

Galanin és monoaminerg rendszer jelentősége a vazopresszin kiválasztás szabályozásában

Ph.D. értekezés

Molnár Andor

Témavezetők:

Dr. László A. Ferenc, tudományos tanácsadó

Dr. László Ferenc, egyetemi tanár

Dr. Varga Csaba, egyetemi docens

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
ÖSSZEHASONLÍTÓ ÉLETTANI TANSZÉK**

2007
Szeged

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Az értekezésben előforduló rövidítések	4
1. Bevezetés	6
1.1. A vazopresszin kiválasztás centrális regulációja	6
1.2. Monoaminerg rendszer szerepe	7
1.3. Galanin és monoaminerg interakció	7
2. Célkitűzés:	10
3. Általános módszerek	11
3.1. <i>In vivo</i> kísérletek	11
3.2. <i>In vitro</i> modellrendszer	12
3.3. Vazopresszin radioimmunoassay	14
3.4. Fehérje meghatározás	16
3.5. Statisztikai analízis	16
I. Galanin hatása a vazopresszin kiválasztásra	17
Bevezetés	17
a. <i>In vivo</i> vizsgálatok	18
Módszerek	18
Eredmények	19
b. <i>In vitro</i> vizsgálatok	21
Módszerek	21
Eredmények	21
Megbeszélés	23
Következtetések	26
II. Hisztamin hatása a vazopresszin kiválasztásra	27
Bevezetés	27
a. <i>In vivo</i> vizsgálatok	27
Módszerek	28
Eredmények	28
b. <i>In vitro</i> vizsgálatok	31
Módszer	31
Eredmények	32
Megbeszélés	35
III. Dopamin hatása a vazopresszin kiválasztásra	39
Bevezetés	39
a. <i>In vivo</i> kísérletek	39
Módszer	39
Eredmények	40
b. <i>In vitro</i> kísérletek	41
Módszer	41
Eredmények	42
c. Galanin és dopamin közötti interakció vizsgálata	44
Bevezetés	44
Módszer	44
Eredmények	45
Megbeszélés	48
IV. Szerotonin hatása a vazopresszin kiválasztásra	52
Bevezetés	52

Módszerek	53
Eredmények	54
Megbeszélés.....	56
V. Az adrenerg rendszer hatása a vazopresszin kiválasztásra	60
Bevezetés	60
Módszerek	60
Adrenalin hatása a vazopresszin szekrécióra.....	62
Eredmények	62
Noradrenalin hatása a vazopresszin szekrécióra	64
Eredmények	64
Megbeszélés.....	66
Összefoglalás	70
Summary	74
Zárszó.....	78
Köszönetnyilvánítás	79
Irodalomjegyzék	80

Az értekezésben előforduló rövidítések

5-HT	szerotonin
ACTH	adrenokortikotróp hormon
ADR	adrenalin
APM	apomorphin
ATL	atenolol
CAT	corynanthin
CIM	cimetidin
CPZ	chlorpromazin
CRH	corticotropin-releasing hormon
DA	dopamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
GAL	galanin
HA	hisztamin
HP	haloperidol
i.c.v.	intracerebroventrikularis
i.p.	intra peritónéális
i.v.	intra vénás
KTS	ketanserin
M15	galantid (galanin antagonist)
MEP	mepyramin
MTG	metergolin
NADR	noradrenalin
NH	neurohipofízis

PBS	foszfát puffer
PDL	pindolol
PIM	pimozid
PLG	Pro-Lys-Gly
PNL	propranolol
PTA	phentolamin
PVN	nucleus paraventricularis
SEM	standard error of mean
SON	nucleus supraopticus
SP	sulpirid
TPE	thioperamid
VP	vazopresszin
WAY	WAY-100635
YOB	yohimbin

1.Bevezetés

1.1. A vazopresszin kiválasztás centrális regulációja

A vazopresszin (VP) a hipotalamusz magnocelluláris régiójában, főleg a SON és a PVN neuronjaiban szintetizálódik [1,2]. A szintézist követően neuroszekréciós granulomok formájában, axonális transzporttal, a hipofízis nyélen át jut a hipofízis hátsó lebenyének pituicitáihoz [3]. A VP innen jut a vérkeringésbe. E szerint az általánosan elfogadott hipotézis szerint az NH, csak mint a VP raktározás színtere játszik szerepet [4].

Ezzel ellentétben témavezetőm, Dr. László A. Ferenc és munkatársai megfigyelték, hogy izolált patkány NH szövetkultúra pituicitái képesek VP szintézisre és kiválasztásra [5]. A szövettenyészet felülúszó médiumában megjelenő VP-t immunológiai és tömegspektrográfias módszerekkel azonosították [6]. Ezeket a megfigyeléseket alátámasztja több publikáció is, melyek leírják, hogy az NH pituicitáiban VP gén expresszió zajlik [7,8]. Patkány NH-ban, hipofízis-nyél roncsolás és só bevitel után megemelkedett a VP mRNS szint [7]. A pituicitákban a VP gén expresszió fokozódás az NH sejtek ozmoszenzitivitásának köszönhető [9].

A VP kémiai szerkezetét Du Vigneaud és munkatársai [10] határozták meg és sikeresen szintetizálták is. A VP kilenc aminosavból álló nonapeptid, mely egy hat aminosavat tartalmazó gyűrűből és az ehhez kapcsolódó tripeptid-amid oldalláncból épül fel. A VP ismert élettani hatásai közül a legjelentősebb, hogy antidiuretikus hatásával szerepet játszik a vízháztartásban [11], valamint vazokonstriktációt okozva emeli az artériás vérnyomást [12]. A fő biológiai hatásai

mellett befolyásolja a tanulási és memóriafolyamatokat [13], fokozza a bélperisztaltikát [14], és növeli a vércukorszintet [15].

Kimutatták, hogy a VP hatása három receptor típuson keresztül érvényesül. A V_{1a} receptorok főleg az erek falában és a májban vannak jelen, inozitol-trifoszfát rendszeren keresztül fejtik ki hatásukat [16-18]. A V_{1b} receptorok a pituicitákban helyezkednek el [19], a V_2 receptorok a vese tubulus-sejtjeinek bazolaterális membránján találhatóak és az adenilát-cikláz aktiválásán keresztül hatnak [20].

1.2. Monoaminerg rendszer szerepe

A VP-t termelő hipotalamikus magnocelluláris magvakban számos neurotranszmitter és neuropeptid lokalizálódik. Ezek a vegyületek az idegvégződésekből felszabadulva, a hipofízis hátsó lebenyébe kerülve részt vehetnek a VP kiválasztás regulációjában [21].

Az említett neuroaktív anyagok közül az agy monoamin vegyületei, a HA [22,23], a DA [24,25], az 5-HT [26,27], és az adrenerg rendszer [28,29] is részt vesznek a VP szekréció szabályozásában.

1.3. Galanin és monoaminerg interakció

A galanint (GAL) 1983-ban, Kazuhiko Tatemoto és Viktor Mutt irányításával, a svéd Karolinska Intézet kutatócsoportja fedezte fel. A 29 aminosavból álló, biológiailag aktív peptidet sertésbélből izolálták, teljes aminosav szekvenciája: Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala-Ile-Asp-Asn-His-Arg-Ser-Phe-His-Asp-Lys-Tyr-Gly-Leu-Ala-NH₂. A vegyület az N- és C-terminális aminosavai alapján (**g**licin és **a**lanin) kapta nevét [30]. Az eltelt 24 évben a

patkány [31], a szarvasmarha [32] és számos egyéb faj GAL szekvenciáját meghatározták. A humán GAL-t 1991-ben Bersani és munkatársai [33] izolálták.

A különböző fajspecifikus GAL-ok legtöbbje 29 aminosavból és amidált C-terminálisból áll. Az N-terminális rész (1-15) aminosav szekvenciája fajoként azonos, a fajra jellemző eltérések a C-terminális szakaszban vannak. Meglepő módon a humán GAL 30 aminosavból áll és C-terminálisa nem amidált, viszont az N-terminális rész megegyezik a többi fajból származó GAL aminosav sorrendjével [34,35].

A GAL felfedezése óta számos élettani hatását leírták: fokozza a növekedési hormon, a prolaktin és a glukagon termelést [36,37], csökkenti az inzulin, szomatosztatin és gasztrin kiválasztást [38,39]. Befolyásolja a pancreas működést [40], a hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy tengelyt [41]. A központi idegrendszerre gyakorolt hatásai is ismeretesek: módosítja a kognitív működést [42], illetve a memória folyamatokat [43].

A disszertációban feldolgozott kísérletsorozatok elméleti alapja, hogy a GAL jelentős szerepet játszik az NH rendszer működésének, a VP kiválasztásának regulációjában [44,45].

A GAL hatásait 3 GAL receptor altípus közvetíti. Ezeket aminosav szekvenciájuk, megoszlásuk, farmakológiájuk és szignál transzdukciójuk különbözteti meg egymástól [46]. A VP termelés és kiválasztás vonatkozásában lényeges, hogy a PVN és a SON magnocelluláris VP neuronjai GAL₁ receptorokat [47-50], az NH sejtek kis koncentrációban GAL₃ receptorokat expresszálnak [51].

Kutatásaink megtervezésében fontos szerepet játszott a tény, hogy a neurotranszmitter GAL szoros kapcsolatban van az agy VP szekréció

szabályozásában is fontos szerepet játszó monoaminerg rendszereivel, a HA-erg [52], a DA-erg [53,54], az 5-HT-erg [55], és az adrenerg rendszerrel [55].

Általánosan elfogadott nézet, hogy a GAL, valamint a monoaminerg rendszerek által kiváltott centrális reguláció két szinten érvényesülhet: hipotalamikus (szomatodendrikus), illetve NH (nerve terminál) szinten, vagy más néven neuron-neuron, vagy neuron-glia interakció eredményeként mehet végbe [4,26,56]. Az irodalmi adatok többsége amellet szól, hogy a GAL, valamint a monoaminerg rendszer a hipotalamusz szomatodendrikus szintjén fejt ki hatását [57-60]. A GAL, a monoaminok, illetve az interakciójuk által kiváltott VP szintézis és kiválasztás NH szinten kevésbé vizsgált problémakör [61]. E megfontolásból kiindulva vizsgáltuk, hogy a fenti neurotranszmitterek izolált NH sejtenyészetben hogyan befolyásolják a pituiciták VP termelését és kiválasztását.

2. Célkitűzés:

In vivo kutatásaink során a következő kérdések megválaszolására törekedtünk:

1. Van-e különbség a patkány, sertés, és humán GAL, valamint a humán GAL fragmenseinek VP szekrécióna gyakorolt hatása között i.c.v. és i.v. adagolás után patkányban?
2. Ozmotikus stimulus (2.5% NaCl oldat) utáni VP koncentráció változásokat hogyan módosítják a különböző GAL fragmensek és származékok?
3. Milyen változást idéz elő a GAL kezelés a nem-oszmotikus inger (HA) által kiváltott VP koncentrációban?
4. A GAL indukálta VP szekrécióna változások kivédhetők-e a GAL antagonistákkal (M15)?
5. A monoaminerg DA milyen hatással van plazma VP koncentrációra, illetve meggátolható-e a DA-okozta változás a DA antagonistákkal (PIM) alkalmazásával?

In vitro kísérleteink segítségével az alábbi kérdésekre kívántunk választ kapni:

1. A GAL-erg rendszer direkt módon hat-e a VP kiválasztásra izolált NH szövetkultúrában?
2. Aspecifikus ozmotikus inger (K^+ adagolás) utáni VP koncentráció változásokat hogyan módosítja a patkány GAL kezelés?
3. Hogyan befolyásolják a monoaminerg vegyületek az NH szövettenyészet felülúszó médiumának VP koncentrációját?
4. Módosítja-e a monoaminerg vegyületek hatását a különböző receptor-specifikus antagonisták alkalmazása?
5. Hogyan hatnak az izolált NH szövetkultúra VP termelésére a GAL-monoaminerg interakciók?

3. Általános módszerek

3.1. *In vivo* kísérletek

Felhasznált állatok: Kísérleteinkhez az Összehasonlító Élettani Tanszék állatházában nevelt, 3-4 hónapos, 180-250 g testtömegű, hím Wistar patkányokat használtunk. Az állatokat standard körülmények (hőmérséklet, világítás, páratartalom) között tartottuk. A patkányok csapvizet ad libitum, és standard granulált patkánytápot (LATI, Gödöllő) kaptak. A kísérleti állatok tartása, ellátása és a kutatási módszerek az SZTE Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság előírásainak megfelelő volt.

Agykanül behelyezése: A műtétet a kísérlet előtt 1 héttel végeztük, éteraltatásban. Az állatot sztereotaxiás készülékben rögzítettük. A fül- és szemvonal között a fejbőrt felemelve kivágtunk egy darabot, a seb környékén a szőrt lenyírtuk. A sebre hidrogén-peroxidos (30%) vattát helyeztünk, amely fertőtlenít és feloldja a kötőszövetet, a csonthártyát is beleértve. Műtét közben az eszközöket hidrogén-peroxiddal fertőtlenítettük. Kis idő múlva eltávolítottuk a vattát, és a felhólyagzott részeket kivágtuk, szikével megtisztítottuk a koponyát, majd a csontot szárazra töröltük. A jobb falcsontba kis lyukat fúrtunk LUER 20G ½ 38/9 injekciós tűből gyártott, 4 mm-nél megjelölt koponyafúróval. A fúrás helye - Praxinos és Watson sztereotaxiás atlaszában [62] leírtak szerint - 0.7 mm anterior és 1.0 mm laterális irányban volt a bregmától. A lyukon keresztül helyeztük a kanült (belső átmérő: 0.4 mm) a jobb oldali laterális agykamrába. A kanül hossza a koponyacsonttól számítva, az állat súlyától függően 3.5 – 4.0 mm volt. A kanült gyorsan szilárduló fogászati cementtel rögzítettük a koponya felszínéhez.

Anyagbeadás előtt a kanült óvatosan, forgató mozdulattal kitisztítottuk, 26 G ½-es tűvel.

Mintavétel: 30 perccel a GAL bejuttatása után az állatokat dekapitáltuk és a vérmintákat hűtött polisztién csövekbe gyűjtöttük. Centrifugálás után (4°C, 4000 rpm) a felülúszó vérplazmából határoztuk meg a VP koncentrációt.

I.c.v. kanül helyének ellenőrzése: a vérminták vétele után a kanülon keresztül 1% metilénkék festéket (Reanal, Budapest) fecskendeztünk az agyba. Ezután a koponyából kiemeltük az agyat és a beszúrás helye előtt pár mm-el megvizsgáltuk az agy keresztmetszetét. Ha a kanül a megfelelő helyen volt, akkor a kamrákban megjelent a festék. Hibásan behelyezett kanülok (összes állat szám 8.5%-a) esetén az eredményeket az értékelésből kihagytuk.

3.2. *In vitro* modellrendszer

Neurohipofízis sejt kultúra

In vitro kísérleteinket Dr. Gálfi Márta főiskolai docens irányította. Az NH sejtjei, a pituiciták módosult gliasejteknek tekinthetők. Ezért modellünk a glia sejt-tenyésztés technikájában szerzett tapasztalatokat használta fel, különös tekintettel az enzimátikus emésztés módszerére [63,64]. A szövetkultúra eljárás részleteivel korábbi publikációk foglalkoztak [5,6,65,66].

Hím Wistar patkányok (180-230 g) hipofízisét - pentobarbital anesztéziában (4.5 mg/kg, Nembutal, Abbott, USA), steril körülmények között - eltávolítottuk. Preparáló mikroszkóp alatt óvatosan elválasztottuk egymástól a hátsó és a középső lebenyt. A hátsó lebeny enzimátikus emésztését 37°C-on, a következő anyagokkal hajtottuk végre:

- 0.2% tripszin (Sigma, Steinheim, Németország) PBS-ben, 30 perc;
- 30 µg/ml kollagenáz (Sigma), 60 perc;
- 300 IU/ml diszpáz (Sigma), 30 perc;
- 10 µg/ml DN-áz I és II (Sigma), 2 x 30 perc.

Az enzimatisz hidrolízist 100 µg/ml tripszin inhibítorral (Sigma) állítottuk meg, majd a szövetet PBS-ben háromszor átmostuk. Ezt követően a sejtek mechanikai disszociáltatásához nylon blutex szűrőt használtunk (pórusátmérő: 100 µm, 80 µm, 48 µm). Végül sejtszám meghatározást és viabilitási tesztet végeztünk.

Sejtszám meghatározás: A sejtszámlálást Bürker-kamrával és/vagy áramlásos-cytometriás méréssel végeztük.

Viabilitási teszt: Trypan-kék oldattal (Sigma) festett sejt környezetben, a sejtek membránjának integritását vizsgálva ellenőriztük a sejtek életképességét. Az alkalmazott festékmolekula fiziológiailag ép membránon nem jut át a mérete miatt. Így az egészséges sejtek nem festődnek. A sejtszám ismeretében, ha a nem festődő sejtek száma $\geq 95\%$, akkor a sejtuszpenziót tovább használtuk vizsgálatainkhoz.

A sejtszám meghatározás (2×10^6), és a viabilitási teszt (99-100%) után a sejteket 2×10^5 sejt/ml koncentrációban, patkány farkok kollagénnel (Sigma) fedett, 24 lyukú tenyésztőedényekben (Costar, USA) tartottuk, 37°C-on, 5% CO₂ jelenlétében. Táploldatuk DMEM-t (Sigma), 20% marha magzati szérumot (Gibco, USA), 100 µg/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint tartalmazott. A sejt kultúrákat naponta mostuk a táploddattal, majd konfluenssé válásuktól kísérleti modellként használtuk.

A szövettenyészet kezdetétől mértük a VP szintet, és megfigyeltük a hormonszekréción időfüggését (1. ábra). A VP 5-6 nap elteltével jelent meg a

médiumban, majd fokozatos koncentrációnövekedés után a 13-14. napon vált konstanssá a hormonszekréción.

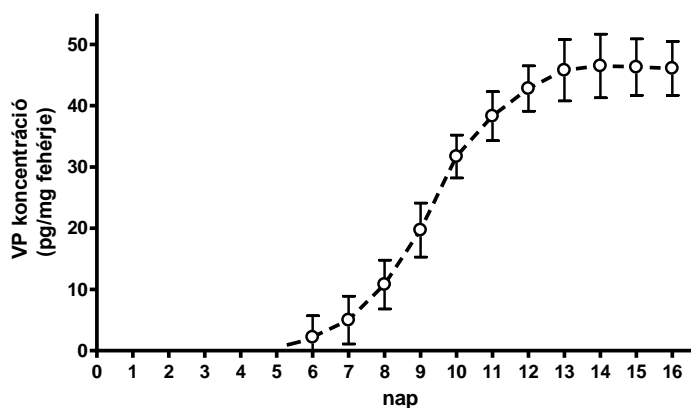
A további *in vitro* kísérletekhez ezért 13-14 napos sejtenyészeteket használtunk.

