

Szegedi Tudományegyetem  
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar  
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

**A kisspeptin-13 és kisspeptin-8 hatásának vizsgálata a  
szorongásra és lokomócióra Wistar patkányokban**

Ph.D. Tézis

dr. Ibos Katalin Eszter

Témavezető: Dr. habil. Csabafi Krisztina, Ph.D.

Szeged,

2023

## **A tézishez kapcsolódó publikációk**

- I. Ibos, Katalin Eszter; Bodnár, Éva; Bagosi, Zsolt; Bozsó, Zsolt; Tóth, Gábor; Szabó, Gyula; Csabafi, Krisztina  
Kisspeptin-8 Induces Anxiety-Like Behavior and Hypolocomotion by Activating the HPA Axis and Increasing GABA Release in the Nucleus Accumbens in Rats  
BIOMEDICINES 9 : 2 Paper: 112 , 22 p. (2021)  
Scopus - Medicine (miscellaneous) SJR: Q1  
Scopus - Biochemistry, Genetics and Molecular Biology (miscellaneous) SJR: Q2  
IF: 4.757
  
- II. Csabafi, Krisztina; Ibos, Katalin Eszter; Bodnár, Éva; Filkor, Kata; Szakács, Júlia; Bagosi, Zsolt  
A Brain Region-Dependent Alteration in the Expression of Vasopressin, Corticotropin-Releasing Factor, and Their Receptors Might Be in the Background of Kisspeptin-13-Induced Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activation and Anxiety in Rats  
BIOMEDICINES 11 : 9 Paper: 2446 , 20 p. (2023)  
Scopus - Medicine (miscellaneous) SJR: Q1  
Scopus - Biochemistry, Genetics and Molecular Biology (miscellaneous) SJR: Q2  
IF: 4.7 \*

## **Egyéb publikációk**

- I. Pintér, Dávid; Balangó, Beáta; Simon, Balázs; Palotai, Miklós; Csabafi, Krisztina; Dobó, Éva; Ibos, Katalin Eszter; Bagosi, Zsolt  
The effects of CRF and the urocortins on the hippocampal acetylcholine release in rats  
NEUROPEPTIDES 88 Paper: 102147 , 5 p. (2021)  
Scopus - Medicine (miscellaneous) SJR: Q2  
IF: 2.9

- II. Simon, Balázs; Buzás, András; Bokor, Péter; Csabafi, Krisztina; Ibos, Katalin Eszter; Bodnár, Éva; Török, László; Földesi, Imre; Siska, Andrea; Bagosi, Zsolt  
The Effects of Alcohol Intoxication and Withdrawal on Hypothalamic Neurohormones and Extrahypothalamic Neurotransmitters  
BIOMEDICINES 11 : 5 Paper: 1288 , 17 p. (2023)  
Scopus - Medicine (miscellaneous) SJR: Q1  
Scopus - Biochemistry, Genetics and Molecular Biology (miscellaneous) SJR: Q2  
IF: 4.7 \*
- III. Dinh, Hoa; Kovács, Zsuzsanna Z. A.; Márványkövi, Fanni; Kis, Merse; Kupecz, Klaudia; Szűcs, Gergő; Freiwan, Marah; Lauber, Gülsüm Yilmaz; Acar, Eylem; Siska, Andrea; Ibos, Katalin Eszter; Bodnár, Éva; Kriston, András; Kovács, Ferenc; Horváth, Péter; Földesi, Imre; Cserni, Gábor; Podesser, Bruno K.; Pokreisz, Peter; Kiss, Attila; Dux, László; Csabafi, Krisztina; Sárközy, Márta  
The kisspeptin-1 receptor antagonist peptide-234 aggravates uremic cardiomyopathy in a rat model  
SCIENTIFIC REPORTS 13 : 1 Paper: 14046 , 16 p. (2023)  
Scopus - Multidisciplinary SJR: D1  
IF: 4.997
- IV. Ibos, Katalin Eszter; Bodnár, Éva; Dinh, Hoa; Kis, Merse; Márványkövi, Fanni; Kovács, Zsuzsanna Z. A.; Siska, Andrea; Földesi, Imre; Galla, Zsolt; Monostori, Péter; Szatmári, István; Simon, Péter; Sárközy, Márta; Csabafi, Krisztina  
Chronic kidney disease may evoke anxiety by altering CRH expression in the amygdala and tryptophan metabolism in rats  
Pflügers Archiv European Journal of Physiology – *under peer review* (2023)  
Scopus - Physiology SJR: Q1  
IF: 4.5

## Rövidítések

ANOVA	varianciaanalízis
AVP vagy VP	(arginin)-vazopresszin
BNST	bed nucleus of the stria terminalis (a határcsík agymagja)
CRH vagy CRF	kortikotropinfelszabadító hormon vagy faktor
ELISA	enzimkötött immunszorbens assay
EPM	elevated plus maze (megemelt keresztpalló)
GABA	gamma-aminovajsav
HPA	hypothalamus-hypophysis-mellékvese
HPG	hypothalamus-hypophysis-gonád
icv.	intracerebroventricularis
ip.	intraperitonealis
Kiss1R	kisspeptin receptor
KP	kisspeptin
LH	luteinizáló hormon
MB	marble burying (üveggolyó elásás)
MePD	posterodorsalis medialis amygdala
mRNA	messenger ribonukleinsav
NAc	nucleus accumbens
NPFRR	neuropeptid FF receptor
OF	open field (nyílt tér)
PCR	polimeráz láncreakció
VTA	ventralis tegmentalis area

## 1. Bevezetés

1996-ban egy emberi melanoma-sejtvonalban fedezték fel a KiSS-1 gént, amelyről bebizonyosodott, hogy metasztázis-szuppresszorként működik. 2001-ben felfedezték a KiSS-1 C-terminálisan amidált, 54 aminosav hosszúságú peptidtermékét, amelyet metasztázisgátló aktivitása alapján "metastinnak" neveztek el. Ugyanebben az évben három biológiailag aktív, 54, 14, 13 és 10 aminosavat tartalmazó KiSS-1-származék peptidet izoláltak humán placentamintákból, amelyeket kisspeptin-54, -14, -13 és 10 névvel illettek. A kisspeptineket (KP-k) ezután a GPR54, egy árva G-fehérje kapcsolt receptor természetes ligandjaként azonosították, amely szerkezeti hasonlóságot mutat a galaninreceptorokkal. Miután 2001-ben deorfanizálták, a receptort kisspeptin-1 receptornak (Kiss1R) nevezték el. A kisspeptinek az RF amid neuropeptid család tagjaiként szintén kötődnek mindkét neuropeptid FF receptorhoz (NPFFR1 és NPFFR2) és aktiválják azokat.

A KP metasztázisellenes hatását fedezték fel először, majd később ezt számos daganattípusban, többek között melanoma, hólyag-, petefészek-, vastagbél-, hasnyálmirigy-, agyalapi mirigy-, prosztata-, emlő- és pajzsmirigyrákban igazolták.

