsejtek méretének jelentősége	27
3.1.3.4. A zsírsejtméret meghatározásának lehetőségei	33
3.2. Célkitűzések	34
3.3. Morfometriai és bioimpedancia mérések alkalmazhatósága, valamint ezek összefüggése a szérumban leptinkoncentrációval kutyában	34
3.3.1. Anyag és módszer	34
3.3.2. Eredmények.....	36
3.3.3. Megbeszélés.....	37
3.4. A zsíreloszlás alakulása és annak metabolikus következményei kutyában	39
3.4.1. Anyag és módszer	39
3.4.2. Eredmények.....	41
3.4.3. Megbeszélés.....	47
3.5. A zsírsejtek méretének jelentősége kutya fajban	51
3.5.1. Anyag és módszer	51
3.5.2. Eredmények.....	53
3.5.3. Megbeszélés.....	57
4. A leptin és az inzulinszerű növekedési hormon (IGF1) szerepe a szukák szaporodásbiológiai működésében	60
4.1. Irodalmi áttekintés	60
4.1.1. A leptin szaporodásbiológiai szerepe nőivarban	60
4.1.2. Az IGF1 szaporodásbiológiai szerepe nőivarban	64
4.2. Célkitűzések	65
4.3. A leptin és a leptin receptor fehérje szintű megjelenése a kutya petefészkében	66
4.3.1. Anyag és módszer	66
4.3.2. Eredmények.....	67
4.3.3. Megbeszélés.....	70
4.4. A szérumban leptinkoncentráció változása a szuka kutya ivari ciklusa során	72
4.4.1. Anyag és módszer	72
4.4.2. Eredmények.....	73
4.4.3. Megbeszélés.....	75
4.5. Az IGF1 valamint receptorának expressziója a kutya petefészekben.....	76
4.5.1. Anyag és módszer	76
4.5.2. Eredmények.....	79
4.5.3. Megbeszélés.....	84
5. A leptin és az IGF1 szerepe a kanok szaporodásbiológiai működésében.....	87

5.1. Irodalmi áttekintés	87
5.1.1. A leptin szaporodásbiológiai szerepe hímvivarban	87
5.1.2. Az IGF1 hatása a hím nemi szerveken	92
5.1.3. A hosszú hatású GnRH szuperagonista alkalmazásával indukált hipogonadizmus, mint az infertilitás modellje, és ennek hatása a metabolikus funkciókra	95
5.2. Célkitűzések	97
5.3. A leptin és az inzulinszerű növekedési faktor-1 szerepének vizsgálata egészséges kutyákból származó here szöveteken	98
5.3.1. Anyag és módszer	98
5.3.2. Eredmények.....	100
5.3.3. Megbeszélés.....	103
5.4. A 4.7 mg deslorelin tartalmú implantátummal végzett kémiai kasztráció hatása a szérum tesztoszteronkoncentrációra, a spermaminőségre, testtömegre, valamint a here és a mellékhere leptin, leptin receptor, IGF1 és IGF1 receptorának génexpressziójára egészséges beagle kanokban	105
5.4.1. Anyag és módszer	106
5.4.2. Eredmények.....	109
5.4.3. Megbeszélés.....	112
6. Új tudományos eredmények	118
7. Irodalomjegyzék	121
8. A doktori kutatás eredményeinek közlései.....	144
8.1. Lektorált, impakt faktossal bíró tudományos folyóiratban megjelent publikációk	144
8.2. Konferencia prezentációk	144
9. Köszönetnyilvánítás.....	146

Rövidítések jegyzéke

ACTH	adrenokortikotrop hormon
ALT	alanin-aminotranszferáz
AP	alkalikus foszfatáz
ARC	hipotalamusz nucleus arcuatus
AST	aszpartát-aminotranszferáz
AVPV	anteroventralis periventricularis mag
BCSs	Body Condition Score System – kondíció bírálati rendszer
BF%	testzsírszázalék (morfometriai mérések alapján)
BMI	Body Mass Index – testtömeg-index
BUN	vér karbamid-nitrogén
cDNA	komplementer DNS
CL	Corpus Luteum – sárgatest
CRP	c-reaktív protein
CT	komputer tomográfia
CV	Coefficient of Variability – variációs koefficiens
DAB	diamino-benzidin
db	diabétesz gén (leptin receptor gén)
DEXA	Dual Energy X-ray Absorptiometry – két energiaszinten mért rtg-sugárzás elnyelődés
DF	deviációs faktor
DFI%	DNS fragmentációs index
E2	ösztrogén (17 β -ösztadiol)
EGF	epidermális növekedési faktor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay – enzimhez kötött immunszorbens próba
FFA	szabad zsírsav
FGF	fibroblaszt növekedési faktor
FSH	follikulusstimuláló hormon
GALP	galaninszerű peptid
GC	granulosa sejtek
GH	növekedési hormon
GHRH	növekedési hormon serkentő hormon
GnRH	gonadotropinfelszabadító hormon
hCG	humán koriális gonadotropin
HPG	hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely
HS	térd csánk távolság (cm)
HSD	Tukey-féle HSD (honestly significant difference) teszt
IAF	intraabdominális zsírszövet
IGF1	inzulinszerű növekedési faktor-1
IGF1R	IGF1 receptor
IGFBP	IGF-kötő fehérjék
IGFBP1-6	IGF1 szállítófehérjék (1-6 típusok)
IL-6	interleukin 6
IRA, IRB	inzulin receptor (A-, B-izoforma)
IR	inzulinrezisztencia

IRS	inzulin receptor szubsztrát
JAK	Janus-kináz
JAK2-STAT3	Janus-kináz-szignál transzducer és transzkripció aktivátor jelátviteli út
Lep	leptin
LepR	leptin receptor
LH	luteinizáló hormon
MAPK	mitózis aktiváló protein kináz
MCH	átlagos hemoglobin tartalom
MCHC	átlagos hemoglobin koncentráció
MCV	vörösvérsejt-térfogat
MPO	mediális preoptikus régió
mRNS	hírvivő ribonukleinsav
NEFA	nem észterifikált zsírsav
NPY	neuropeptid Y
ob	obezitás gén (leptin gén)
Ob-Ra - e	leptin receptor izoformák
P4	progeszteron
P450 scc	koleszterin oldallánc hasító enzim (citokróm P450 enzimek szupercsaládja)
PC	medencekörméret (cm)
PCR	polimeráz láncreakció
PCV	Packed Cell Volume – hematokrit
PGF2 α	prostaglandin F2 α
PGFM	PGF2 α metabolit
POMC	proopiomelanokortin
RIA	RadiolimmunoAssay – radioimmun mérés
RIM	rimonabant
Sc, SCF	szubkután zsírszövet
SF-1	szteroidogén faktor 1
StAR protein	szteroidogén akut szabályozó fehérje
STAT3	szignál transzducer és transzkripció aktivátor-3
T	tesztoszteron
TEC	theca externa sejtek
TG	triglicerid
TIC	theca interna sejtek
TNF α	tumor nekrosis faktor alfa
TRH	tireotropinfelszabadító hormon
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
Visc, IAF	viszcerális zsírszövet
VLDL	very-low-density lipoprotein – nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein
ZP	zona pellucida
α -MSH	alfa- melanocitastimuláló hormon
$\Delta\Delta$ Ct	delta-delta Ct módszer

1. Összefoglalás

A tápláltsági állapot, így egyes metabolikus faktorok hatása a szaporodásbiológiai működésre mindkét nem esetében hosszú ideje részletesen vizsgált kérdés. Elsőként, a kutyában még nem alkalmazott, humán gyakorlatban ismert, a kondíciót jellemző paraméterek vizsgálatát tűztük ki célul. Szuka kutyák esetében vizsgáltuk a morfometriai és bioimpedancia mérések alkalmazhatóságát, valamint az ezek alapján meghatározott testzsírszázalék és a szérumban leptinkoncentráció összefüggését. CT felvételek elemzésével vizsgáltuk a testzsíreloszlást, illetve annak szérumban leptinszintre és inzulinérzékenységre kifejtett hatását, valamint natív zsírminták vizsgálatára kifejlesztett módszerünkkel képet kaptunk a nagyobb zsírdepókat alkotó zsírsejtek méretének alakulásáról. Szoros pozitív összefüggést írtunk le a szérumban leptinkoncentráció és a morfometriai mérések alapján számolt testzsírszázalék érték között, ugyanakkor a bioimpedancia mérés eredménye nem mutatott összefüggést a szérumban leptinkoncentrációval. Egyes egyedekben alapvető különbség mutatkozott a zsírszövet regionalitásának tekintetében, a leptin vérből mérhető koncentrációja pedig összefüggést mutatott a lumbális magasságban megjelenő szubkután és viszcerális zsírmennyiséggel, ugyanakkor a viszcerális zsírszövet mennyisége erősebben befolyásolta a hormonszint alakulását. Kimutattuk, hogy a kondícióval és a leptinszint alakulásával párhuzamosan emelkedik a szubkután és a viszcerális raktárakat alkotó zsírsejtek mérete, egyes egyedekben azonban a kondíciócsoportra jellemző átlagnál nagyobb, vagy annál kisebb átlagos zsírsejtméret volt jellemző, ami valószínűsíti a hiperpláziás, illetve hipertrófiás típusú obezitás megjelenését kutyában is.

Munkánk második részében a leptin és az inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF1), mint a tápláltsági állapotot tükröző faktorok szaporodásbiológiai működésben játszott szerepét vizsgáltuk szukákban és kanokban. Annak ellenére, hogy a leptin kifejeződését kimutattuk a petefészek egyes sejtjeiben, az ivari ciklusstádium és a szérumban progeszteronszint szérumban leptinszint alakulására kifejtett hatását nem tudtuk igazolni. Elsőként vizsgáltuk az IGF1 és receptorának génexpresszióját, valamint fehérje-szintű megjelenését a petefészken, vemhes és nem-vemhes állatokból származó sárgatesteken, illetve ezen fehérjék celluláris lokalizációját a preovulációs folliculusokban. Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy az IGF1 kutyában para-, vagy autokrin úton hatással lehet a preovulációs folliculusok granulosa és theca sejtjeire, stimulálhatja azok proliferációját és szteroidtermelését. Kimutattuk, hogy az IGF1 és annak receptora a korai luteális fázisban, tehát a fejlődő, még erős gonadotropin függőséget nem mutató sárgatestben expresszálódik legerősebben, ezzel is erősítve azt az elméletet, miszerint a sárgatest fejlődését, kezdeti növekedését és progeszterontermelését leginkább a helyileg termelődő, parakrin/autokrin faktorok

befolyásolják, mint például az IGF1. Az IGF1 csökkenő expressziója a luteális fázis későbbi időszakában az IGF1 csökkenő jelentőségű szerepére utal.

A leptin és az IGF1 megjelenését és lehetséges szerepét egészséges juvenilis és ivarérett kutyákból származó, valamint deslorelin tartalmú implantátummal kezelt, infertilis állapotot modellező állatok heréjében és mellékheréjében is vizsgáltuk. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a leptin és az IGF1 rendszerek kor, illetve fejlődési stádium függvényében változó szerepet játszanak a herék működésében kutya fajban is. A leptin és IGF1 gének magasabb fokú expressziója és/vagy a fehérjék nagyobb arányú megjelenése az éretlen here egyes sejtípusain, ezen hormonok szerepét jelzi a gonociták, valamint a Sertoli- vagy Leydig sejtek érésében, proliferációjában. Ivarérett állatokban a leptin szerepet játszhat a spermatociták és a spermatidák érése és differenciációja során, míg az IGF1 esetében annak a spermatogóniumok proliferációjának, valamint a Leydig sejtek szteroidogenezisének irányításában játszott szerepét valószínűsíthetjük. A mellékhere vizsgálata során ivarérett állatokban, legerősebb fokban a testi régióban mutatkozott leptin expresszió, ami a csatornácskák hámjának régióként eltérő szerepét veti fel. Prepubertális, illetve deslorelinnel kezelt állatok esetében a mellékhere egyik régiójában sem tudtunk leptin expressziót kimutatni, ami alapján a leptin tesztoszteronfüggő, vagy a spermatozoák jelenléte által regulált szerepét valószínűsítjük a mellékhere csatornácskák hámjának működésében.

2. Bevezetés és célkitűzések

A napjainkra népbetegséggé váló elhízás és a következményes metabolikus zavarok, valamint az ehhez társuló, reprodukzív működést is érintő problémák gyakorisága nagy lendületet adott az anyagcserefolyamatokban fontos hormonok és mediátorok, így például a leptin (Lep), az inzulin, vagy az inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF1) szaporodásbiológiai szerepét elemző kutatásoknak. A humán vizsgálatok, valamint az állatkísérletekben leggyakrabban alkalmazott fajok, az egér és patkány mellett, szarvasmarhában, juhokban, melyek esetében a szaporodásbiológiai mutatók javítása elsődleges cél, széles körben vizsgálták a legfontosabb metabolikus paraméterek szaporodásbiológiai hatásait. Napjainkban egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek az elhízás következtében létrejövő metabolikus problémák mielőbbi diagnosztizálására, illetve megelőzésére társállatok esetében is. Ezek mellett a számos genetikai és élettani hasonlóság miatt igen elterjedten használják a kutyát, mint modellállatot, a területen végzett humán kutatások során. Annak ellenére, hogy az elhízás egyre növekvő problémaként jelentkezik társállatként tartott kutyák és macskák körében, tükrözve a humán populációban megfigyelhető tendenciát, a tápláltsági faktorokról, köztük is a legfontosabbnak számító leptin kondícióval kapcsolatos összefüggéséről és szaporodásbiológiai hatásairól kevesebbet tudunk, mint a többi állatfaj esetében. Munkánk egyik céljaként határoztuk meg, hogy kutya fajban is megkezdjük a legfontosabb, a tápláltsági állapottal, anyagcserével összefüggő biomarkerek vizsgálatát, melyek más fajokban végzett vizsgálatok alapján többrétű hatást fejthetnek ki a szaporodásbiológiai működésre.

A humán vizsgálatok áttekintése alapján, a kondíciómeghatározás részeként vizsgálandó paraméterek köre sokkal szélesebbnek mutatkozott, mint az állatorvosi vonalon, a mindennapi gyakorlatban használt mutatók. Ezek alapján elsőként, a kutyában még nem vizsgált, a kondíciót jellemző paraméterek vizsgálatát tűztük ki célul. Szuka kutyák esetében vizsgáltuk a **morfometriai és bioimpedancia mérések alkalmazhatóságát, valamint a mérések alapján meghatározott testzsírszázalék és a szérum leptinkoncentráció összefüggését (3.3. fejezet)**. A humán vizsgálatokat követve kutyában is nagy jelentőségű lehet az elhízás típusainak, tehát regionalitásának részletesebb vizsgálata, a szubkután, valamint a viszcerális zsírszövet eloszlásának detektálását célzó módszerek fejlesztése. Ennek keretében vizsgáltuk a **testzsíreloszlás alapján elkülöníthető elhízástípusok megjelenését kutya fajban. Célul tűztük ki egy, a zsírszövet megoszlásának meghatározására kutyában is alkalmas módszer kidolgozását, valamint vizsgálatuk az állatra jellemző zsírszöveti regionalitás hatását a szérum leptinszint alakulására és az inzulinérzékenység változására (3.4.)**. Mivel a zsírszövet eloszlása mellett a zsírdepókat alkotó sejtek száma és morfológiája is alapvetően befolyásolhatja a zsírszövet metabolikus

aktivitását, ezért a kutya fajban még ismeretlen paraméterként vizsgáltuk **az egyes zsírdépkat alkotó zsírs sejtek méretének alakulását (3.5).**

Munkánk második részében vizsgáltuk a leptin és az IGF1, mint a tápláltsági állapotot tükröző, emellett a reprodukív szervek helyi (autokrin/parakrin) szabályzó folyamataiban is fontos szerepet játszó hormonok **szaporodásbiológiai működésben játszott szerepét szukákban és kanokban.** A leptin a táplálékfelvétel egyik fő szabályzó faktora, aminek vérszintjét első sorban a zsírraktárak telítettségi foka határozza meg, ennél fogva a kondíció meghatározására is alkalmas biomarker. A szervezet tápláltsági állapota több ponton is befolyásolja a szaporodásbiológiai funkciókat mindkét nem esetében. A tápláltsági állapot szaporodásbiológiai folyamatokra kifejtett hatásának egyik legfontosabb hírvívő molekulája a leptin. Szerepének pontos megismerését ugyanakkor nehezíti, hogy a zsírszövet mellett számos más szerv és szövet, köztük a nemi szervek sejtjei is termelik ezt a fehérjét, illetve a receptorát is kifejezik. Ebből adódóan a keringésben jellemző leptin mennyiség hatása mellett a periférián képződő leptin auto- vagy parakrin hatását is valószínűsítik. A leptin kutya fajban jellemző szaporodásbiológiai szerepének tisztása céljából, **saját vizsgálat alapján írtuk le a leptin és a leptin receptor sejtszintű lokalizációját kutyából származó petefészekben (4.3).** Emellett vizsgáltuk **a szuka ivari ciklusához köthető hormonális változások és a kondíció szérumban leptinkoncentrációra kifejtett együttes hatását (4.4).**

A keringésben jelenlévő, a növekedési hormon (GH) leginkább a májban termelődő effektor molekulájaként megjelenő IGF1 szintje a tápláltsági állapot rövidtávú változásainak potenciális biomarkere, ugyanakkor vérszintje jelentősen különbözhet a kutyák testméretének függvényében. A GH/IGF1 tengely mellett az IGF1 a leptinhez hasonlóan a periférián, a különböző szövetekben, például az emlőszövetben helyileg termelődve, majd a véráramba jutva, szisztémás hormonszint-változást és a test egészét érintő hatásokat idézhet elő. A petefészekben termelődve pedig auto-/parakrin úton is képes lehet befolyásolni a follikulusok érését vagy a sárgatestfunkciót. Ezek a folyamatok kutya esetében még kevésbé feltárt területek, ezért elsőként vizsgáltuk **az IGF1 és az IGF1R génexpresszióját és fehérje-szintű megjelenését a petefészekben, vemhes és nemvemhes állatokból származó sárgatestekben, illetve ezen fehérjék sejten belüli lokalizációját a preovulációs follikulusokban (4.5).** Az anyagcsere egyes szabályzó molekulái, köztük a szukákban vizsgált leptin és IGF1 is várhatóan több ponton képesek bekapcsolódni a nemi működés szabályozásába kanokban is, ugyanakkor ezek befolyásoló szerepét máig kevésbé tartják tisztázottnak. Munkánk során vizsgáltuk **a leptin és az inzulinszerű növekedési faktor-1 megjelenését és lehetséges szerepét egészséges juvenilis és ivarérett kutyákból származó hereszövetekben (5.3).** Ezt követően intakt kanok és deslorelin tartalmú implantátummal kezelt, infertilis állapotot modellező

állatok heréjében és mellékheréjében vizsgáltuk a leptin, a leptin receptor, az IGF1, valamint az IGF1 receptor expressziójának alakulását (5.4.).

3. A kondíció és a tápláltsági állapotot jellemző endokrin tényezők vizsgálata kutyában

3.1. Irodalmi áttekintés

3.1.1. A kondíció meghatározásának lehetőségei kutya fajban

A kondíciót meghatározó tényezők és ezek mérési lehetőségeinek köre is jelentősen kitágult az utóbbi évtizedekben főleg humán vonalon, leginkább a túlsúlyos emberek növekvő aránya és az elhízás jelentőségének egyre mélyülő ismeretei nyomán. Az elhízás egyre növekvő problémaként jelentkezik társállatként tartott kutyák és macskák körében is. Előfordulásának változása tükrözi az emberek esetében megfigyelhető tendenciát, különösen az Egyesült Államokban és Nyugat-Európa területén (German, 2006).

Kutyák esetében a vártnál nagyobb nehézséget jelenthet a kondíció, illetve az elhízás mértékének megítélése, a tápláltság pontos mérésére alkalmas, gyakorlatias módszer kiválasztása. Az elhízás meghatározásának alapja a testösszetétel vizsgálata, tehát a testsírmennyiség, valamint a zsírtmentes testtömeg mérése (German, 2006). Bár számos, humán vizsgálatokban használt, leginkább a normál testtömeggel történő összehasonlításra alapozott módszer ismert, ezek nem adaptálhatóak a kisállatpraxisra, különösen a kutya fajra jellemző hatalmas diverzitás és a fajtastandardok tág határértékei miatt. A testsírmennyiség becslésére alkalmas paraméterek közül a testsúlymérés, a szubjektív bírálaton alapuló, kondíció meghatározásra alkalmas módszerek, mint a Body Condition Score System (BCSs), valamint a mérőszalag segítségével végezhető objektívebb morfometriás mérések használata terjedt el mind a klinikai vizsgálatok során, mind a kutatásban. Az utóbbi két módszer a különböző fajtájú egyedek esetében is jól alkalmazható. (Burkholder és Toll, 2000; Edney és Smith, 1986; German et al., 2010a; Laflamme, 1997; Mawby et al., 2004; Stone et al., 2009).

A **testsúly**, mint legegyszerűbben mérhető paraméter, mérsékelten összefügg a testsír mennyiségével, így ennek rendszeres mérése alkalmas lehet a kondíció változásának detektálására. Fajtatiszta állatok esetében rendelkezésre állnak fajtastandardok, melyek a segítenek meghatározni az ideális testsúlyt. **Relatív testsúly**ként megadható az állat testsúlya az ideális testsúly százalékaként. Az irodalom nem egységes abban a tekintetben, hogy pontosan milyen érték fölött detektálható obezitás. Egyes vizsgálatokban 115%, másokban csak 140% fölött beszélünk klinikai tüneteiben megnyilvánuló elhízásról (Burkholder és Toll, 2000). Választható, elfogadott módszer a kondícióbecslésen alapuló

rendszerek alkalmazása. A **BCSs** egy egyszerűen használható rutin vizsgálat, amely szemikvantitatív mérést biztosít. Lényege, hogy tapasztalt megfigyelők előre meghatározott szempontok szerint, megtekintés és gyorsan elvégezhető fizikális vizsgálat után, leggyakrabban 5 vagy 9 pontos skálán értékelik az állat tápláltsági állapotát (Edney és Smith, 1986; Laflamme, 1997). A módszer használhatóságának elemzésére lineáris regresszióval határozták meg az összefüggést a testzsírszázalék és a BCSs között, illetve vizsgálták a fajta és a nem hatását erre a kapcsolatra. A BCSs szerinti besorolás erős korrelációt mutatott a testzsírszázalékkal és a módszer megbízhatósága nem különbözött az egyes fajták esetében, ugyanakkor szuka kutyáknál magasabb testzsírszázalék tartozott egy bizonyos BCS kategóriához, mint a kanok esetében (Laflamme, 1997). Az öt pontos skálát tekintve 80, 90, 100, 110 és 120% relatív testsúlytól számítjuk az egyes kategóriákat. A testösszetétel fontos információt adhat az állat fizikai állapotáról, valamint metabolikus státuszáról, így a kondíció értékelésekor a zsírmentes testtömeg és a testzsír arányát, vagyis a testzsírszázalékot próbáljuk megbecsülni. Optimálisnak tekintjük a 15-25% testzsírmennyiséget mind kutyák, mind macskák esetében, tehát a BCS3 kategóriába eső állatoknál, hozzávetőleg 20% testzsírt várunk, ami kategóriánként 10%-kal változik (Burkholder és Toll, 2000). Egyes **morfometriai mérésekből** számolható értékek szintén összefüggést mutatnak a testzsír mennyiségével. Kutya esetében álló helyzetben mérhető paraméterek a medence körméret (PC) és a térd-csánk távolság (HS). Ezt a két távolságot használva, a **1. ábrán** látható képlet szerint számítható a testzsírszázalék (BF%). Ez a módszer brachycephal és dolichocephal kutyák esetében pontatlanabb eredményeket ad (Burkholder és Toll, 2000; Mawby et al., 2004).

$$\begin{aligned} \text{BF}\%_{\text{kan}} &= -1,4 \times \text{HS}_{(\text{cm})} + 0,77 \times \text{PC}_{(\text{cm})} + 4 \\ \text{BF}\%_{\text{szuka}} &= -1,7 \times \text{HS}_{(\text{cm})} + 0,93 \times \text{PC}_{(\text{cm})} + 5 \end{aligned}$$

1. ábra Testzsírszázalék (BF%) meghatározás morfometriai mérések alapján
PC medencekörméret (cm), HS térd csánk távolság (cm)(tuber calacanei-től a patella egyenes szalagjáig).

A kondíció, illetve a testzsírmennyiség meghatározásának legpontosabb, inkább a kísérletei körülmények között alkalmazható eszközei a DEXA valamint a nehézvíz hígítós módszer. A **DEXA** (Dual energy X-ray absorptiometry) egy régóta használt röntgenalapú módszer, mely a mineralizált csontok összetételének mérése mellett, a testzsírmennyiség és a zsírmentes testtömeg meghatározására is alkalmas. Bár kísérleti körülmények között rágcslók és sertés mellett, kutyák és macskák esetében is sikeresen alkalmazott technika, amellet hogy drága, mindennapos használata a kisállatpraxisban nyilvánvalóan nem megoldható (Son et al., 1998). Utóbbihoz hasonlóan, szintén inkább kutatási vonalon

használatos a nehézvíz hígítási módszer, mely a test folyadéktartalmának meghatározásán alapszik (Burkholder és Thatcher, 1998). Átmenetet jelenthet a kutatásokban használt, illetve a klinikumban is alkalmazható kondíciómérésre alkalmas módszerek között a **bioelektromos impedancia** vagy bioimpedancia mérés (Ban et al., 2012, Stone et al., 2009), ami a szövetek különböző víztartalmából adódó eltérő áramvezető képességén alapuló gyors, nem invazív módszer. A mérés alapja a szervezetben található zsírmennyiség nagyobb elektromos ellenállása, mely a zsírszövet mennyiségének függvényében lassítja az áram haladását a használt elektródok között. Bár pontosságáról megoszlanak a vélemények, ma már létezik kifejezetten kutya fajra kifejlesztett, a testfelszínre helyezhető elektródokkal ellátott, kézi készülék (Healthlab Body Fat Analyzer IBF-D02, Kao Corp, Tokyo, Japan), mely a fejlesztése során összegyűjtött adatok alapján megadja a mért ellenállásértékhez tartozó zsírmennyiséget, és testzsírszázalék-értékként mutatja az eredményt (Ban et al., 2012; German et al., 2010a; Stone et al., 2009). Ez a módszer meglehetősen új, ezért még igen kevés az állatorvosi klinikai felhasználásról szóló szakirodalom. Az állatorvosi használatra kifejlesztett gép könnyen kezelhető, gyors, viszonylag pontos és alacsony költségű mérést biztosít (Stone et al., 2009). A műszer a tulajdonos számára is értelmezhető adatokat szolgáltató, gyors, praktikus eszközként, vehető igénybe a klinikai munka során, egy-egy állat testzsírmennyiségének mérésére, valamint folyamatos kontrollálására.

Ahogy az korábban említésre került, a testzsír és a zsírimentes testtömeg aránya mellett alapvetően befolyásolja a metabolikus következményeket a zsírszövet eloszlása. Egyes módszerek a testösszetétel mellett, alkalmasak lehetnek az egyes zsírraktárak telítettségi fokának meghatározására is. A humán gyakorlatban, a hasüregben lerakódott zsírmennyiség mérésére a komputer tomográfia (**CT**) vizsgálatot tartják a legalkalmasabbnak, illetve ennek alternatíváiként megbízható **ultrahangos** mérési eljárásokat is kidolgoztak (Hirooka et al., 2005; Ribeiro-Filho et al., 2003). Kutyák esetében a lumbális 3. és 5. csigolya magasságában készített CT felvételek elemzése bizonyult a testzsírmennyiség elemzése céljára alkalmas módszernek (Ishioka et al., 2005a), emellett a hasi zsíreloszlás és a teljes testösszetétel mérése is megvalósítható ezzel a vizsgálóeszközzel (Purushothaman et al., 2013).

Rutin módszerként használható, mégis kvantitatív markere lehet a tápláltsági állapotnak a zsírszövet által termelt **leptin** plazmában mérhető szintje, ami pozitívan, szorosan korrelál a testzsír mennyiségével (Ishioka et al., 2002a; Ishioka et al., 2007). Mint a testzsír raktárak telítettségének endokrin mutatója, vérben mérhető szintje kutyában is szoros összefüggést mutat az egyed kondíciójával (BCSs; Ishioka et al., 2007), ugyanakkor a morfológiai mérések, illetve a bioimpedancia mérés alapján meghatározott testzsírszázalék és a szérumban leptinkoncentráció közötti összefüggésről kutya fajban vizsgálatunkig nem számoltak be.

Ishioka és munkatársai 166 normál és elhízott kutyában vizsgálták a kor, a nem és a fajta hatását a plazma leptinszintjére. Azt mutatták ki, hogy az utóbbi megbízható mutatója a kutyák elhízásának, függetlenül kortól, nemtől és fajtától. A vizsgálatot kutyára validált ELISA módszerrel végezték. Korábban bizonyították, hogy az így mért leptinszint erős pozitív korrelációt mutat a deutériumoxid hígítási módszerrel kapott eredménnyel. A mintavételnél figyelembe vették azt a korábbi kísérleti eredményt, amely szerint a leptinszint emelkedik a táplálékfelvételt követő 2-10 órában, illetve változik inzulin és glükokortikoid kezelést követően is (Ishioka et al., 2002b; Ishioka et al., 2005b). Az egyes BCSs kategóriákon belül, a leptinszint nem különbözött a kanok és a szukák esetében, emellett az ivartalanításnak sem volt kimutatható hatása a leptinszintre (Ishioka et al., 2007; Sagawa et al., 2002). Ugyanakkor a paraméter alkalmazását bizonytalanná teszi, hogy más szerzők leírták a leptinszint változását a nem, valamint az ivari ciklus függvényében (Salari et al., 2003). Az egyes fajták képviselőinek leptinszintje megegyezett az adott BCS átlagával kivéve, a skóttjuhász fajta egyedeiben, melyek esetében minden BCS kategóriában magasabb, míg a tacsoknál alacsonyabb értékeket mutattak ki. A kondíció jellemzésére is alkalmas leptinszint alakulása követi a többi tápláltságot is jellemző marker változását, így elhízott kutyában jelentősen nő a szérumban leptinkoncentráció, ezzel párhuzamosan pedig szignifikánsan csökken a plazma ghrelinkoncentrációja, míg a koleszterin és triglicerid (TG) mennyisége emelkedik a vérben (Jeusette et al., 2005a). Ennek ellentmondóan, mások nem tudtak szignifikáns korrelációt kimutatni a TG-, a koleszterin-, a glükóz- vagy a nem észterifikált zsírsav (NEFA) -szint és a testzsírmennyiség között (Sagawa et al., 2002).

3.1.2. A tápláltsági állapot endokrin háttere kutyában: leptin, inzulin, IGF1

Számos endokrin marker közül leginkább a táplálékfelvétel rövid- és hosszútávú szabályozásában résztvevő faktorokkal, valamint a zsírszövet által termelt adipokinekkal kapcsolatban merül fel, hogy a tápláltsági állapot, illetve az ahhoz köthető metabolikus állapot jellemzésére is alkalmasak lehetnek. Ezek közül a leptin, az inzulin, valamint az IGF1 szerepét tárgyaljuk részletesen.

A **leptin** molekula felfedezése nem csak az addig passzív raktárként elkönyvelt zsírszövet jelentőségének megítélését írta felül, de új irányt adott a kutatásoknak azzal, hogy rámutatott egy feltérképezésre váró kapcsolati mátrix meglétére a genetikai és hormonális tényezők, a tápláltsági és metabolikus állapotot jelző zsírszövetmennyiség és -eloszlás, illetve számos élettani és patológias folyamat között. A leptin egy fehérje molekula, amit elsősorban a zsírszövet termel és a táplálékfelvétel szabályozásának, valamint a szervezet energiaegyensúlyának kulcs faktora. Elhízott egértörzsek vizsgálatával két gént is azonosítottak, a leptin expresszióját meghatározó *ob* gént, és a diabetes (*db*) gént, melyek mutációja

homozigóta formában felelős lehet az extrém mértékű elhízás kialakulásáért (Coleman 1978; Friedman és Leibel 1992). Friedman kutatócsoportja 1994-ben klónozással azonosította az ob gén által kódolt, 167 aminosavból álló leptint (Zhang, Y et al., 1994). A két mutáns allélt (ob/ob) hordozó, így leptinhiányos egértörzsek egyedei már fiatal korban elhíznak, infertilisek, élettartamuk lerövidül. A hormon pótlását követően az endokrin- és reprodukciós státusz jelentős javulását, illetve a táplálékfelvétel és a testsúly csökkenését figyelték meg, ami közvetlen bizonyítéka a leptinhiány döntő szerepének ob/ob egerekben (Halaas et al., 1995, Pelleymounter et al., 1995). Később a hasonlóan elhízott fenotípust előidéző db gén klónozásával megtalálták a leptin receptorát is, melyet a citokin receptorok családjába soroltak (Tartaglia et al., 1995). A db génről átírt mRNS alternatív hasítása folytán több receptor izoforma is létrejöhet, melyek extracelluláris, ligandkötő doménje megegyezik, míg C-terminális szakaszuk különbözik (Chen et al., 1996; Lee et al., 1996; Li et al., 1998; Wang et al., 1996). A leptin receptor jelenlétét szinte valamennyi vizsgált szövetben igazolták, így az agyban, a bélben, a vesében, a májban, a tüdőben és az ivarszervekben is (Schulz és Widmaier 2007). Míg a rövid receptor típusok elsősorban a perifériás szövetekben expresszálódnak legnagyobb mértékben, addig ezekben a szervekben mindössze 3-5%-ban jelenik meg a hosszú receptor forma (Ob-Rb), ezzel szemben a hipotalamusz területén 30-40%-ban ez a típus mutatható ki, jelezve, hogy döntő szerepet játszik a táplálékfelvételt, étvágyat és az energiaegyensúlyt befolyásoló neuropeptidok és neurotranszmitterek termelésének szabályozásában (Bjørbaek et al., 1997; Ghilardi et al., 1996). A rövidebb, Ob-Ra izoforma is nagy mennyiségben expresszálódik az agy chorioid plexusában és a hajszálerekben, ahol szerepét a leptin vér-agy gáton való átjutásában valószínűsítik (Bjørbaek et al., 1998; Hileman et al., 2000). Az Ob-Rb variáns rendelkezik a leghosszabb intracelluláris szakasszal, és csak ez a teljes hosszúságú változat tartalmazza az összes jelátviteli szempontjából fontos régiót, mely a fő JAK2-STAT3 (Janus kináz-szignál transzducer és transzkripció aktivátor) jelátviteli utat aktiválni képes (Ghilardi et al., 1996). A leptin által beindított jelátviteli út mellett más molekulákon keresztül is megvalósulhat, mint a MAPK (mitózis aktiváló protein kináz) és az IRS (inzulin receptor szubsztrát). Utóbbiak aktiválódhatnak receptor-asszociált JAK segítségével, illetve közvetlenül a rövid leptin receptor izoformákon keresztül is (Bjørbaek et al., 1997, Hegyi et al., 2004). Az Ob-Re transzmembrán és citoplazmatikus rész hiányában, szolubilis receptorként befolyásolja a biológiailag aktív, szabad leptin szintjét a vérben (Li et al., 1998), utóbbi jelenlétét azonban csak patkányban igazolták.

Napjainkra több fajban is ismertté vált a leptin molekula szerkezete és élettani jelentősége (Friedman és Halaas, 1998). Kutyanban egy japán kutatócsoport sikeresen klónozte és szekvenálta a leptint kódoló cDNS-t, melynek nukleotid sorrendje 82-92%-ban, a leptin

fehérje aminosav sorrendje pedig 76-88%-ban bizonyult azonosnak más fajkéval (Iwase et al., 2000a). A szérumban leptinkoncentráció fajspecifikus meghatározására alkalmas szendvics ELISA teszt kifejlesztése lehetővé tette a leptin élettani és kórtani szerepének vizsgálatát kutya fajban is (Iwase et al., 2000b). Hasonlóan más fajokhoz, a szérumban leptinkoncentráció kutyában is szoros összefüggést mutatott a test zsírraktárainak telítettségével, függetlenül az egyedek korától, nemétől és attól, hogy ivartalanítva voltak-e (Ishioka et al., 2007; Ishioka et al., 2002a; Sagawa et al., 2002). Elhízott állatok esetében a leptin szérumszintje 5-6 szorosára is lehet a normál kondíciójú egyedekben mért értéknek (Ishioka et al., 2007; Jeusette et al., 2005b). Alacsony energiatartalmú étrend etetésekor azonban már a testsúlycsökkenés megindulása előtt 25%-os leptinkoncentráció csökkenés mérhető, amit a testösszetétel változásával magyaráznak, illetve feltételezik a takarmány-összetétel közvetlen hatását is (Jeusette et al., 2005b). Az azonos kondíciójú állatok szérumban leptinkoncentrációi esetében azonban jelentős egyedi eltérések is előfordulhatnak, ami mögött más befolyásoló tényezők hatása (a vérvétel, vagy az etetés időpontja, gyógyszeres kezelés stb.) állhat (Ishioka et al., 2005b; Nishii et al., 2006). Bár az adott kondíciócsoportra jellemző leptin koncentráció általában független az állat fajtájától, bizonyos fajták ez alól kivételt képeznek, mint például a törpetacskó, ahol alacsonyabb, vagy a shetlandi juhászkutya, ahol magasabb leptin koncentrációk voltak mérhetőek (Ishioka et al., 2007).

Több fajban is igazolták, hogy elsődlegesen a zsírsejtekben termelődő faktorként, a leptin vérszintje szorosan korrelál a zsírraktárak telítettségének fokával (Maffei et al., 1995), így az a központi idegrendszer felé közvetített, úgynevezett hosszútávú jelzés formájában befolyásolja a táplálékfelvételt, illetve egyes anyagcsere folyamatokat, valamint ezeken keresztül az egész szervezet energia egyensúlyát. A rágcsálómodellben megismert, elhízást okozó rendellenességek, mint a leptin vagy receptorának hiánya helyett, elhízott társállatainkban, az emberekhez hasonlóan emelkedett szérumban leptinszint mellett leptinrezisztenciát valószínűsítene, ami a hipotalamikusan neuronok leptinre adott válaszkészségének, vagy a leptin vér-agyagátón történő átjutásának defektusa miatt alakulhat ki (Wynne et al., 2005). Amellett, hogy a leptin elsődleges élettani szerepét a táplálékfelvétel, valamint a zsír szöveti raktározásának regulációjában tölti be, illetve segíti az inzulin szignált, amin keresztül serkenti a sejtek glükózfelvételét, valamint gátolja a zsírerakódást a perifériás szövetekben (Park et al., 2008), számos más szervfunkcióra, így az immunrendszer, a csontrendszer működésére, a kardiovaszkuláris, légzőszervi, a kiválasztó szervek, valamint a reproduktív szervek működésére kifejtett hatásával is számolni kell (Pérez-Pérez et al., 2017; Poetsch et al., 2020; Chen és Yang 2015; Malli et al., 2010; Wolf et al., 2002; Smith et al., 2002). Mindezek alapján érthető, hogy a zsírraktárak telítődésével párhuzamosan emelkedő leptinszint jelentőségét a legtöbb elhízáshoz köthető következményes betegség patogenezisében hangsúlyozzák. Ezekben a folyamatokban, a központi leptinrezisztencia

mellett, emelkedő szérumban leptinszint, valamint a leptin önálló proinflammatorikus hatása is szerepet játszhat (Lord, 2006). A telítődő zsírraktárak növekvő leptinprodukcója mellett, az egyre nagyobb zsírsejtek megváltozott adipokinprodukcója (nő a proinflammatorikus adipokinek, gyulladáscsökkentő citokinek produkciója, illetve csökken az antiinflammatorikus hatású adipokinek, mint például az adiponektin vérszintje), valamint az egyre nagyobb számban megjelenő szöveti makrofágok gyulladáscsökkentő citokin termelése, egy a zsírszövetben hosszan fennálló, low grade gyulladásként kihatással lehet a legtöbb szerv funkciójára (Lee és Pratley 2005). Bár az elhízás, valamint a magas leptinszint hasonló szerepét társállatainkban még csak egyes esetekben igazolták, az emberekhez hasonlóan, kutyákban is valószínűsíthetjük, hogy az elhízás hajlamosító vagy súlyosbító tényezőként játszik szerepet egyes társult betegségek kialakulásában. Így szerepével számolni kell az osteoarthritis, egyes légzőszervi- vagy kardiovaszkuláris betegségek, vesefunkciót érintő, vagy metabolikus rendellenességek hátterében (Impellizzeri et al., 2000; Bach, et al., 2007; German et al., 2009; Tvarijonaviciute et al., 2012; Tvarijonaviciute et al., 2013).

Az **inzulin**, mint az egyedüli vércukorszintet csökkenteni képes hormon, a glükóz homeosztázis legfontosabb szereplője. Vérszintje, pontosabban a megfelelő vércukorszint fenntartásához szükséges inzulin mennyisége, összefüggést mutat a sejtekkel, és ezen keresztül a szervezetet jellemző inzulinérzékenységgel, valamint a zsírraktárak telítettségi fokával. Az inzulinérzékenység csökkenése, vagyis az inzulinrezisztencia, az inzulin a sejtek glükózfelvételét, metabolizmusát és raktározását serkentő hatásának csökkenését jelenti, ami túlsúlyos vagy elhízott emberekhez hasonlóan, kutyákban és macskákban is jellemző (Smith, 1996; Hoenig et al., 2007; Verkest et al., 2011b). Az inzulinrezisztencia, mint az elhízáshoz köthető egyik legfontosabb következményes metabolikus rendellenesség hátterében leginkább az inzulinreceptorok posztreceptorális defektusa sejthető (Kruszynska és Olefsky 1996), illetve nem zárható ki a megemelkedett NEFA és TNF α vérszintek kóroktani szerepe sem (Hsueh és Buchanan 1994). Gayet és mtsai szerint a 7 hónapon keresztül túletetett kutyák esetében, azok 43 \pm 5%-os testtömeggyarapodása mellett a NEFA és TNF α vérszintek progresszív emelkedése detektálható az inzulinszenzitivitás jelentős csökkenésével (44 \pm 5%) párhuzamosan. A vizsgált egyedekben a hízás folyamán csökkent a sejtek inzulinmediált glükózfelvétele, emellett emelkedett posztprandiális inzulinszint (Gayet et al., 2004). Mindezek mellett az emelkedett IGF1 vérkoncentráció is szerepet játszhat az inzulinszekréció gátlásában, így az inzulinrezisztencia (IR) kialakulásában (Guler et al., 1990; Kolaczynski és Caro 1994). Inzulinrezisztencia esetén, nem teljesen tisztázott kompenzációs folyamatok eredményeként több inzulin termelődik, ami egy ideig képes élettani szinten tartani a vércukorszintet (Verkest et al., 2011b). Ki kell emelni, hogy a hízás következtében kialakuló szénhidrát anyagcserében megfigyelhető eltérések különbözően

alakulnak kutyák és macskák esetében. Kutyákban az elhízás indukálta inzulinrezisztencia esetén beinduló kompenzáló mechanizmusok, melyek több inzulin termelődéséhez vezetnek, nagyon hatékonyan működnek. A kompenzációs hiperinzulinémia kialakulásának háttérében a magasabb leptinszint szerepét valószínűsítik (Verkest et al., 2011a). Attól a ponttól, amikor a fokozott inzulin szekréció már nem képes kompenzálni az elhízás által indukált inzulinrezisztenciát, kettes típusú cukorbetegség alakul ki (Polonsky 1999). Annak ellenére, hogy az elhízás által előidézett inzulinrezisztencia mind macskában, mind kutyában ismert, az inzulinszekréció következményes elégtelensége csak macskában jellemző (Appleton et al., 2001; Rand et al., 2004). Kutyáknál hiányoznak az elhízás indukálta IR mellett kialakuló inzulinszekréciót érintő elégtelenséget leíró eredmények (Verkest et al., 2011b). Míg az alap vércukorszint nem különbözik az elhízott és a fiziológiás kondíciójú egyedek esetében, ugyanakkor elhízás esetén mind az éhomi, mind a glükózfelvételt követő „first phase” inzulin válasz magasabb. Elhízott macskákban ezzel szemben gyakoribb a glükóz intolerancia, vagyis az epizódikusan alapértéket meghaladó vércukorszintek. Kövér macskákkal ellentétben, melyekben glükóz intolerancia, valamint az inzulin felszabadulás első fázisának csökkent volta vagy hiánya jellemző (Hoenig et al., 2002), elhízott kutyák esetében az intravénás glükóz adagolás hatására meginduló úgynevezett „first-phase” inzulin szekréció nem csökken, még évekkal az elhízás kialakulása után is fokozott, közel kétszeres értéket ér el (Verkest et al., 2011b). Az úgynevezett diszpozíciós index, ami azt méri, hogy a first-phase inzulin válasz milyen mértékben képes kompenzálni az inzulinérzékenység változását, nem csökken. Hatból öt egyedben az elhízás indukálta inzulinrezisztencia hatékony kompenzáló mechanizmusai működnek, ami azt jelenti, hogy glükóztolerancia és inzulinrezisztencia mellett az inzulin szekréció folyamata nem károsodik, ezáltal a vércukorszint a beadás után két órával, már fiziológiás határértékek közé csökken. Emberben és macskában is jellemző, hogy az inzulinrezisztencia következtében, valamilyen fajspecifikus folyamat (pl. amiloid lerakódás, lipotoxikózis) következtében létrejövő béta sejt károsodás nagyon nagy arányban vezet cukorbetegség kialakulásához. Kutyák esetében ezzel szemben a béta-sejtek szekréciós kapacitása nő. Egyes feltételezések szerint ebben az esetben szintén fajspecifikus, ugyanakkor védő hatású mechanizmusok, pl. magas leptinszint, alacsony adiponektinszint állhatnak a háttérben (Verkest et al., 2011b).

Gayet kutatócsoportjának vizsgálata szerint a túletetéssel elhízott kutyákban, a megfigyelt súlygyarapodással, valamint a posztprandiális inzulinkoncentráció emelkedésével párhuzamosan az **IGF1** szérumkoncentrációk is magasabbak (Gayet et al., 2004). Az IGF1 egy 70 aminosavból álló polipeptid hormon, mely nevét onnan kapta, hogy nagyfokú homológiát mutat a proinzulinnal, ami bizonyos mértékű átfedést jelent a jelátviteli utakban is (Rinderknecht és Humbel 1978). Az IGF1-szintézist elsődlegesen a táplálékfelvétel és a

növekedési hormon stimulálja a májban és más szövetekben. A keringő IGF1 kétharmada növekedési hormon hatására a májban termelődik, majd endokrin, parakrin és autokrin úton is közvetíti annak anabolikus hatásait. Emellett mitogenikus, valamint inzulinszerű metabolikus aktivitással is rendelkezik, azaz képes stimulálni a zsírsejtek és az izom glükózfelvételét. A májon kívül sok más szövet is képes IGF1 termelésre részben a GH parakrin/autokrin hatására, ugyanakkor expresszióját más hormonok is képesek befolyásolni, például az ösztrogének, az adrenokortikotrop hormon (ACTH), a tireotropinfelszabadító hormon (TRH), a luteinizáló hormon (LH), vagy a follikulusstimuláló hormon (FSH), az inzulin és más növekedési faktorok is (Laviola et al., 2007). Ezek a faktorok, valamint az életkor, a nem, a tápanyagbevitel változásai és a táplálék összetétele együttesen határozzák meg az IGF1 szérumszintjét és hatását a növekedés és az anyagcsere szabályozásában. Kalóriamegvonás esetén kevesebb IGF1 termelődik, mivel a máj refrakterré válik a GH-stimulációra, ezzel gátoltta válik a növekedés és a fehérjeszintézis. Ehhez hozzájárul, hogy csökkent szénhidrát-fogyasztás esetén a portális vénás inzulinkoncentráció csökkenése az IGF1-szintézisének csökkenését okozza a májban. Az IGF1 negatív visszacsatolás révén, az agyalapi mirigy szomatosztatin termelésének serkentésén keresztül gátolja a GH-szekréción. Mivel a GH önmagában, az IGF1 hatásaitól függetlenül is fontos metabolikus szerepet játszik a lipolízis stimulálásában, valamint az inzulin-jelátvitel gátlásában mind a zsír- mind az izomszövetben, az IGF1 a GH gátlása révén, tehát annak metabolikus hatásainak csökkentésével növeli az inzulinérzékenységet. Emellett az IGF – a GH-produkcióra kifejtett hatásától függetlenül – közvetlenül is képes növelni az inzulinérzékenységet. Az inzulin és az IGF1 egymás hatását kiegészítve azonnali, valamint elnyújtott hatást fejtenek ki az anabolikus folyamatokra. Az inzulin mellett és annak hatását kiegészítve az IGF1 közvetlenül is szabályozza a fehérje-, a szénhidrát- és a zsíryanycserét (Clemmons, 2012). Az IGF1 hatását az IGF1-receptorhoz (IGF1R) kötődve fejtik ki, a receptorhoz történő hozzáférést pedig az IGF-kötő fehérjék (IGF binding protein = IGFBP) mennyisége határozza meg. A proinzulinhoz szerkezetileg hasonló IGF1 az IGF1R mellett képes kötődni az inzulinreceptorokhoz (mind az A-, mind a B-izoformákhoz, valamint a hibrid receptorokhoz (IRA-IGF1R és IRB-IGF1R) is, ezáltal szabályozva a fehérje-, szénhidrát- és zsírmetabolizmust. A hepatociták és az érett adipociták bőségesen tartalmaznak IRB-t. Az inzulinhoz az IGF1-nél 2 nagyságrenddel nagyobb az affinitása az IRB-hez, így e szövetekben az inzulin szerepe meghatározó az anyagcsereben. A preadipociták bőséges IGF1R-rel rendelkeznek, melyekhez az IGF1 affinitása két nagyságrenddel nagyobb, mint az inzuliné; itt az IGF1 közvetíti a preadipocita proliferációt, differenciálódást és túlélést (Dupont és LeRoith 2001; Clemmons, 2012). Felnőtt kutyákban, az IGF1 vérből mérhető koncentrációja erős lineáris korrelációt mutat a testmérettel, annak ellenére, hogy a szérum GH-koncentráció nagyon hasonló szinten mozog a különböző fajták esetében (Meij et al., 2010). Például a közép

uszkárban mérhető plazma IGF1-koncentráció közel hatszorosa a törpe uszkárookban mérhető szintnek. Ennek ellenére nem lehet kimondani, hogy a szérumban IGF1-szint lenne a testméret fő meghatározója, hiszen a szabad és fehérjéhez kötött frakció arányát, valamint az IGF1R expresszió mértékét sem vizsgálták, illetve szemben a növekedéshormon adagolással, az IGF1 pótlása nem fokozza a növekedés ütemét. Ezekkel ellentétben a fiatal állatokban, ezek között is a nagyobbra növő fajtákban magasabb és a növekedési ütemmel összefüggésben tovább marad magas a GH-szintje, míg az IGF1 nem változik, ami arra utalhat, hogy a fiatalkori GH hiperszekréció sokkal inkább meghatározója a testméret alakulásának, mint az IGF1 (Meij et al., 2010). Mindemellett ugyanakkor ki kell emelni, hogy a GH direkt hatása mellett jelentős indirekt hatással is rendelkezik, melyeket nehéz különválasztani, hiszen a GH növekedést elősegítő hatását nemcsak a májban termelt IGF1-n keresztül fejt ki, hanem közvetlenül a különböző szövetekben is stimulálja a helyi IGF1 szekréciót, ahol a GH ezen növekedést elősegítő hatásaival összhangban a GH receptor lokális expressziója is változik (Meij et al., 2010). Az elhízalt kutyák esetében leírt, magasabb posztprandiális inzulinkoncentráció mellett megfigyelt IGF1 szérumban emelkedés ellenére nem mondható ki egyértelműen, hogy a szomatotrop tengely aktivitásának változása oka vagy következménye az elhízásnak (Gayet et al., 2004). Az IGF1-szint inkább következményes emelkedését támaszthatja alá, hogy a zsírraktárak telítődésével párhuzamosan emelkedő leptinszint direkt úton befolyásolja a májban folyó IGF1-szintézist (Nyomba et al., 1999; Luna-Pinto és Cronjé 2000). Emellett mind az IGF1-szintézis, mind pedig a szekréció összefüggésben van a perifériás GH szenzitivitással, ami fokozódik elhízás esetén (Baumann et al., 1994), emellett nő a szabad IGF1 frakció aránya a csökkent mennyiségű IGF1 kötőfehérje miatt. Maga az inzulin is fontos regulátora a máj IGF1 termelésének, valamint szuppresszálja a máj IGF1 kötőfehérje szintézisét. Az IGF1 vérszint tehát összefüggésben van az energiabevittel, valamint a kialakuló IR-val. Mindemellett napjainkban azt is hangsúlyozzák, hogy a májban termelődő IGF1 javítja az inzulinérzékenységet, illetve segíti a glükóz toleranciát és az energiafelhasználást (főleg termogenezis formájában) (Hong et al., 2017).

A tápláltsági állapot változása tehát a többi fajhoz hasonlóan kutya fajban is modulálja az IGF/IGFBP rendszer működését. Míg az egy éjszakán át történő koplalásnak, majd újbóli táplálékfelvételnél nincs hatása az IGF1-, vagy kötőfehérjék koncentrációjára a vérben, addig az energiabevétel hosszabb (2 hetes) 5%-ra, illetve 42,5%-ra történő csökkentésének hatására az IGF1 szérumszint 20,4%-os, illetve 32,7%-os csökkenéséről számoltak be. Ezt követően egy 2 hétig alkalmazott ad libitum etetés hatására az értékek normalizálódásáról is beszámoltak. A kalóriamegvonással és az IGF1 vérszintjének csökkenésével párhuzamosan a IGFBP-2-koncentráció jelentős emelkedését is megfigyelték. Mindezek alapján elmondható, hogy a szérumban IGF1-szint a tápláltsági állapot rövidtávú változásainak

potenciális markere, annak ellenére, hogy vérszintje jelentősen különbözhet a testméret függvényében, tehát az egyes fajták esetében (Maxwell et al., 1998).

A növekedési hormon IGF1 tengely fontos mellékágaként kell kiemelni az emlőszövetet, hiszen az ebben a szövetben zajló időszakos növekedési hormon, valamint IGF1-produkció képes jelentősen befolyásolni ezekben a hormonoknak a vérszintjét. Az emlőszövet hiperplasztikus duktális epitheliumából származó, luteális fázisban jellemző progeszteron-indukált GH-felszabadulás nem pulztilis és független a növekedési hormon-serkentő hormon (GHRH), vagy a szomatosztatin hatásától. A diosztrusz alatt jellemző lokális GH-produkció mellett, az ehhez kapcsolódó GH-receptor-expresszió, valamint a lokális IGF-produkció fokozódása is jellemző, ugyanakkor az emlőszövetben termelődő GH és IGF1 a véráramba jutva szisztémás hormonszint-változást és a test egészét érintő hatásokat idéz elő (Meij et al., 2010). Kutyában medroxiprogészteron-acetáttal (MPA) kísérletesen előidézett hiperprogészteronémia, vagy a fiziológiás diosztrusz során mért magasabb szérumszint mellett közel duplájára emelkedett IGF1-koncentrációról számoltak be, ami az MPA-megvonása, vagy ovariohisterektómia végzése után a GH-koncentráció csökkenésével, valamint a klinikai tünetek (pl.: glükóz-intolerancia) enyhülésével párhuzamosan élettani szintre esett vissza (Maxwell et al., 1998).

3.1.3. A testzsíreloszlás és a zsírdepókat alkotó zsírsejtek méretének jelentősége

A humán orvoslásban folytatott kutatások során élesen elkülönítik a „férfias”, android-típusú, centrális/abdominális/viszcerális elhízást, és a „nőies”, főleg az alsóbb testrészeket, a femorális és gluteális tájékat érintő perifériás elhízást, illetve kiemelik a típusok eltérő szerepét a társult betegségek kialakulásában és a prognózis megítélésében (Vague, 1956). Emellett különbségeket tesznek az alapján, hogy az adott zsírdepót mekkora méretű zsírsejtek alkotják (Matsuzawa et al., 1992). Az elhízás ilyen módon, tehát a regionalitás és a zsírsejtméret alapján elkülöníthető típusainak megjelenését kutya-fajban még nem igazolták.

3.1.3.1. A testzsíreloszlás jelentősége

Az utóbbi 50 év kutatási eredményei eloszlatták azt a tévhitet, miszerint a fehérzsírszövet mindössze az energia-trigliceridek formájában történő tárolásának passzív helyszíne, ehelyett, mint az egyik legnagyobb endokrin szervet mutatták be és egyre csak hangsúlyozzák jelentőségét a napjainkra népbetegségnek számító elhízáshoz társuló betegségek patogenezisében. A zsírszövet által termelt, szertágazó hatásokkal rendelkező szabályzó faktorokat közös névvel adipokineknek hívjuk. A zsírszövet endokrin funkciója mellett heterogén szerkezete is napjainkig kutatások tárgya. Helyeződésük alapján több

nagyobb zsírdepót különítünk el a szervezetben. A két nagyobb depót a hasüregben belül helyeződő viszcerális (Visc), más néven intraabdominális zsírszövet, valamint a bőr alatti területeken helyeződő szubkután (Sc) zsírszövet adja. Az előbbin belül egyes vizsgálatok során elkülönítik a cseplesz területén található omentális, valamint a belek között megjelenő mezenteriális zsírszövetet. A bőr alatti zsírszövet esetében pedig különbséget tesznek a hasi régióban helyeződő hasi Sc, valamint a gluteális területen és a combokon megjelenő zsírszövet között. Az egyes zsírdepók nem csak anatómiai helyeződésük, hanem sokszor ezzel összefüggésben vérellátásuk és szöveti szerkezetük tekintetében is eltéréseket mutatnak. Egészséges emberek esetében a Visc zsír legfeljebb 8-20%-át (férfiakban több, nőkben kevesebb) adja a teljes zsírtömegnek. A kondíció meghatározásának részeként nagyon fontos a zsíreloszlás vizsgálata, hiszen a rágcsálókat elemző kutatások, valamint a humán irodalom szerint az inzulinrezisztencia és a diszlipidémia kialakulása mellett más metabolikus problémák megjelenése is szorosabb összefüggést mutat a zsírszövet zsírdepókban történő eloszlásával, mint az összzsírtömeg, vagy a testsúly alakulásával (Vague, 1956; Larsson, 1991). Mindez felhívja a figyelmet az egyes zsírdepók sokszor nagyfokban eltérő tulajdonságaira. A zsírsejtek endokrin funkciója, a szövet lipolitikus aktivitása, valamint az inzulinnal vagy más hormonokkal szembeni érzékenysége mind-mind különböző lehet a Visc valamint a Sc zsírraktár esetében (Hellmér et al., 1992; Laviola, 2006). A zsírszövet szervezeten belüli eloszlását a humán irodalom szerint befolyásolhatja a nem, a kor, ugyanakkor egyes betegségek, gyógyszerek, hormonok hatása mellett, annak egyedi eltéréseit is említik. Összefoglaló közlemények alapján általánosan elfogadott, hogy a centrális obezitás, mely a gluteális területek helyett a hasüregben és a hasi Sc területeken koncentrálódott zsírszövet meglétét jelenti, egyértelműen társítható számos betegség megemelkedett kockázatához, így a cukorbetegség, a magasvérnyomás, az ateroszklerózis, diszlipidémia, illetve daganatos betegségek nagyobb arányú előfordulásához (Shuster et al., 2012). Kutya esetében is beszámoltak arról, hogy már 12 hetes hízlalás után igazolhatóak az elhízás káros metabolikus és kardiovaszkuláris hatásai, melyek erősebb összefüggést mutattak a Visc zsírdepó méretével, mint a teljes, vagy a Sc zsírmennyiséggel (Adolphe et al., 2014). Az egyes zsírraktárak metabolikus funkciók háttérében játszott jelentőségét nagyban meghatározzák az adott zsírdepó anatómiai jellemzői, a differenciálódási képessége, a zsír-tárolási folyamatok különbözősége, illetve a zsírszövetben élettani funkciót betöltő gyulladásozó sejtek megjelenési aránya is (Tchkonina et al., 2013). Alapvető, a funkciót is befolyásoló anatómiai különbségként említendő, hogy míg a Visc zsír felől érkező, NEFA-t és adipokineket szállító vénás vér a portális rendszeren keresztül közvetlenül a májba jut, addig a Sc területekről a szisztémás keringésbe kerül. Ezek mellett több molekuláris szintű különbségről is beszámoltak, egyes receptorok kifejeződésében, illetve az adipokinek produkciójában is írtak le különbségeket. Ibrahim az irodalmat 2009-ig áttekintő

összefoglalója alapján a Visc zsír metabolikusan sokkal aktívabbnak tekinthető (Ibrahim, 2010). Magasabb fokú lipolitikus aktivitása, magasabb fokú NEFA mobilizációt eredményez, ami anatómiai okokból egyből a májba jut. Amellett, hogy a Visc terület vaszkularizáltsága és inervációja gazdagabb, nagyobb mennyiségben tartalmaz nagyobb méretű zsírsejteket melyek sokkal kevésbé reagálnak az inzulinra (Salans et al., 1973). A Visc területen helyeződő zsírszövet ezek alapján rezisztensebb az inzulinhatással szemben, mint a hasi bőr alatti depóban helyeződő zsírszövet (Abate et al., 1995; Frayn, 2000). A Visc depó telítettsége alapvetően meghatározza az egész szervezet inzulinérzékenységét. Az innen induló fokozott NEFA áramlás a májban is csökkenti az inzulinérzékenységet, és a szisztémás hiperinzulinémiához vezet, amellyel együtt jár az inzulin hepatikus glükóz-produkcióra kifejtett gátló hatása. Az NEFA gyorsítja a glükoneogenezist és nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein (VLDL) szekréciót, emellett csökkenti az inzulin-stimulált perifériás glükózfelvételt, amit egészséges szervezetben a glükóz-stimulált inzulin szekréció NEFA által indukált fokozódása kompenzál, így tovább fokozva a perifériás hiperinzulinémiát. A folyamatosan magas NEFA-szint károsítja a béta-sejteket így 2-es típusú diabétesz kialakulására hajlamosít (Ibrahim, 2010; Wajchenberg, 2000). Hiperinzulinémiával párhuzamosan, illetve posztprandiálisan az alsóbb területek (gluteális terület, comb) NEFA felszabadulása sokkal inkább gátolt, mint a felsőbb-hasi Sc területeken mérhető felszabadulás. A Visc területekről származó NEFA felszabadulás rezisztensnek mutatkozott az inzulin antilipolitikus hatására (Jensen, 1995; Meek, 1999). Az adipocita funkcióban leírt depóspecifikus különbségek között a viscerális zsírszövet inzulinreceptorainak csökkent affinitása mellett, annak emelkedett katekolamin-indukált lipolitikus aktivitását és csökkent leptin expresszióját is említik (Stoll, 2002).