1. ábra:

A VP szekréción alakulása az izolált sejtkultúrában az eltelt napok függvényében

A felülúszó médium VP tartalma a 6. naptól fokozatosan növekedik, majd a 13-14. naptól eléri maximumát és konstanssá válik.

(n = 10; Átlag ± S.E.M.)



3.3. Vazopresszin radioimmunoassay

A vérmintákat hűtött polistírol csövekbe vettük le [67], melyek 1.4 mg Na₂EDTA-t tartalmaztak 30 µl fiziológiás sóoldatban. A mintákat 4°C-on centrifugáltuk (4000 rpm) 10 percig. A mérésekhez 1 ml plazmát használtunk, melyeket -20°C-on tartottunk. A méréseket a mintavétel után 72 órán belül elvégeztük.

Az NH sejtenyészet hormontartalma a kultúra korának 13-14. napjától volt standard (1. ábra). Ez tette lehetővé az összehasonlító vazopresszin (VP) szint meghatározást. A sejtkultúra médiumaiból 500 µl-t eltávolítottunk Gilson pipettával és -80°C-on tároltuk. A médiumokat, a mintavételt megelőzően, a sejtkultúrák kezelési sémái szerint kezeltük [6].

Az *in vivo* kísérletekből származó vérplazmák, és az *in vitro* sejtenyészetek médiumainak VP szintjét radioimmunoassay (RIA) eljárással határoztuk meg. A

módszer Dogterom és munkatársai [68] által kidolgozott eljárás módosított változata volt [69]. Szintetikus VP-t (Organon, Oss, Hollandia; antidiuretikus aktivitás 408 NE/mg) alkalmaztunk az antitest termeléséhez és az izotópos jelöléshez. VP antitestet birkában, VP-(ϵ -aminocaproicsav)-thyreoglobulin conjugáttal szemben képeztünk. Az antiszérum hígítás 1: 350000. A keresztreakció 23.3% a lizin-8-vazopresszinnel (Organon, Oss, Hollandia), 0.12% a desglycinamid-9-arginin-vazopresszinnel (Organon), kevesebb, mint 0.01% az oxitocinnal (Richter, Budapest, Magyarország), 0.03% az 1-24 ACTH-val (Organon) és 10.7% az 1-deamino-8-arginin-vazopresszinnel (Per Melin, Ferring Research Laboratory, Malmö, Svédország). Hunter és Greenwood [70] chloramine T módszere szerint végeztük a VP 125 I-dal történő jelzését. A jelzett hormon tisztítását reverz fázisú kromatográfiával hajtottuk végre [71]. A jelzett VP specifikus aktivitása: 49.9-61.1 Tbq/mmol. A jelzett VP-t a SZOTE Önálló Endokrin Kutató Laboratóriumában Dr. Gardi János készítette.

Az extrakció párhuzamos minták alkalmazásával történt. Vérplazmák esetén Amprep C8-as oszlopon (RPN 1902, Amersham, U.K.), amely rendszeren a visszanyerés minimálisan 95%. Sejtenyészetek felülúszó médiumaiból extrakció nélkül történt a meghatározás. A kalibrációs görbéket 1-128 pg/cső tartományban készítettük. A hígításokat 1 ml VP mentes plazmában végeztük, melyet Brattleboro homozigóta diabetes insipidus-os patkányokból (CPB-TNO, Zeist, Hollandia) nyertünk. Bepárlás után a liofilizátumot 125 μ l RIA pufferben [68] feloldottuk, és ebből kétszer 50 μ l-t használtunk fel a párhuzamos mérések elvégzéséhez. A módszer érzékenysége 1 pg/ml, az intra- és interassay koefficiense 13.3%. Az adatokat *in vivo* kísérletek esetében pg/ml, illetve *in vitro* kísérletek esetében pg/mg fehérje egységben tüntettük fel.

3.4. Fehérje meghatározás

A kísérleti minták fehérje tartalmának meghatározását spektrofotometriás úton, Lowry módszere alapján végeztük [72].

3.5. Statisztikai analízis

Az adatokat az átlagérték és a középérték szórása alapján adtuk meg az egyes kísérleti csoportoknak megfelelően. Az *in vivo* kísérletek eredményeit Kruskal-Wallis próbának vetettük alá. Az *in vitro* kísérletek eredményeinek statisztikai elemzését Tukey-Kramer-féle páros összehasonlítással végeztük.

A $P < 0.05$ különbséget tekintettük szignifikánsnak.

I. Galanin hatása a vazopresszin kiválasztásra

Bevezetés

A GAL felfedezése óta több tanulmány is rámutatott, hogy a GAL több helyen megtalálható a patkányok hipotalamuszában, [73-75], és a magnocelluláris neuronokban egyidejűleg van jelen az NH hormonokkal, közöttük a VP-vel [55,60,76,77]. Emellett a hipotalamikus magnocelluláris magvak nagy sűrűségben tartalmaznak GAL-kötőhelyeket [77-79].

Ismeretes, hogy dehidráció, vagy hipertóniás sóoldat bevitele miatt kialakuló hiperozmolalitás csökkenti a GAL immunoreaktivitását, és növeli a GAL mRNS szintjét a hipotalamusz magnocelluláris neuronjaiban [59,60]. Az ozmotikus stimulust követő GAL szekréciónak változásai hasonlóan alakulnak, mint a VP szintézisének és kiválasztásának változásai [59]. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az ozmotikus stimulus szerepet játszik a GAL termelésének szabályozásában. A GAL, mint peptid modulátor, viszont részt vesz a VP szekréciónak regulációjában.

E megfontolásból kiindulva *in vivo* (a), illetve *in vitro* (b) körülmények közt végeztük vizsgálatainkat.

a. *In vivo* vizsgálatok

Módszerek

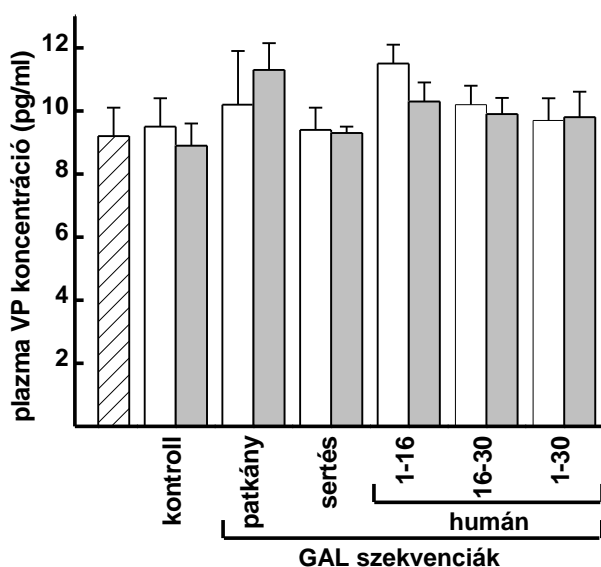
Az alább felsorolt GAL származékokat és fragmenseket Dr. Balásperi Lajos professzor szintetizálta az SZTE ÁOK Orvosi Vegytani Intézetében [80].

1. GAL (patkány, 1-29)
2. GAL (sertés, 1-29)
3. GAL (humán, 1-30)
4. GAL N-terminális fragmens (humán, 1-16)
5. GAL C-terminális fragmens (humán, 16-30)
6. Galantid (M15) - GAL antagonistá

Az GAL vegyületeket a laterális farokvénába, 1.0 nmol (3.2 µg) dózisban, 200 µl fiziológias sóoldatban adagoltuk. I.c.v. bejuttatáshoz Hamilton fecskendőket használtunk és az anyagokat 1 perc alatt adtuk be. A patkány, sertés és humán GAL i.c.v. adagolásakor 100 pmol (0.32 µg) -t használtunk 10 µl fiziológias sóoldatban. A GAL 1-16 és 16-30 fragmenseket i.c.v. 100 pmol (0.17 µg) /10 µl fiziológias sóoldat dózisban adtuk. A GAL antagonistá M15 i.c.v. mennyisége 10.0 nmol (22 µg) volt 10µl fiziológias sóoldatban feloldva, és 15 perccel a GAL kezeléseket előtt alkalmaztuk. A GAL-ok és az M15 dózisát Landry [45] közleménye alapján választottuk. A kontroll állatok i.c.v. 10 µl fiziológias sóoldatot kaptak. Az ozmotikus stimulust 2.5%-os NaCl oldattal idéztük elő i.p. (2 ml/100 g testsúly) közvetlenül a GAL származék beadása előtt. A patkányok dekaptálása és a vérminták gyűjtése minden esetben a GAL kezelés után 30 perccel történt.

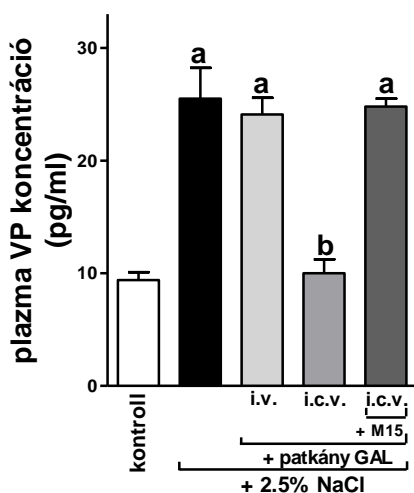
Eredmények

A patkány, sertés és humán GAL, valamint a humán GAL 1-16 N-terminális és 16-30 C-terminális fragmense i.v., vagy i.c.v. adagolást követően nem okozott szignifikáns változást a plazma VP koncentrációjában (2. ábra).



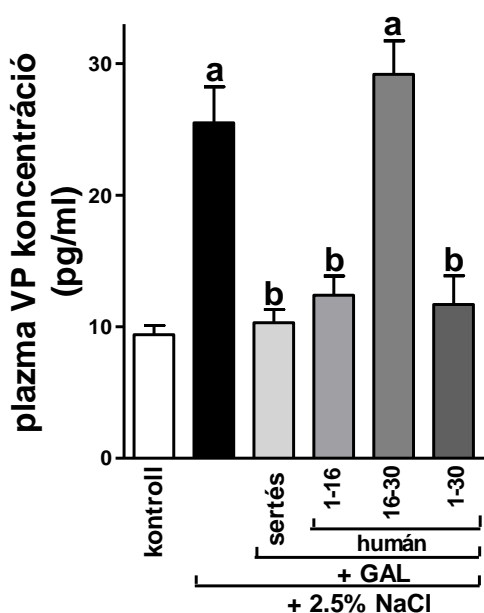
2. ábra:
Patkány, sertés és humán GAL, valamint a humán GAL 1-16 és 16-30 fragmens hatása a plazma VP koncentrációra i.c.v., vagy i.v. adagolás után, az abszolút kontroll és a 10 µl fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll állatok VP szintjéhez viszonyítva
 I.c.v., vagy i.v. patkány, sertés és humán GAL, valamint a humán GAL 1-16 és 16-30 fragmens kezelés nem okozott szignifikáns változást a bazális plazma VP koncentrációban.
 ▨ abszolút kontroll
 □ i.c.v. kezelés
 ■ i.v. kezelés
 (n = 8-12; Átlag ± S.E.M.)

2.5% -os NaCl oldat adagolása jelentős emelkedést váltott ki a plazma VP szintben (3. ábra). I.c.v. adagolt patkány GAL kivédte a 2.5% -os NaCl okozta plazma VP szint növekedését, i.v. kezelés után a VP koncentráció azonban nem tért vissza a normális szintre. Az előzőleg i.c.v. beadott GAL antagonistá M15 megakadályozta az i.c.v. patkány GAL 2.5% -os NaCl okozta plazma VP szint emelkedésére gyakorolt gátló hatását.



3. ábra:
Patkány GAL és GAL antagonistá M15 hatása a 2.5%-os NaCl oldat által kiváltott plazma VP koncentráció változásokra
 2.5%-os NaCl oldat adagolása után a plazma VP koncentráció szignifikánsan emelkedett, ami i.v. patkány GAL kezeléssel nem volt redukálható. I.c.v. patkány GAL adagolása a 2.5%-os NaCl-ozokta emelkedést kivédte. Az i.c.v. patkány GAL beadása előtt alkalmazott M15 kezelés megakadályozta az i.c.v. patkány GAL azon hatását, mely az ozmotikus stimulus utáni megemelkedett VP szintet redukálja.
 (n = 8-12; Átlag ± S.E.M.;
^aP < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz viszonyítva;
^bP < 0.05, szignifikáns különbség a 2.5%-os NaCl-kezelt csoporthoz viszonyítva.)

Mivel az i.v. kezelés eredménytelen volt, ezért a sertés és humán GAL, valamint a humán GAL 1-16 és 16-30 fragmens VP szekrécióra gyakorolt hatását csak i.c.v. kezelés után hasonlítottuk össze (4. ábra). 2.5% -os NaCl adagolása után szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a plazma VP szintben. Ez a növekedés kivédhető volt sertés, humán, vagy humán GAL 1-16 fragmens i.c.v. kezeléssel. Viszont a humán GAL 16-30 fragmens nem csökkentette a 2.5% -os NaCl oldat okozta VP koncentráció fokozódást.



4. ábra:

Sertés és humán GAL, valamint a humán GAL 1-16 és 16-30 fragmensének hatása a 2.5%-os NaCl oldat okozta plazma VP szint emelkedésre

2.5%-os NaCl oldat adagolása után a plazma VP koncentráció szignifikánsan emelkedett.

A sertés és a humán GAL, valamint a humán GAL 1-16 fragmense kivédte a 2.5%-os NaCl adagolása után bekövetkező plazma VP szint emelkedést.

A humán GAL 16-30 fragmens hatástalannak bizonyult 2.5%-os NaCl kezelés után.

(n = 8-12; Átlag ± S.E.M.;

^aP < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz viszonyítva;

^bP < 0.05, szignifikáns különbség a 2.5%-os NaCl-kezelt csoporthoz viszonyítva.)

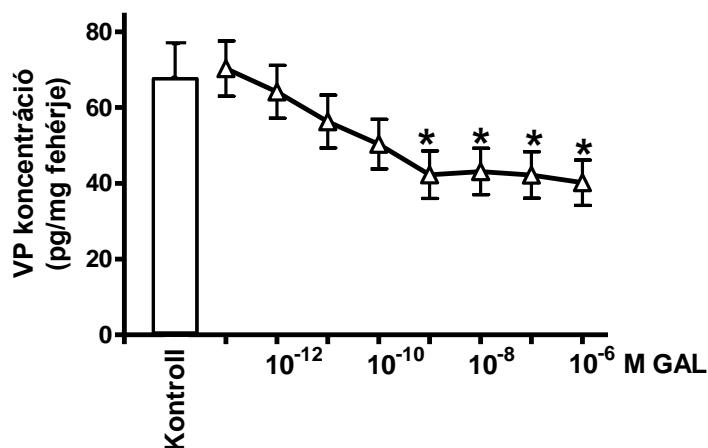
b. *In vitro* vizsgálatok

Módszerek

A dózis-hatás összefüggés vizsgálatok több koncentrációban (10^{-13} – 10^{-6} M) GAL-t adagoltunk a médiumokhoz. 1 óra inkubálás után mértük a felülúszó médium VP szintjét. A kinetikus görbét 10^{-8} M GAL adagolása után vizsgáltuk. Nem specifikus ozmotikus ingerként K^+ -t adtunk a felülúszó médiumhoz 30 mM koncentrációban és 1 óra inkubációs idő elteltével meghatároztuk a médium VP koncentrációját. GAL és K^+ interakció vizsgálatok 20 perces GAL (10^{-6} M) előinkubáció után alkalmaztuk az 1 órás K^+ (30 mM) kezelést.

Eredmények

Az adagolt GAL dózisa és az NH szövettenyészet VP termelése közötti dózis-hatás kapcsolatot illusztrálja az 5. ábra. 10^{-9} – 10^{-6} M GAL kezelés jelentős VP tartalom csökkenést okozott a felülúszó médiumban.



5. ábra:

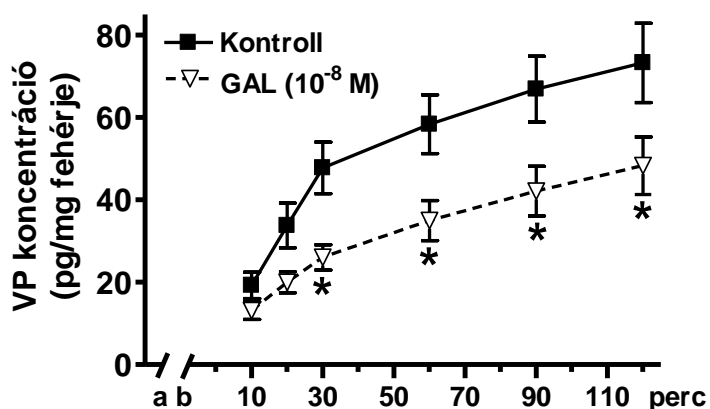
GAL hatása a VP termelésre

10^{-9} – 10^{-6} M dózisú GAL adagolása után a médium VP koncentrációja szignifikánsan, dózistól függően csökkent.

(n = 9; Átlag ± S.E.M.;

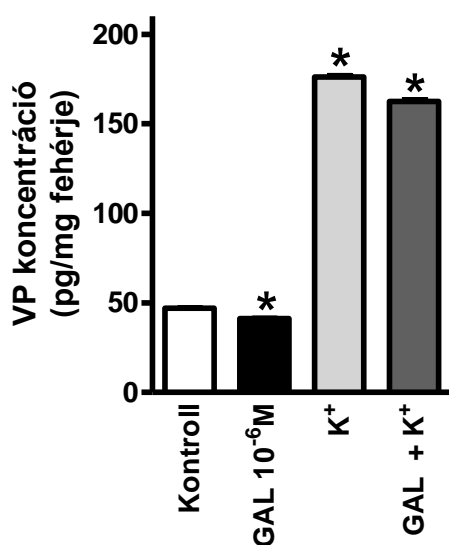
*P < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz viszonyítva.)

A VP szint kinetikus görbáját a felülúszó médiumban a 6. ábrán tüntettük fel. Megállapítható, hogy a VP koncentráció a kontroll médiumban fokozatosan emelkedett, az inkubációs időtől függően. 10^{-9} M GAL a 30-120 perces inkubációs periódusban szignifikáns módon csökkentette a VP szintet.