Később fény derült arra, hogy a KP a reprodukív tengely fő szabályozója. A hipotalamikus KP neuronok nélkülözhetetlenek a pubertáshoz, és felelősek a gonadális szteroidoknak a gonadotropin szekrécióra gyakorolt pozitív és negatív feedback hatásának közvetítéséért is, így a menstruációs ciklust is szabályozzák. A KP azonban nemcsak a HPG tengelyt irányítja, hanem bizonyítottan kulcsszerepet játszik a szexuális viselkedés és a partnerpreferencia szabályozásában is. Az elmúlt években az is nyilvánvalóvá vált, hogy a KP jelátvitel befolyásolja az anyagcserét, az energiafelhasználást, a hőszabályozást és a kardiovaszkuláris működést is, valamint ezek reprodukív funkciókkal való integrációjában is szerepet játszik.

Az antiopioid rendszerként ismert RF-amid család részeként a KP lehetséges szerepét a fájdalomérzékelésben több tanulmány is felvetette. Nemrég a mi csoportunk is kimutatta, hogy a KP-13 lefelé tolja a fájdalomküszöböt, csökkenti a morfiúm analgetikus hatását, csökkenti a morfiúm-toleranciát, és mechanikai hiperszenzitivitást idéz elő egerekben.

A KP és a Kiss1R kifejeződése számos, a stresszben és a szorongásban szerepet játszó agyrégióban kimutatható patkányokban, beleértve a hypothalamust, az amygdalát, a hippocampust, a lateralis septumot, a stria terminalis ágymagját (BNST), a striatumot, a nucleus accumbens (NAc), a periaqueductalis szürkeállományt és a locus coeruleust. Ez alapján számos tanulmány vizsgálta a KP viselkedési és érzelmi hatásait.

A kisspeptin és a hypothalamus-hypophysis-mellékvese (HPA) tengely közötti kölcsönhatás először 2009-ben merült fel, amikor Kinsey-Jones és munkatársai felfedezték, hogy a stressz által kiváltott plazmakortikoszteron-emelkedés gátolja a hypothalamusban a kisspeptin jelátvitelt rágcslókban. Azóta a szakirodalomban ellentmondásos eredmények születtek a KP szorongásban betöltött szerepével kapcsolatban.

Egy paraventricularis magból származó sejtvonalban a KP-10 növelte az arginin-vazopresszín (AVP) és az oxitocin génextpresszióját, miközben gátolta a kortikotropinfelzabadó hormon (CRH) expresszióját. *In vivo* azonban nem volt hatással a HPA tengely aktivitására. Hasonlóképpen, a kisspeptin beadása nem befolyásolta a szorongást embereken sem egy klinikai kutatás során.

2013-ban csoportunk az intracerebroventrikulárisan (icv.) beadott KP-13 anxiogén hatásáról számolt be patkányokban. A KP-13 nemcsak a plazma kortikoszteronszintjének szignifikáns emelkedését idézte elő, hanem csökkentette a nyitott karokba való belépések számát és az ott töltött időt is a megemelt keresztpalló (elevated plus maze, EPM) tesztben. Ezenkívül serkentette a spontán lokomóciót, és a kezelés után több órán át tartó, testhőmérsékletet emelő hatása is volt. A kisspeptin szignalizáció anxiogén jellegét mutatták ki Delmas és munkatársai is: kísérleteikben a Kiss1r KO egerek több időt töltöttek a nyitott karokban az EPM tesztben, ami a szorongás csökkenésére utal.

Zebrahalakban azonban a centrálisan beadott kisspeptin szorongásoldó tendenciával járt együtt. Egy nemrégiben végzett vizsgálatban a Kiss1 neuronok szelektív aktiválása a posterodorsalis medialis amygdala (MePD) területén szignifikánsan fokozta a nyitott karok felfedezését a megemelt keresztpalló tesztben, ami ennek a neuronpopulációnak az anxiolitikus szerepére utal.

Az irodalomban közölt kétértelmű eredményekre több lehetséges magyarázat is létezik. Egyrészt a beadás módja meghatározó tényező lehet, mivel a KP perifériás beadása nem befolyásolta sem a HPA-tengely aktivitását patkányokban, sem a limbikus rendszer működését embereken, de a centrálisan bejuttatott KP-13 kifejezett anxiogén hatást fejtett ki patkányokban. Az is valószínű, hogy a Rao és munkatársai, illetve a Comminos és munkatársai által perifériásan alkalmazott dózisok túl alacsonyak voltak ahhoz, hogy anxiogén hatást fejtsenek ki. Hasonlóképpen, a MePD Kiss1 neuronok szelektív aktiválása egy különálló neuronpopuláció működésére utal, míg a központi kisspeptin kezelés általános központi hatást tükröz a Kiss1r-t kifejező neuronok aktiválása által az egész agyban. Másrészt a különbségek az ezekben a kísérletekben részt vevő fajok sokféleségének is tulajdoníthatók. A zebrahalak

kisspeptin-rendszere markánsan eltér az emlősökétől, ezért a zebrahalakon végzett vizsgálatok eredményeit némi fenntartással érdemes kezelnünk.

Egyes tanulmányok szerint a kisspeptin szerepet játszhat a lokomóció szabályozásában is. Az icv. beadott KP-13 nemcsak a spontán, hanem az exploratív mozgásaktivitást is serkentette hím Sprague-Dawley patkányokban. Ezekkel az eredményekkel összhangban Tolson és munkatársai azt találták, hogy a Kiss1r KO nőstény egereknél csökkent a mozgásaktivitás és az energiafelhasználás, ami elhízáshoz vezetett. Mivel a KP mérsékli a morfium hatását, és kifejeződik a NAc-ben, lehetséges, hogy részt vesz a mesocorticolimbicus dopaminerg rendszer szabályozásában, ami pedig modulálhatja a mozgásaktivitást.

## 2. Célkitűzés

Korábban beszámolt a csoportunk arról, hogy az icv. KP-13 kezelés HPA-tengely aktivációt és szorongásszerű viselkedést idézett elő patkányokban. Tanulmányunkban ezt a hatást kívántuk tovább vizsgálni, a CRF-re és az AVP-re összpontosítva, két olyan hormonnal, amelyek döntő szerepet játszanak a stresszre adott neuroendokrin és viselkedési válaszban. A KP-13-mal történő icv. kezelést követően elemeztük a *Crf*, *Crf1r*, *Crf2r*, *Avp*, *Avpr1a* és *Avpr1b* génexpresszióját, valamint a CRF és az AVP fehérjék expresszióját az amygdalában és a hippocampusban. Ezeket a régiókat a szorongás pathomechanizmusában betöltött jól ismert szerepük alapján választottuk ki, valamint azért, mert a KP és a KISS1R, valamint a CRF és az AVP expressziója mind az amygdalában, mind a hippocampusban kimutatható. Ezért először arra kerestük a választ, hogy a KP-13 kezelés modulálja-e a CRF- és AVP-rendszert ezekben a régiókban a gén- és fehérjeexpresszió szintjén. Ezután azt kívántuk felmérni, hogy az AVP és a CRF hogyan járul hozzá a KP-13 HPA-tengelyt stimuláló és anxiogén hatásához. A nem-szelektív CRF- és AVP-antagonistákkal történő előkezelést követően komputerizált nyílt tér (open field) tesztet végeztünk az állatok viselkedésének vizsgálatára, és törzsvér mintákból meghatároztuk a kortikoszteronkoncentrációt.

