

Doktori értekezés tézisei

Orexin jelentősége a vízanyagcsere, valamint a vazopresszin kiválasztás szabályozásában

Karcsúné Kis Gyöngyi

Témavezetők:

Prof. Dr. László A. Ferenc, tudományos tanácsadó

Dr. Varga Csaba, egyetemi docens

Prof. Dr. László Ferenc, egyetemi tanár[†]



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
ÉLETTANI, SZERVEZETTANI ÉS IDEGTUDOMÁNYI TANSZÉK



2012

SZEGED

A tézisben előforduló rövidítések:

5-HT	szerotonin
ADR	adrenalin
DA	dopamin
HA	hisztamin
i.c.v.	intracerebroventrikuláris
i.p.	intraperitoneális
NH	neurohypophysis
NADR	noradrenalin
OX ₁ R	orexin-1 receptor
OX ₂ R	orexin-2 receptor
PVN	nucleus paraventricularis
RIA	radioimmunassay
SON	nucleus supraopticus
VP	vazopresszin

Bevezetés

Orexinek

Néhány éve izolálták és szerkezetileg jellemezték a kísérletsorozatunkban is használt két neuropeptidet, a hypocretin-1-et és hypocretin-2-t. Későbbiekben legfőbb biológiai hatásának megfelelően orexinnek (orex: görögül étvágy) nevezték el. A kémiai szerkezetet vizsgálva megállapították, hogy két aktív orexin vegyület létezik: az orexin-A 33 aminosavat és 2 diszulfid hidat tartalmaz, míg az orexin-B 28 aminosavból álló lineáris peptidláncból tevődik össze. Két orexin receptor van: az OX_1R szelektív az orexin-A-ra vonatkozóan, az orexin-B-hez az affinitása mintegy tízszer kisebb, míg az OX_2R nem tekinthető szelektívnek, az orexin-A és orexin-B egyenlő affinitással kötődik hozzá. Immunhisztokémiai vizsgálatok a laterális hypothalamusban mutatták nagy mennyiségben orexin peptidek jelenlétét. Több adat szól amellett, hogy az orexin fő hatásaként ismert táplálékfelvételt fokozó tulajdonsága mellett részt vesz a vízanyagcsere szabályozásában: i.c.v. adagolva fokozza a vízfelvételt és vizeletürítést, az orexin szempontjából involvált laterális hypothalamus lézió csökkenti a vízfogyasztást, szomjazás emeli a hypothalamusban a 130 aminosavat tartalmazó orexin precursor prepro-orexin mRNS szintet. Feltételezhető, hogy az orexin, mint peptid modulátor szerepet játszik a hypothalamo-neurohypophysealis rendszer regulációjában. Erre utalnak azok a megfigyelések, amelyek az orexin és a hypothalamus magnocelluláris régiója – a PVN és SON - morfológiai és funkcionális kapcsolatát bizonyítják.

VP

A hypothalamus magnocellularis neuroszekretoros idegsejtjei (PVN, SON) által termelt VP axonális transzporttal jut a hypophysis nyélen át a neurohypophysis fenesztrált kapillárisaihoz. Az axonvégződésekből, adekvát inger hatására a vérkeringésbe jut. Egy, korábban a munkatársaim által alátámasztott hipotézis szerint a NH pituicytáiban is zajlik VP termelés, VP génexpressziót mutattak ki: neurohypophysis sejtenyészet felülűszójában tömegspektroszkópiával VP-t azonosítottak.

Monoaminerg rendszer és ozmotikus inger

In vivo vizsgálatokban kimutatták, hogy monoaminok, így a HA, a 5-HT és a katekolaminok (NADR, ADR, DA) részt vesznek a VP szekréció szabályozásában. *In vitro*

kísérleteink során korábban megállapítottuk, hogy a monoaminok adagolása után a NH szintjén is fokozódik a VP kiválasztás.

Régóta ismert, hogy ozmotikus inger hatására, pl. hiperozmotikus sóoldat intraperitoneális adagolását követően a VP szint emelkedik.

Célkitűzés

A fent említett neurotranszmitterek azonos lokalizációja és élettani folyamatokban betöltött szerepüket tekintve feltételezzük, hogy funkcionális kapcsolatban állnak egymással. Vizsgálatainkat *in vivo* és *in vitro* körülmények között végeztük.

***In vivo* kutatásaink során a következő kérdések megválaszolására törekedtünk:**

1. Van-e különbség az orexin-A és orexin-B között intraperitoneális és intracerebroventrikuláris adagolást követően a táplálékfelvétel valamint vízfogyasztás vonatkozásában?
2. Ozmotikus stimulus (2,5%-os NaCl oldat) után a VP koncentráció változását hogyan módosítja az orexin neuropeptid?
3. Milyen változást idéznek elő az orexinek a nem-ozmotikus inger (hisztamin) által kiváltott VP koncentrációban?
4. Az orexin-A indukálta VP szekréciónak változások kivédhetőek-e az OX₁R antagonistá SB408124-gyel?