6. ábra:
VP termelés kinetikus görbéje GAL adagolás után
 GAL adagolása szignifikáns VP szekréció csökkenést eredményezett a felülúszó médiumban. (n = 6; Átlag ± S.E.M.; *P < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll médiumokhoz viszonyítva; a: előinkubációs idő (60 perc) b: mosás 3x).

A médiumhoz adott aspecifikus, ozmotikus ingert kiváltó K^+ (30 mM) jelentősen növelte a VP tartalmat. Előzetesen bejuttatott GAL nem befolyásolta a VP szint emelkedést (7. ábra).



7. ábra:
GAL és K^+ hatása a VP termelésre
 K^+ (30 mM) hatására jelentősen emelkedett a VP szint a felülúszó médiumban. Előzetes GAL kezelés nem változtatta meg a K^+ hatását. (n = 8; Átlag ± S.E.M.; *P < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll médiumokhoz viszonyítva.)

Megbeszélés

A témakörhöz kapcsolódó szakirodalomban számos publikáció foglalkozik a GAL-nak a hipofízis hormonkiválasztására gyakorolt hatásával. Szintetikus humán GAL i.v. adagolás szignifikáns emelkedést váltott ki a vérplazma humán növekedési hormon koncentrációjában, de a VP szintben jelentős változás nem történt [81]. Bauer és munkatársai [36] korábban leírták, hogy egészséges emberekben az i.v. sertés GAL kezelés fokozta a plazma humán növekedési hormon és a prolaktin szintet. Rendszeres GAL adagolás mérsékelt és rövid vérnyomás emelkedést, valamint enyhe diurézist idézett elő, de az i.v. GAL bejuttatás nem befolyásolta a VP okozta antidiuretikus hatást [60].

A disszertációban bemutatott *in vivo* kísérletek során az i.v. GAL kezelés nem változtatta meg sem a bazális plazma VP szintet, sem a hiperozmotikus stimulust követően megemelkedett VP koncentrációt. I.c.v. GAL adagolás hatástalannak bizonyult a bazális VP szint vonatkozásában. Ez a megfigyelés megegyezik Balment és al Barazanji [82] észlelésével. A hipertóniás NaCl oldat beadása utáni plazma VP tartalom fokozódást az i.c.v. GAL adagolás megszüntette. Hasonló eredményeket publikált Kondo és kutatócsoportja [44,83]. Más kísérletek is a VP termelés és a GAL-erg rendszer közötti szoros kölcsönhatást igazolták: ozmotikus stimulus hatására a SON és a PVN VP és GAL mRNS tartalma hasonlóan fokozódott [59,84]. Újabbban azonosítottak egy 60 aminosavból álló új vegyületet, a GAL-szerű peptidet (GALP) [51]. Hiperozmotist követően a GALP mRNS mennyiségének csökkenése figyelhető meg az NH-ban [61].

In vivo kísérleteinkkel a humán 1-16 N-terminális és 16-30 C-terminális GAL fragmensek ozmotikus stimulust követő plazma VP szekrécióra gyakorolt hatását

is tanulmányoztuk. Tapasztalataink szerint az 1-16 N-terminális fragmens mérsékelte a plazma VP szint emelkedését. Ugyanezt az eredményt kaptuk, amikor a teljes GAL molekulát adagoltuk. Eredményeink megfelelnek a Landry és munkatársai [45] által leírt észlelésnek, akik a hipotalamikusan VP mRNS tartalmat mérték. Ezzel ellentétben a 16-30 C-terminális GAL fragmens nem okozott szignifikáns változást. Megfigyeléseink alapján elmondhatjuk, hogy a 1-16 N-terminális GAL fragmens tartalmazza a GAL molekula biológiai aktív centrumát. Mivel az N-terminális 1-15 aktív centrum aminosav szekvenciája megegyezik a patkány, sertés és humán GAL-ban, nem meglepő, hogy ezeknek a GAL származékoknak a VP szekréciónak gyakorolt hatása is hasonlóan bizonyult.

Az elmúlt 10-12 évben számos GAL receptor antagonistát fedeztek fel, amelyek affinitása a GAL receptorokhoz nagyobb, mint magának a GAL-nak. Ezek az antagonisták mindegyik GAL-érzékeny rendszerben gátolják a GAL effektusait [85,86]. A GAL antagonisták közül a galantid (M15) volt az első, amelyet széles körben használtak az endogén GAL élettani hatásainak tanulmányozásakor [85,86]. Landry és munkatársai [45] leírták, hogy az M15 kezelés megszünteti a dehidrált patkányok hipotalamuszának magnocelluláris régiójában a GAL által előidézett VP mRNS szint csökkenést, és növeli a VP mRNS tartalmat a kontroll patkányokban. Az a tény, hogy az M15 hatékonyan bizonyult a GAL VP mRNS-re kifejtett hatásának gátlásában, arra utal, hogy hipotalamikusan szinten a GAL receptoroknak szerepe van a VP-erg sejtek regulációjában. A GAL kezelés specifitását felméréséhez megvizsgáltuk az M15 hatását, amelyet a GAL adagolás előtt alkalmazott 2.5% NaCl oldat által megemelt plazma VP szintre gyakorolt. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy az M15, mint nem-szelektív GAL

receptor antagonist [87], képes megakadályozni a GAL VP szekrécióna kifejtett gátló hatását.

A szakirodalom főként hipotalamikusan szinten vizsgálja a GAL szerepét a vízanyagcsere szabályozásában [57-60]. A VP kiválasztás GAL-erg regulációja, amely speciálisan az NH idegvégződéseken megy végbe, még kevésbé ismert [61]. További vizsgálatok voltak szükségesek ahhoz, hogy tisztázni tudjuk a GAL-erg szabályozás hatásának pontos helyét/szerepét a VP kiválasztásban [44]. Az NH sejtek aktív szerepének hipotézisét Boersma és Van Leeuwen [4] írta le, akik a pituiciták sejtmembránján neuropeptid receptorok jelenlétét igazolták. Shen és kutatócsoportja [61] rámutatott, hogy dehidrációval kiváltott ozmotikus stimulus hasonlóan fokozta a pituiciták GALP és VP mRNS szintjét.

Végül az aspecifikus ozmotikus inger hatását vizsgáltuk a VP szekrécióna NH szövetnyészében. K^+ -ot adtunk a felülúszó médiumhoz és jelentős VP koncentráció növekedést észleltünk, mely előzetes GAL kezeléssel nem volt kivédhető. Mivel a K^+ hormonszekrécióna fokozó hatása nem receptorokhoz kötött, ebből arra következtethetünk, hogy a GAL-monoaminerg interakció a specifikus receptorok közreműködésével érvényesül [88,89].

In vitro vizsgálataink arra utalnak, hogy a VP kiválasztás GAL-erg szabályozása a hipotalamusztól függetlenül, a hipofízis hátsólebeny szintjén is érvényesül.

Következtetések

Eredményeinket összefoglalva elmondható, hogy a GAL-nak élettani szerepe van az ozmotikus stimulust követő VP kiválasztás regulációjában. Nem találtunk szignifikáns különbséget a stimulációt követően emelkedő plazma VP koncentráció vonatkozásában az i.c.v. patkány, sertés, vagy humán GAL gátló hatása között. Ebből a szempontból az 1-16 N-terminális fragmens tűnik a GAL molekula biológiailag aktív részének. Izolált NH szövettenyészetben végzett kísérleteink arra utalnak, hogy a GAL közvetlenül az NH sejtekre, a pituicitákra hatva is képes a VP szekrécióra gyakorolt hatását kifejteni.

II. Hisztamin hatása a vazopresszin kiválasztásra

Bevezetés

A HA neurotranszmitterként működik a hipotalamuszban [90,91]. Szerepet játszik az adenohipofízis hormonok szekréciójának központi szabályozásában [22] és az NH hormonok kiválasztásában [23]. Számos közlemény bizonyítja, hogy a HA növeli a plazma VP koncentrációját [92-95] és aktiválja a magnocelluláris régió, a SON és PVN neuronjait [96-99]. Kjaer és munkatársai leírták, hogy HA hatására emelkedik a VP mRNS szint a SON-ban és PVN-ben [99,100]. A HA szerepét a VP szekréció szabályozásában igazolja az a tény is, hogy a HA-erg rendszer gátlása mérsékli a dehidráció által előidézett VP szint emelkedést [99,101,102].

I.p., illetve i.c.v. HA adagolás is gyors és erőteljes VP koncentráció emelkedést okoz a vérplazmában. Az i.c.v. adagolás hatékonyabbnak bizonyult, mint az i.p. bejuttatás [103].

A kísérletek többsége hipotalamikus szinten vizsgálja a HA és a VP szekréció összefüggését. Az idevonatkozó szakirodalomban csak néhány adat demonstrálja, hogy a HA-erg rendszer - a hipotalamusztól függetlenül - direkt módon befolyásolja az NH VP kiválasztását [104-106].

a. *In vivo* vizsgálatok

Az *in vivo* kísérletek során az i.p. bejuttatott HA hatását tanulmányoztuk a plazma VP szintre. Ezen túlmenően a GAL-HA interakciót vizsgáltuk a VP szekréció szabályozásának vonatkozásában.

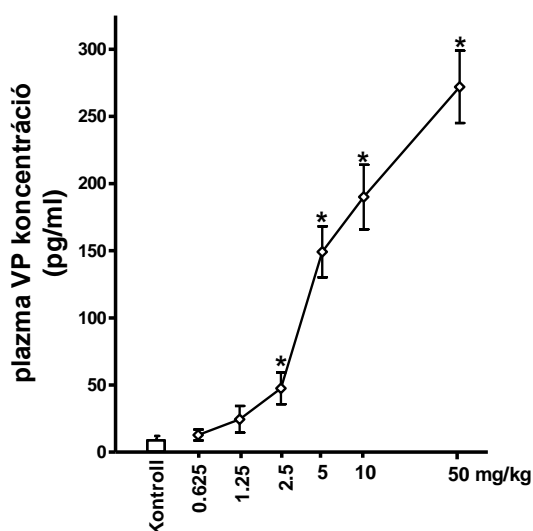
Módszerek

A HA dózis-hatás görbéjének meghatározásához több dózisban i.p. adagoltunk HA-t (Histaminum-bihydrochloricum, Chinoi, Budapest). 10 perc elteltével dekaptáltuk a kísérleti állatokat és vérmintákat vettünk a plazma VP koncentrációjának meghatározásához. Az időkinetikai változásokat 50 mg/kg testsúly dózisú HA i.p. bejuttatása után vizsgáltuk.

A GAL-HA interakció vizsgálatához az i.c.v. GAL kezelés után 15 perccel adagoltuk a HA-t, i.p. 0.1 mg/kg testsúly dózisban. A bejuttatott GAL, illetve M15 dózisa megegyezett a 18. oldalon megadottakkal. Az M15 kezelést 15 perccel a GAL adagolás előtt alkalmaztuk. A vérmintavétel 30 perccel a GAL kezelés után történt.

Eredmények

A növekvő dózisban adagolt HA és a plazma VP koncentráció közötti dózis-hatás összefüggést szemlélteti a 8. ábra. A HA adagolás plazma VP szint emelkedést idézett elő. A kontrollhoz viszonyítva 2.5 mg/kg dózisú HA beadása után vált szignifikánssá a különbség. Tovább növelve a HA dózisát a plazma VP tartalmának lineáris emelkedését detektáltuk.



8. ábra:

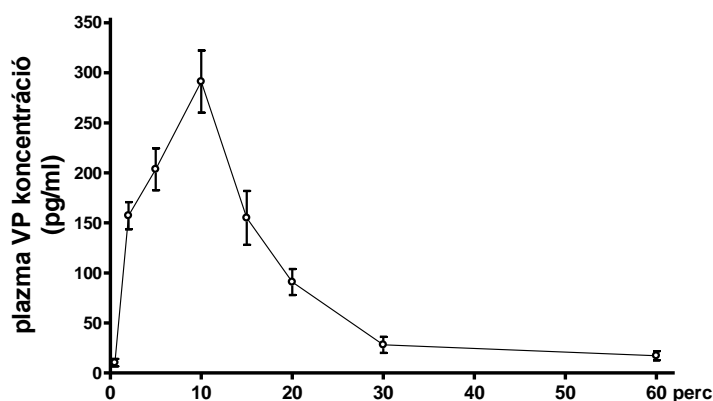
HA adagolás és plazma VP tartalom dózis-hatás összefüggése

I.p. HA kezelés hatására dózistól függő módon, lineárisan emelkedett a plazma VP szint. A fokozódás 2.5 mg/100 g dózis bejuttatása után vált szignifikánssá.

(n = 5; Átlag ± S.E.M.;

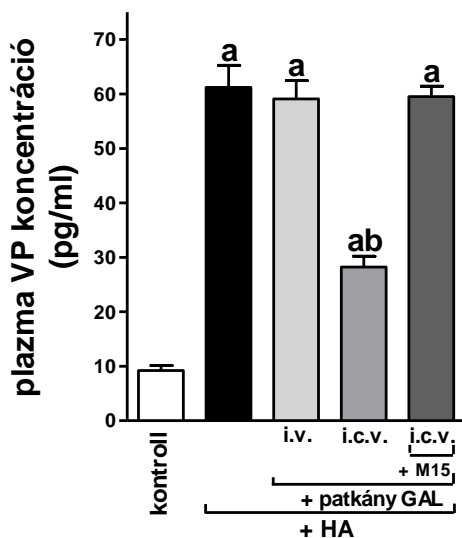
*P < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz viszonyítva.)

50 mg/kg HA adagolást követően megállapítottuk a plazma VP tartalmának időkinetikai görbét (9. ábra). HA hozzáadása után a plazma VP szintje gyors ütemben emelkedett. 10 perc elteltével mértük a legnagyobb VP koncentrációt, utána a VP szint fokozatosan mérséklődött. 1 órával a HA kezelés után a plazma VP tartalma a kiindulási szintre csökkent.



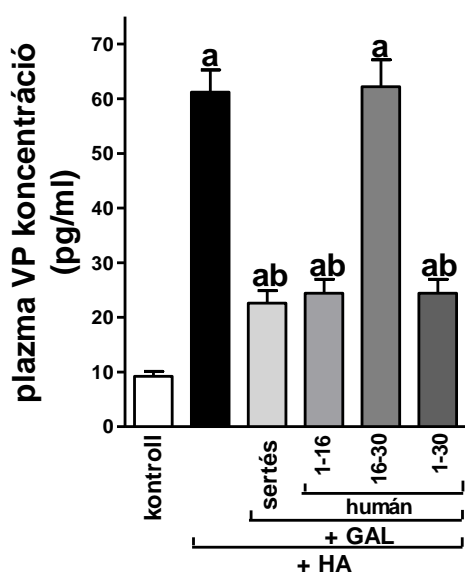
9. ábra:
Plazma VP tartalom kinetikus görbéje HA adagolás után
 I.p. HA kezelés hatására gyors ütemben emelkedett a plazma VP szintje. 10 perc múlva mértük a legmagasabb VP koncentrációt, aztán a VP szint fokozatosan csökkent.
 (n = 5; Átlag ± S.E.M.)

A következőkben a HA és GAL interakciót vizsgáltuk. Az i.p. HA kezelés szignifikánsan emelte a plazma VP koncentrációt. I.v. patkány GAL adagolást követően ez a fokozódás nem változott. I.c.v. patkány GAL csökkentette a HA által előidézett VP szint emelkedését, de a plazma VP koncentrációja magasabb maradt, a kezeletlen kontroll állatokhoz viszonyítva. Az előzetes i.c.v. M15 kezelés megakadályozta, hogy az i.c.v. patkány GAL mérsékelje a HA indukálta plazma VP szint emelkedést (10. ábra).



10. ábra:
Patkány GAL és GAL antagonist M15 hatása a HA által kiváltott plazma VP koncentráció változásokra
 HA kezelés hatására a plazma VP koncentráció szignifikánsan növekszik, ami i.v. patkány GAL kezeléssel nem redukálható. I.c.v. patkány GAL adagolása a HA által előidézett VP szint emelkedést csökkenti, de a plazma VP koncentrációja magasabb marad, mint a kontroll állatokban. Az i.c.v. patkány GAL beadása előtt alkalmazott M15 kezelés megakadályozza az i.c.v. patkány GAL VP szintet redukáló hatását.
 (n = 8-12; Átlag ± S.E.M.;
^aP < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz viszonyítva;
^bP < 0.05, szignifikáns különbség a HA-kezelt csoporthoz viszonyítva.)

HA i.p. adagolása után a plazma VP koncentráció magasabb szintre emelkedett, mint az ozmotikus stimulust követően. Sertés, humán, vagy humán GAL 1-16 fragmens i.c.v. kezelés egyaránt csökkentette a HA indukálta plazma VP koncentráció emelkedését, a VP szint azonban ezután is magasabb maradt, mint a kontroll patkányokban. Az i.c.v. humán GAL 16-30 fragmens ebben az esetben is hatástalan maradt (11. ábra).



11. ábra:

Sertés és humán GAL, valamint a humán GAL 1-16 és 16-30 fragmensének hatása a HA okozta plazma VP szint emelkedésre

HA adagolása után a plazma VP koncentráció szignifikánsan emelkedik.

A HA okozta VP koncentráció növekedést redukálja a sertés és a humán GAL, valamint a humán GAL 1-16 fragmense. de a plazma VP szint magasabb marad, mint a kontroll állatokban.

A humán GAL 16-30 fragmens hatástalannak bizonyul HA kezelés után.

(n = 8-12; Átlag ± S.E.M.;

^aP < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz viszonyítva;

^bP < 0.05, szignifikáns különbség a HA-kezelt csoporthoz viszonyítva.)

b. *In vitro* vizsgálatok

In vitro vizsgálataink során az izolált NH szövettenyészet VP szintézisére és szekrécijára gyakorolt HA hatást kívántuk tanulmányozni. Arra a kérdésre is választ kerestünk, hogy a GAL kezelés módosítja-e a HA által előidézett VP szekréciónak változásokat.

Módszer

Kísérleteink ezen fázisában a korábban leírt módszerrel tenyésztett NH szövetkultúrákat alkalmaztuk. A HA dózis-hatás görbéjének meghatározásához növekvő koncentrációban HA-t (10^{-10} - 10^{-4} M) adagoltunk a tenyészetekhez, majd 1 óra inkubálás után mértük a koncentrált médium VP szintjét.

Az NH szövettenyészet VP szekrécijának idő-kinetikai vizsgálatához - HA és/vagy HA antagonistá (10⁻⁶ M) 1 órás előkezelés után - a következő 90 percben 100 µl mintát vettünk a médiumokból, az első 30 percben 10 percenként, utána 30 percenként.