Napjainkban egyre több tanulmány foglalkozik a kisspeptin analógokkal és antagonistákkal, mivel felmerült a potenciális terápiás felhasználásuk nőgyógyászati betegségekből, például infertilitásban, policisztás ovárium szindrómában és pubertas praecoxban. A molekuláris dokkolási vizsgálatok szerint a KP-10 ASN4, SER5, GLY7, ARG9 és PHE10 aminosavai vesznek részt a Kiss1r-ral való hidrogénkötések kialakításában. Következésképpen az ezeket az aminosavakat tartalmazó rövidebb fragmentumok is képesek lehetnek a receptor megkötésére és aktiválására. Célunk tehát az volt, hogy megvizsgáljuk a Kisspeptin-8 (KP-8), egy 8 aminosav hosszúságú, az Orvosi Vegytani Intézet által szintetizált

KP-fragmentum hatását. A KP-8-cal végzett kísérleteink célja az volt, hogy megállapítsuk, vajon a KP-13-hoz hasonló viselkedésbeli változásokat és HPA-tengely aktivációt vált-e ki, valamint hogy képes-e aktiválni a KISS1R-t, a kisspeptinek kanonikus receptorát is. A KP-8-cal történő icv. kezelést követően a viselkedési hatásokat a megemelt keresztpalló, komputerezált nyílt tér és üveggolyó elásási tesztek segítségével vizsgáltuk. Meghatároztuk a szérum kortikoszteron- és luteinizáló hormonszintet is. A kortikoszteron emelkedése a HPA-tengely aktiválódását mutatja, míg az LH-szint emelkedése a KISS1R aktiválódásának közvetett jeleként értelmezhető. Az első viselkedéses eredmények (a dolgozat későbbi részében leírtak szerint) a ventralis tegmentalis area (VTA) – nucleus accumbens (NAc) dopaminerg pálya lehetséges részvételére utaltak a KP-8 viselkedési hatásaiban. Ez a pálya leginkább a jutalmazásban és az addikcióban betöltött szerepéről ismert, de részt vesz a mozgásaktivitás modulációjában is. *Ex vivo* szuperfúziót segítségével mértük a VTA-ból és a NAc-ből történő dopaminfelszabadulást, valamint a NAc-ből történő GABA felszabadulást KP-8 hatására.

### **3. Anyagok és módszerek**

#### **3.1. Állatok és tartási körülmények**

A kísérletekhez felnőtt, 6-8 hetes, 150-250 g tömegű, hím Wistar patkányokat (Domaszék, Csongrád, Magyarország) használtunk. Az állatokat ellenőrzött körülmények között, állandó szobahőmérsékleten, 12-12 órás sötét-világos ciklusban (reggel 6:00 órától világos) tartottuk. A patkányok szabadon hozzáférhettek a kereskedelmi forgalomban kapható táphoz és csapvízhez. Az állatok tartása és kezelése a kísérletek során a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának utasításai szerint, a jóváhagyásukkal történt. A kísérletek elvégzését a Csongrád Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Főosztálya engedélyezte (szám: X./1207/2018, kelt: 2018. július 6.). Minden állatot csak egy kísérlethez használtunk fel.

#### **3.2. Intracerebroventrikuláris kanülálás**

Az állatoknak a műtét előtt 1 hetet hagytunk az akklimatizálódásra. Rozsdamentes acél (10 mm hosszú) Luer-kanült ültettünk be a jobb lateralis agykamrába nátrium-pentobarbitállal végzett altatásban (Euthasol, Phylaxia-Sanofi, 35 mg/kg, ip.), a következő sztereotaxiás koordináták szerint: 0,2 mm-re a bregmától hátrafelé és 1,7 mm-re oldalra, valamint 3,7 mm mélyen a duralis felszíntől. A kanült fogászati cementtel és akriláttal rögzítettük a koponyához. A kísérleteket 1 hetes regenerálódási időszak után kezdtük el. Minden kísérletet reggel 8:00 és 10:00 óra között végeztünk. A kísérletek végén ellenőriztük a kanül megfelelő helyzetét és áteresztőképességét.



### 3.3. Peptidszintézis

A KP-8 (WNSFGLRF-NH<sub>2</sub>) szintézise Rink Amide MBHA gyantán (Bachem, Bubendorf, Svájc, subst.: 0,52 mmol/g) történt Na-9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) védett aminosavak (IRIS Biotech GmbH, Marktrechwitz, Németország) felhasználásával manuális szilárd fázisú peptidszintézissel az Orvosi Vegytani Intézet (Szegedi Tudományegyetem) által.

### 3.4. Icv. kezelés

A patkányok különböző dózisú KP-13-mal (Bachem Ltd., Svájc) vagy KP-8-cal (az Orvosi Vegytani Intézet által szintetizált) kezeltük, a peptideket 0,9%-os sóoldatban oldottuk, 2 µl térfogatban 30 mp alatt Hamilton mikrofecskendővel adtuk be, az állatok immobilizációját elkerülve a kezelés során. A KP-8-cal végzett vizsgálatainkban 0,1 vagy 1 µg dózist alkalmaztunk. A KP-13-mal végzett nyílt tér tesztben 0,5, 1 és 2 µg KP-13 dózisokat adtunk be, az antagonistákkal végzett kísérletek esetén a KP-13 leghatékonyabb dózisát (1 µg) alkalmaztuk, amelyet korábbi kísérleteink és az open field vizsgálat alapján választottunk ki. Az antagonistista kezelést 30 perccel a KP-13 beadása előtt végeztük. A következő antagonistákat alkalmaztuk: α-helikális CRF(9-41) (Bachem Ltd., Svájc), egy nem szelektív CRFR blokkoló 1 µg-os dózisban, illetve és egy V1R antagonistista (Bachem Ltd., Svájc) 0,1 µg-os dózisban. Az antagonisták dózisát korábbi dózis-válasz vizsgálatok alapján választottuk ki, amelyek során az anyagok önmagukban nem voltak hatással a vizsgált paraméterekre. A kontroll állatok csak sóoldatot kaptak. A KP-13 vagy KP-8 beadása után az állatokat különböző időpontokban feláldoztuk (15 perc: LH mérés; 30 perc: kortikoszteron mérés; 2 óra: génexpresszió; 4 óra: fehérjeexpresszió), vagy viselkedési teszteknek vetettük alá.