Amellett, hogy az egyes zsírdepók esetében eltérő metabolikus aktivitás, adipokin- és parakrin faktor szekréciós profil jellemző, ezek a szövetek eltérő hormonokkal szembeni érzékenységet és telítődési ütemet is mutatnak (Thomou, 2010). Az adott depót jellemző zsírsejt előalakok (általánosabb kifejezéssel élve preadipociták) aránya, illetve eltérő jellemvonásai, pl. replikációs potenciálja, az egyes területeken meghatározzák a zsírdepók tárolási kapacitását és telítődésének ütemét (Hauner, 1988; Montague et al., 1998; Tchoukonia et al., 2002; 2006b). A súlygyarapodás során az egyes depók növekedése eltérő ütemű, emellett területenként változó, hogy a zsírsejtek méretének növekedésével járó hipertrófia vagy a zsírsejtek számának gyarapodása során kialakuló hiperplázia uralja inkább a képet (Tchoukalova et al., 2010). Egy patkányokon végzett kutatás eredményei alapján a bőr alatti zsírraktárak esetében, azokon a területeken, amiknek feladata inkább a hosszútávú tartalékolás, így a femorális területeken a zsírsejtek számának növekedése inkább jellemző, míg a hasi területeken (mind a Visc, mind a Sc) a zsírsejtek méretének növekedése dominál. A Visc zsírszövet esetében inkább jellemző zsírsejtméret növekedés igazodik a gyors

raktározási és felszabadítási folyamatokhoz, illetve a rendelkezésre álló tér behatárolt jellegéhez. Hasi Sc depó esetében nagyobb kapacitás jellemző, mint az omentális zsírszövet esetében (Tchkonja et al., 2002). Ez a depók közötti különbség a preadipociták Sc zsírszövet esetében jellemző nagyobb arányú megjelenésében is megmutatkozik (DiGirolamo et al., 1998). Humán vizsgálatok során is kimutatták, hogy a hasi Sc területről származó szövetben jelenlévő preadipociták sokkal intenzívebb replikációra képesek, mint a cseplesz területéről származók, vagy a kicsit jobb potenciált mutató mezenterialis preadipociták (Tchkonja et al., 2005; 2006b; Van Harmelen et al., 2004). További különbségként kell említeni a gyulladással járó sejtek arányát az egyes zsírszövettípusok esetében. Egyes szerzők szerint a vizszerális raktárban nagyobb arányban jelennek meg gyulladással járó sejtek, illetve ez a zsírraktár nagyobb mértékben expresszálja az angiotenzinogént, illetve egyes gyulladással járó citokineket így pl. a TNF- α , CRP vagy az IL-6 szérumszintje magasabb Visc obezitás esetén (Park et al., 2005). Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy bár egyes szerzők szerint a makrofág infiltráció valóban sokkal extenzívebb a Visc zsírtömeg esetében, azonban a Sc depóban az elhízással párhuzamosan nagyobb ütemben nő a gyulladással járó sejtek megjelenése, mint a hasúri zsír esetében. A preadipociták elhízáshoz köthető öregedése azok proinflammatorikus citokintermelését idézi elő, a zsírszövetben kialakuló gyulladással pedig szintén összefüggést mutat az inzulinérzékenység romlásával, valamint ebben az esetben a Sc területeken erősebben jellemző tárolási képesség csökkenéssel illetve lipotoxikus hatással (Tchkonja et al., 2010). Mindezek ismeretében nem csoda, ha napjainkban sem tekinthető teljesen tisztázottnak, hogy a Visc obezitás oka vagy következménye a metabolikus eltéréseknek, illetve mennyiben lehet kóroktani szerepet tulajdonítani a Sc raktárak diszfunkciójának (Tchkonja et al., 2013). Egy elmélet szerint a bőr alatti zsírszövet diszfunkciója, illetve a területen jellemző gátolt adipogenezis, azaz csökkent lipidtárolási kapacitás ektópiás zsírrakódáshoz vezet, melynek első állomása a Visc depó túlzott telítődése, valamint ezzel párhuzamban a gyulladással járó és lipotoxikus hatások megjelenése, ami alapján a Visc zsír megnövekedett mennyisége sokkal inkább indikátora a metabolikus eltérésnek mintsem okozója (Tchkonja et al., 2006a). A korábbi elmélet alapján, élettani körülmények között a többlet energia raktározásának elsődleges helyszíne a bőr alatti zsírszövet. A zsírsejtek által trigliceridek formájában felvett energia csak az elsődleges raktár telítődése után vagy abban az esetben rakódik más területekre, pl. a Visc depóba, ha a zsírsejtek telítődése genetikai okból vagy stressz indukált úton gátlódik. A Sc depó kisebb zsírsejtjei nagyobb hajlamot mutatnak a szabadzsírsav- és a TG-felvételére, így az újonnan megjelenő kisebb így inzulinérzékenyebb zsírsejtek hatásos puffertárolást jelentenek a posztprandiális időszakban megnövekvő mennyiségű NEFA és TG raktározása során. A depó telítődése után azonban megkezdődik a depó kívüli lerakódás (Freedland, 2004). Bergman szerint (2006, kutya modell) a többlet energia raktározása során mind a Sc, mind a Visc raktár

gyarapodása megfigyelhető, ugyanakkor a vizsцерális depó gyorsabban gyarapszik egy plató eléréséig, míg a Sc raktár fokozatos de folyamatos növekedést mutat az elhízás kialakulása során. Míg a cseplesz egy részének műtéti eltávolítása, ezzel a Visc zsír mennyiségének csökkentése több fajban, köztük kutyában is igazoltan javítja az inzulinérzékenységet (Lotatti 2009; Ben-Shlomo 2012), addig hörcsögökben vizsgálva, a Sc zsírmennyiség csökkentése pont az ellenkező hatásúnak bizonyult (Weber et al., 2000). Egyre inkább igazolódni látszik, hogy a hosszútávú raktározásra specializálódott bőrálatti zsírdepók, több szempontból is de leginkább metabolikusan védő hatásúnak tekinthetők (Tchkonina et al., 2006a). A metabolikus védő hatás szempontjából azonban sokkal nagyobb szerepet tulajdonítanak az alsó régióban tehát a lábakon megjelenő Sc zsírnak, mint a hasi területen lerakódott Sc depónak (Tchoukalova et al., 2010). Verboven kutatócsoportja (2018) a korábbi eredményekkel egybehangzó megállapításokra jutott miszerint az elhízás során megváltozik a zsírszövet szerkezete, így jellemzővé válik a hipertrófia, a gyulladásos sejtes beszűrődés, különösen a Visc zsírraktár esetében. A Visc területen megjelenő zsírsejtek mérete erős összefüggést mutatott a teljes szervezetet jellemző inzulinérzékenységgel, ugyanakkor ezt a bőrálatti zsírdepó funkcionális jellemzői nem befolyásolták. A korábbi irodalommal egybehangzóan a Visc illetve a Sc depókban megjelenő hipertrófiás zsírsejtek az inzulinérzékenységet leginkább befolyásoló tényezők. A Visc depóban megjelenő hipertrófia az inzulinérzékenység legfőbb meghatározója, míg a Sc területen kialakuló nagyobb zsírsejtek pedig jelentősen hozzájárulnak a lipidek ektópiás lerakódáshoz első körben a Visc területre, ezzel közvetetten hozzájárulva az egész test inzulinérzékenységének romlásához. Az elhízáskor jellemző krónikus proinflammatorikus közeg gátolni képes az adipocita funkciót ezzel metabolikus eltéréseket is okozva elhízás esetén. A korábbi megállapításokkal ellentétben, a Sc zsírban elhízott emberek mintáiban is csak kevésbé volt jellemző a gyulladásos fenotípus megjelenése, illetve ezek nem mutattak összefüggést az inzulinrezisztencia kialakulásával. A Visc területen megjelenő gyulladásos fenotípus sokkal nagyobb jelentőséggel bír, ugyanakkor kiemelik, hogy a Sc raktár, az összzsír tömeg 80%-át adva sokkal fontosabb kvantitatív faktor, tehát erősebb meghatározója a teljes szervezet inzulin érzékenységének, mint a zsírsejt morfológia. A Visc depóban megjelenő nagyméretű zsírsejtek az inzulinrezisztencia kialakulásának független hajlamosító tényezői, melyek részben a proinflammatorikus hatásokon keresztül fejtik ki hatásukat. A Sc területen helyeződő sejtek funkciója kisebb jelentőségű a szervezet egészének inzulinérzékenysége szempontjából (Verboven et al., 2018). Önmagában tehát a Visc obezitás metabolikus hatása egyre inkább ismertté válik ugyanakkor a kialakulására hajlamosító okok még nem tisztázottak, mivel lehet, hogy ezek a depókat alkotó zsírsejtek örökölt tulajdonságaiból adódó folyamatok (Heilbronn et al., 2004). A genetikai predispozíció mellett, a gonadális hormonok játszó a legfontosabb szerepet a zsírraktárak megoszlásának kialakításában, így a főbb metabolikus

folyamatok kialakításában. A nők testében lerakódó zsír leginkább Sc területekre és az alsóbb testrészekre rakódik le, míg férfiakban sokkal jellemzőbb az abdominális régiók telítődése. A tesztoszteron (T) serkenti a lipolízist, illetve gátolja a lipoprotein lipáz aktivitását, hiányában nő a teljes zsírszövet mennyiség és nagyobb arányban nő a Sc zsírraktárak nagysága. Az androgének képesek blokkolni a preadipociták proliferációját és differenciációját, ezzel szemben az ösztradiol, *in vitro* vizsgálatok szerint, mind férfiakban, mind nőkben - utóbbiakban nagyobb mértékben - segíti a proliferációt. Az ösztradiol a Sc depozíciót serkenti leginkább, hiányában nőkben is magasabb a Visc lerakódás mértéke. A Visc zsír mindkét nem esetében magasabb mértékben expresszálja mind az androgén, mind pedig az ösztrogén receptorokat, mint a Sc raktárak. (Power és Schulkin, 2008).

3.1.3.2. A testzsíreloszlás vizsgálatának módszerei kutyán

A humán orvoslásban, a legtöbb elhízáshoz kapcsolható társult betegség esetén a vizsцерális elhízás jelentőségét hangsúlyozzák a perifériással szemben (Stoll, 2002). A megnövekedett arányban jelenlévő Visc vagy Sc zsírtömeg különböző metabolikus hatását kutyában is leírták (Kabir et al., 2005). Ugyanakkor annak ellenére, hogy a humán elhízástípusok speciális rizikófaktorként szerepelhetnek a metabolikus betegségek kialakulásában, ezeket kutya fajban nem különítik el. A kutya zsírszöveti eloszlásának vizsgálata fontos lehet annak megértésében, hogy a Sc-nal szemben, főleg a Visc zsírdepóba tömörülő zsír hozzájárul-e az elhízás súlyosabb, patológiás következményeinek kialakulásához ebben a fajban is. Az utóbbi években a kutyát egyre elterjedtebben használják a human metabolikus szindróma modellállataként, valamint a Visc típusú elhízás és az inzulinrezisztencia kapcsolatának vizsgálata során (Bergman et al., 2001). Ennek ellenére kérdéses, hogy a kutyák esetében kialakuló elhízás mennyiben állítható párhuzamba a humán folyamatokkal, hiszen az egyes zsírraktárak eloszlása alapvető különbségeket mutat. Ember esetében, főleg nőkben a legfontosabb Sc depóként az alsóbb régiókban megjelenő (femorális, gluteális) zsírszövetet tartják, míg kutyában a Sc zsír nagyobb része a törzsön és a mellkas területén jelenik meg, tehát a klasszikus elhízástípusokat nem tudjuk elkülöníteni. Mindemellett a kutyában jellemző zsíreloszlás alapján talán elegendő a hasi területek vizsgálata, ami a végtagok vizsgálata nélkül is képet adhat az adott egyedben jellemző zsíreloszlásáról. Ugyanakkor ezen különbségek ismeretében felmerül, hogy a zsíreloszlás másként befolyásolja a metabolikus folyamatokat, mint emberben. Kutyákon, magas energiatartalmú táppal történő etetési periódus előtt és után végzett mérések szerint, a meghízott kutyák egy részében a Visc és Sc zsírszövet mennyiség aránya nőtt, másoké csökkent, tehát az egyes egyedekben, eltérő ütemben gyarapodott a Sc és a Visc zsírraktár (Ishioka et al., 2005a). Kutya modellen végzett

vizsgálatban is kimutatták, hogy a Visc zsírdepó kifizetésének csökkentése jelentősen javítja az inzulinérzékenységet (Lottati et al., 2009). A zsírraktárak telítettségének, valamint eloszlásának meghatározása alapvető módszer az elhízás hatásainak vizsgálata során, ugyanakkor az ilyen irányú human vizsgálatok legtöbbje nem adaptálható a kutya fajra. A BCS rendszerek a leggyakrabban alkalmazott módszerek kutyában, az elhízás diagnosztizálása, valamint káros hatásainak becslése során, ugyanakkor ezek nem alkalmasak a Visc és Sc zsírraktárak vizsgálatára (Laflamme, 1997). Humán vonalon, a CT az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a zsírraktárak eloszlásának és telítettségének vizsgálatára (Hirooka et al., 2005). Bár az L3-5 csigolya magasságában készített CT felvételek elemzése alkalmas a kutya fajban jellemző obezitás, valamint a zsíreloszlás vizsgálatára is, a módszert eddig csak egy (beagle) fajtában írták le (Ishioka et al., 2005a).

Az endokrin szervként is működő zsírszövet számos élettani folyamatra van hatással adipokinek termelése révén. A különböző érettségi fokú valamint lokalizációjú zsírsejtek adipokin produkciója jelentősen eltérhet. Egyes adipokinek, elsődlegesen a leptin, az adiponektin, illetve a rezisztin, potenciális markerei lehetnek az elhízás mértékének, valamint az egyes következményes betegségek kockázatát is jellemezhetik (German et al., 2010b). A szérumban leptin koncentráció pozitív korrelációt mutat a testzsír tartalommal, emiatt kutya fajban is a zsírtömeg markereként alkalmazható, ami független az állat nemétől, korától, fajtájától és ivari ciklusától, bár az utóbbi két tényező leptinszint alakulása kifejtett hatása még nem zárható ki teljes mértékben. A szérumban leptinszint tehát alkalmas markernek tekinthető az elhízás diagnosztizálása, valamint a következményes betegségek progressziójának vizsgálata mellett talán a zsíreloszlás jellemzésére is. Bár egyes kutatók a leptin és a vizcerális zsírtömeg erős korrelációjáról számolnak be (Ronnemaa et al., 1997), több vizsgálat szerint a leptinszintet a szubkután zsírraktár telítettsége határozza meg legerősebben, mivel ebben a depóban nagyobb a leptin expresszió foka (Cnop et al., 2002). A leptin elsődlegesen a zsírsejtekben termelődő faktor, melynek termelésére a preadipociták még nem képesek (Matson et al., 1996). Montague és munkatársai eredményei alapján a leptin mRNA expresszió mind fiziológiás kondíciójú emberekben, mind enyhe elhízás esetén magasabb volt a Sc zsírszövet esetében a csepleszből származó mintához képest (Montague et al., 1997). Emellett a Sc-omentális leptin mRNA aránya jelentősen magasabb volt nők esetében. Ezeket az eredményeket a szerzők részben azzal magyarázták, hogy a Sc zsírdepó sejtjei nagyobbak voltak, mint az omentális zsírban megjelenő zsírsejtek, a több trigliceridet tároló nagyobb sejtek pedig más szerzők által is igazoltan nagyobb mértékben expresszálják a leptin mRNS-t (Hamilton et al., 1995; Tritos és Mantzoros 1997). Mindezek azonban nem egyeznek azzal a korábbi megállapítással, miszerint a nagyobb zsírsejtek megjelenése inkább az intraabdominális zsírdepó esetében jellemző. Ugyanakkor ez utóbbi sem zárja ki azt, hogy az egyébként domináns bőralatti zsírszövet növekedése során

megfigyelhető zsírsejtméret növekedés is okozója a leptinszint emelkedésének a vérben. Egy másik, Sc és omentális zsírszövet leptin termelését vizsgáló tanulmány szerint mind elhízott, mind fiziológiás kondíciót mutató nőkben kimutatták hogy a leptin szekréció illetve a leptin mRNS expresszió 2-3 szoros emelkedést mutat a bőralatti zsírszövetben. Az eredmények alapján szintén azt a következtetést vonták le, hogy a Sc zsírdepó a leptinszint legfőbb meghatározója, ennek indoklásaként pedig, szintén ellentétesen az előzőekben leírtakkal a bőr alatti területen megjelenő, 50%-kal nagyobb zsírsejtek magasabb leptin expresszióját emelték ki (Van Harmelen et al., 1998). Összességében tehát elmondható, hogy bár a háttér nem teljesen tisztázott, az irodalom egységes abban a tekintetben, hogy a szérumban a leptinszint összefüggést mutat a kondícióval, de fő meghatározója a bőralatti zsírraktárak mérete és telítettsége (Konigorski et al., 2018).

3.1.3.3. A zsírdepókat alkotó zsírsejtek méretének jelentősége

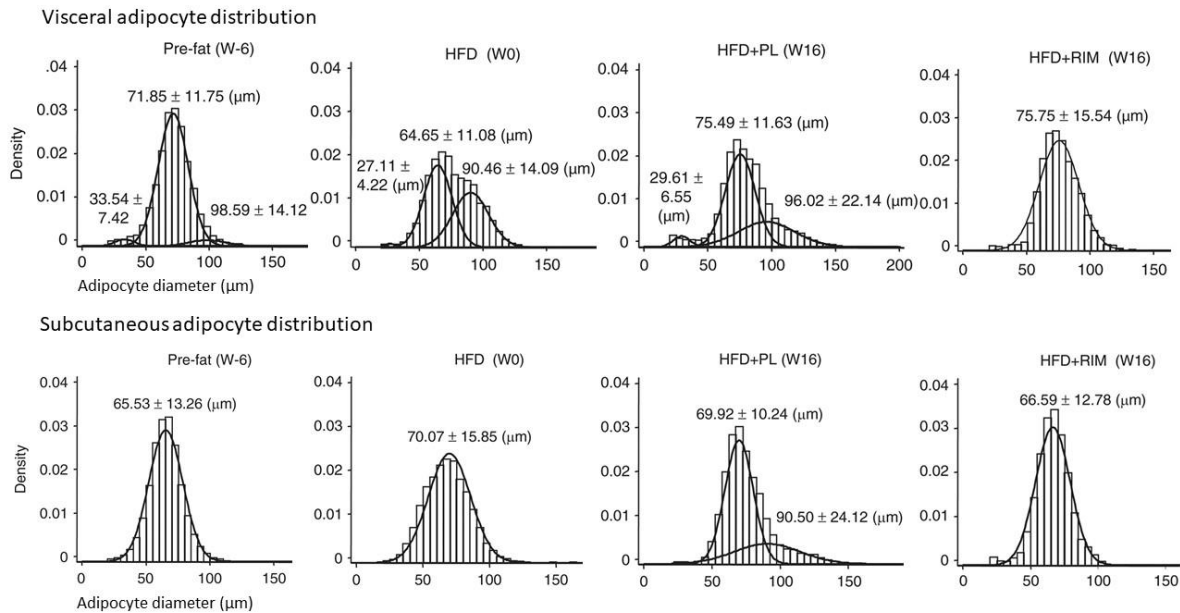
Számos nemrégiben megjelent publikáció alapján feltételezhető, hogy a szervezet zsírtartalma, valamint a zsírszövet eloszlása mellett a zsírszövetet jellemző cellularitás is alapvetően befolyásolhatja az egyed metabolikus profilját, illetve a szérumban a leptinkoncentrációt (Wählen et al., 2011). Felmerült ugyanis, hogy a depókat alkotó zsírsejtek mérete összefüggést mutathat a metabolikus rendellenességekkel. Annak függvényében, hogy a zsírszövet mennyiségének növekedésével párhuzamosan inkább a zsírsejtek méretének, vagy a zsírsejtek számának növekedése figyelhető meg, elkülöníthető az úgynevezett hipertrófiás, valamint a hiperpláziás elhízás (Hirsch és Han 1969; Hirsch és Batchelor 1976). Szintén humán kutatások alapján állították fel azt az elméletet, mely szerint a zsírsejtek méretének növekedése révén kialakuló, úgynevezett hipertrófiás elhízás, nagyobb eséllyel vezethet egyes metabolikus diszfunkciók kialakulásához, mint a dominánsan a zsírsejtek számának növekedésével járó hiperpláziás obezitás. Egyes elméletek szerint nem maga az elhízás, hanem az adipociták megnövekedett mérete áll inkább az inzulinrezisztencia hátterében, tehát az elégtelen számú zsírsejt, vagyis az adipociták proliferációs, illetve differenciálódási zavara nagyobb eséllyel vezet metabolikus zavarok kialakulásához (Ravussin és Smith 2002; Weyer et al., 2000). Mindezek magyarázatául szolgálhat, hogy zsírsejtek méretének alakulása alapvetően befolyásolja a termelt adipokinek mennyiségét és arányát, a pro- és antiinflammatorikus faktorok expresszióját, valamint a sejtek metabolikus funkcióját (Skurk et al., 2007; Winkler et al., 2003; Jernås et al., 2006). Több tanulmány is beszámol a proinflammatorikus citokinek (IL-6, IL-8, TNF- α , MCP) fokozott expressziójáról, valamint az inzulinérzékenyítő hormonként ismert adiponektin csökkent szekréciójáról, illetve az inzulinrezisztencia kialakulásáról a nagyobb zsírsejtekben, amik következményesen más szövetek romló

inzulinérzékenységéhez vezetnek (izom, máj) (Skurk et al., 2007; McLaughlin et al., 2010; Meyer et al., 2013; Wellen és Hotamisligil 2003). A zsírsejtek a többlet energiát, inzulin által szabályozott folyamatként TG formájában raktározzák, méretük pedig elsődlegesen a tárolt TG mennyiségével hozható kapcsolatba, emellett függ a lokalizációtól és zsírszöveti eloszlástól (Salans és Dougherty 1971; Tchoukalova et al., 2008). A fiatalabb, kisebb méretű zsírsejtek hatékony raktárkapacitást jelentenek, a sejtek növekedésével párhuzamosan azonban ezek inzulinérzékenysége csökken, utat engedve ezzel a TG zsírszöveten kívüli lerakódásának (Mårin et al., 1992; Hisra et al., 2003). A megnagyobbodott zsírsejtek esetében fokozott glükózmétabolizmusról, intenzívebb lipolízisről számolnak be, ugyanakkor az inzulin-stimulált glükóz métabolizmus negatívan korrelál a zsírsejtek méretével (Salans et al., 1968; Salans et al., 1971; Jacobsson és Smith 1972). A zsírsejt növekedésével párhuzamosan a gyulladós faktorok dominanciája válik jellemzővé, ugyanakkor változik a sejt metabolikus funkciója, és a lipidmétabolizmusban betöltött szerepe. Ezek alapján a zsírsejtek hipertrófiája összefüggést mutat az inzulin rezisztencia, valamint a metabolikus diszfunkciók kialakulásával (Engfeldt és Arner 1988; Despres et al., 1987), míg a hiperplázia kevésbé tűnik károsnak, illetve egyes elméletek szerint védelmet jelenthet az elhízáshoz társuló betegségekkel szemben (Arner et al., 2010). A növekvő sejtszámtól függetlenül az adipocita méretének növekedése az elhízott állatokban és alanyokban csökkent inzulinérzékenységgel jár együtt (Lundgren et al., 2007; Molina et al., 1989), ami részben a hipertrófiás zsírsejtek megnövekedett proinflammatorikus citokin expressziójának tulajdonítható (Matsubara et al., 2009). Az egyes zsírdepók esetében a zsírsejtméret hatása és jelentősége eltérő lehet, az irodalom azonban nem egységes abban a tekintetben, hogy melyik terület zsírsejtméret eloszlása határozza meg erősebben a szervezet inzulinérzékenységét. Az újabb publikációk alapján a viscerális zsírdepót jellemző zsírsejt hipertrófia, valamint az ezt kísérő gyulladós folyamatok inzulinrezisztencia kialakulására hajlamosíthatnak, ugyanakkor mindezek a Sc raktárak esetében nem járnak ilyen súlyos következményekkel (Verboven et al., 2018). Ezzel ellentétben, korábbi vizsgálatok szerint a Sc depóban található zsírsejtek nagyobb mérete szintén inzulin rezisztencia, illetve ezen keresztül 2-es típusú cukorbetegség kialakulására hajlamosít, ami alapján a Sc zsírsejtek mérete szintén negatív korrelációt mutat az inzulinérzékenységgel, illetve pozitívan korrelál a proinflammatorikus adipokinek szekréciójával (Lundgren et al., 2007.; Skurk et al., 2007; Lönn et al., 2010; Yang et al., 2012). Ezzel egybehangzóan nem elhízott, ugyanakkor 2-es típusú diabéteszben szenvedő emberek esetében a Sc zsírdepó esetében nagyobb zsírsejtekről számolnak be, aminek háttérében ezek progenitor sejtjeinek csökkent differenciációs képessége állhat (Acosta et al., 2016). Bár, feltehetőleg a könnyebb vizsgálhatósága miatt a bőr alatti zsírraktárakkal kapcsolatban sokkal több eredmény született, a Visc raktárak jellemzői is szoros összefüggést mutatnak az inzulinrezisztencia

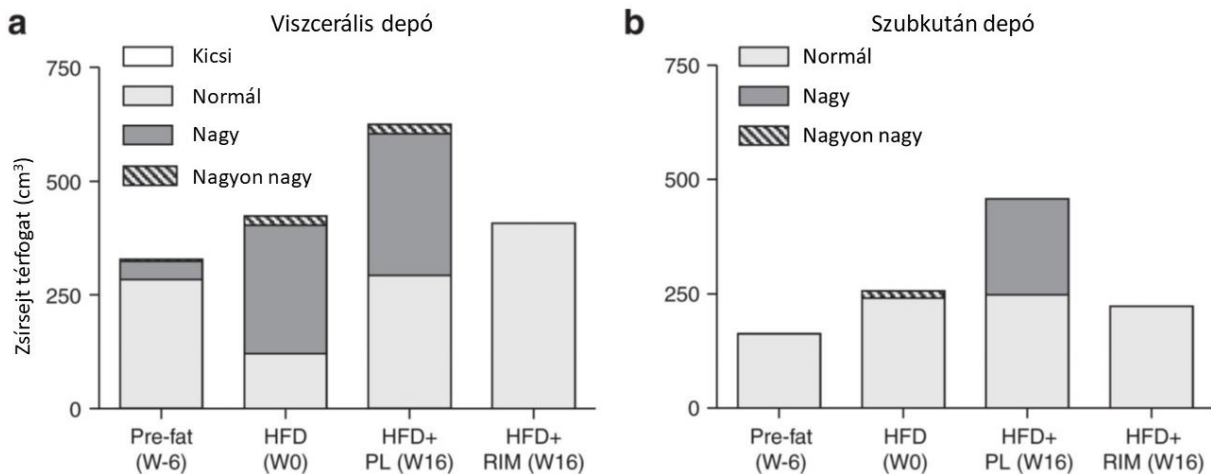
fokával, valamint a metabolikus szindróma kialakulásával (Wajchenberg, 2000; Gastaldelli et al., 2002; Heilbronn et al., 2004; Fox et al., 2007). Több publikációban a Visc zsírt további két komponensre, csepleszi valamint mezenteriális zsírra is bontják, ugyanakkor a Visc zsír vizsgálata legtöbbször valójában a csepleszi zsírszövet tanulmányozását jelenti (Catalano et al., 2010; Liu et al., 2009). A Visc zsír metabolikusan sokkal aktívabb szövet, mint a bőr alatti depó. Proinflammatorikus aktivitása és a portális vénával való szoros kapcsolata révén erős összefüggést mutat a metabolikus szindróma kialakulásával (Ravussin et al., 2004; Björntorp, 1990; DeFronzo, 2004; Liu et al., 2009; Pérez-Pérez et al., 2009). Mindezekkel ellentétben egyes eredményekből arra következtettek, hogy az inzulinrezisztencia foka valamint az adipogenezis folyamatát jellemző, valamint a gyulladást kísérő gének expressziója a Sc zsírsejtek méretével mutat összefüggést, ráadásul leginkább a kisebb sejtek frakciójának növekedését találták hajlamosító tényezőnek (McLaughlin et al., 2007; McLaughlin et al., 2010). A régebbi irodalom szerint hiperpláziás elhízás nehezebben kezelhető, emiatt szintén rossz a hosszútávú prognózisa. A kezelés hatékonyságát jelentősen limitáló tény, hogy a zsírszövet telítettsége nem tud egy bizonyos határ alá csökkenni, ezt a határt pedig, a zsírsejtek száma határozza meg. A zsírsejtek hiperpláziája csak egy meghatározott életszakaszban, a pubertásig bezárólag fysiológias. Az előbbiekből adódóan, a növekedésben lévő szervezetek hajlamosak a zsírsejtek számának növekedésével járó elhízásra (Salans et al., 1973). Bár ezt a hatást kutyában még nem igazolták, valószínűsíthető, hogy az utóbbi folyamat hasonlóan működik ezekben a fajokban is, így feltételezhetően a fiatal állatok túletetése, egy életen át tartó elhízás elleni küzdelmet irányoz elő (Case et al., 2011). Az újabb szemlélet szerint a kisebb zsírsejtek arányának növekedése a zsírtárolási folyamat egy bizonyos szakában mindig megfigyelhető. Fang és mtsai vizsgálataik során arról számoltak be, hogy morbid elhízás esetén a humán zsírminták vizsgálata alapján, nagyobb volt az átlagos sejméret a Sc raktárakban, mint az omentum vagy a mezenteriális zsírraktárakban, ugyanakkor mind a Sc, mind pedig a cseplesz területéről származó zsírmintákban megnőtt a kisméretű zsírsejtek, illetve következményesen csökken a nagy méretű sejtek aránya. Az éhomi vércukorszint pozitív korrelációt mutatott a Visc raktárban megjelenő kisebb zsírsejtekből álló frakció méretével, ugyanakkor nem volt összefüggés a nagyobb zsírsejtek átmérője és a klinikai paraméterek között. Ebből azt a következtetést vonták le a szerzők, hogy a kisméretű zsírsejtek frakciójának növekedése függ össze leginkább a metabolikus problémák kialakulásával (Fang et al., 2015). Ez az eredmény egybeesik McLaughlin publikációival (McLaughlin et al., 2007; McLaughlin et al., 2010). Elméletük szerint az energiafelesleg felvételére kezdetben minden zsírdepó lipiddárolással, így hipertrófia irányába történő alakulással reagál, egy küszöbérték eléréséig, ami a Sc raktárak esetében magasabb mint a viscerális depókban. A határérték elérését követően a hiperplázia irányába tolódik el a folyamat, vagyis a szervezet egy kisebb

méretű sejtpopuláció megjelenésével fokozza tovább tárolási képességet. Egyes egyedek védettek, melyekben az új populációként megjelenő kisméretű sejtek magukba gyűjtve a zsírt nagyobbakká válnak, mint funkcionáló zsírsejtek. Ugyanakkor más egyedekben a megjelenő sejtpopuláció nem képes a hipertrófiára vagyis értett zsírsejtté történő differenciációra, ami nagy veszélyt jelent az inzulinrezisztencia kialakulása szempontjából, mivel a károsodott differenciálódás az ektópiás, tehát máj vagy izomszövetbe történő zsírlerakódáshoz vezet (Fang et al., 2015). Ez a két folyamat, tehát a nagy zsírsejtek kialakulása, valamint a kisebb méretű zsírsejt populáció megjelenése egymást ki nem zárva alakíthatja ki a negatív hatásokat, emellett feltételezik, hogy ezek eltérő mértékben jellemzik az egyes depókat. A bőralatti zsírszövet jelenlétét védő hatásúnak is mondhatjuk, hiszen több lipidet képes raktározni és ezek a nagyobb sejtek gátolják az ektópiás zsírlerakódást miközben alacsonyabb lehet a proinflammatorikus citokin szekréció szemben a Visc raktárakkal ami csak egy határig raktároz, így hamarabb jelentkezik az ektópiás lerakódás és az emelkedő proinflammatorikus faktorok mennyisége (Fang et al., 2015). Az eddig összegzett humán eredmények mellett, a zsírsejtmorfológia és a társult betegségek patogenezise közti összefüggést kutya modell alkalmazásával is vizsgálták (Kabir et al., 2011). Korábban ugyanez a kutatócsoport leírta, hogy hat hetes magas zsírtartalmú diétát követően a testsúly növekedése mellett mind a Visc mind pedig a Sc zsírdepó növekedése egyértelmű volt és romló inzulinérzékenységről számoltak be (Kim et al., 2007). Az egyes típusú kannaboid receptor szelektív blokkolására képes rimonabant (RIM) adagolásával 16 hét alatt, a testsúlycsökkenéssel párhuzamosan, javult az inzulinérzékenység, illetve mind a Sc, mind a Visc zsírdepó mennyiségének csökkenését megfigyelték. Előbbi esetében a csökkenés nagyobb fokúnak bizonyult. Fentiekén túl vizsgálták a zsírdepókat alkotó sejtek morfológiájának változását is (**2. és 3. ábra**). A Visc területen megjelenő zsírsejtek 91%-a normál méretű sejtpopulációként jelent meg, míg a zsírdús diétát követően két sejtpopuláció dominanciája vált jellemzővé (bimodális), egy a sejtek 53%-át magába foglaló normál méretű-, valamint a sejtek 45%-át jellemző nagyméretű zsírsejt csoport. RIM kezelés hatására a sejtméret eloszlása újra a diétát megelőző állapottal megegyező képet adta. A Sc területekről származó zsírmintákban a sejtpopulációk alakulása a diéta egyes fázisaiban követte a Visc raktárban megfigyelt dinamikát, azzal a különbséggel, hogy az átlagos sejtméretek kisebbek voltak, illetve a zsírdús diéta után is csak egy, kiindulási állapothoz képest nagyobb méretű de a sejtek mintegy 99%-át magába foglaló sejtpopuláció meglétét írták le. A kezeletlen kontroll csoportokban, a magas zsírtartalmú diéta további fenntartása esetén mind a Visc, mind a Sc raktárra jellemző lett a 2 sejtpopuláció megjelenése, (Sc 72% normál, 28% nagyobb, viscerális 62% normál, 32% nagyobb) (Kabir et al., 2011). Utóbbi egybehangzik Skurk csoportjának eredményeivel, miszerint (Skurk et al., 2007) a humán Sc

területről származó zsírban méret szerint több populációt alkotnak a zsírsejtek, és a nagyon nagy zsírsejtek súlyosan károsodott adipokin-szekrúciót mutatnak, és elősegítik a gyulladást.



2. ábra Kabir és mtsai által közölt ábra, mely bemutatja a zsírsejtméret alakulását a Visc és a Sc zsírdepóból származó zsírmintákban, hat hetes magas zsírtartalmú diéta előtt (Pre-fat (W-6) és után (HFD (W0)), majd további 16 hetes magas zsírtartalmú diétát (HFD+PL (W16)), vagy rimonabant kezelést követően (HFD+RIM (W16)) (Kabir et al., 2011).



3. ábra Kabir és kutatócsoportja által közölt ábra a viszcerális (a), valamint a szubkután (b) zsírdepót alkotó sejtek térfogatának alakulásáról (kicsi, normál, nagy, nagyon nagy zsírsejtek) hat hetes magas zsírtartalmú diéta előtt (Pre-fat (W-6) és után (HFD (W0)), majd további 16 hetes magas zsírtartalmú diétát (HFD+PL (W16)), vagy rimonabant kezelést követően (HFD+RIM (W16)) (Kabir et al., 2011).

A vizsgálat eredményei arra utaltak, hogy a morfológiai jellemzők alapján csak Visc depóban megjelenő nagyobb (>75 μm) zsírsejtek hajlamosítanak a hepatikus inzulinrezisztencia kialakulására. Eddig főleg a Sc raktárak vizsgálatával keresték az összefüggést a zsírsejtmorfológia és az inzulinérzékenység alakulása között és mind a hipertrófia mind pedig a hiperplázia kóroktani szerepe felmerült (Pasarica et al., 2009a; McLaughlin et al., 2007). Mindkét raktár növekedését detektálták a zsíretetés hatására. Az eredmények alapján a magas zsírtartalmú diéta megkezdését követően a Visc depóban a zsírsejtek növekedése, azaz hipertrófiája figyelhető meg, míg a Sc raktárban a zsírsejtek mérete nem növekszik ilyen mértékben, ebben a depóban inkább a zsírsejtek számának enyhe emelkedése jellemző. A további zsíretetés hatására a Sc depóban is jellemzővé válik a zsírsejtek méretének növekedése, ami mellett a zsírsejtszám csökkenését is leírták. Utóbbi magyarázatául az inzulin érzékenység romlása és az apoptózis fokozódása szolgálhat. A zsíretetés megkezdésekor tehát a zsírsejtek növekedése a Visc depóban kezdődik meg, majd a korábbi „overflow” hipotézisnek megfelelően (Bergman 2006;) a vizcerális depó telítődése után folytatódik a Sc raktár telítődése. Ezzel szemben korábban más elméletek is születtek amik szerint a Sc raktár telítődése után jut a zsír a Visc és az ektópiás területekre (pl.: máj, izom) (Freedland, 2004; Pasarica et al., 2009b). Kabir munkacsoportjának eredményei ellentétesek voltak azokkal a közleményekkel, amik szerint a kisebb méretű zsírsejtek játszanak szerepet az inzulinérzékenység romlásában (McLaughlin et al., 2007). Ezzel kapcsolatban kiemelik, hogy a kollagén emésztésen alapuló zsírsejtméret meghatározására alkalmazott módszerek nem alkalmasak a kifejezetten nagy, valamint a kisebb sejtek vizsgálatára sem. Így a szerzők arra következtettek, hogy az inzulin rezisztencia nem a nagy zsírsejtek megváltozott funkciójának tulajdonítható, hanem a többlet energia lipidek formájában történő tárolásának képtelensége, amit a kisebb sejtek populációjának megjelenése igazol (McLaughlin et al., 2007).

Összességében elmondható, hogy a legújabb publikációk szerint a szervezet metabolikus egyensúlyának kulcsa a zsírraktározással párhuzamosan megfigyelhető, dinamikus zsírszöveti átalakulás, mely magában foglalja a zsírsejt populációk arányának eltérő ütemű változását az egyes zsírdepókban. A metabolikus folyamatok hátterében sokkal inkább ennek a zsírszövet által képviselt alkalmazkodási folyamatnak a jelentőségét kell kiemelni, mintsem egy meghatározott zsírdepó, bizonyos méretű zsírsejtjeinek önálló szerepét.

3.1.3.4. A zsírsejtméret meghatározásának lehetőségei

A zsírsejtek méretének meghatározására számos módszert dolgoztak ki. Ilyenek például a pufferben, kollagenáz oldattal történő emésztés után, a zsírsejtek metilénkéssel történő festését követő méret-meghatározása okulármikrométer, vagy digitális képanalizáló program segítségével (Clarkson et al., 1981, Tchoukalova et al., 2003). Ismert továbbá az ozmium-tetroxiddal történő fixálással végzendő módszerek alkalmazása (Hirsch és Gallian 1968), a formaldehidben fixált, fagyasztva metszett minták elemzése (Sjöström et al., 1971), illetve az elektronmikroszkóppal történő méret-meghatározás is (Guo et al., 2007).

A kollagénemésztéses módszerek esetében jelentősen könnyíti a vizsgálatot, hogy szabályos, a festési eljárás miatt jól meghatározható határú, ezáltal pontosan mérhető sejtek jönnek létre. Ugyanakkor több publikációban is kiemelik, hogy ezek eljárások torzíthatják az eredményeket, mert a túl nagy vagy a túl kicsi méretű zsírsejteket destrulálni képesek az enzimes emésztés során (Chen és Farese 2002; Hirsch és Gallian 1968; Kabir et al., 2011). A szövettani metszet alapú zsírsejtméret meghatározás saját tapasztalataink alapján is nagyon nehéz feladat. Önmagában a zsírszövet fixálása és a belőle történő metszet készítés is gyakorlatot igényel a szövet nagy víztartalma miatt. Az elkészült metszeteken ugyanakkor a zsírsejtek szabálytalan alakú sejtekként jelennek meg, melyek területének/térfogatának meghatározása nehézkes és nehezen stanardizálható, a sejtek határai pedig nehezebben azonosíthatóak különösen egy vastagabb metszeten. A zsírsejtek méretére a zsírszövet TG tartalmának és DNS tartalmának aránya alapján is következtethetünk. Az irodalom alapján azonban ez sem számít pontos eljárásnak, alulbecsülhetjük a zsírsejtek méretét. (Chen és Farese 2002; Hirsch és Gallian 1968, Björnheden, et al., 2004). Az irodalom alapján a leptinszint meghatározása közvetett módon, szintén információt adhat a zsírsejtek méretének alakulásáról. Wählen és mtsai szerint a teljes zsírtömeg a keringésben megjelenő leptin koncentráció legfőbb meghatározója, ugyanakkor a zsírsejtek mérete egy, az előbbtől független tényezőként szintén befolyásolja a leptinszint alakulását (Wählen et al., 2011). A zsírsejtek hipertrófiája (kevés, nagy zsírsejt jelenléte) erősebb összefüggést mutatott a leptinszinttel, mint a hiperpláziát (sok kisebb sejt) mutató zsírszövet esetében (Couillard et al., 2000; Lundgren et al., 2007), ami azzal magyarázható, hogy a leptin fehérje expressziója (Hamilton et al., 1995; Guo et al., 2004) valamint a keringésben megjelenő leptin mennyiség is szoros pozitív korrelációt mutat a zsírsejtek méretével (Lönqvist et al., 1997; Couillard et al., 2000; van Harmelen et al., 1998). Ezzel szemben más kutatások nem találtak összefüggést a leptin mRNS és fehérje szintű expressziója között (Ranganathan et al., 1998).

3.2. Célkitűzések

A kondíció és a testzsírszázalék pontosabb meghatározása céljából bevezettünk további morfometriai és bioimpedancia méréseket, illetve vizsgáltuk az így kapott testzsírszázalék és a szérumban leptinkoncentráció közötti összefüggéseket (3.3.).

Vizsgálatunk célja volt kimutatni a zsíreloszlás, vagyis a viszcerálisan, valamint a bőr alatti területeken helyeződő zsírmennyiség, illetve ezek arányának hatását a szérumban leptinszint alakulására, valamint feltárni a leptinszint és a szérumban inzulinkoncentráció, valamint a szervezet inzulinérzékenysége közötti összefüggéseket kutyában (3.4.).

További célunk volt leírni, hogy hogyan változik a Visc és Sc depók zsírsejtjeinek mérete a kondíció függvényében, valamint megvizsgálni a zsírsejtméret és a szérumban leptinkoncentráció közötti összefüggéseket kutyából származó mintákon (3.5.).

3.3. Morfometriai és bioimpedancia mérések alkalmazhatósága, valamint ezek összefüggése a szérumban leptinkoncentrációval kutyában

Müller L, Kók E, Kollár E, Balogh O*, Thuróczy J*: A vérszérumban leptinkoncentráció változása az ivari ciklus és a testzsírmennyiség függvényében szuka kutyában – Irodalmi áttekintés és saját tapasztalatok.

MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA 141 (7) pp. 411-424. (2019)

Célul tűztük ki a kondíció és az ivari ciklushoz köthető hormonális változások szérumban leptinkoncentrációra kifejtett együttes hatásának vizsgálatát beagle fajtájú szuka kutyákban. A kondíció pontosabb meghatározása céljából a testsúly és a BCS meghatározása mellett morfometriás méréseket és bioimpedancia mérést is alkalmaztunk. Az ivari ciklushoz köthető hormonális változás szérumban leptinszintre kifejtett hatásait a következő fejezetben (4.4.) tárgyaljuk.

3.3.1. Anyag és módszer

Tizenhét egészséges, nem vemhes, 2-9 éves korú, beagle fajtájú szuka kutyát vontunk be a vizsgálatba. A munkánk során alkalmazott vizsgálatok teljes mértékben igazodtak egy engedéllyel rendelkező (Pest Megyei Kormányhivatal által kiadott 29/2015 számú engedély) tenyésztő esetében az állományon alkalmazott szaporodásbiológiai gondozás, illetve szűrővizsgálatok rendszerébe. A vizsgálatokara kijelölt tenyészállomány egyedeket vontunk be a vizsgálatba, ez határozta meg az elemszámokat. Az állatok tápláltsági állapotának megítélése érdekében, 5 pontos skálán értékeltük a kondíciót (BCS) (Edney és Smith, 1986), feljegyeztük a testsúlyt, a medence körméretet (PC - pelvic circumference, cm-ben) és a

laterális oldalon mért térd-csánk távolságot (HS - hock to stifle, cm-ben). Az utóbbi 2 paraméter alapján számított értéként kaptuk meg a testösszetételt jellemző testzsír százalék értéket (Szuka testzsír % (BF%) = $-1,7 (HS) + 0,93 (PC) + 5$) (Burkholder és Toll, 2000, Mawby et al., 2004). A testösszetétel további jellemzésére a test zsírtartalmának (BMI) mérését egy kisállatokra optimalizált bioimpedancia mérő készülékkel (Healthlab Body Fat Analyzer IBF-D02, Kao Corp, Tokyo, Japan) is elvégeztük. A készülék elektródáit a szőr szétfésülése és a bőr alkohollal történő tisztítása után az utolsó borda mögé helyeztük, a gerincvonalától 3 cm-re, azzal párhuzamosan. Az eredményt háromszori mérés átlagaként jegyeztük fel. Az állatokból vérmintát gyűjtöttünk TG-, koleszterin-, valamint szérumból leptinszint meghatározása céljából. Az ismételt vérvételek a szakma szabályainak megfelelően, a *vena cephalica antebra-*chiából történtek, kéthetes időközönként 3 alkalommal, mindig reggel 8 és 9 óra között 24 órás koplaltatást követően. A vérmintákat 4°C-on hűtve tároltuk és szállítottuk. A szérumból szeparátoros csövekbe gyűjtött minták a vérvétel után 2 órával kerültek a Kórélettani és Onkológiai Tanszék laboratóriumába TG- és koleszterinszint enzimatikus kolorimetriás teszttel történő meghatározása céljából. A gélmentes csövekbe levett mintákat a vérvételt követően 3 órán belül 1500 g-vel, 12 percig, 4°C-on centrifugáltuk, a szérumból a további vizsgálatokig -86°C-on tároltuk. A fagyasztott szérumból történő hormonszint-meghatározás a Szülészeti Tanszék Klinikai laboratóriumában történt. A leptin koncentrációt ELISA teszttel határoztuk meg (Canine Leptin ELISA, EZCL-31K, Millipore Corporation; érzékenység 0.21 ng/ml, inter- és intra-assay CV: 6-7% és 2-6%). Az ELISA tesztek számszerű értékeléséhez ELISA olvasó berendezést (Thermo Labsystems Multiskan RC, Vantaa, Finland) és értékelő programot használtunk (Ascent Thermo LabSystem, Vantaa, Finland). Az eredmények kiértékelését a Microsoft Excel, R 3.5.1. statisztikai program, valamint az IBM® SPSS® Statistics for Windows 22.0 verzió (Armonk, NY, USA) statisztikai programcsomag segítségével végeztük. A szignifikancia szintjét $P \leq 0.05$ értéknél jelöltük meg. A BCS3 kondíciócsoportban két állat esetében mindhárom mérési időpontban kiugró (az interkvartilis tartomány 1,5-szeresén kívül eső értékek) leptin értéket mértünk (átlag 8,2 és 4,14 ng/ml), melyeket nem tudtunk magyarázni, ezért ezen egyedek mérési eredményeit kizártuk a statisztikai elemzésekből. A kondíciót jellemző paraméterek (testsúly, BCS, BF%, BMI) vizsgálata során a szérumból leptin koncentrációk ismételt mérésekből számított átlagával végeztük a statisztikai számításokat. A 3-as és 4-es BCS kategóriába sorolt egyedek (BCS3 és BCS4) leptin, koleszterin és TG koncentrációit, illetve a kondíciót jellemző egyéb paramétereit Student-féle t-teszttel hasonlítottuk össze. A változók közötti összefüggés vizsgálatára Spearman féle korrelációs tesztekkel végeztünk. Az eredményeket átlag és szórás értékekkel jellemezve mutatjuk be.

3.3.2. Eredmények

A BCS3 (n = 8) és a BCS4 (n = 7) kondíciójú szukák leptin koncentrációi között szignifikáns különbség mutatkozott (P=0,029). A 4-es kondíciócsoportba sorolt állatok leptinszintje átlagosan közel háromszorosa volt a 3-as csoport egyedeiben mért értékeknek (**1. táblázat**). A plazma koleszterin- (BCS3: 5,18±1,52 mmol/l; BCS4: 6,19±1,69 mmol/l) és TG értékekben (BCS3: 0,56±0,14 mmol/l; BCS4: 0,61±0,22 mmol/l) nem volt különbség a kondíciócsoportok között (P=0,22 és P=0,6). A kondícióbecslésre használt mutatók közül a testsúly (BW), valamint a testzsírszázalék (BF%) szignifikáns különbséget mutattak a két kondíciócsoport között (P=0,003 és P=0,001), míg az impedanciamérővel meghatározott BMI hasonlóan alakult a két csoportban (P=0,29; **1. táblázat**).

1. táblázat A kondícióbecslésre használt mutatók értékei a 3-as és 4-es kondíciócsoportban. BF%: morfometriai mérésből származó testzsírszázalék érték (testzsír % (BF%) = -1,7 (HS) + 0,93 (PC) + 5), ahol HS = térd-csánk távolság es PC = medencekörméret); BMI: impedanciamérővel meghatározott érték, háromszori mérés átlaga.

	Testsúly (kg)		BF%		BMI		Szérum leptin (ng/ml)	
	átlag	szórás	átlag	szórás	átlag	szórás	átlag	szórás
BCS3 n=8	10,19	0,67	21,04	2,68	22,17	5,71	0,56	0,38
BCS4 n=7	13,33	1,81	29,81	5,15	25,76	6,91	1,49	0,99
P érték	0,003		0,001		0,29		0,029	

Az egyes kondíciót jellemző paraméterek közötti összefüggések eredményeit a **2. táblázat** mutatja be. A használt paraméterek közül a BCS és a számolt testzsírszázalék (BF%) érték mutatta a legszorosabb összefüggést a szérum leptin koncentrációval ($r_s=0,62$, P=0,014; $r_s=0,69$, P=0,005), míg a bioimpedanciamérés során kapott eredmény nem mutatott összefüggést a szérum leptin koncentrációval ($r_s=0,43$, P=0,111). Ennek ellenére a BMI és BF% paraméterek között szoros összefüggést találtunk ($r_s=0,77$, P=0,001). A vér leptin-, koleszterin-, valamint TG értékei között nem volt szignifikáns összefüggés.

2. táblázat A kondíciót jellemző paraméterek közötti összefüggés vizsgálata Spearman féle korrelációs teszttel. r_s (rho): Spearman féle korrelációs koefficiens; BCS: Body Condition Score; BF%: morfometriai mérésből származó testzsírszázalék érték; BMI: impedanciamérővel meghatározott érték, háromszori mérés átlaga.

	Testsúly		BMI		BF%		Szérum leptin (ng/ml)	
	r_s	P	r_s	P	r_s	P	r_s	P
n=15								
BCS	0,868	<0,001	0,248	0,373	0,745	0,001	0,619	0,014
Testsúly			0,433	0,107	0,759	0,001	0,510	0,052
BMI					0,766	0,001	0,429	0,111
BF%							0,688	0,005

3.3.3. Megbeszélés

A kondícióbecslés (BCS) mellett az általunk is használt morfometriai és bioimpedancia mérések olyan nem invazív módszerek, melyek klinikai körülmények között is alkalmasak a testzsírmennyiség becslésére (German et al., 2010b; Mawby et al., 2004; Stone et al., 2009). Ugyanakkor eddig csak a BCS besorolás szérumban leptinkoncentrációval mutatott összefüggéseiről jelentek meg publikációk (Ishioka et al., 2007; Ishioka 2002a; Jeusette et al., 2005b; Sagawa et al., 2002), míg a morfometriai és a bioimpedancia mérések eredményeinek szérumban leptin koncentrációval való összefüggéséről kutyában nincsenek adatok. A szakirodalmi adatokhoz hasonlóan (Ishioka et al., 2007; Ishioka 2002a; Jeusette et al., 2005b; Sagawa et al., 2002) mi is szignifikánsan magasabb szérumban leptin koncentrációt mértünk a magasabb BCS-sel (BCS4) rendelkező kutyákban, mint a normál (BCS3) kondíciójú egyedekben. Az általunk használt paraméterek közül a számolt testzsírszázalékérték (BF%) és a BCS mutatták a legszorosabb korrelációt a szérumban leptinkoncentrációval, ami szintén korábbi tanulmányok eredményeivel egybehangzóan, a testösszetétel perifériás leptinkoncentrációt befolyásoló hatását hangsúlyozza (Jeusette et al., 2005b). A BF% és a szérumban leptinkoncentráció korrelációját más fajtákban is valószínűsítjük, kérdéses ugyanakkor, hogy adott leptinkoncentráció alapján következtethetünk-e az adott egyed jellemző testzsírszázalékra, hiszen egyes kutyafajtákban jelentősen eltérő lehet az ideális testsúly esetében jellemző testzsírszázalék érték (Jeusette et al., 2010). Bár a bioimpedancia mérő készülékkel kapott eredmény (BMI) jól korrelált a BF% értékkel, a humán irodalomban megjelent eredményekkel ellentétben (Lubkowska et al., 2015) nem mutatott összefüggést a szérumban leptinkoncentrációkkal. Ennek hátterében a gép felhelyezéséből adódó mérési pontatlanságok állhatnak, melyek tisztázása további vizsgálatokat igényel. Egyéb, a metabolikus állapotot tükröző paraméterek, mint a plazma TG- és koleszterinkoncentrációjának vizsgálata során nem mutatkozott különbség a kondíciócsoportok között, ami valószínűleg arra vezethető vissza, hogy a BCS4 csoportba tartozó állatok esetében a túlsúly még nem okozott jelentős metabolikus diszfunkciót a szervezetben.

Az általunk vizsgált állatokban, a 3-as kondíciócsoportban $0,56 \pm 0,38$, a 4-es csoportban $1,49 \pm 0,99$ ng/ml szérumban leptinkoncentrációkat mértünk. Ugyanezzel a kutya leptin ELISA kittel Park és mtsai (Park et al., 2015) hasonló leptin koncentrációkat mértek elhízott (BCS5) beagle fajtájú kutyákban ($1,99 \pm 1,00$ ng/ml), míg más kutatók $7,2$ ng/ml átlagértéket kaptak a BCS4-5-nek megfelelő kondíciójú állatokban és szignifikánsan alacsonyabb koncentrációkat ($\leq 3,6$ ng/ml) a BCS2-3-nak megfelelő csoportban (Tvarijonaviciute et al., 2011). Saját eredményeinkhez hasonlóan a Tvarijonaviciute és mtsai által vizsgált 62, különböző fajtájú kutya közül a normál, illetve sovány kondíciójú egyedek esetében

kifejezetten alacsony leptinszintet mértek, így az értéknek egy része kívül esett a teszt mérési tartományán (Tvarijonaviciute et al., 2011). Ugyanezzel a kittel más kutatók is a vártnál alacsonyabb szérumban leptinkoncentrációkat mértek az alacsonyabb kondíciócsoportba sorolt kutyák esetében (Park et al., 2014, Wakshlag et al., 2011). Ez megkérdőjelezi, hogy az elérhető mérési módszer alkalmas-e a leptinkoncentrációt enyhébben befolyásoló tényezőkre, mint például az ivari ciklus során bekövetkező hormonális változások lehetséges hatásának vizsgálatára szuka kutyában. Az általunk mért alacsony leptin értékeket az is magyarázhatja, hogy a mintavételeket 24 óra koplaltatás után végeztük, ami önmagában is csökkentheti a vérben mérhető leptinszintet (Boden et al., 1996; Hardie et al., 1996; Ishioka et al., 2005b). A koplaltatásra azért volt szükség, hogy a szérumban leptin koncentráció táplálékfelvétellel kapcsolatos napszaki ingadozását, mint lehetséges befolyásoló tényezőt, elkerüljük (Ishioka et al., 2005b). Mivel a vérvételeket télen, kifutóban tartott állatokból végeztük, felmerülhet a külső hőmérséklet esetleges befolyásoló hatása is, amit rágcsálókban, juhokban és emberben már leírták (Asakuma et al., 2003, Hardie et al., 1996, Trayhurn et al., 1995). A csökkenő hőmérséklet hatására a bőr alatti kötőszövetben mérhető leptin mRNS expresszió csökken, az ebből adódó leptinkoncentráció csökkenés pedig étvágyfokozó, így a táplálékfelvétel növekedését eredményezi hideg környezetben (Murdoch et al., 2005; Peinó et al., 2000).

Az irodalmi adatokhoz hasonlóan szignifikáns különbséget mutattunk ki a túlsúlyos és normál kondíciójú (BCS3 és BCS4) szuka kutyák szérumban leptin koncentrációi között. Emellett szoros pozitív összefüggést írtunk le a szérumban leptin koncentráció és a kondíciómérésre alkalmas újabb paraméterek, köztük is a számolt testzsírszázalék érték között, amire a szakirodalomban még nem volt adat. Bevezettük a bioimpedancia mérést is a testtömegindex (body mass index, BMI) pontos becslésére, a BMI azonban a vártnál alacsonyabb összefüggést mutatott a testsúllyal, a kondícióbesorolással és a szérumban leptinkoncentrációval is, aminek oka további vizsgálatokat igényel. A vártnál alacsonyabb leptin koncentrációk az alacsony hőmérséklet, valamint a hosszabb koplaltatási periódus hatását is tükrözhetik.

3.4. A zsíreloszlás alakulása és annak metabolikus következményei kutyában

Müller L, Kollár E, Balogh L, Pöstényi Z, Márián T, Garai I et al.,. Body fat distribution and metabolic consequences-examination opportunities in dogs. Acta Veterinaria Hungarica. 2014 Jun 1;62(2):169-179.

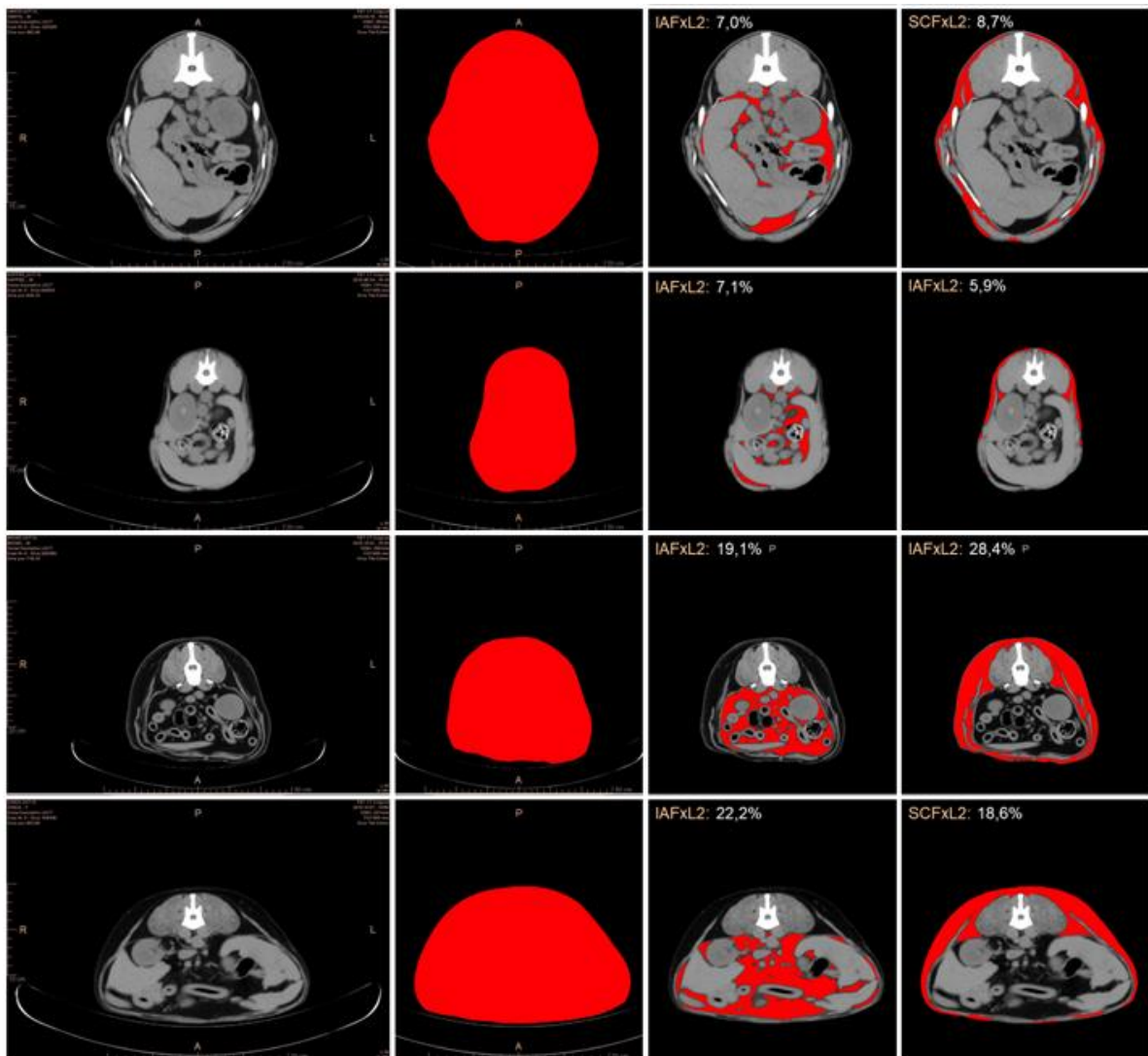
A zsírszövet eloszlásának főbb, leginkább metabolikus hatásai nem tekinthetők teljesen tisztázottnak a korábbi kutatások alapján. Célunk volt egy, a zsírszövet eloszlásának meghatározására kutya fajban is alkalmazható módszer kidolgozása, valamint a zsíreloszlás metabolikus hatásainak vizsgálata. Munkánk során vizsgáltuk az egyes zsírraktárak mérete (területe), illetve aránya (IAF/SCFxL2, IAF/SCFxL3), mint az intraabdominális zsírrakumulációt jellemző paraméterek (Fujioka et al., 1987) és az állatok metabolikus státuszát jellemző paraméterek közti kapcsolatot.

3.4.1. Anyag és módszer

A vizsgálatsorán 25 különböző fajtájú kutya, diagnosztikai céllal végzett PET/CT vizsgálata során röntgítésre került felvételeket elemeztünk. Az állatok fajtája, kora, neme, kondíciója és kórtörténete minden esetben feljegyzésre került. Utóbbi alapján az egyedek nem szenvedtek metabolikus betegségekben, ugyanakkor külön, erre irányuló vizsgálatokat nem végeztünk. A CT vizsgálatot megelőzően az állatok általános klinikai vizsgálaton, illetve 5 pontos skála szerint végzett kondícióbecslésen estek át (BCS1-5, Laflamme, 1997). A vizsgálatba 2,5 és 13 év közötti (átlag életkor $8,6 \pm 3,3$ év), 16 ivaros kan és 9 ivaros szuka kutyát vontunk be.

Komputertomográfias vizsgálatok (CT)

Munkánk során a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Nukleáris Medicina Intézetében elvégzett 25 diagnosztikai célú CT vizsgálat (Phillips Brilliance, 64 slices CT) felvételeinek utólagos elemzését végeztük el. A képalkotó berendezéssel végzett vizsgálat általános anesztézia alkalmazása mellett történt a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Nukleáris Medicina Intézetében. Az szubkután és a vizsцерális zsír mennyiségét a 2. és 3. lumbális csigolya magasságában, azaz az irodalmi adatok szerint legalkalmasabb területeken készített keresztirányú felvételeken (120 Kv, 30 mA, szeletvastagság 5 mm) (Ishioka et al., 2005a), az adott depóba tartozó zsírszövet által elfoglalt terület nagysága alapján határoztuk meg. A vizsцерális és a szubkután zsírszövet közötti határt a peritoneum, a hasfal izmai, valamint a paraspinalis izmok mély pólója adta. A pixeldenzitás alapján azonosítottuk a zsírszövetet az adott képen, amit pirossal jelöltünk (**4. ábra**), majd a szövet által elfoglalt terület nagyságát képanalizáló szoftver segítségével határoztuk meg négyzetcentiméterben (cm²).



4. ábra Az első oszlopban négy különböző fajtájú és két különböző kondíciócsoportba tartozó kutya (fentről lefelé haladva BCS 3,3,4,4), kettes lumbális csigolyának magasságában készített keresztirányú CT felvétele látható. A második oszlop képein a szelet teljes területét, míg a harmadik oszlop képein a hasúri, a negyedik oszlop képein pedig a bőr alatti zsírdepó területét jelöltük piros színnel. Az utolsó két oszlop képein feltűntettük a vizcerális (IAFxL2), illetve szubkután (SCFxL2) zsír mennyiségét a teljes keresztmetszeti kép területéhez viszonyítva.