Az alább felsorolt HA agonistát és antagonistákat adagoltuk a monolayer szövetkultúrák médiumaihoz (Sigma, Steinheim, Németország):

1. Hisztamin (HA)
2. Mepyramin (MEP, H₁ receptor antagonist)
3. Cimetidin (CIM, H₂ receptor antagonist)
4. Thioperamid (TPE, H_{3,4} receptor antagonist)

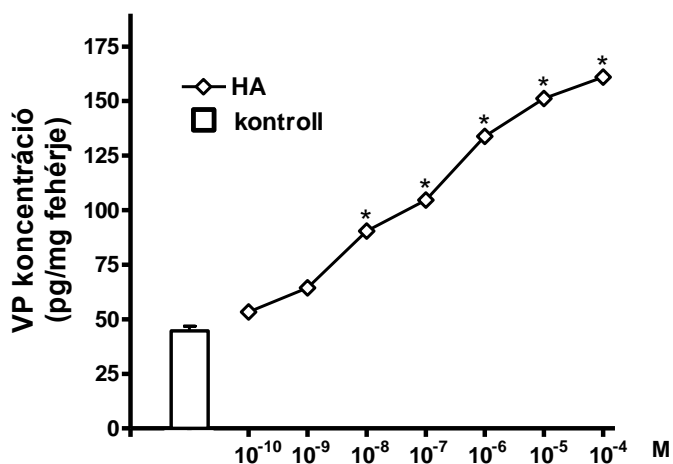
HA és antagonistái közötti interakció vizsgálatához megmértük a 10⁻⁶ M HA, 10⁻⁶ M MEP, 10⁻⁶ M CIM, 10⁻⁶ M TPE adagolást és 1 óra inkubálási időt követő VP szintet a médiumokban. Majd megvizsgáltuk az antagonistákkal történő, 20 perces

előkezelést követő HA adagolás hatását az VP szintre. A mintavételt 1 óra inkubációs idő előzte meg. A következő kísérleti fázisban 20 perces HA előkezelést alkalmaztunk. Az antagonistákat ezután adtuk a médiumokhoz, majd 1 óra múlva vettünk mintát.

GAL és HA interakciójának tanulmányozásakor 1 órával a HA kezelés előtt GAL-t adagoltunk a sejtenyészetek egyik csoportjához. A másik csoportnál a HA adagolás 1 órával megelőzte a GAL kezelést. Mindkét csoport esetében a kezeléseket 1 órás inkubáció követte, ezután meghatároztuk a felülúszó médiumok VP koncentrációját.

Eredmények

Az izolált NH szövetkultúra felülúszó médiumához adagolt HA dózisa és a szövettenyészet VP szekréciója közötti dózis-hatás összefüggést szemlélteti a 12. ábra.



12. ábra:

HA hatása az NH VP termelésére

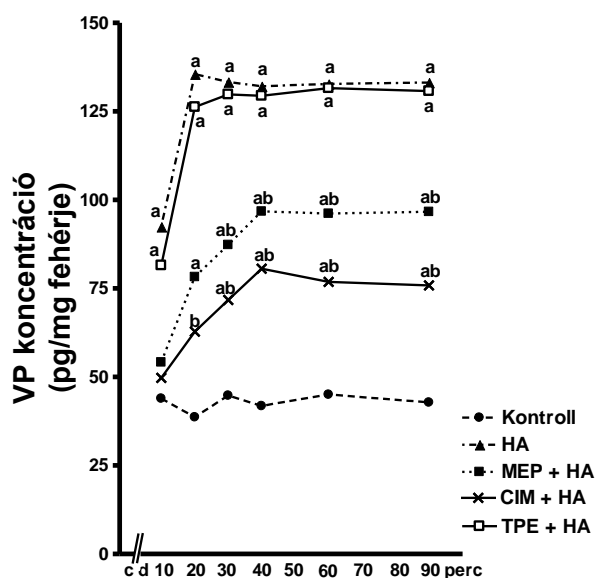
HA növekvő dózisú adagolása (10^{-10} - 10^{-4} M) után fokozatos VP koncentráció emelkedés tapasztalható a felülúszó médiumban.

(n = 8; Átlag ± S.E.M.;

* P < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz viszonyítva.)

10^{-8} M dózisban adagolt HA hatására a szövettenyészet médiumában szignifikáns VP koncentráció emelkedést figyeltünk meg. HA-t növekvő koncentrációban (10^{-7} - 10^{-4} M) adagolva, a felülúszó médium VP tartalmának lineáris, dóziszfüggő emelkedését detektáltuk.

HA adagolást követően megállapítottuk a szövetkultúra felülúszó médiumából mérhető VP tartalom időkinetikai görbét (13. ábra).



13 ábra:
HA és antagonistáinak hatása VP termelés kinetikus görbéjére

HA adagolása szignifikáns VP szekréció emelkedést eredményezett a felülúszó médiumban. HA kezelést megelőző HA antagonisták MEP, vagy CIM hozzáadása részben blokkolta a HA VP szekréciót növelő effektusát. TPE hatástalan volt az HA indukálta emelkedett VP koncentráció vonatkozásában.

(n = 6; Átlag ± S.E.M.;

^aP < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll médiumokhoz viszonyítva;

^bP < 0.05, szignifikáns különbség a HA-kezelt médiumokhoz viszonyítva;

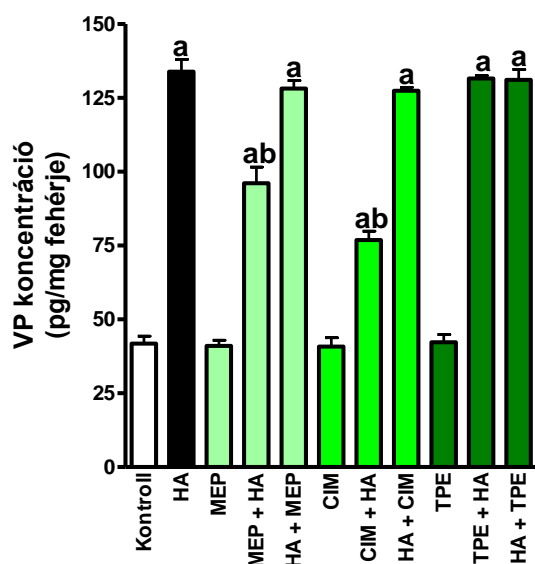
c: előinkubációs idő (60 perc)

d: mosás 3x)

HA hozzáadása után a szövettenyésztés médiumának VP koncentrációja a megfigyelési idő első 20 percében gyors ütemben növekedett, és 20 perc után állandó magas szinten maradt. HA antagonisták MEP, vagy CIM kezelés hatására a VP tartalom a kontroll szinten maradt a megfigyelési periódus első 10 percében. A továbbiakban a hormon szintje megemelkedett a kontrollhoz képest, MEP és CIM nem tudta teljesen kivédeni a HA okozta VP szekréció fokozódást. TPE adagolása nem befolyásolta a HA VP koncentráció növelő hatását.

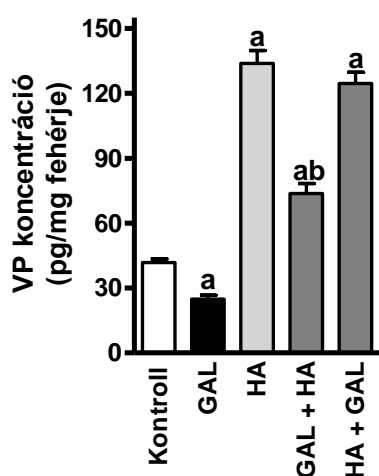
A HA és a HA antagonisták hatásának, illetve interakciójának eredményét szemlélteti a 14. ábra. HA adagolást és 1 órás inkubálást követően emelkedett VP szekréciót mutattunk ki az NH szövetkultúra felülúszó médiumából. A kísérletek során felhasznált HA antagonisták nem változtatták meg a médium VP tartalmát. Abban az esetben, amikor HA bejuttatását megelőzően MEP, vagy CIM kezelést alkalmaztunk, a HA indukálta VP koncentráció emelkedés szignifikánsan kisebb mértékű volt, de a hormonszint a kontroll koncentráció felett maradt.

Előzetes TPE adagolás nem mérsékelte a HA által előidézett VP szekréciónövekedést. A HA kezelést követően adagolt HA antagonisták nem csökkentették a HA által fokozott VP termelést.



14. ábra:
HA és HA antagonistá vegyületek (MEP, CIM, TPE) hatása a VP termelésre
 HA kezelés hatására, 1 órás inkubálás után megemelkedett a VP szint. HA antagonisták önmagukban nem okoztak változást a hormonszekréciónban. A HA adagolást megelőző MEP, vagy CIM kezelés redukálta a HA indukálta VP koncentráció növekedést. Előzetes TPE kezelés hatástalannak bizonyult a HA indukálta VP szekréciónövekedés vonatkozásában. A HA kezelés után adagolt HA antagonisták nem csökkentették a VP koncentráció növekedést. (n = 8; Átlag ± S.E.M.;
^aP < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll médiumokhoz viszonyítva;
^bP < 0.05, szignifikáns különbség a HA-kezelt médiumokhoz viszonyítva.)

A HA és GAL közötti interakciót vizsgálva megállapítottuk, hogy GAL adagolás csökkentette a médium VP szintjét, HA kezelés pedig szignifikánsan növelte a szövetkultúra VP szekréciónövekedését. Előzetes GAL kezelés jelentősen mérsékelte a HA által előidézett VP koncentráció emelkedését. HA kezelés után alkalmazott GAL adagolás sikertelennek bizonyult, nem mérsékelte a HA okozta magasabb VP szintet (15. ábra.).



15. ábra
GAL és HA interakciójának hatása a VP szekréciónra
 HA adása után szignifikáns VP szekréciónövekedést detektáltunk a felülszó médiumban. HA adagolást megelőző GAL előkezelés jelentősen csökkentette a HA által indukált VP szint fokozódását. HA kezelés után adagolt GAL hatástalannak bizonyult. (n = 10, Átlag ± S.E.M.;
^aP < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll médiumokhoz viszonyítva;
^bP < 0.05, szignifikáns különbség a HA-kezelt médiumokhoz viszonyítva.)

Megbeszélés

A kísérleteink során az i.v. GAL kezelés nem változtatta meg a HA adagolást követően megemelkedett VP koncentrációt. I.c.v. GAL kezelés hatástalannak bizonyult a bazális VP szekréció vonatkozásában, amely eredmény teljes mértékben megegyezik Balment és al Barazanji [82] megfigyelésével. I.c.v. GAL adagolás azonban részben kivédte a HA kezelést követő plazma VP szint fokozódást.

Tapasztalataink szerint az 1-16 N-terminális GAL fragmens mérsékelte a plazma VP szint növekedését. Ugyanezt figyelhettük meg, amikor a teljes hosszúságú GAL szekvencia kezelést alkalmaztuk. Eredményeink megerősítik a korábban tett megállapításokat, mely szerint a 1-16 N-terminális GAL fragmens tartalmazza a GAL molekula biológiai aktív centrumát, és mivel az N-terminális 1-15 aktív centrum aminosav szekvenciája megegyezik a patkány, sertés és humán GAL-ban, nem meglepő, hogy ezeknek a GAL származékoknak a VP szekrécióra gyakorolt hatása is hasonlóan bizonyult.

A GAL kezelés specificitásának felméréséhez megvizsgáltuk az M15 hatását, amelyet a GAL adagolás előtt alkalmazott HA adagolás okozta fokozott plazma VP szintre gyakorolt. Ebben a kísérletsorozatban is beigazolódtott, hogy az M15, mint nem-szelektív GAL receptor antagonist [87], kivédi a GAL gátló hatását a fokozott VP kiválasztás vonatkozásában.

Ezen megfigyeléseink eredményei megegyeznek a GAL és az ozmotikus stimulus alkalmazása során végzett kísérletek eredményeivel. A különbség az, hogy ozmotikus stimulus után a GAL kivédte VP koncentráció emelkedését, viszont a HA adagolást követő VP szint fokozódást csak csökkenteni tudta. Ennek oka, hogy a HA jóval erőteljesebben fokozta a VP termelést és kiválasztást.

Az NH hormon kiválasztására kifejtett HA hatásokra irányuló morfológiai és funkcionális kutatások általában a hipotalamikus regulációra vonatkoznak. Az NH sejtek (pituiciták) szerepe a HA által indukált VP szekréciónak változásában kevésbé vizsgált kérdés. A disszertációban bemutatott eredmények arra utalnak, hogy NH szinten a HA-nak fontos reguláló szerepe van a VP kiválasztásban.

Korábbi tapasztalatok szerint a HA adagolás, *in vitro* körülmények között, nem okozott VP kiválasztást az NH-ban [105], és hipofízis-irtott patkányokban az antidiuretikus reakció is változatlan maradt [107]. Ezért más szerzők kétkedéssel fogadták, hogy HA kezelés hatására az NH-ban direkt VP kiválasztás detektálható.

Eredményeink megerősítik azt a nézőpontot, amely szerint az NH HA receptorokat tartalmaz. Felmerül a kérdés, melyik receptor a felelős a VP szekréciónak az NH-ban. Napjainkig négy HA receptor típust írtak le [108-110]: A H₁ receptor gént 1991-ben Yamashita és munkatársai [111], a H₂ receptor génjét pedig - szintén 1991-ben - Gantz és kollégái [112] klónozták. A H₃ [113] és H₄ receptorokat [109] majd egy évtizeddel később fedezték fel. Számos publikáció jelent meg a HA receptorok működésével kapcsolatban, de funkciójuk nincs teljes mértékben tisztázva. A H₁ receptornak az allergiás tünetek manifesztálódásában van szerepe. A H₂ receptor kontrollálja a gyomorsav szekréciónak. A H₃ receptor fontos tényező a központi idegrendszeri neurotranszmitterek kiválasztásában. A H₄ receptor modulálhatja az immunsejtek működését [108-110]. Úgy tapasztaltuk, hogy ha a HA antagonisták kezelése megelőzte a HA adagolást, akkor a MEP, és a CIM is szignifikánsan csökkentette a HA által előidézett VP szint növekedését. Eszerint az izolált NH szövetanyagban a H₁ és H₂ receptorok vesznek részt a HA VP szekréciónak fokozó hatásának kialakításában. Ezzel párhuzamosan a H₃ és

H₄ receptor antagonisták hatástalannak bizonyultak: nem tudták blokkolni a HA kezelés okozta VP koncentráció emelkedését. Ez az eredmény megfelel több szerző eredményeinek [23,102,106,114].

A hipotalamikus magvak, a PVN és a SON, nemcsak VP-erg idegsejteket tartalmaznak, hanem CRH neuronokat is [115], amelyeket HA-erg rostok innerválnak [115,116]. Ez az anatómia alapja a kölcsönös funkcionális kapcsolatnak a HA-erg idegsejtek, valamint a CRH és VP neuronok között [101,115,117,118].

Érdekes jelenség, hogy a HA antagonisták csak akkor tudják csökkenteni a HA VP kiválasztást fokozó hatását, amikor az antagonistákat a HA kezelés előtt alkalmaztuk. Amikor viszont a HA adagolás megelőzte az antagonista kezelést, a HA receptor antagonisták hatástalannak voltak. A VP produkció emelkedése nem változott. Ez a jelenség a receptorok deszenzitizálódásával magyarázható. A receptorok telítettsége miatt az NH sejtek veszítenek szenzitivitásukból, így MEP, vagy CIM kezelés ellenére nem csökken a VP koncentráció. Hasonlóan alakul a pancreas szekréciója is nagy dózis cholecystokinin és carbachol adagolása után *in vivo* és *in vitro* körülmények között [119-121]. A disszertációban tárgyalt következő kísérletsorozatban, a DA, vagy 5-HT szabályozással kapcsolatban is megfigyelhető ugyanez a jelenség. NH szövetenyészetben a DA, vagy 5-HT által előidézett VP produkció növekedést blokkolni lehet DA, vagy 5-HT receptor antagonista előkezeléssel. Ha a DA, vagy 5-HT adagolás után alkalmaztuk az antagonista kezelést, akkor az hatástalannak bizonyult. Más megközelítésben, lehetséges, hogy a 20 perces időhatás elég hosszú a HA-nak, hogy kialakítsa VP szint fokozó hatását az NH-ban, és így a HA antagonisták hatástalannak mutatkoznak.

Mindezek az eredmények azt jelzik, hogy a HA-erg rendszer direkt módon befolyásolja az NH VP produkcióját, a VP szekréció HA-erg kontrollja patkányban a hipofízis hátsó lebenyének szintjén is érvényesül.

III. Dopamin hatása a vazopresszin kiválasztásra

Bevezetés

Ismeretes, hogy a DA-erg rendszer jelentős szerepet játszik a VP kiválasztás szabályozásában [24,25] és az ozmotikus stimulust követő VP szekréciónak változások szabályozásában is részt vesz [47,61]. Az idevonatkozó szakirodalomban nem található olyan publikáció, amely megfelelően demonstrálná, hogy az NH VP produkcióját a DA-erg rendszer direkt módon, a hipotalamusztól függetlenül befolyásolja. Az NH VP kiválasztásának DA-erg regulációját általában a hipotalamusz és az NH szintjén tanulmányozták patkányban.

Vizsgálatainkat *in vivo* (a) és *in vitro* (b) körülmények között végeztük.

a. *In vivo* kísérletek

Az *in vivo* kísérletek során a következő kérdésekre kerestük a választ:

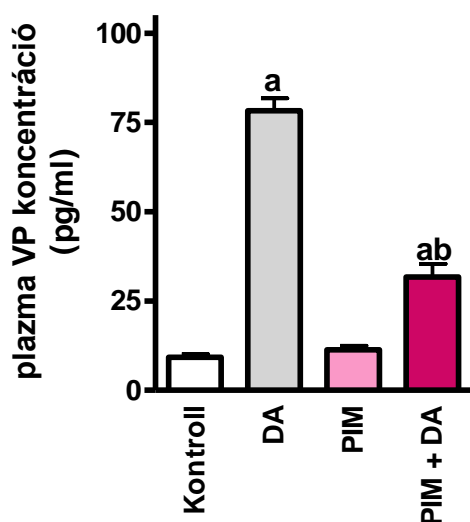
1. DA i.c.v. bejuttatása után hogyan változik a plazma VP szint?
2. Megváltoztatja-e a DA plazma VP koncentrációra gyakorolt hatását a DA antagonistá pimozid (PIM, Richter, Budapest, Magyarország)?

Módszer

I.c.v. bejuttatáshoz Hamilton fecskendőket használtunk és az anyagokat 1 perc alatt adtuk be az állatoknak. A DA dózisa 20 nmol, a PIM dózisa 110 nmol volt 10-10 µl fiziológiás sóoldatban feloldva. DA esetében 5, PIM esetében 10 perccel a kezelés után történt a vérmintavétel. A DA és PIM interakció vizsgálatakor a PIM adagolás 5 perccel előzte meg az 5 perces DA kezelést.