### 3.5. Viselkedési vizsgálatok

#### 3.5.1. *Megemelt keresztpalló (elevated plus maze - EPM) teszt*

30 perccel az icv. kezelés után a patkányokat az egyik nyitott karral szemben a labirintusba helyeztük, majd viselkedésüket egy, az EPM fölé függesztett kamera rögzítette 5 percen át. Az egyes karokban eltöltött időt, valamint a karonkénti belépések számát egy, a kísérleti csoportok szempontjából vak megfigyelő regisztrálta. A nyitott karokba való belépések százalékos arányát és a nyitott karokban töltött idő százalékos arányát is kiszámítottuk.

#### 3.5.2. *Komputerizált nyílt tér (open field - OF) teszt*

A patkányok újdonság által kiváltott mozgásaktivitását a Conducta 1.0 rendszer (Experimetria Kft., Budapest, Magyarország) segítségével vizsgáltuk. Az icv. kezelés után 30 perccel a patkányokat a doboz közepére helyeztük, és viselkedésüket a Conducta számítógépes program 5 percig (KP-13) vagy 60 percig (KP-8) rögzítette. A kísérlet során hat viselkedési

paramétert mértünk: a mozgással töltött teljes időt és megtett távolságot, az immobilitás idejét, az ágaskodások (függőleges mozgás) számát, a centrális zónában (24×24 cm-es központi terület) töltött időt és az ott megtett távolságot. Ezenkívül a nyers adatokból kiszámítottuk a centrális mozgással töltött idő/teljes mozgással töltött idő %-os arányát és a centrális távolság/összes távolság %-os arányát.

### 3.5.3. *Üveggolyó elásás (marble burying - MB) teszt*

Az MB rendszeresen használt paradigma a szorongásszerű és kényszeres viselkedés értékelésére. Protokollunk a Schneider és Popik által leírt módszerre épült. Az állatokat kivettük a saját ketrecükből, majd a ketrecet előkészítettük a kísérlethez az alom mélységének 5 cm-re való növelésével. A KP-8-cal vagy fiziológiás sóoldattal történő icv. kezelést követően az egyik állatot 30 percre visszahelyeztük a saját ketrecbe, hogy akklimatizálódjon. Ezután 9 db 2,5 cm átmérőjű üveggolyót helyeztünk el 3 sorban a ketrec rövidebbik fala mentén. A kísérletet 10 percig végeztük, és a ketrec fölött elhelyezett videokamerával rögzítettük. Ezután az állatot kivettük a ketrecből, és megszámláltuk az eltemetett (>50%-ban alommal fedett) üveggolyók számát. A golyókkal való kétféle célorientált interakció (a golyók elásása és a golyók mozgatása elásás nélkül) számát és időtartamát értékeltük.

## 3.6. ELISA

Az állatokat a szérum kortikoszteron és fehérje mérés céljából 30 perccel, illetve az LH mérése céljából 15 perccel a KP-8-cal vagy sóoldattal történő icv. kezelés után dekapitáltuk. A törzsvért kémcsövekbe gyűjtöttük, 30 percig szobahőmérsékleten alvadni hagytuk, majd 10 percig 3500 rpm-en centrifugáltuk. A mintákat -80°C-on tároltuk. Az amygdala és hippocampus AVP és CRF tartalmának méréséhez az állatokat 4 órával az icv. kezelés után dekapitáltuk, a régiókat a 3.8 pontban leírtak szerint izoláltuk, majd a mintákat Eppendorfkba helyezve, folyékony nitrogénnel fagyasztottuk, majd -80°C-on tároltuk. A szérum kortikoszteron-koncentrációt kompetitív kortikoszteron ELISA-kittel (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) mértük a gyártó utasításainak megfelelően. A szérum LH-koncentrációt szendvics LH ELISA-kittel (Wuhan Xinquidi Biological Technology Co., Wuhan, Kína) határoztuk meg a gyártó utasításainak megfelelően. A CRF és AVP meghatározását kompetitív ELISA kitekkel (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, USA; EK-019-06, EK-065-07) végeztük. A Pierce Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit-et (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtuk a gyártó utasításainak megfelelően a szérum teljes fehérjekoncentrációjának mérésére. Az abszorbanciát 595 nm-en mértük NanoDrop OneC mikroméretű spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

### 3.7. *Ex vivo* szuperfúzió

Az *ex vivo* szuperfúzió előtt az állatokon nem végeztünk icv. kanulálást. A patkányokat gyorsan dekapitáltuk, és agyukat kiemeltük a koponyából. A boncolást agymátrix, szövetylukasztó és borotvapengék segítségével foszfát-pufferelt sóoldattal nedvesített szűrőpapíron, jéggel töltött Petri-csésze tetején végeztük. A NAc-t mindkét oldalról eltávolítottuk, a Heffner által leírt izolálási módszer szerint. A VTA-t a Salvatore és munkatársai által leírt módon izoláltuk. A szövetet 300µm-es szeletekre vágtuk, és 30 percig inkubáltuk 5 ml Krebs-oldatban (Reanal, Magyarország), amelyet karbogén gázzal (5% CO<sub>2</sub> és 95% O<sub>2</sub>) buborékoltattunk. Ezután 5µL [3H] GABA-t (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) adtunk a NAc-hez, és 5µL [3H] Dopamint (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) adtunk a VTA-hoz vagy a NAc-hez. Ezt követően a szeleteket egyenletesen szétosztva áthelyeztük a szuperfúziós rendszer (Experimetria Kft., Budapest, Magyarország) négy kamrájába, és testhőmérsékleten (37°C) megkezdtük a szuperfúziót karbogénnal buborékoltatott Krebs-oldattal. Egy perisztaltikus pumpával (Minipuls 2, Gilson, Middleton, WI, USA) 227, 7 µL/perc állandó áramlási sebességet tartottunk fenn. A 30 perces szuperfúzió után a szuperfuzátumokat Eppendorfokba kezdtük gyűjteni egy többszörös frakciógyűjtővel (FC 203B, Gilson, Middleton, WI, USA). A frakciókat 32 percen keresztül, kétpercenként gyűjtöttük. A 6. percben 1 µg KP-8-at 1 ml Krebs-oldatban feloldva közvetlenül a kamrákba adtunk. A frakciógyűjtés 12. percétől kezdve két percen keresztül négyszögimpulzusokkal elektromos stimulációt végeztünk (ST-02 elektromos stimulátor, Experimetria Kft., Budapest, Magyarország). Ezután az egyes kamrákból származó szövetet 600 µL Krebs-oldatot tartalmazó főzőpohárba helyeztük ultrahangos homogenizáláshoz (Branson Sonifier 250, Emerson Electric Co., St. Louis, MO, USA). Ezt követően 3 ml Ultima Gold szcintillációs kóktélt (Perkin-Elmer Inc., Waltham, MA, USA) pipettáztunk 4-szer 17 szcintillációs fiolába. Ezt követően a 16 összegyűjtött frakcióból és a hozzájuk tartozó kamrából származó szövetszuszpenzióból 200 µL-t adtunk az üvegcékhez. A mintákat 30 percig mechanikusan homogenizáltuk. A minták radioaktivitását folyadékszcintillációs spektrométerrel (Tri-carb 2100 TR, Hewlett-Packard Inc., Palo Alto, CA, USA) detektáltuk. A frakcionált dopamin- vagy GABA-felszabadulást (FR) a percenkénti számlálásokból (counts per minute, CPM) számoltuk ki az alábbi egyenlet szerint, amelyben az *i* a frakció számát jelöli és *n* = 16. A CPM<sub>17</sub> a frakcióhoz tartozó homogenizált szövetminta CPM-jét jelenti:

