

**Monoaminerg és galaninerg rendszerek szerepe az
oxytocin szekréció regulációjában
*patkány neurohypophysis sejt kultúrákon***

Ph.D. értekezés tézisei

Radács Marianna

Témavezető: Dr. Julesz János egyetemi tanár
Dr. Gálfi Márta főiskolai tanár

Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
1. sz. Belgyógyászati Klinika
Endokrinológia Laboratórium

Szeged
2009

RÖVIDÍTÉSEK

5-HT: szerotonin

ADR: adrenalin

GAL: galanin

HA: hisztamin

NADR: noradrenalin

NH: neurohypophysis

OT: oxytocin

PVN: nucleus paraventricularis

RIA: radioimmunoassay

SON: nucleus supraopticus

BEVEZETÉS

Az állati szervezet homeosztázisának fenntartása az ideg-, az endokrin- és az immunrendszer által komplexen szabályozott. Az endokrin- és idegrendszer közötti kapcsolat megteremtésében a gliasejtek jelentős szerepet játszanak. Hormonális indukcióra a gliasejtek alapvető fontosságúvá válnak az idegrendszer fejlődésében, anyagcseréjében és aktivitásában, továbbá visszahatnak a hormon release-re. A neurohypophysis-t (NH) alkotó pituicyták gliális eredetű sejtek, melyek hormonszekréciónja neurovaszkuláris kapcsolatokkal szabályozott. Az astroglia sejtek a hypothalamusban különböző neuronokhoz futó szinaptikus bemeneteket szabályoznak, illetve részt vesznek a hypophysis hormonok elválasztásában.

A normál endokrin funkcióhoz intakt hypothalamus szükséges. A hypothalamikus sejteknek három típusát különböztetjük meg. Az egyik csoportot képviselik a magnocelluláris neuronok, melyek az arginin-vazopresszint és az oxytocint (OT) szintetizálják. A sejttestek a nucleus supraopticus-ban (SON) és a nucleus paraventricularis-ban (PVN) találhatóak, idegvégződésekből neurohormonok szabadulnak fel a NH-ben.

Az első peptidhormon, aminek a szerkezetét is meghatározták és a biológiailag aktív formáját kémiai úton is szintetizálták az OT volt.

A főbb neurohormonok nemcsak fiziológiai stimuláció hatására ürülnek, hanem bizonyos, velük együtt előforduló peptidek fokozhatják, illetve gátolhatják a szekréciónjukat. Az OT szekréciónját számos aminerg (adrenalin /ADR/, dopamin, noradrenalin /NADR/, szerotonin /5-HT/, hisztamin /HA/) és peptiderg (galanin /GAL/) neurotranszmitter szabályozza.

A katekolaminok közé tartozó dopamin, ADR, NADR neurotranszmitterek és/vagy hormonok a periférián, illetve a központi idegrendszerben találhatóak. A noradrenalin neurotranszmitterként fordul elő az agyban. A NADR N-metilációja során keletkező ADR a mellékvesevelő hormonja, különböző szervekben a katekolamin receptorokat stimulálja. Az agyban különböző katekolamin receptorok (α_1 , α_2 és β) találhatóak, a NADR és ADR ezen receptorokon keresztül fejtik ki hatásukat.

A szerotoninerger neuronok sejttestjei diszkrét sejtcsoportokban fordulnak elő az agytörzs középvonalának mentén. Axonjaik a központi idegrendszer csaknem egész területét beidegzik. Az 5-HT azon neurotranszmitterek egyike, mely részt vesz a hypophysealis szekréción hypothalamikus kontrolljában. A 5-HT receptorok három családja G-protein kapcsolt: az elsőt az 5-HT₁ és 5-HT₅, a másodikat 5-HT₂ és a harmadikat a 5-HT₄, 5-HT₆ és 5-HT₇ együtt alkotja. Külön családot alkot az 5-HT₃ receptor mely ligand-vezérelt

ioncsatorna. Különbség a szignál transzdukció mechanizmusában, a neuroanatómiai előfordulásában, valamint a szintetikus kémiai ágensek iránti affinitásában van.