A vizcerális, vagyis intraabdominális (IAF) illetve a szubkután (SCF) zsír által elfoglalt terület nagyságát a szelet teljes területéhez viszonyított százalékos arányban (IAFxL2, IAFxL3, SCFxL2, SCFxL3), illetve a szervek által elfoglalt területhez viszonyítva (IAForgxL2, IAForgxL3, SCForgxL2, SCForgxL3) adtuk meg a két megjelölt magasságban, biztosítva ezáltal a különböző fajtájú és testméretű kutyák adatainak összehasonlíthatóságát.

Vérminták gyűjtése és a hormonszintek meghatározása

A vérvétel a CT vizsgálathoz szükséges anesztézia bevezetését közvetlenül megelőzően, figyelembe véve a leptinszint táplálékfelvétellel összefüggő napi ingását, valamint egyes gyógyszeres kezelések befolyásoló hatását (Ishionka et al., 2002b; Ishioka et al., 2005b). Csak olyan állatokat válogattunk be a vizsgálatba, amelyeknél a vérvétel legalább 10 órás koplattatást követően történt, illetve amelyek nem voltak inzulinnal vagy glükokortikoiddal kezelve a vizsgálatot megelőző egy hónapos időszakban. A vérvételeket, a vérminták előkészítését, valamint a vércukorszintek és a leptinszintek meghatározását az előző vizsgálatban ismertetett módon végeztük (3.3.). Az inzulinszintek meghatározása is az Állatorvostudományi Egyetem Szülészeti Tanszékének Diagnosztikai Laboratóriumában történt, szintén direkt szendvics ELISA teszttel (érzékenység 0.01 µg/l; Mercodia AB, Uppsala, Sweden; 6,6 mU/l és 23,6 mU/l koncentrációk esetén Intra-Assay CV 4,5% és 2,1%, az Inter-Assay CV 4,6% és 3,8%). A teljes test inzulinérzékenységének meghatározására a HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment) index értéket alkalmaztuk, ami az éhomi vércukor- valamint inzulinszint alapján számolható ($HOMA-IR = \frac{[éhomi\ inzulin\ (\mu U/ml)] \times [éhomi\ vércukor\ (mmol/l)]}{22.5}$), az éhomi állapotban jellemző inzulinrezisztencia fokának jellemzésére alkalmas paraméter (Matthews et al., 1985; Verkest et al., 2010).

Statisztikai értékelés

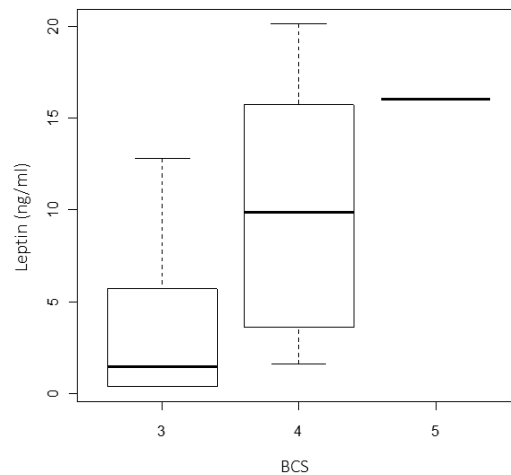
Az adatokat átlag \pm szórás érték formájában adtuk meg. A nem normál eloszlású változók miatt a leptinszint, az inzulinszint és a zsíreloszlást, valamint az inzulinérzékenységet jellemző paraméterek közötti összefüggéseket Spearman-féle rang-korrelációs együttható számításával vizsgáltuk. Egyszeres és többszörös regresszió analízissel határoztuk meg a zsíreloszlás, valamint a zsíreloszlás és az inzulinérzékenység leptinszint-alakulására kifejtett hatását. A statisztikai számításokat R statisztikai program (R version 2.9.2, 2009) segítségével végeztük. A szignifikancia szintet minden statisztikai analízisben a $P < 0,05$ értéknél rögzítettük.

3.4.2. Eredmények

Kondíció és zsíreloszlás

A kondíciópontozásos rendszerben történő értékelés alapján 17 állatot (5 szuka, 12 kan; átlag életkor $8 \pm 2,8$ év) soroltunk a "normál" (BCS3), 7 állatot (3 szuka, 4 kan; átlag életkor $10,1 \pm 2,9$ év) a "túlsúlyos" (BCS4) és egy állatot (szuka, 13 éves) az "elhízott" kategóriába (BCS5).

A szérumban a leptin szint a BCS3 csoportban 3.22 ± 3.74 ng/ml, a BCS4 csoportban 10.4 ± 7.36 ng/ml, a BCS5 kategóriába sorolt állat esetében pedig 16.06 ng/ml volt. A leptinkoncentráció szignifikánsan magasabb volt a BCS4 és BCS5 csoport egyedeiben mint a BCS3 csoportban ($P=0,02$), illetve szintén szignifikáns különbség mutatkozott a BCS3 és BCS4 csoportok között ($P=0,05$) (**5. ábra**). A szérumban az inzulin koncentráció és a HOMA-IR index értékek nem mutattak összefüggést a kondícióbesorolással.



5. ábra A szérumban a leptin szint (ng/ml) alakulása az egyes kondíciócsoportokban. A box plot diagramon a csoportokban jellemző interkvartilis terjedelemben, a medián, a legkisebb és a legnagyobb érték került ábrázolásra.

Az intraabdominális (IAF), valamint az intraabdominális és a szubkután zsír által (IAF+SCF) együttesen elfoglalt terület (%) döntően tendenciózus (L2: $P=0,075$; $P=0,087$; L3: $P=0,026$; $P=0,058$) emelkedést mutatott a BCS3 és BCS4 kondíciócsoportok között, míg az L2, L3 magasságban mért szubkután zsírmennyiség (SCF) nem különbözött a kondíciócsoportok esetében. A vizsgált állatok alapvető különbséget mutattak a zsírszövet regionalitásának tekintetében. Az L2 és L3 magasságokban meghatározott zsírszöveti eloszlás vizsgálata alapján a vizsgált állatok (ezen belül a BCS3 és BCS4 kondíciócsoportok voltak értékelhetőek) nagy részében (interkvartilis terjedelemben) a vizsgált zsírraktárak közel azonos területet foglaltak el, ugyanakkor az állatok egy részében a viszcerális, míg másik részükben a szubkután depóban raktározódott a teljes hasi zsírszövet nagyobb része (**3. táblázat**). Mind az L2, mind az L3 magasságában készített felvételek alapján azt láttuk, hogy az összes zsírmennyiség (SCF+IAF) nem mutatott szignifikáns korrelációt a zsírdepók egymáshoz viszonyított arányával (IAF \times L2/SCF \times L2, IAF \times L2/SCF \times L3; Spearman korreláció, $P=0,072$; $P=0,477$).

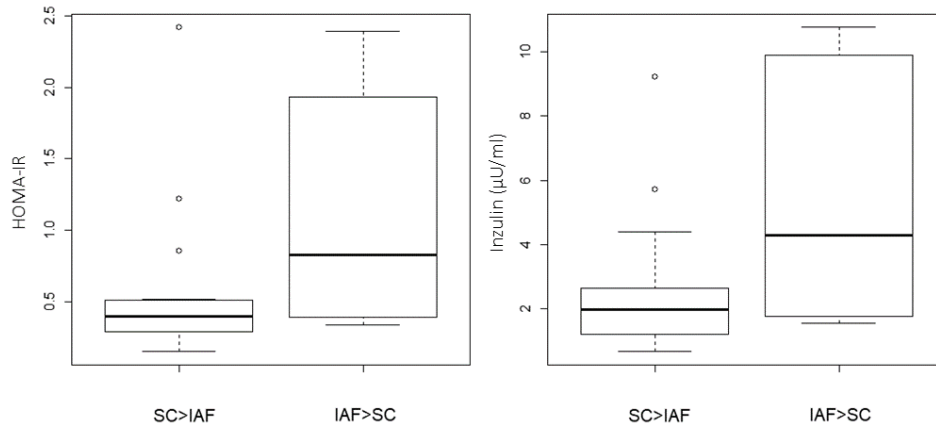
3. táblázat A hasi zsírraktárak arányának alakulása az egyes BCS kategóriákba sorolt egyedek esetében. Az lumbális kettes (L2), vagy hármas (L3) csigolya magasságában készített felvételek alapján a vizcerális, vagyis intraabdominális (IAF) illetve a szubkután (SCF) zsír által elfoglalt terület nagyságát a szelet teljes területéhez viszonyított százalékos arányban adtuk, meg emellett feltüntettük ezek egymáshoz viszonyított arányát (IAF/SCF) az említett régiókban. A szervek által elfoglalt területhez viszonyított formában megadott értékek egymáshoz viszonyított aránya számszerűen megegyezett az itt látható arányszámokkal, ezért ezeket külön nem tüntettük fel a táblázatban. Az egyes kondíciócsoportokra vonatkozóan feltüntettük az átlag, minimum (min) és maximum (max) értékeket, illetve az IAF/SCF értékek esetében a medián, az alsó -(Q1) és felső kvartilis (Q3) értékeket is, utóbbi adatoknak megfelelően külön színnel jelöltük a kvartilisek közé eső értékeket.

BCS	L2			L3		
	IAF	SCF	IAF/SCF	IAF	SCF	IAF/SCF
3	16,1	41,4	0,4	12,4	40,9	0,3
	16	35,1	0,5	20	35,6	0,6
	17,9	33	0,5	20,9	30,7	0,7
	6	9,8	0,6	6,2	11,3	0,5
	12,2	17,8	0,7	11,1	17,6	0,6
	7	8,7	0,8	11,2	8,6	1,3
	9,4	11,7	0,8	13,8	16,5	0,8
	21,6	28,3	0,8	22,6	31,5	0,7
	27,4	29,8	0,9	29,2	28,5	1
	29,3	27,9	1	28,8	31,8	0,9
	27,9	25	1,1	21,6	26,2	0,8
	7,1	5,9	1,2	3,4	7,6	0,4
	14,4	11,9	1,2	18,5	13,8	1,3
	27,7	22,7	1,2	26,3	22,3	1,2
	25,2	18,8	1,3	26,8	18,1	1,5
22,9	15,6	1,5	27	15,9	1,7	
9,1	1,5	5,9	7,4	2,6	2,9	
átlag	17,5	20,3	1,2	18,1	21,1	1,0
min	6	1,5	0,4	3,4	2,6	0,3
Q1			0,7			0,6
medián			0,9			0,8
Q3			1,2			1,3
max	29,3	41,4	5,9	29,2	40,9	2,9
4	21,9	34,3	0,6	24	33,5	0,7
	19,1	28,4	0,7	22	28,1	0,8
	25,4	35,2	0,7	27,9	35,1	0,8
	30,6	31	1	30,9	31,1	1
	29,6	28,9	1	28,1	30,4	0,9
	22,2	18,6	1,2	29,8	17,7	1,7
17,5	12,3	1,4	19,9	13,1	1,5	
átlag	23,8	27,0	0,9	26,1	27,0	1,1
min	17,5	12,3	0,6	19,9	13,1	0,7
Q1			0,7			0,8
medián			1			0,9
Q3			1,1			1,25
max	30,6	35,2	1,4	30,9	35,1	1,7
5	30,8	15,3	2	30,4	19,9	1,5

Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a szérumszintű leptinkoncentráció és az L2 és L3 magasságban mérhető zsírraktárak méretét jellemző paraméterek, tehát a szubkután és a vizszerális zsírraktár mérete között (**4. táblázat**). A szérumszintű leptinszintek szorosabb összefüggést mutattak a vizszerálisan, mint a szubkután helyeződő zsírraktárak mennyiségével, ugyanakkor nem mutattak összefüggést a zsírraktárak arányával. Ezzel ellentétben szignifikáns pozitív korrelációt írtunk le a vizszerális és szubkután zsírmennyiség aránya valamint a szérumszintű inzulinszintek között, illetve hasonló trend volt megfigyelhető a zsírraktárak aránya és a HOMA-IR index értékek között (**4. táblázat** és **6. ábra**). Az inzulinkoncentráció és a HOMA-IR index nem mutatott összefüggést sem a zsírraktárak területével, sem a szérumszintű leptinszinttel (**4. táblázat**).

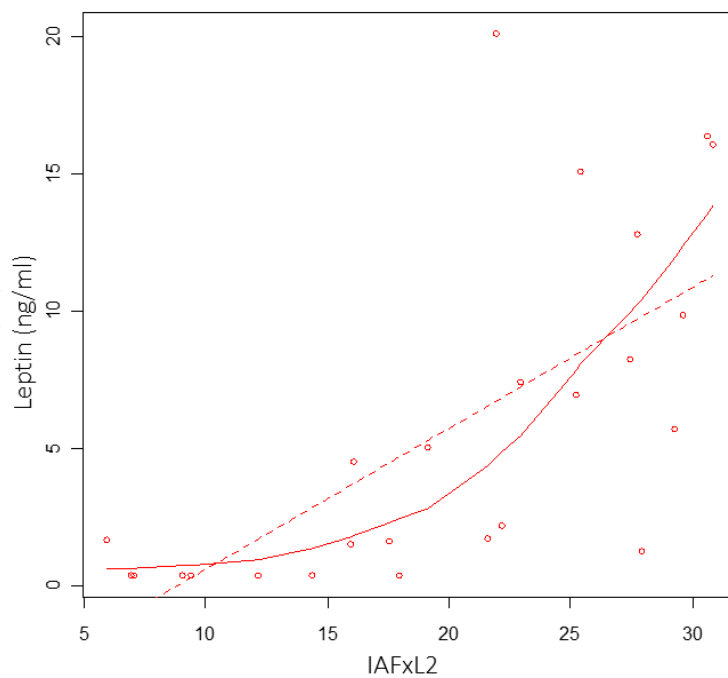
4. táblázat Spearman-féle rangkorreláció a szérumszintű leptin- és inzulinszint, valamint a HOMA-IR index értékek és a hasi zsírmennyiséget és eloszlást jellemző paraméterek között (rho): Spearman-féle korrelációs együttható, *: a kiugró értékek elhagyásával

	Leptin		Inzulin		HOMA-IR	
	ρ (rho)	P	ρ (rho)	P	ρ (rho)	P
N=25, *N=24						
IAFxL2	0,78	<0,001	0,22	0,301	0,21	0,307
IAFxL3	0,80	<0,001	0,25	0,23	0,23	0,279
IAForg.xL2	0,79	<0,001	0,15	0,486	0,13	0,524
IAForg.xL3	0,83	<0,001	0,17	0,411	0,16	0,452
SCFxL2	0,53	0,006	- 0,17	0,423	- 0,17	0,431
SCFxL3	0,53	0,006	- 0,21	0,321	- 0,19	0,358
SCForg.xL2	0,61	0,001	- 0,15	0,474	- 0,15	0,4707
SCForg.xL3	0,62	0,001	- 0,13	0,521	- 0,14	0,503
IAF/SCFxL2	0,19*	0,386*	0,41*	0,048*	0,39*	0,060*
IAF/SCFxL3	0,28*	0,182*	0,44*	0,030*	0,39*	0,061*
Inzulin	- 0,01	0,973				
HOMA-IR	0,01	0,973				



6. ábra A szérumszint (μU/ml), valamint a teljes test inzulinérzékenységének (HOMA-IR) alakulása a döntően (az összes zsírszövet több mint 50%-a) szubkután (SC>IAF) és a nagyjából viszcerális (IAF>SC) zsírraktárakkal rendelkező egyedek csoportjaiban, a harmadik lumbális csigolya magasságában készített felvételek alapján.

A grafikus értékelés (**7. ábra**) alapján egy nem-lineáris összefüggés sejthető a szérumszint és a viszcerális zsírmennyiség között (IAF×L2).



7. ábra A leptinszint (ng/ml) változása a kettes lumbális csigolya magasságában meghatározott viszcerális zsírmennyiség (IAF×L2, %) változásának függvényében; Szórásdiagram egyenes illesztéssel és simítással.

Ezt az összefüggést a log transzformált leptinkoncentráció értékek alkalmazásával is vizsgáltuk egy regressziós modellben. A lineáris regresszió analízis alapján a leptinszint szignifikáns korrelációt mutat a zsírszövet mennyiségével, legerősebb meghatározója pedig a viszcserális depó telítettsége (**5. táblázat**), ugyanakkor a zsírdepók egymáshoz viszonyított arányának hatását nem tudtuk kimutatni.

5. táblázat Lineáris regresszió analízis eredményeit összegző táblázat, az egyedszám (N), a determinációs együttható (R^2), valamint a p értékek feltüntetésével.

N=25	R^2		p
IAForg.xL2	0,64	64%	<0,001
IAForg.xL3	0,62	62%	<0,001
IAFxL2	0,62	62%	<0,001
IAFxL3	0,55	55%	<0,001
SCForg.xL2	0,34	34%	0,001
SCForg.xL3	0,35	35%	0,001
SCFxL2	0,27	27%	0,005
SCFxL3	0,27	27%	0,004
IAF/SCxL2	-0,01	-1%	0,406
IAF/SCxL3	-0,04	-4%	0,808

A többszörös lineáris regresszió analízis alapján elmondható, hogy az éhomi inzulinszint ($P=0,982$), illetve a HOMA-IR ($P=0,975$) index érték nem mutatnak összefüggést a szérumban lévő leptinszinttel. Sem az utóbbi paraméterek, sem pedig a szubkután zsírraktárban lerakódott zsírszövet mennyisége ($P=0,99$) nem befolyásolja számottevően a szérumban lévő leptinszint és a viszcserális zsírmennyiség közti összefüggést (**6. táblázat**).

6. táblázat Többszörös lineáris regresszió analízis eredményeit összegző táblázat. Független változóként log transzformált leptinkoncentráció értékek szerepeltek. (EC (β)) becsült regressziós koefficiens; (SE) standard error; (R^2) determinációs együttható.

Változók	EC(β)	SE	P	R^2	p
IAForg.xL2	0,023	0,005	<0,001		
SCForg.xL2	<0,001	0,004	0,990		
				0,621	<0,001
IAForg.xL2	0,023	0,004	<0,001		
Inzulin	0,001	0,024	0,982		
				0,621	<0,001
IAForg.xL2	0,023	0,004	<0,001		
HOMA-IR	0,003	0,109	0,975		
				0,621	<0,001

3.4.3. Megbeszélés

A hasi zsíreloszlás jelentősége

Az emberhez hasonlóan a zsírraktárak telítettségének aránya egyedenként változhat kutyában is, és bár ebben a fajban a különböző elhízástípusokat (szubkután vagy viszcerális) nem definiálták még, ez kiemeli az egyszerű testtömeg mérésen túl, a kondíció becslésére alkalmas módszerek szerepét. Míg a humán irodalom nagy részében a zsíreloszlás elemzésekor az egész szervezet összes zsírdepójának egymáshoz viszonyított arányáról olvashatunk, szubkután zsírtömegként pedig a domináns, gluteális területen felhalmozódott zsírt tekintik, ez kutyák esetében nem jelentős raktár. Kutyában főleg a törzs dorsalis és lateralis területén, valamint a mellkas magasságában felhalmozódó zsír jelentőségét hangsúlyozzák a kondíció megítélésé kapcsán. Ezt tükrözi, hogy a BCS rendszer értékelési szempontjai között is szerepel mellkas és a törzs dorsalis és lateralis oldalán felhalmozódott zsírmennyiség, valamint a törzs alakjának szubjektív bírálata. Mindezek alapján saját vizsgálatunkban a lumbális magasságban mért hasi zsíreloszlást állítottuk párhuzamba a teljes szervezetre jellemző zsíreloszlással. Eredményeink arra mutatnak rá, hogy különbségek írhatók le az egyes egyedekben jellemző zsíreloszlás, tehát a regionalitás szempontjából kutyák esetében is. Bár egy korábbi publikáció szerint a zsírraktárak növekedésével párhuzamosan kezdetben a viszcerális zsír mennyisége nő majd egy plató elérése után az nem telítődik tovább, és így az elhízott állatokban már a szubkután raktárak bővülése jellemző (Bergman 2006), mi nem tudtunk ilyen jellegű következtetést levonni. Saját eredményeink szerint a szubkután raktárak dominanciája nem csak a viszcerális raktár telítődését követően figyelhető meg, a zsíreloszlás, azaz a zsírdepók aránya az egyed kondíciójától (BCS) függetlenül is változhat, ami utalhat döntően szubkután vagy viszcerális irányú zsírraktározásra. Utóbbi egybecseng Ishioka eredményeivel, mi szerint az elhízott kutyák egy részében a viszcerális és a szubkután zsírszövet aránya nőtt, míg másokban ez az arány csökkent (Ishioka et al., 2005a). Ki kell azonban emelni, hogy az általunk végzett vizsgálat elrendezéséből (cross sectional study) adódóan csak tendenciákat figyelhetünk meg, emellett mintáink nem terjedtek ki minden BCS kategóriára, illetve az esetek száma jelentősen különbözött az egyes csoportokban. Pontosabb következtetést az egyes egyedek elhízását követő prospektív vizsgálat eredményeiből lehetne levonni. Eredményeink alapján tendenciózusan ($P < 0,1$) nagyobb mennyiségű viszcerális zsír, illetve össz zsír mennyiség jellemző, mind az L2, mind az L3 magasságában a magasabb kondíciócsoportba tartozó egyedekben. Ezzel szemben a szubkután zsír mennyisége nagyobb egyedi változatosságot mutatott, illetve mennyisége nem különbözött az L2 vagy L3 magasságban készített felvételeken. A zsíreloszlás, tehát a zsírdepók L2 és L3 magasságban mért egymáshoz viszonyított aránya nem mutatott összefüggést az adott

szegmensben mért összsírmennyiséggel, vagy a kondícióbesorolással. Közleményünk megjelenését követően Kobayashi és mtsai is publikálták tapasztalataikat a zsíreloszlás kutya fajban történő meghatározásáról (Kobayashi et al., 2014). Ez a kutatócsoport az ivartalanítás hatására egy év alatt létrejövő zsírtömegnövekedést és a zsíreloszlás változását vizsgálta. Kimutatták, hogy a vizcerális zsír mennyisége csak az L3 magasságában növekszik szignifikánsan, a mellkasi régióban (T6, T9) valamint a törzs caudalisabban helyeződő területén (L5) nem, ami szintén igazolja azt a feltevésünket, hogy a törzs egy meghatározott szeletének CT elemzése alapján képet kaphatunk a vizcerális és szubkután zsírraktár arányáról. A vizcerális depó aránya minden régióban csökken, bár ez csak a mellkasi területeken szignifikáns. Ezek alapján azt feltételezik, hogy az összsírmennyiség növekedésével párhuzamosan a szubkután raktárak telítődése gyorsabb, mint a vizcerális területeké, emellett leírják, hogy az L3 és L5 magasságokban vizsgálva sokkal markánsabb a zsírlerakódás a dorsalis területeken. Ugyanakkor ki kell emelni, hogy összesen 3 állat vizsgálattát végeztek el. Az általunk 25 egyedden végzett mérések alapján egyedileg változik, hogy melyik zsírdepó tartalmazza az összsír nagyobb hányadát, így az ezt meghatározó tényezők felderítése további vizsgálatokat igényel.

A hasi zsíreloszlás és a leptinszint alakulása

A magasabb kondíció csoportok esetében szignifikánsan magasabb szérum leptin koncentrációkat mértünk a vizsgált állatok esetében. Bár az egyes kategóriákon belül a leptin értékek szórása viszonylag nagy volt, aminek magyarázata további vizsgálatokat igényel, nagyságrendileg körülbelül megegyeztek a korábban közölt értékekkel (Ishioka et al., 2007). Szignifikáns pozitív korrelációt állapítottunk meg a szérum leptinszintek és a szubkután zsírszövet által, valamint a vizcerális zsírszövet által elfoglalt területek között is. Ugyanakkor eredményeink alapján a vizcerális zsírszövet mennyisége erősebben befolyásolja a hormonszint alakulását. Mindezek ellenére a leptin szint és az egyes régiókban felhalmozódó zsírmennyiségek aránya között nem találtunk összefüggést. Utóbbi eredmények ellentétesek azokkal a human vizsgálatokból származó eredményekkel melyek szerint a leptin expresszió erősebb a szubkután zsírterületeken, aminek hátterében a régióban megjelenő nagyobb zsírsejtek leptin expressziójára vezetnek vissza (Hube et al., 1996; Montague et al., 1997; Hamilton et al., 1995; Tritos és Mantzoros, 1997; Van Harmelen et al., 1998). Részben magyarázhatja az általunk közölt eredményeket, a kutyában a falciforme hepatitis területén megjelenő zsírszövetben kimutatott erősebb leptin expresszió (Ryan et al., 2010), illetve a depókat jellemző zsírsejtméret beli különbségek is (Wählen et al., 2011). Kutyák esetében kimutatták, hogy a vizcerális depóból származó zsírsejtek nagyobb méretűek, mint a szubkután területeken helyeződő sejtek. A zsíretetés mindkét depó esetében a zsírsejtek növekedéséhez vezet, ugyanakkor a szubkután

zsírraktár esetében a zsírsejt szám és méret növekedés mérsékeltebb, a vizszerális raktár esetében pedig sokkal inkább jellemző az adipocita-méretnövekedés, míg a hiperplázia nem jelentős (Kabir et al., 2011).

A hasi zsíreloszlás és az inzulin érzékenység alakulása

Ismert, hogy vizszerális területeken lerakódó zsír mennyisége szorosan összefügg azokkal a rendellenességekkel melyek inzulin hatásmechanizmusában felléphetnek (Cnop et al., 2002). Kutya modell esetében kimutatták, hogy a vizszerális zsírraktár mennyiségének minimális csökkentésével is javítható az inzulin érzékenység (Lottati et al., 2009). Mások ugyanakkor arról számoltak be, hogy a hasi régióban, de a szubkután területeken lerakódott zsírszövet az inzulin érzékenység fő meghatározója (Goodpaster et al., 1997). Saját eredményeink szerint pozitív korreláció mutatható ki az inzulin koncentráció és a hasi területen található depók arányát leíró mutató között, illetve hasonló trend figyelhető meg a zsíreloszlás és a HOMA-IR index értékek között is, vagyis azokban az állatokban, melyekben a vizszerális zsírdepó nagyobb részt tett ki, rosszabb volt az inzulinérzékenység és magasabb az inzulinszint. Ezek az eredmények egybehangzanak azokkal a human vizsgálatokból származó eredményekkel, melyek szerint a hasi vizszerális és a szubkután zsírraktár aránya szoros összefüggést mutat a metabolikus zavarok kialakulásával (Fujioka et al., 1987). Midezek ellenére, szemben a korábbi publikációkkal, nem tudtuk kimutatni az inzulinszint, illetve a HOMA-IR index érték összefüggését a vizszerális vagy a szubkután zsírszövet mennyiségével.

Leptin, inzulin és teljes test inzulinérzékenység

A leptin képes gátolni az inzulin szekréción, emellett képes gátolni az inzulinhatást (Girard, 1997). Ahogy ezt egér modellben kimutatták, a leptin jelátviteli útjának megzavarása az inzulin szekréció zavarát, ezzel pedig az egész szervezetet érintő inzulin rezisztencia kialakulását is képes előidézni (Levi et al., 2011). Mindemellett az emberben megfigyelhető folyamatokkal némileg ellentétes folyamatokat valószínűsítenek kutyákban végzett elemzések alapján, amik szerint a leptin segíti a inzulinszekréció kompenzatórikus fokozódását elhízott kutyák esetében, illetve a szuprafiziológias leptinszint nem gátolja az inzulin szekréción a normál kondíciójú egyedekben sem (Verkest et al., 2011a). A saját eredményeink alapján, a kutyában mért éhomi inzulin koncentrációk és HOMA-IR index értékek csökkenő tendenciát mutattak a magasabb kondíció csoportokban. Emellett pozitív korreláció mutatkozott a vizszerális és szubkután zsírszövet aránya és az inzulin koncentrációk között, illetve hasonló trended írtunk le a HOMA-IR index értékek esetében is. Mindezek ellenére nem mutatkozott szignifikáns különbség az egyes kondíciócsoportokban mérhető inzulin és HOMA-IR értékek esetében, illetve a leptinkoncentrációk nem mutattak

korrelációt ezekkel a paraméterekkel. Annak ellenére, hogy az inzulin fontos szerepet játszik a leptinszekréció hosszútávú szabályozásában (Malmström et al., 1996), saját eredményeink azt mutatták, hogy a szérum inzulin, illetve HOMA-IR értékek nem meghatározói a szérum leptinszintnek, tehát nem befolyásolják a leptinszint és az egyes zsírraktárak mennyiségének összefüggését. Mivel a szórás értékek emelkedtek mind az inzulinszintek, mind a HOMA-IR index értékek esetében a nagyobb viszcerális zsírmennyiséget mutató állatok esetében, nem mondható ki direkt, inzulinrezisztenciát okozó hatás, ugyanakkor nem zárható ki, hogy a növekvő mennyiségű zsírszövet egyes egyedekben predispozíciós faktora lehet a csökkent inzulinérzékenység kialakulásának. Az elhízott állatok esetében valószínűleg két fokozatról beszélhetünk, ami alapján elkülöníthető lehet egy metabolikus problémákkal terhelt csoport, melynek egyedei esetében endokrin zavarok, vagy fontos kompenzációs mechanizmusok zavart működése jellemző, amely az inzulinérzékenység romlásához vagy az inzulin termelés hiányához vezet. Az elhízott állatok másik csoportjában még csak a pozitív energiamérleg hatásait figyelhetjük meg, amikor a metabolikus egyensúly még megtartott, a zsírraktárak telítettségétől függetlenül, csak az inzulin koncentráció enyhe emelkedése jellemző, ugyanakkor a kompenzációs mechanizmusok működése miatt az inzulinérzékenység csökkenése csak enyhe fokú.

Összegzésként elmondható, hogy a CT felvételek elemzésére kidolgozott módszer segítheti a kutyák elhízásának vizsgálatát, valamint az elhízás hatásainak, különösen a zsíreloszlás és az elhízáshoz köthető metabolikus betegségek összefüggéseinek részletesebb kutatását. Saját vizsgálati eredményeink szerint egyes egyedekben alapvető különbség van a zsírszövet regionalitásának tekintetében. A vizsgált állatok nagy részében a zsírraktárak közel azonos területet foglaltak el az L2, L3 magasságban készített felvételeken, ugyanakkor egyes egyedekben a viszcerális, míg másokban a szubkután depó dominanciáját állapítottuk meg, függetlenül az adott egyed kondíciójától. Eredményeink alapján a leptin koncentrációja összefüggést mutat a zsírszövet lumbális magasságban jellemző eloszlásával, különösen a viszcerálisan helyeződő zsírszövet mennyiségével. A emberrel ellentétben, kutyák esetében a hasüregben lerakódó zsírszövet tűnik a leptinszint fő meghatározójának, míg a hasi területen szubkután lerakódott zsír csak kisebb mértékben befolyásolja azt. Utóbbi ellentmond egyes humán kutatási eredményeknek, azonban egybeesik Ryan és mtsai megállapításával, miszerint kutya fajban a viszcerális zsírszövet leptin expressziója a szérum leptinszint fő meghatározója (Ryan et al., 2010). Ez magyarázható azzal, hogy hízás esetén nagyobb mértékű növekedést mutatnak, így jelentősebb leptin produkcióval jellemezhetőek a viszcerális zsírsejtek (Wählen et al., 2011). A leptinszint mint marker, a testzsírmennyiség jelzése mellett szintén alkalmas lehet zsíreloszlás monitorozására. Szemben a nemrégiben publikált eredményekkel, a viszcerális zsírmennyiség és a leptinszint közötti összefüggést nem befolyásolja számottevő mértékben az éhomi inzulinszint vagy az inzulin érzékenység

foka. Az éhomi inzulinszintek és a HOMA-IR index értékek esetében csökkenő tendencia jellemző a magasabb BCS kategóriába sorolt állatok esetében. Pozitív korreláció figyelhető meg a vizszerálisan és a szubkután területen helyeződő zsírmennyiség aránya és a vérből mérhető inzulinszint, illetve a zsíreloszlást jellemző paraméterek és a HOMA-IR index értékek között, ami szintén a vizszerális zsírdepó jelentőségét emeli ki. További vizsgálatok, így a zsírdepókat jellemző átlagos zsírsejtméret meghatározása, immunhisztokémiai vizsgálatok (Lep, LepR), valamint más metabolikus állapotot jellemző paraméterek vizsgálata tovább segíthetne felderíteni a zsírszövet eloszlásának jelentőségét és hatásait kutya fajban is.

Az emberrel ellentétben, kutya fajban a vizszerálisan lerakódó zsírtömeg a fő meghatározója a mérhető leptinszintnek, míg a hasi bőralatti zsírmennyiség ezt kevésbé befolyásolja. Bár az inzulinrezisztencia fokának vagy az inzulinszintnek az egyes zsírraktárak növekedésével való feltételezett összefüggését nem tudtuk kimutatni, a vizszerális zsírraktár nagyobb arányú telítődésével tendenciaként megfigyelhető az inzulinérzékenység kismértékű romlása. A depóspecifikus különbségek okának vizsgálata a kondíció csoportokon belül végzett felmérésekkel, a raktárakat alkotó zsírsejtek méretének vizsgálatával, a leptin receptorok immunhisztokémiai kimutatásával, valamint a vérminták további elemzésével jövőbeni vizsgálatok témája lehet.

3.5. A zsírsejtek méretének jelentősége kutya fajban

A kutya egyes zsírdepóit alkotó zsírsejtek méretének alakulásairól, valamint ennek metabolikus hatásairól kevés adat áll rendelkezésre, illetve kérdéses, hogy a hiperpláziás és hipertrófiás obezitás megjelenik-e különálló elhízástípusként ebben a fajban. Célul tűztük ki a kutya hasi zsírdepóit alkotó zsírsejtek méretének vizsgálatát, illetve a főbb zsírraktárakat jellemző átlagos zsírsejtméretet egyes metabolikus paraméterekkel mutatott összefüggésének vizsgálatát.

3.5.1. Anyag és módszer

Mintagyűjtés, a hormonszintek, valamint a zsírsejtméret vizsgálat

Vizsgálataink céljából 50 hasúri műtét céljából az Állatorvostudományi Egyetem Kisállatklinikájára érkező, különböző fajtájú szuka kutyák zsír- és vérmintáit gyűjtöttük össze és dolgoztuk fel. Az állatok fajtáját, korát, testsúlyát és kórtörténetét feljegyeztük, illetve 12 egyed kivételével minden esetben 5 pontos skála alapján meghatároztuk az állatok kondícióját (BCS). Az említett 12 egyedből történt mintavételkor, tapasztalt vizsgáló nem tudott jelen lenni. A műteti előkészítés során, a vénakanül behelyezésekor gyűjtöttük, majd tároltuk a vérmintákat, a korábban részletezett (3.3.) módon, figyelembe véve a leptinszint

táplálékfelvétellel összefüggő napi ingadozását, valamint, egyes gyógyszeres kezelések befolyásoló hatását (Ishionka et al., 2002b; Ishioka et al., 2005b). Csak olyan állatokat válogattunk be a vizsgálatba, amelyeknél legalább 10 órás koplaltatást követően történt a vérvétel, illetve amelyek biztosan nem voltak inzulinnal vagy glükokortikoiddal kezelve a vizsgálatot megelőző egy hónapban. A vérvételek, a vércukorszint, valamint a hormonszintek és az inzulinérzékenység meghatározása az előző (3.3. és 3.4.) vizsgálatok esetében részletezett metódus alapján történt.

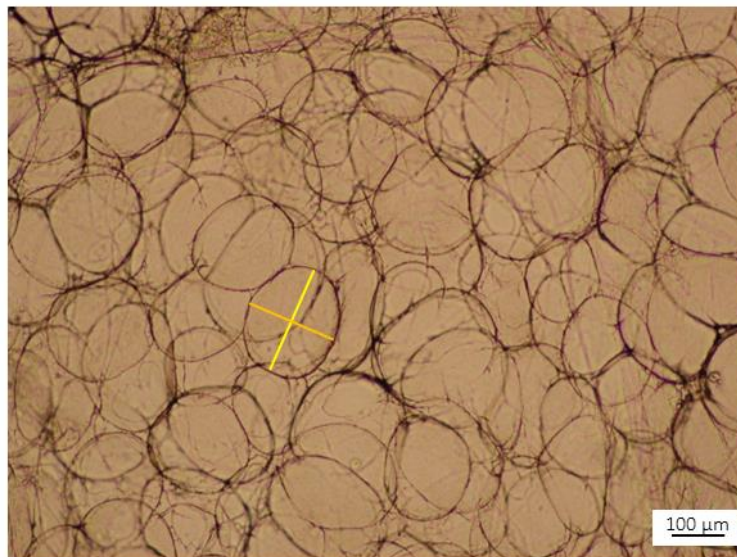
A medián laparotómia során készített seb alkalmas volt arra, hogy további célzott beavatkozás nélkül, a hasüreg megnyitása közben kb. 0,5-0,5 cm³ térfogatú mintát vegyünk a köldök tájéki szubkután, valamint a viszcerális zsírdepókból. Utóbbi esetében a mintákat a ligamentum falciforme hepatis területéről gyűjtöttük. A zsírmintákat további vizsgálatig -86 C°-on, fagyasztva tároltuk. A zsírszövetből fél rízsszemnyi darabokat helyeztünk egy távtartóként cellux csíkokkal ellátott tárgylemezre, majd egy másik tárgylemezzel fedtük. A natív elnyomati zsírminták vizsgálatakor okulármikrométer (kalibrációs lemez), illetve számítógépes software (Image J és Photoshop) segítségével határoztuk meg a zsírsejtek leghosszabb és legrövidebb átmérőjét, majd ezek átlagát használtuk a zsírsejtméret jellemzésére. Egyedenként, minden depó esetében, 100-100 zsírsejt átlagos átmérőjét jegyeztük fel.

Statisztikai értékelés

Az eredmények kiértékelését a Microsoft Excel és R 3.5.1. statisztikai program segítségével végeztük. A szignifikancia szintjét $P \leq 0.05$ értéknél jelöltük meg. Vizsgáltuk a leptin-, az inzulinszint, a HOMA-IR index, valamint a Sc depót alkotó zsírsejtek méretének alakulását a kondíciócsoportokban. Mivel ezek a változók nem mutattak normál eloszlást, az összefüggés vizsgálatára Kruskal-Wallis tesztet, majd páronkénti összehasonlítást végeztünk. Az egyes BCS kategóriákba eső egyedek Visc zsírdepóit alkotó átlagos zsírsejtméretek összehasonlítására egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA, Tukey-féle post hoc-teszttel) alkalmaztunk. A változók, így a BCS kategória, a Sc és Visc zsírsejtméret, és a szérumszintek közötti összefüggés vizsgálatára Spearman-féle korrelációs tesztet végeztünk. Az eredményeket átlag és szórás értékekkel jellemezve mutatjuk be. Hisztogrammon ábrázolva vizsgáltuk az egyes kondíciócsoportokban jellemző zsírsejtméret alakulását, illetve az egyedenként jellemző átlagos zsírsejtméret alakulását az egyes depókban.

3.5.2. Eredmények

Ötven állat 50 Visc és 44 Sc zsírmintájának vizsgálatát végeztük el. Hat állat esetében a metszévonal mentén a Sc területen annyira kevés szövet jelent meg, hogy erről a területről nem tudtunk mintát gyűjteni. A kondícióbesorolás alapján 5 állat került a BCS5, 17 egyed a BCS4, 12 állat a BCS3, illetve 4 egyed a BCS2 kondíciócsoportba. Tizenkét állat esetében a megfigyelésen alapuló kondícióbecslést nem tudtuk elvégezni, így ezen állatok eredményeit csak a leptinszintek vizsgálatakor, valamint a zsírdepókban jellemző zsírsejtméretek összehasonlításakor tudtuk figyelembe venni. A szérum leptinkoncentráció meghatározását, a korlátozottan rendelkezésre álló, hormonszint meghatározásra alkalmas teszt felhasználásával 48 állat esetében tudtuk elvégezni. Harminckilenc vérminta esetében az inzulinérzékenységet jellemző HOMA-IR értéket is meghatároztuk. Az újszerű natív preparátum készítése révén, a zsírsejtméret-meghatározás jól működő és gyors módszeréhez jutottunk (**8. ábra**). Az átlagos zsírsejt átmérőket (átlag \pm szórás) a **7. táblázatban** foglaltuk össze.

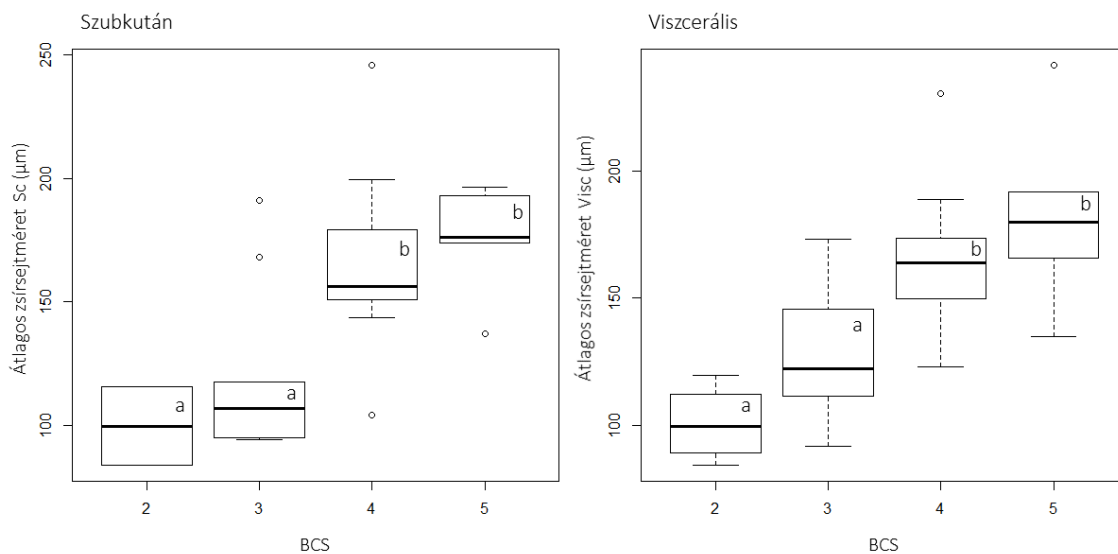


8. ábra Natív, festetlen elnyomati készítményről készített mikroszkópos felvétel számítógépes feldolgozása (x400-os nagyítás). Minden depó esetében rögzítettük 100-100 sejt leghosszabb (citromsárga) és legrövidebb (narancssárga) átmérőjét, majd ezek átlagát használtuk a zsírsejtméret jellemzésére. Az Image J program a méréseket automatikusan excel file-ba rögzítette.

7. táblázat az egyes kondíciócsoportokban (BCS; n:egyedszám) jellemző átlagos zsírsejtátmérők alakulása a szubkután és a viscerális depókban. Az utolsó oszlopokban az Kruskal-Wallis/ANOVA teszt eredményét tüntettük fel.

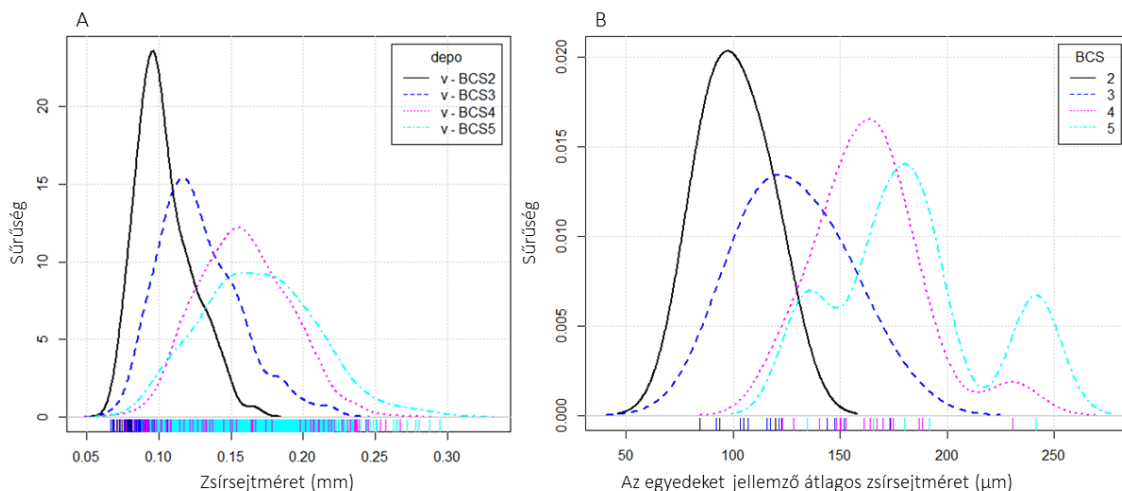
BCS	n	Szubkután (μm)			Viscerális (μm)		
		átlag	szórás		átlag	szórás	
2	4	99,94	22,21	a	100,62	15,2	a
3	12	119,37	33,25	a	128,01	23,49	a
4	17	165,97	31,96	b	163,46	25,2	b
5	5	175,26	23,48	b	182,69	39,23	b

Mindkét zsírdepó esetében elmondható, hogy az átlagos zsírsejtméret tendenciózus összefüggést mutatott a BCS kategóriával (**9. ábra**). A BCS2 és BCS3, valamint BCS4 és BCS5 kondíciócsoportok összehasonlításakor ugyanakkor sem a Sc ($p=0,84$ és $p=0,93$), sem pedig a Visc depókat alkotó zsírsejtek mérete ($p=0,281$ és $p=0,477$) nem különbözött szignifikánsan. A BCS3 és BCS4, BCS5 csoportok között, valamint a BCS2 és BCS4, BCS5 csoportok között szignifikáns különbség mutatkozott mind a Sc ($p=0,008$; $p=0,009$; $p=0,032$; $p=0,019$) és a Visc ($p=0,005$; $p=0,002$; $p=0,001$; $p<0,001$) zsírsejtméretek esetében.

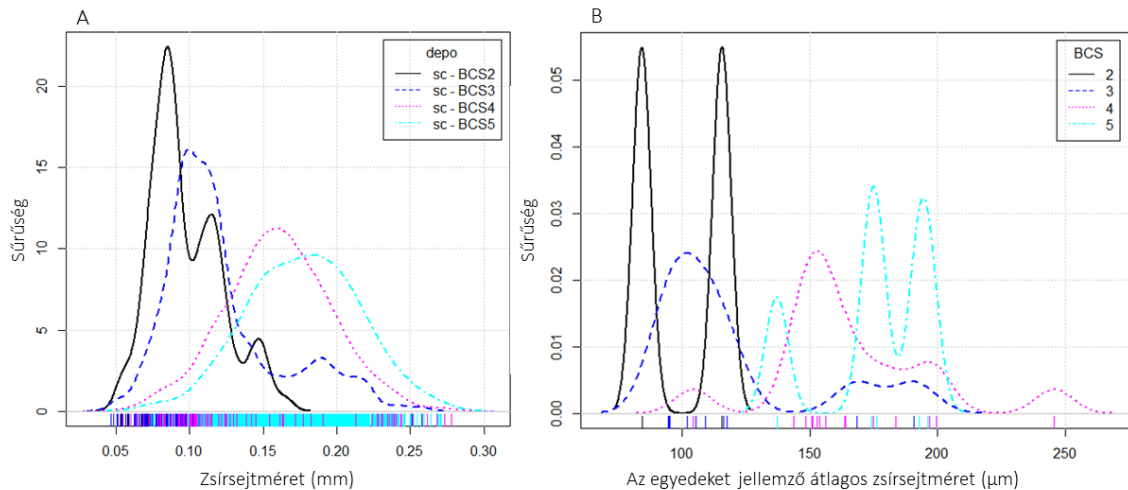


9. ábra A szubkután zsír szövetből, valamint a viscerális területről származó zsírsejtek átlagos méretének (μm) alakulása az egyes kondíciócsoportokban. A doboz ábra (box plot) az interkvartilis terjedelmet, a mediánt, illetve a legkisebb és a legnagyobb értékeket szemlélteti, a körök a kiugró értékeket jelölik. Mindkét depó esetében azt láttuk, hogy a BCS2 és BCS3, valamint BCS4 és BCS5 csoportok között nem volt különbség az átlagos zsírsejtméretek tekintetében, a BCS2-3 valamint BCS4-5 csoportok között azonban szignifikáns különbségeket mutattunk ki.

Páros t-próbával nem mutatkozott különbség egy-egy állat esetében a Sc és Visc zsírdepóban jellemző átlagos zsírsejtméretük között ($p=0,144$), illetve a depók egymáshoz viszonyított arányát az egyes egyedek esetében nem befolyásolja a BCS besorolás ($p = 0.707$). Hisztogramon ábrázolva vizsgáltuk az egyes kondíciócsoportokban jellemző zsírsejtméret alakulását, illetve az egyedenként jellemző átlagos zsírsejtméretük alakulását az egyes depókban (**10. ábra** és **11. ábra**). Sem a Sc, sem pedig a Visc depó esetében nem volt jellemző a különböző méretű sejtpopulációk megjelenése. Minden kondíciócsoport esetében egy-egy bizonyos méretű sejtpopuláció megjelenése volt jellemző. Az egyedeket jellemző átlagos zsírsejtméretük ábrázolása segített annak tisztázásában, hogy az átlagos zsírsejtméretük esetében kapott szélesebb hisztogramok mennyiben jelentik több kisebb sejtpopuláció kialakulását egy adott kondíciócsoportban. Ahogy például a Visc depókat jellemző zsírsejtméretük alakulását vizsgáló grafikonon látható, a BCS5 esetében látható szélesebb hisztogramot az egyedek egymáshoz viszonyított nagyobb eltérései, és nem az egy egyedben belül megjelenő több sejtpopuláció okozta. A Sc raktárak elemzése során kapott grafikonok a nagyobb szórással jellemezhető és kevesebb egyed vizsgálatából származó értékek miatt nehezebben értékelhetőek, ugyanakkor tükrözik az egy kondíciócsoportba sorolt egyedek közötti különbségeket. A kondícióbesorolással szinkronban, tendenciózusan változó zsírsejtméretük mellett egyes egyedekben eltérő lehet az átlagos zsírsejtméretük, így például a BCS5 kondíciócsoportba sorolt egyedek esetében, a Visc depó vizsgálata alapján sejthető az átlagosnál kisebb, vagy nagyobb zsírsejtekkel rendelkező, hipertrófiás elhízással jellemezhető egyedek megjelenése.



10. ábra A vizszerális depóból származó zsírsejtek méretének alakulása az egyes kondíciócsoportokban, valamint az egyes kondíciócsoportokba sorolt egyedek esetében



11. ábra A Szubkután zsírsejtek méretének alakulása az egyes kondíciócsoportokban, valamint az egyes kondíciócsoportokba sorolt egyedek esetében

Meghatároztuk a szérumban leptin- és inzulinkoncentrációk, valamint az inzulinérzékenység jellemzésére használt (HOMA-IR) paraméter alakulását az egyes kondíciócsoportokban (**8. táblázat**).

8. táblázat A szérumban leptin- és inzulinkoncentrációk, valamint az inzulinérzékenység jellemzésére használt (HOMA-IR) paraméter alakulása (átlag és szórás értékek) az egyes kondíciócsoportokban.

BCS	Leptin (ng/ml) n=48		Inzulin (µU/ml) n=39		HOMA-IR	
	átlag	szórás	átlag	szórás	átlag	szórás
2	0,533	0,265	2,580	1,983	1,062	1,566
3	0,960	1,108	2,212	1,907	0,505	0,474
4	9,962	13,177	6,959	9,938	2,389	4,363
5	20,306	16,515	4,877	3,517	3,364	5,138

Míg a szérumban mérhető inzulinkoncentrációk, valamint a HOMA-IR index értékek nem mutattak szignifikáns különbséget az egyes kondíciócsoportokban ($p=0,16$ és $p=0,17$), a szérumban leptinkoncentráció különbözött a 2-4 ($p=0,015$), 2-5 ($p=0,003$), 3-4 ($p=0,003$) és 3-5 ($p=0,001$) BCS csoportok között. A szérumban leptinkoncentráció, valamint az inzulinérzékenység jellemzésére használt (HOMA-IR) paraméter, a kondíció és a zsírdepókat jellemző átlagos zsírsejtméret közötti összefüggések vizsgálatának eredményeit a **9. táblázat** mutatja be.

9. táblázat A szérumb leptinkoncentráció, valamint az inzulinérzékenység jellemzésére használt (HOMA-IR) paraméter, a kondíció és a zsírdepókat jellemző átlagos zsírsejtméret közötti összefüggések vizsgálata Spearman féle korrelációs teszttel. r_s (rho): Spearman féle korrelációs koefficiens; BCS: Body Condition Score; Sc: a szubkután zsírdepót jellemző átlagos zsírsejtméret (μm); Visc: a vizcerális zsírdepót jellemző átlagos zsírsejtméret (μm).

n=50	Szérumb leptin		HOMA-IR		Sc		Visc	
	r_s	P	r_s	P	r_s	P	r_s	P
BCS	0,752	<0,001	0,425	0,027	0,684	<0,001	0,713	<0,001
Szérumb leptin			0,536	0,004	0,739	<0,001	0,747	<0,001
HOMA-IR					0,496	0,009	0,500	0,008
Sc							0,874	<0,001

Az eredmények alapján látható, hogy az inzulinérzékenység meghatározására alkalmazott HOMA-IR paraméter csak gyenge korrelációt mutatott a leptinkoncentrációval, a zsírsejtméret alakulásával és a kondícióbesorolással is; alakulása nem volt erősebben köthető egyik depót alkotó zsírsejtméretre sem. Ezzel szemben a szérumb leptinkoncentráció erősebb korrelációt mutatott a zsírdepókat jellemző átlagos zsírsejtméret alakulásával, valamint a kondícióbesorolással. A két fő zsírdepót jellemző átlagos zsírsejtméret egymással, valamint a BCS kategóriával szoros korrelációban változott.

3.5.3. Megbeszélés

Vizsgálataink erős limitáló faktora, hogy a zsírsejtméret meghatározásánál alkalmazott módszer egyedi volta miatt, a kapott eredmények nem hasonlíthatók össze más módszerek eredményeivel, illetve még nem volt módunk megismerni módszerünk esetleges torzító hatásait. Ugyanakkor ki kell emelni, hogy az általunk kifejlesztett újszerű, natív preparátum készítése révén egy, a zsírsejtméret meghatározása céljából jól működő és gyors módszerhez jutottunk, ami alapján képet kaphattunk az általunk vizsgált egyedek zsírdepóit alkotó zsírsejtek méretéről. A módszer standardizáltnak tekinthető, hiszen közel azonos méretű szövetdarabokat, azonos nyomással tettünk vizsgálhatóvá, további alkalmazása előtt validálását tervezzük. Kimutattuk, hogy a kondícióval és a szérumb leptinszint alakulásával párhuzamosan emelkedik a Sc és a Visc raktárakat alkotó zsírsejtek mérete. Az egyes egyedek esetében nem mutatkozott különbség a depókat alkotó zsírsejtek átlagos méretében, ami részben ellentétben áll a korábban leírtakkal, miszerint a súlygyarapodás kutyák esetében is a zsírsejtek növekedéséhez vezet mindkét depó esetében, ugyanakkor a Sc zsírraktár esetében a zsírsejtszám és zsírsejtméret-növekedés mérsékeltebb, míg a Visc területen nagyobb zsírsejtek alakulnak ki (Kabir et al., 2011). A depókban jellemző

zsírsejtméreték eltérésének hiánya azonban nem mond ellent a korábbi megfigyeléseknek abból a szempontból, hogy a súlygyarapodás során nő a zsírsejtek mérete, ami különösen a Visc depót érintve metabolikus problémák megjelenésére hajlamosít.

Az egyedek átlagos zsírsejtméretei megfeleltek a becsült kondíciónak, tehát a magasabb kondíciócsoportba sorolt egyedek nagyobb zsírsejtekkel rendelkeztek, azonban az egyedek mintáin belül nem figyeltük meg különböző méretű sejtpopulációk megjelenését. Megfigyelésünk tovább bővíti az irodalomban fellelhető, a sejtméreték dinamikus alakulását leíró elméletek körét. A Kabír által leírtak szerint a súlygyarapodás mindkét zsírraktár sejteinek növekedését előidézi, ugyanakkor a Visc területen már a hízás kezdeti szakaszában megjelenik egy normál méretű és egy nagyméretű sejtpopuláció. A Sc területekről származó zsírmintákban a sejtpopulációk alakulása a diéta egyes fázisaiban követte a Visc raktárban megfigyelt dinamikát, azzal a különbséggel, hogy az átlagos sejtméreték kisebbek, később viszont a magas zsírtartalmú diéta további fenntartása esetén már mindkét zsírraktárban jellemző a két sejtpopuláció megjelenése. A magas zsírtartalmú diéta hatására tehát a Visc depóban a zsírsejtek növekedése, azaz hipertrófiája figyelhető meg, míg a Sc raktárban a zsírsejtek mérete nem növekszik ilyen mértékben; ebben a depóban inkább a zsírsejtek számának enyhe emelkedése jellemző. A további zsíretetés hatására a Sc depóban is jellemzővé válik a zsírsejtek méretének növekedése, ami mellett a zsírsejtszám csökkenését is leírták. Utóbbi magyarázatául az inzulinérzékenység romlása és az apoptózis fokozódása szolgálhat. Ugyanakkor mások, leginkább a Visc raktárban megjelenő kisebb zsírsejtekből álló frakció megjelenéséről számoltak be, amit összefüggésbe hoztak a metabolikus problémák kialakulásával (Fang et al., 2015; McLaughlin et al., 2007; McLaughlin et al., 2010).

Bár vizsgálatunk nem terjedt ki a zsírsejtek számának meghatározására, a túlsúlyos egyedekben mi is kimutattuk a kisebb átlagos zsírsejtméret meglétét, ami felveti a lehetőségét annak, hogy kutya fajban is megjelenhet a hiperpláziás obezitás. A korábbi eredményekkel egybehangzóan mi is kimutattuk, hogy a zsírszövetet jellemző cellularitás is alapvetően befolyásolhatja a szérum leptinkoncentráció alakulását (Wählen et al., 2011). Bár a legtöbb humán szakirodalmi cikk a Sc depók vizsgálata alapján vonta le ezt a következtetést, a zsírsejtméret és a szérum leptinszint összefüggését a nagyobb zsírsejtek fokozott leptin-expressziójára vezettek vissza (Hube et al., 1996; Montague et al., 1997; Hamilton et al., 1995; Tritos és Mantzoros 1997; Van Harmelen et al., 1998). Ezzel ellentétben - bár az irodalmi adatok szerint a nagyobb zsírsejtek alakulása összefüggést mutat azok metabolikus funkciójával, ezen keresztül pedig más szövetek romló inzulinérzékenységéhez vezet (Skurk et al., 2007; McLaughlin et al., 2010; Meyer et al., 2013; Wellen és Hotamisligil 2003) - azt vártuk, hogy az inzulinrezisztencia foka erős korrelációt mutat majd a zsírsejtméreték alakulásával. Ennek ellenére csak gyengébb

összefüggést tapasztaltunk, ami más befolyásoló faktorok hatását valószínűsíti, illetve felveti a lehetőségét annak, hogy a HOMA-IR index érték kutya esetében nem elég érzékeny mutatója a metabolikus rendellenességek kialakulásának. Ugyanakkor az értékelést nehezíti, hogy egyes szerzők szerint az inzulinrezisztencia nem a nagy zsírsejtek megváltozott funkciójának tulajdonítható, hanem a többlet energia lipidek formájában történő tárolásának képtelenségéhez köthető, amit a kisebb zsírsejtek populációjának megjelenése igazol (McLaughlin et al., 2007). Annak ellenére, hogy saját vizsgálatunkban a zsírraktárakat jellemző átlagos zsírsejtméret-értékek csak gyengén korreláltak az inzulinrezisztencia fokával, utólag kiderült hogy a legnagyobb zsírsejtekkel rendelkező állat cukorbeteg volt. Utóbbi egyezik a szakirodalommal, mely szerint a hipertrófiás elhízás nagyobb eséllyel vezethet egyes metabolikus diszfunkciók kialakulásához, mint a hiperpláziás obezitás (Ravussin és Smith, 2002; Weyer et al., 2000).

Összességében elmondható, hogy egy klinikai körülmények között is alkalmazható módszert dolgoztunk ki, melynek segítségével képet nyerhetünk a főbb zsírraktárakat alkotó zsírsejtek méretéről. Eredményeink megegyeztek a szakirodalom alapján is egységesnek mondható megállapításokkal, miszerint a szérum leptinszint erősen függ a zsírsejtek méretének alakulásától és az egyed BCS-étől. Nem meglepő módon azonban nem tudtunk meggyőző összefüggéseket leírni az inzulinrezisztencia jellemzésére használt HOMA-IR és a zsírsejtméret, a szakirodalom alapján is ellentmondásos összefüggésével kapcsolatban. Az utóbb említett, valószínűleg sokkal bonyolultabb, több szinten megvalósuló összefüggés vizsgálatában az inzulinérzékenység fokát pontosabban kifejező paraméterek bevezetése, valamint a sejtméreték dinamikus változásának alaposabb vizsgálata jelentheti a továbblépést.

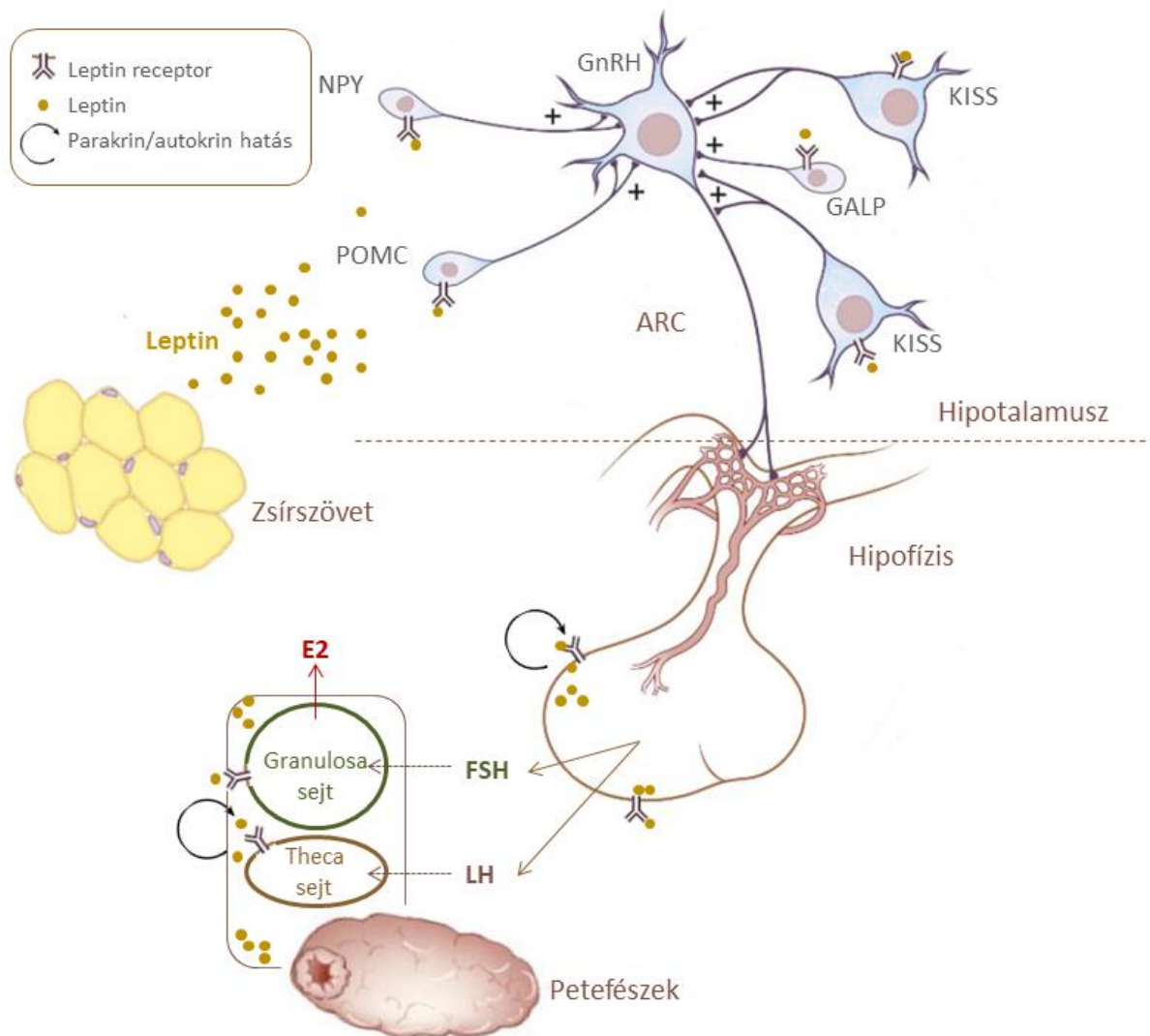
4. A leptin és az inzulinszerű növekedési hormon (IGF1) szerepe a szukák szaporodásbiológiai működésében

4.1. Irodalmi áttekintés

4.1.1. A leptin szaporodásbiológiai szerepe nőivarban

A leptin felfedezését követően szinte azonnal ismertté vált, hogy a leptinhiányos (két mutáns allélt (ob/ob) hordozó) egértörzsek egyedei már fiatal korban elhíznak és infertilissé válnak. A hormon pótlását követően nem csak a táplálékfelvétel és a testsúly csökkenését figyelték meg, hanem az endokrin és reprodukciós státusz jelentős javulását is, ami közvetlen bizonyítéka a leptin szaporodásbiológiai működésben játszott döntő szerepének (Halaas et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995). A mellett, hogy a leptin alapvető jelentőségű a táplálékfelvétel és az energiaháztartás szabályozásában, a hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG) tengely minden szintjén hatva, tehát centrálisan és a periférián megvalósuló hatásokon keresztül egyértelműen bekapcsolódik a szaporodásbiológiai folyamatok szabályozásába (**12. ábra**). Nem meglepő, hogy az alultápláltság, illetve a kalóriamegvonás hatással van a legtöbb endokrin szerv, így a hipotalamusz, a hipofízis, a zsírszövet és a petefészek működésére is anovulációs állapot kialakulásához vezethet (Martin et al., 2008). Az ovuláció kalóriamegvonás esetében megfigyelhető rendellenességei egér és juh modellben is kezelhetőnek bizonyultak leptin adagolása útján, ami a leptin centrális hatásának jelentőségét hangsúlyozza (Henry et al., 2001; Nagatani et al., 1998; Nagatani et al., 2000), ugyanakkor a hipotalamusz-hipofízis mellett feltételezik perifériás, közvetlenül a petefészek szintjén kifejtett hatását is. Nem csak az alacsony, hanem a szuprafiziológiás leptinkoncentrációk is szaporodásbiológiai zavarokhoz vezethetnek, amit az elhízás esetén megfigyelhető nagyobb arányú infertilitás, valamint az asszisztált reprodukciós eljárások csökkent eredményessége bizonyít (Lin et al., 2017; Maheshwari et al., 2007; Mulders et al., 2003).