$$FR_i = 100 \cdot \frac{CPM_i}{4 \cdot CPM_{17} + \sum_{i=1}^n CPM_i}$$

### 3.8. Génexpresszió

Két órával az icv. KP-13 kezelés után az állatokat dekapitáltuk. Az agy izolálása után előhűtött felnőtt patkány agymátrixszal (Ted Pella Inc., Redding, CA, USA) végeztük a boncolást. Az agyakat előhűtött borotvapengével kézzel (1 mm vastag) koronális metszetekre szeltük, majd az amygdalából és a hippocampusból 1 mm átmérőjű szövetmintákat vettünk szövetlyukasztóval (Ted Pella Inc., Redding, CA, USA), és azokat 1 ml TRIzol reagenst (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) tartalmazó Eppendorffokba helyeztük. A szövetmintákat azonnal lefagyasztottuk és -80 °C-on tároltuk. A mintákat ultrahangos homogenizátorral jégen homogenizáltuk, majd a TRIzol extrakciós protokoll, majd a GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével a gyártó utasításainak megfelelően kivontuk a teljes RNS-t. A kivont RNS minőségét és mennyiségét NanoDrop OneC spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) határoztuk meg. cDNS-t szintetizáltunk legalább 100 ng teljes RNS-ből a Maxima First Strand cDNS Synthesis Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével a gyártó utasításai szerint. SybrGreen technológián alapuló valós idejű kvantitatív PCR-t (CFX96 BioRad) használtunk a cél mRNS-ek (*Crf*, *Crf1r*, *Crf2r*, *Avp*, *Avpr1a*, *Avpr1b*, valamint a *Gapdh* háztartási gén) relatív mennyiségének számszerűsítésére. Specifikus exonokon átívelő génexpressziós próbákat használtunk (*Avp*: forward: CTG ACA TGG AGC TGA GAC AGT, reverse: CGC AGC TCT CGT CGC T; *Avpr1a*: forward: TGG ACC GAT TCA GAA AAC CCT, reverse: GTT GGG CTC CGG TTG TTA GA; *Avpr1b*: forward: CAG CAT AGG AGC CAA CCA TCA A, reverse: GAA AGC CCA GCT AAG CCG T; *Crf*: forward: TGG TGT GGA GAA ACT CAG AGC, reverse: CAT GTT AGG GGC GCT CTC TTC; *Crf1r*: forward: CGA AGA GAA GAA GAG CAA AGT ACA C, reverse: GCG TAG GAT GAA AGC CGA GA; *Crf2r*: forward: CCC GAA GGT CCC TAC TCC TA, reverse: CTG CTT GTC ATC CAA AAT GGG T; *Gapdh*: forward: CGG CCA AAT CTG AGG CAA GA, reverse: TTT TGT GAT GCG TGT GTA GCG). Protokoll: (50°C, 2 perc), 1x kezdeti denaturálás (95°C, 10 perc), 40x denaturálás (95°C, 15 s), kapcsolódás (60°C, 30 s), meghosszabbítás (72°C, 30 s). Kontrollként cDNS nélküli reakcióelegyet használtunk. Minden mintát duplikátumban futtattunk. Az egyes mRNS-ek arányát a *Gapdh* háztartási génhez viszonyítva a  $2^{-\Delta\Delta CT}$  módszerrel számoltuk ki.

### 3.9. Statisztika

A statisztikai analízist és grafikonszerkesztést az SPSS (KP-13) és GraphPad Prism 8 (KP-8) programokkal végeztük. A 0,05-nél kisebb valószínűségi szintet fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

## 4. Eredmények

### 4.1. Kísérletek KP-13-mal

#### 4.1.1. *Génexpresszió*

Az *Avp*, *Avpr1a*, *Avpr1b*, *Crf*, *Crfr1* és *Crfr2* gének relatív expresszióját a *Gapdh*-hoz viszonyítva számítottuk ki, és Mann-Whitney-tesztel elemeztük.

Az amygdalában az *Avp* és az *Avpr1b* mRNS-expressziója jelentősen nőtt, míg a *Crf* expressziója csökkent a kontrollcsoporthoz képest. Az *Avpr1a*, *Crfr1* és *Crfr2* esetében nem találtunk szignifikáns eltérést. A hippocampusban a *Crf* relatív génexpressziója szignifikánsan fokozódott a KP-13-kezelt csoportban, az *Avpr1a* mRNS-expressziója viszont jelentősen csökkent. Az *Avpr1b*, *Avp*, *Crfr1* és *Crfr2* esetében nem észleltünk szignifikáns különbséget.

#### 4.1.2. *Proteinexpresszió*

Az AVP fehérje esetén a kétfaktoros ANOVA a kezelési faktor és a régió faktor szignifikáns fő hatását mutatta ki. A két faktor között nem volt szignifikáns kölcsönhatás, tehát a különböző kezelések hatása nem függ attól, hogy melyik régióról van szó. A páros összehasonlítások azt mutatták, hogy a KP-13 kezelés szignifikáns növekedést okozott az AVP fehérjeszintjében az amygdala területén, azonban a hippocampusban nem volt hatása.

A CRF fehérjetartalomra vonatkozó kétfaktoros ANOVA szignifikáns főhatást mutatott a régió faktor esetében, azonban a kezelés faktor esetében nem találtunk szignifikáns főhatást. A KP-13 kezelés tehát nem befolyásolta a CRF fehérjetartalmat.

#### 4.1.3. *Plazma kortikoszteron*

Kétutas ANOVA-t végeztünk a KP-13 kezelés és az antagonistá kezelési hatásának értékelésére a kortikoszteron koncentrációra. Eredményeink statisztikailag szignifikáns főhatást mutattak a KP-13 kezelésre és statisztikailag szignifikáns kölcsönhatást a két tényező között, tehát a KP-13 hatása az antagonistá előkezeléstől függ. Az antagonistá kezelési faktor esetében nem volt szignifikáns főhatás. A páros összehasonlítások azt mutatták, hogy a KP-13 kezelés a kortikoszteron-koncentrációt jelentősen emelte a sóoldattal kezelt csoporthoz képest. Továbbá a KP-13-mal kezelt állatok között mind a CRFR-antagonista, mind a V1R-antagonista előkezelési szignifikáns különbséget okozott.