***In vitro* kísérleteink az alábbi kérdések megválaszolására irányultak:**

1. NH sejt kultúrában hogyan hatnak az orexinek a VP kiválasztásra?
2. Módosítják-e az orexinek (és ha igen, akkor a két vegyület hatása között van-e különbség) a monoaminerg vegyületekkel indukált VP kiválasztás változását a sejtenyészeti pituicytáiban?
3. Aspecifikus ozmotikus inger (K⁺ adagolás) okozta VP szekréciónak növekedését az orexinek képesek-e befolyásolni?
4. Az OX₁R antagonistá (SB408124) alkalmazásával a monoaminerg vegyületek által előidézett VP szint emelkedés orexin-A okozta mérséklése kivédhető-e?

Anyagok és módszerek

A) *In vivo* kísérletek

180-250 g súlyú hím Wistar patkányokkal dolgoztunk. Az érkezést követő egy hetes beszoktatás után altatásban kanült helyeztünk be a jobb ventriculus lateralisba. Kísérleteket egy héttel a műtét után végeztünk. A kanül helyét a kísérletek lezajlását követően ellenőriztük és csak a pozitív esetekkel számoltunk.

A táplálék- és vízfelvétel méréséhez szeparált ketrecekbe helyeztük az állatokat. A víz- és táplálékfogyasztásukat óránként mértük 4-6 órán át.

A plazma VP szint meghatározáshoz a patkányokat dekapitáltuk és vérmintát gyűjtöttünk alvadásgátlóval ellátott (Na_2EDTA , 3 mg/ml) polisztiρέn csövekbe. A VP mennyiségét centrifugálás után kapott plazmából RIA módszerrel mértük. Az eredmények statisztikai analíziséhez Kruskal-Wallis próbát használtunk.

A kezelésekhöz felhasznált anyagok:

1. Orexin-A és orexin-B (i.c.v. 10-30-90 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}/\text{állat}$; i.p. 100-300 $\mu\text{g}/1\text{ ml}/\text{állat}$)
2. 2,5% NaCl oldat (i.p. 1ml/100g testsúly, 15 perccel az orexin kezelés után)
3. HA (i.p. 1 mg/100g testsúly; 15 perccel az orexin kezelés után)
4. SB408124 (N-(6,8-Difluoro-2-methyl-4-quinoliny)-N'-[4-(dimethylamino)phenyl]urea) (i.c.v. 30 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}/\text{állat}$, orexin kezeléssel egyidőben)

B) *In vitro* kísérletek

Wistar patkányok hypophysisét steril körülmények között eltávolítottuk és enzimatikusan emésztettük (tripszin, DNáz-I és II, kollagenáz), majd a diszpergált sejteket kollagénnel bevont plasztik Petri csészébe helyeztük. (Viabilitás: 99-100%, sejtszám: $2 \times 10^6/\text{ml}$.) A VP koncentráció meghatározása a felülúszó médiumból RIA módszerrel történt. Eredményeink statisztikai analízisét Tukey-Kramer-féle páros összehasonlítással végeztük.

A kezelésekhöz felhasznált anyagok:

1. orexin-A és orexin-B (10^{-10} - 10^{-4} M)
2. HA, DA, ADR, NADR, K^+ (10^{-6} M)
3. SB408124 (10^{-6} M)

Eredmények

1. Orexinek hatása a táplálék- és vízfelvételekre

Mind az orexin-A, mind az orexin-B i.c.v. alkalmazását követően már az első órában fokozódott a kontroll csoportokhoz képest a táplálék- és vízfelvétel. A két hormon hatása között számottevő különbség nem volt mérhető. A vízfelvétel vonatkozásában a 30 µg/10 µl i.c.v. adagolt orexin-A hatása volt a legkifejezettebb.

2. Az orexinek hatása a VP kiválasztásra

A különböző koncentrációban, i.c.v. és i.p. adagolt orexin-A és orexin-B nem befolyásolta a plazma bazális VP szintjét. Az ozmotikus (2,5%-os sóoldat) és nem ozmotikus (HA) inger hatására a VP szint emelkedett, ezt a növekedést az orexinek redukálni tudták, de kivédeni nem. Az orexin-A és orexin-B neuropeptidet egymással összehasonlítva megállapítottuk, hogy a kiváltott hatásaik tekintében nincs számottevő különbség közöttük.