A **hipotalamusz** gonadotropin-releasing hormon (GnRH) termelő neuronjai nem expresszálnak leptin receptorokat (Finn et al., 1998; Zamorano et al., 1997), ami valószínűsíti, hogy a leptin hatását más, leptin receptorokat expresszáló és a GnRH-termelő neuronokkal szinaptikus kapcsolatban álló interneuronok közvetítik.



12. ábra A leptin hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely egyes szintjein kifejtett hatásai (saját ábra). ARC: nucleus arcuatus, POMC: proopiomelanokortint termelő neuronok, NPY: neuropeptid Y-t termelő neuronok, GALP: Galanin-like peptidet termelő neuronok, KISS: kisspeptin termelő neuronok, GnRH: gonadotropin releasing hormon, LH: luteinizáló hormon, FSH: follikulusstimuláló hormon, E2: ösztadiol

A GnRH termelésért felelős idegsejtek egy része a hipotalamusz nucleus arcuatus (ARC) területén található. A szintén ezen a területen megjelenő proopiomelanokortint (POMC), neuropeptid Y-t (NPY) és Galanin-like Peptidet (GALP) termelő sejtpopuláció esetében is felmerül, hogy ezek a neuronok közvetítik a leptin hatását a GnRH termelő neuronok felé (Crown et al., 2007; Kageyama et al., 2005; Schneider, 2004; Xu et al., 2009b). Ezek mellett a kisspeptin termelő neuronok (Kiss1) szerepét is leírták, amelyek leptin hatásra megnövekedett kisspeptin leadáson keresztül stimulálják a GnRH elválasztást (Quennell et al., 2009; Roseweir és Millar, 2009). A leptin az ARC területén expresszálandó receptorán keresztül csökkenti a NPY (orexigén) és növeli a POMC (anorexigén) expressziót ezzel

befolyásolva a táplálékfelvételt (Friedman és Halaas, 1998; Coll et al., 2007), valamint a GnRH szekréción is (Schneider, 2004; Xu et al., 2009b). Az NPY neuronok a mediális praeopticus régió (MPO) területén helyeződő GnRH neurontestekhez, illetve az eminencia mediána-n át haladó GnRH axonokra csatlakozva gátolják a GnRH-szintézist és felszabadulást (Xu et al., 2009a). A POMC neuronok axonvége az ARC területén van, majd tovább halad az MPO felé ahol a β -endorfin és az alfa- melanocitastimuláló hormon (α -MSH) felszabadulás befolyásolja a GnRH produkciót (Hill et al., 2008). Éhezett patkányokban csökkenő LH mellett csökkent α -MSH-szintet mértek (Watanobe, 2002), ugyanakkor más publikációk szerint az endorfinok gátolják a GnRH szekréción (Crown et al., 2007; Hill et al., 2008). Az ARC-ban lévő GALP neuronok axonjai a MPO területén helyeződő GnRH neuronokra hatva serkentik a GnRH leadást (Kageyama et al., 2005; Crown et al., 2007). A Kisspeptin a GnRH neuronok fő regulátoraként az anteroventralis periventricularis magban (AVPV) és az ARC területén expresszálódik és a GnRH neuronok által expresszált receptorán keresztül hatva, közvetlenül stimulálja a GnRH termelődését (Roseweir és Millar, 2009) emellett a gonadotropinokét is a hipofízisben (Suzuki et al., 2008). Az alacsony leptin- és inzulinkoncentrációk miatt magasabb NPY, csökkent POMC és GALP expressziók gátolják a GnRH termelődését, mindezek mellett az alacsony leptinszint csökkenti a kiss-1 pozitív hatású GnRH termelő neuronokon. A leptinszint emelkedése a növeli a kiss-1-szintet (Hill et al., 2008), a leptin és inzulin együttes növekedése pedig csökkenti a NPY-szintet és emeli a POMC- és GALP-szintet (Juréus et al., 2000), ami visszaállítja a fiziológias GnRH szekréción. (Guzmán-Sánchez et al., 2012). A leptin pozitív hatása a hipofízis szintjén is megvalósul, ahol saját receptorán keresztül direkt, endokrin úton, valamint az elülső leány sejteinek leptin termelése révén auto-/parakrin úton képes dózisfüggően serkenteni az LH, az FSH és a prolaktin felszabadulását is (Jin et al., 2000; Ogura et al., 2001; Watanobe, 2002; Yu et al., 1997). A hipofízis LH termelő sejteinek válaszkészsége ciklusfüggő, és mind GnRH-ra, mind a leptinre adott válasza sokkal intenzívebb – fajtól függően – ösztrogén (E2), vagy progeszteron (P4) jelenlétében. Az LH csúcs közelében mérhető leptin csúcs emberben és patkányban igazolja a leptin aktív szerepét az ovuláció folyamatában, az LH szekréción serkentésén keresztül (Ahrens et al., 2014; Chou et al., 2011; De Biasi et al., 2001; Fenichel et al., 2008; Sir-Petermann et al., 1999, Tanaka et al., 2001). A leptin közvetlenül a periférián is részt vesz a petefészekfunkción szabályozásában, amit több fajban is bizonyít a leptin, illetve a leptin receptor jelenléte a tüsző granulosa és theca sejteiben, magán a petesejten, valamint a sárgatestben (Cioffi et al., 1997; Karlsson et al., 1997; Löffler et al., 2001; Phoophitphong et al., 2017; Ryan et al., 2002; Ryan et al., 2003; Sarkar et al., 2010; Smolinska et al., 2010; Zerani et al., 2004). Ezek alapján nem csak a keringésben megjelenő leptin endokrin, hanem a lokálisan termelődő hormon parakrin/autokrin szabályozó szerepével is számolni kell. A leptin a fejlődő tüszők theca és

granulosa sejtjeinek szteroid termelésére elsősorban negatív hatást fejt ki (Spicer és Francisco, 1997; Spicer és Francisco, 1998; Zachow és Magoffin, 1997), ami nem közvetlenül a gonadotropin hormonok, hanem a gonadotropin és az inzulinszerű növekedési faktorok együttes serkentő hatásának gátlásán keresztül nyilvánul meg (Agarwal et al., 1999; Spicer és Francisco, 1997; Zachow és Magoffin, 1997). Ezzel ellentétes eredmények is születtek humán vizsgálatokban, ami szerint a leptin stimuláló hatással van a tüsző granulosa sejtjeinek ösztrogén termelésére azok aromatáz aktivitásán keresztül (Kitawaki et al., 1999). Sertésekben, a leptin dóziszfüggő hatásáról számoltak be, vagyis kis mennyiségben serkentette, míg magas koncentrációban gátolta a granulosa sejtek szteroid hormon termelését (Ruiz-Cortés et al., 2003). Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a fiziológiásnál magasabb leptinkoncentráció valószínűleg negatívan befolyásolja a domináns tüsző ösztrogéntermelő képességét, az androgén szubsztrátok képződésének gátlásán és a granulosa sejtek aromatizáló képességének csökkentésén keresztül, bár ezek a hatások állatfajonként némileg eltérőek lehetnek. Újabb tanulmányok szerint a leptin szerepet játszik a sárgatest kialakulásában is az angiogenezis támogatásán és a progeszterontermelés serkentésén keresztül (Garcia, 2017).

A fent említett centrális és perifériás hatásokkal párhuzamosan a leptinkoncentráció menstruációs ciklussal összhangban történő ingadozását is megfigyelték. Nőkben a szérumban a leptinkoncentráció emelkedését írták le a ciklus 14. napján az ovuláció idején, valamint a 21. napon a luteális fázisban, ami alapján feltételezik mind az ösztrogén, mind pedig a progeszteron leptinkoncentrációt befolyásoló hatását (Ajala et al., 2013; Hardie et al., 1997; Riad-Gabriel et al., 1998). Bár egyes szerzők szerint a nemi hormonok nem befolyásolják a leptinkoncentráció alakulását (Kristensen et al., 2000, Mannucci et al., 1998), több publikáció alapján a megemelkedett leptinkoncentráció forrása a zsírszövet, amelyben a magas ösztrogénkoncentráció a zsírsejtek által kifejezett ösztrogén receptorokon keresztül fokozza a leptin termelődését (Ajala et al., 2013; Messinis et al., 1998; Yamada et al., 2000). Mások szerint az emelkedett szérumban a leptinkoncentráció forrása részben maga a petefészek is lehet (Messinis et al., 1998). Bár a sárgatest leptin termelő képességét már több fajban is igazolták (Ahrens et al., 2014; Archanco et al., 2003; Balogh et al., 2012; Kumar et al., 2012; Löffler et al., 2001; Sarkar et al., 2010), máig nem bizonyított, hogy a sárgatest által termelt leptin számottevő mennyiségben bejuthat-e a véráramba.

A leptin szaporodásbiológiai hatásait szuka kutyában eddig kevesen vizsgálták. A leptinnek és receptorának jelenléte a petefészekben a sárgatest különböző fázisaiban, valamint a vemhes méhben és placentában a hormon parakrin/autokrin, illetve endokrin szabályozó szerepét valószínűsíti (Balogh et al., 2012; Balogh et al., 2015). Ezzel összhangban a vérben mérhető leptinkoncentráció is szignifikánsan megemelkedik a vemhesség alatt kutyában (Cardinali et al., 2017). Nem vemhes szukákban a ciklusstádium plazma leptinkoncentrációra

gyakorolt hatását Saleri és mtsai (2003) vizsgálták, és a humán tanulmányokkal részben ellentétben, az ösztroz alatt szignifikánsan magasabb leptinszinteket mértek, mint proösztrozban vagy diösztrozban. A vizsgálat, bár nagy létszámú (n=81), hasonló méretű és testsúlyú állaton történt, kutyánként egyszeri vérvételen alapult, és az egyes ciklusstádiumok elkülönítésére használt módszert a szerzők nem részletezték. Ezen kívül, míg az előzőekben említett tanulmányok nem találtak különbséget a szukákban és a kanokban mért leptinkoncentrációk között, Saleri és mtsai szignifikánsan magasabb koncentrációkat mértek az ivari ciklus anösztroz fázisában lévő szukákban, mint kanokban (Saleri et al., 2003).

4.1.2. Az IGF1 szaporodásbiológiai szerepe nőivarban

A leptin mellett más metabolikus szignálok is képesek befolyásolni a reprodukív axis működését ilyen például az inzulin, vagy az IGF1. Bár az IGF1 pontos szerepe a mai napig nem tisztázott, alapvető fontosságát bizonyítja, hogy a génkiütött, IGF1-hiányos egerek főleg gonadális defektusok miatt infertilisek (Baker et al., 1996), emellett az IGF1-szállítófehérjék egyes típusainak (IGFBP1-6) megváltozott expressziója, a szabad IGF1 vérszintjének befolyásolásán keresztül jelentős hatással van a reprodukív axis neuroendokrin funkcióira (Wolfe et al., 2014). Mind a centrális (májban), mind pedig a periférián termelődő IGF1 képes hatni a GnRH termelő neuronokon kifejeződő IGF1R-okra, ezáltal befolyásolva a pubertást, majd az ivari ciklust. A IGF1R expresszálódik és funkcionális szereppel bír a hipofízis gonadotrop sejtjein is. A több egymásnak ellentmondó publikáció közül egyesek szerint valószínűsíthető, hogy ez a metabolikus faktor képes serkenteni az LH-szintézisét és szekrécióját (Wolfe et al., 2014).

A petefészekben zajló folliculogenezist alapvetően a reprodukív axis felsőbb régiói irányítják gonadotropinokon (LH, FSH) keresztül, ugyanakkor a folyamatot a helyileg ható para- és autokrin faktorok is jelentősen befolyásolhatják. Bár utóbbiak pontos szerepe kevésbé ismert, több növekedési faktorról, köztük a fibroblaszt növekedési faktorról (FGF), az epidermális növekedési faktorról (EGF), vaszkuláris endoteliális növekedési faktorról (VEGF), valamint a növekedési hormonnál (GH) és az inzulinról is leírták, hogy expresszálódhatnak kutya petefészekben, a folliculusokban, valamint in vitro vizsgálatok során igazolták, hogy ezek serkentik a tüszőérést és -túlélést (Serafim et al., 2015; Serafim et al., 2013; Songsasen et al., 2017; Thongkittidilok et al., 2017). Más emlős fajoktól eltérően, kutyában az IGF1 tüszőérésben, valamint a sárgatest-funkció szabályozásában játszott szerepe kevésbé tisztázott. A kutya preovulációs tüszőiből kinyert folliculáris folyadékban megjelenő IGF1-koncentráció pozitív korrelációt mutat a plazmában mérhető IGF1-szinttel, illetve az LH csúcsot megelőző időszakban az intrafolliculáris P4

koncentrációval is pozitívan korrelál (Reynaud et al., 2010). Mindezek alapján feltételezhető, hogy az IGF1 stimulálhatja a tüszőbeli P4 produkciót. Az IGF1, valamint receptorának kifejeződését a petefészekben kutya esetében még nem igazolták, ugyanakkor sertésben az IGF1 mRNS szintű, ciklusfüggő megjelenését leírták a sárgatest kis lutein sejtjeiben (Gadsby et al., 1996). Szarvasmarha esetében, az IGF1 és az IGF1R upregulációjáról számoltak be a nagyobb antrális folliculusok granulosa és theca interna, valamint a korai sárgatest sejtjeiben (Schams et al., 2002), ami alapján az IGF1-nek a tüszőérés végső fázisában, valamint a sárgatest kialakulása során játszott szerepe valószínűsíthető, melyre példaként szolgálhat a *granulosa* és *theca* sejtproliferáció serkentése (Mani et al., 2010; Spicer és Echterkamp, 1995; Stewart et al., 1995). Emberből, szarvasmarhából, sertésből, valamint egérből származó granulosa, granulosa-lutein, valamint luteális sejt kultúrákon, az IGF1 önmagában, valamint a gonadotropin hormonokkal szinergizálva is serkentette a P4 és az ösztrogén szintézist (Devoto et al., 1999; Gregoraszcuk és Ptak, 2005; Mani et al., 2010; Schams et al., 2001; Spicer és Echterkamp, 1995). Az IGF1 szteroidprodukcióna képes sejtek P4 leadását serkentő hatása a szteroidogén akut szabályozó fehérje (steroidogenic acute regulatory protein - StAR) expressziójának fokozásán keresztül érvényesül (Devoto et al., 1999; Manna et al., 2006; Sekar et al., 2000), mely a koleszterin-transzport meghatározójaként alapvetően befolyásolja a sejtek szteroidhormon-produkcióját. Ugyanakkor az IGF1-nek a petefészek szintjén megvalósuló hatása valószínűleg a sárgatest fejlettségétől is függ. Ezt bizonyítja az a kísérletsorozat, amiben az IGF1 csak a fiatal sárgatestből származó sertés lutein-sejtek progeszterontermelését volt képes fokozni in vitro körülmények között, míg ez a pozitív hatás érett sárgatestből származó luteinsejt-kultúrában már nem volt megfigyelhető (Gregoraszcuk és Ptak, 2005). Az IGF1 nem csak a sejtproliferációt és a szteroidogenezist serkenti, de önmagában és LH-val együtt is képes fokozni a *granulosa* és a luteális sejtek VEGF expresszióját és szekrécióját, ezen keresztül pedig fokozni az angiogenezist (Schams et al., 2001; Stanek et al., 2007; Tropea et al., 2006).

4.2. Célkitűzések

Immunhisztokémiai módszerek segítségével részletesen feltérképeztük a leptinnek és receptorának fehérje szintű megjelenését a petefészek sejtjeiben, különös tekintettel az eddig kevésbé vizsgált tüszőfázisban megjelenő struktúrákra (4.3.). Szuka ivari ciklushoz köthető hormonális változásai és a kondíció szérumban leptinkoncentrációra kifejtett együttes hatásának vizsgálata során elemeztük a szérumban leptinszint változását szuka kutya ciklusa során (4.4.). Ezek mellett vizsgáltuk az IGF1 és az IGF1R génexpresszióját és fehérjeszintű

megjelenését a petefészkben vemhes és nem-vemhes állatokból származó sárgatesteken, illetve ezen fehérjék sejtszintű lokalizációját a preovulációs folliculusokban (4.5.).

4.3. A leptin és a leptin receptor fehérje szintű megjelenése a kutya petefészkében

A leptin (Lep), mint az egyik legfontosabb metabolikus szignál, hatását a hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely minden szintjén kifejti. Nőivarban több faj vizsgálata alapján feltételezik szerepét a folliculogenezis, valamint az ovuláció folyamatában, a tüsző és a sárgatest szteroidhormon-produkciójában. Kutyák esetében a leptin és a leptin receptor (LepR) fehérjeszintű megjelenéséről a petefészkben először Sorace és mtsai számoltak be (Sorace et al., 2006), majd Balogh és mtsai vizsgálták részletesebben a fehérje- és génexpressziókat kifejezetten a luteális fázisra, illetve a sárgatestre koncentrálnak (Balogh et al., 2012; Balogh et al., 2015). Mivel ezen vizsgálatok eredményei nem mutattak teljes egyezést, leginkább a LepR expresszióját illetően, célul tűztük ki a Lep és LepR fehérjeszintű expressziójának immunhisztokémiai módszerrel történő vizsgálatát felnőtt, egészséges, a ciklus proösztroz és ösztroz stádiumában járó kutyákból (n=4) származó petefészkek szöveteken.

4.3.1. Anyag és módszer

A későbbi immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzésére kiválasztott petefészekmintákat az Állatorvostudományi Egyetem Szülészeti klinikáján elvégzett rutin ivartalanítások során gyűjtöttük egészséges, ivarérett (n=4, 2-6 éves korú, különböző fajtájú) szukákból, melyek klinikai tünetek, hüvelykép és hüvelycitológia alapján a proösztroz-ösztroz időszakában jártak. A szövetmintákat 24 órán át 10%-os pufferolt formaldehid oldatban +4°C-on tároltuk, ezt követően napi rendszerességgel pufferolt foszfát puffer oldatban öblítettük egy héten át, majd a dehidráció céljából felszálló alkoholsort használtunk, végül pedig parafinba ágyazva (Kowalewski et al., 2010) kerültek további vizsgálatra.

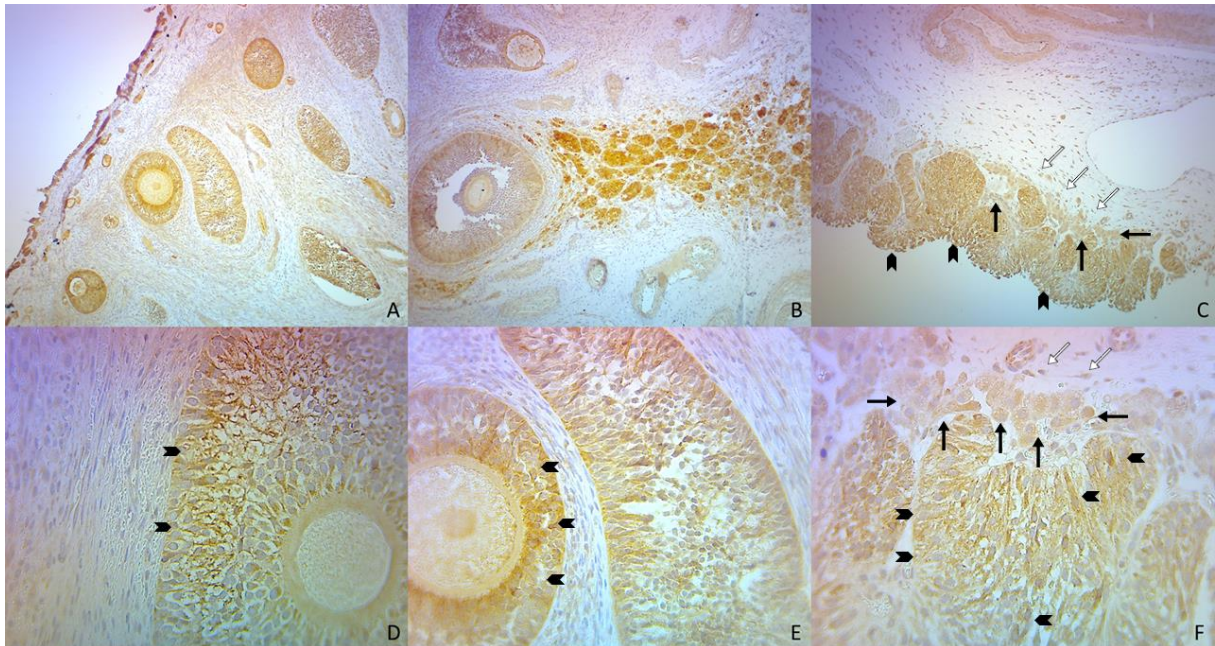
Immunhisztokémiai vizsgálatok

A vizsgálataink során a rutin szövettani festéssel (hematoxillin-eozin) készített metszetek alapján igazoltan folliculáris fázisban eltávolított petefészkekből származó preparátumokat immunhisztokémiai vizsgálatoknak vetettük alá, melyek során a fehérjék (Lep, LepR) kimutatására indirekt immunperoxidáz módszert alkalmaztunk (Kowalewski et al., 2006a). Az erre a célra készült, 2-3 µm vastagságú metszetek, 3-amino-propil-trietoxi-szilánnal („APES”-sel) előkezelt, SuperFrost Plus típusú ún. szilanizált-tárgylemezekre kerültek (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany). Ezt követően legalább 12 órára 37 °C-os termosztátba helyeztük

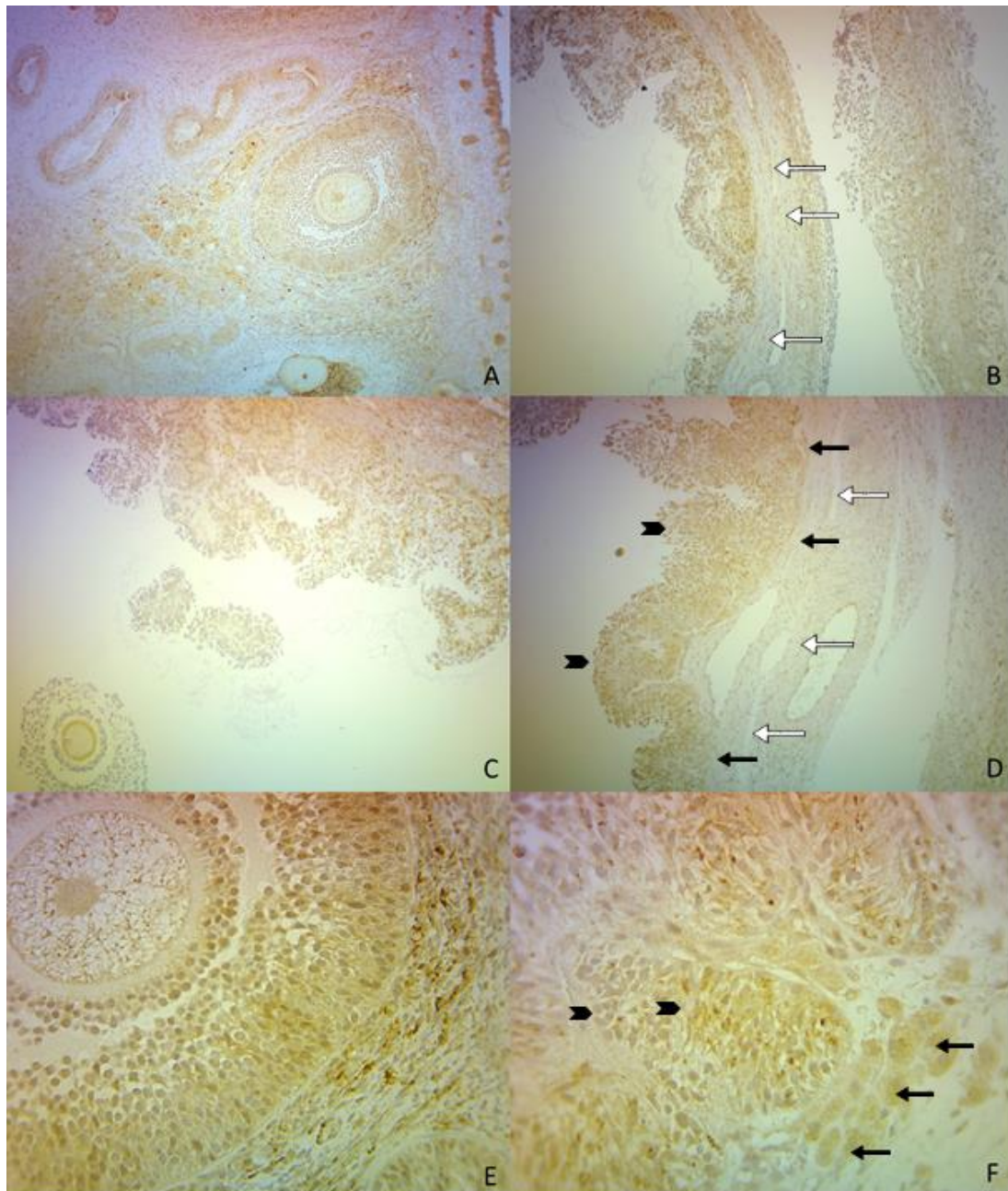
őket. A mintákat ezek után deparafináltuk, ehhez 2 x 10 percre xilolba merítettük, majd leszálló (5 percig 100%-os majd 5 percig 70%-os végül 5 percig 50%-os) alkoholsorozaton vittük végig, végül desztillált vízzel öblítettük le a metszeteket. Ezt követte az antigén feltárás, amit hővel (mikrohullámú sütő segítségével) végeztük, 10 mM citrát pufferben (pH 6.0) 15 percig 100°C-on kezeltük a mintákat. A következő lépésben az endogén peroxidáz aktivitás blokkolása céljából a lemezeket 0.3% hidrogén peroxidot tartalmazó metanolba merítettük. Az aspecifikus kötőhelyek blokkolását 1.5% albuminnal, valamint a Lep esetében 10%-os kecske szérummal (KPL, Gaithersburg, USA), a LepR esetében pedig 10%-os ló szérummal végeztük (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Az immunhisztokémiai vizsgálatok során, a Leptin kimutatására nyúlban termeltetett poliklonális antitestet (ARP41697_P050, Aviva Systems Biology, San Diego, USA), míg a LepR jelölésére kecskében termeltetett poliklonális antitestet használtunk (Ob-R (M-18): sc-1834, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) 1:500, illetve 1:150 hígításban. Ezeket az antitesteket korábban már sikeresen alkalmazták kutya szöveteken (Ressel et al., 2012; Balogh et al., 2015). Az utóbbi antitest alkalmas mind a rövid, mid pedig a hosszú receptorformák jelölésére. A primer antitesttel történő inkubáció +4°C-on, egy éjszakán át történt. Az indirekt immunreakció során, a jelöletlen primer antitest kötődését a primer antitest ellen termeltetett, biotinnel konjugált antitesten keresztül mutattuk ki. Biotinilált kecske anti-nyúl IgG-t vagy lóban termelt anti-kecske IgG-t (Vector Laboratories) használtunk 1:100 hígításban szekunder antitestként. A jel erősítését avidin-biotin peroxidáz (ABC) rendszer alkalmazásával (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) értük el, kromogénként pedig 3'3-diaminobenzidint (DAB) (Liquid DAB+ substrate Kit, Dako Schweiz -AG, Baar, Switzerland) használtunk. Végül kontrasztfestést végeztünk hemalaun oldattal, majd felszálló alkoholsorral víztelenítettük és fedtük a metszeteket. Izotípus kontrollként primer antitest nélkül alkalmaztuk az anti-nyúl (Lep) vagy az anti-kecske (LepR) IgG-t (Vector Laboratories).

4.3.2. Eredmények

A metszetek mindegyikében nagy számban jelentek meg preantrális és antrális folliculusok a ciklusstádiumnak megfelelően. A Lep legerősebben a folliculusok granulosa sejtjeiben festődött (++) . Ennél kevésbé erős de határozott festődést mutattak a theca interna sejtjei (+), ugyanakkor a theca externa sejtjeiben és magában a petesejtben már csak gyengébb festődést (+/-) figyeltünk meg (**13. ábra**). A LepR erős festődést mutatott a folliculusok granulosa sejtjeiben, a theca interna sejtekben és magában a petesejtben (++) (**14. ábra**). Ezen kívül a vérerek fala (tunica interna, tunica media) is pozitívan festődött mind a Lep-re, mind a LepR-ra.



13. ábra A Lep expresszió immunhisztokémiai vizsgálata kutyából származó preovulációs folliculusokban (nagyítás A,B,C 200X, D,E,F 400X); erős immunfestődés a növekvő preovulációs folliculusok granulosa sejtjeiben (GC) (++)(fekete, vastagabb nyilak), valamint a theca interna sejtjeiben (TIC) (+)(fekete nyilak). Az immunfestődés ugyanakkor gyengébb (+/-) a theca externa rétegben (TEC) (fehér nyilak).



14. ábra A LepR expresszió immunhisztokémiai vizsgálata kutyából származó preovulációs folliculusokban (nagyítás A, B, C, D 200X, E, F 400X); erős immunreaktivitás detektálható a preovulációs folliculusok GC (fekete, vastagabb nyilak) és a TIC (fekete nyilak) rétegében, valamint magában a petesejtben (++) míg a TEC (fehér nyilak) rétege nem festődik.

4.3.3. Megbeszélés

A Lep és a LepR megjelenése magán a petefészkben mára több faj esetében is bizonyítottá vált (Ryan et al., 2003; Ryan et al., 2002; Sarkar et al., 2010; Smolinska et al., 2010; Zerani et al., 2004; Löffler et al., 2001; Cioffi et al., 1997), ami túl azon a korábbi elméleten, miszerint a leptin a hipotalamusz-hipofízis-gonád axis több pontján is befolyásolja a petefészek működését, kutya esetében is felveti a petefészekben, vagy az azt közvetlenül övező zsírszövetben (bursa ovarica), illetve a Sc vagy egyéb Visc zsírszövetben termelődő leptin autokrin/parakrin és endokrin hatásának lehetőségét. A leptin receptor a petefészek több sejtípusán is megjelenik, és több fajban is igazoltan expresszálják a theca, és a granulosa sejtek, illetve a petesejt is (Karlsson et al., 1997; Ryan et al., 2003). Bár maga a leptin mRNS nem volt kimutatható a petesejtekben, ugyanakkor a fehérjeszinten történő megjelenése alapján feltételezhető, hogy a más szövetekben, így leginkább az oocitát körülvevő sejtekben termelődő leptin bejut a petesejtbe (Cioffi et al., 1997), ugyanakkor a szérumból származó leptin is bejut és akkumulálódik a petefészek szövetében (Almog et al., 2001). Annak ellenére, hogy a leptinnek az ovulációs rátát csökkentő in vivo és in vitro hatásáról is beszámoltak patkányban (Duggal et al., 2000), több publikáció is bizonyítja a leptin sokrétű szerepét az ovulációt elősegítő folyamatokban. Egyrészt a preovulációs folliculusokat körülvevő theca sejtek nagy arányban fejeznek ki leptin receptorokat, egérből származó folliculusok esetében pedig leírták, hogy a leptin hatékonyan serkenti a petesejt érési folyamatát (Ryan et al., 2002). További befolyásoló hatásként a leptin képes serkenteni az ovuláció idejében fontos szerepet játszó makrofágok citokinprodukciónak, fagocitózisát, tehát ezek alapján fontos szerepe lehet az ovulációhoz és a sárgatest kialakulásához köthető gyulladási folyamatokban (Brännström és Norman, 1993; Santos-Alvarez et al., 1999; Loffreda et al., 1998). Mindezeket túl segíteni képes a corpus luteum kialakulását azáltal, hogy serkenti az angiogenezis folyamatát is (Ryan et al., 2003). A leptin, valamint receptorának megjelenését és funkcióját a petefészkben sokkal behatóbban vizsgálták a luteális fázis alatt. Szarvasmarha petefészek vizsgálatakor leírták, hogy a sárgatest Lep és LepR expressziója magasabb a sárgatest fázis középső időszakában, majd a sárgatest regressziója alatt csökken, vemhesség alatt viszont végig magas marad. A folliculáris fázis alatt a legintenzívebb Lep és LepR koexpressziót a theca interna és a granulosa sejteken a kisebb folliculusok esetében tapasztalták, majd ennek csökkenéséről számoltak be a folliculusok növekedése során (Sarkar et al., 2010). Macskákban is vizsgálták a LepR kifejeződésének változását az ivari ciklus, illetve a vemhesség alatt. Kimutatták, hogy a macska petefészke minden ciklusstádium alatt expresszál LepR-t, ugyanakkor az expresszió ebben a fajban is a luteális fázisban a legintenzívebb (Albrizio et al., 2013). Kutya esetében először Sorace és mtsai vizsgálták immunhisztokémiai módszerrel a Lep és a LepR

jelenlétét prepubertális és ivarérett, nem vemhes állatok petefészkében. A leptin erősen festődött az ovulációt megelőző időszakban a tüsző luteinizálódó granulosa sejtjeiben, valamint az ovulációt követően a sárgatest lutein sejtjeiben. A ciklus többi fázisában, valamint prepubertális állatokból gyűjtött petefészkekben a leptin gyenge festődését mutatták ki a preantrális tüszők *granulosa* és *theca* sejtjeiben. A leptin receptor festődését a petesejtben, és a proösztroz fázisban a növekvő tüszők granulosa és theca sejtjeiben mutatták ki, míg a sárgatest nem festődött (Sorace et al., 2006). Később Balogh és mtsai mRNS szinten kimutatták a Lep mellett a LepR expresszióját is kutya sárgatesteken. Míg nem vemhes állatokban a LepR expresszió foka nem változott a luteális fázis során, a Lep kifejeződése intenzívebb volt az ovulációtól számított 15-35. nap között. Ez az időszak egybeesik a magasabb szérum progeszteronkoncentrációkkal, valamint a magasabb StAR protein mRNS expresszióval, ami a leptin szteroidhormon-produkció szabályozásában betöltött auto/parakrin szerepének lehetőségét veti fel. Vemhes szukákban a sárgatest Lep és a LepR génexpressziója nem változott, ugyanakkor a leptin receptor antagonistája (AGRP) adagolását követően 72h órával jelentősen csökkent a Lep expressziója, míg a LepR nem változott (Balogh et al., 2012). Az utóbbi változás párhuzamba állítható az AGRP által előidézett luteolízissel, hiszen eközben jelentősen csökken a szteroidproduktó meghatározó StAR protein expressziója, illetve a 3β -hydroxysteroid dehidrogenáz mRNS expresszió. Bár kutyában a folliculáris fázist eddig nem vizsgálták részletesen, más fajokban végzett in vitro tesztek alapján leírták, hogy a leptinnek kifejezett közvetlen hatása van a granulosa, valamint a theca sejtek működésére. Saját vizsgálatunk során a legerősebb Lep expressziót a folliculusok granulosa sejtjeiben és a zona pellucida (ZP) területén detektáltuk, ugyanakkor szintén határozott festődést láttunk a theca interna sejtjeiben. A theca externa sejtjeiben és magában a petesejtben már csak gyengébb reakciót láttunk. Bár önmagában a fehérje megjelenése nem igazolja a leptin szerepét a folliculáris szteroidogenezisben vagy az ovuláció folyamatában, felveti a lehetőségét, hogy a többi állatfajban részletesebben megismert szabályzó folyamatok kutya fajban is hasonlóan működnek.

Számos vizsgálat során igazolták, hogy a szuprafiziológiás leptinkoncentráció képes gátolni a granulosa sejtek és a theca sejtek szteroidhormon-produkcióját. Utóbbi eredmények elsődlegesen szarvasmarhából származó sejtek in vitro vizsgálatából származnak (Spicer és Francisco, 1997; Spicer et al., 2000; Spicer és Francisco, 1998), ugyanakkor hasonló megfigyelésekről számoltak be több más faj, így ember (Agarwal et al., 1999; Brannian et al., 1999), patkány (Zachow és Magoffin, 1997), juh (Campbell et al., 1999) és sertés (Ruiz-Cortés et al., 2003) petefészkek vizsgálata alapján is. Ezzel szemben a fiziológiás leptinszint stimuláló hatást fejtett ki a sertés granulosa sejtek szteroidogenezisére (Ruiz-Cortés et al., 2003) IGF1 jelenlétében és hiányában egyaránt. Túl a gonadotropinok ismertebb hatásain, a

follikulogenezis folyamatát több parakrin/autokrin faktor is befolyásolja, így az FGF, EGF, VEGF, továbbá a GH vagy az inzulin. Ezek egy része a follikulusokban is expresszálódva, vagy a follikulusok növekedését segítve vesz részt a folyamatban, így nem lehet kizárni annak a lehetőségét, hogy a leptin ezen faktorok szintjét befolyásolva, közvetett hatást fejt ki a tüszőfázis során. Bár a sárgatestfázisban jellemző szteroidprodukciónak talán részletesebben vizsgált szakasz, a konkrét mechanizmus, amin keresztül a leptin befolyásolni képes a sárgatest szteroidprodukciónak nem tekinthető teljesen ismertnek. Humán és patkány vizsgálatokban kimutatták, hogy a leptinkoncentráció pozitív korrelációt mutat a progeszteronszinttel a luteális fázis alatt (Duggal et al., 2002; Hardie et al., 1997). Feltételezhető, hogy a leptin direkt és indirekt úton, tehát egyes metabolikus hormonok, így például a növekedési hormon, az inzulin, vagy az IGF1 hatásának modulálásán keresztül is befolyásolja a szteroidogenezis folyamatát. Szarvasmarhából származó luteális sejteken végzett vizsgálat szerint a leptinnek önmagában nincs hatása, azonban IGF1-gyel szinergista hatással segíti a P4 produkciót (Nicklin et al., 2007). Más szerzők arról számoltak be, hogy a leptin képes gátolni az IGF1 szteroidogenezist serkentő hatását humán *granulosa* sejteken és *theca* sejteken, valamint patkány *granulosa* sejteken is (Zachow és Magoffin, 1997; Agarwal et al., 1999). In vitro vizsgálatok szerint a leptin a helyileg termelődő IGF1-gyel kölcsönhatásban segíti a progeszteronszintézist (Ruiz-Cortés et al., 2003), amit szintén alátámaszt, hogy szarvasmarha esetében az IGF1 és a leptin mRNS expresszió együttes erősödéséről számoltak be a luteális fázisban (Sarkar et al., 2010).

4.4. A szérumban leptinkoncentráció változása a szuka kutya ivari ciklusa során

Müller L, Kók E, Kollár E, Balogh O*, Thuróczy J*: A vérérszék leptinkoncentráció változása az ivari ciklus és a testzsírmennyiség függvényében szuka kutyában – Irodalmi áttekintés és saját tapasztalatok.

MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA 141 (7) pp. 411-424. (2019)

Célul tűztük ki az ivari ciklushoz köthető hormonális változások és a kondíció szérumban leptin koncentrációra kifejtett együttes hatásának vizsgálatát beagle fajtájú szuka kutyákban. A kondíció pontosabb meghatározása céljából a testsúly és a BCS meghatározása mellett morfometriás méréseket és bioimpedancia mérést is alkalmaztunk, melynek eredményeit egy korábbi fejezetben foglaltuk össze (3.3.).

4.4.1. Anyag és módszer

Egy vizsgálati elrendezésben vizsgáltuk a morfometriai és bioimpedancia mérések leptinszinttel mutatott összefüggését, valamint utóbbi ciklusfüggőségét, ezért az egyedszám

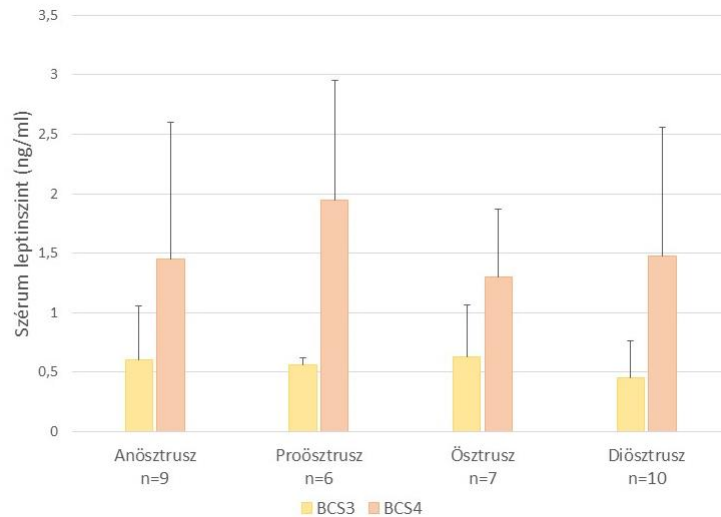
alakulásával, vérvételekkel, mintakezeléssel kapcsolatban utalunk a 3.3. vizsgálatnál már ismertetett metodikai lépésekre. Az állatok fizikális vizsgálatát és a mintavételeket a várható tüzelési időszak kezdete előtt két héttel, illetve a már tüzelő szukáknál a tüzelés ideje alatt kezdtük, majd kéthetes időközönként, összesen 3 alkalommal ismételtük. A különböző szaporodásbiológiai fázisokba (proösztusz, ösztusz, diösztusz, anösztusz) a külső nemi szervek állapotának klinikai vizsgálata, a hüvelyből vett citológiai minta és a vér progeszteron koncentrációja alapján soroltuk be az állatokat. A hüvelycitológiai mintákat Diff-Quick festés után az irodalmi adatoknak megfelelően értékeltük (Johnston et al., 2001). A tüzelés klinikai tüneteit mutató állatokat a hüvelycitológiai vizsgálat eredményének figyelembevételével soroltuk proösztuszba vagy ösztuszba. A tüzelés klinikai tüneteit nem mutató állatoknál a szérum progeszteronkoncentráció alapján tettünk különbséget anösztusz és diösztusz között (2 ng/ml progeszteron koncentráció alatt anösztusz).

A mélyhűtött szérumból történő hormonszint-meghatározások az Állatorvostudományi Egyetem Szülészeti Tanszék Klinikai laboratóriumában történtek. A progeszteron koncentrációt ELISA módszerrel, Quanti Check Progesterone kittel végeztük (érzékenység 0,2 ng/ml, inter- és intra-assay CV: $\leq 4,5\%$ és $\leq 5,25\%$). A leptin koncentrációt a korábban ismertetett módszerrel határoztuk meg. Az eredmények kiértékelését a Microsoft Excel, R 3.5.1. statisztikai program, valamint az IBM® SPSS® Statistics for Windows 22.0 verzió (Armonk, NY, USA) statisztikai programcsomag segítségével végeztük. A szignifikancia szintjét $P \leq 0,05$ értéknél jelöltük meg. A BCS3 kondíciócsoportban két állat esetében mindhárom mérési időpontban kiugró leptin értéket mértünk (átlag 8,2 és 4,14 ng/ml), ezen egyedek eredményeit a korábban ismertetett okból kizártuk a statisztikai elemzésekből. Mivel az egyedek ciklusa nem volt szinkronban, nem minden egyedről tudtunk mindhárom alkalommal mintát gyűjteni, ezért az ivari ciklusstádium, a progeszteronszint, valamint a kondíció (BCS) szérum leptin koncentrációra gyakorolt hatásának vizsgálatához egy általános lineáris kevert modellt használtunk, melyben random faktorként szerepelt az állat azonosítója, így figyelembe tudtuk venni, hogy egy-egy állaton több mérés történt. A modellben a leptinkoncentrációk normáltól eltérő eloszlása miatt azok természetes alapú logaritmusával dolgoztunk.

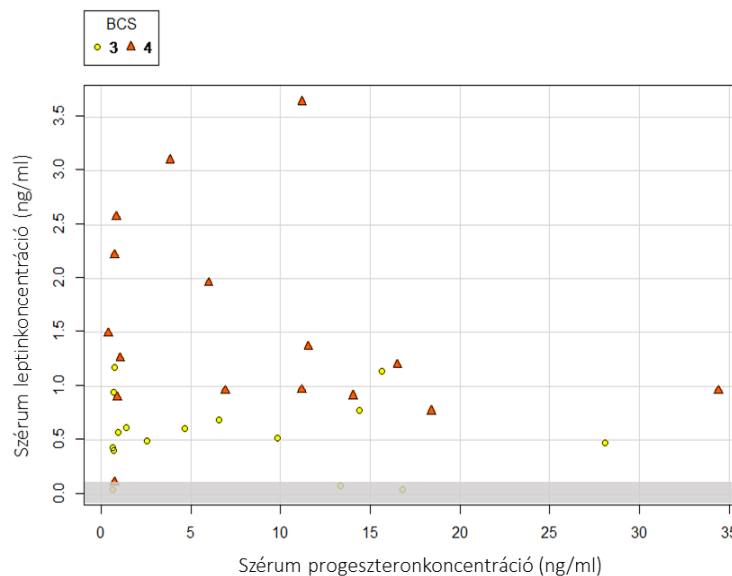
4.4.2. Eredmények

Az elvégzett klinikai és hüvelycitológiai vizsgálatok, valamint vérből történő progeszteron koncentráció meghatározás alapján 9 anösztuszos (szérum progeszteron $0,73 \pm 0,09$ ng/ml), 6 proösztuszos (szérum progeszteron $1,70 \pm 1,26$ ng/ml), 7 ösztuszos (szérum progeszteron $9,18 \pm 4,20$ ng/ml) és 10 diösztuszos (szérum progeszteron $17,52 \pm 7,86$ ng/ml) minta vizsgálati eredményeit értékeltük a kiugró értékeket mutató 2 egyed kizárása

után. A lineáris kevert modell eredményei alapján, sem a ciklusstádium ($P=0,745$; **15. ábra**), sem pedig a progeszteronszint ($P=0,587$; **16. ábra**) befolyásoló hatását nem tudtuk igazolni, ugyanakkor a 3.3. vizsgálat eredményeinek megfelelően, a BCS szignifikáns hatását ($P\leq 0,003$) ki tudtuk mutatni.



15. ábra. A szérumban lévő leptin koncentráció (ng/ml) alakulása az ivari ciklusstádium szerint. Az oszlopdiaagramok az átlag és szórás értékeket szemléltetik.



16. ábra A szérumban lévő leptin- (ng/ml) és -progeszteronkoncentráció (ng/ml) összefüggésének alakulása az egyes kondíciócsoportokban (BCS3, BCS4). A szürke sávban ábrázolódó értékek a legalacsonyabb kimutatható koncentráció (0,2 ng/ml) alá estek. A lineáris kevert modellek alapján a progeszteronszint nem befolyásolta a szérumban lévő leptinkoncentrációt ($p = 0,587$), ugyanakkor a kondíció (BCS) szignifikáns hatása ($P=0,002$) kimutatható volt.

4.4.3. Megbeszélés

Vizsgálataink során tanulmányoztuk a szuka kutyák ivari ciklusa során bekövetkező hormonális változások vér leptin koncentrációra gyakorolt hatásait. Célul tűztük ki az eredményeink irodalmi adatokkal történő összehasonlítását, a lehetséges befolyásoló tényezők, valamint a mérési lehetőségek összegzését. Bár a szakirodalom meggyőző abban a tekintetben, hogy a leptin elsődlegesen tápláltsági markerként alkalmazható, szintjét befolyásolhatja az ivari ciklus is. Vizsgálatunkban az ivari ciklusstádium és a szérum progeszteron koncentráció a kutya szérum leptin koncentrációra gyakorolt hatását nem tudtuk igazolni. Eredményeink nem támasztják alá Saleri és munkatársai (2003) megállapítását, akik szuka kutyában szignifikánsan magasabb szérum leptin koncentrációkat mértek ösztrozsban, mint proösztrozsban és diösztrozsban (Saleri et al., 2003). Más szerzők emberben és patkányban kimutatták a folliculáris fázisban termelődő ösztrogén leptin koncentrációt növelő hatását, amit a zsírszöveti leptin génexpresszió emelkedésével magyaráztak. A leptin szerepét a preovulációs LH csúcs stimulálásán keresztül az ovuláció elősegítésében látták (Mannucci et al., 1998; Shimizu et al., 1997; Tanaka et al., 2001). Bár az általunk gyűjtött proösztrozsos mintákból mért leptin értékek hasonlóak voltak a többi ciklusstádiumban jellemző értékekhez, a mintagyűjtés gyakorisága miatt (kéthetes időköz) egy preovulációs LH csúcs körüli leptinkoncentráció emelkedést sem megerősíteni, sem elvetni nem tudunk. Míg nőkben a luteális fázisban is leírták a szérum leptin koncentráció emelkedését (Ajala et al., 2013, Hardie et al., 1997), azt általunk vizsgált beagle kutyákban nem tapasztaltunk emelkedést a diösztrozs fázisában. A szérum leptin- és progeszteronkoncentrációk között sem találtunk összefüggést, ami arra enged következtetni, hogy kutyában a magas progeszteron koncentráció vagy nincs hatással a zsírszövet leptintermelésére, vagy pedig az általunk használt mérési módszerrel ez a hatás nem mutatható ki. Egy másik kutatócsoport ezzel szemben a szérum leptinkoncentráció szignifikáns emelkedéséről számol be szuka kutyákban a vemhesség idején (Cardinali et al., 2017), amikor a vérben mérhető progeszteronkoncentrációk hasonlóképpen magasak, mint nem vemhes állatokban a diösztrozs idején (Concannon, 2011). Vemhes szukák esetében ugyanakkor, a zsírszövet mellett, a méh és placenta leptin termelése (Balogh et al., 2015) is hozzájárulhat a megemelkedett leptinkoncentrációhoz. Kutyában a leptin génexpressziója a sárgatestben is kimutatható mind vemhes, mind nem-vemhes állatokban (Balogh et al., 2012), az ott termelődő leptin szisztémás keringésbe jutásáról, és így annak esetlegesen a vérbeli leptin koncentrációt növelő hatásáról azonban nincsenek adatok. A saját és más kutatócsoportok eredményei közötti különbségek valószínűleg a vizsgálatba vont kutyák fajtájával, a mintaelemszámmal, az állatok élettani stádiumával, illetve a leptin mérésére használt módszerbeli különbségekkel magyarázhatóak.

Az irodalmi adatokhoz hasonlóan szignifikáns különbséget mutattunk ki a túlsúlyos és normál kondíciójú (BCS3 es BCS4) szuka kutyák szérum leptin koncentrációi között (ld. 2.3.), ugyanakkor nem tudtuk igazolni sem az ivari ciklusstádium, sem a szérum progeszteron leptin koncentrációra gyakorolt hatását. Ennek háttérében az alacsony mintaelemszám és 2 hetes mérési gyakoriság mellett, a vártnál alacsonyabbnak mért, az alacsony hőmérsékletet, vagy a hosszabb koplaltatási periódus hatását is tükröző leptin koncentrációk is állhatnak. Saját és a szakirodalomban található adatok is megerősítik, hogy az általunk használt, a piacon elérhető ELISA kittel végzett mérések alapján a normál, illetve sovány kondíciójú egyedek leptin koncentrációi alacsonynak bizonyultak, illetve egy részük esetében az eredmények a teszt mérési tartományán kívül esnek. Ebből kifolyólag lehetséges, hogy a kisebb, mint például az ivari ciklussal összefüggő koncentrációbeli különbségek nem észlelhetők.

4.5. Az IGF1 valamint receptorának expressziója a kutya petefészekben

Balogh O, Müller L, Boos A, Kowalewski MP, Reichler IM.: Expression of insulin-like growth factor 1 and its receptor in preovulatory follicles and in the corpus luteum in the bitch.

General and Comparative Endocrinology
Volume 269, 1 December 2018, Pages 68-74

Bár az IGF1-nek a preovulációs folliculusok fejlődésének folyamatában játszott szerepe már tisztázódott kutya fajban is, a petefészekben jellemző, IGF1 és IGF1R expresszió celluláris lokalizációja és időbeni változása nem ismert. Ennek feltérképezése fontos lehet, hiszen ezeken keresztül jelentős szerepet bír a para-/autokrin hatás érheti a petefészek sejtjeit a folliculáris fázis során. Emellett az IGF1 helyi, luteotrop hatását is valószínűsíthetjük mind vemhes, mind nem vemhes állatokban, különösen a formálódó, korai, még a gonadotrop hormonok hatásától függetlenül fejlődő sárgatestben. Mindezek alapján célul tűztük ki az IGF1 és az IGF1R fehérje és mRNS-szintű expressziójának vizsgálatát vemhes, középideős vemhesség mellett agleprisztonnal kezelt, valamint nem vemhes, diösztruszban vizsgált állatokból származó sárgatesteken, illetve vizsgáltuk az említett fehérjék celluláris lokalizációját a preovulációs folliculusokban.

4.5.1. Anyag és módszer

Mintagyűjtés

Folliculáris fázisban, rutin ovariohisterektómia során eltávolított, ivarérett, egészséges, keverék kutyákból (15-30 kg) származó petefészkek (n=5) vizsgálatát végeztük el. Az

Állatorvostudományi Egyetem beteganyagából választott állatok tulajdonosai, a műtéti beleegyező nyilatkozat aláírásával hozzájárultak az eltávolított szövetek vizsgálatához. A szukák a műtétet megelőző fizikális vizsgálat során tüzelésre utaló tüneteket (péra ödéma, savós-véres váladék ürülése a hüvelyből) mutattak. A műtéti előkészítés során, a vénakanül beültetésekor vérmintát gyűjtöttünk az állatokból, amiből ELISA (Quanticheck® Progesterone, Veterinorg Kft., Budapest, Hungary; érzékenység 0,5 ng/ml, intra-assay CV: ≤5,25%; (Nagy et al., 1998; Tibold és Thuróczy, 2009) módszerrel meghatároztuk a szérum progeszteronszintet. A vizsgálatba volt egyedek szérum P4-szintjei a 0,52 és 2,19 ng/ml közötti tartományba estek. A sárgatestetek elemzésére korábbi, engedéllyel rendelkező (II 25.3-19c20-15c GI 18/14 and VIG3-19c-20/15c GI 18,14 (Justus-Liebig University Giessen, Giessen, Germany); 2006/06 (University of Ankara, Ankara, Turkey) vizsgálatok (Kowalewski et al., 2009; Kowalewski et al., 2006a) céljából gyűjtött mintákat használtunk, melyek szintén keverék, közepes testmretű, egészséges, ivarérett, 2-8 éves szukákból származtak. Az ovuláció időpontját a szérummintákból, a 4. vizsgálat esetében ismertetett módszerrel mért progeszteronszintek alapján határoztuk meg (P4~5 ng/ml (Bouchard et al., 1991). A petefészkeket, a nem-vevhes állatok esetében 5, 15, 25, 35, 45, 65 nappal az ovulációt követően (n=4-5/csoport), vevhes állatok esetében pedig a vevhesség 8-12. (preimplantáció, n=5), 18-25. (posztimplantáció; n=5), 35-40. (középidő; n=5) napján, valamint az ellést megelőzően jelentkező luteolízis időszakában (n=3; P4 <3 ng/ml, három egymást követő 6 óránként levett mintában) végzett rutin műtét (ovariorrektómia) során kerültek eltávolításra. Ezek mellett további két csoportban, középidőben (40-45 napos) P4-receptor blokkoló, aglepriszton adagolásával (Alizin®; Virbac, Carros Cedex, France; 10 mg/kg sc., 2 alkalommal 24 óra különbséggel) indukált luteolízist követően, 24 (n=5) és 72 (n=5) órával a második injekció után elvégzett ovariorrektómia során eltávolított sárgatesteket vizsgáltunk. A vevhes, nem-vevhes/luteális fázisban lévő, valamint az agleprisztonnal kezelt csoportok egyedeinek szérum progeszteron eredményei korábban publikálásra kerültek (Kowalewski et al., 2009; Kowalewski et al., 2010; Kowalewski et al., 2011b). A génexpressziók meghatározása céljából a vevhes, az agleprisztonnal kezelt, valamint a nem-vevhes/luteális fázisban járó egyedekből származó petefészkekből kimetszett sárgatesteket (CL) RNAlater® oldatban (Ambion Biotechnologie GmbH, Wiesbaden) konzerváltuk és 24 órán át +4°C-on, majd -80°C-on tároltuk az RNS megőrzése céljából. A immunhisztokémiai vizsgálatok céljára gyűjtött mintákat (CL és hosszában kettévágott petefészek) 24 órán át 10%-os pufferolt formaldehid oldatban +4°C-on tároltuk, majd napi rendszerességgel pufferolt foszfát puffer oldatban öblítettük egy héten át, majd víztelenítés céljából felszálló alkoholsort alkalmaztunk. Ezt követően a minták végül parafinba ágyazva kerültek további vizsgálatra (Kowalewski et al., 2010).

Az IGF1 és az IGF1R génextpressziójának vizsgálata petefészkén

A minták teljes RNS tartalmát TRizol® reagens (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) alkalmazásával izoláltuk. Ezt követően DNS-áz kezelést végeztünk a genomiális DNS eliminálása érdekében (RQ1 RNase-free DNase; Promega, Dübendorf, Switzerland), majd a minták RNS tartalmának reverz transzkripcióját az Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) reagensivel, saját protokoll szerint (Kowalewski et al., 2006a) végeztük, random hexamerek mint primerek használatával. A szemikvantitatív valós idejű (TaqMan) PCR reakciót 96 lyukú lemezen, ABI PRISMTM 7500 Sequence detekciós rendszerrel (Applied Biosystems) végeztük, korábban leközölt protokoll szerint (Kowalewski et al., 2011a; Kowalewski et al., 2006a; Nowaczyk et al., 2017). Fast Start Universal Probe Master (ROX®) (Roche Diagnostics AG, Schweiz) mellett, a 3' végen egy fluoreszcens aktivitású jelző (reporter) festékkel 6-carboxyfluorescein-nel (FAM), valamint az 5' végen kioltó (quencher) festékkel carboxytetramethyl-rhodamine (TAMRA) ellátott TaqMan próbát alkalmaztunk a primerek jelölésére, valamint korábban már alkalmazott primer-eket használtunk (Kautz et al., 2014; Kowalewski et al., 2006a). Canine *IGF1R* (GenBank accession no. XM545828): forward primer: 5'-GGA CGT TGA GCC TGG CAT T-3'; reverse primer: 5'-CAC TCT TAG CCC CAC GGA TGT-3'; TaqMan probe: 5'-AGC CCT GGA CGC AGT ATG CGG-3' (amplicon length 119bp) (Canine specific TaqMan gene expression assay for IGF1 (Prod. No. Cf02627846_m1, Applied Biosystems). Belső kontrollként a kutya-specifikus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; GenBank accession no. AB028142) valamint cyclophyllin A (Prod. No. Cf03986523-gH; Applied Biosystems) referenciagének amplifikációját végeztük el, szintén primerpárok és TaqMan fluoreszcens szonda segítségével. GAPDH forward primer: 5'-GCT GCC AAA TAT GAC GAC ATC A-3'; reverse primer: 5'-GTA GCC CAG GAT GCC TTT GAG-3'; TaqMan probe: 5'-TCC CTC CGA TGC CTG CTT CAC TAC CTT-3' (75bp hosszú oligonukleotid). Ezeket a TaqMan rendszerekkel végzett PCR vizsgálatokat szintén korábban már leírt protokoll szerint végeztük (Kautz et al., 2014; Kowalewski et al., 2006a). A polimeráz láncreakció hatékonysága közel 100% volt, amit a gyártó által javasolt, korábban már alkalmazott CT slope (meredekség) módszerrel számítottunk ki (ABI PRISMTM 7500 Sequence Detection System; Kowalewski et al., 2011a). Minden minta elemzését két párhuzamossal futtattuk. RT-mínusz, vagyis reverz transzkripció nélküli minták, illetve non-template kontroll, vagyis cDNS helyett steril vizet tartalmazó minták futtatásával ellenőriztük a reakciók DNS kontaminációját. Az amplifikáció eredményeként kapott DNS minták identitását szekvenálással ellenőriztük. Az eredményeket Ct (cycle threshold) értékek formájában kaptuk, mely mindig azt a reakcióciklusszámot jelöli, ahol a relatív fluoreszcenciaszint eléri az általunk beállított küszöbértéket, a reakció exponenciális fázisában. Az expresszióváltozások kimutatására, szintén gyártói ajánlásra, a $\Delta\Delta Ct$ módszert alkalmaztunk, az irodalmi leírásnak megfelelően, a $\Delta\Delta Ct$ értékekből pedig

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ számítással kaptuk a relatív génexpresszióváltozás értékeit (ABI PRISMTM 7500 Sequence Detection System; Kowalewski et al., 2011a és 2011b; Kowalewski et al., 2006a).

Immunhisztokémiai vizsgálatok

A folliculusok, valamint a sárgatestek sejtjeiben megjelenő IGF1 és IGF1R fehérjék kimutatására indirekt immunperoxidáz módszert (Kowalewski et al., 2006a) és nyúlban termeltetett poliklonális antitesteket (bs-0014R és bs-0227R; Bioss Inc., Woburn, MA, USA) alkalmaztunk. A sárgatestek esetében mindkét antitestet 1:200 arányban hígítottuk, míg a folliculáris fázisból származó mintákhoz 1:350 hígítású IGF1 és 1:400 hígítású IGF1R antitestet használtunk. A metszetek készítésének és előkészítésének lépései megegyeztek a 4.3 vizsgálat esetében bemutatott módszertannal. Szekunder antitestként biotinilált kecske anti-nyúl IgG-t (Vector 11 Laboratories, Burlingame, USA) használtunk 1:100 hígításban. A kontrasztfestést Mayer féle hematoxillin oldattal végeztük. Izotípus kontrollként primer antitest nélkül alkalmaztuk az anti-nyúl IgG-t (Vector Laboratories). Az IGF1 és IGF1R kimutatásra használt antitesteket korábban már sikeresen alkalmazták kutya szöveteken (Kautz et al., 2014; Müller et al., 2017).