#### 4.1.4. *A KP-13 hatása aviselkedésre nyílt tér tesztben*

Egyváltozós ANOVA-t használtunk a KP-13 kezelési hatásának vizsgálatára az OF paraméterekre: a teljes mozgási távolságra és időre, az immobilitási időre, az ágaskodásra, a centrális távolságra és időre, és végül a centrális távolság/teljes távolságra% és a centrális idő/teljes idő%-ra. Eredményeink szerint a KP-13 nem volt szignifikáns hatással a teljes megtett

távolságra és a teljes mozgással töltött időre. Az immobilitási idő növekvő tendenciát mutatott a KP-13 hatására, a KP-13 2 µg-os dózisa szignifikánsan növelte az immobilitást a kontrollhoz képest. A KP-13 szignifikáns hatással volt az ágaskodásra is. Ismét a KP-13 2 µg-os dózisa volt a leghatékonyabb.

A centrális távolság esetében a homogenitás tesztje nem teljesült, ezért nem-parametrikus ANOVA-t (Kruskal-Wallis) végeztünk, amelyet Dunn-teszt követett a többszörös összehasonlításokhoz. Az eredmények azt mutatták, hogy a KP-13 kezelés szignifikánsan csökkentette a centrálisan megtett távolságot. A Bonferroni korrekcióval végzett páros összehasonlítások alapján mind az 1 µg, mind a 2 µg KP-13 szignifikánsan csökkentette az OF-aréna közepén megtett távolságot. A KP-13 szignifikáns hatással volt a centrálisan eltöltött időre. A páros összehasonlítások azt mutatták, hogy az 1 µg és 2 µg-os dózisos egyaránt szignifikánsan csökkentették az aréna közepén töltött időt. A KP-13 szignifikáns csökkenést idézett elő a centrális távolság/összes távolság%-ban is, a páros összehasonlítások alapján mind az 1 µg, mind a 2 µg KP-13 szignifikáns volt. A centrális idő/teljes ambulációs idő% esetében az eredmény hasonló volt, mind az 1 µg-os, mind a 2 µg-os dózis szignifikánsnak bizonyult.

#### **4.1.5. A VIR és CRFR antagonisták hatása a KP-13 által kiváltott viselkedésre OF tesztben**

Kétutas ANOVA-val vizsgáltuk a KP-13 kezelés hatását CRFR és VIR antagonisták előkezelés jelenlétében az OF paraméterekre. Nem volt szignifikáns változás a megtett távolságban és az ambulációs időben. Az immobilitási idő esetében szignifikáns főhatást kaptunk a kezelési faktor esetében, de az antagonisták kezelése vagy a két faktor interakciója esetén nem. A páros összehasonlítás nem mutatott szignifikáns különbséget a csoportok között. Az ágaskodásban nem volt szignifikáns eltérés.

A centrális távolság esetében statisztikailag szignifikáns főhatást figyeltünk meg a KP-13 kezelésre, de az antagonisták kezelése faktorra vagy a két faktor közötti kölcsönhatásra nem. A páros összehasonlítások alapján a KP-13 kezelés után 30 perccel a centrális ambulációs távolság szignifikánsan csökkent a sóoldattal kezelt csoporthoz képest. A KP-13-mal kezelt állatokban a CRFR antagonisták előkezelés nem okozott szignifikáns különbséget, a VIR antagonisták előkezelés azonban statisztikailag szignifikáns eltérést mutatott.

A centrális idő tekintetében a KP-13 kezelésnek a centrális távolsághoz hasonlóan statisztikailag szignifikáns főhatása volt, de az antagonisták kezelése faktorának vagy a két faktor közötti kölcsönhatásnak nem volt statisztikailag szignifikáns főhatása. A páros összehasonlítások alapján a KP-13 kezelés hatására a centrális idő szignifikánsan csökkent. A

KP-13-mal kezelt állatok között a V1R antagonistá előkezelés statisztikailag szignifikáns eltérést idézett elő, a CRFR antagonistá előkezelés hatása azonban nem volt szignifikáns.

A centrális távolság/összes távolság% esetében a KP-13 kezelés főhatása szignifikánsnak bizonyult, azonban az antagonistá kezelés és a két faktor közötti kölcsönhatás esetében nem mutatkozott szignifikáns főhatás. A páros összehasonlítás szerint a KP-13 jelentősen csökkentette a centrális távolság/teljes távolság%-ot, és a KP-13-kezelt állatokban a V1R antagonistá gátolta a centrális távolság/teljes távolság% KP-13 által kiváltott csökkenését, a CRFR antagonistá azonban nem enyhítette a KP-13 hatását. A centrális idő/teljes ambulációs idő%-ra vonatkozó eredményeink meglehetősen hasonlóak voltak, mivel statisztikailag szignifikáns főhatást észleltünk a KP-13 kezelés esetében, de nem találtunk hatást az antagonistá kezelés vagy a kölcsönhatás esetében. A páros összehasonlítás azt mutatta, hogy a KP-13 szignifikáns csökkenést idézett elő a centrális idő/teljes ambulációs idő%-ban. Továbbá, a V1R antagonistá szignifikánsan csökkentette a centrális idő/teljes ambulációs idő% KP-13 által kiváltott csökkenését, míg a CRFR antagonistá kezelés hatása nem volt szignifikáns.

## **4.2. Kísérletek KP-8-cal**

### **4.2.1. Megemelt keresztállás (EPM) teszt**

A KP-8 0,1 µg-os dózisa jelentősen csökkentette a nyitott karokba való belépések százalékos arányát, valamint a nyitott karokban töltött idő százalékos arányát. A karokba való belépések teljes számának csökkenését mind a 0,1 µg, mind az 1 µg KP-8 előidézte. A csoportok között nem volt szignifikáns különbség a karokban töltött teljes idő tekintetében.

### **4.2.2. Komputerezált nyílt tér (OF) teszt**

A 60 perces összesített eredmények nem mutattak jelentős változást a viselkedésben.

Az egyes 5 perces intervallumok elemzését követően azonban szignifikáns különbségeket találtunk. Az arénában megtett távolságra a kétfaktoros RM-ANOVA az időfaktor szignifikáns főhatását mutatta ki. Az első öt percben tapasztalt csúcsot követően az ambulációs távolság meredeken csökkent, amíg 30 perc körül el nem érte az alap mozgási aktivitás alacsonyabb szintjét. Az 50-55. és az 55-60. percben megtett távolság az 1 µg KP-8 csoportban alacsonyabb volt, mint a kontrollcsoportban. A teljes ambulációs idő tekintetében az időtényező szignifikáns főhatást mutatott, az előbbihez hasonló meredek, majd enyhe csökkenéssel. Az 1 µg KP-8 csoport az 50-55 percnél és 55-60 percnél is kevesebb időt töltött mozgással, mint a kontrollcsoport. Az immobilitásban a kétutas ANOVA szignifikáns főhatást mutatott az időtényező és a kölcsönhatás esetén. Az immobilitással töltött idő a kísérlet során

növekedett, és a tendencia az ambulációs távolság és idő reciproka volt. A kontrollhoz képest az 1 µg-os KP-8 dózis szignifikánsan növelte az immobilitást 50-55 és 55-60 percnél.