Eredmények

Centrális DA kezelés hatására szignifikáns plazma VP szint emelkedést figyeltünk meg (16. ábra). Az önmagában alkalmazott DA antagonistá PIM adagolás nem befolyásolta a plazma VP koncentrációt. A DA kezelés előtt alkalmazott PIM kezelés mérsékelte, de kivédeni nem tudta a DA plazma VP tartalmat növelő hatását.



16. ábra:

I.c.v. DA és DA antagonistá PIM hatása a plazma VP koncentrációra

Az i.c.v. DA kezelés jelentős plazma VP szint emelkedést idézett elő. A DA antagonistá PIM, önmagában alkalmazva nem okozott változást a plazma VP koncentrációban. A DA adagolást megelőző PIM előkezelés mérsékelte a DA által előidézett plazma VP szint fokozódást, de kivédeni nem tudta a DA hatását.

(n = 8-12; Átlag ± S.E.M.;

^aP < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz viszonyítva;

^bP < 0.05, szignifikáns különbség a DA-kezelt csoporthoz viszonyítva.)

b. *In vitro* kísérletek

Módszer

A korábban részletezett szövettenyésztési módszerrel készített, 13-14 napos NH szövetkultúrákhoz 10^{-6} M dózisban adagoltuk a következő dopamin-aktív anyagokat:

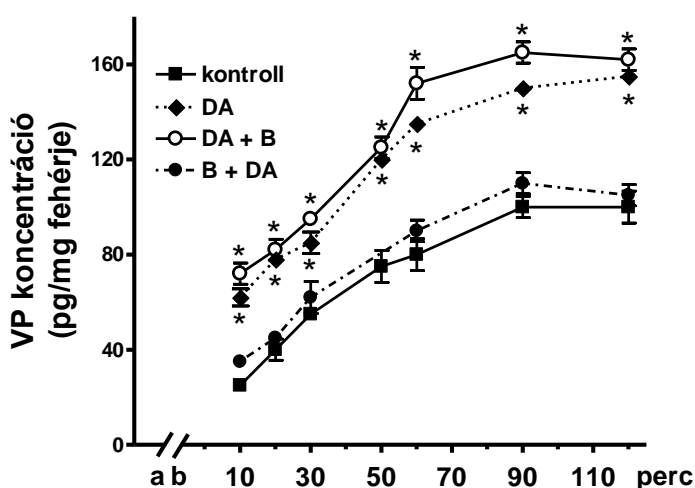
1. Dopamin (DA, Hoffman-La Roches, Bazel, Svájc);
2. Apomorphin (APM, Chinoin, Budapest, Magyarország);
3. Pro-Lys-Gly (PLG, A. Gupta ajándéka, Department of Chemistry, University of Rajasthan, Jaipur, India);
4. Haloperidol (HP, Richter, Budapest, Magyarország);
5. Chlorpromazin (CPZ, EGIS, Budapest, Magyarország);
6. Butaclamol (B, Henrik Keyzer, Department of Chemistry and Biochemistry, California State University, Los Angeles, USA);
7. Sulpirid (SP, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Németország).

A DA-aktív vegyületek dózisékat a dózis-hatás görbéik alapján határoztuk meg. A kezeléseket után, 1 óra inkubálási idő elteltével határoztuk meg a felülúszó médium VP tartalmát.

A VP termelés kinetikai vizsgálatához a szövettenyészeteket különböző DA-aktív anyagokkal 1 órán át előkezeltük, majd a következő 2 órában, 10 percenként, 100 μ l mintát vettünk a médiumokból, amelyekből meghatároztuk a VP szinteket.

Eredmények

A VP kiválasztás kinetikai görbét demonstrálja a 17. ábra. A 2 órás megfigyelési idő alatt a kontroll médium VP tartalma, az eltelt idő függvényében, fokozatosan emelkedett. Ugyanakkor DA adagolás hatására a VP szintézis jelentősen fokozódott. A VP termelés kinetikus görbéje, magasabb szinten, közel párhuzamosan futott a kontroll görbével. DA után adagolt DA antagonistá B mindezt nem befolyásolta. A kinetikus görbe lefutása megközelítőleg azonos volt a csak DA kezelést kapott médiumokkal. Abban az esetben, amikor a B hozzáadása megelőzte a DA kezelést, a B teljesen blokkolta a DA VP szintézis fokozó hatását.



17. ábra:

DA és DA antagonistá B hatása a VP termelés kinetikus görbéjére

DA adagolása szignifikáns VP szekréció emelkedést eredményezett a felülúszó médiumban. DA kezelést megelőző DA antagonistá B blokkolta a DA VP szekréciót növelő effektusát. DA után adagolt B hatástalannak bizonyult a megnövekedett VP koncentráció vonatkozásában.

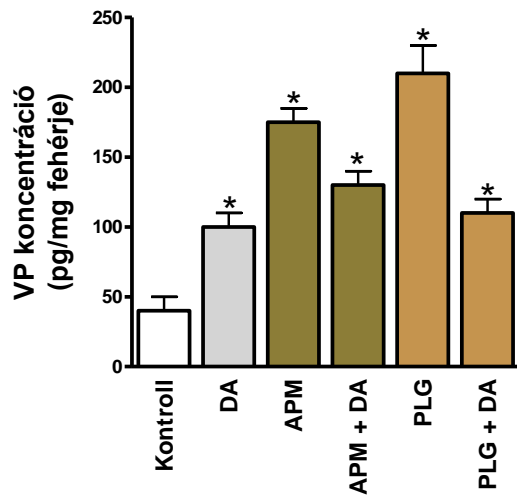
(n = 5; Átlag ± S.E.M.;

*P < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll médiumokhoz viszonyítva;

a: előinkubációs idő (60 perc)

b: mosás 3x).

1 órás inkubáció elteltével, a DA és DA agonisták (APM és PLG) hatására a VP produkció növekedett (18. ábra). APM adagolása nagyobb mértékben növelte a szövettenyészet médiumának VP szintjét, mint a DA hozzáadása. A VP szintézis legjelentősebb fokozódását a PLG kezelés idézte elő. A VP termelést fokozó DA-hatást a DA előtt adagolt APM, vagy PLG nem tette intenzívebbé.



18. ábra:
DA és DA agonisták (APM, PLG) hatása a VP termelésre

DA, APM, illetve PLG hatására a VP termelés szignifikáns módon növekedett a szövettenyészet médiumában.

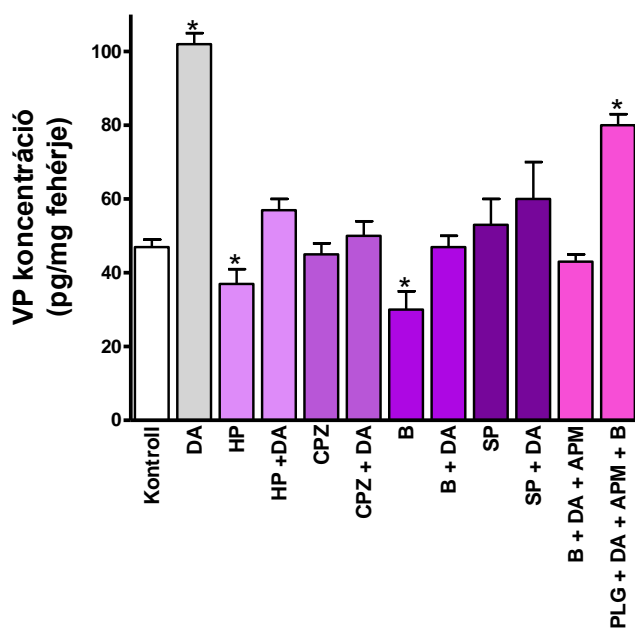
Legjelentősebb mértékben a PLG, legkevésbé a DA kezelés növelte VP szintet.

A VP termelést fokozó DA-effektus intenzitása nem fokozódott előzetes APM, vagy PLG adagolás hatására.

(n = 5; Átlag ± S.E.M.;

*P < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll médiumokhoz viszonyítva.)

DA antagonisták (HP, vagy B) hatására az NH szövetkultúra VP tartalma szignifikáns módon lecsökkent. CPZ és SP adagolás önmagában nem befolyásolta a VP szintet (19. ábra). A DA antagonisták (beleértve a SP-t is) nagymértékben mérséklék a DA hatására bekövetkező VP szint emelkedést, ha az antagonistákat a DA kezelés előtt alkalmaztuk. Ebben a vonatkozásban B erős antagonistát a DA kezelés előtt alkalmaztuk. Ebben a vonatkozásban B erős antagonistát a DA kezelés előtt alkalmaztuk. Ebben a vonatkozásban B erős antagonistát a DA kezelés előtt alkalmaztuk. A VP szintézis szignifikáns emelkedését tapasztaltuk PLG + DA + APM + B együttes alkalmazásakor.



19. ábra:
DA és DA antagonisták (HP, B, CPZ és SP) hatása a VP termelésre

HP, vagy B adagolása szignifikánsan csökkentette a NH szövetkultúra VP tartalmát. CPZ és SP kezelés nem változtatta meg a VP szintet. A DA kezelés előtt alkalmazott DA antagonisták jelentősen mérséklék a DA hatására bekövetkező VP szint emelkedést. DA és APM egyidejű alkalmazásakor B előkezelés blokkolta a VP szintet növelő hatást.

PLG, DA és APM egyidejű adagolása után adott B hatástalannak bizonyult a megemelkedett VP szint vonatkozásában.

(n = 6; Átlag ± S.E.M.;

*P < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll médiumokhoz viszonyítva.)

c. Galanin és dopamin közötti interakció vizsgálata

Bevezetés

Mióta bebizonyosodott, hogy a GAL a központi idegrendszerben a DA kiválasztás hatásos inhibitora [53,54,122], érdemesnek tűnt *in vitro* körülmények közt megvizsgálni a DA és a GAL interakcióját is a pituiciták VP szekréciójának vonatkozásában.

Módszer

A következő kísérleti fázisban is 13-14 napos NH szövettenyészeteket használtunk. A kinetikus görbe meghatározásához a szövetkultúrákat 1 órán át előkezeltük GAL-lal, majd háromszor átmostuk. A következő 2 órában, 100 µl mintát vettünk a felülúszókból, az első 30 percben 10 percenként, utána 30 percenként, és a VP koncentrációt a mintákból meghatároztuk.

A GAL és DA interakciójának megfigyeléséhez 10^{-6} M DA-t és ugyanakkor különböző dózisokban (10^{-14} - 10^{-8} M) GAL-t adagoltunk a médiumokhoz. Egy óra inkubálási időt követően vizsgáltuk a VP szintet a médiumokban.

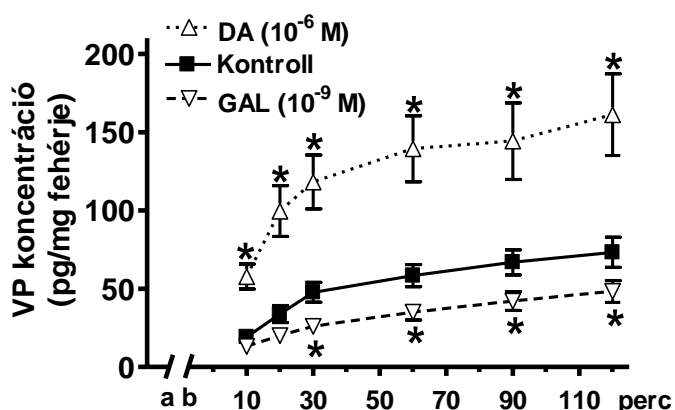
GAL és DA-aktív vegyületek (APM, PLG) VP termelésre gyakorolt hatásának vizsgálatához 20 perces, 10^{-6} M DA, APM, vagy PLG előkezelést alkalmaztunk. Rögtön ezután 10^{-8} M GAL-t adagoltunk a médiumokhoz. A mintavételt és a VP szint meghatározását 1 óra inkubációs idő előzte meg. A kísérlet következő szakaszában 10^{-8} M GAL előkezelés után 20 perccel 10^{-6} M DA-t, APM-t vagy PLG-t adtunk a szövettenyészetek felülúszójához. Egy óra inkubáció után mértük a médiumok VP koncentrációját.

A galantid (M15) effektusának vizsgálatához 20 perces 10^{-6} M DA kezelés után, több dózisban (10^{-13} - 10^{-7} M) M15-t és 10^{-8} M GAL-t adagoltunk egyszerre a médiumokhoz. A médiumokból 1 óra múlva mintákat vettünk és meghatároztuk a VP tartalmat.

Az inkubációk során alkalmazott GAL, M15, vagy DA-aktív vegyületek anyagmennyiségét a dózis-hatás görbék alapján adtuk meg.

Eredmények

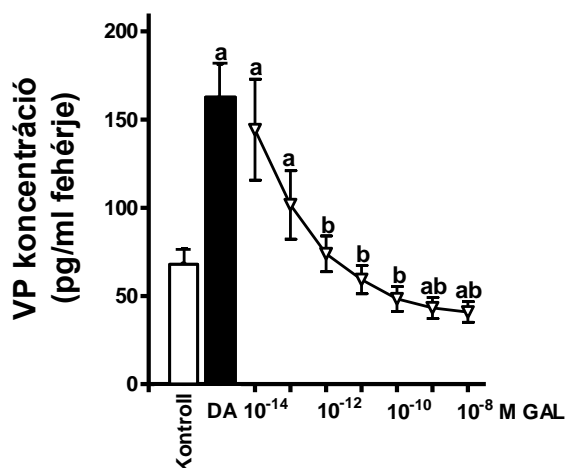
GAL, illetve DA VP szekrécióna gyakorolt hatásának kinetikus görbáját illusztrálja a 20. ábra. A kontroll szövettenyészetek médiumában a VP tartalom az eltelt idő arányában, fokozatosan növekedett. A DA adagolása szignifikáns VP koncentráció emelkedést idézett elő, a kinetikus görbe magasabb szinten, megközelítőleg párhuzamosan futott a kontroll görbével. A korábban már vizsgált GAL és VP szekrécióna dózis-hatás összefüggés (5. ábra) alapján meghatározott legkisebb effektív GAL dózis (10^{-9} M) redukálta a médium VP koncentrációját. Ez a változás a megfigyelési idő 30. percétől vált szignifikánssá.



20. ábra

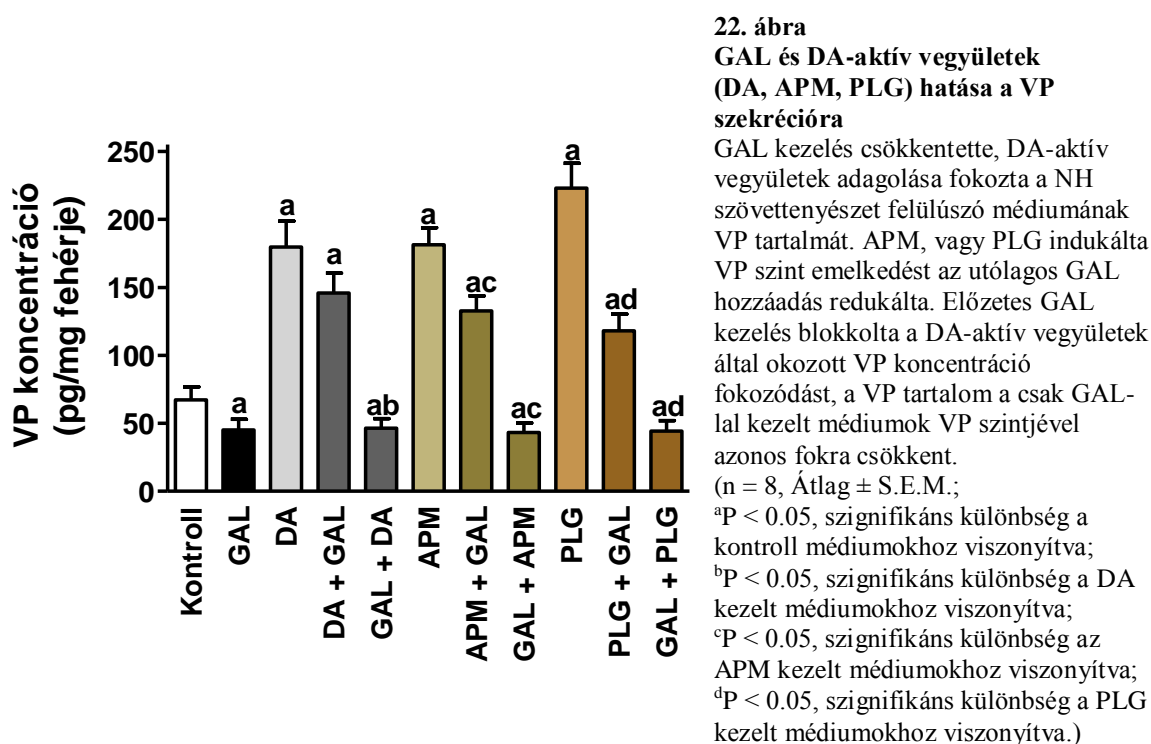
A VP termelés kinetikus görbéje GAL vagy DA adagolását követően
A kontroll médium VP koncentrációja az eltelt idő függvényében fokozatosan emelkedett. DA kezelés jelentősen növelte a VP szintet. 10^{-9} M GAL adagolása a megfigyelési periódus 30. percétől szignifikáns VP tartalom csökkenést okozott. (n = 8, Átlag ± S.E.M.; *P < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll médiumokhoz viszonyítva; a: 60 perc inkubáció; b: mosás 3x)

Amikor a GAL hozzáadása megelőzte a DA kezelést (21. ábra), a nagyobb dózisú (10^{-12} – 10^{-8} M) GAL adagolás kivédte a DA által előidézett VP szint emelkedést.



21. ábra
DA és különböző dózisban adagolt GAL hatása a VP produkcóra
 Nagyobb dózis GAL, a DA kezelést megelőzően adagolva blokkolta a DA VP termelésre gyakorolt fokozó hatását.
 (n = 9, Átlag ± S.E.M.;
^aP < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll médiumokhoz viszonyítva;
^bP < 0.05, szignifikáns különbség a DA kezelt médiumokhoz viszonyítva.)