A sejtenyészetben végzett kísérleteink az *in vivo* vizsgálatok eredményeivel jól korrelálnak. A bazális VP koncentráció nem változott koncentrációfüggően egyik neuropeptid adagolását követően sem. A monoaminergekkel indukált VP kiválasztás az orexinek preinkubációjával redukálható volt, az orexinek indukciót követő adagolásával ilyen csökkenést nem tapasztaltunk. K⁺ hatására bekövetkező VP kiválasztás nem változott orexin-A vagy -B kezelést követően.

3. Az OX₁R antagonistá alkalmazásával kapott eredmények

Az orexin-A irodalmi adatok szerint nagyobb affinitással kapcsolódik az orexin-1 receptorhoz, ezt a tulajdonságát kihasználva az orexin-A és a receptora antagonistájának együttes alkalmazásával végeztünk kísérleteket. Az orexin-A mellett antagonistá alkalmazásával a vízfelvétel szintje mérséklődött, de a kontrollhoz viszonyítva emelkedett maradt.

A vérplazma VP koncentrációjában bekövetkezett változások tekintetében eredményeink azt mutatják, hogy az antagonistá egyidejű adagolásával, a HA-nal és hiperozmotikus sóoldattal indukált emelkedést követően az előzőekben tapasztalt redukció nem következett be. Az antagonistá jelenléte az izolált NH sejtenyészetben is kivédte a monoaminerg stimulust követően az orexin-A által kiváltott VP szint csökkenést.

Következtetés

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy:

1. Orexin-A jelentősebben, orexin-B kisebb mértékben fokozza a vízfogyasztást. Az OX₁R antagonistá a polydipsiát szignifikánsan csökkenti.
2. Különböző dózisban bejuttatott orexin-A, illetve -B önmagában a VP-szintet nem változtatja meg.
3. HA, illetve 2,5%-os NaCl kezelés emeli a VP-szintet; orexin-A i.c.v. adása a HA, illetve a hipertóniás NaCl oldat okozta VP-kiválasztás növekedését gátolta. Az OX₁R antagonistá adásával a gátlást nem tudtuk kimutatni.
4. Megállapítottuk, hogy az orexin a vízfelvétele, illetve HA-nal és ozmotikusan indukált VP-szint emelkedésre gyakorolt hatását feltehetően az OX₁R közvetítésével fejti ki.
5. Izolált patkány NH sejtenyészetben a bazális VP szintet az orexin kezelés nem befolyásolja.
6. A monoaminergekkel indukált VP szint emelkedés csökkenthető orexin előkezeléssel NH sejtenyészetben. Az orexin VP szekréció regulálásában betöltött szerepét a monoaminerg rendszerrel való interakcióján keresztül érvényesíti.
7. Az orexin-A redukáló hatását a szelektív OX₁R antagonistá csökkenti.
8. A VP kiválasztás szabályozását az orexin a hypophysis hátsó lebeny szintjén is érvényesíti specifikus receptora, az OX₁R-ok közreműködésével.

Összefoglalás

Vizsgálati eredményeink alapján valószínűsítjük, hogy a nemrégiben izolált két orexin neuropeptid *in vivo* és *in vitro* körülmények között szerepet játszik a VP kiválasztás regulációjában. Az *in vitro* kísérletek továbbá alátámasztják azt a hipotézist, hogy interakciójuk monoaminergekkel a hypothalamustól függetlenül, a NH szintjén is érvényesül. Az antagonistával kapott eredményeink arra utalnak, hogy az orexinek regulátor funkciója a specifikus receptoraikon keresztül érvényesül.

Kísérleteink elsősorban elméleti jelentőségűek: a centrális szabályozás szempontjából fontos orexinnek a vízanyagcserére gyakorolt hatásmechanizmusának tisztázásához kívánunk hozzájárulni.

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 7,924

The osmotically and histamine-induced enhancement of the plasma vasopressin level is diminished by intracerebroventricularly administered orexin in rats

Gyöngyi K. Kis, Andor H. Molnár, Lejla Daruka, János Gardi, Kinga Rákosi, Ferenc László, Ferenc A. László, Csaba Varga

Pflügers Archiv - European Journal of Physiology (2012) Accepted IF: 3,354

The effects of orexins on monoaminerg-induced changes in vasopressin level in rat neurohypophyseal cell cultures

Gyöngyi K. Kis, Tímea Ocskó, Márta Gálfi, Marianna Radács, Zsolt Molnár, Kinga Rákosi, Andor H. Molnár, Ferenc László, Csaba Varga, Ferenc A. László

Neuropeptides (2011) 45: 385-389. IF: 1,917

Effects of orexin-monoaminergic interactions on oxytocin secretion in rat neurohypophyseal cell cultures

Tímea Ocskó, Márta Gálfi, Mariann Radács, Zsolt Molnár, **Gyöngyi K. Kis**, Kinga Rákosi, Andor H. Molnár, Ferenc László, Csaba Varga, Ferenc A. László

Regulatory Peptides (2012) Accepted IF: 2,473

A disszertáció alapjául szolgáló referált absztrakt:

Effects of orexins on water intake and vasopressin secretion in rat

G.K. Kis, L. Daruka, K. Rákosi, AH. Molnár, F. László, Cs. Varga, F.A. László

Acta Physiologica (2011) Volume 202, Supplement 684 :P39 IF: 3,138

Az értekezés témájához nem tartozó idézhető közlemények:

Gervain Mihály, Vörös Erika, Molnár Andor, **Karcsú-Kis Gyöngyi**, László Ferenc, László A. Ferenc

Combined Treatment with Buserelin+Cabergoline in Patient with Prostate Cancer and Pituitary Macroprolactinoma.