Statisztikai értékelés

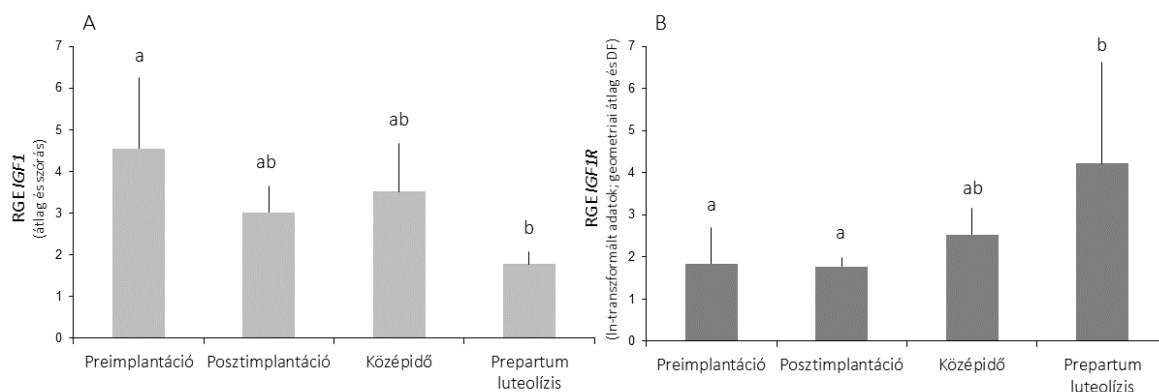
Egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA), azt követően pedig Tukey-féle honestly significant difference (HSD) post-hoc tesztet használtunk a mért vagy logaritmikusan transzformált adatok, azaz csoportokban mérhető IGF1-t és IGF1R-t jellemző relatív génexpressziók összehasonlítására. Amennyiben az adatok reziduálisainak eloszlása nem követte a normál eloszlást, a Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztuk. Az eredményeket átlag \pm szórás formájában vagy logaritmikusan transzformált adatok esetében a geometriai átlag és annak szórásaként (deviációs faktor (DF)) tüntettük fel, a szignifikancia szintként pedig a $P \leq 0.05$ értéket jelöltük meg. A statisztikai elemzést SPSS szoftver segítségével végeztük (IBM® SPSS® Statistics for Windows, Version 22.0 (Armonk, NY, USA)).

4.5.2. Eredmények

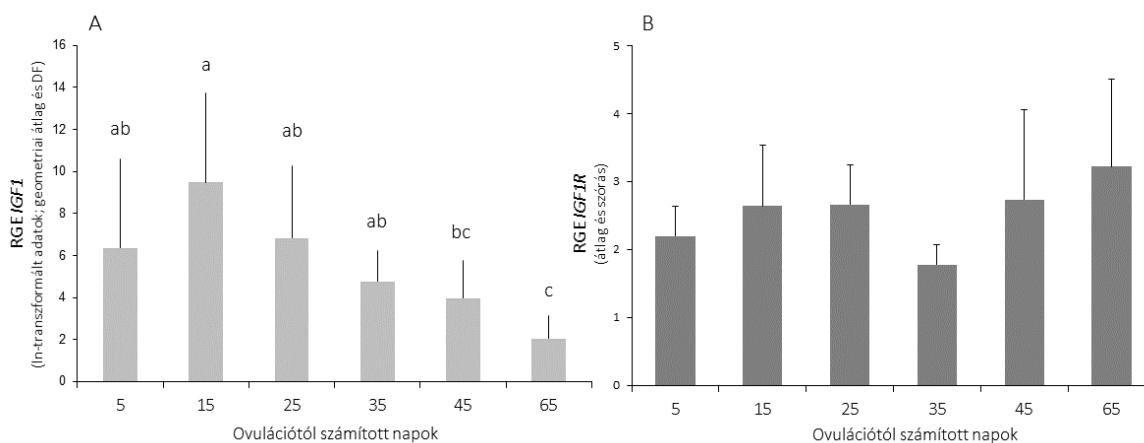
IGF1 és IGF1R génexpresszió a sárgatestben

A vemhes állatokban a legmagasabb IGF1 mRNS expressziót a preimplantációs időszakban detektáltuk, majd ennek szintje szignifikánsan csökkent ($P = 0,025$) a prepartum luteolízis idejére (**17. A ábra**). Ezzel szemben az IGF1R gén expressziója szignifikánsan nőtt a prepartum luteolízis időszakában az implantációt megelőző és az azt közvetlenül követő időszakhoz viszonyítva ($P \leq 0,009$; **17. B ábra**). A középidős vemhesség időszakában agleprisztonnal kezelt és kezeletlen egyedek esetében nem különbözött az IGF1, valamint IGF1R génexpresszió ($P = 0,5$, $P = 0,61$), tehát a P4 receptorok antagonizálása nem befolyásolta a vizsgált gének expresszióját. A nem-vemhes, luteális fázisban járó egyedek

esetében, a legmagasabb IGF1 mRNS koncentrációt a luteális fázis első felében mértük, majd ennek kifejeződése fokozatosan csökkent az ovulációt követő 45. naptól a 65. napig ($P \leq 0,042$; 18. A ábra), ugyanakkor az IGF1R génexpresszió nem változott szignifikáns mértékben a luteális fázis során ($P = 0,205$; 18. B ábra).



17. ábra A sárgatestben kimutatható IGF1 (A) és az IGF1R (B) génexpresszió változása a vemhesség egyes szakaszaiban. RGE: relatív génexpresszió. Az IGF1 esetében az átlagokat és szórás értékeket tüntettük fel az oszlopdiaagrammon, míg az IGF1R expressziójának alakulását az adatok ln-transzformációját követően geometriai átlag és szórás (deviációs faktor (DF)) formájában ábrázoltuk. Az eltérő feliratú oszlopok esetében a különbség szignifikancia szintje $P < 0.05$.



18. ábra A sárgatestben mérhető IGF1 és IGF1R génexpresszió változása a luteális fázis során nem-vevő kutyában. A sárgatestben kimutatható IGF1 (A) és az IGF1R (B) génexpresszió változása a nem-vevő luteális fázis során. RGE: relatív génexpresszió. Az IGF1 expressziójának alakulását az adatok ln-transzformációját követően geometriai átlag és szórás (deviációs faktor (DF)) formájában ábrázoltuk, míg az IGF1R esetében az átlagokat és szórás értékeket tüntettük fel az oszlopdiaagrammon. Az eltérő feliratú oszlopok esetében a különbség szignifikancia szintje $P < 0.05$.

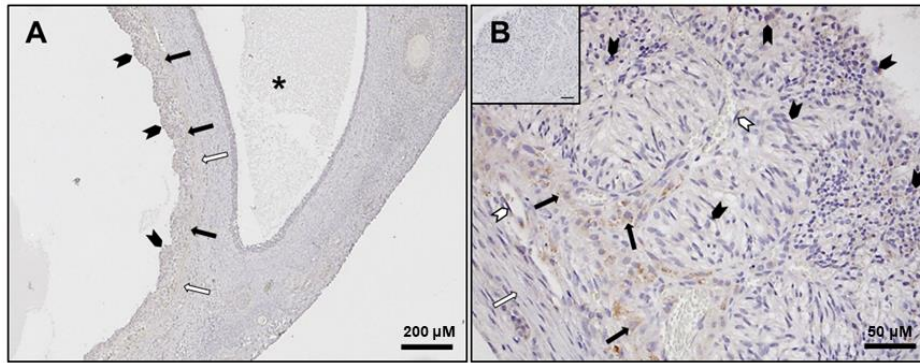
Az IGF1 és az IGF1R fehérjeszintű expressziója a preovulációs tüszőkben

Minden petefészken a két legnagyobb tüszőt vizsgáltuk, ezek minden esetben 3 mm-t meghaladó átmérőjű antrális follikulusok voltak. A follikulusok fala némileg különböző proliferációs és luteinizációs stádiumban volt (Concannon et al., 1977); kisebb redőket formáló (**20. B ábra**) vagy vastagabb, komplexebb szerkezetű, *granulosa* (GC) és *theca interna* (TIC) sejteket tartalmazó rétegekre különülve (**19. B és 20. C ábra**). Az IGF1 expresszióját igazoltuk a granulosa (GC) és a theca interna (TIC) sejtekben, utóbbiak esetében erősebb immunfestődést tapasztaltunk (**19. A és B ábra**), ugyanakkor nem mutatkozott pozitív reakció a theca externa sejtekben (TEC). Ezzel szemben az IGF1R expresszió a GC rétegben, különösen az apikális régióban tűnt erősebbnek, mint a TIC rétegben (**20. A - 20. C ábra**). A TEC rétegben az IGF1R fehérje sem jelent meg (**20. A és B ábra**). Mindemellett az endotheliális sejtek is kifejezték mind az IGF1 (**19. B ábra**), mind pedig az IGF1R fehérjét (**20. B ábra**); az IGF1R az erek középső rétegében (tunica media) is megjelent. A mintákban a degenerálódó, vékony GC réteggel rendelkező, atretizálódó antrális follikulusok is megjelentek. Az atretizálódó antrális follikulusok GC és TIC rétegeiben csak gyengén vagy nem jellemző az IGF1 (**19. A ábra**) vagy az IGF1R (**20. A és B ábra**) expressziója.

Az IGF1 és az IGF1R fehérjeszintű expressziója és lokalizációja a vemhes szukákból származó sárgatestekben

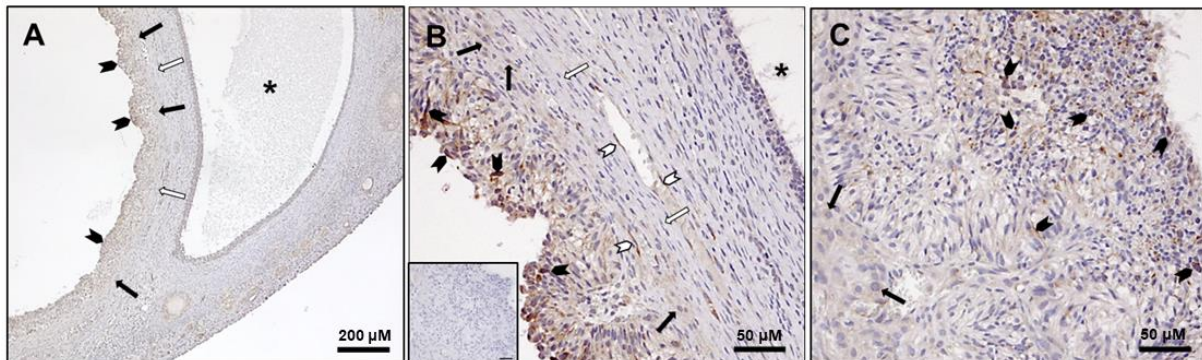
Erős IGF1 immunfestődést tapasztaltunk a luteális sejtek citoplazmájában, különösen a pre- és posztovulációs periódusban (**21. A és 21. B ábra**), majd gyengébb festődés volt jellemző ezekben a sejtekben a középidoős vemhesség esetében (**21. C ábra**), valamint a prepartum luteolízis időszakában, amikor szintén csak elszórtan jelentkezett, gyenge intenzitású festődés a luteális sejtekben (**21. D ábra**). A luteális sejtek mellett a makrofágok is erős IGF1 fehérje expressziót mutattak a preimplantáció időszakától a vemhesség közepéig (**21. A – 21. C ábrák**). Gyenge IGF1 festődést szintén megfigyeltünk az erek tunica intima és -media rétegeiben (**21. C és 21. D ábra**). Az IGF1 fehérjéhez hasonlóan az IGF1R is kifejeződött a luteális sejtekben. A legerősebb reakciót itt is a pre- és postovulációs periódusokban figyeltük meg (**22. A és 22. B ábra**), majd a reakció erőssége csökkent a középidoős vemhességből származó mintákban (**22. C ábra**) és eltűnt a prepartum luteolízis időszakára (**22. D ábra**). A preimplantációs periódusban a makrofágokban is megjelent az IGF1R, illetve erős IGF1R immunfestődés volt megfigyelhető végig a vemhesség alatt a vérerek intima és media rétegében (**22. C és 22. D ábra**).

IGF1



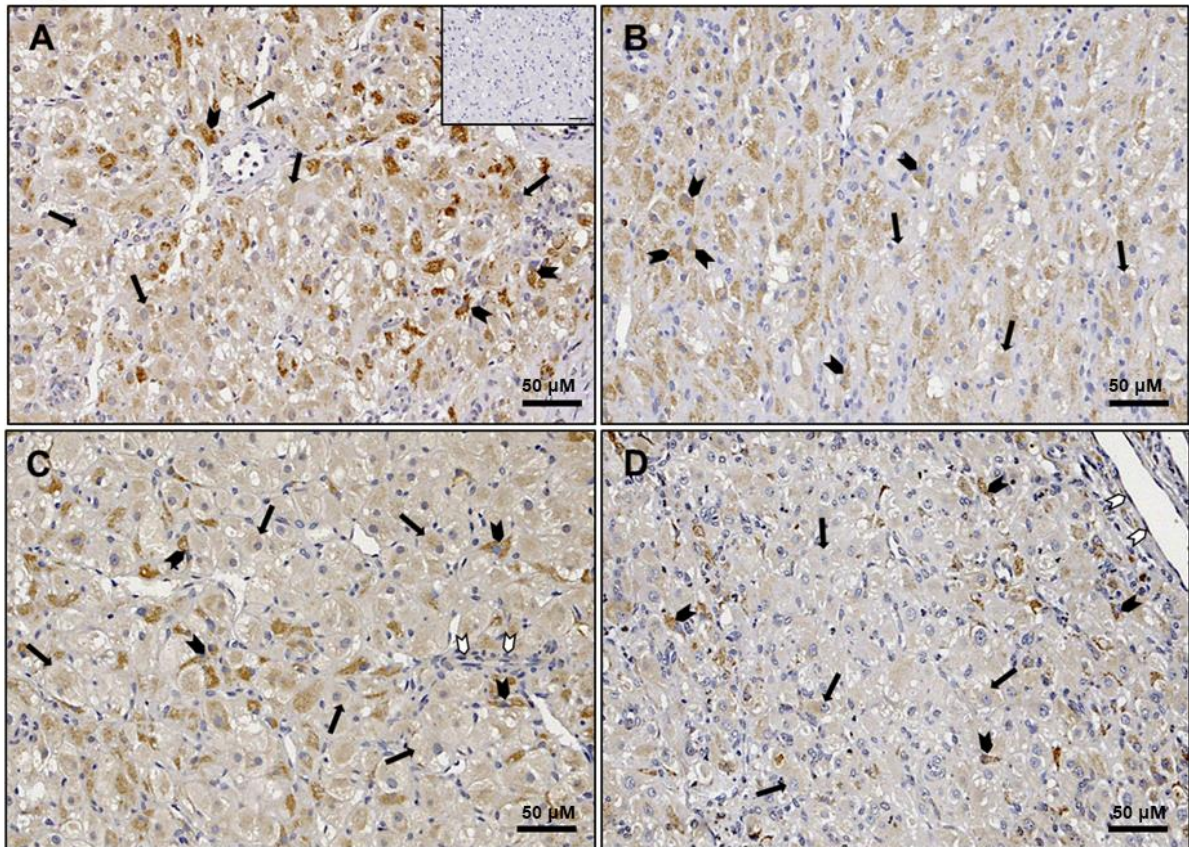
19. ábra Az IGF1 expresszió immunhisztokémiai vizsgálata kutyából származó preovulációs follikulusokban: (A): IGF1 immunfestődés a növekvő preovulációs follikulusok granulosa- (fekete, vastagabb nyilak) és theca interna sejtjeiben (fekete nyilak). Az immunfestődés ugyanakkor nem jellemző a theca externa rétegben (fehér nyilak). Az atretizálódó follikulusok (fekete csillaggal jelölve) esetében csak gyenge sporadikus immunfestődés jellemző, vagy hiányzik a festődés a GC és TIC rétegekben. (B): A növekvő preovulációs follikulusok TIC rétegében (fekete nyilak) erősebb immunfestődés jelenik meg, mint a GC esetében (fekete, vastagabb nyilak), míg a TEC réteg nem mutat immunreaktivitást (fehér nyilak). IGF1 immunreaktivitás szintén megjelenik az endoteliális sejtekben (fehér, vastagabb nyilak). A mellékelt kisebb képen a negatív izotípus kontroll látható.

IGF1R



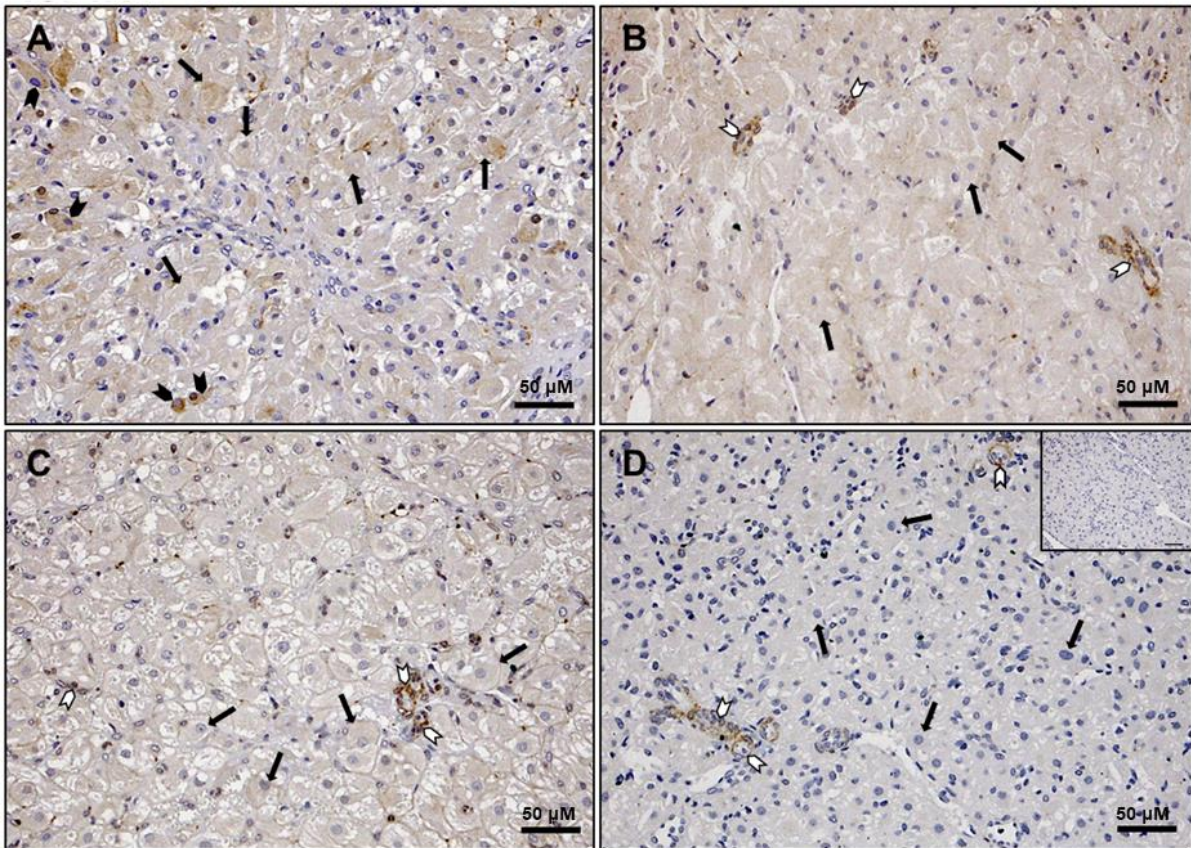
20. ábra Az IGF1R expresszió immunhisztokémiai vizsgálata kutyából származó preovulációs follikulusokban. (A): IGF1R immunreaktivitás detektálható a preovulációs follikulusok GC (fekete, vastagabb nyilak) és a TIC (fekete nyilak) rétegében, míg a TEC (fehér nyilak) rétege nem festődik. Az atretizálódó follikulus (fekete csillag) falában csak gyenge, sporadikus pozitívás jelenik meg, vagy nem látható festődés. (B) A vékonyabb GC és TIC réteggel rendelkező preovulációs follikulusok falában gyengébb festődés jelenik meg a TIC rétegben (fekete nyilak), mint a GC rétegben (fekete, vastagabb nyilak). A GC rétegen belül leginkább az apikális régió mutat pozitívást. A TEC réteg nem mutat IGF1R immunreaktivitást (fehér nyilak). Az atretizálódó follikulusokban (fekete csillag) nem jelenik meg, vagy csak gyengébb sporadikus reakció detektálható a granulosa és a theca sejtjeiben. Az IGF1R szignál itt is megjelenik az endothel sejtekben (fehér, vastagabb nyilak). A mellékelt kisebb képen a negatív izotípus kontroll látható. Bar = 50µM. (C) A növekvő preovulációs follikulusok falában már komplexebb szerkezetű redők jelennek meg. Az IGF1R pozitívás erősebben jelentkezik a granulosa sejtjeiben (fekete, vastagabb nyilak) mint a theca interna sejtjeiben (fekete nyilak).

IGF1



21. ábra Az IGF1 expresszió immunhisztokémiai vizsgálata vemhes kutyákból származó sárgatestekben. IGF1 pozitivitás jellemzi a sárgatest sejtjeit a vemhesség során (preimplantáció (A), posztimplantáció (B), középidő (C), prepartum luteolízis (D)). Az IGF1 immunfestődés erősebben jelenik meg a luteális sejtekben (fekete nyilak) a pre- és posztimplantációs időszakban. Középidőben, majd a prepartum luteolízis idejében a festődés intenzitása csökken, gyengévé és elszórttá válik a legtöbb luteális sejt esetében. Az immunreakció megjelenik a makrofágokban is (fekete, vastagabb nyilak), különösen a preimplantációtól a vemhesség közepéig. Gyenge pozitivitás a vérerek tunika intima és – media rétegében (fehér, vastagabb nyilak) is megjelenik. A mellékelt kisebb képen a negatív izotípus kontroll látható.

IGF1R



22. ábra Az IGF1R expresszió immunhisztokémiai vizsgálata vemhes kutyákból származó sárgatestekben. IGF1R expresszió vizsgálata a sárgatest sejtjeiben a vemhesség során (preimplantáció (A), posztimplantáció (B), középido (C), prepartum luteolízis (D)). IGF1R reakció erősebben jelentkezik a luteális sejtekben (fekete nyilak) a pre- és posztimplantációs periódusban, mint a középido-ben, majd a pozitívitas eltűnik a prepartum luteolízis időszakában. A preimplantációs fázisban a pozitívitas megjelenik a makrofágokban is (fekete, vastagabb nyilak). Erős immunfestődés figyelhető meg a véresek falának tunica media és –interna rétegeiben (fehér, vastagabb nyilak). A mellékelt kisebb képen a negatív izotípus kontroll látható.

4.5.3. Megbeszélés

A folliculáris fázisban eltávolított petefészkek esetében mind az IGF1, mind pedig az IGF1R fehérje szintű expressziója erős volt az antrális folliculusok kifejezett proliferációt és luteinizációt mutató GC és TIC rétegében, ugyanakkor csak sporadikus, kifejezetten gyenge festődés jellemezte az atretizálódó folliculusok falának rétegeit. Mindez jelezheti, hogy az IGF1 fehérje kutyában pozitív hatással lehet a granulosa és theca interna sejtek proliferációjára és/vagy az ovariális P4 produkcióra, mint ahogy azt más fajokban leírták (Devoto et al., 1999; Goto et al., 2009; Schams et al., 2001; Spicer és Echternkamp, 1995;

Stewart et al., 1995). Mindez egybees az a következtetéssel, miszerint pozitív korreláció fedezhető fel az intrafollikuláris IGF1- és P4-szintek között a kutyából származó preovulációs follikulusok esetében (Reynaud et al., 2010). Ahogy kutyában az LH receptorhoz való kötődés elsődlegesen a granulosa sejtek esetében jellemző (Saint-Dizier et al., 2008), az IGF1 szerepet játszhat az LH receptor expresszió fokozásában, ahogy ezt patkányok esetében már kimutatták (Hirakawa et al., 1999), ezen keresztül fokozva az LH stimuláló hatását a follikulusok fejlődésére, majd az ovuláció folyamatára. Az eredményeink alapján leírt, a vemhes és nem-vemhes szukában megjelenő sárgatestet jellemző IGF1 expresszió megegyezik a korábban szarvasmarha (Schams et al., 2002) és sertés esetében leírtakkal, ahol az IGF1 mRNS expresszió a kisebb lutein sejtekben erősebb a vemhesség kezdeti szakaszában (4-10. nap), majd csökken a 14-16. naptól (Gadsby et al., 1996). Vizsgálataink szerint az IGF1-hez hasonlóan annak receptora is a preimplantációs fázisban expresszálódik a legerősebben a luteális sejtekben. Ebben a korai luteális fázisban a fejlődő sárgatest még nem mutat erős gonadotropin függőséget, így az autokrin/parakrin regulációnak döntő szerepe van (Kowalewski et al., 2015). Ebben az időszakban, amikor kutyákban magas a vérben mérhető progeszteronkoncentráció, illetve fokozott a szteroidprodukciónban résztvevő enzimek és az angiogenezist segítő faktorok expressziója a sárgatestben (Concannon, 1980; Concannon et al., 1975; Gram et al., 2015; Kowalewski et al., 2009; Kowalewski and Hoffmann, 2008), a kutya esetében is igaz lehet, hogy az IGF1 stimulálja a sárgatest sejtjeinek STAR protein-, P4-, valamint VEGF expresszióját, hasonlóan a sertésben (Gregoraszcuk and Ptak, 2005; Sekar et al., 2000), vagy emberben leírtakhoz (Tropea et al., 2006). Az IGF1, valamint receptorának megjelenése az endothel sejteken azok luteális angiogenezisben játszott szerepét valószínűsíti. Mindemellett más fajokban arról is beszámoltak, hogy az IGF1 segíti a granulosa- és a theca sejtek proliferációját (Mani et al., 2010; Spicer és Echterkamp, 1995; Stewart et al., 1995), ami alapján szerepét a kutya sárgatestben zajló, főleg a luteinizáció során fokozódó sejtproliferáció serkentésében is valószínűsítik (Hoffmann et al., 2004; Kowalewski et al., 2015; Papa and Hoffmann, 2011). Érdekes módon az IGF1 fehérje a korábban makrofágként azonosított sejtekben is kifejeződik (Nowaczyk et al., 2017), valószínűsítve annak lehetséges immunmoduláló szerepét a fejlődő sárgatestben, amikor az immunsejtek bőségesen vannak jelen (Nowaczyk et al., 2017). Az IGF1 csökkenő expressziója a luteális fázis későbbi időszakában az IGF1 csökkenő lokális szerepére utal. Ez egybees azokkal a sertésekből származó luteinsejtek in vitro vizsgálata során nyert eredményekkel, melyek szerint az IGF1 ciklusfüggő módon, a korai sárgatest-fázisban, tehát az újonnan kialakult sárgatestek esetében, serkenti annak P4 szekrécióját (Gregoraszcuk and Ptak, 2005). A sárgatestfázis során, a kezdetben mind vemhes, mind nem-vemhes kutyában nagyfokú IGF1 és IGF1R expresszió eltérően alakul a két csoportban. A nem-vemhes állatokban az IGF1 mRNS expresszió a sárgatestfázis

közepétől fokozatosan csökkenni kezd, tükrözve a progeszteronszint fokozatos csökkenését, illetve a sárgatest lassú regresszióját (Concannon et al., 1975; Kowalewski et al., 2015; Kowalewski és Hoffmann, 2008). Ezzel szemben vemhes szukákban, ahol a P4 szérumban mérhető lassú csökkenését a vemhesség végén jelentkező, a placentális prosztaglandinszintézis következtében megemelkedő PGF2 α -koncentráció hatására kialakuló prepartum luteolízis eredményeként gyors vérszintcsökkenés váltja fel (Gram et al., 2014; Kowalewski et al., 2010), az IGF1 expresszió szignifikáns csökkenése is a prepartum luteolízis időszakára tolódik ki. Ez az összefüggés egyezik annak a szarvasmarhákön végzett vizsgálatnak az eredményeivel, melyben a luteális fázis közepidejében adagolt cloprostenol (PGF2 α analóg) hatásaként, fél órával a beadást követően az intraluteális IGF1 koncentráció szignifikáns csökkenését figyelték meg (Berisha et al., 2010). Az általunk vizsgált nem vemhes szukákban az IGF1R mRNS expressziója nem változott a sárgatestfázis során, ezzel szemben a vemhes egyedekben szignifikáns emelkedést mutattunk ki a prepartum luteolízissel egyidőben. Bár a génexpresszió fokozódása ellenére, az immunhisztokémiai vizsgálataink szerint az IGF1R fehérjeszintű kifejeződése csökkent a luteális fázis végén, amit a transzkripció és transláció folyamatának eltérő regulációja magyarázhat, ugyanakkor ehhez hasonló inverz összefüggésről sertésekben is beszámoltak (Ge et al., 2000).

Míg a vemhes állatokban a sárgatest IGF1 expressziója a prepartum luteolízis hatására lecsökken, agleprisztonnal közepidőben előidézett luteolízis esetén a luteális IGF1, valamint IGF1R mRNS expresszió változatlan maradt, ami a sárgatest-funkció felfüggesztésének eltérő mechanizmusával lehet összefüggésben. Míg a placentális PGF2 α produkció, valamint a plazmában mérhető PGF2 α metabolit (PGFM) koncentrációjának emelkedése következtében kialakuló prepartum luteolízis (Gram et al., 2014; Kowalewski et al., 2010) során intenzív apoptotikus szignálok, illetve fokozott immun- és gyulladásos válasz mutatható ki a sárgatest sejteiben (Kowalewski, 2014; Zatta et al., 2017), az agleprisztonnal indukált luteolízis esetében mérhető PGFM koncentrációnövekedés kevésbé hangsúlyos, tehát a korai luteolízis kiváltásában a keringő placentális PGF2 α mellett, a sárgatest szintjén blokkolt progeszteron-hatás következtében beinduló kompenzációs mechanizmusok negatív hatása dominál (Kowalewski et al., 2010; Zatta et al., 2017). Mindezek alapján a természetes luteolízissel összehasonlítva, a közepidős vemhesség során végzett progeszteron antagonistával történő kezelés eredményeként létrejött luteolízis hátterében sokkal kevésbé kifejezett a természetes folyamat során megfigyelhető gyulladásos válasz, ebben az esetben sokkal inkább a sejtproliferáció és a géntranszkripció negatív szabályozására vezethető vissza a folyamat, ami a progeszteron jelen esetben kiesett luteotrop hatásának jelentőségét emeli ki (Kowalewski et al., 2010; Zatta et al., 2017). Annak ellenére, hogy a progeszteron IGF1 expressziót stimuláló hatását sertés méh (Simmen et al., 1990), valamint a kutya

emlőszövet esetében is igazolták (Mol et al., 1996; Selman et al., 1994), saját eredményeink alapján nem valószínű, hogy a progeszteron auto/parakrin úton befolyásolná a luteális IGF1 expressziót. Emellett kimondható, hogy a középidős vemhesség esetén az IGF1 szerepe nem számottevő a sárgatestfunkció fenntartása szempontjából.

Összefoglalásként elmondható, hogy kutya esetében az IGF1 para-, vagy autokrin úton hatással lehet a preovulációs follikulusok granulosa és theca sejtjeire, stimulálhatja azok proliferációját és szteroidprodukciónak. A sárgatest IGF1 génexpressziójának mértéke hasonlóan változik a vemhes és a nem-vemhes szukák korai luteális fázisa során. Ebben az időszakban detektáltuk a legkifejezettebb fehérje expressziót a vemhes állatokban. Vizsgálatunk alapján arra következtettünk, hogy ebben a korai, relatív gonadotropin-független időszakban az IGF1 fontos szerepet játszik a luteális sejtek P4 produkciójának, valamint a sárgatestben folyó angiogenezis, proliferáció stimulálásában, valamint immunmoduláló szereppel bír. A luteális fázis későbbi szakaszában megfigyelt alacsonyabb IGF1 expresszió ugyanakkor a fehérje szerepének csökkenését valószínűsíti. Az aglepriszton indukált luteolízis esetén megfigyelt változatlan mRNS expresszió alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a gonadotropin-dependens sárgatest esetében az IGF1 szerepe már kevésbé jelentős, talán az intra-luteális P4 és IGF1 produkció közötti autokrin stimulációs hurok kiesése vagy hiánya miatt.

5. A leptin és az IGF1 szerepe a kanok szaporodásbiológiai működésében

5.1. Irodalmi áttekintés

5.1.1. A leptin szaporodásbiológiai szerepe hímivarban

Humán vizsgálati eredmények és bizonyos állatfajokban végzett kutatások alapján az anyagcsere egyes szabályzó molekulái több ponton is bekapcsolódhatnak a hím nemi működés szabályozásába. A leptin ezen szerepét máig kevésbé tartják tisztázottnak, mint nőivar esetében. Humán vizsgálatok alapján, a pubertáskor a hímekeket jellemző alacsonyabb leptinszint alapján azt valószínűsítik, hogy míg nőnemben a zsírraktárak bizonyos telítettségi fokának elérése, így a vemhesség vagy laktáció energiaigényének teljesítőképessége alapvető feltétele az ivari működésnek, addig ez hímivarban nem bír akkora jelentőséggel (Tena-Sempere és Barreiro, 2002). Ennek ellenére a leptin feltételezhetően hímivarban is szükséges a hipotalamusz-hipofízis-here tengely működéséhez, hiszen leptinhiányos (ob/ob) egerek esetében nagy arányban jelentkezett hipogonadotropikus hipogonadizmus. A morbid obezitás és centrális leptinhiány mellett lecsökken a gonadotropinok koncentrációja a vérben és következményes apoptózis alakul ki a here sejtjeiben, illetve csökken a szexuálissteroidok

koncentrációja (Mounzih et al., 1997). Emberekben, ehhez hasonlóan leptinhiány esetén hipogonadizmus jelentkezett, illetve kitolódott a pubertás (Wauters et al., 2000). Míg nőivar esetében a leptinhiány kivétel nélkül infertilitáshoz vezetett, a hímek egyrésze fertilis maradt, ami a leptin nő és hímivarban játszott némileg eltérő szerepét hangsúlyozza (Tena-Sempere és Barreiro, 2002). Az axis felsőbb régióinak szabályozását már nagyrészt ismertettük a nőivart érintő vizsgálataink kapcsán (12. ábra). Alacsony dózisú leptin hatására a GnRH szekréció növekszik, míg magas dózisban történő adagolásakor gátló hatást fejt ki a GnRH termelésére (Spicer, 2001). A gonadotrop sejtek nagyrésze maga is expresszál LepR-okat, emellett mind a gonadotrop mind a szomatotrop sejtek képesek saját leptin termelésre, utóbbi GnRH, NPY és a növekedési hormon serkentő hormonjának (GHRH) hatására történik (Landry et al., 2013), felvetve a leptin hipofízis szintjén is megjelenő auto-/parakrin hatását. Hímek esetében a hipofízis leptintermelése döntően a szomatotrop sejtekhez köthető (Landry et al., 2013). A leptin hímivarban is képes direkt úton fokozni az LH, kisebb mértékben az FSH felszabadulást a hipofízis szintjén (Yu et al., 1997). Bár kutyák esetében ilyen különbség meglétét nem igazolták, emberben a leptinszintet jellemzően alacsonyabbnak találták férfiakban (testzsírtartalomra korrigált értékek esetén), ami alapján a nemi hormonok leptin expressziót és szekréciót moduláló hatásait feltételezik. Míg az ösztrogének serkenthetik, addig az androgének gátolhatják a leptin szekréciót (Wauters et al., 2000). Prepubertális korú hím patkányok esetében a leptin dózisfüggően stimulálja a pulzatilis GnRH szekréciót, emberekben pedig a pubertás közeli korcsoportban prepubertális leptin csúcs megjelenését írták le, amihez tesztoszteron csúcs is kapcsolódik. Valószínűleg a tesztoszteron szupresszív hatásának köszönhetően a leptin koncentráció csökkenése detektálható a pubertást követően, míg ezzel ellentétben lányok esetében a pubertás idejében jellemző ösztrogén csúcs magyarázhatja a magasabb leptinszintet (Landry et al., 2013).

Túl a hipotalamusz-hipofízis-gonád axis felsőbb régióinak vizsgálatán (Tena-Sempere és Barreiro, 2002), egyre több esetben tanulmányozzák a leptin direkt, periférián helyeződő szöveteken kifejeződő, saját receptorán keresztül megvalósuló hatását, így a LepR eloszlását és a rajta keresztül kiváltott biológiai hatást (El-Hefnawy et al., 2000; Tena-Sempere és Barreiro, 2002). Míg a leptin esetében hipotalamusz és a hipofízis szintjén serkentő, a gonádok esetében inkább gátló hatását írták le (Moschos et al., 2002).

A Lep és a LepR jelenlétét a hereszövetben több vizsgálatban is megerősítették, ami a hormon herében kifejtett direkt hatását feltételezi (Caprio et al., 2003; El-Hefnawy et al., 2000; Herrid et al., 2008a; Ishikawa et al., 2007; Aquila et al., 2005; Aquila et al., 2008; De Ambrogi et al., 2007), ugyanakkor mind a Lep, mind a LepR expressziója és lokalizációja fajspecifikus (El-Hefnawy et al., 2000; Tena-Sempere et al., 2001; Caprio et al., 2003; Ishikawa et al., 2007; Herrid et al., 2008a; Rago et al., 2009) és korfüggő (Caprio et al.,

2003; Herrid et al., 2008a; Rago et al., 2009) különbségeket mutat. A hereszövet mellett a Lep és a LepR kifejeződését a mellékherében (Rago et al., 2009), az érett spermatozoákon és a szemínális plazmában is kimutatták több faj esetében is (Caprio et al., 2003; Herrid et al., 2008a; Rago et al., 2009). Sertésből származó mellékhere mintákon régióként eltérő fokú Lep expressziót írtak le prepubertális és ivarérett állatok esetében, ami felveti annak lehetőségét, hogy a leptin szerepet játszik a spermiumok mellékherében zajló érési folyamatában is (Rago et al., 2009). Egerek esetében immunhisztokémiai módszerrel kimutatták, hogy a LepR fejlődési állapotnak megfelelően jelenik meg a csírasejtekben, illetve kimutatható az intersticiális sejtekben, azonban a Sertoli sejtek nem expresszálják. A korai posztnatális életben (5 napos állatokban) a LepR leginkább az A típusú spermatogóniumokban, míg az idősebb, 10 napos állatokban már részben a B típusú spermatogóniumokban is megjelent. 20- és 30-napos állatokban az expresszió már inkább a spermatocitákban, illetve a lumenbe kerülő spermatidákban legjellemzőbb. Az interstícium sejtjei felnőtt korban csak gyengén expresszálják a LepR-t (El-Hefnawy et al., 2000). A leptin szintén korfüggő megjelenést mutatott, minden életkorban megjelent a csírasejtekben, a lokalizáció korfüggő változása pedig a LepR expresszió változásához hasonlóan alakult. Ugyanakkor nem jelent meg az interstícium sejtjeiben, így a Leydig sejtekben sem (Herrid et al., 2008a). PCR vizsgálat alapján az egérből származó Leydig sejtek egyik korosztályban sem expresszálják a hosszú receptorformát (LepRb), ugyanakkor a LEPRa és LepRe kódoló mRNS minden korcsoportban megjelenik (Herrid et al., 2008a). Mindezek alapján feltételezik, hogy a leptin sejt típus- és korfüggő auto/parakrin hatást fejt ki a csírasejtek érése során. A Leydig sejtek esetében LepRb hiányában nem ennyire egyértelmű a helyzet, ezeknél ugyanakkor a rövidebb receptorformák megjelenése alapján felmerül a leptin intersticiális sejteken (másodlagos jelátviteli úton át- MAPK, STAT3) kifejtett hatása (Herrid et al., 2008a). Patkányok esetében bár a here tubulusaiban nem tudták kimutatni a LepR-ok kifejeződését, a Leydig sejtek LepR expressziója az ivarérett korú állatok mintáiban egyértelmű volt, szemben a juvenilis egyedek heréivel (Caprio et al., 2003). Felnőtt állatokban in situ hibridizáció segítségével a LepR mRNS jelenlétét igazolták a Sertoli sejtekben is (Landry, et al., 2013). In situ hibridizációval végzett vizsgálatok alapján a LepR mRNS expresszió első sorban a Leydig és a Sertoli sejtekhez köthető, ugyanakkor megjelenik a csírasejtekben is. (Tena-Sempere et al., 2001). Bikák hereszöveiben is kimutatták a LepR kifejeződését, ezek közül is a LepRb mutatta a legerősebb expressziót míg az „a” típus enyhébb, a „c” pedig még kisebb mértékben jelent meg (Kawachi, et al., 2007). Szemben az egerek esetében tapasztaltakkal a Lep és a LepR expresszálódott a Leydig sejtekben mind a 2-3 hónapos, mind az ivarérett sertésekben. Bár az éretlen hereszövet kanyarulatós csatornácskáinak sejtjei nem mutattak pozitívítást, intenzív szignált

tapasztaltak mindkét fehérje vizsgálata során az elongált spermátidákban, a felnőtt állatokból származó mintákban (Rago et al., 2009).

A Lep és receptorának megjelenését sertés mellékherében is kimutatták (Mehr et al., 2013). A fiatal állatokban immunhisztokémiai módszerekkel nem lehetett kimutatni a leptint a mellékhere epitheliális sejteiből, míg ivarérett állatokban, mind a feji testi rész erős, míg a farki részeken közepes citoplazmafestődés jelentkezett. A LepR esetében a mellékhere mindhárom területén közepes erősségű pozitívítást figyeltek meg fiatal állatok esetében, ami kifejezettebbé vált a kor előrehaladtával (Rago et al., 2009).

A Lep, vagy LepR expressziót érintő változások egyes human vizsgálatok alapján a spermatogenezis folyamatának rendellenességeihez vezethetnek (Chen et al., 2008; Ishikawa et al., 2007; Rago et al., 2009). A hím nemi szerveket érő fiziológiás leptinszint jelentőségét hangsúlyozza, hogy a leptin hiány csökkent spermatogenezishez, alacsonyabb ivarsejt számhoz és az érett spermatozoák teljes hiányához is vezethet (Bhat et al., 2006). Leptin hiányos egerek esetében csökkent spermatogenezisről számolnak be, illetve nő az ivarsejtek apoptózisának aránya. Az ob/ob genotípusú hím egerekben csökkent a kanyarulat csatornák által elfoglalt területek aránya, csökken a pachytene spermatoцитák, valamint az elongált spermátidák és az érett spermatozoák aránya a herék keresztmetszetének elemzése alapján. Ezekben az egerekben abnormális spermatogenezis és infertilitás figyelhető meg, az ivarsejtek esetében leírt nagyarányú apoptózis hátterében pedig az elégtelen gonadotropin ellátás sejthető. Feltételezések szerint a leptin közvetlen autokrin/parakrin hatással, a STAT3 aktiváción keresztül is képes regulálni az egér ivarsejtek proliferációját és differenciációját (El-Hefnawy et al., 2000). Leptin hiányos egerek esetében a Sertoli sejteket jellemző vakuolizáció megjelenése a leptin Sertoli sejt funkcióra kifejtett hatását, ez esetben antiapoptotikus hatásának hiányát valószínűsíti (Bhat et al., 2006). Emellett negatív arányulást írtak le a leptinszint és a Sertoli sejtek által szekretált inhibin B-szint között (Zorn et al., 2007), amely jó markere a spermatogenezisnek. Az apoptózis-megelőző állapotban jellemzően aktiválódó gének szintén magasabb arányú megjelenését írták le ob/ob egerekben. Bhat és mtsai (2006) eredményei alapján leírható egy egyértelmű összefüggés a csökkent spermatogenezis, az apoptózist irányító, valamint a preapoptotikus gének aktivációja és a leptin hiánya között.

A leptin képes átlépni a vér-heré barriert (Banks et al., 1999), ezért kisebb mennyiségű vér eredetű leptin képes bejutni a herébe, illetve a vérerek felől az intersticiális folyadékba, majd átjutva a Sertoli sejtek által képzett barrieren, a kanyarulat csatornák lumenébe. Von Sobbe vizsgálatai alapján (2003) férfiakban a szeminális plazma leptin tartalma pozitívan korrelál a szérumban mérhető szinttel. A szeminális plazma leptinkoncentrációjának 16-szorosa mérhető a vérben. Mind a szérumban mérhető, mind pedig a szeminális plazmát jellemző leptin koncentráció negatív összefüggést mutat a tesztoszteronszinttel, ugyanakkor

ez az összefüggés gyengébb a szemínális plazmában megjelenő leptinszint esetében. Több különböző fajban végzett vizsgálat alapján a szemínális plazmában megjelenik a szabad leptin, ami a prosztatából, vagy az ondóhólyagból is származhat (Mehr et al., 2013; Nikbakht et al., 2010; Jope et al., 2003), ugyanakkor a leptin expressziót magukon az ejakulált spermatozoákon is kimutatták (Aquila et al., 2005). Számos vizsgálatban igazolták a LepR-ok megjelenését a spermatozoákon sertésben és szarvasmarhában, illetve juhok epididimális spermatozoáin (Mehr et al., 2012; Mehr et al., 2013; Gil et al., 2014), ember esetében leginkább az érett alakok farki régiójában (Jope et al., 2003). Vaddisznóból származó spermium minták esetében a LepRb típus jelenlétét igazolták az akroszóma területén, a subekvatoriális területen, illetve az egész fark területén és a középrészen is, feltételezve, hogy ezeken a területeken a szemínális plazmában megjelenő Lep azonnali hatást fejthet ki (De Ambrogi et al., 2007). Ezek alapján azt feltételezik, hogy a genitális traktusban, így a kanyarulat csatornáiban is megjelenő leptin hatással lehet a spermatozoák fejlődésére és azok motilitására, ugyanakkor ezek ellenkezőjét is leírták. Zorn és munkacsoportja szerint a leptinszintnek nincs hatása a spermiumok morfológiájára és motilitására (Zorn et al., 2007). Lampiao és du Plessis human vizsgálataik során ugyanakkor arról számoltak be, hogy leptin jelenlétében nő a motilitás és a leptin segíti az akroszóma reakciót. Egy *in vitro* vizsgálat keretében leírták a leptin sperma funkcióra kifejtett hatását, ami alapján valószínűsíthető, hogy a spermatozoák fertilizáló képességét igenis befolyásolhatja a leptin (Lampiao és du Plessis, 2008). Kimutatták a kapacitált spermium alakok magasabb fokú leptin produkcióját, ami a leptin kapacitációban játszott szerepét is valószínűsíti (Aquila et al., 2005). *In vitro* vizsgálat során a leptin adagolásával növelhető a motilitás, a NO produkció és az akroszóma reakció (Lampiao és du Plessis 2008). Aquila és mtsai hasonló eredményekről számoltak be, leptinnel kezelt sertésből származó spermaminták vizsgálata alapján (Aquila et al., 2005). Mások szerint a magasabb leptinkoncentráció negatív hatással lehet a spermiumfunkcióra (Glander et al., 2002). Lovakban például a leptin kezelés hatására a motilitást jellemző paraméterek csökkenésével párhuzamosan nőtt az akroszómareagált alakok aránya (Lange-Consiglio et al., 2016). A leptin Leydig sejt funkcióra kifejtett hatását egyes eredmények cáfolják, mások ezek negatív összefüggéséről számolnak be (Tena-Sempere et al., 1999 és 2001; Herrid et al., 2008b). Emberekben a LepR pozitív Leydig sejtek aránya negatívan korrelált a szérumszteszteronkoncentrációval (Ishikawa et al., 2007). Egyes feltételezések szerint a magasabb leptinszint (ami pl. morbid obezitás esetén jellemző lehet) ugyanakkor már csökkentheti a tesztoszteron produkciót és zavarhatja a spermatogenezis folyamatát. A szérumszteszteronkoncentráció tehát csökkenhet a leptin LepR-on keresztül közvetített Leydig sejteken kifejtett gátló hatásának következtében (Landry et al., 2013). El-Hefnawy felfedezése szerint a leptin a LH, illetve a hCG indukált szteroidogenezis down-regulációján

keresztül fejt ki hatását (El-Hefnawy et al., 2000). Utóbbi mások is megerősítették, Tena-Sempere és munkacsoportja, patkány szöveteken végzett in vitro vizsgálatai alapján arról számolt be, hogy a leptin hatással bír a tesztoszteronprodukcóra. Leírták mind az alap, mind pedig a hCG stimulált tesztoszteronprodukciónak leptinadagolásra történő csökkenését (1999 és 2001). A folyamat hátterében több a szteroidogenezis folyamatában résztvevő kulcsenzim (StAR, P450 scc, SF-1 (steroidogenic factor 1)) mRNS expressziójának downregulációját detektálták. Szemben a felnőtt állatokkal, a prepubertális korban lévő egyedek esetében a leptin nem volt hatással a tesztoszteron produkcióra (Tena-Sempere et al., 1999). Ezzel szemben egerek esetében a leptin képes volt gátolni az alap tesztoszteron produkciót a fiatal állatokból származó sejt kultúrákon, ugyanakkor a hatás elmaradt az idősebb állatok sejtjein (Herrid et al., 2008b). Utóbbi kutatócsoport szerint a leptin bifázisosan hat az alap tesztoszteronprodukcóra egerek esetében, így alacsony koncentrációban gátolja, míg nagyon alacsony vagy magas koncentrációban nem befolyásolja a tesztoszteron termelést a fiatal állatok esetében. Ugyanakkor felnőtt egyedekben sem alap, sem pedig a hCG stimulált tesztoszteron produkcióra nincs hatása (Herrid et al., 2008b).

5.1.2. Az IGF1 hatása a hím nemi szerveken

Több tanulmány alapján is egyértelműnek tűnik, hogy a GH-IGF1 tengely élettani szerepet játszik a reproduktív funkció fejlődése, majd működése során, emellett mind alul-, mind túlműködése esetén beszámoltak csökkent fertilitás, illetve infertilitás kialakulásáról. Amellett, hogy a növekedési hormon saját receptora (GHR) az axis több pontján, így a periférián, a Leydig és Sertoli sejteken is kifejeződik, annak endokrin és auto/parakrin hatását biztosítva, a GH hatás indirekt úton, IGF1 termelődés kiváltásán keresztül is hat a reproduktív axisra. A fiziológiás GH, azon keresztül pedig IGF1-szint biztosítja az ivarérettség folyamatát, a GnRH termelődését, a herék megfelelő hormontermelő képességet, valamint az ivarsejtképzést (Mayank, C. 2020). Az IGF1, az inzulin/IGF1 rendszer részeként fontos mediátora lehet a sejt differenciáció, transzformáció folyamatának mind a posztnatális fejlődés, mind pedig a reproduktív működés kapcsán (Baker et al., 1993; Powell-Braxton et al., 1993). A hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely szabályzó mechanizmusai mellett az IGF1 rendszer is esszenciális részét képezheti a fiziológiás hereműködés, így a sperma produkció, a Sertoli és a Leydig sejt funkció, valamint az ivarsejtfunkció endokrin és parakrin úton megvalósuló szabályozásának (Roth és Amory, 2011; Pitetti et al., 2013). Az IGF1 szerepének jelentőséget hangsúlyozza, hogy egy egereken folytatott vizsgálat során leírták, hogy az IGF1 produkcióra képtelen hím egerek infertilisek, esetükben mind a tesztoszteron produkció, mind pedig a spermatogenezis terén 80%-os csökkenés figyelhető meg (Baker et al., 1996). A vérben mérhető IGF1 koncentráció jól korrelál a herék méretével és a motilis

spermium alakok arányával (Yilmaz et al., 2004). Az IGF1 a növekedési hormon effektor molekulájaként elsődlegesen a májban termelődve kerül a szisztémás keringésbe, emellett a legtöbb szervben, így a herékben is termelődve autokrin/parakrin úton is kifejti hatását (Rosen, 1999; Jones és Clemmons, 1995). Az IGF1 receptorát kimutatták a here sejtjeiben és a spermatozoákon is, patkányban, emberben és lovakon végzett vizsgálatok során (Wang és Hardy, 2004; Henricks et al., 1998). Bár számos hormon, vagy faktor Sertoli sejt proliferációt és maturációt, valamint a napi sperma produkciót befolyásoló hatását leírták, így például az FSH (Baker és O'Shaughnessy 2001; Abel et al., 2008), az androgének, vagy a pajzsmirigy hormonok, az aktivin, a fibroblaszt növekedési faktor, vagy az epidermális növekedési faktor szerepét (Fumel et al., 2012; Hu et al., 1999), az inzulin/IGF1 rendszer lehet a legfontosabb hormonális szignál a kellő méretű és normál funkciójú Sertoli sejt populáció meglétének hátterében. Az IGF-ok a legfontosabb növekedési faktorok lehetnek a Sertoli sejtek számának és méretének regulálásában (Pitetti et al., 2013). A Leydig és Sertoli sejtek saját IGF1 termelését a gonadotropin hormonok regulálják (Hess és Roser, 2001). Érdekes módon az FSH interakciót mutat az IGF jelátvitellel, így több ponton is stimulálja az IGF1 szekréciót, többek között erősíti a Sertoli sejtek saját IGF1 szekrécióját, erősíti az IGF1 mediált PI3K/AKT aktivációt a Sertoli sejtekben, ugyanakkor az IGF1R aktivitás elengedhetetlen az FSH-indukált AKT foszforiláció lezajlásához (Zhou et al., 2013). Amellett, hogy az IGF1 fontos szerepet játszik az FSH hatás mediálásában, képes stimulálni az FSHR expressziót, valamint a mind az IGF1, mind az FSH számára közös jelátviteli útvonalak aktiválását (Khan et al., 2002; Griffeth et al., 2014). A herén expresszáldó IGF1R-ok hiánya esetén a heresúly 34.6%-os csökkenéséről számoltak be, ami szintén aláhúzza az IGF1R jelenlétének fontosságát (Pitetti et al., 2013). Az említett csökkent súlyú herékben sem a kanyarulat csatornák hámszövetének szerkezete, sem pedig a tubulusok átmérője nem változott, ugyanakkor a csatornák hosszának masszív csökkenését írtak le. A sperma termelés szintén csökkent ezekben az egyedekben, ugyanakkor a spermiumok életképessége és motilitása nem változott (Pitetti et al., 2013). Összességében tehát az IGF1 a Sertoli sejtek számának fontos szabályzó faktora, ugyanakkor a sejtek funkcióját nem befolyásolja, így az ivarsejtek differenciálódása, illetve a spermatogenezis folyamata a faktor hiányában sem károsodik (Griffeth et al., 2014; Pitetti et al., 2013). Az IGF1 hatása auto-/parakrin úton valósul meg a kanyarulat csatornák epiheliumában (Pitetti et al., 2013), így képes modulálni a sejtek túlélését, proliferációját, differenciációját és metabolizmusát (Nakae et al., 2001). Az IGF1 és az IGF1R is expresszáldó a spermatogóniumokon is és a spermacitákon is, ami felveti közvetlen autokrin/parakrin szabályzó szerepének lehetőségét a spermatogenezis során (Yoon et al., 2011; Söder et al., 1992). A tesztikuláris IGF1 produkció fő forrásai maguk az ivarsejtek, leginkább a spermatogóniumok, melyek IGF1 termelése parakrin úton hat a Sertoli- és Leydig sejtek különböző funkcióira, valamint a

peritubuláris myoid sejtekre a here fejlődése során, majd később a felnőtt életben (Pitetti et al., 2013). Az IGF1, az LH-hoz hasonlóan szintén hatással van a Leydig sejtek proliferációjára és szteroidprodukcójára a pubertás időszakában. Az IGF1 bizonyítottan stimulálja a Leydig sejtek differenciációját és érését (Wang et al., 2003). IGF1 hiány esetén, zavart szenved az LH-stimulált androgén szekréció, így csökken a szteroidogenezishez köthető markerek (pl. StAR, 5α reduktáz) expressziója (Baker et al., 1996; Hu et al., 2010). Kimutatták, hogy az IGF1 a StAR protein expresszió upregulációján keresztül képes stimulálni a Leydig sejtek szteroidogenezisét (Manna et al., 2006; Colón et al., 2007), ugyanakkor ez a hatás fejlődési stádium-függőnek bizonyult. In vitro körülmények között vizsgálva az IGF1 önmagában nem volt hatással a pubertás időszakában járó, sem az ivarérett lovakból származó Leydig sejtek szteroidprodukcójára, ugyanakkor LH-val szinergizmusban dózisfüggően képes növelni a T-szintézist ivarérett csődörökben (Yoon and Roser, 2011). Patkányokon végzett in vitro vizsgálatban IGF1 kezelés hatására az éretlen Leydig sejtek proliferációjának dózisfüggő növekedése, valamint csökkent apoptotikus Leydig sejt arány figyelhető meg mind a juvenilis, mind pedig az ivarérett állatok esetében (Colón et al., 2007). A here és mellékhere eredetű IGF1 kimutatható szeminális plazmából (Glander et al., 1996), így a spermatozoákon kifejeződő saját receptorán keresztül hatva, segíthet kivédeni a mitokondriális diszfunkciót, valamint antioxidáns-szerű hatással bír (Sortino és Canonico, 1996). Több vizsgálat eredményei alapján IGF1 kiegészítés hatására javult a motilitás, ezen belül a progresszív motilitás, a kiegészítés jó hatással van a kapacitáció, valamint az akroszóma reakció folyamatára, csökken az apoptotikus sejthalakok aránya, illetve az IGF1 kiegészítés segíti a spermatogóniumok DNS szintézisét (Söder et al., 1992; Ozkurkucugil et al., 2004; Miah, et al., 2008; Pan et al., 2015). Az IGF1 szerepének megítélését nehezíti, hogy a fentebb tárgyalt hatások eltérő mértékben érvényesülnek az egyes életszakaszokban. Juvenilis korú patkányokban az IGF1 hasonló intenzitású festődése volt jellemző az ivarsejtek előalakjaiban és a Sertoli sejtekben, ugyanakkor a utóbbiak esetében az élet harmadik hetét követően megszűnik a fehérjeexpresszió. Ivarérett patkányokban az IGF1 megjelenik a spermaticitákban de a spermatogóniumokban, a Sertoli és a Leydig sejtekben nem (Hansson et al., 1989), az IGF1R foszforilált formában kimutatható az ivarsejtekben, úgy ahogy a Leydig és a Sertoli sejtekben (Colón et al., 2007). Lovakban az IGF1 and IGF1R expresszió intenzitása a Leydig sejtekben, a spermatogóniumokban, valamint a spermaticitákban folyamatosan változik az élet egyes időszakaiban (Yoon et al., 2011). Ivarérett csődörökben a Leydig sejtek és a spermatogóniumok pozitív immunreakciót mutattak, mindkét fehérje vizsgálata során, míg a spermaticiták csak gyenge szignált mutattak, a Sertoli sejtek pedig negatívak voltak (Yoon et al., 2011).

5.1.3. A hosszú hatású GnRH szuperagonista alkalmazásával indukált hipogonadizmus, mint az infertilitás modellje, és ennek hatása a metabolikus funkciókra

Kutyák esetében a herék működésének sejtszintű és molekuláris aspektusai máig nem teljesen tisztázottak. A lassú felszívódású GnRH implantátumok képesek elnyomni a gonadotropin- és tesztoszteronszekrúciót (Goericke-Pesch, 2017), így ezek a herék alkalmasak lehetnek az infertilitás hátterében álló endokrin és para-/autokrin regulációs folyamatok vizsgálatára. A sebészi kasztráció alternatívájaként többféle, reverzibilis, műtéti beavatkozást nem igénylő, kémiai alapú módszert is kifejlesztettek. A nyolcvanas évek elejétől számos publikáció született a hosszú hatású GnRH agonisták ilyen irányú alkalmazásáról (Fontaine és Fontbonne, 2011). Ezek a nemi működésért felelős hipotalamikus neurohormon analógok képesek biológiai választ kiváltani a hipofízisbeli GnRH receptorokon, és így az LH és FSH felszabadulását indukálni. A kezdeti stimuláló („flare-up”) hatást követően azonban bekövetkezik az agyalapi mirigy deszenzitizációja a GnRH receptorok downregulációján keresztül, ami átmeneti hipogonadizmushoz vezet (Heber et al., 1982; Vickery, 1985). Az adenohipofízis LH és FSH termelő sejtjeinek GnRH hatásával szembeni megváltozott válaszkészsége mellett kimutatták a Leydig sejtek LH-val szembeni érzéketlenségét is (Junaidi et al., 2007). A hosszú hatású GnRH analógok hatásmechanizmusából következik, hogy a downreguláció kialakulása után az alacsony nemi hormon szint mellett a gonadotropinszintek is alacsonyak lesznek. Ilyen GnRH szuperagonista a deslorelin-acetát is, amit állatorvosi vonalon Trigg és munkatársai alkalmaztak először (Trigg et al., 2000; Trigg et al., 2001). Az implantátum beültetését követő „flare-up” hatást a perifériás tesztoszteronszint emelkedése jellemzi. A tesztoszteron csúcskoncentrációja a kezelést követő 40. percben mérhető, majd pár óráig (Junaidi et al., 2003) vagy napos (Junaidi et al., 2007; Polisca et al., 2013) perzisztálás után alapszintre csökken. Más szerzők hosszabb, még a 9-17. napon is mérhető tesztoszteron-emelkedési hullámról számoltak be a 4.7 mg-os deslorelin implantátum alkalmazása során (Romagnoli et al., 2012). Az ezt követő progresszív csökkenés során a tesztoszteronszint a 11. (Polisca et al., 2013), 22-33. (EMA 2010), illetve a 64-75. napon (Romagnoli et al., 2012) méréshatár alá csökken. A deslorelinkezelést követő tesztoszteronszint-csökkenés eredményeként átlagosan a 4-6. hétre azozoospermia alakul ki (Trigg et al., 2001). A kezelt állatokban a herék atrófiája figyelhető meg, illetve a spermatogenezis a spermatogóniumok fázisában elakad (Fontaine és Fontbonne, 2011). A deslorelin dózisától függetlenül (3, 6 és 12 mg-os implantátumok beültetését követően, azonos mértékben) romlani kezd az ejakulátum minősége 22 nappal, mások szerint 28-35 nappal az implantációt követően (Junaidi et al., 2009a; Polisca et al., 2013; Trigg et al., 2006). Kezdetben csökken az ejakulátum

mennyisége, majd csökken a spermiumok motilitása és koncentrációja, illetve akár 80%-ig megemelkedik az abnormális morfológiájú, főleg szekunder defektusokat mutató spermiumok aránya (Junaidi et al., 2009a; Polisca et al., 2013; Trigg et al., 2006). Az implantációt követően a spermavétel átlagosan a 35. napig lehetséges (Junaidi et al., 2009a; Polisca et al., 2013; Trigg et al., 2006). Trigg és mtsai (2006) a hágómozgások megléte alapján elbíralt libidó 50%-os csökkenését, majd megszűnését írták le a 22., illetve a 30-35. napon (Trigg et al., 2006). Ezzel szemben Junaidi vizsgálatában (2009) az ejakulációnak a 35. nap körül jelentkező elmaradása mellett az állatok libidóját változatlanok ítélték, mert az állatok továbbra is erekciót és hágómozgásokat mutattak a sikertelen mintavételek alkalmával is (Junaidi et al., 2009a). Az irodalom ugyanakkor nem egységes abban a tekintetben, hogy a „flare-up” időszakra jellemző átmeneti tesztoszteronszint-emelkedés klinikai szinten is detektálható-e. A spermaminőség kezdeti javulásáról számoltak be Romagnoli és mtsai (2012), akik 6-ból 4 kutyánál megnövekedett ejakulátum mennyiséget és progresszív motilitást, 3 kutyában pedig megnövekedett összpermiumszámot írtak le a 4.7 mg-os deslorelin implantátum beültetését követően (Romagnoli et al., 2012). A deslorelin implantátumnak a spermiumok DNS integritására gyakorolt esetleges hatásáról sem a kezdeti „flare-up”, sem a későbbi, az azoospermia kialakulásáig eltelt időszakban, illetve a down-regulációt követően a spermatermelés visszaállásának idejére vonatkozóan sincsenek adatok.