A HA számos fiziológiai és patológiai folyamat mediátora az idegrendszeren belül és kívül. A központi idegrendszerben előforduló HA számos agyi funkció fontos regulátora. Annak ellenére, hogy a központi idegrendszer csaknem egészében tartalmaz hisztaminerg rostokat, a beidegzés denzitása eltérő. Valamennyi gerincesben a nucleus tuberomammillary-ban előfordulnak hisztaminerg neuronok. A tuberomammillary-ban található sejtek monoaminerg inputokat kapnak adrenerg, noradrenerg és serotoninerget. A HA négy G-protein kapcsolt receptoron keresztül fejti ki hatását. Az agyban a H₁, H₂, és H₃ receptorok meghatározott területeken fordulnak elő, de nem köthetők egyes neuronokhoz.

A GAL 29/30 aminosavból álló neuropeptid, ami a bél és agyi neuropeptidok családjába tartozik. A GAL jelen van mind az idegrendszerben, mind a perifériás szövetekben. Egyes patkány és humán agyi struktúrákban más neurohormonokkal ill. neuromediátorokkal együtt expresszálódik. A GAL-nak parakrin-endokrin hatása van hypothalamus-hypophysis egységen belül. A GAL G-protein kapcsolt receptorokon és ioncsatornákon (Ca²⁺, K⁺) keresztül fejti ki hatását. Az idegrendszeren belül széles spektrumú előfordulást mutat.

CÉLKITŰZÉSEK

Irodalmi adatok szerint a hypothalamus magnocelluláris sejtjeiben (PVN, SON) az OT intracelluláris szintje monoaminerg (ADR, NADR, 5-HT, HA) és peptiderg (GAL) szabályozás alatt áll. A fiziológiásan aktív OT a NH pituicytáiból szabadul fel. Így a hypothalamikus regulációban érintett peptidek és monoaminok neurohypophysealis OT release szabályozásában való szerepe különösen érdekes kérdéskört képvisel. Jelen munkánk során célunk az volt, hogy a vázolt problémakört vizsgáljuk. A problémakör tanulmányozásához a következő feladatokat és kérdéseket kellett megoldani:

1/a. Sejtszintű szabályozás tanulmányozását jelentő standard *in vitro* modellrendszer (NH sejt kultúra) létrehozása.

1/b. A funkcionálisan aktív NH sejt kultúrából az elválasztott OT tartalom meghatározásához módosított radioimmunoassay (RIA) módszer beállítása.

2/a. A kialakított standard pituicyta kultúra OT szekréció változásainak vizsgálata ADR, NADR, 5-HT, HA dózis és időfüggésében.

2/b. Az említett monoaminerg ágensek speciális receptor típusainak OT release kapcsolt funkcionális jelenlétének tanulmányozása a specifikus receptor altípusok agonistáinak és/vagy antagonistáinak jelenlétében.

3. Az OT elválasztás GAL receptorok általi szabályozásának vizsgálata peptiderg reguláció okán.

4. Az OT szekréció monoaminerg és peptiderg receptor funkciók általi interakciók, mint a szabályozás jelentős lehetőségének meghatározása.

MÓDSZEREK

Neurohypophysis sejt kultúra

A hypophysis neurohypophyseális sejtjei, a pituicyták, gliális eredetűek. Munkánk során Wistar hím patkányokból (ts.: 180-200 g) steril körülmények között eltávolítottuk a NH-eket. A szövetet enzimatikusan [tripszin (0,2 %; 30 min.), kollagenáz (30 µg/ml; 60 min.), diszpáz (300 IU/ml; 30 min.) és DN-áz I, II (10µg/ ml; 2x30 min.)] emésztettük 37 °C-on, majd PBS-ban mostuk háromszor. Az enzimátikus emésztést követően 100, 80 és 48 µm pórusátmérőjű nylon blutex szűrőt használtunk a sejtek mechanikai disszociáltatásához.

A sejtek viabilitását (99-100%) trypan-kék teszttel történő ellenőrzés után 2×10^6 sejt/ml koncentrációban, felületkezelt tenyésztőedényekben (24 lyukú Costar) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) +10% FCS (Fetal Calf Serum) +10 IU/ml penicillin-streptomycin tápoldatban tartottuk, 5% CO₂ jelenlétében 37 °C-on. A sejt kultúrákat rendszeresen mostuk tápoldattal, majd amikor konfluenssé váltak, kísérleti modellként használtuk.

Hormon meghatározás metodikája

A NH monolayer sejt kultúra hormon elválasztó funkcióit a tenyészetek 13-14 napos korában vizsgáltuk. A médium hormontartalma közel azonos módon változott a tenyészetek életének

ebben a korában. Így ez az időpont alkalmasnak bizonyult a hormon-release vizsgálatok standard módon történő vizsgálatára.