Az ágaskodások számát figyelembe véve szignifikáns főhatást észleltünk az időtényezőre, valamint szignifikáns kölcsönhatást az idő és a kezelés között. A csoportok között 30 perc után kezdett markáns különbség mutatkozni. Az 1 µg KP-8 csoportban 30-35 percnél, 40-45 percnél, 50-55 percnél és 55-60 percnél szignifikánsan csökkent az ágaskodások száma.

Miután kiszámítottuk az átlagos sebességet az egyes időtartamokra, az időtényező és a kölcsönhatás szignifikáns főhatása volt látható. A kezelési csoportok között nem volt szignifikáns különbség az 55. percig, amikor az 1 µg KP-8 csoport sebessége csökkent.

A centrális ambulációs távolság százalékos arányát úgy számoltuk ki, hogy az aréna központi zónájában megtett távolságot elosztottuk a teljes megtett úttal és megszoroztuk 100-zal. Az időtényező, valamint az idő és a kezelés közötti kölcsönhatás egyaránt szignifikánsan hozzájárult az eltéréshez, de a csoportok között nem volt különbség, kivéve az első 5 percet, amikor az 1 µg KP-8 csoport centrálisan nagyobb távot tett meg, mint a kontrollcsoport. A centrális ambulációs idő százalékos arányát a centrális idő és a teljes ambulációs idő arányának 100-zal való megszorozásával számították ki. Szignifikáns főhatás mutatkozott az időtényezőre és a kölcsönhatásra. Az első 5 percben az 1 µg KP-8 csoport centrális ideje szignifikánsan meghaladta a kontrollcsoportét, egyébként nem volt különbség a csoportok között.

#### **4.2.3. Üveggolyó elásási (marble burying) teszt**

A csoportok között nem volt jelentős különbség az elásott golyók számában. Kétféle, a golyókkal való célorientált interakciót különböztettük meg: a golyók elásását és mozgatását.

A golyó elásása olyan interakció, amely a golyók körüli ásással jár, aminek eredményeképpen a golyókat alomanyag borítja. Sem az üveggolyó-ásási tevékenységek száma, sem az időtartama nem változott szignifikánsan a kezelés hatására, bár megfigyelhető volt egy csökkenő tendencia az üveggolyó-ásásban. A üveggolyó mozgatás a golyók gurításával, a mellső lábakkal történő mozgatásával jár, anélkül, hogy az állatok beborítanák azokat az alommal. A golyók elásásához hasonlóan, a csoportok között nem volt szignifikáns különbség a mozgatások számában és időtartamában, bár a KP-8-mal kezelt csoportokban a golyómozgatás csökkenő tendenciát mutatott. A kétféle interakciót összesítve, az 1 µg KP-8 csoport szignifikánsan kevesebbszer lépett interakcióba a golyókkal, és kevesebb időt töltött célorientált interakciókkal, mint a kontrollcsoport.

#### **4.2.4. Szérum kortikoszteron, LH és teljes fehérje**



Az egyutas ANOVA a KP-8 kezelés szignifikáns hatását mutatta mind a kortikoszteron, mind az LH koncentrációra. A szérumszint kortikoszteron-koncentráció erőteljes növekedését észleltük 30 perccel az 1 µg KP-8-mal történő icv. kezelés után. A 0,1 µg-os dózis emelte a kortikoszteronszintet, de a változás nem volt szignifikáns. Az 1 µg-os KP-8 dózis 15 perccel a kezelés után szintén megemelte a szérumszint LH-koncentrációt, de a 0,1 µg-os dózissal nem volt hatása. A szérumszintje-koncentrációban nem volt különbség a csoportok között.

#### **4.2.5. Ex vivo szuperfúzió**

A VTA-ból történő frakcionált dopaminfelszabadulás esetében a p-értéket nem számítottuk ki az időtényezőre. Nem volt szignifikáns főhatás sem a kezelési tényezőre, sem a kezelés és az idő közötti kölcsönhatásra. A csoportok között semmilyen időpontban nem volt szignifikáns különbség. Hasonlóképpen, a KP-8 nem befolyásolta a frakcionált dopaminfelszabadulást a NAc-ből. Az időtényező esetében azonban szignifikáns főhatás mutatkozott. Nem találtunk szignifikáns főhatást a kezelési tényezőre, valamint a kezelés és az idő közötti kölcsönhatásra. A csoportok között egyetlen konkrét időpontban sem lehetett szignifikáns különbséget kimutatni. A KP-8 azonban növelte a frakcionált GABA felszabadulást a NAc-ből. Szignifikáns főhatás volt az idő és a kölcsönhatás faktorok esetében. A hetedik frakcióban, az elektromos ingerlést követően a frakcionált GABA felszabadulás szignifikánsan magasabb volt a KP-8-mal kezelt agyszeletekből, mint a kontrollszövetből.

## **5. Összefoglalás**

A disszertáció célja az volt, hogy bemutassuk az újonnan publikált adatainkat a kisspeptinek lehetséges hatásáról a HPA tengelyre, a szorongással kapcsolatos viselkedésre és a mozgásaktivitásra. A kisspeptin a Kiss1 gén terméke, és négy biológiailag aktív formában van jelen, amelyek 54, 14, 13 és 10 aminosavból állnak. Ezek különböző affinitással tudnak kötődni a saját receptoraikhoz, a KISS1R vagy az NPF1R receptorokhoz. A kisspeptinnek jól ismert a reprodukciós tengely fő központi szabályozójaként betöltött szerepe, a disztribúciós adatok azonban szélesebb körű funkciót sugalltak. Ezért csoportunk korábban vizsgálta a centrálisan beadott KP-13 lehetséges hatását a HPA tengely aktivitására és a szorongásszerű viselkedésre patkányokban. Azt találtuk, hogy a KP-13 megnövelte a patkányok kortikoszteronszintjét, és szorongást váltott ki az EPM tesztben és az OF tesztben. Ezután azt kívántuk megvizsgálni, hogy a KP-13 hogyan befolyásolhatja a HPA-tengelyt és a stresszel kapcsolatos viselkedést. Feltételeztük, hogy a KP-13 megváltoztathatja a CRF, az AVP és a receptoraik expresszióját, amelyek a HPA tengely fő központi szabályozói, és a szorongás közvetítésében betöltött szerepük jól ismert. Két olyan agyrégióra koncentráltunk, ahol a kisspeptin és a Kiss1r is

kimutatható, ezek az amygdala és a hippocampus. Azt is megvizsgáltuk, hogy a kisspeptinnel kezelt állatok OF-ben való viselkedése és kortikoszteronválasza hogyan változik CRF- vagy V1-receptor-antagonistákkal történő előkezelés hatására. Továbbá azt is igyekeztünk feltárni, hogy egy N-terminálisan csonkított, 8 aminosav hosszúságú KP fragmentum, a KP-8 megőrzi-e a KP-13-hoz hasonlóan a HPA tengelyre és a patkányok viselkedésére gyakorolt hatást.