Míg a GnRH analógok reproduktív szervekre kifejtett hatása klinikai szinten jól ismert, a nem reproduktív szervrendszereket és folyamatokat érintő, például az anyagcserére, táplálékfelvételre kifejtett hatásaival kevésbé foglalkozik a szakirodalom annak ellenére, hogy a sebészi ivartalanítás a legjelentősebb rizikófaktor társállataink elhízásának hátterében (Kustritz, 2012; Martin et al., 2006). A gonádok eltávolítása mind nőivarú, mind hímivarú kutyák esetében befolyásolja a metabolikus funkciókat, de ennek pontos háttere, valamint a beavatkozás időpontjának jelentősége máig sem tisztázott (Reichler 2009). Szuka kutyákban a sebészi ivartalanítást követően ~30%-kal csökken az energiaszükséglet, ugyanakkor nő a táplálékfelvétel és csökken az állatok aktivitása (Haupt et al., 1979; Haupt, 1991; Jeusette et al., 2004; Jeusette et al., 2006; Schauf et al., 2016), így már 90 nappal az ivartalanítást követően testsúlynövekedés mérhető (Haupt et al., 1979). Ivartalanított kan kutyákban is megfigyelhető a megnövekedett táplálékfelvétel és az aktivitás csökkenése, gyakoribb az elhízás és ehhez kapcsolódóan a cukorbetegség kialakulásának valószínűsége (Edney és Smith, 1986; Lund et al., 2006, Maarchalkerweerd et al., 1997; McGreevy et al., 2005). Renauld és mtsainak megfigyelései szerint (1980) 4 hónappal a kasztrációt követően a kan kutyák kondíciója és pajzsmirigyfunkciója nem változott, viszont 10 hónappal a beavatkozást követően az állatok testsúlynövekedést, elhízást mutattak (Renauld et al., 1980). Vizsgálataik szerint a hiperglikémiára adott inzulinválasz intenzívebb a kasztrált állatokban,

illetve az ivartalanítás segíti a zsír raktározását azáltal, hogy hiperglikémia mellett is növeli a szövetek szabadzsírsav felvételét a vérből, illetve hipoglikémia esetén gátolja a lipolitikus válasz kialakulását (Renauld et al., 1980). Férfiakban a GnRH agonisták alkalmazása növeli a testzsír mennyiségét, a vér koleszterin- és TG-szintjét, és csökkenti a sovány testtömeget, valamint az inzulinérzékenységet (Smith et al., 2006; Smith et al., 2008). Bár kan kutyákban megfigyelték kémiai kasztrációt követően a T-szint csökkenését kísérő fokozódó étvágyat (Goericke-Pesch et al., 2010; Ludwig et al., 2009), a hosszú hatású deslorelin implantátum kezelés részletes metabolikus hatásait máig nem írták le.

5.2. Célkitűzések

Összességében tehát mind a herében folyó szteroidogenezist (Leydig sejt funkció), mind az ivarsejt-, valamint a Sertoli sejt funkcióját auto-/parakrin vagy endokrin úton is modulálhatja a Lep, illetve az IGF1 mint metabolikus faktor. Kutya fajban a Lep tesztikuláris funkcióban játszott szerepe még tisztázásra vár, míg az IGF család egyes képviselőinek expresszióját már vizsgálták RT-PCR módszer segítségével egészséges és daganatos here szöveten (Peters et al., 2003). Utóbbi, Peters és mtsai (2003) által végzett vizsgálat során kimutatták a Sertoli sejtes daganatok és a Seminómák alacsonyabb IGF1 és IGF kötő fehérje 1 gén expresszióját. A Leydig sejtes és kevert tumorok esetében magasabb IGF1R és IGF kötő fehérje 4 mRNS-szinteket detektáltak. A szerzők ezek alapján azt a következtetést vonták le, hogy a különböző tumorokban jellemző génexpresszió nem tér el drámai mértékben az egészséges szövetekben jellemző értékektől, és az IGF rendszer jelentős szerepe a heredaganatok növekedésében nem valószínű. Egészséges kutya hereszövege esetében ugyanakkor a Lep és az IGF1 is hatással lehet a spermatogenezis és a szteroidogenezis folyamatára. Saját célul a leptinnek és az IGF1-nek a kanok nemi működésében játszott szerepének megismerését tűztük ki, a leptin, az IGF1, valamint receptoraik mRNS és fehérje-szintű lokalizációjának vizsgálatán keresztül. Ezek gén- és fehérjexpresszióját tanulmányoztuk juvenilis, ivarérett, valamint kémiai kasztráción átesett ivarérett kanok heréjében és mellékheréjében. Első lépésként vizsgáltuk a leptin és az inzulinszerű növekedési faktor-1 szerepét fejlődési stádium szerint, azaz egészséges, juvenilis, és ivarérett kutyákból származó hereszöveteken (5.3.). Ezt követően intakt kanok és deslorelin tartalmú implantátummal kezelt hipogonadotrop, infertilis állatok heréjében és mellékheréjében vizsgáltuk a Lep, LepR, IGF1 és az IGF1R expresszió alakulását (5.4.)

5.3. A leptin és az inzulinszerű növekedési faktor-1 szerepének vizsgálata egészséges kutyákból származó here szöveteken

Linda Müller, Mariusz P Kowalewski, Iris M Reichler, Eszter Kollár, Orsolya Balogh
Different expression of leptin and IGF1 in the adult and prepubertal testis in dogs *Reprod Domest Anim.* 2017 Apr;52 Suppl 2:187-192.

Több faj esetében is feltételezik a Lep és IGF1 herében kifejtett, a spermatogenezist és a tesztoszterontermelést auto- és parakrin úton befolyásoló szerepét. A vizsgált faktorok és receptoraik egyes állatfajokban némileg eltérő celluláris lokalizációt mutatnak, emellett kifejeződésük függ a here fejlettségi állapotától, ami alapján feltételezhető a Lep és az IGF1 hereműködésben betöltött, faj- és korszpecifikus szerepe. Munkánk célja a Lep és IGF1 herefunkcióra kifejtett, auto-/parakrin úton megvalósuló szabályozó szerepének tanulmányozása volt.

5.3.1. Anyag és módszer

Vizsgált állatok és mintagyűjtés

Az elváltozást nem mutató herékből származó mintákat rutin kasztrációk alkalmával gyűjtöttük egészséges, ivarérett (n=7, 2-5,5 éves korú, 12-26 kg testsúlyú, 5 keverék és 2 angol agár fajtájú kutya) illetve a pubertás előtt álló (n=7, kor 8 hetes korú, 4,1-6,6 kg testsúlyú, Australian Cobberdog fajtájú) állatokból. A juvenilis korú egyedek 2 külön alomból származtak (3 az egyikből, és 4 a másiktól). A kimetszett szövetmintákat RNAlater[®] oldatban (Ambion Biotechnologie GmbH, Wiesbaden) konzerváltuk és +4°C-on, majd -80°C-on tároltuk az RNS megőrzése céljából. Az immunhisztokémiai vizsgálatok céljára gyűjtött mintákat a korábbiakban leírtak szerint készítettük elő (4.3.).

A Lep, LepR, IGF1 és az IGF1R génexpressziójának vizsgálata herében

A minták RNS tartalmának izolálását, majd a reverz transzkripciót és magát a szemikvantitatív valós idejű PCR reakciót a korábban ismertetett (4.5.) módon végeztük.

A vizsgált gének (canine Lep, LepR, IGF1, IGF1R) expressziójának szemikvantitatív valós idejű (TaqMan) PCR vizsgálata során a korábbi vizsgálatokban már alkalmazott primer-eket és detekciós rendszert alkalmaztuk (Balogh et al., 2012 and 2015; Kautz et al., 2014). Lep (forward): 5'-GGG TCG CTG GTC TGG ACT T-3', Lep (reverse): 5'-CTG TTG GTA GAT GGC CAA CGT-3', Lep TaqMan probe: 5'-TCC TGG GCT CCA ACC AGT CCT GAG T-3'; LepR (forward): 5'-CAT TTG CGG AGG GAT GGT T-3', LepR (reverse): 5'-AGC GGT TTC ACC ACG GAA T-3', LepR TaqMan probe: 5'-TTG ACT CTT CAC CAA CGT GTG TGG TTC C-3'; IGF1R (forward): 5'-GGA CGT TGA GCC TGG CAT T-3', IGF1R (reverse): 5'-CAC TCT

TAG CCC CAC GGA TGT-3', IGF1R TaqMan probe: 5'-AGC CCT GGA CGC AGT ATG CGG-3'. Ezeket a TaqMan módszereket szintén korábban már leírt protokoll szerint végeztük (Kautz et al., 2014; Kowalewski et al., 2006a). A relatív gén expressziókat a korábban ismertetett komparatív Ct ($\Delta\Delta Ct$) módszer segítségével határoztuk meg.

Immunhisztokémiai vizsgálatok

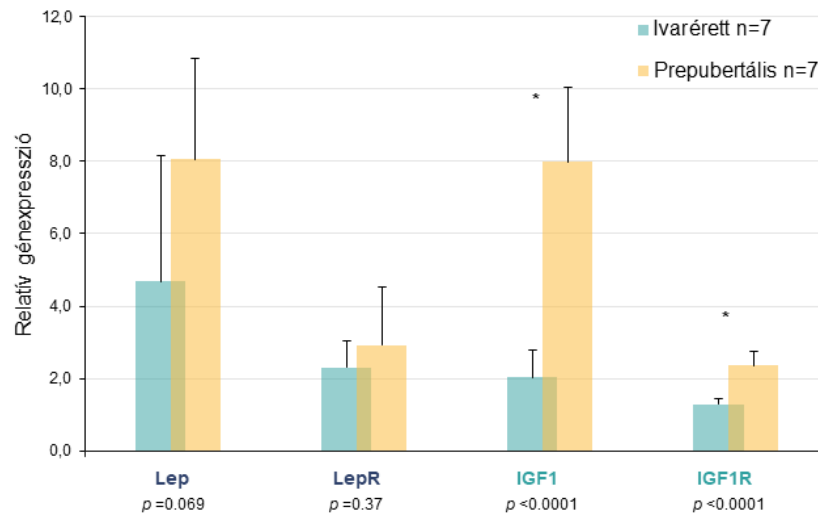
Az immunhisztokémiai vizsgálatok során, a fehérjék kimutatására indirekt immunperoxidáz módszert alkalmaztunk (Kowalewski et al., 2006a). A metszetek készítésének és előkészítésének lépései megegyeztek a 4.3 vizsgálat esetében bemutatott módszertannal. A Leptin kimutatására nyúlban termeltetett poliklonális antitestet (ARP41697_P050, Aviva Systems Biology, San Diego, USA), míg a LepR jelölésére kecskében termeltetett poliklonális antitestet használtunk (Ob-R (M-18): sc-1834, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) 1:500, illetve 1:150 hígításban. Az utóbbi antitest alkalmas mind a rövid, mind pedig a hosszú receptorformák jelölésére. Az IGF1, valamint az IGF1R kimutatása nyúl eredetű poliklonális antitesttel történt (Bioss Inc., Woburn, MA, USA; bs-0014R, 1:300 hígítás és bs-0227R, 1:350 hígítás). Az aspecifikus kötőhelyek blokkolását 1.5% albuminnal, valamint a Lep, az IGF1 és az IGF1R esetében 10%-os kecske szérummal (KPL, Gaithersburg, USA), a LepR esetében pedig 10%-os ló szérummal végeztük (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Biotinilált kecske anti-nyúl IgG-t vagy lóban termelt anti-kecske IgG-t (Vector Laboratories) használtunk szekunder antitestként, 1:100 hígításban. Izotípus kontrollként primer antitest nélkül alkalmaztuk az anti-nyúl (Lep, IGF1, IGF1R) vagy az anti-kecske (LepR) IgG-t (Vector Laboratories). A Lep és LepR kimutatásra használt antitesteket korábban már sikeresen alkalmazták kutya szöveteken (Ressel et al., 2012; Balogh et al., 2015). Az IGF1 és az IGF1R kimutatása során egér máj, illetve egérből és kutyából származó vázizom szövetet használtunk pozitív kontrollként.

Statisztikai kiértékelés

Az adatok normál eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel igazoltuk. Az ivarérett és prepubertális csoportban meghatározott relatív génexpressziók értékeit Student féle kétoldali, független mintás t-próbával hasonlítottuk össze. Az eredményeket, mint átlag \pm szórás értékeket tüntettük fel, szignifikancia szintként pedig a $P \leq 0.05$ értéket jelöltük meg. A statisztikai elemzést SPSS szoftver segítségével végeztük (IBM® SPSS® Statistics for Windows, Version 22.0 (Armonk, NY, USA)).

5.3.2. Eredmények

Lep és LepR mRNS szintek nem különböztek a prepubertális és az ivarérett állatokban ($P=0,069$ és $P=0,37$, **23. ábra**). A hereszövetben jellemző IGF1 és IGF1R génexpressziók magasabbak voltak a 8 hetes korú állatokban, mint a felnőtt egyedekben ($P<0,001$; **23. ábra**).

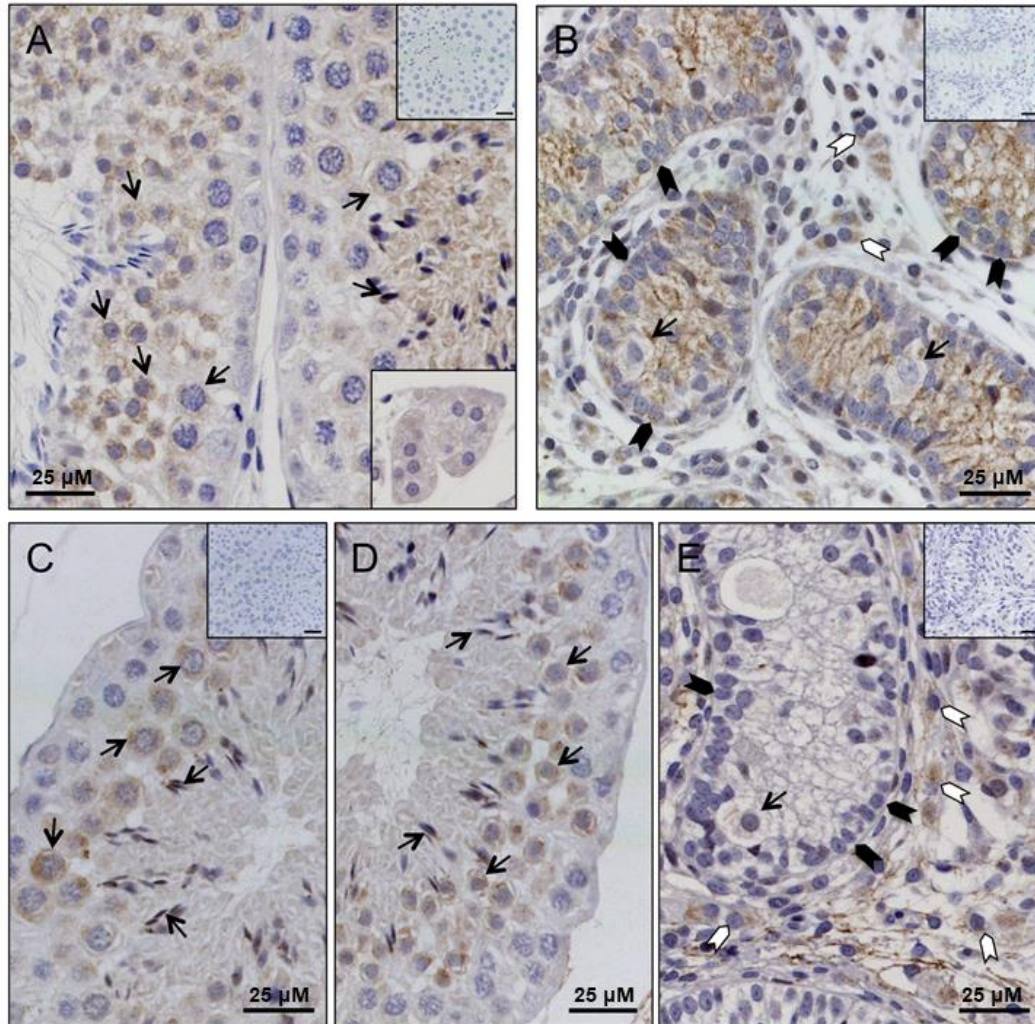


23. ábra A leptin (Lep), leptin receptor (LepR), valamint az inzulinszerű növekedési faktor 1 (IGF1) és receptorának (IGF1R) relatív génexpressziója egészséges ivarérett, valamint prepubertális (8 hetes életkorú) kutyákból származó here mintákban. A csillaggal jelölt oszlopok esetén a csoportok között szignifikáns különbség mutatkozott ($P<0,05$).

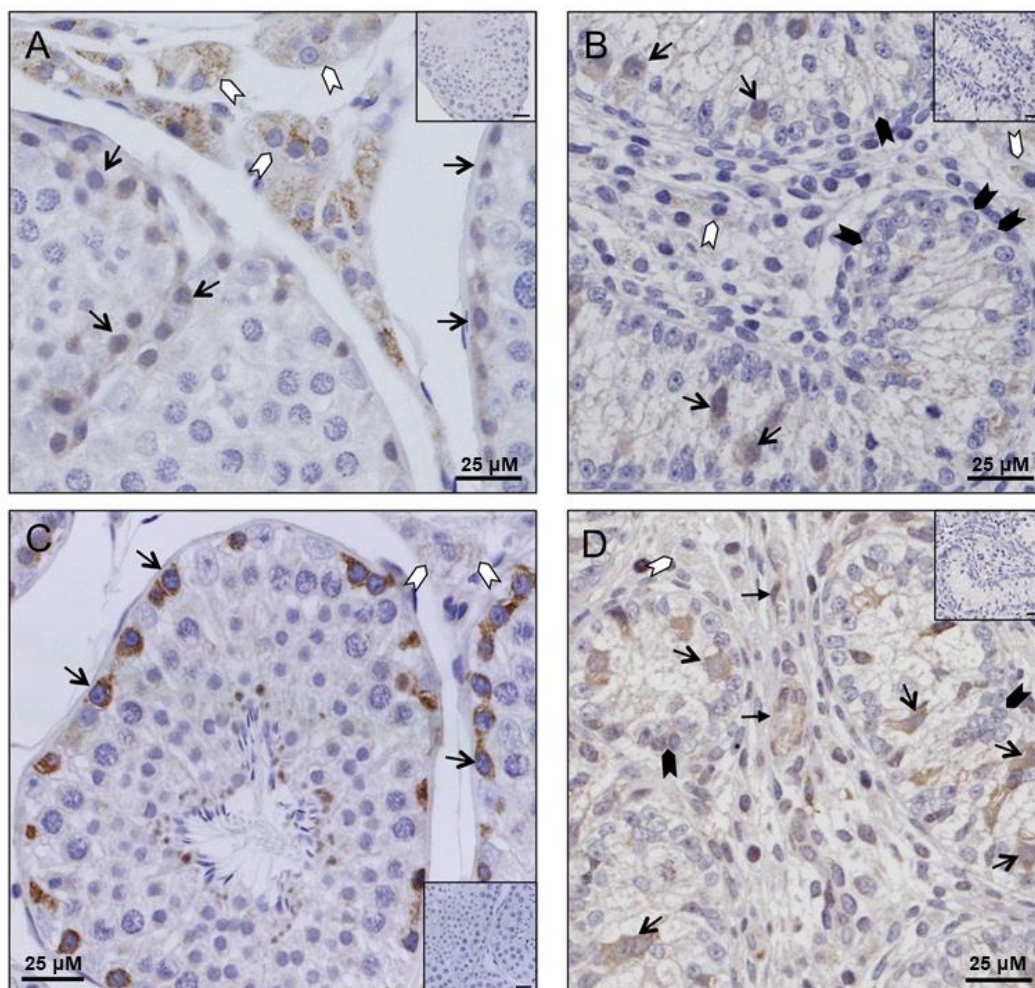
Ivarérett állatokban erős Lep immunreaktivitás látszott a spermatocitákban, valamint a spermatidákban, míg a Leydig sejtek csak sporadikusan, gyengén festődtek (**24. A ábra**). Juvenilis egyedekben intenzív pozitív reakciót láttunk a Lep kimutatása során mind a Leydig-, mind a Sertoli sejtekben (**24. B ábra**). A LepR ivarérett állatok heremintáiban a spermatocitákban és a spermatidákban jelent meg (**24. C ábra**), de nem mutatkozott a Leydig sejtekben. A fiatal állatokban ugyanakkor a LepR immunreaktivást a Leydig sejtekben láttunk (**24. D ábra**), emellett pozitivitást írtunk le a stroma fibroblaszt sejteiben, amik nagyobb arányban jelennek meg a prepubertális here szövetben. A vérerek intimája és media rétege Lep és LepR pozitivitást is mutatott mindkét korosztály esetében.

Ivarérett állatokban az IGF1 és IGF1R fehérjék jelenlétét igazoltuk a kanyarulat csatornában megjelenő spermatogóniumokban (**25. A és 25. C ábra**). Az IGF1 szignál a Leydig sejtekben erősebbnek mutatkozott, mint az IGF1R, ami csak gyengébb, sporadikus festődést mutatott. A fiatal állatokban a Leydig sejtek, illetve az ivarsejtek is IGF1 pozitivitást mutattak, míg a Sertoli sejtekben csak gyengébb szignált láttunk (**25. B ábra**). A Leydig sejtek, valamint a gonociták pozitívak voltak IGF1R kifejeződés szempontjából is, a Sertoli

sejtek viszont csak helyenként, gyengébben festődtek (25. D ábra). A vérerek médiája mindkét korosztályban erős immunreaktivitást mutatott az IGF1R esetében (25. D ábra), viszont csak gyengébben festődött IGF1 kimutatás során. Az eredményeket a 10. táblázatban összegeztük.



24. ábra A Lep fehérje megjelenése ivarérett (A) és prepubertális (B) hereszövetben és a LepR fehérje lokalizációja ivarérett (C) és prepubertális herében (D). A: Lep immunreaktivitás figyelhető meg a spermatocitákban és a spermatidákban (fekete nyíllal jelölve). A Leydig sejtek sporadikus, gyenge festődést mutatnak (jobb alsó kép). B: Prepubertális kutyák esetében, mind a Leydig sejtek (fehér nyilak) mind a Sertoli sejtek (fekete nyilak) pozitivitást mutatnak. C és D: Az ivarérett herékben a spermatociták és az elongált spermatidák LepR immunreaktivitást mutatnak (C, fekete nyilak), emellett a LepR megjelenik a kerek és elongálódó spermatidák esetében is (D, fekete nyilak). E: A LepR prepubertális herék vizsgálata során látható a Leydig sejtekben (fehér nyilak), míg a Sertoli sejtek (fekete nyílhegyek) és a gonociták (fekete nyilak) nem festődtek. Kisebb képeken mutatjuk a Lep vagy a LepR izotípus kontrolljait.



25. ábra Az IGF1 fehérje megjelenése ivarérett (A) és prepubertális (B) hereszövetben és az IGF1R fehérje lokalizációja ivarérett (C) és prepubertális herében (D). A: IGF1 pozitivitás figyelhető meg a spermatogóniumokban (fekete nyilak), emellett intenzív festődés jelenik meg a Leydig sejtekben (fehér nyílhegyek) az ivarérett szövetek vizsgálata alapján. B: A prepubertális herékben a Leydig sejtek (fehér nyílhegyek) és a gonociták (fekete nyilak) mutatnak IGF1 immunreaktivitást, ugyanakkor a Sertoli sejtek csak gyengén festődnek (fekete nyílhegyek). C: Ivarérett állatok heréjében, erős IGF1R pozitivitást figyeltünk meg a spermatogóniumokban (fekete nyilak), a Leydig sejtek viszont csak gyengébben festődtek (fehér nyílhegyek). D: Prepubertális állatok mintáiban IGF1R festődés látható a gonocitákban (fekete nyilak), a Leydig sejtekben (fehér nyílhegyek) és sporadikusan, gyengébben a Sertoli sejtekben is (fekete nyílhegyek). A vérerek szintén IGF1R immunreaktivitást mutattak (fehér nyilak). Kisebb képeken mutatjuk az IGF1 vagy az IGF1R izotípus kontrolljait.

10. táblázat A Lep, a LepR, az IGF1 és az IGF1R celluláris lokalizációja immunhisztokémiai vizsgálatok alapján prepubertális és ivarérett kan kutyákban. A feketével vagy szürkével szedett sejtalakok esetében erős, illetve gyenge reakciót figyeltünk meg, míg a fehérrel szedett struktúrákban nem volt festődés.

HERE	Prepubertális	Ivarérett
Lep	Leydig sejtek Sertoli sejtek Gonociták -	Spermatociták Spermatidák Leydig sejtek sporadikusan, gyengén
LepR	Leydig sejtek Sertoli sejtek - Gonociták -	Spermatociták, Elongált spermatidák Leydig sejtek -
IGF1	Gonociták Leydig sejtek Sertoli sejtek gyengén	Spermatogóniumok Leydig sejtek Sertoli sejtek -
IGF1R	Gonociták Leydig sejtek Sertoli sejtek sporadikusan, gyengén	Spermatogóniumok Leydig sejtek gyengén Sertoli sejtek -

5.3.3. Megbeszélés

El-Hefnawy és mtsai (2000) eredményeivel egybehangzóan, ahogy azt felnőtt egerek here mintáiban leírták, ivarérett kutyák spermatocitákban is jellemző a LepR expresszió, míg a Sertoli és Leydig sejtekben nem jelenik meg. Ugyanakkor saját eredményeink szerint a LepR fehérje szinten a spermatidákban is megjelenik. A Lep lokalizáció megegyezett a LepR esetében leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy a Leydig sejtekben is kimutatható volt a Lep fehérje. Utóbbiak a Lep spermatogenezisre kifejtett direkt hatását valószínűsítik kutyák esetében is. Ivarérett egerekből származó izolált kanyarulat csatornák vizsgálata alapján beszámoltak a Lep-indukált Signal Transducer és transzkripció aktivátor-3 (STAT3) jelátvitelről, mely általában a sejt differenciáció folyamatához köthető (El-Hefnawy et al., 2000). Ezek alapján azt feltételezzük, hogy a Lep szerepet játszhat az A típusú spermatogóniumok proliferációja és megújulása során, valamint a spermatociták spermatidává történő érése folyamán. Saját eredményeink alapján a Lep spermatocitákra és spermatidákra kifejtett hasonló hatását feltételezzük kutyák esetében is. Bár jelen vizsgálatban erre irányuló vizsgálatot nem végeztünk, korábbi kutatások szerint ennek a Lep hormonnak antiapoptotikus hatása is lehet az ivarsejteken, ahogy ezt Lep hiányos ob/ob egerek esetében igazolták a spermatociták emelkedett apoptotikus rátájának kimutatásával (Bhat et al., 2006). A Lep ivarérett egyedek Leydig sejtjeinek szteroidogenezisére kifejtett negatív hatásáról, valamint a hatás hiányáról is születtek publikációk egerek és patkányok

vizsgálata alapján (Tena-Sempere et al., 1999 és 2001, Herrid et al., 2008b). A Lep szintén negatív hatást írtak le olyan humán vizsgálatok alapján, melyek során a LepR pozitívást mutató Leydig sejtek aránya negatívan korrelál a szérumban T-szinttel (Ishikawa et al., 2007). Saját eredményeink szerint, szemben a sertés szövetek immunhisztokémiai vizsgálata során tapasztaltakkal (Rago et al., 2009), a kutya herékben a Leydig sejtek csak gyengén vagy nem expresszálják a Lep és a LepR fehérjét. Ez alapján lehetséges, hogy kutyában a fiziológiásan funkcionáló ivarérett herében a Lep nem, vagy csak minimális mértékben befolyásolja a T produkciót. A Lep és LepR gének expressziója nem különbözött a prepubertális és ivarérett hereszövetben. Bár fiatal állatok esetében a Lep fehérje szignál még intenzív volt a Sertoli sejtekben, ez felnőtt korban már nem jellemző. Ez a változás feltételezhető a Lep specifikusan a Sertoli sejtek érése során játszott szerepét. Emellett az ivarérett állatoknál megfigyeltél erősebb Lep és LepR fehérje expressziót írtunk le a Leydig sejtek esetében a prepubertális mintákban, ami alapján valószínűsíthető, hogy a Lep stimulálja ezeket a sejteket a proliferációját és differenciációját a juvenilis herékben, illetve hatással lehet a T produkcióra is, ahogy ezt fiatal egerekből származó here szöveten végzett in vitro vizsgálatokban leírták (Herrid et al., 2008b).

Ivarérett kutyák esetében mind az IGF1, mind az IGF1R expresszióját kimutattuk a spermatogóniumokon és a Leydig sejteken, ami megegyezett a lovakból származó minták vizsgálata alapján leírt lokalizációval (Yoon et al., 2011). Ezzel szemben patkányokban az IGF1 jelenléte a spermaticitákban jellemző (Hansson et al., 1989), a foszforilált IGF1R pedig a csíra sejtek mellett a Leydig – és Sertoli sejtekben is megjelent (Colón et al., 2007). Patkányokban leírt szerepéhez hasonlóan, ahol, az IGF1 növeli a DNS szintézist a spermatogóniumokban (Söder et al., 1992), emellett csökkenti az apoptózis mértékét a csíra sejtekben (Ozkurkugil et al., 2004), az IGF1 kutyák esetében stimulálhatja a spermatogóniumok proliferációját és a csíra sejtek túlélését, bár ebben az irányban még nem történtek in vitro kísérletek. A Leydig sejtek erős IGF1 és IGF1R immunreaktivitása alapján, az IGF1 anti apoptotikus, valamint a T-szintézist segítő szignálként is működhet kutya esetében is, ahogy azt korábban rágcsálókban és lovakban leírták. (Manna et al., 2006; Colón et al., 2007; Yoon and Roser, 2011).

A rágcsálók vizsgálata során leírták alapján, az IGF1 kulcsfontosságú faktor a Sertoli sejtek fejlődése során. Az IGF1 és az inzulin szignál hiányában az egér herékben csökkent Sertoli sejt proliferációt mutattak ki a késői magzati és a korai posztnatális élet során, ami a felnőttkori heresúly, valamint a sperma produkció jelentős csökkenéséhez vezet (Pitetti et al., 2013). A faktor jelenléte szükséges a Leydig sejtek éréséhez és differenciációjához, emellett elengedhetetlen a posztnatális életben jellemző T bioszintézis folyamata során (Wang et al., 2003; Colón et al., 2007). Az ivarérett állatokéhoz képest magasabb IGF1 és IGF1R mRNA expressziót mutattunk ki a prepubertális állatokból származó heremintákon, a protein

lokalizáció alapján pedig egy - a Sertoli és a Leydig sejtek esetében is érvényesülő, - a fejlődést elősegítő hatás sejthető. Mindkét fehérje gonociták esetében jellemző megjelenése feltételezi a az IGF1 rendszer csírasejt proliferációt és differenciációt segítő hatását a juvenilis kutya herék esetében. A két hónapos állatokból származó mintákban jellemző szignifikánsan magasabb StAR mRNS-szintek ellenére, alacsonyabb számú IGF1 expresszáló Leydig sejt számot írtak le (Goericke-Pesch et al., 2013), ami magyarázhatja a juvenilis stádiumban eltávolított herék esetében jellemző alacsonyabb plazma T-szinteket (Mialot et al., 1988). Bár lovakban végzett vizsgálatok szerint az IGF1 nem stimulálta a T-szintézist az éretlen Leydig sejt kultúrákon (Yoon and Roser, 2011), feltételezésünk szerint juvenilis kutyákban az IGF1 növelheti a StAR gén expresszióját, ugyanakkor az mRNS transzkripciót követő folyamatok nem feltétlenül fejeződnek be a Leydig sejtekbe, így ez nem feltétlenül jelentkezik a T termelés emelkedésében.

Összességében, adataink alapján feltételezhető, hogy a Lep és IGF1 rendszerek is szerepet játszanak a herék működésében kutya fajban is. Az egyes faktorok szerepe változhat a fejlődési stádium függvényében. A Lep és IGF1 gének magasabb fokú expressziója és/vagy a fehérjék nagyobb arányú megjelenése az éretlen here egyes sejtípusain, ezek Sertoli vagy Leydig sejt proliferációban vagy érésben vagy a gonociták érésében játszott szerepét jelzi. Ivarérett állatokban a Lep szerepet játszhat a spermatoцитák és a spermatidák érése és differenciációja során, míg az IGF1 esetében a spermatogóniumok proliferációjának, valamint a Leydig sejtek szteroidogenezisének irányításában játszott szerepét valószínűsíthetjük.

5.4. A 4.7 mg deslorelin tartalmú implantátummal végzett kémiai kasztráció hatása a szérum tesztoszteronkoncentrációra, a spermaminőségre, testtömegre, valamint a here és a mellékhere leptin, leptin receptor, IGF1 és IGF1 receptorának génexpressziójára egészséges beagle kanokban

Linda Müller, Mariusz Pawel Kowalewski, Iris Margaret Reichler, Orsolya Balogh
Leptin, leptin receptor, and androgen receptor expression in the testis and epididymis of
adult male Beagles treated with a 4.7 mg deslorelin implant
Oral presentation XXI Congress of the European Veterinary Society For Small Animal
Reproduction 2018

Müller Linda, Mester László, Nagy Anna, Hanácsek Richárd, Janett Fredi, Cseh Sándor,
Reichler Iris Margaret, Balogh Orsolya
Deslorelin tartalmú implantátummal (Suprelorin® 4,7 mg) végzett kémiai kasztráció hatása a
spermaminőségre, a testsúlyra, a vér egyes biokémiai paramétereire és a vérképre ivarérett
Beagle kan kutyákban – Irodalmi áttekintés és saját tapasztalatok
Magyar Állatorvosok Lapja, in press

Kutyák esetében a herék működésének celluláris és molekuláris aspektusai máig nem teljesen tisztázottak. A lassú felszívódású GnRH implantátumok képesek szupresszálni a gonadotropin és tesztoszteron expressziót (Goericke-Pesch 2017), így ezek a down-reguláción átesett herék, prepubertális, illetve hipogonadális állapotot modellezve alkalmasak lehetnek a gonádokban zajló endokrin és para-/autokrin regulációs folyamatok vizsgálatára. Korábban kimutattuk, hogy a Lep szerepet játszhat a csírasejtek és a Leydig sejtek funkciójában, illetve hogy a Lep és a LepR lokalizációja változik a hereszövet érése során (Müller et al., 2017). Bár kutyák esetében a Lep expressziót még nem írták le a mellékherében, sertésben végzett vizsgálatok alapján a Lep és LepR prepubertális és ivaréret egyedekben különböző lokalizációval detektálható, ami alapján a Lep-nek szerepe lehet az ivarérett állatok mellékheréjének funkcionális aktivitásában (Rago et al., 2009). A Lep kutya heréken és mellékheréken kifejtett parakrin/autokrin úton megnyilvánuló hatásának elemzése céljából vizsgáltuk a deslorelin tartalmú implantátum (4,7 mg Suprelorin®, Virbac) Lep és LepR, valamint IGF1, IGF1R gén expresszióra kifejtett hatását 5 egészséges, beagle fajtájú kutyából származó here és mellékhere mintán. A vizsgálat eredeti célja mellett tanulmányoztuk a kémiai kasztráció spermaminőségre, a spermiumok DNS integritására, valamint anyagcserére kifejtett hatásait is. A vizsgálat során feldolgoztuk az előző vizsgálatban gyűjtött prepubertális korú egyedek mellékhere mintáit is és azokból is meghatároztuk a Lep és LepR génexpressziók alakulását.

5.4.1. Anyag és módszer

Munkánk során 5, Beagle fajtájú, kísérleti célra tenyésztett és tartott (ATRC Aurigon Kft., Dunakeszi, 9/1/2014; PEI/001/4557-4/2014) örökbefogadásra szánt, 31-46 hónapos, 10,4-13,9 kg testsúlyú, 2/5-3/5 kondícióbesorolású kan kutyát kezeltünk, vizsgáltunk, majd ivartalanítottunk. Az állatok a vizsgálatot megelőzően rendszeres állatorvosi felügyelet (részletes fizikális- és vérvizsgálat) alatt álltak, ami alapján egészségesek voltak és korábban reprodukív funkciót érintő vizsgálatban nem vettek részt. Az állatokat csoportban, 14 m² nagyságú, hasonló alapterületű kifutóval rendelkező boxban tartottuk. Folyamatos ivóvíz ellátás mellett napi egy alkalommal (11:00 órakor) kaptak teljes értékű száraztápot (Ecopet Natural, Farmina Pet Foods, 300 g/egyed), egészségi állapotukat pedig napi rendszerességgel ellenőriztük. Az állatok fizikális vizsgálatát, beleértve a testsúlymérést, valamint a vér- és spermaminták gyűjtését a reggeli órákban, 8 és 9 óra között végeztük 22 órás koplaltatást követően. Szőrnyírás és a bőr alapos fertőtlenítése után 4,7 mg deslorelin tartamú (ami megfelel 0,34-0,45 mg/ttkg dózishoz) implantátumot (Suprelorin®) ültettünk az állatok bőre alá, a lapockák közötti területre, a gyártó által a készítményhez csomagolt

applikátor segítségével. Az implantátum beültetését megelőzően egyhetes időközzel, két alkalommal történt spermavétel (-14. és -7. nap) az állatok szoktatása és a kezdeti spermaminőség ellenőrzése céljából, majd a beültetést (0. nap) követően heti két alkalommal addig, amíg a spermavétel lehetséges volt. Testsúlymérést, valamint a hematológiai- és biokémiai paraméterek vizsgálatát a kísérletbe vonáskor, és azt követően a 21. napon, majd kéthetente, illetve a kísérlet befejezésekor a 16. héten (112. nap) végeztük el, amikor az állatok sebészi kasztráción estek át. A szérumszorosztéronkoncentrációját a beültetést közvetlenül megelőzően (0. nap), majd a 3., 7., 14., 21., 35., 49., 77., és végül a 105. napon mértük. Az eltávolított heréket szövettanilag értékeltük. A vértvételek, valamint a mintatárolás technikája megegyezett a korábbi vizsgálatok esetén ismertetett módszerekkel. A hematológiai paraméterek közül vizsgáltuk a vörösvérsejteket jellemző hematokrit [PCV], vörösvérsejt-térfogat [MCV], átlagos hemoglobin tartalom [MCH], átlagos hemoglobin koncentráció [MCHC] értékeket, a fehérvérsejtek egyes populációit, valamint a vérlemezkeshámot. A biokémiai paraméterek közül minden állat mintáiból meghatároztuk az alanin amino-transzferáz- [ALT], alkalikus foszfatáz- [AP], kreatinin-, karbamid-, karbamid-nitrogén- [BUN], TG-, totál protein- és albuminszinteket, illetve az albumin/globulin arányt. Emellett mértük az ionizált klorid-, -kálium-, -nátrium-, valamint kalciumszinteket. A tesztoszteron szérumszintjének meghatározása az Állatorvostudományi Egyetem Szülészeti Tanszékének endokrinológiai laboratóriumában beállított, kutyára validált RIA analízissel történt (a legkisebb detektálható koncentráció 0,56 nmol/L volt, <10% intra-assay CV mellett, míg az inter-assay CV 13,8% volt 1,35 nmol/l és 9,5% 3,36 nmol/l koncentrációk esetében). A spermamintákat egy hetes szoktatási periódust követően, ivarzó szuka jelenléte nélkül, manuális stimuláció útján, frakcionált spermavétel során gyűjtöttük. Meghatároztuk az ejakulátum spermiumban gazdag 2. frakciójának mennyiségét, Bürker kamra segítségével vizsgáltuk a spermiumok koncentrációját, a spermiumok számát a teljes ejakulátumban, és fénymikroszkópos vizsgálattal elbíráltuk a minták progresszív motilitását. A spermiumok morfológiai vizsgálatát Spermac® (FertiPro N.V., Belgium) festést követően végeztük, kenetenként 200 spermium elbírálásával. A spermiumok DNS töredezettségének meghatározására az ejakulátum spermiumban gazdag frakciójából 200-500 µl-t közvetlenül a mintavételt követően folyékony nitrogénben fagyasztottunk és az SCSA™ analízisig abban tároltunk. Az SCSA™ vizsgálathoz a spermaminta előkészítése, valamint maga a vizsgálat egy már korábban leírt módszer szerint zajlott (Wach-Gygax et al., 2017) EXPO32 ADC XL 4 Color™ szoftver-rel felszerelt Coulter EPICS XL áramlási citométer használatával (Beckman Coulter Inc., Krefeld, Németország). Az adott spermaminta DNS töredezettségi szintjét a felolvasztás után azonnal mért, és a felolvasztás után 38 °C-on 3 órás inkubációt követően meghatározott DNS fragmentációs index-szel (DFI%) jellemeztük. A deslorelin-implantátummal kezelt kutyák szérumszorosztéronkoncentrációjának változását a 0. és 3.

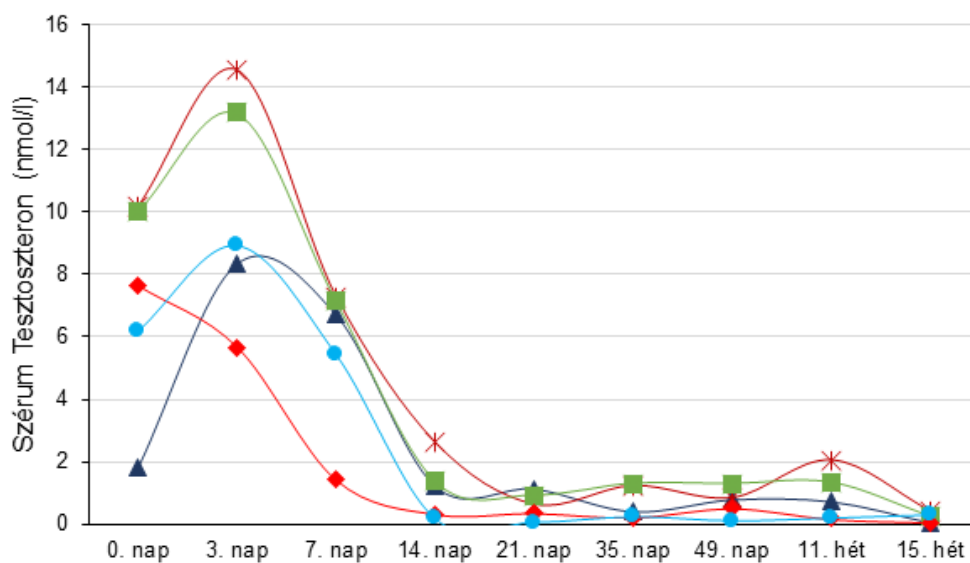
nap között (lehetséges „flare-up” hatás), a 0. és 14. vagy 21. nap között (az aspermia első napja, ami 4 kutyában a 14., az utolsóban pedig a 21. napra esett), valamint a 0. és 105. nap között páros t próbával hasonlítottuk össze.

A spermaminőség mutatóit (ejakulátum mennyisége, spermiumkoncentráció, összes spermiumszám az ejakulátumban, progresszív motilitás, normál morfológia, DFI%), valamint az állatok testsúlyának változását az idő függvényében általános lineáris modell (ismételt mérésekre) analízissel vizsgáltuk. A spermaminőség paramétereit a 0. és 10. nap között (0., 3., 7., 10. napon, a progresszív motilitás esetében a 0., 3., 7. napon), míg a testsúly változását a 0. naptól a vizsgálat végéig (112. nap) elemeztük. Az adatok statisztikai értékelését SPSS 22.0 szoftverrel (SPSS Inc., Chicago, USA) végeztük. Szignifikáns eltérést $P < 0.05$ érték esetében állapítottunk meg. A teljes down reguláció időszakában, rutin sebészeti beavatkozás (fedett kasztráció) során eltávolított, valamint további 6 egészséges, nem elhízott, hasonló körülmények között tartott beagle fajtájú kutya, rutin kasztrációjából származó (kontroll) here és mellékhere szöveteket további szövettani és génexpressziós vizsgálatoknak vetettük alá. A szövettani minták kezelését, a génexpressziók meghatározását az előző vizsgálat esetében ismertetett módokon végeztük (4.3.). A szövettani metszeteket hematoxillin-eozin festés után vizsgáltuk. A vizsgálat során feldolgoztuk az előző vizsgálatban gyűjtött prepubertális korú egyedek mellékhere mintáit is és azokból is meghatároztuk a Lep és LepR génexpressziók alakulását.

A hereminták esetében az adatok normál eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel igazoltuk. Az ivarérett és deslorelinnel kezelt csoportban meghatározott relatív génexpressziók (RGE) értékeit, átlag \pm szórás formájában tüntettük fel, majd Student féle kétoldali, független mintás t-próbával hasonlítottuk össze. Az ivarérett, prepubertális, valamint deslorelinnel kezelt állatokból származó mellékherék különböző régióiban meghatározott relatív génexpressziók esetében az adatok nem mutattak normál eloszlást, így ezekkel logaritmikus transzformációt követően dolgoztunk. Utóbbiak esetében az eredményt geometriai átlag \pm deviációs faktor (DF) formájában tüntettük fel a grafikonokon. Az elemzéshez kevert modellt alkalmaztunk. Lep expressziót csak az ivarérett állatok mintáiból tudtunk kimutatni, ezért páronkénti összehasonlítást, LSD (Least Significant Difference = legkisebb szignifikáns különbség) tesztet végeztünk. A LepR expressziókat szintén kevert modellben elemeztük, majd ANOVA-t követően Tukey-féle post hoc teszt segítségével értékeltük. Szignifikancia szintként a $P \leq 0,05$ értéket jelöltük meg. A statisztikai elemzést SPSS szoftver segítségével végeztük (IBM® SPSS® Statistics for Windows, Version 22.0 (Armonk, NY, USA)).

5.4.2. Eredmények

A fizikális vizsgálat, valamint a vérvizsgálat alapján az állatok egészségesnek bizonyultak a kísérletbe vonástól a vizsgálat végéig. A vérkép, valamint a vér egyes biokémiai paraméterei minden egyednél a normál tartományban voltak a vizsgálat teljes időtartama alatt. Az implantátum beültetése után egy állatnál sem figyeltünk meg lokális reakciót. A szérumszintézis szintje nem mutatott szignifikáns változást a 0. ($7,16 \pm 3,43$ nmol/l) és 3. nap ($10,14 \pm 3,65$ nmol/l) között ($P=0,208$). Az aspermia első napján ($1,05 \pm 0,97$ nmol/l), valamint a 105. napon ($0,21 \pm 0,15$ nmol/l) viszont szignifikánsan alacsonyabb volt ($P=0,020$ és $P<0,001$), mint az implantátum beültetését közvetlenül megelőzően (0. nap) (26. ábra).

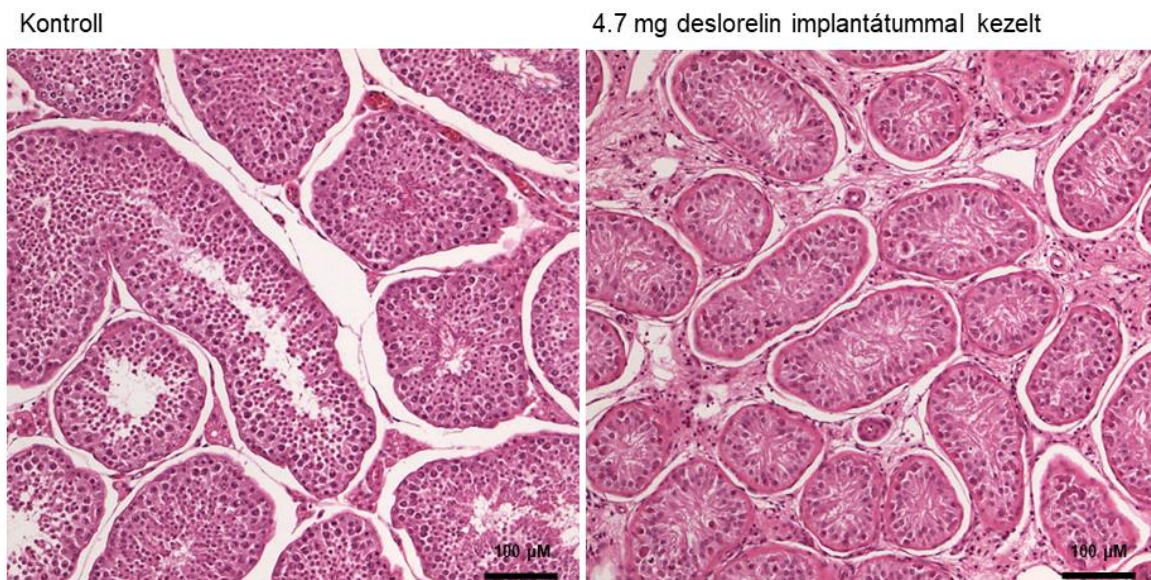


26. ábra A szérumszintézis szintje alakulása a deslorelin tartalmú implantátummal kezelt egyedekben, az implantátum beültetésétől (0. nap) a 15. hétig. Az egyes egyedekben mért hormonszinteket különböző színű és alakú szimbólumokkal jelöltük.

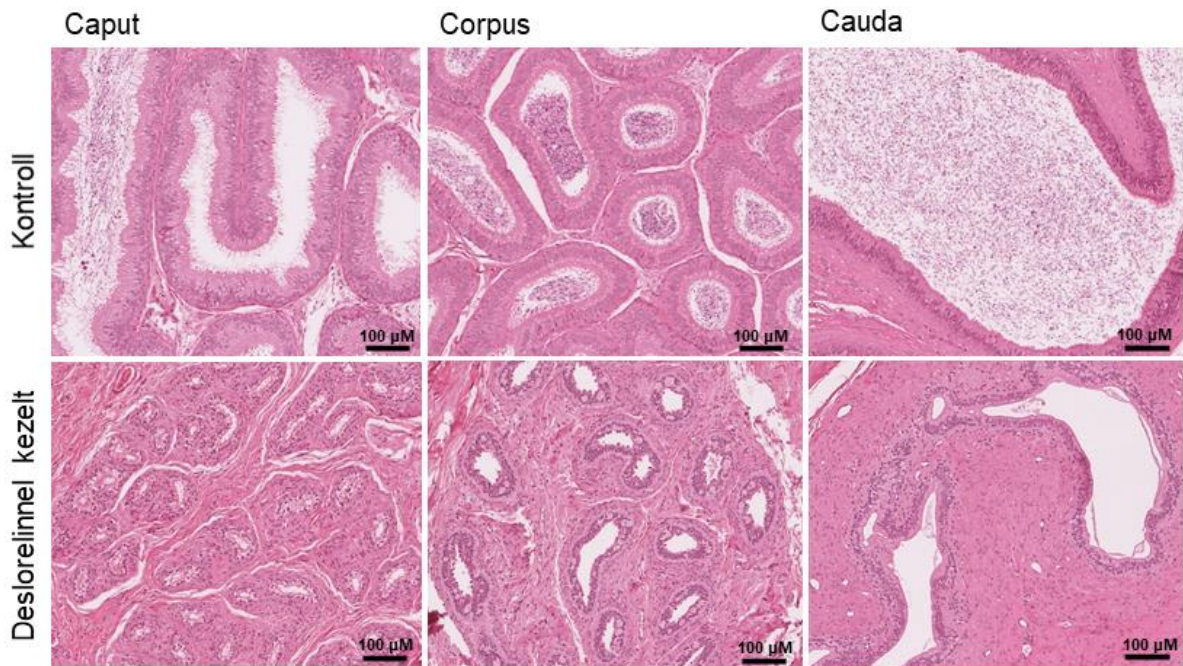
Az állatok testsúlya nem változott szignifikánsan ($P=0,204$) a vizsgálat ideje alatt. Az ötből négy állat esetében kis mértékű ($\pm 3\%$) testsúlyváltozást láttunk a vizsgálat végén a 0. napon végzett testsúlyméréshez képest, míg egy állatnál 14%-os testsúlycsökkenést mértünk. Az implantátum beültetését követően négy állat esetében a 10. napig, egy állatnál pedig a 17. napig volt lehetséges a spermavétel. A 21. napon már egyik kutya sem adott spermát. A 0., 3., 7. és 10. napi spermamintákban nem volt szignifikáns különbség az ejakulátum térfogatát ($P=0,590$), a spermiumok koncentrációját ($P=0,898$), az ejakulátumban lévő összes spermium számát ($P=0,991$), a progresszív motilitást ($P=0,779$) és a normál spermiumalakok %-os arányát (0.-7. nap között; $P=0,213$) illetően. Az abnormális spermiumalakok aránya 10% alatti volt minden állatban, kivéve egy kutyát, ahol a 10. napi utolsó spermamintában a proximális plazmacseppet hordozó alakok aránya 88% volt. Az SCSATM vizsgálat alapján a

DFI% nem változott szignifikánsan (n=4; 0. óra, P=0,112; 3. óra, P=0,226). A DFI% 1,33-4,50% között változott a felolvasztás után azonnal mért, és 1,49-6,66% közé esett a 3 órával később elemzett mintákban. Az deslorelin implantátum behelyezését követő 16. héten eltávolított herék szövettani vizsgálata minden állatban igazolta a spermatogenezis leállítását (**27. ábra**). A mellékhere minták esetében szintén sorvadást figyeltünk meg, emellett spermatozoák csak elvétve jelentek meg a csatornákból (**28. ábra**).

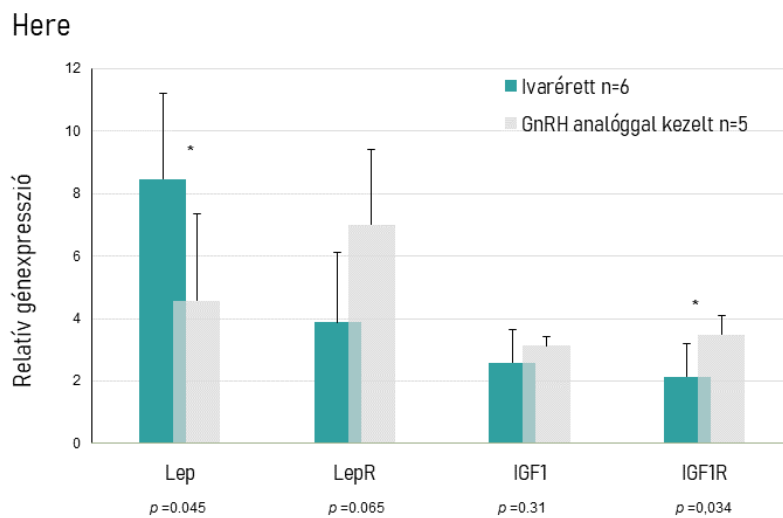
A deslorelin kezelésen átesett állatok heremintáiban szignifikánsan csökkent a Lep génexpresszió (P=0,045), ezzel szemben a LepR mRNS mennyisége tendenciózus növekedést mutatott (P=0,065). Az IGF1 expresszió nem változott a kezelt csoportban (P=0,31), az IGF1R expresszió viszont szignifikáns emelkedést mutatott (P=0,034) (**29. ábra**). Az ivarérett állatok mellékheréiben a Lep génexpresszió szignifikánsan magasabb volt a mellékhere testében, összehasonlítva a feji vagy farki területekről származó minták eredményeivel (P≤0,025).



27. ábra A 16. héten eltávolított herék esetében a szövettani vizsgálatokkal igazoltuk a GnRH analóg segítségével előidézett downregulációt. A kezelt csoportban a spermatogenezis leállítását jelezte a fejlődő sejtalakok hiánya. A kanyarulat csatornákból egy-egy spermatozoa mellett kizárólag A típusú spermatogóniumok jelentek meg, emellett a Leydig-sejtek sorvadása figyelhető meg. Hematoxillin-eozin festés, 100x nagyítás.

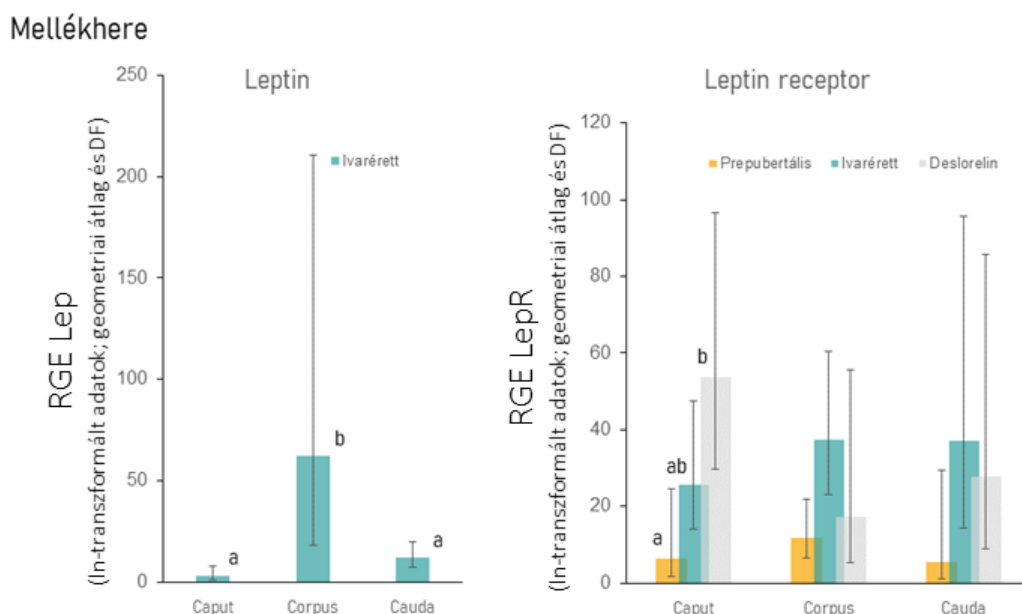


28. ábra A kezelést követő 16. hétben eltávolított mellékherék esetében, mindhárom régióban (caput, corpus, cauda) jelentős fokú epitheliális atrófia (az epithel réteg magassága csökkent, az epitheliális ciliák eltűntek) volt megfigyelhető, illetve spermatozoák elvértve, csak nagyon alacsony számban jelentek meg. Hematoxillin-eozin festés, 100x nagyítás.



29. ábra A leptin (Lep), leptin receptor (LepR), valamint az inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF1) és receptorának (IGF1R) relatív génexpressziója egészséges ivarérett, valamint deslorelinnel kezelt kutyákból származó here mintákban. Az oszlopdiagrammon átlagokat és szórás értékeket tüntettük fel. A csillaggal jelölt oszlopok esetén a csoportok között szignifikáns különbség mutatkozott ($P < 0,05$).

A legtöbb prepubertális, illetve deslorelinnel kezelt állatból származó mellékhereminta esetében ugyanakkor a Lep expresszió a méréshatár alatt volt, tehát drasztikusan csökkent deslorelin implantátum hatására a kezeletlen kontrollhoz képest. A LepR mRNS expresszió nem különbözött a mellékhere egyes régióiban egyik csoportban sem, ugyanakkor különbség mutatkozott a kezelési csoportok között (prepubertális, ivarérett, deslorelinnel kezelt; $P \leq 0,01$), ezen belül is a mellékhere feji régiójában, ahol a prepubertális és deslorelinnel kezelt csoport között szignifikáns különbség mutatkozott ($P=0,016$) (**30. ábra**).



30. ábra A leptin (Lep) és a leptin receptor (LepR) relatív génexpressziója egészséges ivarérett, valamint deslorelinnel kezelt kutyákból származó mellékhere mintákban.

Geometriai átlagokat és deviációs faktorokat tüntettük fel az oszlopdigrammon. Az eltérő feliratú oszlopok esetében a különbség szignifikancia szintje $P < 0,05$.

5.4.3. Megbeszélés

A hosszú hatású GnRH analógok alkalmazása kan kutyák esetében módot ad egy olyan reverzibilis infertilis állapot létrehozására, amely nem jár együtt a gonadotrop hormonok (LH, FSH) szintemelkedésével, sőt azok csökkenése figyelhető meg (De Gier 2011). Deslorelin tartalmú implantátum alkalmazása esetén a beültetést követően annak serkentő hatása érvényesül, így átmenetileg emelkedik a gonadotrop hormonok koncentrációja, és ennek következményeként a tesztoszteronszint („flare-up” hatás) (Junaidi et al., 2003; Junaidi et al., 2007, Romagnoli et al., 2012; Trigg et al., 2006, Trigg et al., 2001). Deslorelin 0,27-0,4 mg/kg koncentrációban való adagolása után a plazma tesztoszteron 60. percbeli csúcskoncentrációját követően még néhány napig magasabb hormonszinteket mértek

(Junaidi et al., 2007). Más kutatók szintén az alap tesztoszteronkoncentráció ($1,35\pm 0,21$ ng/ml) emelkedéséről ($2,26\pm 0,29$ ng/ml) számoltak be az implantáció utáni első 3 napon (Polisca et al., 2013). Ezt követően a tesztoszteronszint jelentősen csökken, és a beültetést követően a 6-25. nap között már 1 ng/ml alatti értéket mutat (Trigg et al., 2001). Polisca és mtsai szerint a 11. nap után már mérés határ alatti tesztoszteronkoncentrációk jellemzők (Polisca et al., 2013), míg Junaidi és Williamson mérései szerint ez a 30. naptól következik be (Junaidi et al., 2003; Junaidi et al., 2007). Romagnoli és mtsai (2012) ugyanakkor 6 különböző fajtájú, korú (1,5-8,5 éves) és testsúlyú (7,8-42,6 kg) kan kutya vizsgálatok a 4,7 mg deslorelin-t tartalmazó implantátum behelyezését követően 3 állat esetében még a 9-17. napos mintákban is emelkedett tesztoszteronszinteket mértek (Romagnoli et al., 2012). Saját vizsgálatunkban számszerűen magasabb, valószínűleg élettani szempontból releváns, ugyanakkor statisztikailag nem szignifikáns tesztoszteronszintbeli növekedést írtunk le három nappal a beültetést követően, majd a hormonszint szignifikáns csökkenését detektáltuk a 14-21. napon, az aspermia első megjelenésének megfelelő időpontban. Egyes szerzők megnövekedett ejakulátum mennyiséget, progresszív motilitást és összpermiumszámot írtak le 6-ból 4, illetve 3 kutyánál, amit az emelkedő tesztoszteronszinttel magyaráztak (Romagnoli et al., 2012). Ezzel ellentétben saját vizsgálatunkban nem láttunk szignifikáns különbséget a 0. (implantátum behelyezése) és 10. nap (utolsó ejakulátum 5-ből 4 kutya esetében) közötti spermamintákat illetően sem az ejakulátum mennyiségében, sem a spermiumok koncentrációjában, számában, progresszív motilitásában és morfológiájában. A korábbi közlemények szerint a deslorelin-t tartalmazó implantátum beültetését követően 23-85 nap kell a teljes sterilitás kialakulásához, illetve hisztopatológiai vizsgálatok alapján a kanok 90%-ában a 41. napra a kanyarulat csatornákat atrófiája látható (EMA 2010; Junaidi et al., 2009b; Polisca et al., 2013; Romagnoli et al., 2012; Trigg et al., 2006). Ezzel szemben az általunk kezelt állatoknál az aspermia már az implantátum behelyezése utáni 10. napon jelentkezett ötből négy kutyánál. A 13. és 17. napon már csak egy kutya ejakulált, a 21. napra pedig már egyik állat sem adott spermát. A saját vizsgálatunkban megfigyelt, a klinikai sterilitás kialakulásához szükséges egységesen rövidebb idő valószínűleg azzal magyarázható, hogy hasonló korú és testsúlyú, azonos fajtájú (Beagle) állatokkal dolgoztunk, és a deslorelin implantátum adagja is egy szűk tartományba ($0,34-0,45$ mg/ttkg) esett. Míg Trigg és mtsai a libidó jelentős (50%) csökkenését a 22. napon, teljes megszűnését pedig a 30-35. napon észlelték (Trigg et al., 2006), ezek az általunk kezelt állatokban hamarabb következtek be, ami részben azzal is magyarázható, hogy kutyáink nem voltak rendszeres spermavételhez szoktatva. Míg egyes szerzők csak a spermaminőség, ezen belül is a motilitás és a spermakonzentráció jelentős csökkenését írtak le (Junaidi et al., 2003), az általunk vett mintákban sem a spermaminőséget jellemző

paraméterek, sem az ejakulátum mennyisége nem változott a vizsgálat során. Trigg és munkatársai arról számoltak be, hogy hasonló dózisú deslorelin kezelés után csökkenő ejakulátum mennyiség mellett a 35. napra már 70%-ra, azaz tízszeresére nőtt az abnormális spermiumalakok aránya (Trigg et al., 2006). Morfológiai eltérésként a szekunder elváltozások, ezek közül is disztális citoplazmacseppek voltak jellemzőek, illetve kisebb arányban megjelentek a farokrendellenességek is (Junaidi et al., 2003). Más szerzők szerint a morfológiai eltérések gyakorisága nem változik a kezelés hatására (Romagnoli et al., 2012). Jelentős morfológiai eltéréseket mi sem tudunk kimutatni, és csak egy állatban láttuk a proximális plazmacseppek jelentős arányú (88%) megjelenését az utolsó, 10. napi mintában. A többi spermaminőséget jellemző paraméterhez hasonlóan a deslorelin implantátummal történő kezelés nem befolyásolta a spermiumok DNS fragmentációjának mértékét, vagyis még az aspermia kialakulása előtt közvetlenül vett spermamintákban sem lehetett jelentős DNS károsodást kimutatni. A spermaminőségre gyakorolt hatás mellett vizsgálatunk része volt a kémiai kasztráció által előidézett esetleges metabolikus változások megjelenésének nyomon követése, különös tekintettel az elhízásra való hajlamra. Más típusú GnRH analóggal (azagly-nafarelin, Gonazon, Intervet) végzett kezelés során, hasonlóan a sebészi kasztrációhoz, fokozott étvágy jelentkezett az állatoknál, amint a tesztoszteronkoncentrációk 0 ng/ml közeli tartományba estek (Goericke-Pesch et al., 2010). Az általunk vizsgált állatok testsúlya nem változott jelentős mértékben a vizsgálat ideje alatt, valamint a biokémiai, beleértve a glükóz- és TG-szinteket, és hematológiai paraméterek is a referenciatartományon belül maradtak. Ötből négy állat esetében $\pm 3\%$, míg egy állat esetében -14% -os testsúlyváltozást rögzítettünk. A több hónapja összeszokott állatok esetében az egy egyed nagyobb mértékű fogyásának hátterében állhatott a többi, dominánsabb egyed éhségérzetének fokozódása, ami a csoportos tartás és behatárolt mértékű táplálékadagolás mellett nem jelentkezhett az említett 3% -os testsúlynövekedésnél nagyobb mértékben.