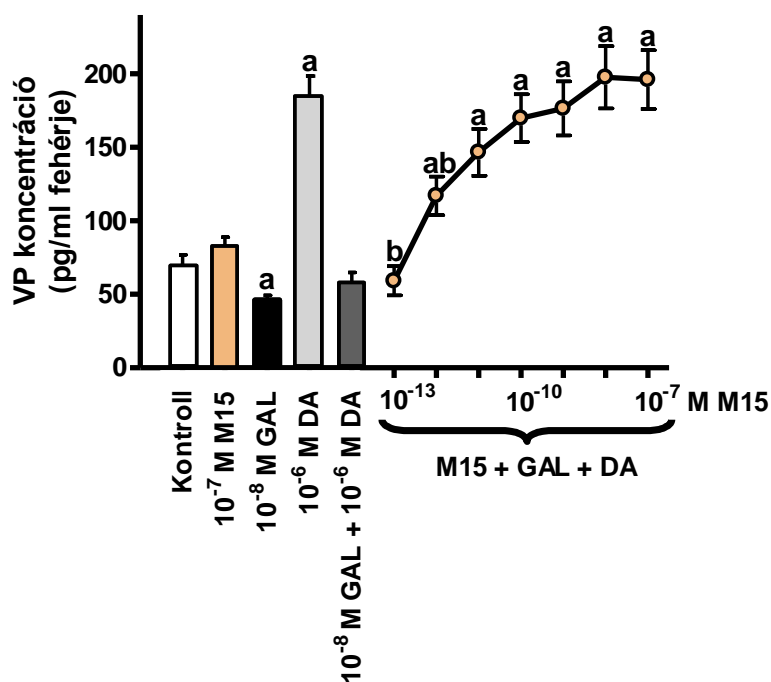
GAL és DA-aktív vegyületek (DA, APM és PLG), illetve azok interakciójának VP szekrécióra kifejtett hatását tüntettük fel a 22. ábrán.



22. ábra
GAL és DA-aktív vegyületek (DA, APM, PLG) hatása a VP szekrécióra
 GAL kezelés csökkentette, DA-aktív vegyületek adagolása fokozta a NH szövettenyészet felülűző médiumának VP tartalmát. APM, vagy PLG indukálta VP szint emelkedést az utólagos GAL hozzáadás redukálta. Előzetes GAL kezelés blokkolta a DA-aktív vegyületek által okozott VP koncentráció fokozódást, a VP tartalom a csak GAL-lal kezelt médiumok VP szintjével azonos fokra csökkent.
 (n = 8, Átlag ± S.E.M.;
^aP < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll médiumokhoz viszonyítva;
^bP < 0.05, szignifikáns különbség a DA kezelt médiumokhoz viszonyítva;
^cP < 0.05, szignifikáns különbség az APM kezelt médiumokhoz viszonyítva;
^dP < 0.05, szignifikáns különbség a PLG kezelt médiumokhoz viszonyítva.)

Egy órás inkubáció után DA, APM vagy PLG hozzáadására a felülúszó médium VP koncentrációja fokozódott. Az APM vagy PLG indukálta VP szint növekedés mérséklődött, amikor az APM vagy PLG kezelés után GAL-t adtunk a médiumokhoz. Ha a GAL adása megelőzte a DA-aktív anyagok hozzáadását, akkor a GAL teljes mértékben kivédte a VP kiválasztás fokozódását. A VP koncentráció megegyezett a csak GAL-lal kezelt médiumok VP szintjével.

A DA kezelés által kiváltott, fokozott VP szekrécióra gyakorolt GAL és M15 effektust ábrázolja a 23. ábra. A kontroll szövetkultúra médiumához önmagában adott nagy dózis M15 (10^{-7} M) nem okozott szignifikáns változást a VP termelésben (kontroll: 79.87 ± 11.36 pg VP/mg fehérje; kontroll + 10^{-7} M M15: 84.12 ± 12.11 pg VP/mg fehérje; $n=9$). A DA kezelés előtti GAL hozzáadás megakadályozta a DA VP szint növelő hatását. Amikor a DA kezelés előtt különböző dózisu M15-t és GAL-t együtt adagoltunk a médiumhoz, a nagy koncentrációjú M15 kezelés következtében a GAL blokkoló hatása nem érvényesült, és a DA kezelést követő fokozott VP szekréció változatlan maradt.



23. ábra
GAL és különböző dózisu M15 hatása a VP termelésre
 Nagy dózis M15 (10^{-7} M) nem változtatta meg a médium VP koncentrációját.
 DA kezelést megelőző GAL hozzáadás megakadályozta a DA VP szint növelő hatását.
 DA kezelés előtt alkalmazott különböző dózisu M15-t és GAL-t együttes adagolásakor a nagy koncentrációjú M15 blokkolta a GAL redukáló effektusát.
 ($n = 9$, Átlag \pm S.E.M.;
^a $P < 0.05$, szignifikáns különbség a kontroll médiumokhoz viszonyítva;
^b $P < 0.05$, szignifikáns különbség a DA kezelt médiumokhoz viszonyítva.)

Megbeszélés

Több morfológiai és funkcionális vizsgálat bizonyítja a DA-erg rendszer jelentőségét a VP kiválasztásban úgy a magnocelluláris magvak, mint az NH szintjén patkányban [24,25]. Ezeken a területeken nagy affinitású DA-erg receptorok is vannak [123,124]. Az NH-ban a DA tartalom és a szintézis sebessége összefügg az NH funkcionális állapotával [125,126]. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a DA-erg idegsejtek részt vesznek a VP szintézisének, raktározásának és kiválasztásának szabályozásában.

Kísérleteink eredményei szerint a DA az NH szintjén is fontos szerepet játszik a VP szekrécióban. Megfigyeléseinket számos olyan irodalmi adat támasztja alá, amelyek az NH DA-erg beidegzését demonstrálják [24,25,127,128]. Izolált, neuronális lebenyen végzett *in vitro* vizsgálatok során azonban a DA VP kiválasztást gátló effektusát észlelték [129]. Ugyanakkor más szerzők semmilyen, VP kiválasztásra gyakorolt hatását sem észlelték a DA-nak [130,131]. Racke [132], valamint Treiman és Greengard [133] megfigyelései szerint két DA receptor típus található az NH-ban. A D₂ receptor közvetíti a VP kiválasztás gátlását, és a D₁ pedig elősegíti azt. Kísérleteinkben a DA agonista APM és PLG fokozta az NH VP termelését. Megfigyeléseinkkel összhangban más kutatók is leírták az APM és a PLG DA agonista természetét [134-136]. Kísérleteink szerint a VP szintézisre kifejtett DA hatást az APM vagy PLG kezelés nem fokozta. A potenciáló effektus elmaradásának mechanizmusára nehéz magyarázatot találni. Lehetséges, hogy a DA kötődése a receptorokhoz erősebb, mint az APM vagy PLG affinitás. A szövettenyészet sejtjeiben a receptor-szaturáció gátolhatja az APM vagy PLG kötődést, ami blokkoló hatást okozhat.

A DA antagonisták hatásairól elmondható, hogy a HP csökkentette a VP kiválasztást. Korábban más szerzők is hasonló eredményeket közöltek [134,137]. Humán vizsgálatok során az APM által előidézett VP kiválasztás teljes gátlását írták le [138]. Yamaguchi and Hama vizsgálatai szerint az i.c.v. HP kezelés blokkolta a hipertóniás sóoldat adagolása miatt kialakuló plazma VP szint emelkedést [139]. Egy tanulmány ugyan arról számol be, hogy a HP-nek D₂ antagonistakarakterre van [140], viszont egy másik kísérlet végeredménye szerint D₁ és D₂ antagonistaként viselkedik [141]. Korábbi kutatások eredményeihez hasonlóan a CPZ antagonistakarakterrel rendelkezik [140,141]. Meglepő megfigyelés volt, hogy a D₂ antagonistá SP nem befolyásolta a bazális VP produkciót. Mindamellet a VP szintézis DA-okozta fokozódását előzetes SP kezeléssel teljes mértékben blokkolni lehetett. Tapasztalataink szerint, az irodalmi adatokkal megegyezően [142,143], B rendelkezik a legerősebb DA antagonistahatással.

Különös megfigyelés, hogy a B csak akkor tudta megakadályozni a DA VP kiválasztást serkentő effektusát, amikor a DA adagolás előtt alkalmaztuk. Ha a DA kezelés megelőzte a B adagolását, akkor a DA antagonistahatástalannak mutatkozott: a VP termelés nem csökkent. A disszertációban tárgyalt többi kísérletsorozatban, a HA, 5-HT vagy adrenerg szabályozással kapcsolatban is megfigyelhető ugyanez a jelenség, amely a receptorok deszenzitizálódásával magyarázható. A receptorok telítettsége miatt az NH sejtek valószínűleg veszítenek szenzitivitásukból, így az antagonistakezelés ellenére sem csökken a VP koncentráció.

Eredményeink azt mutatják, hogy az NH VP termelésére a DA-erg rendszer is direkt hatású. Patkányban az NH VP szekréciónak DA-erg kontrollja a hipotalamusztól függetlenül, a pituiciták szintjén is bekövetkezik.

Elmondható, hogy a VP szekréciónak regulálásában a GAL és a DA között antagonistikus interakció áll fenn. Ezt alátámasztja az a megfigyelés is, hogy az i.c.v. GAL kezelés csökkenti a VP kiválasztást [144,145]. Másrészt hipotalamikusan szinten a GAL és a DA termelés kölcsönhatásban áll egymással. Ugyanis a központi idegrendszerben a GAL az eminencia mediana DA kiválasztásának hatásos inhibitora [146]. Nordström és munkatársai leírták [147], hogy a GAL és a DA egyidejűleg van jelen az eminencia mediana idegvégződéseiben, és ez a terület nagy mennyiségben tartalmaz GAL-kötő helyeket. *In vitro* megfigyeléseik szerint a GAL dózis-függő módon csökkenti a DA kiválasztást. Kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy a GAL kezelés hogyan befolyásolja a DA által kiváltott VP szekréciónak fokozódását az NH szövettenyészetben. Azt találtuk, hogy DA vagy DA-aktív vegyület adagolása előtt alkalmazott GAL kezelés teljes mértékben blokkolta a DA által indukált VP kiválasztást. A GAL és DA antagonizmus a VP termelés vonatkozásában a hipotalamusztól függetlenül is érvényesül. A VP szekréciónak gyakorolt ellentétes GAL és DA hatás az izolált NH szövetkultúra pituicitáira gyakorolt direkt effektus által is megvalósul.

A GAL kezelés specificitásának bizonyításához a GAL és DA kezelést megelőzően adagolt M15 VP produkcióra kifejtett hatását tanulmányoztuk. Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy az M15, mint nem-szelektív GAL receptor antagonistikus [87], megakadályozta a GAL azon hatását, amely gátolta az NH szövettenyészet VP szintézisének DA kezelés által kiváltott fokozódását. Eredményeink arra utalnak, hogy az M15 GAL receptor antagonistikus hatása a

hipotalamikus magnocelluláris magvaktól függetlenül, direkt módon érvényesül az NH szövetkultúra sejtjeiben.

IV. Szerotonin hatása a vazopresszin kiválasztásra

Bevezetés

A VP kiválasztásban a szerotonin (5-hidroxitriptamin, 5-HT) is jelentős szerepet játszik [26,27]. Ferris és munkatársai [148] beszámoltak az NH és az 5-HT rendszer morfológiai és funkcionális kapcsolatáról a hipotalamusz szintjén. Az 5-HT-erg neuronok kapcsolatban állnak a hipotalamusz SON és PVN magjaival [149,150]. A PVN-ben 5-HT receptorokat azonosítottak [151], amelyek fontos szerepet játszanak főleg az oxitocin neuronok szabályozásában [149]. Az 5-HT i.c.v. adagolása gyors emelkedést idéz elő a plazma VP koncentrációjában [152]. Jorgensen és kutatócsoportja [153] nemrégiben leírta, hogy az 5-HT képes aktiválni a VP expressziót a PVN-ben és a SON-ban. További adatokkal szolgált Lovino and Steardo [154], valamint Van de Kar [155], akik megállapították, hogy az 5-HT részt vesz az NH hormonok bazális, illetve stressz által kiváltott szekréciójában. Az előbbi megfigyelést igazolja, hogy a különböző stressztényezők által előidézett VP szekréció növekedés 5-HT antagonistákkal blokkolható [156]. A rendelkezésre álló adatok mellett szólnak, hogy a VP és az 5-HT rendszer közötti interakció még nem teljesen tisztázott [150]. A VP kiválasztás 5-HT-erg szabályozását szinte kizárólag a hipotalamusz szintjén vizsgálták. Azt a kérdést, hogy az NH VP szekrécióját az 5-HT a hipotalamusztól függetlenül hogyan befolyásolja, nem tanulmányozták.

Kísérleteink első részében az 5-HT hatását vizsgáltuk a VP szintézisre és kiválasztásra, izolált patkány NH szövetkultúrában. Miután a neuropeptid GAL szoros kapcsolatban áll az agy 5-HT rendszerével [26,27,55], érdekesnek találtuk

tanulmányozni az 5-HT és GAL rendszer interakcióját a VP kiválasztás regulációjának vonatkozásában, *in vitro* körülmények között.

Módszerek

Az alább felsorolt 5-HT és 5-HT antagonistákat adagoltuk a monolayer sejttenyészetek médiumaihoz:

1. Szerotonin (5-HT, Sigma, Steinheim, Németország);
2. WAY-100635 (WAY, 5-HT₁-receptor antagonist, Tocris Cookson, Bristol, UK);
3. Ketanserin (KTS, 5-HT₂-receptor antagonist, Sigma);
4. Metergolin (MTG, 5-HT_{1,2}-receptor antagonist, Sigma).

A dózis-hatás görbék meghatározásához növekvő koncentrációban 5-HT-t (10^{-10} - 10^{-4} M) adagoltunk a tenyészetekhez, majd 1 óra inkubálás után mértük a médiumok VP szintjét.

Az idő-kinetikai vizsgálatokhoz, 5-HT és/vagy 5-HT antagonist (10⁻⁶ M) 1 órás előkezelés után, a következő 90 percben 100 µl mintát vettünk a médiumokból: az első 30 percben 10 percenként, utána 30 percenként.

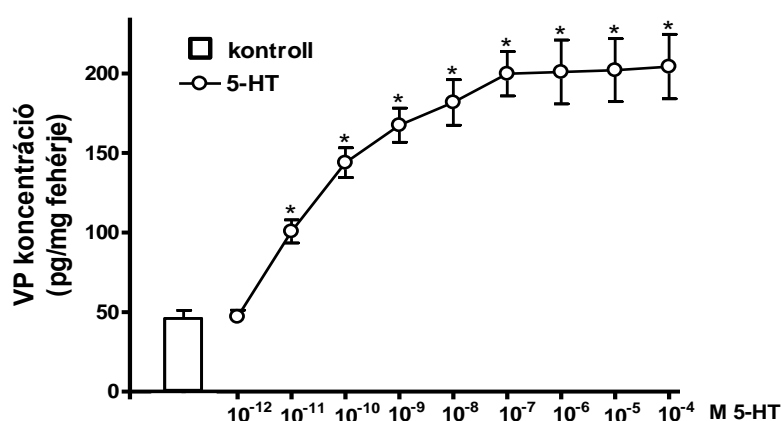
5-HT antagonisták hatásának vizsgálatához megmértük a 10⁻⁶ M 5-HT, 10⁻⁶ M WAY, 10⁻⁶ M KTS, 10⁻⁶ M MTG adagolást és 1 óra inkubálási időt követően a médiumban található VP szintet. Majd tanulmányoztuk az antagonistákkal történő 20 perces előkezelést követő 5-HT adagolás hatását. A mintavételt 1 óra inkubációs idő előzte meg. A következő kísérleti fázisban a 20 perces előkezeléshez 5-HT-t alkalmaztunk. Ezt követően antagonistákat adtuk a médiumokhoz, majd 1 óra múlva vettünk mintát.

GAL és 5-HT interakciójának vizsgálatához vagy az 5-HT kezelés előtt, vagy az 5-HT kezelés után 1 órával GAL-t adagoltunk. Mindkét csoport esetében a

kezeléseket 1 órás inkubáció követte, ezután meghatároztuk a felülúszó médiumok VP koncentrációját.

Eredmények

Az NH szövettenyészet VP szekréciója és az 5-HT dózisa (10^{-12} - 10^{-4} M) közötti összefüggést demonstrálja a 24. ábra. Az 5-HT hatására emelkedő VP koncentrációt detektáltunk a szövetkultúra médiumában. 10^{-11} M 5-HT adagolásakor vált szignifikánssá a VP szint emelkedése. Tovább növelve az 5-HT dózist (10^{-10} - 10^{-7} M), lineáris VP koncentráció fokozódást tapasztaltunk. Még nagyobb dózis (10^{-7} - 10^{-4} M) 5-HT hatására további VP szint emelkedést már nem találtunk.



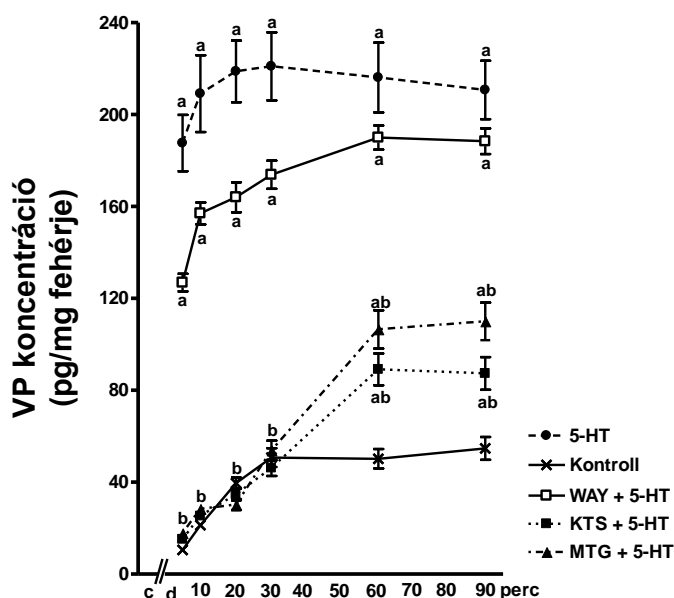
24. ábra:

Az 5-HT hatása az NH szövetkultúra VP termelésére

5-HT növekvő dózisu adagolása (10^{-12} - 10^{-4} M) után fokozatos VP koncentráció emelkedés tapasztalható a felülúszó médiumban. (n = 8; Átlag \pm S.E.M.; * P < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz viszonyítva.)