A NH tenyészetek felülúszó médiumaiból 500-500 µl mintát vettünk és -80 °C-on, műanyag edényben tároltuk az OT tartalom méréséig RIA módszerrel.

Oxytocin radioimmunoassay

A sejt kultúra felülúszó hormontartalmának meghatározása 2 órával a médium lecserélése után történt. Szintetikus OT-t használtunk jelölésre. OT antitest az Új-Zéland törzsű nyúlban lett termeltetve OT-(ε-aminokapronsav)-thyroglobulin konjugátum ellen. A keresztreakció 92,7%-os volt az oxypresszin-nel. A standard görbe 1,0-128 pg/assay cső intervallumot fedte le. Az assay érzékenysége OT-ra nézve 1pg/cső. Az OT tartalom pg/mg fehérje egységben lett megadva.

Fehérje-meghatározás

A kísérleti minták protein tartalmának meghatározását spektrofotometriás úton, Lowry módosított módszere alapján végeztük

Statisztikai elemzés

Az adatok elemzését Kruskal-Wallis teszt alkalmazásával végeztük. A teszt szignifikancia szintje $p < 0,05$ volt. A statisztikailag értékelhető eltéréseket a kontrollhoz és/vagy adott kezelési sémához viszonyítva tüntettük fel az eredmények prezentálásánál.

MEGBESZÉLÉS AZ EREDMÉNYEK TÜKRÉBEN

A funkcionális és morfológiai vizsgálatok a hypothalamikus szabályozást érintik. Általánosan elfogadott, hogy a NH "csak" raktározó szerepet tölt be az OT szempontjából.

Ennek megfelelően, kevésbé tanulmányozott volt a pituicyták szerepe a monoamin-indukált OT elválasztásban. Már bizonyított a SON-ban, PVN-ben és a commissura anterior-ban az OT neuronok noradrenerg, dopaminerg és szerotoninerg innervációja.

Igazolt, hogy az adrenerg rendszer esszenciális szerepet tölt be a neuronális, endokrin, kardiovaszkuláris, vegetatív és metabolikus funkciók szabályozásában. Jelen vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a coryanthine (ADR antagonist) teljesen blokkolja ADR indukált OT

emelkedést abban az esetben, ha az α_1 receptor antagonistá alkalmazása megelőzte az adrenalin hozzáadását. Viszont, az α_2 receptor antagonistá (yohimbin) alkalmazása hatástalan volt az ADR indukált OT emelkedés blokkolásában. Tehát elmondhatjuk, hogy α_1 receptor vesz részt az ADR indukált OT szekréció fokozásában NH sejt kultúrában.

A β_{1+2} receptor antagonistá propanolol a NADR előtt adva felfüggeszti a NADR OT release-re gyakorolt hatását. A β_1 receptor antagonistá (atenolol) alkalmazása nem védte ki a NADR által kiváltott OT elválasztás fokozódást. Következésképpen a NH sejt kultúrákban a NADR β_2 receptoron keresztül fejt ki reguláló hatását.

Irodalmi adatok szerint a NADR az α_1 receptoron keresztül felel a szoptatási inger kiváltásáért *in vivo*, mellyel adataink (*in vitro*) OT szekrécióra vonatkozóan összhangban vannak.

Noha *in vivo* β -adrenerg receptor stimulációja gátolja az OT szekréciót, ez részben az adrenerg hatásnak tulajdonítható, ami központilag és/vagy közvetlen hat a NH-re.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy nincs szignifikáns különbség az ADR és a NADR indukált OT release növekedés között *in vitro*.

A PVN magnocelluláris régiójában és a SON-ban a szerotonerg rostok azon területekre koncentrálódnak, ahol elsődlegesen oxytocinerg sejtek dominálnak. Vizsgálataink során 5-HT₁ receptor antagonistát (WAY-100635), 5-HT₂ receptor antagonistát (ketanserin) és 5-HT_{1,2} receptor antagonistát (metergolin) használtunk. Azt találtuk, hogy valamennyi alkalmazott antagonistá szignifikánsan csökkentette a megemelkedett OT szintet akkor, amikor az 5-HT antagonistá alkalmazása megelőzte az 5-HT hozzáadását. Ennek megfelelően megállapíthatjuk, hogy az 5-HT kiváltotta OT szekréció-fokozódás az 5-HT₁ és 5-HT₂ receptorokon keresztül valósul meg NH sejt kultúrákban. Ezen megállapítás összhangban van Jørgensen megfigyeléseivel, hogy az 5-HT indukált OT szekréció 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} és 5-HT₄ receptorokon keresztül valósul meg.