Összességében elmondható, hogy az általunk vizsgált egészséges, hasonló korú és testsúlyú, azonos fajtájú kan kutyák esetében a 4,7 mg-os deslorelin implantátum spermaminőségre kifejtett feltételezett „flare-up” hatását nem tudtuk igazolni. A klinikai sterilitás, vagyis az ejakuláció elmaradása, az irodalomban közölt adatokhoz képest rövidebb időn belül, négy állatnál az implantátum beültetését követő 10. nap, egy állatnál pedig a 17. nap után következett be. Az aspermia bekövetkeztéig a várt folyamatos spermaminőségromlás helyett sem a hímivarsejtek DNS fragmentációs indexe, sem az ejakulátum mennyisége, a spermiumok koncentrációja, az összes spermiumszám, a spermiumok progresszív motilitása és morfológiája sem változott jelentősen, vagyis ezen időszakban az állatok még termékenynek tekinthetők. Változatlan táplálékadagolás mellett a 4,7 mg-os

deslorelin implantátum nem befolyásolja az állatok testsúlyát, valamint a szérum egyes biokémiai paramétereinek, köztük a vércukorszintet és a trigliceridkoncentrációt.

Eredményeink alapján ugyanakkor a deslorelin kezelés befolyásolhatja a here- és a mellékherefunkció parakrin/autokrin úton is megvalósuló szabályozását. A herében, illetve a mellékhere egyes régióiban a LepR gén expressziója nem változott szignifikánsan a kezelés következtében, ami arra utal, hogy ezen receptorok kifejeződése nem tesztoszteron-függő folyamat, illetve nem befolyásolja azt a csírasejtek, a spermium előalakok vagy a spermiumok jelenléte. A Lep gén expressziója ezzel szemben szignifikáns csökkenést mutatott a kezelt herékben, illetve mérési határ alá csökkent, tehát eltűnt a mellékhere egyes régióiból származó mintákban. A deslorelinnel kezelt állatokban detektált, a herében és a mellékherében jellemző csökkent Lep génexpresszió összefüggésben lehet a csökkent gonadotropinszintekkel, a csökkent tesztoszteronprodukciónal, vagy a csírasejtek hiányával. A kontrollként vizsgált állatok mintáiban eltérő Lep génexpressziós értékek jellemezték a mellékhere egyes területeit, ami a leptinnek különösen a mellékhere testében jellemző szerepére utalhat és a spermiumok érésével lehet kapcsolatban. A GnRH analóggal kezelt állatokban a herében mérhető IGF1R génexpresszió hasonló irányban változott, mint a prepubertális állatokban, így szintje fordított arányban áll a herében folyó csírasejtképzés ütemével és a tesztoszterontermelés mértékével. A vizsgálatunk során ugyanakkor nem került megállapításra, hogy a génexpressziók változása melyik sejtekhez, vagy sejtalakokhoz köthető, a celluláris lokalizáció meghatározása immunhisztokémiai módszerrel folyamatban van. A **11. táblázatban** az ivarérett állatokhoz viszonyítva mutatjuk be a vizsgált génexpressziók változását a prepubertális, valamint deslorelinnel kezelt hereszövetben.

11. táblázat A génexpressziók változása prepubertális, valamint deslorelinnel kezelt állatok here és mellékhere hereszövetében. (-) nem volt szignifikáns változás, egy nyíllal jelöltük a szignifikáns változásokat, két nyíllal pedig azokat az eseteket, ahol a $P < 0,001$ volt. A mellékhereminták esetében a Lep expresszió a prepubertális és a deslorelinnel kezelt egyedekben kimutatási határ alá esett.

HERE	Prepubertális		Deslorelinnel kezelt
Lep	-	Ivarérett	↓
LepR	-		-
IGF1	↑↑		-
IGF1R	↑↑		↑

MELLÉKHERE	Prepubertális		Deslorelinnel kezelt
Lep	↓↓	Ivarérett	↓↓
LepR	-		-

A kanokban folytatott vizsgálataink alapján összegzésként megállapítottuk, hogy a prepubertális korú állatokban megjelenő Lep expresszió nem változik szignifikáns fokban az ivaréssel (enyhe tendenciózus csökkenése figyelhető meg), a celluláris lokalizáció ugyanakkor változik a pubertáshoz köthetően. A fejlődő herében a Sertoli- és Leydig sejtekhez köthető az expresszió, míg a gonociták nem mutattak Lep protein expressziót. Ezzel szemben az ivarérett herében a Lep expresszió a spermium előalakokra tolódik át, a Leydig sejtek viszont kevésbé festődnek. Bár különbségként kell kiemelnünk, hogy az ivarérett állatok mintáiban az elongált spermaticidák nem mutattak Lep fehérje expressziót, eredményeink egybevágóak azokkal a korábbi, rágcsálókban, emberben és sertésben leírt vizsgálati eredményekkel, amik szerint a Lep fehérje expresszió megjelenik az érett hereszövet kanyarulat csatornáiban helyeződő spermium előalakokon, ugyanakkor hiányzik a prepubertális herékben megjelenő éretlen gonociták esetében (Rago et al., 2009). Mindez kutya esetében is valószínűsíti a leptinnek a spermiumok érési folyamatában játszott szerepét. A deslorelinnel kezelt ivarérett állatokban a Lep expresszió kifejezett csökkenését detektáltuk. A fehérjeszintű lokalizáció vizsgálata nélkül csak valószínűsítjük, hogy az expresszió csökkenése elsődlegesen a kiürülő kanyarulat csatornácskákkal, illetve a spermium előalakok hiányával magyarázható, így csak közvetett összefüggést mutat a gonadotropin-szintek, illetve a tesztoszteronkoncentráció alakulásával.

A mellékhere vizsgálata során ivarérett állatokban legerősebb fokban a mellékhere testében (corpus) mutatkozott Lep génexpresszió, ugyanakkor prepubertális, illetve deslorelinnel kezelt állatok esetében a mellékhere egyik régiójában sem tudtunk Lep génexpressziót kimutatni. Az elongált alakok negativitása miatt nem valószínű, hogy önmagában a spermiumok, vagy azok hiánya lenne felelős a szervet jellemző Lep expresszió kialakításáért, ugyanakkor nem zárható ki, hogy a spermiumok jelenléte stimulálja a Lep expressziót a mellékherében, ezzel közvetlen vagy közvetett hatást gyakorolva a spermiumok érésére. A celluláris lokalizáció vizsgálatának hiányában a korábban sertésben végzett vizsgálat hasonló eredményei alapján feltételezzük, hogy az ivarérett állatok esetében az epitheliális sejtek felelősek a Lep expresszióért (Rago et al., 2009). Prepubertális korú sertésekben ezek a sejtek nem expresszálták a leptint. Ezzel egyhangzóan az általunk vizsgált prepubertális, illetve deslorelinnel kezelt állatokban nem volt kimutatható a Lep gén expressziója. Mindez felveti a leptin akár tesztoszteronfüggő, vagy a spermiumok jelenléte által regulált szerepét a mellékherecsatornácskák hámjának működésében. Ivarérett állatokban a mellékhere régióinak eltérő Lep expressziója a csatornácskák hámjának eltérő szerepét veti fel a caput a corpus és a cauda területén.

Eredményeink alapján a Lep fehérjeszintű expressziója prepubertális állatokban a Sertoli- és Leydig sejtekben mutatkozott, míg ivarérett állatokban a spermium előalakok festődtek erősen, a Leydig sejtek pedig csak gyengébb proteinexpressziót mutattak. A LepR

expresszió egyik szerv esetében sem mutatott eltérést, illetve a herében sem a prepubertális állapot, sem pedig a deslorelinnel előidézett alacsony gonadotropin és tesztoszteronszintekkel jellemezhető állapot nem befolyásolta a génexpresszióját. A LepR fehérjeszintű expressziója prepubertális állatokban a Leydig sejtekhez volt köthető, majd az ivaréretést követően a spermium előalakokat jellemezte, míg a Leydig és Sertoli-sejtek nem mutattak LepR festődést. Bár sem a Lep, sem a LepR génexpressziójában nem mutatkozott szignifikáns különbség az ivarérett és prepubertális here között, ez valószínűleg a kanyarulat csatornák és az interstícium különböző arányával, ezáltal az ott fellelhető Lep-t és LepR-t expresszáló sejtek arányával magyarázható. Bár erre a LepR proteinszintű vizsgálatának hiányában nincs bizonyítékunk a deslorelinnel kezelt állatok esetében, elképzelhető, hogy ott is hasonló módon magyarázható az ivarérett herét jellemző génexpressziók összehasonlításának eredménye, mint a prepubertális here esetében. Ebben a tekintetben eredményeink nem egyeztek meg a sertésekben kimutatott, az ivarérettel megjelenő LepR expresszióval (Rago et al., 2009). A Leydig sejtek Lep és LepR fehérje expressziója csak a prepubertális egyedek mintáiban volt jellemző, ami ellentmond a sertés esetében kimutatott eredményeknek, miszerint mindkét korcsoportban megjelenik mind a Lep, mind a LepR a Leydig sejteken. Ennek hátterében metodikai különbségek is állhatnak, vagy a leptin herében és a mellékherében játszott szerepe eltérő lehet az egyes állatfajok esetében. Kutyában a leptinnek inkább a Leydig sejtek proliferációjában és érésében játszott szerepét valószínűsítjük, míg ivarérett állatokban a leptin Leydig-sejtek funkciójában, így a szteroidhormon-produkcióban betöltött szabályozó szerepe kisebb mértékű lehet.

A herében vizsgált IGF1, valamint az IGF1R expresszióját illetően a prepubertális egyedekben mindkét molekula fehérjeszintű kifejeződését mutattuk ki a Leydig sejtekben, valamint a gonocitákban, majd az ivaréretést követően a spermatogóniumokban és a Leydig sejtekben. A Sertoli sejtek esetében a prepubertális korban mindkét fehérje gyengébb expresszióját detektáltuk, ami alapján az IGF1 a Sertoli és a Leydig sejtek fejlődésében és proliferációjában játszott szerepét feltételezzük. Az ivarérett csoportban jellemző génexpressziónál erősebb mRNS kifejeződés volt jellemző a prepubertális csoportban mind az IGF1, mind pedig receptora esetében, ugyanakkor a deslorelin kezelés, tehát a csírahám atrófiája, a tesztoszteron-, valamint a gonadotropinszintek csökkenése nem befolyásolta az IGF1 expressziót a herében. Ezzel szemben az IGF1R génexpressziója nem csak a prepubertális, de a deslorelinnel kezelt csoportban is intenzívebb volt. Ezek alapján az IGF1 kutyák esetében is stimulálhatja a gonociták és spermatogóniumok proliferációját és túlélését, bár ebben az irányban még nem történtek in vitro kísérletek. A Leydig sejtek erős IGF1 és IGF1R immunreaktivitása alapján az IGF1 antiapoptotikus, valamint a tesztoszteronszintézist segítő szignálként is működhet kutya esetében is, ahogy azt

korábban rágcsálókban és lovakban is leírták. Mindkét fehérje gonociták esetében jellemző megjelenése feltételezi az IGF1 rendszer csírasejtproliferációt és -differentiációt segítő hatását a prepubertális kutyaherék esetében. Egy korábbi vizsgálatban két hónapos kutyákból származó teljes herehomogenizátum-mintákban szignifikánsan magasabb StAR mRNS szinteket mértek, ennek ellenére sokkal kevesebb Leydig sejt expresszálta magát a StAR proteint, amit IHC módszerrel állapítottak meg (Goericke-Pesch et al., 2013). Ez az eredmény magyarázhatja a juvenilis stádiumban eltávolított herék esetében jellemző alacsonyabb plazma tesztoszteronszinteket (Mialot et al., 1988). Bár lovakban végzett vizsgálatok szerint az IGF1 nem stimulálta a tesztoszteronszintézist az éretlen Leydig sejt kultúrákon (Yoon and Roser, 2011), feltételezésünk szerint juvenilis kutyákban az IGF1 növelheti a StAR gén expresszióját, ugyanakkor az mRNS transzkripciót követő folyamatok nem feltétlenül fejeződnek be a Leydig sejtekben, így ez nem feltétlenül jelentkezik a tesztoszteron termelés emelkedésében.

Összességében, adataink alapján feltételezhető, hogy a Lep és IGF1 rendszerek a kor, illetve a fejlődési stádium függvényében változó szerepet játszanak a herék működésében kutya fajban is.

6. Új tudományos eredmények

1. Morfometriai és bioimpedancia mérések alkalmazhatósága, valamint ezek összefüggése a szérum leptinkoncentrációval kutyában: Szoros pozitív összefüggést írtunk le a szérum leptinkoncentráció és a morfometriai mérések (medence körméret és a térd-csánk távolság) alapján számolt testzsírszázalék érték között. Utóbbi szorosabb összefüggést mutat a szérum leptinkoncentrációval, mint a BCS pontszám. A bioimpedancia-méréssel kapott eredmények gyengébb összefüggést mutatnak a testsúllyal, a BCS kategóriával és nem mutatnak összefüggést a szérum leptinkoncentrációval.
2. A zsíreloszlás alakulása és annak metabolikus következményei kutyában: Az általunk a CT felvételek elemzésére kidolgozott módszer segítheti a kutyák elhízásának vizsgálatát, valamint az elhízás hatásainak, különösen a zsíreloszlás és az elhízáshoz köthető metabolikus betegségek összefüggéseinek részletesebb kutatását. Egyes egyedekben különbség mutatkozik a zsírszövet regionalitásának tekintetében. A vizsgált állatok nagy részében a zsírraktárak közel azonos területet foglaltak el az L2, L3 magasságban készített felvételeken, ugyanakkor egyes egyedekben a viscerális, míg másokban a szubkután depó dominanciája jellemző. A szérum leptinszint összefüggést mutat a zsírszövet lumbális magasságban (L2, L3) jellemző eloszlásával, különösen a viscerális zsírszövet mennyiségével. A viscerális zsírmennyiség és a leptinszint közötti összefüggést nem befolyásolja számottevő mértékben az éhomi inzulinszint vagy az inzulinérzékenység foka.

Pozitív korreláció jellemző a viszcerális és a szubkután zsírmennyiség aránya és a vérből mérhető inzulinszint, illetve a zsíreloszlást jellemző paraméterek és az inzulinrezisztencia foka (HOMA-IR index érték) között.

3. A zsírsejtek méretének jelentősége kutya fajban: Az újszerű natív preparátum készítése révén a zsírsejtméret-meghatározás jól működő és gyors módszeréhez jutottunk. A két fő depót alkotó zsírsejtek mérete a kondícióval és a leptinszint alakulásával párhuzamosan változik. Az egyes egyedek esetében nem mutatkozott különbség a depókat alkotó zsírsejtek átlagos méretében. A kondícióbesorolással szinkronban, tendenciózusan változó zsírsejtméret mellett egyes egyedekben a kondíciócsoportra jellemző átlagnál nagyobb vagy annál kisebb átlagos zsírsejtméret jellemző, ami hiperpláziás, illetve hipertrófiás típusú obezitás megjelenését jelentheti.
4. A leptin és a leptin receptor fehérje szintű megjelenésének vizsgálata kutya petefészekben immunhisztokémiai módszerrel: A leptin fehérje legerősebben a folliculusok granulosa sejtjeiben jelenik meg. Ennél kevésbé erős festődést mutatnak a theca interna sejtjei, ugyanakkor a theca externa sejtjeiben és magában a petesejtben már csak gyengébb festődés jellemző. A leptin receptor erős festődést mutat a folliculusok granulosa sejtjeiben, a theca interna sejtekben és magában a petesejtben.
5. A szérum leptinkoncentráció változása a szuka kutya ivari ciklusa során: Az ivari ciklusstádium és a szérum progeszteronszint nincs hatással a szérum leptinszintre sem a normál, sem pedig a magasabb BCS kondíciócsoportba sorolt kutyákban.
6. Az IGF1, valamint receptorának (IGF1R) expressziója a kutya petefészekben: A folliculáris fázisban eltávolított petefészek esetében mind az IGF1, mind pedig az IGF1R fehérjeszintű expressziója erős az antrális folliculusok kifejezett proliferációt és luteinizációt mutató granulosa és theca interna rétegében, ugyanakkor csak sporadikus, gyenge festődés jellemezi az atretizálódó folliculusok falának rétegeit. Az IGF1 és annak receptora a korai luteális fázisban, tehát a fejlődő, még erős gonadotropin függőséget nem mutató sárgatestben expresszálódik legerősebben, majd expressziója csökken a luteális fázis későbbi időszakában. Míg nem-vevhes állatokban az IGF1 mRNS expresszió a sárgatestfázis közepétől fokozatosan csökken, vevhes szukákban ez a csökkenés a prepartum luteolízis időszakára tolódik ki. Nem vevhes szukákban az IGF1R mRNS expressziója nem változik a sárgatestfázis során, ezzel szemben a vevhes egyedekben szignifikáns emelkedése jellemző a prepartum luteolízissel egyidőben. Míg a vevhes állatokban a sárgatest IGF1 expressziója a prepartum luteolízis hatására lecsökken, a leptinre, középidejűen előidézett luteolízis esetén a luteális IGF1, valamint IGF1R mRNS expresszió változatlan marad.
7. A leptin és az IGF1 szerepe a kanok szaporodásbiológiai működésében: A prepubertális (két hónapos) korú állatokban megjelenő leptin génextpresszió nem változik szignifikáns fokban

az ivaréréssel. A fejlődő herében a Sertoli- és Leydig sejtekhez köthető fehérje expresszió, a gonociták spermatocitákká, spermatidákká alakulását követően a spermiumelőalakokra tolódik át. A prepubertális herékben megjelenő éretlen gonociták, valamint az ivarérett állatok esetében jelenlévő elongált spermatidákká nem mutattak leptin fehérje expressziót, ugyanakkor ez megjelenik az érett hereszövet kanyarulatos csatornáiban helyeződő spermium előalakokon. A deslorelinnel kezelt ivarérett állatokban a leptin expresszió kifejezett csökkenése jellemző. Az ivarérett állatok mellékheréjében minden régióban, legerősebben a testi régióban jellemző a leptin expresszió, amit prepubertális, illetve deslorelinnel kezelt állatok esetében a mellékhere egyik régiójában sem jellemző. A leptin receptor fehérjeszintű expressziója prepubertális állatokban a Leydig sejtekhez köthető, majd az ivarérést követően leginkább a spermium előalakokat jellemzi, illetve megjelenik az elongált spermatidákon. A Leydig sejtek leptin és leptin receptor fehérje expressziója csak a prepubertális egyedek mintáiban jellemző. Az IGF1, valamint az IGF1R fehérjeszintű expressziója prepubertális egyedekben a Leydig sejtekben, valamint a gonocitákban, majd az ivarérést követően továbbra is a Leydig sejtekben, illetve a spermatogóniumokban jellemző. A Sertoli sejtek esetében a prepubertális korban mindkét fehérje gyengébb expressziója jellemző. Az ivaréréssel csökken a herét jellemző IGF1 génexpresszió, ugyanakkor a deslorelin kezelés hatására kialakuló csírahám atrófia, valamint a tesztoszteron-, valamint a gonadotropinszintek csökkenése nem befolyásolja azt. Ezzel szemben az IGF1R génexpressziója nem csak a prepubertális, de a deslorelinnel kezelt csoportban is intenzívebb.

7. Irodalomjegyzék

- Abate, N., Garg, A., Peshock, R. M., Stray-Gundersen, J., Grundy, S. M.: **Relationships of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men**, *J. Clin. Invest.*, 96. 88–98, 1995.
- Abel, M. H., Baker, P. J., Charlton, H. M., Monteiro, A., Verhoeven, G., De Gendt, K., Guillou, F., O'Shaughnessy, P. J.: **Spermatogenesis and sertoli cell activity in mice lacking sertoli cell receptors for follicle-stimulating hormone and androgen**, *Endocrinology*, 149(7). 3279–3285, 2008.
- Acosta, J. R., Douagi, I., Andersson, D. P., Bäckdahl, J., Rydén, M., Arner, P., Laurencikiene, J.: **Increased fat cell size: a major phenotype of subcutaneous white adipose tissue in non-obese individuals with type 2 diabetes**, *Diabetologia*, 59(3). 560–570, 2016.
- Adolphe, J. L., Silver, T. I., Childs, H., Drew, M. D., Weber, L. P.: **Short-term obesity results in detrimental metabolic and cardiovascular changes that may not be reversed with weight loss in an obese dog model**, *Br. J. Nutr.*, 112(4). 647–656, 2014.
- Agarwal, S. K., Vogel, K., Weitsman, S. R., & Magoffin, D. A.: **Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary**, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84(3). 1072–1076, 1999.
- Ahrens, K., Mumford, S. L., Schliep, K. C., Kissell, K. A., Perkins, N. J., Wactawski-Wende, J., Schisterman, E. F.: **Serum leptin levels and reproductive function during the menstrual cycle**, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 210(3). 248.e1–248.e9, 2014.
- Ajala, O. M., Ogunro, P. S., Elusanmi, G. F., Ogunyemi, O. E., & Bolarinde, A. A.: **Changes in serum leptin during phases of menstrual cycle of fertile women: relationship to age groups and fertility**, *Int. J. Endocrinol. Metab.*, 11(1), 27–33, 2013.
- Albrizio, M., Roscino, M. T., Trisolini, C., Binetti, F., Rizzo, A., & Sciorsci, R. L.: **The expression of leptin receptor in the ovary of the queen: leptin receptor expression in queen ovary**, *Research in veterinary science*, 95(2). 629–631, 2013.
- Almog, B., Gold, R., Tajima, K., Dantes, A., Salim, K., Rubinstein, M., Barkan, D., Homburg, R., Lessing, J. B., Nevo, N., Gertler, A., Amsterdam, A.: **Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats**, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 183(1-2). 179–191, 2001.
- Appleton, D. J., Rand, J. S., Sunvold, G. D.: **Insulin sensitivity decreases with obesity, and lean cats with low insulin sensitivity are at greatest risk of glucose intolerance with weight gain**, *J. Feline. Med. Surg.*, 3(4). 211–228, 2001.
- Aquila, S., Gentile, M., Middea, E., Catalano, S., Morelli, C., Pezzi, V., Andò, S.: **Leptin secretion by human ejaculated spermatozoa**, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90(8). 4753–4761, 2005.
- Aquila, S., Rago, V., Guido, C., Casaburi, I., Zupo, S., Carpino, A.: **Leptin and leptin receptor in pig spermatozoa: evidence of their involvement in sperm capacitation and survival**, *Reproduction*, 136(1). 23–32, 2008.
- Archanco, M., Muruzábal, F. J., Llopiz, D., Garayoa, M., Gómez-Ambrosi, J., Frühbeck, G., & Burrell, M. A.: **Leptin expression in the rat ovary depends on estrous cycle**, *J. Histochem. Cytochem.*, 51(10). 1269–1277, 2003.
- Arner, E., Westermark, P. O., Spalding, K. L., Britton, T., Rydén, M., Frisén, J., Bernard, S., Arner, P.: **Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology**, *Diabetes*, 59(1). 105–109, 2010.
- 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**, *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, 134(2). 329–335, 2003.
- Bach, J. F., Rozanski, E. A., Bedenice, D., Chan, D. L., Freeman, L. M., Lofgren, J. L., Oura, T. J., Hoffman, A. M.: **Association of expiratory airway dysfunction with marked obesity in healthy adult dogs**, *Am. J. Vet. Res.*, 68(6). 670–675, 2007.

- Baker, J., Hardy, M. P., Zhou, J., Bondy, C., Lupu, F., Bellvé, A. R., Efstratiadis, A.: **Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction**, *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), 10(7). 903–918, 1996.
- Baker, J., Liu, J. P., Robertson, E. J., Efstratiadis, A.: **Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth**, *Cell*, 75(1). 73–82, 1993.
- Baker, P. J., O'Shaughnessy, P. J.: **Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice**, *Reproduction*, 122(2). 227–234, 2001.
- 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. Domest. Anim.*, 47(Suppl 6). 40–42, 2012.
- Balogh, O., Müller, L., Boos, A., Kowalewski, M. P., & Reichler, I. M.: **Expression of insulin-like growth factor 1 and its receptor in preovulatory follicles and in the corpus luteum in the bitch**, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 269. 68–74, 2018.
- Balogh, O., Staub, L. P., Gram, A., Boos, A., Kowalewski, M. P., Reichler, I. M.: **Leptin in the canine uterus and placenta: possible implications in pregnancy**, *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 13. 13, 2015.
- Ban, T., Okawa, M., Umeda, T., Otsuji, K.: Patent application publication. **Pet body fat measuring tool**. 2012. Patent No.: US 8,195,283 B2 – szabadalom <https://patents.google.com/patent/US8195283>
- Banks, W. A., DiPalma, C. R., Farrell, C. L.: **Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity**, *Peptides*, 20(11). 1341–1345, 1999.
- Baumann, G., Shaw, M.A. Amburn, K.: **Circulating growth hormone binding proteins**, *J. Endocrinol. Invest.*, 17. 67–81, 1994.
- Ben-Shlomo, S., Einstein, F. H., Zvibel, I., Atias, D., Shlomai, A., Halpern, Z., Barzilai, N., Fishman, S.: **Perinephric and epididymal fat affect hepatic metabolism in rats**, *Obesity* (Silver Spring, Md.), 20(1). 151–156, 2012.
- Bergman, R. N., Kim, S. P., Catalano, K. J., Hsu, I. R., Chiu, J. D., Kabir, M., Hucking, K., Ader, M.: **Why visceral fat is bad: mechanisms of the metabolic syndrome**, *Obesity*, 14. 16–19, 2006.
- Bergman, R. N., Van Citters, G. W., Mittelman, S. D., Dea, M. K., Hamilton-Wessler, M., Kim, S. P., Ellmerer, M.: **Central role of the adipocyte in the metabolic syndrome**, *J. Investig. Med.*, 49. 119–126, 2001.
- Berisha, B., Meyer, H.H., Schams, D.: **Effect of prostaglandin F2 alpha on local luteotropic and angiogenic factors during induced functional luteolysis in the bovine corpus luteum**, *Biol. Reprod.*, 82. 940-947, 2010.
- Bhat, G. K., Sea, T. L., Olatinwo, M. O., Simorangkir, D., Ford, G. D., Ford, B. D., Mann, D. R.: **Influence of a leptin deficiency on testicular morphology, germ cell apoptosis, and expression levels of apoptosis-related genes in the mouse**, *J Androl.*, 27(2). 302–310, 2006.
- Bjørbaek, C., Elmquist, J. K., Michl, P., Ahima, R. S., van Bueren, A., McCall, A. L., & Flier, J. S.: **Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels**, *Endocrinology*, 139(8). 3485–3491, 1998.
- Bjørbaek, C., Uotani, S., da Silva, B., Flier, J. S.: **Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor**, *J. Biol. Chem.*, 272. 32686–32695, 1997.
- Björntorp, P.: **"Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes**, *Arteriosclerosis*, 10(4). 493–496, 1990.
- Boden, G., Chen, X., Mozzoli, M., Ryan, I.: **Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects**, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81(9), 3419–3423. 1996.
- Bouchard, G. F., Solorzano, N., Concannon, P. W., Youngquist, R. S., Bierschwal, C. J.: **Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesterone**, *Theriogenology*, 35(3). 603–611, 1991.
- Brannian, J. D., Zhao, Y., McElroy, M.: **Leptin inhibits gonadotrophin-stimulated granulosa cell progesterone production by antagonizing insulin action**, *Hum. Reprod.*, 14(6). 1445–1448, 1999.

- Brännström, M., Norman, R. J.: **Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function**, *Hum. Reprod.*, 8(10). 1762–1775, 1993.
- Burkholder, W. J., Thatcher, C. D.: **Validation of predictive equations for use of deuterium oxide dilution to determine body composition of dogs**, *Am. J. Vet. Res.*, 59(8). 927–937, 1998.
- Burkholder, W. J., Toll, P. W.: **Obesity**, In: Hand, Thatcher, Remillard, Roudebush (Eds.), *Small Animal Clinical Nutrition*, 4th ed. Mark Morris Institute, Topeka, pp. 401–430, 2000.
- Campbell, B. K., Gutierrez, C., Armstrong, D., Webb, R., Baird, D.: **Leptin: In vitro and in vivo evidence for direct effects on the ovary in monovulatory ruminants**, *Hum. Reprod.*, 14. 15-16, 1999.
- Caprio, M., Fabbri, E., Ricci, G., Basciani, S., Gnessi, L., Arizzi, M., Carta, A. R., De Martino, M. U., Isidori, A. M., Frajese, G. V., Fabbri, A.: **Ontogenesis of leptin receptor in rat Leydig cells**, *Biol. Reprod.*, 68(4). 1199–1207, 2003.
- Cardinali, L., Troisi, A., Verstegen, J. P., Menchetti, L., Elad Ngonput, A., Boiti, C., Canello, S., Zelli, R., Polisca, A.: **Serum concentration dynamic of energy homeostasis hormones, leptin, insulin, thyroid hormones, and cortisol throughout canine pregnancy and lactation**, *Theriogenology*, 97. 154–158, 2017.
- Case, L. P., Daristotle, L., Hayek, M.G., Raasch, M. F.: **Chapter 28 Development and Treatment of Obesity**, In: Case, Daristotle, Hayek, Raasch (Eds), *Canine and Feline Nutrition (Third Edition)*, Mosby, pp. 313-342, 2011.
- Catalano, K. J., Stefanovski, D., Bergman, R.: **Critical role of the mesenteric depot versus other intra-abdominal adipose depots in the development of insulin resistance in young rats**, *Diabetes*, 59. 1416-1423, 2010.
- Chen, H. C., Farese, R. V., Jr.: **Determination of adipocyte size by computer image analysis**, *J. Lipid. Res.*, 43(6). 986–989, 2002.
- Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L. A., Woolf, E. A., Weng, X., Ellis, S. J., Lakey, N. D., Culpepper, J., Moore, K. J., Breitbart, R. E., Duyk, G. M., Tepper, R. I., Morgenstern, J. P.: **Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice**, *Cell*, 84. 491-495, 1996.
- Chen, X. X., Yang, T.: **Roles of leptin in bone metabolism and bone diseases**, *J. Bone Miner. Metab.*, 33(5). 474–485, 2015.
- Chou, S. H., Chamberland, J. P., Liu, X., Matarese, G., Gao, C., Stefanakis, R., Brinkoetter, M. T., Gong, H., Arampatzi, K., Mantzoros, C. S.: **Leptin is an effective treatment for hypothalamic amenorrhea**, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108(16). 6585–6590, 2011.
- Cioffi, J. A., Van Blerkom, J., Antczak, M., Shafer, A., Wittmer, S., Snodgrass, H. R.: **The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles**, *Mol. Hum. Reprod.*, 3(6), 467–472, 1997.
- Clarkson, P. M., Kroll, W., Wai, J., Kamen, G.: **A comparison of four methods to measure fat cell size**, *Am. J. Clin. Nutr.*, 34(10). 2287–2290, 1981.
- Clemmons D. R.: **Metabolic actions of insulin-like growth factor-I in normal physiology and diabetes**, *Metab. Clin. North. Am.*, 41(2). 425–443, 2012.
- Cnop, M., Landchild, M. J., Vidal, J., Havel, P. J., Knowles, N. G., Carr, D. R., Wang, F., Hull, R. L., Boyko, E. J., Retzlaff, B. M., Walden, C. E., Knopp, R. H., Kahn, S. E.: **The concurrent accumulation of intra-abdominal and subcutaneous fat explains the association between insulin resistance and plasma leptin concentrations : distinct metabolic effects of two fat compartments**, *Diabetes*, 51(4). 1005-1015, 2002.
- Coleman, D. L.: **Obese and diabetes: Two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice**, *Diabetologia*, 1978. 14, 141-148.
- Coll, A. P., Farooqi, I. S., O'Rahilly, S.: **The hormonal control of food intake**, *Cell*, 129(2). 251–262, 2007.

- Colón, E., Zaman, F., Axelson, M., Larsson, O., Carlsson-Skwirut, C., Svechnikov, K. V., Söder, O.: **Insulin-like growth factor-I is an important antiapoptotic factor for rat leydig cells during postnatal development.** *Endocrinology*, 148(1). 128–139, 2007.
- Concannon P. W.: **Reproductive cycles of the domestic bitch**, *Anim. Reprod. Sci.*, 124(3-4). 200–210, 2011.
- Concannon, P. W., Hansel, W., Visek, W. J.: **The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone**, *Biol. Reprod.*, (13). 112-121, 1975.
- Concannon, P., Hansel, W., Mcentee, K.: **Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch**, *Biol. Reprod.*, 17(4). 604–613, 1977.
- Concannon, P.: **Effects of hypophysectomy and of LH administration on luteal phase plasma progesterone levels in the beagle bitch**, *J. Reprod. Fertil.*, 58. 407-410, 1980.
- Couillard, C., Mauriège, P., Imbeault, P., Prud'homme, D., Nadeau, A., Tremblay, A., Bouchard, C., Després, J. P.: **Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia**, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 24(6). 782–788, 2000.
- Crown, A., Clifton, D. K., Steiner, R. A.: **Neuropeptide signaling in the integration of metabolism and reproduction**, *Neuroendocrinology*, 86(3). 175–182, 2007.
- De Ambrogi, M., Spinaci, M., Galeati, G., Tamanini, C.: **Leptin receptor in boar spermatozoa**, *Int. J. Androl.*, 30(5). 458–461, 2007.
- 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**, *Eur. J. Endocrinol.*, 145(5). 659–665, 2001.
- De Gier, J.: *Reproductive endocrinology of the dog: effects of medical and surgical intervention (2011) Utrecht University Repository (Dissertation) ISBN: 978-90-393-5687-6 pp.91-110. (De Gier, J. – Okkens, A.C. et al.,: The pituitary-testicular axis in dogs before and after surgical castration or chemical castration with the GnRH agonist deslorelin)*
- DeFronzo R. A.: **Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes**, *Int. J. Clin. Pract.*, 58. 9-21, 2004.
- Despres, J. P., Fong, B. S., Julien, P., Jimenez, J., Angel, A.: **Regional variation in HDL metabolism in human fat cells: effect of cell size**, *Am. J. Physiol.*, 252. 654–659, 1987.
- Devoto, L., Christenson, L.K., McAllister, J.M., Makriganakis, A., Strauss, J.F.: **Insulin and insulin-like growth factor-I and -II modulate human granulosa-lutein cell steroidogenesis: enhancement of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) expression**, *Mol. Hum. Reprod.*, 5. 1003-1010, 1999.
- DiGirolamo, M., Fine, J. B., Tagra, K., & Rossmanith, R.: **Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum**, *Am. J. Physiol.*, 274(5). 1460–1467, 1998.
- Duggal, P. S., Ryan, N. K., Van der Hoek, K. H., Ritter, L. J., Armstrong, D. T., Magoffin, D. A., Norman, R. J.: **Effects of leptin administration and feed restriction on thecal leucocytes in the preovulatory rat ovary and the effects of leptin on meiotic maturation, granulosa cell proliferation, steroid hormone and PGE2 release in cultured rat ovarian follicles**, *Reproduction*, 123(6). 891–898, 2002.
- Duggal, P. S., Van Der Hoek, K. H., Milner, C. R., Ryan, N. K., Armstrong, D. T., Magoffin, D. A., Norman, R. J.: **The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat**, *Endocrinology*, 141(6). 1971–1976, 2000.
- Dupont, J., LeRoith, D.: **Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction**, *Horm. Res.*, 55(2). 22–26, 2001.
- Edney, A. T. B., Smith, P. M.: **Study of obesity in dogs visiting veterinary practices in the United Kingdom**, *Vet. Rec.* 118. 391-396, 1986.
- El-Hefnawy, T., Ioffe, S., Dym, M.: **Expression of the leptin receptor during germ cell development in the mouse testis**, *Endocrinology*, 141(7). 2624-2630, 2000.

EMA, 2010: SCIENTIFIC DISCUSSION; Suprelorin 4.7 mg implant for dogs http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR-Scientific_Discussion/veterinary/000109/WC500068832.pdf

Engfeldt, P., Arner, P.: **Lipolysis in human adipocytes, effects of cell size, age and of regional differences**, *Horm. Metab. Res. Suppl.*, 19. 26–29, 1988.

Fang, L., Guo, F., Zhou, L., Stahl, R., Grams, J.: **The cell size and distribution of adipocytes from subcutaneous and visceral fat is associated with type 2 diabetes mellitus in humans**, *Adipocyte*, 4(4). 273–279, 2015.

Fenichel, R. M., Dominguez, J. E., Mayer, L., Walsh, B. T., Boozer, C., Warren, M. P.: **Leptin levels and luteinizing hormone pulsatility in normal cycling women and their relationship to daily changes in metabolic rate**, *Fertil. Steril.*, 90(4). 1161–1168, 2008.

Finn, P. D., Cunningham, M. J., Pau, K. Y., Spies, H. G., Clifton, D. K., & Steiner, R. A.: **The stimulatory effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey**, *Endocrinology*, 139(11). 4652–4662, 1998.

Fontaine, E., Fontbonne, A.: **Clinical use of GnRH agonists in canine and feline species**. *Reprod. Domest. Anim.*, 46(2), 344–353, 2011.

Fox, C. S., Massaro, J. M., Hoffmann, U., Pou, K. M., Maurovich-Horvat, P., Liu, C. Y., Vasan, R. S., Murabito, J. M., Meigs, J. B., Cupples, L. A., D'Agostino, R. B., Sr, & O'Donnell, C. J.: **Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study**, *Circulation*, 116(1). 39–48, 2007.

Frayn, K. N.: **Visceral fat and insulin resistance: causative a correlative**, *Br. J. Nutr.*, 83(1). 71–77, 2000.

Freedland E. S.: **Role of a critical visceral adipose tissue threshold (CVATT) in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review**, *Nutr. Metab. (Lond.)*, 1(1). 12, 2004.

Friedman, J. M., Halaas, J. L.: **Leptin and the regulation of body weight in mammals**, *Nature*, 395(6704). 763–770, 1998.

Friedman, J. M., Leibel, R. L.: **Tackling a weighty problem**, *Cell*, 69(2). 217–220, 1992.

Fujioka, S., Matsuzawa, Y., Tokunaga, K., Tarui, S.: **Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity**, *Metabolism*, 36. 54–59, 1987.

Fumel, B., Guerquin, M. J., Livera, G., Staub, C., Magistrini, M., Gauthier, C., Flamant, F., Guillou, F., Fouchécourt, S.: **Thyroid hormone limits postnatal Sertoli cell proliferation in vivo by activation of its alpha1 isoform receptor (TRalpha1) present in these cells and by regulation of Cdk4/JunD/c-myc mRNA levels in mice**. *Biol. Reprod.*, 87(1). 16–9, 2012.

Gadsby, J. E., Lovdal, J. A., Samaras, S., Barber, J. S., Hammond, J. M.: **Expression of the messenger ribonucleic acids for insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins in porcine corpora lutea**, *Biol. Reprod.*, 54(2). 339–346, 1996.

Garcia M. R.: **Leptin Contributes to the Development of the Corpus Luteum**, *Cell. Dev. Biol.* 6(3). 190, 2017.

Gastaldelli, A., Miyazaki, Y., Pettiti, M., Matsuda, M., Mahankali, S., Santini, E., DeFronzo, R. A., Ferrannini, E.: **Metabolic effects of visceral fat accumulation in type 2 diabetes**, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87. 5098–2103, 2002.

Gayet, C., Bailhache, E., Dumon, H., Martin, L., Siliart, B., Nguyen, P.: **Insulin resistance and changes in plasma concentration of TNFalpha, IGF1, and NEFA in dogs during weight gain and obesity**, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*, 88(3-4). 157–165, 2004.

Ge, Z., Nicholson, W. E., Plotner, D. M., Farin, C. E., Gadsby, J. E.: **Insulin-like growth factor I receptor mRNA and protein expression in pig corpora lutea**, *J. Reprod. Fertil.*, 120. 109–114, 2000.

- German, A. J., Hervera, M., Hunter, L., Holden, S. L., Morris, P. J., Biourge, V., Trayhurn, P.: **Improvement in insulin resistance and reduction in plasma inflammatory adipokines after weight loss in obese dogs**, *Domest. Anim. Endocrinol.*, 37(4). 214–226, 2009.
- German, A. J., Holden, S. L., Morris, P. J., Biourge, V.: **Comparison of a bioimpedance monitor with dual-energy x-ray absorptiometry for non-invasive estimation of percentage body fat in dogs**, *Am. J. Vet. Res.*, 71(4). 393-398, 2010a.
- German, A. J., Ryan, V. H., German, A. C., Wood, I. S., Trayhurn, P.: **Obesity, its associated disorders and the role of inflammatory adipokines in companion animals**, *Vet. J.*, 185. 4–9, 2010b.
- German, A., J.: **The Growing Problem of Obesity in Dogs and Cats**, *J. Nutr.*, 136(7). 1940–1946, 2006.
- Ghilardi, N., Ziegler, S., Wiestner, A., Stoffel, R., Heim, M. H., & Skoda, R. C.: **Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 93(13). 6231-6235, 1996.
- Gil, J., Genovese, P., Sartore, I., Bielli, A., Montossi, F., Viñoles, C.: **The leptin receptor is expressed in the Leydig cells of Merino rams, but its expression is not affected by long-term differences in the plane of nutrition**, *Animal Production Science*, 54(8). 981-986, 2014.
- Girard, J.: **Is leptin the link between obesity and insuline resistance?**, *Diabetes Metab.*, 3. 16-24, 1997.
- Glander, H. J., Kratzsch, J., Weisbrich, C., Birkenmeier, G.: **Insulin-like growth factor-I and alpha 2-macroglobulin in seminal plasma correlate with semen quality**, *Hum. Reprod.*, 11(11). 2454–2460, 1996.
- Glander, H. J., Lammert, A., Paasch, U., Glasow, A., Kratzsch, J.: **Leptin exists in tubuli seminiferi and in seminal plasma**, *Andrologia*, 34(4). 227–233, 2002.
- Goericke-Pesch S.: **Long-term effects of GnRH agonists on fertility and behaviour**, *Reprod. Domest. Anim.*, 52(2). 336–347, 2017.
- Goericke-Pesch, S., Gentil, M., Spang, A., Kowalewski, M. P., Failing, K., Hoffmann, B.: **Status of the down-regulated canine testis using two different GNRH agonist implants in comparison with the juvenile testis**, *Reproduction*, 146(6). 517–526, 2013.
- Goericke-Pesch, S., Wilhelm, E., Ludwig, C., Desmoulins, P. O., Driancourt, M. A., Hoffmann, B.: **Evaluation of the clinical efficacy of Gonazon implants in the treatment of reproductive pathologies, behavioral problems, and suppression of reproductive function in the male dog**, *Theriogenology*, 73(7). 920–926, 2010.
- Goodpaster, B. H., Thaete, F. L., Simoneau, J. A., Kelley, D. E.: **Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat**, *Diabetes*, 46. 1579–1585, 1997.
- Goto, M., Iwase, A., Harata, T., Takigawa, S., Suzuki, K., Manabe, S., Kikkawa, F.: **IGF1-induced AKT phosphorylation and cell proliferation are suppressed with the increase in PTEN during luteinization in human granulosa cells**, *Reproduction*, 137(5). 835–842, 2009.
- Gram, A., Fox, B., Buchler, U., Boos, A., Hoffmann, B., Kowalewski, M. P.: **Canine placental prostaglandin E2 synthase: expression, localization, and biological functions in providing substrates for prepartum PGF2alpha synthesis**, *Biol. Reprod.*, 91. 154, 2014.
- Gram, A., Hoffmann, B., Boos, A., Kowalewski, M. P.: **Expression and localization of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and its two receptors (VEGFR1/FLT1 and VEGFR2/FLK1/KDR) in the canine corpus luteum and utero-placental compartments during pregnancy and at normal and induced parturition**, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 223. 54-65, 2015.
- Gregoraszczyk, E.L., Ptak, A.: **In vitro effect of leptin on growth hormone (GH)- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-stimulated progesterone secretion and apoptosis in developing and mature corpora lutea of pig ovaries**, *J. Reprod. Dev.* 51. 727-733, 2005.
- Griffeth, R. J., Bianda, V., Nef, S.: **The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function**. *Basic. Clin. Androl.*, 24. 12, 2014.

- Guler, H. P., Schmid, C., Zapf, J., Froesch, E. R.: **Effects of insulin-like growth factor I in man**, *Acta Paediatr. Scand. Suppl.*, 367. 52–54, 1990.
- Guo, K. Y., Halo, P., Leibel, R. L., Zhang, Y.: **Effects of obesity on the relationship of leptin mRNA expression and adipocyte size in anatomically distinct fat depots in mice**, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 287. 112–119, 2004.
- Guo, W., Bigornia, S., Leizerman, I., Xie, W., McDonnell, M., Clemente, K., Pirtskhalava, T., Kirkland, J. L., Gokce, N., Corkey, B. E., Sullivan, L. M., Apovian, C. M.: **New scanning electron microscopic method for determination of adipocyte size in humans and mice**, *Obesity (Silver Spring)*, 15(7). 1657–1665, 2007.
- Guzmán-Sánchez, A., Rosales-Torres, A. M., Gutierrez, C.: **Neuroendocrine Effects of Insulin, IGF-I And Leptin on the Secretion of the Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)**, *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15. 79-90, 2013.
- Halaas, J. L., Gajiwala, K. S., Maffei, M., Cohen, S. L., Chait, B. T., Rabinowitz, D., Lallone, R. L., Burley, S. K., & Friedman, J. M.: **Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene**, *Science*, 269(5223). 543–546, 1995.
- Hamilton, B. S., Paglia, D., Kwan, A. Y., Deitel, M.: **Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans**, *Nat. Med.*, 1. 953–956, 1995
- Hansson, H. A., Billig, H., Isgaard, J.: **Insulin-like growth factor I in the developing and mature rat testis: immunohistochemical aspects**. *Biol. Reprod.*, 40(6), 1321–1328, 1989.
- 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.*, 223(3), 660–665, 1996.
- Hardie, L., Trayhurn, P., Abramovich, D., Fowler, P.: **Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy**, *Clin. Endocrinol.*, 47(1). 101–106, 1997.
- Hauner, H., Wabitsch, M., Pfeiffer, E.F.: **Differentiation of adipocyte precursor cells from obese and nonobese adult women and from different adipose tissue sites**, *Horm. Metab. Res. Suppl.* 19. 35–39, 1988.
- Heber, D., Dodson, R., Swerdloff, R. S., Channabasavaiah, K., Stewart, J. M.: **Pituitary receptor site blockade by a gonadotropin-releasing hormone antagonist in vivo: mechanism of action**. *Science*, 216(4544), 420–421, 1982.
- Hegyí, K., Fülöp, K., Kovács, K., Tóth, S., Falus, A.: **Leptin-induced signal transduction pathways**, *Cell. Biol. Int.*, 28(3). 159–169, 2004.
- Heilbronn, L., Smith, S. R., & Ravussin, E.: **Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus**, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 28 Suppl 4. 12–21, 2004.
- Hellmér, J., Marcus, C., Sonnenfeld, T., Arner, P.: **Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells**, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 75(1). 15–20, 1992.
- Henricks, D. M., Kouba, A. J., Lackey, B. R., Boone, W. R., Gray, S. L.: **Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility**, *Biol. Reprod.*, 59(2). 330–337, 1998.
- Henry, B. A., Goding, J. W., Tilbrook, A. J., Dunshea, F. R., & Clarke, I. J.: **Intracerebroventricular infusion of leptin elevates the secretion of luteinising hormone without affecting food intake in long-term food-restricted sheep, but increases growth hormone irrespective of bodyweight**, *J. Endocrinol.*, 168(1). 67–77, 2001.
- Herrid, M., O'Shea, T., McFarlane, J. R.: **Ontogeny of leptin and its receptor expression in mouse testis during the postnatal period**, *Mol. Reprod. Dev.*, 75(5). 874–880, 2008a.
- Herrid, M., Xia, Y., O'Shea, T., McFarlane, J. R.: **Leptin inhibits basal but not gonadotrophin-stimulated testosterone production in the immature mouse and sheep testis**, *Reprod. Fertil. Dev.*, 20(4). 519–528, 2008b.

- Hess, M. F., Roser, J. F.: **The effects of age, season and fertility status on plasma and intratesticular insulin-like growth factor I concentration in stallions**, *Theriogenology*, 56(5). 723–733, 2001.
- Hileman, S. M., Tornøe, J., Flier, J. S., Bjørbaek, C.: **Transcellular transport of leptin by the short leptin receptor isoform ObRa in Madin-Darby Canine Kidney cells**, *Endocrinology*, 141(6). 1955–1961, 2000.
- Hill, J. W., Elmquist, J. K., Elias, C. F.: **Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction**, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, *Endocrinology and metabolism*, 294(5). E827–E832, 2008.
- Hirakawa, T., Minegishi, T., Abe, K., Kishi, H., Ibuki, Y., Miyamoto, K.: **A role of insulin-like growth factor I in luteinizing hormone receptor expression in granulosa cells**, *Endocrinology*, 140(11). 4965–4971, 1999.
- Hirooka, M., Kumagi, T., Kurose, K., Nakanishi, S., Michitaka, B., Horiike, N., Onji, M.: **A technique for the measurement of visceral fat by ultrasonography: comparison of measurements by ultrasonography and computed tomography**, *Intern. Med.*, 44(8). 791-799, 2005.
- Hirsch, J., Batchelor, B.: **Adipose tissue cellularity in human obesity**, *Clin. Endocrinol. Metab.*, 5(2). 299-311, 1976.
- Hirsch, J., Gallian, E.: **Methods for the determination of adipose cell size in man and animals**, *J. Lipid. Res.*, 9(1). 110–119, 1968.
- Hirsch, J., Han, P. W.: **Cellularity of rat adipose tissue: effects of growth, starvation, and obesity**, *J. Lipid. Res.*, 10(1). 77-82, 1969.
- Hisra, A., Vikram, N. K.: **Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots**, *Nutrition*, 19. 457–466, 2003.
- Hoenig, M., Alexander, S., Holson, J., Ferguson, D. C.: **Influence of glucose dosage on interpretation of intravenous glucose tolerance tests in lean and obese cats**, *J. Vet. Intern. Med.*, 16(5). 529–532, 2002.
- Hoenig, M., Thomaseth, K., Waldron, M., Ferguson, D. C.: **Insulin sensitivity, fat distribution, and adipocytokine response to different diets in lean and obese cats before and after weight loss**, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 292(1). 227–234, 2007.
- Hoffmann, B., Busges, F., Baumgartner, W.: **Immunohistochemical detection of CD4-, CD8- and MHC II-expressing immune cells and endoglin in the canine corpus luteum at different stages of dioestrus**, *Reprod. Domest. Anim.* 39. 391-395, 2004.
- Hong, H., Cui, Z. Z., Zhu, L., Fu, S. P., Rossi, M., Cui, Y. H., Zhu, B. M.: **Central IGF1 improves glucose tolerance and insulin sensitivity in mice**, *Nutr. Diabetes*, 7(12). 2. 2017.
- Haupt K. A.: **Feeding and drinking behavior problems**, *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.*, 21(2). 281–298, 1991.
- Haupt, K. A., Coren, B., Hintz, H. F., Hilderbrant, J. E.: **Effect of sex and reproductive status on sucrose preference, food intake, and body weight of dogs**, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 174(10). 1083–1085, 1979.
- Hsueh, W. A., Buchanan, T. A.: **Obesity and hypertension**, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 23(2). 405–427, 1994.
- Hu, G. X., Lin, H., Chen, G. R., Chen, B. B., Lian, Q. Q., Hardy, D. O., Zirkin, B. R., Ge, R. S.: **Deletion of the Igf1 gene: suppressive effects on adult Leydig cell development**. *J. Androl.*, 31(4). 379–387, 2010.
- Hu, J., Shima, H., Nakagawa, H.: **Glial cell line-derived neurotrophic factor stimulates sertoli cell proliferation in the early postnatal period of rat testis development**. *Endocrinology*, 140(8). 3416–3421, 1999.
- Hube, F., Lietz, U., Igel, M., Jensen, P. B., Tornqvist, H., Joost, H. G., Hauner, H.: **Difference in leptin mRNA levels between omental and subcutaneous abdominal adipose tissue from obese humans**, *Horm. Metab. Res.*, 28(12). 690–693, 1996.

- Ibrahim M. M.: **Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences**, *Obes. Rev.*, 11(1). 11–18, 2010.
- Impellizzeri, J. A., Tetrick, M. A., Muir, P.: **Effect of weight reduction on clinical signs of lameness in dogs with hip osteoarthritis**, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 216(7). 1089–1091, 2000.
- Ishikawa, T., Fujioka, H., Ishimura, T., Takenaka, A., Fujisawa, M.: **Expression of leptin and leptin receptor in the testis of fertile and infertile patients**, *Andrologia*, 39(1). 22–27, 2007.
- 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.*, 169(1). 85–90, 2005b.
- 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.*, 82(1). 11–15, 2007.
- Ishioka, K., Okumura, M., Sagawa, M., Nakadomo, F., Kimura, K., Saito, M.: **Computed tomographic assessment of body fat in beagles**, *Vet. Radiol. Ultrasound*, 46(1). 49–53, 2005a.
- Ishioka, K., Soliman, M.M., Honjoh, T., Shibata, H., Kimura, K., Saito, M.: **Dexamethasone increases serum leptin concentration in dogs**, *Vet. J.*, 164. 295–297, 2002b.
- Ishioka, K., Soliman, M.M., Sagawa, M.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.*, 64(4). 394–353, 2002a.
- Iwase, M., Kimura, K., Komagome, R., Sasaki, N., Ishioka, K., Honjoh, T., Saito, M.: **Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay of canine leptin**, *J. Vet. Med. Sci.*, 62. 207–209, 2000b.
- 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**, *Res. Vet. Sci.*, 68. 109–114, 2000a.
- Jacobsson, B., Smith, U.: **Effect of cell size on lipolysis and antilipolytic action of insulin in human fat cells**, *J. Lipids. Res.*, 13. 651–656, 1972.
- Jensen, M.D.: **Gender differences in regional fatty acid metabolism before and after meal ingestion**, *J. Clin. Invest.*, 96. 2297–2303, 1995.
- Jernås, M., Palming, J., Sjöholm, K., Jennische, E., Svensson P., Gabrielsson, B. G., Levin, M., Sjögren, A., Rudemo, M., Lystig, T. C., Carlsson, B., Carlsson, L. M. S., Lönn, M.: **Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression**, *FASEB J.*, 20(9). 1540–1542, 2006.
- Jeusette, I. C., Detilleux, J., Shibata, H., Saito, M., Honjoh, T., Delobel, A., Istasse, L., Diez, M.: **Effects of chronic obesity and weight loss on plasma ghrelin and leptin concentrations in dogs**, *Res. Vet. Sci.*, 79(2). 169–175, 2005b.
- 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.*, 66(1). 81–86, 2005a.
- Jeusette, I., 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**, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 90. 12–18, 2006.
- Jeusette, I., Detilleux, J., Cuvelier, C., Istasse, L., Diez, M.: **Ad libitum feeding following ovariectomy in female Beagle dogs: effect on maintenance energy requirement and on blood metabolites**, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 88. 117–121, 2004.
- Jeusette, I., Greco, D., Aquino, F., Detilleux, J., Peterson, M., Romano, V., Torre, C.: **Effect of breed on body composition and comparison between various methods to estimate body composition in dogs**, *Research in veterinary science*, 88(2). 227–232, 2010.
- Jin, L., Zhang, S., Burguera, B. G., Couce, M. E., Osamura, R. Y., Kulig, E., Lloyd, R. V.: **Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells**, *Endocrinology*, 141(1). 333–339, 2000.

- Johnston, S. D., Kustritz, M. V. R., Olson, P. N. S.: *Canine and Feline Theriogenology* 1st Edition, Saunders, **chapter 3**, 32-40, 2001.
- Jones, J. I., Clemmons, D. R.: **Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions**, *Endocr. Rev.*, 16(1). 3–34, 1995.
- Jope, T., Lammert, A., Kratzsch, J., Paasch, U., Glander, H. J.: **Leptin and leptin receptor in human seminal plasma and in human spermatozoa**, *Int. J. Androl.*, 26(6). 335–341, 2003.
- Junaidi, A., Williamson, P. E., Cummins, J. M., Martin, G. B., Blackberry, M. A., Trigg, T. E.: **Use of a new drug delivery formulation of the gonadotrophin-releasing hormone analogue Deslorelin for reversible long-term contraception in male dogs**. *Reprod. Fertil. Dev.*, 15(6). 317–322, 2003.
- Junaidi, A., Williamson, P. E., Martin, G. B., Blackberry, M. A., Cummins, J. M., Trigg, T. E.: **Dose-response studies for pituitary and testicular function in male dogs treated with the GnRH superagonist, deslorelin**. *Reprod. Domest. Anim.*, 44(5). 725–734, 2009a.
- Junaidi, A., Williamson, P. E., Martin, G. B., Stanton, P. G., Blackberry, M. A., Cummins, J. M., Trigg, T. E.: **Pituitary and testicular endocrine responses to exogenous gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and luteinising hormone in male dogs treated with GnRH agonist implants**. *Reprod. Fertil. Dev.*, 19(8). 891–898, 2007.
- Junaidi, A., Williamson, P. E., Trigg, T. E., Cummins, J. M., Martin, G. B.: **Morphological study of the effects of the GnRH superagonist deslorelin on the canine testis and prostate gland**. *Reprod. Domest. Anim.*, 44(5), 757–763, 2009b.
- Juréus, A., Cunningham, M. J., McClain, M. E., Clifton, D. K., Steiner, R. A.: **Galanin-like peptide (GALP) is a target for regulation by leptin in the hypothalamus of the rat**, *Endocrinology*, 141(7). 2703–2706, 2000.
- Kabir, M., Catalano, K. J., Ananthnarayan, S., Kim, S. P., Van Citters, G. W., Dea, M. K. Bergman, R. N.: **Molecular evidence supporting the portal theory: a causative link between visceral adiposity and hepatic insulin resistance**, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 288. 454-461, 2005.
- Kabir, M., Stefanovski, D., Hsu, I. R., Iyer, M., Woolcott, O. O., Zheng, D., Catalano, K. J., Chiu, J. D., Kim, S. P., Harrison, L. N., Ionut, V., Lottati, M., Bergman, R. N., Richey, J. M.: **Large size cells in the visceral adipose depot predict insulin resistance in the canine model obesity**, *Obesity* 19. 2121-2129, 2011.
- Kageyama, H., Takenoya, F., Kita, T., Hori, T., Guan, J. L., Shioda, S.: **Galanin-like peptide in the brain: effects on feeding, energy metabolism and reproduction**, *Regul. Pept.*, 126(1-2), 21–26, 2005.
- Karlsson, C., Lindell, K., Svensson, E., Bergh, C., Lind, P., Billig, H., Carlsson, L. M., Carlsson, B.: **Expression of functional leptin receptors in the human ovary**, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82(12). 4144–4148, 1997.
- Kautz, E., Gram, A., Aslan, S., Ay, S. S., Selçuk, M., Kanca, H., Koldaş, E., Akal, E., Karakaş, K., Findik, M., Boos, A., Kowalewski, M. P.: **Expression of genes involved in the embryo-maternal interaction in the early-pregnant canine uterus**, *Reproduction*, 147(5). 703–717, 2014.
- Kawachi, H., Yang, S., Hamano, A., Matsui, T., Smith, S., Yano, H.: **Molecular cloning and expression of bovine (*Bos taurus*) leptin receptor isoform mRNAs**, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 148(2).167-173, 2007.
- Khan, S. A., Ndjountche, L., Pratchard, L., Spicer, L. J., & Davis, J. S.: **Follicle-stimulating hormone amplifies insulin-like growth factor I-mediated activation of AKT/protein kinase B signaling in immature rat Sertoli cells**. *Endocrinology*, 143(6). 2259–2267, 2002.
- Kim, S. P., Catalano, K. J., Hsu, I. R., Chiu, J. D., Richey, J. M., Bergman, R. N.: **Nocturnal free fatty acids are uniquely elevated in the longitudinal development of diet-induced insulin resistance and hyperinsulinemia**, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 292(6). 1590–1598, 2007.
- Kitawaki, J., Kusuki, I., Koshiba, H., Tsukamoto, K., & Honjo, H.: **Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells**, *Mol. Hum. Reprod.*, 5(8), 708–713, 1999.
- Kobayashi, T., Koie, H., Kusumi, A., Kitagawa, M., Kanayama, K., Otsuji, K.: **Comparative investigation of body composition in male dogs using CT and body fat analysis software**, *J. Vet. Med. Sci.* 76(3). 439–446, 2014.