Meghatároztuk a szövetkultúra felülúszó médiumából mérhető VP tartalom kinetikai görbét is (25. ábra). A megfigyelési periódus első 30 percében a kontroll médium VP tartalma gyors ütemben növekedett, és 30 perc elteltével állandó magas szinten maradt. 5-HT adagolása után, a kontrollhoz viszonyítva, szignifikáns VP koncentráció fokozódást figyeltünk meg. Az 5-HT antagonistá KTS, illetve MTG kezelés hatására az első 30 percben a VP tartalom a kontroll szintre csökkent. A továbbiakban a hormon szintje kis fokban emelkedett a

kontrollhoz képest. Az 5-HT VP produkció serkentő hatását a KTS vagy MTG kezelés csak részben blokkolta. A WAY nem befolyásolta az 5-HT által kiváltott fokozott VP szekréción.



25. ábra:

Az 5-HT hatása a VP termelés kinetikus görbéjére

5-HT adagolása szignifikáns VP szekréción emelkedést eredményezett a felülúszó médiumban. 5-HT antagonisták ketanserin, vagy metergoline hozzáadása után, az első 30 percen a VP tartalom a kontroll szintre redukálódott, később enyhén növekedett. WAY-1006335 hatástalan volt az 5-HT indukálta emelkedett VP koncentráció vonatkozásában.

(n = 8; Átlag ± S.E.M.;

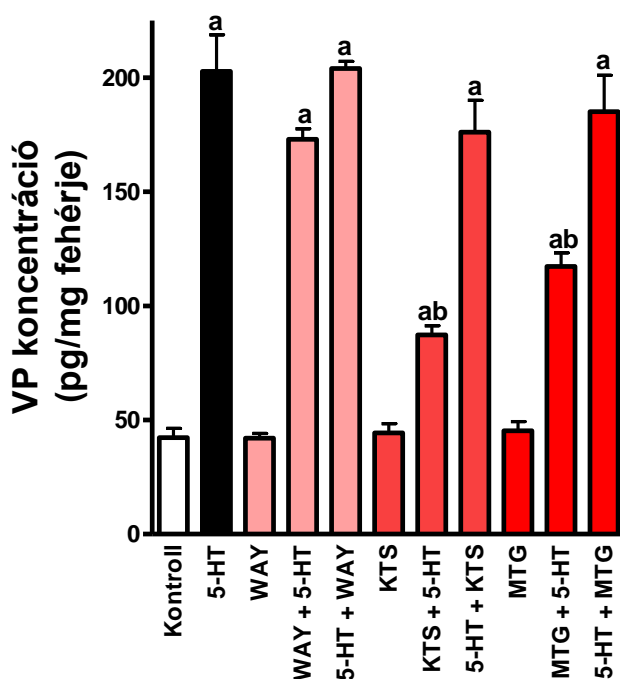
^aP < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll médiumokhoz viszonyítva;

^bP < 0.05, szignifikáns különbség az 5-HT kezelt médiumokhoz viszonyítva;

c: előinkubációs idő (60 perc);

d: mosás 3x)

Az 5-HT adagolást követően, 1 órás inkubációs idő elteltével, megemelkedett VP produkciót észleltünk (26. ábra). A kontroll médiumokhoz adott 5-HT antagonisták hatására a VP koncentráció nem változott. Ha a KTS és MTG



26. ábra:

5-HT és 5-HT antagonisták vegyületek (WAY, KTS, MTG) hatása a VP termelésre

5-HT kezelés hatására, 1 órás inkubálás után megemelkedett a VP szint. 5-HT antagonisták önmagukban nem okoztak változást a hormonszekréciónban. Az 5-HT adagolást megelőző KTS, vagy MTG kezelés redukálta az 5-HT indukálta VP koncentráció növekedést. Előzetes WAY kezelés nem csökkentette az 5-HT hatására megemelkedett VP szekréción.

Az 5-HT kezelés után adagolt 5-HT antagonisták nem csökkentették a VP koncentráció növekedést.

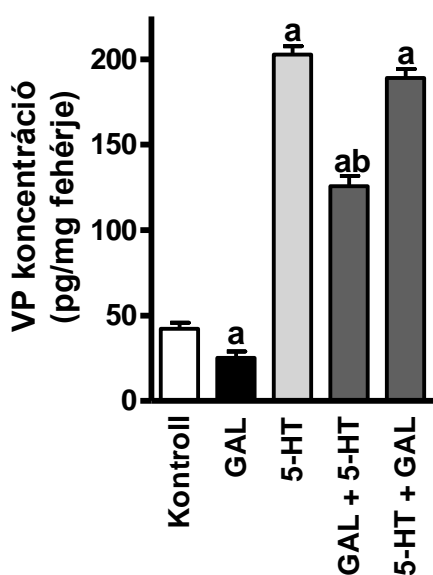
(n = 8; Átlag ± S.E.M.;

^aP < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll médiumokhoz viszonyítva;

^bP < 0.05, szignifikáns különbség az 5-HT kezelt médiumokhoz viszonyítva.)

kezelést az 5-HT hozzáadását megelőzően alkalmaztuk, akkor az 5-HT-okozta VP szint emelkedés jelentősen csökkent, de a kontroll koncentrációnál magasabb értéken maradt. A WAY nem bizonyult hatékony gátlószernak az 5-HT indukálta VP szekréció növekedés vonatkozásában. A VP szintet nem redukálták az 5-HT antagonisták, amikor azokat az 5-HT kezelést követően alkalmaztuk.

Az NH szövetkultúra felülúszó médiumának VP tartalmát befolyásoló GAL és 5-HT interakciót illusztrálja a 27. ábra. A GAL hozzáadása csökkentette, amíg az 5-HT kezelés szignifikánsan fokozta a médium VP koncentrációját. Az előzetes GAL kezelés jelentősen mérsékelte az 5-HT által előidézett VP szint emelkedést, de azt teljesen kivédeni nem tudta. Az 5-HT kezelés után alkalmazott GAL adagolás hatástalan volt. Nem mérsékelte az 5-HT okozta magasabb VP szintet.



27. ábra

GAL és 5-HT interakciójának hatása a VP szekrécióra patkány NH szövetnyészében

5-HT adása után szignifikáns VP szekréció emelkedést tapasztaltunk a felülúszó médiumban. 5-HT adagolást megelőző GAL előkezelés jelentősen csökkentette az 5-HT által indukált VP szint fokozódást. 5-HT kezelés után adagolt GAL hatástalannak bizonyult.

(n = 10, Átlag ± S.E.M.;

^aP < 0.05, szignifikáns különbség a kontroll médiumokhoz viszonyítva;

^bP < 0.05, szignifikáns különbség az 5-HT kezelt médiumokhoz viszonyítva.)

Megbeszélés

A szakirodalomban számos publikáció jelent meg, amelyek az 5-HT NH hormonszekréciójára kifejtett hatásaival foglalkoznak. A morfológiai és funkcionális kutatások főként a hipotalamikus regulációt tartják fontosnak. Az NH sejteknek

(pituiciták) az 5-HT által kiváltott VP szekréciónak változásokban játszott szerepe kevésbé vizsgált probléma.

Friedman [157], illetve Leranath [158] 5-HT-t tartalmazó idegrostokat talált az NH-ban. Nagy dózisu 5-HT kezelés VP kiválasztást idézett elő az NH-ból [159]. Holzbauer és munkatársai [160] leírták, hogy a hipofízis-nyél stimulálását követően fokozódik a hormon szekréciónak az izolált NH-ból. Saját eredményeink arra utalnak, hogy az NH szintjén az 5-HT fontos szerepet játszik a VP szekréciónak szabályozásában.

Megfigyeléseink alapján feltételezzük, hogy az NH 5-HT receptorokat tartalmaz. Felvetődik a kérdés, hogy melyik 5-HT receptor típus felelős az NH VP szekréciónak szabályozásáért. Napjainkig az 5-HT receptorok 3 csoportját, azokon belül 15 altípust különítettek el [161]. Az 5-HT₁ receptor-alcsaládba tartoznak az 5-HT_{1A-F} altípusok. Az 5-HT₂-be sorolhatók az 5-HT_{2A-C} altípusok. Végül a vegyes 5-HT receptorok alcsaládjába az 5-HT₃₋₇ altípusokat tartalmazza. Az 5-HT receptorok részt vesznek az élettani folyamatokban. Szelektív 5-HT agonistákkal és antagonistákkal végzett munkáink alapján Bagdy és kutatócsoportja arra a következtetésre jutott, hogy a VP szekréciónak az 5-HT₁ receptorok mediálják [162]. Ezzel ellentétben később Jorgensen és kollégái megállapították, hogy nem az 5-HT₁ receptorok, hanem az 5-HT_{2A} és az 5-HT_{2C} receptorok felelősek a mérsékelt stressz-indukálta VP szekréciónak [156,163]. Kísérleteinkhez a szelektív 5-HT₁ receptor antagonistá WAY-t [156,163], az 5-HT₂ receptor antagonistá KTS-t [164-168] és az 5-HT_{1,2} receptor antagonistá MTG-t [169-171] használtuk. Megfigyeléseink szerint a KTS és az MTG szignifikáns módon csökkentette az 5-HT-okoza VP szint emelkedést, abban az esetben, ha az 5-HT antagonistá kezelést az 5-HT adagolás előtt alkalmaztuk. Eszerint az

izolált NH szövetkultúrában a VP szekréciót fokozó 5-HT effektus főleg az 5-HT₂ receptorokon keresztül valósul meg.

Érdekes jelenség, hogy az 5-HT antagonisták csak akkor tudták blokkolni az 5-HT VP szekréciót serkentő hatását, amikor az 5-HT adagolás előtt alkalmaztuk őket. Ha az 5-HT kezelés megelőzte az antagonista adagolást, akkor az 5-HT antagonisták hatástalanok voltak: a VP termelést nem csökkentették. A disszertációban tárgyalt többi kísérletsorozatban, a HA, a DA, vagy az adrenerg reguláció vonatkozásában is megfigyelhető ugyanez a jelenség, amely a receptorok deszenzitizálódásával magyarázható. A receptorok telítettsége miatt az NH sejtek veszítenek szenzitivitásukból, így az antagonista kezelés ellenére nem csökken a VP koncentráció. A másik lehetséges magyarázat az, hogy a 20 perces inkubáció alatt az 5-HT kialakítja VP szint fokozó hatását az NH-ban, és így az 5-HT antagonisták hatástalannak bizonyulnak.

Eredményeink arra utalnak, hogy az NH VP termelését az 5-HT-erg rendszer direkt módon befolyásolja. Patkányban a VP szekréció 5-HT-erg szabályozása a hipofízis hátsó lebenyének szintjén is érvényesül.

Más szerzők korábban leírták, hogy a GAL és receptorai (GALR1-GALR3) [46] az agy olyan régióiban, illetve idegsejtjeiben helyezkednek el, amelyek különböző neurotranszmittereket, köztük 5-HT-t expresszálnak [74]. A raphe magvak és a locus coeruleus területén található 5-HT-erg neuronokra kifejtett GAL hatást többen is tanulmányozták *in vitro* elektrofiziológiai [172,173], vagy *in vivo* mikrodialízis módszerrel [174,175]. Utóbbi eljárást alkalmazva Kehr és munkatársai felismerték, hogy patkány hippocampusban a GAL a bazális 5-HT kiválasztás hatásos inhibitora. Effektusát a raphe magvak GAL receptorainak stimulálása révén szabályozza [174].

In vitro kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy a GAL kezelés hogyan befolyásolja az 5-HT által kiváltott VP szekréciónak fokozódását NH szövetnyészében. Megfigyeléseink szerint a VP szekréciónak vonatkozásában a GAL és a 5-HT között antagonistikus interakció áll fenn, amely megfelel Fuxe és kutatócsoportja eredményeinek [176]. Úgy találtuk, hogy az 5-HT adagolása előtt alkalmazott GAL kezelés nem tudta teljes mértékben blokkolni az 5-HT által indukált VP kiválasztás emelkedését. Az utólag alkalmazott GAL kezelés inaktívnak bizonyult. A GAL és 5-HT antagonizmusa a VP termelés vonatkozásában a hipotalamusztól függetlenül vizsgálható, mivel a VP szekréciónak gyakorolt ellentétes GAL és 5-HT hatás az izolált NH szövetkultúra pituicitáira közvetlenül is megvalósul.

V. Az adrenerg rendszer hatása a vazopresszin kiválasztásra

Bevezetés

A VP kiválasztás szabályozásában az ozmotikus stimulus, illetve a korábban említett különböző neurotranszmitterek (GAL, HA, DA, 5-HT) mellett az adrenerg rendszer is jelentős szerepet játszik. Az i.c.v. adagolt adrenalin (ADR) vagy noradrenalin (NADR) serkenti a VP kiválasztást [28,29]. A hipotalamikus magnocelluláris magvakba történő direkt ADR vagy NADR injekciózás stimulálja a VP sejteket [177,178], fokozva a VP mRNS szintézist [179]. Az exogén NADR a magnocelluláris neuronokat az α_1 -adrenoceptorok közreműködésével serkenti [180,181]. Az ADR, vagy NADR fokozza a VP szekréción a hipotalamikus explantátumokban [182], más publikációk azonban arról számolnak be, hogy az NADR gátolja a VP kiválasztást [183-186]. Ennek az ellentmondásnak az a lehetséges magyarázata, hogy az adrenerg receptorok eltérően oszlanak meg a VP sejtek membránjának felszínén, így a különböző adrenerg bemenő jelek („input”) úgy gátló, mint serkentő hatásúak egyaránt lehetnek [28]. Az adrenerg rendszer szerepét a VP kiválasztás regulációjában eddig többnyire hipotalamikus szinten vizsgálták.

Kísérleteinkkel izolált NH szövettenyészetben kívántuk tanulmányozni az ADR és az NADR hatását a VP szintézisre és szekréción.

Módszerek

Az alább felsorolt ADR és NADR agonistákat, illetve antagonistákat adagoltuk a monolayer sejtenyészetek médiumaihoz (Sigma, Steinheim, Németország):

1. Adrenalin (ADR, α -receptor agonista);
2. Phentolamin (PTA, $\alpha_1+\alpha_2$ -receptor antagonistista);
3. Corynanthin (CAT, α_1 -receptor antagonistista);
4. Yohimbin (YOB, α_2 -receptor antagonistista);
5. Noradrenalin (NADR, β -receptor agonista);
6. Propranolol (PNL, $\beta_1+\beta_2$ -receptor antagonistista);
7. Atenolol (ATL, β_1 -receptor antagonistista);
8. Pindolol (PDL, $\beta_1+\beta_2$ -receptor antagonistista).

A dózis-hatás összefüggés meghatározásához növekvő koncentrációban ADR-t (10^{-10} - 10^{-5} M), illetve NADR-t (10^{-9} - 10^{-5} M) adagoltunk a tenyészetekhez, majd 1 óra inkubálás után mértük a médium VP szintjét.

Az idő-kinetikai vizsgálatokhoz - ADR (10^{-6} M) és/vagy CAT (10^{-6} M), illetve NADR (10^{-6} M) és/vagy PNL (10^{-6} M) 1 órás előkezelés után - a következő 90 percben 100 μ l mintát vettünk a médiumokból: az első 30 percben 10 percenként, utána 30 percenként.

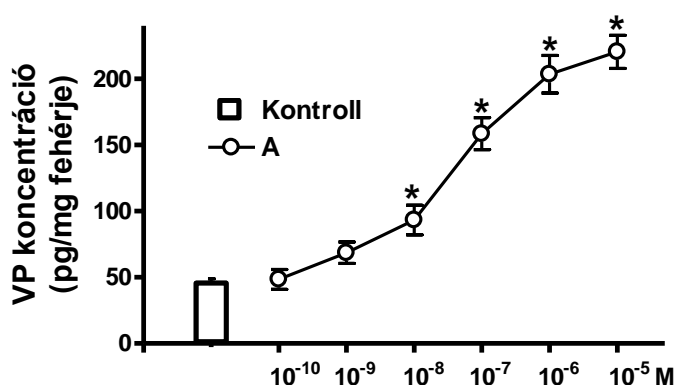
Az ADR és antagonistái közötti interakció vizsgálatához megmértük a 10^{-6} M ADR, 10^{-6} M PTA, 10^{-6} M CAT, 10^{-6} M YOB adagolás után, 1 óra inkubálási időt követően a médium VP szintjét. Az NADR és antagonistái közötti kölcsönhatás vizsgálatához 10^{-6} M NADR-t, 10^{-6} M PLT-t, 10^{-6} M ATL-t, 10^{-6} M PDL-t adagoltunk. Majd megvizsgáltuk az antagonistákkal történő, 30 perces előkezelést követő ADR, vagy NADR adagolás hatását az VP szintre. A mintavételt 1 óra inkubációs idő előzte meg. A következő kísérleti fázisban 30 perces előkezelésként ADR-t, vagy NADR-t alkalmaztunk. Ezt követően antagonistákat adtunk a médiumokhoz, majd 1 óra múlva vettünk mintát.

GAL és ADR, illetve NADR interakciójának tanulmányozásakor 1 órával az ADR (10^{-6} M), vagy NADR (10^{-6} M) kezelés előtt 10^{-6} M GAL-t adagoltunk a sejtenyészetek egyik csoportjához. A másik csoportban az ADR (10^{-6} M), vagy NADR (10^{-6} M) adagolás 30 perccel megelőzte a GAL (10^{-6} M) kezelést. Mindkét csoport esetében a kezeléseket 1 órás inkubáció követte, ezután határoztuk meg a felülúszó médiumok VP koncentrációját.

Adrenalin hatása a vazopresszin szekrécióra

Eredmények

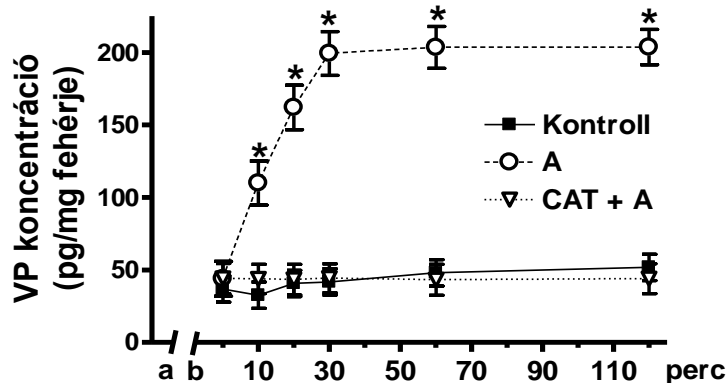
Az NH szövettenyészet felülúszó médiumában a VP koncentráció a hozzáadott ADR mennyiségével egyenes arányban növekedett (28. ábra). A VP szint emelkedése 10^{-8} M, vagy annál nagyobb dózisban adagolt ADR esetén vált szignifikánssá.



28. ábra:
Az ADR hatása az NH szövettenyészet VP kiválasztására
 Emelkedő ADR dózis (10^{-10} - 10^{-5} M) hatására lineárisan növekvő VP szint volt kimutatható a felülúszó médiumban
 (n=10; Átlag \pm S.E.M.;
 *szignifikáns különbség a kontrollhoz viszonyítva).