A HA, mint neurotranszmitter részt vesz a hypophysis hormonszekréciójának neuroendokrin szabályozásában indirekt módon hypothalamikus szinten, ahol nagy számban fordulnak elő hisztaminerg rostok. HA stimuláló hatását az OT-ra valószínűleg SON-ra és PVN-ra hatva fejt ki. Azt találtuk, hogy a mepyramine és cimetidine szignifikánsan csökkentette a HA-indukált OT elválasztás fokozódását abban az esetben, ha a HA antagonistá hozzáadása megelőzte a HA alkalmazását. Megállapíthatjuk, hogy a HA a H₁ és H₂ receptorokon keresztül fejt ki OT release fokozó hatását NH sejt kultúrákban. A H₃₊₄ receptor antagonistá thioperamide hatástalannak bizonyult a HA indukált fokozott OT szekréció blokkolásában.

Ezen megállapítások párhuzamba állíthatók más kutatók megfigyeléseivel, pl. a HA stimulált OT szekréció postszinaptikusan elhelyezkedő H_1 és H_2 receptorok aktiválásával valósul meg. *In vivo* szoptatós patkányban a HA H_1 receptoron keresztül excitatórikus hatással van az OT release-re. A H_2 receptor kettős hatású, egyrészt fokozza az OT szintézisét, másrészt gátolja az érés előtti release-t *in vivo*.

A GAL szerepe az OT elválasztás szabályozásában nem teljesen tisztázott. Ezen és korábbi megfigyeléseink arra engednek következtetni, hogy a NH hormonok közvetlen galaninerg kontroll alatt állnak, és patkányban NH hormonok szekréciójának galaninerg ellenőrzése a NH szintjén független a hypothalamustól. Eredményeink értelmében *in vitro* a pituicyta kultúra membránján GAL receptor található, de a pontos GAL receptor altípus még nem ismert.

A GAL módosította a monoaminok NH hormon release fokozó hatását abban az esetben, ha a GAL adása megelőzte a monoamin kezelést. Amennyiben a monoaminok hozzáadása előzte meg a GAL kezelést, úgy a GAL hatástalannak bizonyult és a fokozott OT elválasztásban nem történt változás. Ugyanez a jelenség volt megfigyelhető akkor is, amikor a GAL antagonistá M15 hozzáadása megelőzte a GAL-t, és ezt követte a monoaminok hozzáadása. Ekkor valamennyi esetben az OT szekréció fokozódott. Igazoltuk a GAL OT release módosító hatását.

ÖSSZEFOGLALÁS

Biológiailag aktív NH sejt kultúra modellt sikerült létrehozni *in vitro*. A pituicyta kultúra jól működő modellt prezentált az OT release vizsgálatára. A release-lt OT tartalom RIA-val történő meghatározását beállítottuk.

Megállapítottuk, hogy NH sejt kultúrában az OT szekréciót a monoaminok (ADR, NADR, 5-HT, HA) és a GAL megváltoztatja, melyet a dózis- és idő-kinetikai görbék mutatnak be.

Az ADR és NADR dózis-függő módon növelte az OT szintet a kísérleti modell felülúszójában. Nem észleltünk szignifikáns különbséget az ADR és NADR-indukálta OT release-k között. Specifikus antagonistákat használva igazoltuk, hogy α_1 receptoron keresztül történik az ADR indukálta OT szekréció fokozása, a NADR mediálta OT szekréció emelésében viszont a β_2 receptor játszik szerepet *in vitro*.

Az 5-HT emelkedő dózisának hatására a kísérleti modell felülűszó médiumának OT tartalma lineárisan emelkedett. Megfigyeléseink alapján megállapíthatjuk, hogy az 5-HT indukálta OT elválasztás emelkedése az 5-HT₁ és 5-HT₂ receptorokon keresztül valósult meg NH sejt kultúrákban.

Dózis-függést igazoltunk a HA és az elválasztott OT tartalom között az NH sejt kultúra felülűszó médiumában. Eredményeink azt mutatják, hogy a H₁ és H₂ receptoron keresztül valósul meg a HA-indukált OT elválasztás növekedése.