Eredményeink azt mutatták, hogy a KP-13 a jelek szerint régiófüggő módon változtatja meg az *Avp*, a *Crf* és receptoraik expresszióját. Az amygdalában a KP-13 az *Avp* és az *Avpr1b* upregulációját indukálta, és downregulálta a *Crf* expresszióját. A hippocampusban a KP-13 a *Crf* mRNS-szintjének növekedését és az *Avpr1a* mRNS-szintjének csökkenését idézte elő. Az amygdalában az AVP fehérjetartalmának jelentős emelkedését is észleltük. Továbbá a KP-13 szorongásszerű viselkedést váltott ki az OF tesztben, amelyet a V1R blokkoló antagonizált. Továbbá mind a CRFR, mind a V1R antagonisták csökkentették a plazma kortikoszteronszint KP-13 által kiváltott emelkedését. Mindezek az adatok arra utalnak, hogy a KP-13 befolyásolhatja az AVP és a CRF jelátviteli útvonalakat, és ez lehet felelős a HPA tengelyre és a szorongásszerű viselkedésre gyakorolt hatásáért.

A KP-8 szintén aktiválta a HPA-tengelyt és a KP-13-hoz hasonlóan szorongásszerű viselkedést váltott ki patkányokban. A lokomócióra azonban ellentétes irányban hatott, azaz a KP-8 szupprimálta a mozgásaktivitást, míg a KP-13 a spontán lokomóciót fokozta. Ennek az ellentmondásnak a hátterében a Kiss1R és NPF1R receptorokhoz való eltérő affinitást, a VTA-NAc dopaminerg kör modulációját, valamint az anyagcserére és a hőszabályozásra gyakorolt hatást tételeztük fel. E lehetőségek vizsgálatához elengedhetetlen néhány kísérlet elvégzése antagonistákkal előkezeléssel, például p234 (Kiss1R antagonistákkal) és GJ14 (NPF1R antagonistákkal) használatával. Továbbá érdemes telemetriát is végezni a spontán mozgás csökkenésének megerősítésére és testhőmérsékleti adatok gyűjtésére. Korábbi vizsgálatainkban a KP-13 a testhőmérsékletet átmenetileg emelte, ami lehet a fokozott mozgásaktivitáshoz kapcsolódó jelenség, vagy más, aktivitástól független mechanizmus, például a barna zsírszövetben a didergéssel nem járó termogenezis, eredménye. Ki kell derítenünk, hogy a KP-8 befolyásolja-e a testhőmérsékletet, esetleg a lokomócióval együtt. Végül a VTA-NAc-körben bekövetkező változásokat gén- és fehérjeexpressziós vizsgálatokkal érdemes tovább vizsgálnunk.

Összefoglalva, a KP jelátvitel aktiválása patkányokban szorongást okozott, amelyet a kortikoszteron emelkedése kísért, amit a CRF és az AVP rendszerek megváltozott expressziója közvetíthet az amygdalában és a hippocampusban. A KP-8, a KP-13 szintetikus származéka, megtartotta a HPA tengely aktiválásának és a szorongás kiváltásának képességét, de a KP-13-

mal ellentétben gátolta a lokomóciót, valószínűleg a VTA-NAc körre gyakorolt, NPFRR-mediált hatáson keresztül. Azonban további vizsgálatokra van szükség a kisspeptinek pontos hatásmechanizmusának megerősítéséhez.

## **6. Köszönetnyilvánítás**

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Csabafi Krisztinának, aki kiváló mentorom volt harmadéves orvotanhallgató korom óta. Ő keltette fel érdeklődésemet a kórélettan és a tudományos kutatás iránt, megtanított a kritikus gondolkodásra és teljes szívvel támogatott ezen az úton. Sokszor éjszakába nyúlóan, bőséges mennyiségű kávéval és mély beszélgetésekkel dolgoztuk át magunkat a feladathegyeken, de voltak bőven vidám pillanataink is, amelyekre mindig szívesen fogok emlékezni.

Hálás vagyok Szabó Gyula professzor úrnak, a Kórélettani Intézet korábbi vezetőjének is, aki befogadott az Intézetbe, első témavezetőmként bölcsen irányított a PhD-képzés első két évében, és magasra tette a lécet az oktatásban, inspirálva a szakmai fejlődésre.

Szeretnék köszönetet mondani Rakonczay Zoltán professzor úrnak, a Kórélettani Intézet jelenlegi vezetőjének is, aki barátságos légkört teremtett és támogatást nyújtott kis közösségünk minden tagjának.

Köszönetemet szeretném kifejezni kollégáimnak, Dr. Szakács Júliának, Bodnár Évának és Dr. Bagosi Zsoltnak, akik támogattak a kutatásban, és melegszívű és befogadó hozzáállásukkal otthonossá tették az Intézetet. Hálás vagyok továbbá a Dr. Jászberényi Miklóssal, Dr. Mezei Zsófiával, Dr. Gecse Árpáddal és Dr. Pataki Imrével való közös munkáért, akik mindannyian nagyszerű példaképek voltak az orvosképzésben. Szeretném megköszönni a tanszék többi tagjának is, hogy támogató környezetet biztosítottak, hálás vagyok, hogy ennek a közösségnek a része lehetek. Külön köszönöm kiváló asszisztenseinknek, Kiss Gusztávnak, Fráter Zsuzsannának, Pál Ágnesnek és Romhányi Veronikának, hogy felbecsülhetetlen segítséget nyújtottak a laboratóriumi kísérletek elvégzésében.

Szeretném köszönetemet kifejezni kooperációs partnereinknek: Dr. Sárközy Mártának, Dr. Bozsó Zsoltnak és Dr. Galla Zsoltnak.

Végül, de nem utolsósorban hálás vagyok szüleimnek, Istvánnak és Margitnak a támogatásukért és türelmükért, ők mindig bátorítottak, hogy kövessem az álmaimat, és egész életemben szeretetteljes környezetet biztosítottak számomra. Végül szeretném hálámat kifejezni Czene Dánielnek, a páromnak, az "ikercsillagomnak", aki mindig felvidített és hitt bennem, még akkor is, ha elvesztettem az önmagamba vetett hitemet. Nélkülük ez a tézis soha nem készült volna el.