- Kolaczynski, J. W., Caro, J. F.: **Insulin-like growth factor I therapy for diabetes mellitus?**, *Diabetes care*, 17(1). 92–96, 1994.
- Konigorski, S., Janke, J., Drogan, D., Bergmann, M. M., Hierholzer, J., Kaaks, R., Boeing, H., Pischon, T.: **Prediction of Circulating Adipokine Levels Based on Body Fat Compartments and Adipose Tissue Gene Expression**, *Obesity facts*, 12(6). 590–605, 2019.
- Kowalewski, M. P., Beceriklisoy, H. B., Aslan, S., Agaoglu, A. R., Hoffmann, B.: **Time related changes in luteal prostaglandin synthesis and steroidogenic capacity during pregnancy, normal and antiprogestin induced luteolysis in the bitch**, *Anim. Reprod. Sci.*, 116(1-2), 129–138, 2009.
- Kowalewski, M. P., Beceriklisoy, H. B., Pfarrer, C., Aslan, S., Kindahl, H., Kücükaslan, I., Hoffmann, B.: **Canine placenta: a source of prepartal prostaglandins during normal and antiprogestin-induced parturition**, *Reproduction*, 139(3). 655–664, 2010.
- Kowalewski, M. P., Gram, A., Kautz, E., Graubner, F. R.: **The Dog: Nonconformist, Not Only in Maternal Recognition Signaling**, *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.*, 216. 215–237, 2015.
- Kowalewski, M. P., Mason, J. I., Howie, A. F., Morley, S. D., Schuler, G., Hoffmann, B.: **Characterization of the canine 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and its expression in the corpus luteum during diestrus**, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 101. 254-262, 2006b.
- Kowalewski, M. P., Meyer, A., Hoffmann, B., Aslan, S., Boos, A.: **Expression and functional implications of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in canine reproductive tissues during normal pregnancy and parturition and at antiprogestin induced abortion**, *Theriogenology*, 75. 877-886, 2011a.
- Kowalewski, M. P., Schuler, G., Taubert, A., Engel, E., & Hoffmann, B.: **Expression of cyclooxygenase 1 and 2 in the canine corpus luteum during diestrus**, *Theriogenology*, 66(6-7). 1423–1430, 2006a.
- Kowalewski, M. P.: **Luteal regression vs. prepartum luteolysis: regulatory mechanisms governing canine corpus luteum function**, *Reprod. Biol.* 14. 89-102, 2014.
- Kowalewski, M.P., Michel, E., Gram, A., Boos, A., Guscetti, F., Hoffmann, B., Aslan, S., Reichler, I.: **Luteal and placental function in the bitch: spatio-temporal changes in prolactin receptor (PRLr) expression at dioestrus, pregnancy and normal and induced parturition**, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9. 109, 2011b.
- Kristensen, K., Pedersen, S. B., Richelsen, B.: **Interactions between sex steroid hormones and leptin in women. Studies in vivo and in vitro**, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 24(11). 1438–1444, 2000.
- Kruszynska, Y. T., Olefsky, J. M.: **Cellular and molecular mechanisms of non-insulin dependent diabetes mellitus**, *J. Investig. Med.*, 44(8). 413–428, 1996.
- Kumar, L., Panda, R. P., Hyder, I., Yadav, V. P., Sastry, K. V., Sharma, G. T., Mahapatra, R. K., Bag, S., Bhure, S. K., Das, G. K., Mitra, A., Sarkar, M.: **Expression of leptin and its receptor in corpus luteum during estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*)**, *Anim. Reprod. Sci.*, 135(1-4). 8–17, 2012.
- Kustritz R. M. V.: **Effects of surgical sterilization on canine and feline health and on society**, *Reprod. Domest. Anim.*, 47(4). 214–222, 2012.
- Laflamme, D.: **Development and validation of a body condition score system for dogs**, *Canine practice*, 22(4). 10-15, 1997.
- Lampiao, F., du Plessis, S. S.: **Insulin and leptin enhance human sperm motility, acrosome reaction and nitric oxide production**, *Asian. J. Androl.*, 10(5). 799–807, 2008.
- Landry, D., Cloutier, F., Martin, L. J.: **Implications of leptin in neuroendocrine regulation of male reproduction**, *Reprod. Biol.*, 13(1). 1–14, 2013.
- Lange-Consiglio, A., Corradetti, B., Perrini, C., Bizzaro, D., Cremonesi, F.: **Leptin and leptin receptor are detectable in equine spermatozoa but are not involved in in vitro fertilisation**, *Reprod. Fertil. Dev.*, 28(5). 574–585, 2016.
- Larsson, B.: **Obesity, fat distribution and cardiovascular disease**, *Int. J. Obesity*, 15. 53–57, 1991.

- Laviola, L., Natalicchio, A., Giorgino, F.: **The IGF-I signaling pathway**, *Curr. Pharm. Des.*, 13(7). 663–669, 2007.
- Laviola, L., Perrini, S., Cignarelli, A., Natalicchio, A., Leonardini, A., De Stefano, F., Cuscito, M., De Fazio, M., Memeo, V., Neri, V., Cignarelli, M., Giorgino, R., Giorgino, F.: **Insulin signaling in human visceral and subcutaneous adipose tissue in vivo**, *Diabetes*, 55(4). 952–961, 2006.
- Lee, G. H., Proenca, R., Montez, J. M., Carroll, K. M., Darvishzadeh, J. G., Lee, J. I., Friedman, J. M.: **Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice**, *Nature*, 379. 632-635, 1996.
- Lee, Y. H., Pratley, R. E.: **The evolving role of inflammation in obesity and the metabolic syndrome**, *Curr. Diab. Rep.*, 5(1). 70–75, 2005.
- Levi, J., Gray, S. L., Speck, M., Huynh, F. K., Babich, S. L., Gibson, W. T., Kieffer, T. J.: **Acute disruption of leptin signaling in vivo leads to increased insulin levels and insulin resistance**, *Endocrinology*, 152(9). 3385-3395, 2011.
- Li, C., Ioffe, E., Fidahusein, N., Connolly, E., Friedman, J. M.: **Absence of soluble leptin receptor in plasma from dbPas/dbPas and other db/db mice**, *J. Biol. Chem.*, 273(16). 10078-82, 1998.
- Lin, X. H., Wang, H., Wu, D. D., Ullah, K., Yu, T. T., Ur Rahman, T., Huang, H. F.: **High Leptin Level Attenuates Embryo Development in Overweight/Obese Infertile Women by Inhibiting Proliferation and Promotes Apoptosis in Granule Cell**, *Horm. Metab. Res.*, 49(7). 534–541, 2017.
- Liu, A., McLaughlin, T., Liu, T., Sherman, A., Yee, G., Abbasi, F., Lamendola, C., Morton, J., Cushman, S. W., Reaven, G. M., Tsao, P. S.: **Differential intra-abdominal adipose tissue profiling in obese, insulin-resistant women**, *Obes. Surg.*, 19. 1564-1573, 2009.
- Loffreda, S., Yang, S. Q., Lin, H. Z., Karp, C. L., Brengman, M. L., Wang, D. J., Klein, A. S., Bulkley, G. B., Bao, C., Noble, P. W., Lane, M. D., Diehl, A. M.: **Leptin regulates proinflammatory immune responses**, *FASEB J.*, 12(1). 57–65, 1998.
- Lord G. M.: **Leptin as a proinflammatory cytokine**, *Contrib. Nephrol.*, 151. 151–164, 2006.
- Lottati, M., Kolka, C. M., Stefanovski, D., Kirkman, E. L., & Bergman, R. N.: **Greater omentectomy improves insulin sensitivity in nonobese dogs**, *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 17(4). 674–680, 2009.
- Löffler, S., Aust, G., Köhler, U., Spanel-Borowski, K.: **Evidence of leptin expression in normal and polycystic human ovaries**, *Mol. Hum. Reprod.*, 7(12), 1143–1149, 2001.
- Lönn, M., Mehlig, K., Bengtsson, C., Lissner, L.: **Adipocyte size predicts incidence of type 2 diabetes in women**, *FASEB J.*, 24(1). 326–331, 2010.
- Lönnqvist, F., Nordfors, L., Jansson, M., Thörne, A., Schalling, M., Arner, P.: **Leptin secretion from adipose tissue in women. Relationship to plasma levels and gene expression**, *J. Clin. Invest.*, 99(10). 2398–2404, 1997.
- Lubkowska, A., Radecka, A., Bryczkowska, I., Rotter, I., Laszczyńska, M., Dudzińska, W.: **Serum Adiponectin and Leptin Concentrations in Relation to Body Fat Distribution, Hematological Indices and Lipid Profile in Humans**, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12(9), 11528–11548, 2015.
- Ludwig, C., Desmoulins, P. O., Driancourt, M. A., Goericke-Pesch, S., Hoffmann, B.: **Reversible downregulation of endocrine and germinative testicular function (hormonal castration) in the dog with the GnRH-agonist azagly-nafarelin as a removable implant "Gonazon"; a preclinical trial**, *Theriogenology*, 71(7). 1037–1045, 2009.
- Luna-Pinto, G., Cronjé, P. B.: **The roles of the insulin-like growth factor system and leptin as possible mediators of the effects of nutritional restriction on age at puberty and compensatory growth in dairy heifers**, *S. Afr. J. Anim. Sci.* 30(2). 155-162, 2000.
- Lund, E. M., Armstrong, P. J., Kirk, C., Klausner, J. S.: **Prevalence and risk factors for obesity in adult dogs from private US veterinary practices**, *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.*, 4. 177-186, 2006.
- Lundgren, M., Svensson, M., Lindmark, S., Renstrom, F., Ruge, T., Eriksson, J. W.: **Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and 'hyperleptinaemia'**, *Diabetologia*, 50. 625–633, 2007.
- Maarschalkerweerd, R. J., Endenburg, N., Kirpensteijn, J., Knol, B. W.: **Influence of orchietomy on canine behaviour**, *Vet. Rec.*, 140(24). 617–619, 1997.

- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S.: **Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects**, *Nat. Med.*, 1(11). 1155–1161, 1995.
- Maheshwari, A., Stofberg, L., Bhattacharya, S.: **Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology--a systematic review**, *Hum. Reprod. Update.*, 13(5). 433–444, 2007.
- Malli, F., Papaioannou, A. I., Gourgoulialis, K. I., Daniil, Z.: The role of leptin in the respiratory system: an overview. *Respir. Res.*, 11(1). 152, 2010.
- Malmström, R., Taskinen, M. R., Karonen, S. L., Yki-Järvinen, H.: **Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM**, *Diabetologia*, 39(8). 993-996, 1996.
- Mani, A. M., Fenwick, M. A., Cheng, Z., Sharma, M. K., Singh, D., Wathes, D. C.: **IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells**, *Reproduction*, 139(1). 139–151, 2010.
- Manna, P.R., Chandrala, S.P., King, S.R., Jo, Y., Counis, R., Huhtaniemi, I.T., Stocco, D.M.: **Molecular mechanisms of insulin-like growth factor-I mediated regulation of the steroidogenic acute regulatory protein in mouse leydig cells**. *Mol. Endocrinol.*, 20. 362-378, 2006.
- Mannucci, E., Ognibene, A., Becorpi, A., 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.*, 139(2), 198–201, 1998.
- Mårin, P., Andersson, B., Ottosson, M., Olbe, L., Chowdhury, B., Kvist, H., Holm, G., Sjöström, L., Björntorp, P.: The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men, *Metabolism*, 41(11). 1242–1248, 1992.
- Martin, B., Golden, E., Carlson, O. D., Egan, J. M., Mattson, M. P., Maudsley, S.: **Caloric restriction: impact upon pituitary function and reproduction**, *Ageing. Res. Rev.*, 7(3). 209–224, 2008.
- Martin, L. J., Siliart, B., Dumon, H. J., Nguyen, P. G.: **Hormonal disturbances associated with obesity in dogs**, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*, 90(9-10). 355–360, 2006.
- Matson, C. A., Wiater, M. F., Weigle, D. S.: **Leptin and the regulation of body adiposity. A critical review**, *Diabetes Rev.*, 4. 488–508, 1996.
- Matsubara, Y., Kano, K., Kondo, D., Mugishima, H., Matsumoto, T.: **Differences in adipocytokines and fatty acid composition between two adipocyte fractions of small and large cells in high-fat diet-induced obese mice**, *Ann. Nutr. Metab.*, 54. 258–267, 2009.
- Matsuzawa, Y., Fujioka, S., Tokunaga, K., Tarui, S.: **Classification of obesity with respect to morbidity**, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 200(2). 197–201, 1992.
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., Turner, R. C.: **Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man**, *Diabetologia*, 28(7). 412–419, 1985.
- Mawby, D. I., Bartges, J. W., d'Avignon, A., Laflamme, D. P., Moyers, T. D., Cottrell, T.: **Comparison of various methods for estimating body fat in dogs**, *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 40(2). 109-114, 2004.
- Maxwell, A., Butterwick, R., Yateman, M., Batt, R. M., Cotterill, A., Camacho-Hübner, C.: **Nutritional modulation of canine insulin-like growth factors and their binding proteins**, *J. Endocrinol.*, 158(1). 77–85, 1998.
- Mayank, C.: **Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor-I: Novel Insights into the Male Reproductive Health**, *Growth Disorders and Acromegaly*, Ahmed R.G. and Ahmet Uçar, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.90710. Available from: <https://www.intechopen.com/books/growth-disorders-and-acromegaly/growth-hormone-and-insulin-like-growth-factor-i-novel-insights-into-the-male-reproductive-health>, 2020.
- McGreevy, P. D., Thomson, P. C., Pride, C., Fawcett, A., Grassi, T., Jones, B.: **Prevalence of obesity in dogs examined by Australian veterinary practices and the risk factors involved**, *Vet. Rec.*, 156(22). 695–702, 2005.

- McLaughlin, T., Deng, A., Yee, G., Lamendola, C., Reaven, G., Tsao, P. S., Cushman, S. W., Sherman, A.: **Inflammation in subcutaneous adipose tissue: relationship to adipose cell size**, *Diabetologia*, 53(2). 369–377, 2010.
- McLaughlin, T., Sherman, A., Tsao, P., Gonzalez, O., Yee, G., Lamendola, C., Reaven, G. M., Cushman, S. W.: **Enhanced proportion of small adipose cells in insulin-resistant vs insulin-sensitive obese individuals implicates impaired adipogenesis**, *Diabetologia*, 50(8). 1707–1715, 2007.
- Meek, S.E., Nair, K.S., Jensen, M.D.: **Insulin regulation of regional free fatty acid metabolism**, *Diabetes*, 48. 10–14, 1999.
- Mehr, M., Rajabi-Toustani, R., Motamedi-Mojdehi, R.: **Leptin Receptor in Ram Epididymal Spermatozoa**, *Engineering*, 04(10).121-123; 2012.
- Mehr, M., Toustani, R., Mojdehi, R.: **Leptin receptor mRNA expression in Taleshi ram gonads**, *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 14(4). 327-333, 2013.
- Meij, B. P., Kooistra, H. S., Rijnberk, A.: **Hypothalamus-Pituitary System**, In: Rijnberk, Kooistra (Eds.), *Clinical Endocrinology of Dogs and Cats*, 2nd ed. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co., Hannover, pp. 18-20, 2010.
- Messinis, I. E., Milingos, S., Zikopoulos, K., Kollios, G., Seferiadis, K., Lolis, D.: **Leptin concentrations in the follicular phase of spontaneous cycles and cycles superovulated with follicle stimulating hormone**, *Hum. Reprod.*, 13(5). 1152–1156, 1998.
- Meyer, L. K., Ciaraldi, T. P., Henry, R. R., Wittgrove, A. C., Phillips, S. A.: **Adipose tissue depot and cell size dependency of adiponectin synthesis and secretion in human obesity**, *Adipocyte*, 2(4). 217–226, 2013.
- Miah, A. G., Salma, U., Takagi, Y., Kohsaka, T., Hamano, K. I., Tsujii, H.: **Effects of relaxin and IGF-I on capacitation, acrosome reaction, cholesterol efflux and utilization of labeled and unlabeled glucose in porcine spermatozoa**. *Reprod. Med. Biol.*, 7(1), 29–36, 2008.
- Mialot, J. P., Thibier, M., Toubanc, J. E., Castanier, M., Scholler, R.: **Plasma concentration of luteinizing hormone, testosterone, dehydroepiandrosterone, androstenedione between birth and one year in the male dog: longitudinal study and hCG stimulation**, *Andrologia*, 20(2). 145–154, 1988.
- Mol, J. A., van Garderen, E., Rutteman, G. R., Rijnberk, A.: **New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans**, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 57. 67-71, 1996.
- Molina, J. M., Ciaraldi, T. P., Brady, D., Olefsky, J. M.: **Decreased activation rate of insulin-stimulated glucose transport in adipocytes from obese subjects**, *Diabetes*, 38. 991–995, 1989.
- Montague, C. T., Prins, J. B., Sanders, L., Digby, J. E., O'Rahilly, S.: **Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution**, *Diabetes*, 46(3). 342–347, 1997.
- Montague, C. T., Prins, J. B., Sanders, L., Zhang, J., Sewter, C. P., Digby, J., Byrne, C. D., O'Rahilly, S.: **Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes**, *Diabetes*, 47(9). 1384–1391, 1998.
- Moschos, S., Chan, J. L., Mantzoros, C. S.: **Leptin and reproduction: a review**, *Fertil. Steril.*, 77(3). 433–444, 2002.
- Mounzih, K., Lu, R., Chehab, F. F.: **Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males**, *Endocrinol.*, 138(3). 1190-1193, 1997.
- Mulders, A. G., Laven, J. S., Eijkemans, M. J., Hughes, E. G., & Fauser, B. C.: **Patient predictors for outcome of gonadotrophin ovulation induction in women with normogonadotrophic anovulatory infertility: a meta-analysis**, *Hum. Reprod. Update*, 9(5). 429–449, 2003.
- 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**, *Can. J. Anim. Sci.*, 85. 157-164, 2005.

- Müller, L., Kowalewski, M. P., Reichler, I. M., Kollár, E., Balogh, O.: **Different expression of leptin and IGF1 in the adult and prepubertal testis in dogs**, *Reprod. Domest. Anim.*, 52(Suppl. 2). 187–192, 2017.
- Nagatani, S., Guthikonda, P., Thompson, R. C., Tsukamura, H., Maeda, K. I., & Foster, D. L.: **Evidence for GnRH regulation by leptin: leptin administration prevents reduced pulsatile LH secretion during fasting**, *Neuroendocrinology*, 67(6). 370–376, 1998.
- Nagatani, S., Zeng, Y., Keisler, D. H., Foster, D. L., & Jaffe, C. A.: **Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep**, *Endocrinology*, 141(11). 3965–3975, 2000.
- Nagy, P., Solti, L., Kulcsar, M., Reiczigel, J., Huszenicza, G., Abavary, K., Wolfling, A.: **Progesterone determination in equine plasma using different immunoassays**, *Acta. Vet. Hung.*, 46. 501-513, 1998.
- Nakae, J., Kido, Y., Accili, D.: **Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors**, *Endocr. Rev.*, 22(6). 818–835, 2001.
- Nicklin, L. T., Robinson, R. S., Marsters, P., Campbell, B. K., Mann, G. E., Hunter, M. G.: **Leptin in the bovine corpus luteum: receptor expression and effects on progesterone production**, *Mol. Reprod. Dev.*, 74(6). 724–729, 2007.
- Nikbakht, G., Mehr, M. R., Baghbanzadeh, A., Tajik, P., Tamanini, C., Emam, M.: **Leptin receptor mRNA in bull ejaculated spermatozoa**, *Reprod. Domest. Anim.*, 45(2). 237–242, 2010.
- Nishii, N., Takasu, M., Ohba, Y., Maeda, S., Kitoh, 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.*, 67. 266-270, 2006.
- Nowaczyk, R. M., Jursza-Piotrowska, E., Gram, A., Siemieniuch, M. J., Boos, A., Kowalewski, M. P.: **Cells expressing CD4, CD8, MHCII and endoglin in the canine corpus luteum of pregnancy, and prepartum activation of the luteal TNF α system**, *Theriogenology*, 98. 123–132, 2017.
- Nyomba, B. L. G., Johnson, M., Berard, L., Murphy, L. J.: **Relationship between serum leptin and the insulin-like growth factor-I system in humans**, *Metabolism*, 48(7). 840-844, 1999.
- Ogura, K., Irahara, M., Kiyokawa, M., Tezuka, M., Matsuzaki, T., Yasui, T., Kamada, M., Aono, T.: **Effects of leptin on secretion of LH and FSH from primary cultured female rat pituitary cells**, *Eur. J. Endocrinol.*, 144(6). 653–658, 2001.
- Ozkurkucugil, C., Yardimoglu, M., Dalcik, H., Erdogan, S., Gokalp, A.: **Effect of insulin-like growth factor-1 on apoptosis of rat testicular germ cells induced by testicular torsion**. *BJU. Int.*, 93(7). 1094–1097, 2004.
- Pan, Y., Cui, Y., Baloch, A. R., Fan, J., He, J., Li, G., Zheng, H., Zhang, Y., Lv, P., Yu, S.: **Insulinlike growth factor I improves yak (*Bos grunniens*) spermatozoa motility and the oocyte cleavage rate by modulating the expression of Bax and Bcl-2**. *Theriogenology*, 84(5). 756–762, 2015.
- Papa, P. C., Hoffmann, B.: **The corpus luteum of the dog: source and target of steroid hormones?**, *Reprod. Domest. Anim.*, (46). 750-756, 2011.
- Park, H. J., Lee, S. E., Kim, H. B., Isaacson, R. E., Seo, K. W., Song, K. H.: **Association of obesity with serum leptin, adiponectin, and serotonin and gut microflora in beagle dogs**, *J. Vet. Intern. Med.*, 29(1). 43–50, 2015.
- Park, H. J., Lee, S. E., Oh, J. H., Seo, K. W., Song, K. H.: **Leptin, adiponectin and serotonin levels in lean and obese dogs**, *BMC Vet. Res.*, 10. 113, 2014.
- Park, H. S., Park, J. Y., Yu, R.: **Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6**, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 69(1). 29–35, 2005.
- Park, S., Hong, S. M., Sung, S. R., Jung, H. K.: **Long-term effects of central leptin and resistin on body weight, insulin resistance, and beta-cell function and mass by the modulation of hypothalamic leptin and insulin signaling**, *Endocrinology*, 149(2). 445–454, 2008.
- Pasarica, M., Tchoukalova, Y. D., Heilbronn, L. K., Fang, X., Albu, J. B., Kelley, D. E., Smith, S. R., Ravussin, E., Look AHEAD Adipose Research Group: **Differential effect of weight loss on**

- adipocyte size subfractions in patients with type 2 diabetes**, *Obesity (Silver Spring)*, 17(10). 1976–1978, 2009.
- Pasarica, M., Xie, H., Hymel, D., Bray, G., Greenway, F., Ravussin, E., Smith, S. R.: **Lower total adipocyte number but no evidence for small adipocyte depletion in patients with type 2 diabetes**, *Diabetes care*, 32(5). 900–902, 2009b.
- Peinó, R., Piñeiro, V., Gualillo, O., Menéndez, C., Brenlla, J., Casabiell, X., Diéguez, C., Casanueva, F. F.: **Cold exposure inhibits leptin secretion in vitro by a direct and non-specific action on adipose tissue**, *Eur. J. Endocrinol.*, 142(2). 195–199, 2000.
- 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*, 269(5223). 540–543, 1995.
- Pérez-Pérez, A., Vilariño-García, T., Fernández-Riejos, P., Martín-González, J., Segura-Egea, J. J., Sánchez-Margalet, V.: **Role of leptin as a link between metabolism and the immune system**, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 35. 71–84, 2017.
- Pérez-Pérez, R., Ortega-Delgado, F. J., García-Santos, E., López, J. A., Camafeita, E., Ricart, W., Fernández-Real, J. M., Peral, B.: **Differential proteomics of omental and subcutaneous adipose tissue reflects their unlike biochemical and metabolic properties**, *J. Proteome. Res.*, 8(4). 1682–1693, 2009.
- Peters, M. A., Mol, J. A., van Wolferen, M. E., Oosterlaken-Dijksterhuis, M. A., Teerds, K. J., van Sluijs, F. J.: **Expression of the insulin-like growth factor (IGF) system and steroidogenic enzymes in canine testis tumors**, *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 1. 22, 2003.
- Phoophitphong, D., Srisuwatanasagul, S., Tummaruk, P.: **Leptin Immunohistochemical Staining in the Porcine Ovary**, *Anat. Histol. Embryol.*, 46(4). 334–341, 2017.
- Pitetti, J. L., Calvel, P., Zimmermann, C., Conne, B., Papaioannou, M. D., Aubry, F., Cederroth, C. R., Urner, F., Fumel, B., Crausaz, M., Docquier, M., Herrera, P. L., Pralong, F., Germond, M., Guillou, F., Jégou, B., Nef, S.: **An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice**, *Mol. Endocrinol.*, 27(5). 814–827, 2013.
- Poetsch, M. S., Strano, A., Guan, K.: **Role of Leptin in Cardiovascular Diseases**, *Front. Endocrinol.*, 11. 354, 2020.
- Polisca, A., Orlandi, R., Troisi, A., Brecchia, G., Zerani, M., Boiti, C., Zelli, R.: **Clinical efficacy of the GnRH agonist (deslorelin) in dogs affected by benign prostatic hyperplasia and evaluation of prostatic blood flow by Doppler ultrasound**. *Reprod. Domest. Anim.*, 48(4). 673–680, 2013.
- Polonsky K. S.: **Evolution of beta-cell dysfunction in impaired glucose tolerance and diabetes**, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.*, 107 Suppl 4. 124-127, 1999.
- Powell-Braxton, L., Hollingshead, P., Warburton, C., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Dalton, D., Gillett, N., Stewart, T. A.: **IGF-I is required for normal embryonic growth in mice**, *Genes. Dev.*, 7(12B). 2609–2617, 1993.
- Power, M. L., & Schulkin, J.: **Sex differences in fat storage, fat metabolism, and the health risks from obesity: possible evolutionary origins**, *Br. J. Nutr.*, 99(5). 931–940, 2008.
- Purushothaman, D., Vanselow, B. A., Wu, S. B., Butler, S., Brown, W. Y.: **Whole Body Computed Tomography with Advanced Imaging Techniques: A Research Tool for Measuring Body Composition in Dogs**, *J. Vet. Med.*, 610654. Epub, 2013.
- Quennell, J. H., Mulligan, A. C., Tups, A., Liu, X., Phipps, S. J., Kemp, C. J., Herbison, A. E., Grattan, D. R., Anderson, G. M.: **Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function**, *Endocrinology*, 150(6). 2805–2812, 2009.
- Rago, V., Aquila, S., Guido, C., & Carpino, A.: **Leptin and its receptor are expressed in the testis and in the epididymis of young and adult pigs**, *Anat. Rec.*, 292(5). 736–745, 2009.
- Rand, J. S., Fleeman, L. M., Farrow, H. A., Appleton, D. J., Lederer, R.: **Canine and feline diabetes mellitus: nature or nurture?**, *J. Nutr.*, 134(8). 2072–2080, 2004.

- Ranganathan, S., Maffei, M., Kern, P. A.: **Adipose tissue ob mRNA expression in humans: discordance with plasma leptin and relationship with adipose TNFalpha expression**, *J. Lipid. Res.*, 39(4). 724–730, 1998.
- Ravussin, E., Smith, S. R.: **Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus**, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 967. 363–378, 2002.
- Ravussin, E.: **Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance, and type II diabetes mellitus**, *Int. J. Obes.*, 28. 12-21, 2004.
- Reichler, I. M.: **Gonadectomy in cats and dogs: a review of risks and benefits**, *Reprod. Domest. Anim.*, 44(2). 29-35, 2009.
- Renauld, A., Sverdlik, R. C., Fels, R. C., von Lawzewitsch, I., Perez, R. L., Foglia, V. G., Rodriguez, R. R.: **Metabolic and histological pancreatic changes induced by orchidectomy in dogs**, *Horm. Metab. Res.*, 12(8). 370–376, 1980.
- Ressel, L., Finotello, R., Innocenti, V. M., Vannozi, I., Poli, A.: **Preliminary report on the expression of leptin and leptin receptor (ObR) in normal, hyperplastic and neoplastic canine mammary tissues**, *Res. Vet. Sci.*, 93(1). 343–349, 2012.
- Reynaud, K., Chastant-Maillard, S., Batard, S., Thoumire, S., Monget, P.: **IGF system and ovarian folliculogenesis in dog breeds of various sizes: is there a link?**, *J. Endocrinol.*, 206(1). 85–92, 2010.
- Riad-Gabriel, M. G., Jinagouda, S. D., Sharma, A., Boyadjian, R., Saad, M. F.: **Changes in plasma leptin during the menstrual cycle**, *Eur. J. Endocrinol.*, 139(5). 528–531, 1998.
- Ribeiro-Filho, F. F., Faria, A. N., Azjen, S., Zanella, M. T., Ferreira, S. R.: **Methods of estimation of visceral fat: advantages of ultrasonography**, *Obes. Res.*, 11(12). 1488–1494, 2003.
- Rinderknecht, E., Humbel, R. E.: **The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin**, *J. Biol. Chem.*, 253(8). 2769–2776, 1978.
- Romagnoli, S., Siminica, A., Sontas, B. H., Milani, C., Mollo, A., Stelletta, C.: **Semen quality and onset of sterility following administration of a 4.7-mg deslorelin implant in adult male dogs**, *Reprod. Domest. Anim.*, 47(Suppl 6). 389–392, 2012.
- Ronnemaa, T., Karonen, S. L., Rissanen, A., Koskenvuo, M., Koivisto, V. A.: **Relation between plasma leptin levels and measures of body fat in identical twins discordant for obesity**, *Ann. Intern. Med.*, 126. 26-31, 1997.
- Rosen C. J.: **Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding proteins: clinical implications**, *Clin. Chem.*, 45(8 Pt2). 1384–1390, 1999.
- Roseweir, A. K., Millar, R. P.: **The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion**, *Hum. Reprod. Update.*, 15(2). 203–212, 2009.
- Roth, M. Y., Amory, J. K.: **Pharmacologic development of male hormonal contraceptive agents**, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 89(1), 133–136, 2011.
- Ruiz-Cortés, Z. T., Martel-Kennes, Y., Gévry, N. Y., Downey, B. R., Palin, M. F., Murphy, B. D.: **Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells**, *Biol. Reprod.*, 68(3). 789–796, 2003.
- Ruiz-Cortés, Z. T., Martel-Kennes, Y., Gévry, N. Y., Downey, B. R., Palin, M. F., Murphy, B. D.: **Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells**, *Biol. Reprod.*, 68(3), 789–796, 2003.
- Ryan, N. K., Van der Hoek, K. H., Robertson, S. A., Norman, R. J.: **Leptin and leptin receptor expression in the rat ovary**, *Endocrinology*, 144(11). 5006–5013, 2003.
- Ryan, N. K., Woodhouse, C. M., Van der Hoek, K. H., Gilchrist, R. B., Armstrong, D. T., Norman, R. J.: **Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation**, *Biol. Reprod.*, 66(5). 1548–1554, 2002.
- Ryan, V. H., German, A. J., Wood, I. S., Hunter, L., Morris, P., Trayhurn, P.: **Adipokine expression and secretion by canine adipocytes: stimulation of inflammatory adipokine production by LPS and TNFalpha**, *Pflugers Arch.*, 460(3). 603–616, 2010.

- Sagawa, M., Nakamodo, F., Honjoh, T., Ishioka, K., Saito, M.: **Correlation between plasma leptin concentration and body fat content in dogs**, *Am. J. Vet. Res.*, 63(1). 7-10, 2002.
- Saint-Dizier, M., Jaffré, N., Reynaud, K., Remy, B., Thoumire, S., Chastant-Maillard, S.: **Expression of follicle-stimulating hormone and luteinising hormone binding sites in the bitch ovary during the follicular phase**, *Reprod. Fertil. Dev.*, 20(8). 925–934, 2008.
- Salans, L. B., Cushman, S. W., Weismann, R. E.: **Studies of human adipose tissue. Adipose cell size and number in nonobese and obese patients**, *J. Clin. Invest.*, 52(4). 929–941, 1973.
- Salans, L. B., Dougherty, J. W.: **The effect of insulin upon glucose metabolism by adipose cells of different size. Influence of cell lipid and protein content, age, and nutritional state**, *J. Clin. Invest.*, 50(7). 1399–1410, 1971.
- Salans, L. B., Horton, E. S., Sims, E. A. H.: **Experimental obesity in man: cellular character of the adipose tissue**, *J. Clin. Invest.*, 50(5). 1005–1011, 1971.
- Salans, L. B., Knittle, J. L., & Hirsch, J.: **The role of adipose cell size and adipose tissue insulin sensitivity in the carbohydrate intolerance of human obesity**, *J. Clin. Invest.*, 47(1). 153–165, 1968.
- Saleri, R., Tirelli, M., Grasselli, F., Dondi, M., Arisi, M.: **Sexual dimorphism of blood leptin levels in dog** (in Italian), *Veterinaria (Cremona)*, 17. 47–51, 2003.
- Santos-Alvarez, J., Goberna, R., Sánchez-Margalet, V.: **Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes**, *Cell. Immunol.*, 194(1). 6–11, 1999.
- Sarkar, M., Schilffarth, S., Schams, D., Meyer, H. H., Berisha, B.: **The expression of leptin and its receptor during different physiological stages in the bovine ovary**, *Mol. Reprod. Dev.*, 77(2). 174–181, 2010.
- Schams, D., Berisha, B., Kosmann, M., Amselgruber, W. M.: **Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy**, *Domest. Anim. Endocrinol.*, 22(1), 51–72, 2002.
- Schams, D., Kosmann, M., Berisha, B., Amselgruber, W.M., Miyamoto, A.: **Stimulatory and synergistic effects of luteinising hormone and insulin like growth factor 1 on the secretion of vascular endothelial growth factor and progesterone of cultured bovine granulosa cells**, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 109. 155-162, 2001.
- Schauf, S., Salas-Mani, A., Torre, C., Bosch, G., Swarts, H., Castrillo, C.: **Effect of sterilization and of dietary fat and carbohydrate content on food intake, activity level, and blood satiety-related hormones in female dogs**, *J. Anim. Sci.*, 94(10). 4239–4250, 2016.
- Schneider J. E.: **Energy balance and reproduction**, *Physiol. Behav.*, 81(2), 289–317, 2004.
- Schulz, L.C., Widmaier, E.P.: **Chapter 2. Leptin receptors**, In: Castrace, V. D. és Henson, M. D.(Eds.), *Leptin*. Springer Science & Business Media, pp. 11-31, 2007.
- Sekar, N., Lavoie, H.A., Veldhuis, J.D.: **Concerted regulation of steroidogenic acute regulatory gene expression by luteinizing hormone and insulin (or insulin-like growth factor I) in primary cultures of porcine granulosa-luteal cells**, *Endocrinology*, 141. 3983-3992, 2000.
- Selman, P. J., Mol, J. A., Rutteman, G. R., Rijnberk, A.: **Progestin treatment in the dog. I. Effects on growth hormone, insulin-like growth factor I and glucose homeostasis**, *Eur. J. Endocrinol.*, 131. 413-421, 1994.
- Serafim, M. K., Duarte, A. B., Silva, G. M., Souza, C. E., Magalhães-Padilha, D. M., Moura, A. A., Silva, L. D., Campello, C. C., Figueiredo, J. R.: **Impact of growth hormone (GH) and follicle stimulating hormone (FSH) on in vitro canine preantral follicle development and estradiol production**, *Growth. Horm. IGF Res.*, 25(2). 85–89, 2015.
- Serafim, M. K., Silva, G. M., Duarte, A. B., Araújo, V. R., Silva, T. F., Lima, A. K., Chaves, R. N., Campello, C. C., Silva, L. D., Figueiredo, J. R.: **High insulin concentrations promote the in vitro growth and viability of canine preantral follicles**, *Reprod. Fertil. Dev.*, 25(6). 927–934, 2013.
- 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**, *J. Endocrinol.*, 154(2), 285–292, 1997.

- Shuster, A., Patlas, M., Pinthus, J. H., Mourtzakis, M.: **The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis**, *Br. J. Radiol.*, 85(1009). 1-10, 2012.
- Simmen, R. C., Simmen, F. A., Hofig, A., Farmer, S. J., Bazer, F. W.: **Hormonal regulation of insulin-like growth factor gene expression in pig uterus**, *Endocrinology*, 127. 2166-217, 1990.
- Sir-Petermann, T., Maliqueo, M., Palomino, A., Vantman, D., Recabarren, S. E., Wildt, L.: **Episodic leptin release is independent of luteinizing hormone secretion**, *Hum. Reprod.*, 14(11). 2695–2699, 1999.
- Sjöström, L., Björntorp, P., Vrána, J.: **Microscopic fat cell size measurements on frozen-cut adipose tissue in comparison with automatic determinations of osmium-fixed fat cells**, *J. Lipid. Res.*, 12(5). 521–530, 1971.
- Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., Hauner, H.: **Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion**, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 92(3). 1023-1033, 2007.
- Smith S. R.: **The endocrinology of obesity**, *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*, 25(4). 921–942, 1996.
- Smith, G. D., Jackson, L. M., Foster, D. L.: **Leptin regulation of reproductive function and fertility**, *Theriogenology*, 57(1). 73–86, 2002.
- Smith, M. R., Lee, H., McGovern, F., Fallon, M. A., Goode, M., Zietman, A. L., Finkelstein, J. S.: **Metabolic changes during gonadotropin-releasing hormone agonist therapy for prostate cancer: differences from the classic metabolic syndrome**, *Cancer*, 112(10), 2188–2194, 2008.
- Smith, M. R., Lee, H., Nathan, D. M.: **Insulin sensitivity during combined androgen blockade for prostate cancer**, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 91(4). 1305–1308, 2006.
- Smolinska, N., Kaminski, T., Siawrys, G., Przala, J.: **Leptin gene and protein expression in the ovary during the oestrous cycle and early pregnancy in pigs**, *Reprod. Domest. Anim.*, 45(5). 174–183, 2010.
- Son, H. R., d'Avignon, D. A., Laflamme, D. P.: **Comparison of dual-energy x-ray absorptiometry and measurement of total body water content by deuterium oxide dilution for estimating body composition in dogs**, *Am. J. Vet. Res.*, 59(5). 529–532, 1998.
- Songsasen, N., Nagashima, J., Thongkittidilok, C.: **Endocrine and paracrine controls of canine follicular development and function**, *Reprod. Domest. Anim.*, 52. Suppl 2. 29-34, 2017.
- Sorace, M., Tripodi, L., Tripodi, A., Groppetti, D., Cremonesi, F.: **Leptin: pharmacological aspects in gynecology**, *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.*, 33(2). 113–116, 2006.
- Sortino, M. A., Canonico, P. L.: **Neuroprotective effect of insulin-like growth factor I in immortalized hypothalamic cells**. *Endocrinology*, 137(4). 1418–1422, 1996.
- Söder, O., Bang, P., Wahab, A., Parvinen, M.: **Insulin-like growth factors selectively stimulate spermatogonial, but not meiotic, deoxyribonucleic acid synthesis during rat spermatogenesis**. *Endocrinology*, 131(5). 2344–2350, 1992.
- Spicer, L. J., Chamberlain, C. S., Francisco, C. C.: **Ovarian action of leptin: effects on insulin-like growth factor-I-stimulated function of granulosa and thecal cells**, *Endocrine*, 12(1). 53–59, 2000.
- Spicer, L. J., Francisco, C. C.: **Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis**, *Biol. Reprod.*, 58(1). 207–212, 1998.
- Spicer, L. J., Francisco, C. C.: **The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function**, *Endocrinology*, 138(8). 3374–3379, 1997.
- Spicer, L.: **Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction**, *Domest. Anim. Endocrinol.*, 21(4). 251-270, 2001.
- Spicer, L.J., Echtenkamp, S.E.: **The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals**, *Domest. Anim. Endocrinol.*, 12. 223-245, 1995.
- Stanek, M.B., Borman, S.M., Molskness, T.A., Larson, J.M., Stouffer, R.L., Patton, P.E.: **Insulin and insulin-like growth factor stimulation of vascular endothelial growth factor production by**

luteinized granulosa cells: comparison between polycystic ovarian syndrome (PCOS) and non-PCOS women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 92. 2726-2733, 2007.

Stewart, R.E., Spicer, L.J., Hamilton, T.D., Keefer, B.E.: **Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone**, *J. Anim. Sci.* 73. 3719-3731, 1995.

Stoll B. A.: **Upper abdominal obesity, insulin resistance and breast cancer risk**, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 26(6). 747–753, 2002.

Stone, R., Berghoff, N., Steiner, J., Zoran, D.: **Use of bioelectric impedance device in 420 obese and lean healthy dogs to estimate body fat percentage**, *Vet. Ther.*, 10(1-2). 59-70, 2009.

Suzuki, S., Kadokawa, H., Hashizume, T.: **Direct kisspeptin-10 stimulation on luteinizing hormone secretion from bovine and porcine anterior pituitary cells**, *Anim Reprod Sci.*, 103(3-4). 360–365, 2008.

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.*, 56(3-4). 98–104, 2001.

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

Tchkonina, T., Corkey, B.E., Kirkland, J.L.: **Current Views of the Fat Cell as an Endocrine Cell: Lipotoxicity**, In *Endocrine Updates, Vol. 26: Overweight and the Metabolic Syndrome*, Bray, Ryan (Eds.) New York: Springer, pp. 105–118, 2006a.

Tchkonina, T., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., Tchoukalova, Y., Karagiannides, I., Forse, R. A., DePonte, M., Stevenson, M., Guo, W., Han, J., Waloga, G., Lash, T. L., Jensen, M. D., Kirkland, J. L.: **Fat depot origin affects adipogenesis in primary cultured and cloned human preadipocytes**, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 282(5). 1286–1296, 2002.

Tchkonina, T., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., Thomou, T., DePonte, M., Koo, A., Forse, R. A., Chinnappan, D., Martin-Ruiz, C., von Zglinicki, T., Kirkland, J. L.: **Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes**, *Diabetes*, 55(9). 2571–2578, 2006b.

Tchkonina, T., Morbeck, D. E., Von Zglinicki, T., Van Deursen, J., Lustgarten, J., Scoble, H., Khosla, S., Jensen, M. D., Kirkland, J. L.: **Fat tissue, aging, and cellular senescence**, *Aging cell*, 9(5). 667–684, 2010.

Tchkonina, T., Tchoukalova, Y. D., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., Karagiannides, I., Forse, R. A., Koo, A., Stevenson, M., Chinnappan, D., Cartwright, A., Jensen, M. D., Kirkland, J. L.: **Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots**, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 288(1). 267–277, 2005.

Tchkonina, T., Thomou, T., Zhu, Y., Karagiannides, I., Pothoulakis, C., Jensen, M. D., Kirkland, J. L.: **Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots**, *Cell Metab.*, 17(5). 644–656, 2013.

Tchoukalova, Y. D., Harteneck, D. A., Karwoski, R. A., Tarara, J., Jensen, M. D.: **A quick, reliable, and automated method for fat cell sizing**, *J. Lipid. Res.*, 44(9). 1795–1801, 2003.

Tchoukalova, Y. D., Koutsari, C., Karpyak, M. V., Votruba, S. B., Wendland, E., Jensen, M. D.: **Subcutaneous adipocyte size and body fat distribution**, *Am. J. Clin. Nutr.*, 87(1). 56-63, 2008.

Tchoukalova, Y.D., Votruba, S.B., Tchkonina, T., Giorgadze, N., Kirkland, J.L., and Jensen, M.D.: **Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding**, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107. 18226–8231, 2010.

Tena-Sempere, M., Barreiro, M. L.: **Leptin in male reproduction: the testis paradigm**, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 188(1-2). 9–13, 2002.

Tena-Sempere, M., Manna, P. R., Zhang, F. P., Pinilla, L., González, L. C., Diéguez, C., Huhtaniemi, I., Aguilar, E.: **Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for**

- leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression**, *J. Endocrinol.*, 170(2). 413–423, 2001.
- Tena-Sempere, M., Pinilla, L., González, L. C., Diéguez, C., Casanueva, F. F., Aguilar, E.: **Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis in vitro**, *J. Endocrinol.*, 161(2). 211–218, 1999.
- Thomou, T., Tchkonia, T., Kirkland, J.L.: Cellular and Molecular Basis of Functional Differences among Fat Depots. In: Leff, Granneman (Eds) *Adipose Tissue in Health and Disease*, Weinheim, Germany: Wiley-VCH, pp. 21–47, 2010.
- Thongkittidilok, C., Wildt, D.E., Songsasen, N.: **Responsiveness of intraovarian dog follicles in vitro to epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor depends on ovarian donor age**, *Reprod. Domest. Anim.*, 52. Suppl 2. 114-122, 2017.
- Tibold, A., Thuroczy, J.: **Progesterone, oestradiol, FSH and LH concentrations in serum of progesterone-treated pregnant bitches with suspected luteal insufficiency**, *Reprod. Domest. Anim.*, 44(2). 129-132, 2009.
- 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.*, 311(Pt 3)(Pt 3), 729–733, 1995.
- Trigg, T. E., Doyle, A. G., Walsh, J. D., Swangchan-uthai, T.: **A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction**. *Theriogenology*, 66(6-7). 1507–1512, 2006.
- Trigg, T. E., Wright, P. J., Armour, A. F., Williamson, P. E., Junaidi, A., Martin, G. B., Doyle, A. G., Walsh, J.: **Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs**. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 57, 255–261, 2001.
- TRIGG, T. E., WRIGHT, P. J., ARMOUR, A. F., WILLIAMSON, P. R., JUNAIDI, A., MARTIN, G. B.: **Long-term reversible desexing of male dogs and oestrus postponement of bitches, using a GnRH analogue implant**. *Proc. Adv. Dog Cat Exotic Carniv. Reprod.*, Oslo, 2000. 21 [abstract].
- Tritos, N. A., Mantzoros, C. S.: **Leptin: its role in obesity and beyond**, *Diabetologia*, 40. 1371–1379, 1997.
- Tritos, N., Mantzoros, C.: **Leptin: its role in obesity and beyond**, *Diabetologia* 40. 1371–1379, 1997.
- Tropea, A., Miceli, F., Minici, F., Tiberi, F., Orlando, M., Gangale, M.F., Romani, F., Catino, S., Mancuso, S., Navarra, P., Lanzone, A., Apa, R.: **Regulation of vascular endothelial growth factor synthesis and release by human luteal cells in vitro**, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 91. 2303-2309, 2006.
- Tvarijonavičiute, A., Ceron, J. J., Holden, S. L., Biourge, V., Morris, P. J., German, A. J.: Effect of weight loss in obese dogs on indicators of renal function or disease, *J. Vet. Intern. Med.*, 27(1). 31–38, 2013.
- Tvarijonavičiute, A., Ceron, J. J., Holden, S. L., Cuthbertson, D. J., Biourge, V., Morris, P. J., German, A. J.: **Obesity-related metabolic dysfunction in dogs: a comparison with human metabolic syndrome**, *BMC Vet. Res.*, 8. 147, 2012.
- Tvarijonavičiute, A., Ceron, J. J., Martínez-Subiela, S.: **Assessment of five ELISAs for measurement of leptin concentrations in dogs**, *Am. J. Vet. Res.*, 72(2). 169–173, 2011.
- Vague, J.: **The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout and uri-calculus disease**, *Am. J. Clin. Nutr.*, 4. 20–29, 1956.
- Van Harmelen, V., Reynisdóttir, S., Eriksson, P., Thörne, A., Hoffstedt, J., Lönnqvist, F., Arner, P.: **Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women**, *Diabetes*, 47(6). 913–917, 1998.
- Van Harmelen, V., Röhrig, K., Hauner, H.: **Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects**, *Metabolism*, 53(5). 632–637, 2004.

- Verboven, K., Wouters, K., Gaens, K., Hansen, D., Bijnen, M., Wetzels, S., Stehouwer, C. D., Goossens, G. H., Schalkwijk, C. G., Blaak, E. E., Jocken, J. W.: **Abdominal subcutaneous and visceral adipocyte size, lipolysis and inflammation relate to insulin resistance in male obese humans**, *Sci. Rep.*, 8(1), 4677, 2018.
- Verkest, K. R., Fleeman, L. M., Morton, J. M., Ishioka, K., & Rand, J. S.: **Compensation for obesity-induced insulin resistance in dogs: assessment of the effects of leptin, adiponectin, and glucagon-like peptide-1 using path analysis**, *Domest. Anim. Endocrinol.*, 41(1). 24–34, 2011a.
- Verkest, K. R., Fleeman, L. M., Rand, J. S., Morton, J. M.: **Basal measures of insulin sensitivity and insulin secretion and simplified glucose tolerance tests in dogs**, *Domest. Anim. Endocrinol.*, 39(3). 194–204, 2010.
- Verkest, K. R., Fleeman, L. M., Rand, J. S., Morton, J. M.: **Evaluation of beta-cell sensitivity to glucose and first-phase insulin secretion in obese dogs**, *Am. J. Vet. Res.*, 72(3). 357–366, 2011b.
- Vickery B. H.: **Comparisons of the potential utility of LHRH agonists and antagonists for fertility control**. *J. Steroid. Biochem.*, 23(5B), 779–791, 1985.
- von Sobbe, H. U., Koebnick, C., Jenne, L., Kiesewetter, F.: **Leptin concentrations in semen are correlated with serum leptin and elevated in hypergonadotrophic hypogonadism**, *Andrologia*, 35(4). 233–237, 2003.
- von Sobbe, H. U., Koebnick, C., Jenne, L., Kiesewetter, F.: **Leptin concentrations in semen are correlated with serum leptin and elevated in hypergonadotrophic hypogonadism**, *Andrologia*, 35(4). 233–237, 2003.
- Wach-Gygax, L., Burger, D., Malama, E., Bollwein, H., Fleisch, A., Jeannerat, E., Thomas, S., Schuler, G., Janett, F.: **Seasonal changes of DNA fragmentation and quality of raw and cold-stored stallion spermatozoa**, *Theriogenology*, 99. 98–104, 2017.
- Wählen, K., Sjölin, E., Löfgren, P.: **Role of fat cell size for plasma leptin in a large population based sample**, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 119(5). 291-294, 2011.
- Wajchenberg B. L.: **Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome**, *Endocr. Rev.*, 21(6). 697–738, 2000.
- Wakshlag, J. J., Struble, A. M., Levine, C. B., Bushey, J. J., Laflamme, D. P., Long, G. M.: **The effects of weight loss on adipokines and markers of inflammation in dogs**, *Br. J. Nutr.*, 106(1). 11–14, 2011.
- Wang, G. M., O'Shaughnessy, P. J., Chubb, C., Robaire, B., Hardy, M. P.: **Effects of insulin-like growth factor I on steroidogenic enzyme expression levels in mouse leydig cells**. *Endocrinology*, 144(11), 5058–5064, 2003.
- Wang, G., Hardy, M. P.: **Development of leydig cells in the insulin-like growth factor-I (igf-I) knockout mouse: effects of igf-I replacement and gonadotropic stimulation**, *Biol. Reprod.*, 70(3). 632–639, 2004.
- Wang, M. Y., Zhou, Y. T., Newgard, C. B., Unger, R. H.: A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS letters*, 392(2). 87–90, 1996.
- Watanobe, H.: **Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate gonadotropin-releasing hormone secretion in vivo in rats**, *J. Physiol.*, 545(1). 255–268, 2002.
- Wauters, M., Considine, R. V., van Gaal, L. F.: **Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator**, *Eur. J. Endocrinol.*, 143. 293-311, 2000.
- Weber, R. V., Buckley, M. C., Fried, S. K., Kral, J. G.: **Subcutaneous lipectomy causes a metabolic syndrome in hamsters**, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 279. 936–943, 2000.
- Wellen, K. E., Hotamisligil, G. S.: **Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue**, *J. Clin. Invest.*, 112(12). 1785–1788, 2003.
- Weyer, C., Foley, J. E., Bogardus, C., Tataranni, P. A., Pratley, R. E.: **Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance**, *Diabetologia*, 43(12). 1498–1506, 2000.

- Winkler, G., Kiss, S., Keszthelyi, L., Sápi, Z., Ory, I., Salamon, F., Kovács, M., Vargha, P., Szekeres, O., Speer, G., Karádi, I., Sikter, M., Kaszás, E., Dworak, O., Gerő, G., Cseh, K.: **Expression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF-alpha, soluble serum TNF-receptor-2 concentrations and C-peptide level**, *Eur. J. Endocrinol.*, 149(2). 129–135, 2003.
- Wolf, G., Chen, S., Han, D. C., Ziyadeh, F. N.: **Leptin and renal disease**, *Am. J. Kidney Dis.*, 39(1), 1–11. 2002.
- Wolfe, A., Divall, S., Wu, S.: **The regulation of reproductive neuroendocrine function by insulin and insulin-like growth factor-1 (IGF-1)**, *Front. Neuroendocrinol.*, 35(4). 558–572, 2014.
- Wynne, K., Stanley, S., McGowan, B., Bloom, S.: **Appetite control**, *J. Endocrinol.*, 184(2). 291–318, 2005.
- Xu, J., Kirigiti, M. A., Cowley, M. A., Grove, K. L., Smith, M. S.: **Suppression of basal spontaneous gonadotropin-releasing hormone neuronal activity during lactation: role of inhibitory effects of neuropeptide Y**, *Endocrinology*, 150(1). 333–340, 2009a.
- Xu, J., Kirigiti, M. A., Grove, K. L., Smith, M. S.: **Regulation of food intake and gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone during lactation: role of insulin and leptin**, *Endocrinology*, 150(9). 4231–4240, 2009b.
- Yamada, M., Irahara, M., Tezuka, M., Murakami, T., Shima, K., & Aono, T.: **Serum leptin profiles in the normal menstrual cycles and gonadotropin treatment cycles**, *Gynecol. Obstet. Invest.*, 49(2). 119–123, 2000.
- Yang, J., Eliasson, B., Smith, U., Cushman, S. W., Sherman, A. S.: **The size of large adipose cells is a predictor of insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients**, *Obesity*, 20. 932-938, 2012.
- Yilmaz, A., Davis, M. E., Simmen, R. C.: **Estimation of (co)variance components for reproductive traits in Angus beef cattle divergently selected for blood serum IGF-I concentration**, *J. Anim. Sci.*, 82(8). 2285–2292, 2004.
- Yoon, M. J., Berger, T., Roser, J. F.: **Localization of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor (IGF-IR) in equine testes**. *Reprod. Domest. Anim.*, 46(2). 221–228, 2011.
- Yoon, M. J., Roser, J. F.: **A synergistic effect of insulin-like growth factor (IGF-I) on equine luteinizing hormone (eLH)-induced testosterone production from cultured Leydig cells of horses**. *Anim. Reprod. Sci.*, 126(3-4). 195–199, 2011.
- Yu, W. H., Kimura, M., Walczewska, A., Karanth, S., McCann, S. M.: **Role of leptin in hypothalamic-pituitary function**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(3). 1023–1028, 1997.
- Zachow, R. J., Magoffin, D. A.: **Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 beta production by rat ovarian granulosa cells**, *Endocrinology*, 138(2). 847–850, 1997.
- Zachow, R. J., Weitsman, S. R., Magoffin, D. A.: **Leptin impairs the synergistic stimulation by transforming growth factor-beta of follicle-stimulating hormone-dependent aromatase activity and messenger ribonucleic acid expression in rat ovarian granulosa cells**, *Biol. Reprod.*, 61(4). 1104–1109, 1999.
- Zamorano, P. L., Mahesh, V. B., De Sevilla, L. M., Chorich, L. P., Bhat, G. K., Brann, D. W.: **Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat**, *Neuroendocrinology*, 65(3). 223–228, 1997.
- Zatta, S., Rehrauer, H., Gram, A., Boos, A., Kowalewski, M. P.: **Transcriptome analysis reveals differences in mechanisms regulating cessation of luteal function in pregnant and nonpregnant dogs**, *BMC Genomics*, 18. 757, 2017.
- Zerani, M., Boiti, C., Zampini, D., Brecchia, G., Dall'Aglio, C., Ceccarelli, P., Gobbetti, A.: **Ob receptor in rabbit ovary and leptin in vitro regulation of corpora lutea**, *J. Endocrinol.*, 183(2). 279–288, 2004.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J. M.: **Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue**, *Nature*, 372. 425-432, 1994.

Zhou, P., Baumgarten, S. C., Wu, Y., Bennett, J., Winston, N., Hirshfeld-Cytron, J., Stocco, C.: **IGF-I signaling is essential for FSH stimulation of AKT and steroidogenic genes in granulosa cells.** *Mol. Endocrinol.*, 27(3). 511–523, 2013.

Zorn, B., Osredkar, J., Meden-Vrtovec, H., Majdic, G.: **Leptin levels in infertile male patients are correlated with inhibin B, testosterone and SHBG but not with sperm characteristics,** *Int. J. Androl.*, 30(5), 439–444, 2007.

8. A doktori kutatás eredményeinek közlései

8.1. Lektorált, impakt faktorra bíró tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Müller, L., Kollár, E., Balogh, L., Pöstényi, Z., Márián, T., Garai, I., Balkay, L., Trencsényi, G., Thuróczy, J.: **Body fat distribution and metabolic consequences - Examination opportunities in dogs.** *Acta. Vet. Hung.* 62. 169-79, 2014.

Müller, L., Kowalewski, M. P., Reichler, I. M., Kollár, E., & Balogh, O.: **Different expression of leptin and IGF1 in the adult and prepubertal testis in dogs,** *Reprod. Domest. Anim.*, 52(2). 187–192, 2017.

Müller, L., Mester, L., Nagy, A., Hanácsek, R., Janett, F., Cseh, S., Reichler, I. M., Balogh, O.: **Deslorelin tartalmú implantátummal (Suprelorin 4,7 mg) végzett kémiai kasztráció hatása a spermaminőségre, a testtömegre, a vér egyes biokémiai paramétereire és a vérképre ivarérett Beagle kan kutyákban Irodalmi összefoglaló és saját tapasztalatok,** *Magy. Állatorv. Lapja* 140. 727-736, 2018.

Balogh, O., Müller, L., Boos, A., Kowalewski, M. P., Reichler, I. M.: **Expression of insulin-like growth factor 1 and its receptor in preovulatory follicles and in the corpus luteum in the bitch,** *Gen. Comp. Endocrinol.*, 269. 68–74, 2018.

Müller, L., Kók, E., Kollár, E., Balogh, O.*, Thuróczy, J.*: **A vérszérum leptinkoncentrációjának változása az ivari ciklus és a testzsírmennyiség függvényében szuka kutyában: Irodalmi áttekintés és saját tapasztalatok,** *Magy. Állatorv. Lapja* 141. 411-424, 2019.

8.2. Konferencia prezentációk

Müller L., Kollár E., Thuróczy J.: **Interaction of ovarian function and fat deposits in dog,** EVSSAR Congress Louvain-La-Neuve, 2010.

Müller L., Kollár E., Várnay Zs., Thuróczy J., Balogh L., Pöstényi Z., Haász V., Polyák A., Márián T., Garai I., Galuska L., Balkay L., Trencsényi Gy., Nagy T., Szabó J., Jánoki Gy., Jánoki G., Török R.: **Kövér kutya, kövér ember – mi a különbség?,** Hevesy György Magyar Orvostudományi Nukleáris Társaság XVII. Kongresszusa, Budapest, 2011.

Müller L., Kollár E., Thuróczy, J.: **A zsírszövet és egyes hormonok hatása az inzulinérzékenység változására kutyában,** MTA Akadémiai Beszámoló, Budapest, 2011.

Müller L., Kollár E., Balogh L., Thuróczy, J.: **A hasi zsíreloszlás szerepe a metabolikus státusz kialakításában – vizsgálati lehetőségek és azok jelentősége kutya fajban,** MTA Akadémiai Beszámoló, Budapest, 2012.

Müller, L.*, Balogh, O.*, Kollár, E., Gürler, H., Kowalewski, M.P., Reichler, I.M.: **A pilot study on immunohistochemical detection of leptin and its receptor in the canine testis and epididymis,** Pilotstudie für immunhistochemische Erkennung von Leptin und dessen Rezeptor im kaninen Hoden und Nebenhoden. *Reprod Dom Anim* 50(Suppl.1). 55-56, 2015. *equal contribution

Balogh, O., Müller, L., Kowalewski, M.P., Kollár, E., Thuróczy, J., Cseh, S., Reichler, I.M.: **Leptin and leptin receptor gene expression in the canine testis and epididymis – a preliminary study,** *Proceedings of the 18th EVSSAR Congress,* Hannover, Germany, 2015.

Müller L., Kollár E., Thuróczy J., Balogh O.: **A kutya gonádok leptin és leptin receptor expressziójának immunhisztokémiai vizsgálata**, MTA Akadémiai Beszámoló, Budapest, 2015.

Müller L., Wölfling A., Kollár E., Thuróczy J., Balogh O.: **Az ivari ciklus hatása a leptin és a leptin receptor zsírdepó-specifikus expressziójára szuka kutyában – előtanulmányok**, MTA Akadémiai Beszámoló, Budapest, 2015.

Balogh, O., Müller, L., Kowalewski, M.P., Reichler, I.M.: **Leptin and IGF1 in the adult and prepubertal canine testis**, Proceedings of the 8th International Symposium on Canine and Feline Reproduction, Paris, France, 2016.

Balogh, O., Müller, L., Kowalewski, M.P., Thuróczy, J., Cseh, S., Reichler, I.M.: **A preliminary study on leptin and its receptor in the adult and prepubertal canine testis**, Proceedings of the 49th Annual Conference of Physiology and Pathology of Reproduction and 41st Mutual Conference on Veterinary and Human Reproductive Medicine (Februartagung), Leipzig, Germany, 2016.

Müller, L., Balogh, O.: **A leptin és az inzulinszerű növekedési faktor-1 szerepének vizsgálata egészséges kutyákból származó here szöveteken**, 23. Szaporodásbiológiai Találkozó, Cegléd, 2017.

Müller, L., Kowalewski, M.P., Reichler, I.M., Balogh, O.: **Leptin, leptin receptor, and androgen receptor expression in the testis and epididymis of adult male Beagles treated with a 4.7mg deslorelin implant**, Proceedings of the 21st EVSSAR Congress, Venice, Italy, 2018.

9. Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm témavezetőmnek dr. Thuróczy Juliannának, hogy elindított ezen az úton és sok éven át segítette klinikusi és kutatói munkámat és fejlődésemet. Nem lehetek eléggé hálás témavezetőmnek dr. Balogh Orsolyának, aki fáradhatatlan lelkesedéssel és önzetlen segítséggel vitt engem előre az úton és lehetővé tette számomra a munkám befejezését. Bízom abban, hogy immár kontinenseket és időzónákat átívelő barátságunk és kutatói együttműködésünk módot ad majd arra, hogy viszonzzam a segítséget. Köszönöm témavezetőmnek dr. Farkas Szilviának, hogy segített a végső akadályok leküzdésében. Szeretném megköszönni Prof. Solti Lászlónak, Prof. Cseh Sándornak és Prof. Rátky Józsefnek, hogy tanszékvezetőként lehetővé tették a kutatói munkámat és egyengették az utam.

Köszönettel tartozom dr. Balogh Lajosnak, Haller Károlynak, Kovács-Haász Veronikának, Nagy Tamásnak és Szabó Juditnak a CT vizsgálatokhoz kötődő technikai segítségükért.

Külön köszönetet illeti Harnos Andreát az adatok statisztikai elemzésében nyújtott segítségéért, és Wölfling Annát az ELISA vizsgálatok során adott pótolhatatlan technikai segítségéért. Hálásan köszönöm dr. Baska Ferencnek és Popp Renátának a szövettani minták feldolgozásában nyújtott segítségüket.

Szeretném megköszönni Prof. Mariusz P. Kowalewskinek, Prof. Alois Boosnak és Prof. Iris M. Reichlernek, hogy lehetőséget adtak arra, hogy a Zürichi Egyetem Állatorvostudományi Karának Kisállatklinikáján és Anatómiai Intézetének laborjaiban dolgozhassak, és hogy szakmai segítségükre mindig támaszkodhattam. Hálával tartozom Elisabeth Höggernek, az Anatómiai Intézet technikusának, aki az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz szükséges metszetek elkészítésével segítette a munkámat. Köszönöm továbbá Professzor Fredi Janett, Mathias Siuda és Sarun Keo munkáját (Zürichi Egyetem, Állatorvostudományi Kar), akik az SCSA analízisben segítettek.

Köszönetet szeretnék mondani az ATRC Aurigon Kft. Klinikopatológiai laboratóriumában dolgozó munkatársainak a laboratóriumi vizsgálatok elvégzéséért, valamint dr. Mester Lászlónak, a vizsgálóhely vezetőségének, technikusainak és állatgondozóinak, akik lehetővé tették és segítették a vizsgálat megvalósítását.

Külön köszönet illeti dr. Faigl Verát és dr. Fodor Kingát, amiért szűkös idejükből áldoztak a dolgozatom elolvasására és értékes javaslataikkal, megfontolt tanácsaikkal végleges formába öntötték.

Köszönettel tartozom a Szülészeti Klinika régi és új munkatársainak a klinikai minták folyamatos gyűjtésében nyújtott segítségükért. Nagyon hálás vagyok barátomnak és kollégámnak dr. Kollár Eszternek, akivel együtt indultunk a PhD hallgatók rögzös útján, és

akinek tanácsai és biztatása sok hullámvölgyön átsegített. Hálásan köszönöm volt és jelenlegi kollégáim, barátaim és családtagjaim türelmét és támogatását.

A vizsgálat részben a Kutatókar KK-UK (új kutatási téma) pályázati finanszírozásból valósulhatott meg.