A GAL (10⁻⁶ - 10⁻⁹ M dózisban) a NH sejt kultúrák OT szekréciónak csökkenését váltotta ki. A GAL antagonist M15 alkalmazása GAL előtt a kísérleti protokollban, OT release normalizálódását eredményezett.

A monoaminok (ADR, NADR, 5-HT, HA) előtt alkalmazott GAL, a monoamin indukált OT elválasztás fokozását blokkolta. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy GAL receptorok vannak a pituicyták membránján *in vitro* körülmények között, de a pontos altípusuk még nem tisztázott.

Eredményeink szerint az OT szekréciónak a monoaminerg rendszer közvetlen hatása alatt áll *in vitro* NH sejt kultúra modellben. Az OT elválasztás monoaminerg kontrollja, valamint az OT szekréciónakhoz kapcsolt monoaminerg és galaninerg rendszer interakciója független a hypothalamustól a NH szintjén.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Őszintén köszönöm Dr. Julesz János Professzor Úrnak lelkes támogatását a Ph.D. dolgozat elkészülése során.

Szeretném kifejezni őszinte hálámat Dr. Gálfi Mártának, aki a kezdetektől fogva irányítja a munkámat, ellátott hasznos tanácsokkal, végig bátorított a munka során és megtanított sejt kultúrákkal dolgozni.

Nagyrabecsülésemet szeretném kifejezni Dr. Juhász Annának, aki értékes javaslatokkal, építő jellegű tanácsokkal látott el és sokat fejlesztette a labortechnikai jártasságomat.

Nagyon köszönöm Dr. László Ferenc Professzornak az értékes tanácsokat, melyek növelték munkám minőségét.

Külön köszönet Dr. Gardi Jánosnak, aki értékes javaslatokkal segítette a munkámat és megtanított RIA módszerrel mérni.

Köszönöm Dr. Varga Csabának és Dr. Molnár Andornak a segítséget.

Köszönöm Dr. Balázspiri Lajosnak a galantidot és galanint.

Köszönöm Aaron Mangoldnak és Miczák Péternek, hogy növelték a dolgozatom olvashatóságát és érthetőségét.

Végül köszönöm Anyának megértését, türelmét és bátorítását.

Ph.D. TÉZIS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ CIKKEK

M. Radacs, M. Gálfí, A. Juhász, C. Varga, A. Molnár, F. László, F.A. László: Histamine-induced enhancement of vasopressin and oxytocin secretion in rat neurohypophyseal tissue cultures. *Regul Pept.* 134: 82-8 (2006)

Impact factor: 2,442

M. Gálfí, **M. Radács**, A. Juhász, F. László, A. Molnár, F.A. László: Serotonin-induced enhancement of vasopressin and oxytocin secretion in rat neurohypophyseal tissue culture. *Regul Pept.* 127: 225-31 (2005)

Impact factor: 2,442

Ph.D. TÉZISSEL KAPCSOLATOS POSZTER-KIVONATOK

M. Radács, Gy. Nagyéri, L. Gáspár, Zs. Valkusz, A. Juhász, A. László, J. Julesz, P. Miczák, M. Gálfí: The role of environmental effects in the changes of ACTH, VP and OT release. The Endocrine Societies 89th Annual Meeting. Toronto, Canada (2007)

Nagyéri Gy., **Radács M.**, Gálfí M., Baláspiri L., Molnár A., László F., Varga Cs., László A. F.: Galanin származékok és fragmensek hatása az oxytocin szekréciójára patkányban. in *Magyar Belorvosi Archívum* 59: 57 (2006)

Nagyéri, Gy., Gálfí, M., Juhász, A., Molnár, A., **Radács, M.**, László, F., László, F.A.: Galanin és monoaminerg rendszer interakciójának a vazopresszin és oxytocin kiválasztásra gyakorolt hatásának vizsgálata patkány neurohipofízis sejtenyészetben. *MÉT LXX. Abstract könyv* 70: 77 (2006)

M. Radács, M. Gálfí, A. Juhász, L. Gáspár, A. Petri, A. Molnár, F. László, F.A. László: A histamin receptorok szerepe az oxytocin és vasopressin release szabályozásában. in *MÉT LXIX. Abstract Könyv*: 172. (2005)

Radács M., Gálfí M., Juhász A., László F. Molnár A. László F.: A serotonin hatása a neurohypophysis hormonok elválasztására. *Orvosi Hetilap. Suppl.* 3: 1102. (2004)