J Cancer Therapy 2010; (1): 214-218. IF: 0,00

Tari I, **Kiss G** , Deer AK , Csiszar J, Erdei L , Galle A, Gemes K , Horvath F, Poor P, Szepesi A, Simon LM

Salicylic acid increased aldose reductase activity and sorbitol accumulation in tomato plants under salt stress.

Biologia Plantarum 2010; 54(4): 677-683. IF: 1,656

Mihály András, **Karcsú-Kis Gyöngyi**, Bakos Mónika, Bálint Erika

Cellular distribution of B-Raf protein kinase in the brainstem of the adult rat. A fluorescent immunohistochemical study.

Acta Biol. Szeged. 2007; 51; 7-15. IF: 0,000

Bereczki L, **Kis G**, Bagdi E, Krenacs L.

Optimization of PCR amplification for B- and T-cell clonality analysis on formalin-fixed and paraffin-embedded samples.

Pathol Oncol Res. 2007;13(3):209-14. IF: 1,272

Krenacs L, Schaerli P, **Kis G**, Bagdi E.

Phenotype of neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma is consistent with activated follicular B helper T cells.

Blood. 2006; 1;108(3):1110-1. IF: 10,370

A disszertáció alapjául szolgáló poszter prezentációk:

GK Kis, M Gálfi, M Radács, K Kádár, Z Molnár, AH Molnar, F László, C Varga, FA László

Effects of orexin-monoaminergic interactions on vasopressin secretion in rat neurohypophyseal cell cultures

13th European Congress of Endocrinology

30 April – 4 May 2011, Rotterdam, The Netherlands

Karcsúné Kis Gyöngyi, Daruka Leila, Rákosi Kinga, Molnár H. Andor, Varga Csaba, László Ferenc, László A. Ferenc

Orexinek hatásának vizsgálata a vízháztartásra és a plazma vazopresszin szintjére patkányban

Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok Közös Tudományos Konferenciája, 2011. június 8-11., Pécs

Az értekezés témájához nem tartozó poszter prezentációk:

Molnár Andor, **Karcsúné Kis Gyöngyi**, Rákosi Kinga, Miski Scerif, Korbonits Márta
Orexin-A hatása a bőr alatti és hasi zsírszövet AMPK aktivitására
„Sport- Kultúra- Életminőség” Nemzetközi Sporttudományi Konferencia, Pécs,
2010. október 27-29.

Ferenc A. László, Mihály Gervain, Erika Vörös, Andor H. Molnár, **Gyöngyi Karcsú-
Kis**, Ferenc László

Macroprolactinoma after chronic buserelin treatment in patient with prostate cancer
12th European Congress of Endocrinology; 24-28 April 2010; Prague, Czech
Republic

Karcsúné Kis Gyöngyi, Weiczner Roland, Krecsmarik Mónika, Mihály András
Raf-protein kinázok sejtszintű immunhisztokémiai lokalizációja patkány
agyttörzsben.

XI. MITT Konferencia, Szeged, 2007. január 24-27.

Ideggyógyászati Szemle 2007; 60(S1):31p.

Kis Gyöngyi, Bereczki László, DR. Bagdi Enikő, DR. Krenács László

In situ hibridizáció alkalmazása a tumordiagnosztikában

V. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, 2006. május 4-6.

Tari I, Simon LM, Deér KA, Csistár J, Bajkán Sz, **Kis Gy**, Szepesi Á

Influence of Salicylic Acid on Salt Stress Acclimatization of Tomato Plants:
Oxidative Stress Responses and Osmotic Adaptation

Federation of European Societies of Plant Biology: The 14th FESPB Congress,
August 23-27., 2004., Cracow, Poland

Hencová Mária, Kissné Deér Aranka, **Kis Gyöngyi**, Ábrahámné Gulyás Magdolna

Kadmium hatása busa és harcsa máj citokróm P450-függő enzimrendszerére

Szegedi Akadémiai Bizottság Kémiai Szakbizottság Környezetvédelmi és Analitikai
Munkabizottság: „The 10th Symposium on Analytical and Environmental
Problems”,

Szeged, 2003. szeptember 29.