ADR és α_1 -receptor antagonistá CAT VP szekrécióra gyakorolt hatásának időkinetikáját szemlélteti a 29. ábra. ADR adagolás hatására jelentősen fokozódott

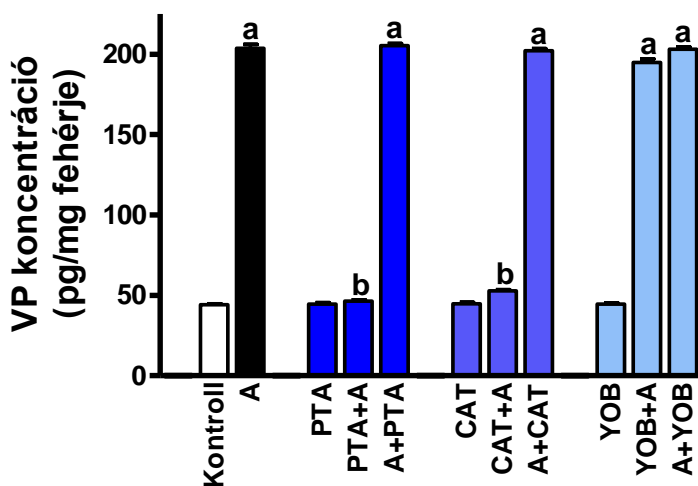
a médium VP tartalma. Viszont az ADR bejuttatását megelőző CAT kezelés kivédte az ADR VP szint fokozó hatását.



29. ábra:
ADR adagolást követő VP kiválasztás kinetikus görbéje

ADR adás után jelentősen fokozódott a VP termelés. Az ADR kezelés előtt bejuttatott α_1 -receptor antagonistá CAT a médium VP tartalmát a kontroll szintre csökkentette (n=10; Átlag \pm S.E.M.; *szignifikáns különbség a kontrollhoz viszonyítva).

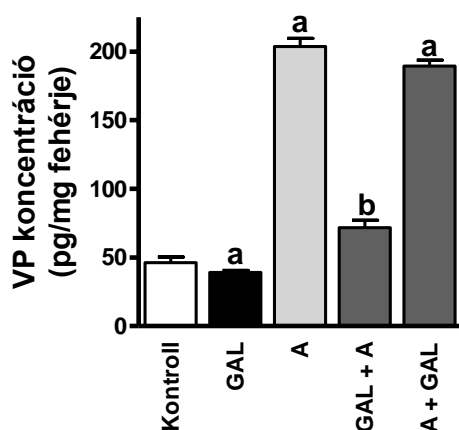
NH szövetkultúra felülúszójának VP tartalma ADR hozzáadása és 1 óra inkubáció után szignifikánsan növekedett (30. ábra). Az α receptor antagonisták (PTA, CAT, YOB), önmagukban adagolva, nem változtatták meg a VP szintet. Antagonista előkezelést alkalmazva az ADR hozzáadása előtt azt tapasztaltuk, hogy a PTA, ill. CAT kivédte a VP szint fokozódását, a YOB viszont nem gátolta az ADR hatását. Utólag adagolt antagonisták jelentősen nem változtatták az ADR által előidézett VP koncentráció növekedést.



30. ábra:
Az α -receptor antagonisták (PTA, CAT, YOB) hatása az ADR által kiváltott VP szint változásra

Egy órás inkubáció alatt a VP szint emelkedett, ADR adása után. Önmagában alkalmazott α -receptor antagonistá kezelés nem okozott változást a VP koncentrációban. Amikor a PTA, ill. CAT adagolás megelőzte az ADR kezelést, az ADR által kiváltott VP szint fokozódás nem jött létre. YOB előzetes adása nem védte ki az ADR hatását. Amikor az ADR kezelés megelőzte az antagonisták adását, a VP koncentráció növekedésében jelentős csökkenés nem volt kimutatható. (n=10; Átlag \pm S.E.M.; a: szignifikáns különbség a kontrollhoz viszonyítva; b: szignifikáns különbség az ADR-kezelthez viszonyítva).

Az NH szövetkultúra VP produkcióját megváltoztató GAL és ADR kölcsönhatást demonstrálja a 31. ábra. Az NH szövettenyészet VP szekréciója az ADR kezelés hatására fokozódott. Az ADR kezelést megelőző GAL adagolás megakadályozta az ADR által előidézett VP koncentráció emelkedést. Amikor a GAL-t az ADR kezelést követően alkalmaztuk, a GAL hatástalannak bizonyult az ADR által megnövelt VP kiválasztás vonatkozásában.



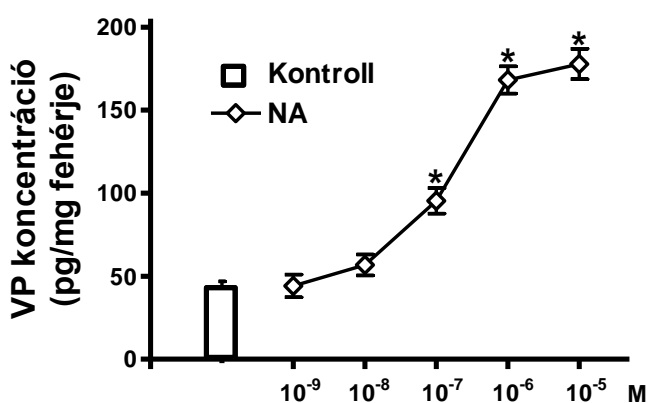
31. ábra:
GAL és ADR interakciója az NH szövetkultúra VP termelésének vonatkozásában

Az NH szövettenyészet VP termelését az ADR kezelés fokozta. Az ADR kezelést megelőző GAL adagolás blokkolta az ADR indukálta VP szint emelkedést. Utólag adagolt GAL nem gátolta az ADR hatását VP kiválasztás vonatkozásában (n=10; Átlag ± S.E.M.; a: szignifikáns különbség a kontrollhoz viszonyítva, b: szignifikáns különbség az ADR-kezelthez viszonyítva).

Noradrenalin hatása a vazopresszin szekrécióra

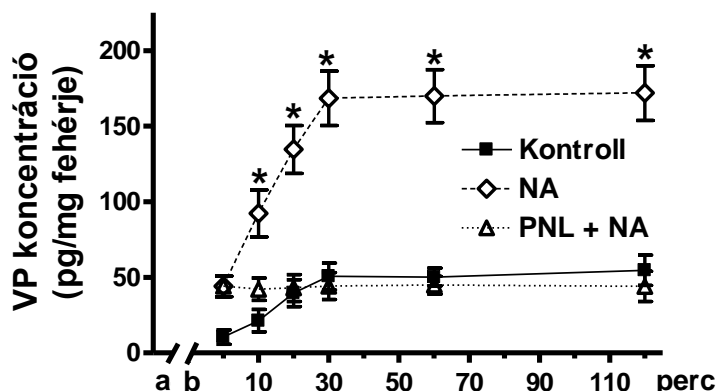
Eredmények

Az NADR kezelés és a VP kiválasztás dózis-hatás összefüggését mutatja a 32. ábra. Növekvő dózisban adagolt NADR (10^{-9} - 10^{-5} M) emelkedő VP szekréciót váltott ki az NH szövettenyészetben. A VP szint növekedése 10^{-7} M, vagy annál nagyobb dózisu NADR kezelés esetén vált szignifikánssá.



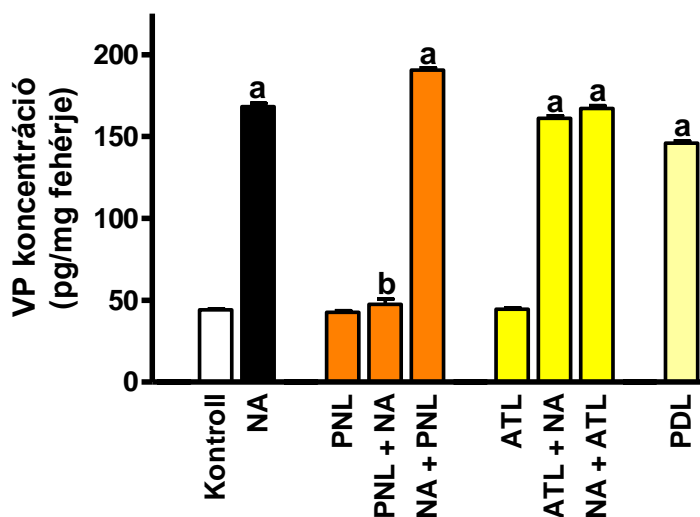
32. ábra:
Az NADR hatása a VP kiválasztásra
Emelkedő NADR dózis (10^{-9} - 10^{-5} M) hatására lineárisan növekedett a VP szint a felülülő médiumban. (n=10; Átlag ± S.E.M.; *szignifikáns különbség a kontrollhoz viszonyítva).

Az NADR és $\beta_1+\beta_2$ -receptor antagonistista PNL kezelés VP szekrécióra gyakorolt hatásának kinetikus görbét tüntettük fel a 33. ábrán. Az NADR adagolás szignifikáns VP szint növekedést okozott a felülúszóban. Az NADR kezelést megelőző PNL hozzáadás a médium VP tartalmát a kontroll szintre csökkentette.



33. ábra:
NADR adást követő VP kiválasztás kinetikus görbéje
 NADR adás után jelentősen fokozódott a VP termelés. Az NADR kezelés előtt bejuttatott $\beta_1+\beta_2$ -receptor antagonistista PNL a médium VP tartalmát a kontroll szintre csökkentette (n=10; Átlag \pm S.E.M.; *szignifikáns különbség a kontrollhoz viszonyítva).

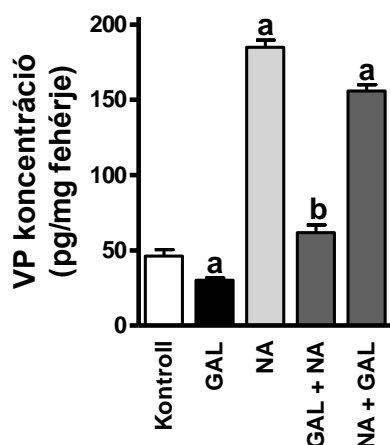
NADR kezelés után, egy órás inkubáció alatt a VP szint emelkedett (34. ábra). Önmagában adott PNL, illetve ATL kezelés nem eredményezett változást a VP koncentrációban. PDL az NADR-hez hasonlóan fokozta a VP termelést.



34. ábra
 β -receptor antagonisták (PNL, ATL, PDL) hatása az NADR által kiváltott VP szint változásra
 NADR adása az egy órás inkubáció alatt VP szint emelkedést okozott. Önmagában adott PNL, ill. ATL kezelés nem idézett elő változást a VP koncentrációban. PDL az NADR-hez hasonlóan fokozta a VP termelést. Előzetesen alkalmazott PNL blokkolta az NADR okozta VP szint emelkedést, míg az ATL ilyen hatást nem idézett elő. Amikor az NADR kezelést megelőzte a PNL adását, a VP koncentráció növekedésében csökkenés nem volt kimutatható (n=10; \pm S.E.M.; a: szignifikáns különbség a kontrollhoz viszonyítva, b: szignifikáns különbség az NADR-kezelthez viszonyítva).

Az előzetesen alkalmazott PNL kivédte az NADR okozta VP szint emelkedést, míg az ATL ilyen hatást nem idézett elő. Amikor az NADR kezelést megelőzte a PNL adását, a VP koncentráció növekedésében csökkenést nem tudunk kimutatni.

Az NH szövetkultúra VP termelését befolyásoló GAL és NADR kölcsönhatást szemlélteti a 35. ábra. Az NADR kezelés hatására fokozódott a szövettenyészet VP szekréciója. Az NADR kezelést megelőző GAL adagolás megakadályozta az NADR által előidézett VP koncentráció emelkedést. Amikor a GAL-t az NADR kezelést követően alkalmaztuk, a GAL hatástalannak bizonyult az NADR által kiváltott VP kiválasztás fokozódás vonatkozásában.



35. ábra:
GAL hatása az NADR által előidézett VP szekréció fokozódására NH szövetkultúrában

NADR kezelés fokozta a NH szövettenyészet VP termelését. NADR kezelést megelőző GAL adagolás blokkolta az NADR indukálta VP szint emelkedést. Utólag adagolt GAL nem gátolta az NADR VP kiválasztásra gyakorolt hatását.

(n=10; ± S.E.M.;

a: szignifikáns különbség a kontrollhoz viszonyítva,

b: szignifikáns különbség az NADR-kezelthez viszonyítva).

Megbeszélés

A szakirodalomban számos publikáció foglalkozik a katekolaminok VP kiválasztásra kifejtett hatásaival. A morfológiai és funkcionális kutatások során leginkább a hipotalamikus regulációt vizsgálták. Humán hipotalamuszban végzett vizsgálatok alapján beszámoltak az adrenerg rendszernek a VP kiválasztásra gyakorolt hatásáról [187]. A pituiticák jelentőségének tisztázása a katekolaminok

által kiváltott VP szekréción változásokban kevésbé vizsgált téma. Eredményeink arra utalnak, hogy az NH szintjén az ADR és az NADR jelentős befolyást gyakorol a VP szekrécóra.

Katekolaminokkal végzett kutatásaink eredményei arra utalnak, hogy a VP szekréciónak adrenerg kontrollja az NH szintjén is érvényesül. Megfigyeléseink alapján feltételezzük, hogy az NH-ban adrenerg receptorok vannak. Felmerül a kérdés, hogy melyik receptor típus vesz részt az NH VP szekréciónak szabályozásában. Mostanáig 9 adrenerg receptor típust azonosítottak: 3-féle α_1 -receptor típust, 3-féle α_2 -receptor típust és 3-féle β -receptor típust [188-191]. Tapasztalataink szerint a PTA és a CAT adagolás teljes mértékben kivédte az ADR okozta VP szint emelkedést, ha az ADR kezelés előtt alkalmaztuk azokat. Ugyanakkor az α_2 -receptor antagonistá YOB hatástalannak bizonyult. Ebből arra következtethetünk, hogy az izolált NH szövetkultúrában a VP szekréción ADR- okozta emelkedése az α_1 -receptorok közvetítésével realizálódik. Ezt a feltételezést más kutatók eredményei is megerősítik [28,178,182,192]. A β -receptor antagonistákkal kapcsolatban elmondható, hogy a PNL (a $\beta_1+\beta_2$ -receptor antagonistá) adagolás preventív hatású, ha az NADR kezelés előtt alkalmazzuk. Ugyanebben az esetben a specifikus β_1 -receptor antagonistá ATL hatástalan volt. Meglepő módon az önmagában alkalmazott $\beta_1+\beta_2$ -receptor antagonistá PDL kezelés fokozta a VP szekréción. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az NH szövettenyészetben a β_2 receptorok játszanak szerepet az NADR által előidézett VP kiválasztás fokozódásban.

Különös módon az adrenerg antagonisták csak abban az esetben mérsékeltek az ADR, vagy NADR által előidézett fokozott VP kiválasztást az NH-ban, ha az antagonistá kezelés megelőzte az ADR, vagy NADR adagolást. Ha az

ADR, vagy NADR kezelést alkalmaztuk előbb, akkor az adrenerg receptor antagonisták inefektívnek bizonyultak, a VP produkció változatlanul növekedett. A HA, a DA és az 5-HT hatásaival foglalkozó korábbi kísérleteink során hasonló tapasztalatokat szereztünk. A jelenség egyik lehetséges magyarázata ebben az esetben is az, hogy a 20 perces inkubációs idő elég hosszú ahhoz, hogy az ADR, vagy NADR kialakítsa a VP szint fokozó hatását az NH-ban, és így az adrenerg antagonisták utókezelés már hatástalannak bizonyul. Más megközelítésben a receptorok deszenzitizálódásával magyarázható. A receptorok telítettsége miatt az NH sejtek veszítenek szenzitivitásukból, így az antagonisták kezelés ellenére nem csökken az NH szövetkultúra felülúszó médiumának VP koncentrációja.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy az ADR, illetve az NADR VP kiválasztást serkentő hatásában nincs szignifikáns különbség. Nem várt fejlemény, hogy PDL ($\beta_1 + \beta_2$ antagonisták) kezelés után fokozott VP szekréciót észleltünk. Ez a látszólagos ellentmondás azzal magyarázható, hogy a PDL nemcsak mint blokkoló játszik szerepet az adrenerg regulációban, hanem jelentős „intrinsic sympathomimetic action (ISA)” tulajdonságának megfelelően erős adrenerg agonista hatása is van [193].

Megvizsgáltuk a GAL-adrenerg rendszer interakcióját az NH VP kiválasztás vonatkozásában. Azt találtuk, hogy előzetesen adott GAL kivédte az ADR, illetve NADR okozta VP szint emelkedést.

Ismeretes, hogy a GAL és receptorai (GALR1-GALR3) jelen vannak az agy különböző neurotranszmittereket, köztük katekolaminokat expresszáló neuronjaiban [46,74]. A locus coeruleus területén található NADR-erg neuronokra kifejtett GAL hatást többen is tanulmányozták *in vitro* elektrofiziológiai [172,194-196], vagy *in vivo* mikrodialízis módszerrel [197].

Hipotalamikus szinten is kölcsönhatásban áll egymással a GAL és a katekolamin-termelés. Tsuda és kollégái [198] *in vitro* hipotalamusz metszeteken végzett kísérleteik alapján megfigyelték, hogy a GAL részt vesz a centrális adrenerg rendszer regulációjában, és a GAL az eminencia mediana ADR, illetve NADR kiválasztásának hatásos gátlószere [146]. Ennek megfelelően a VP szekréció szabályozásában a GAL-nak antagonistá hatása van az adrenerg rendszer működésére.

Kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy a GAL kezelés hogyan befolyásolja az adrenerg rendszer által kiváltott VP szekréció fokozódást az NH szövettényészetben. Megfigyeléseink szerint a VP szekréció szabályozásában a GAL és az adrenerg rendszer között antagonistá interakció áll fenn. Úgy találtuk, hogy az ADR, vagy NADR adagolása előtt alkalmazott GAL kezelés csökkentette az ADR, vagy NADR által kiváltott VP kiválasztás emelkedését. Az utólag alkalmazott GAL kezelés hatástalannak bizonyult az ADR, vagy NADR által előidézett VP szint fokozódás vonatkozásában. A GAL és az adrenerg rendszer ellentétes hatása a VP termelés vonatkozásában a hipotalamusztól függetlenül is érvényesül, mivel a VP szekrécióra gyakorolt ellentétes GAL és adrenerg hatás az izolált NH szövetkultúra pituicitáira gyakorolt direkt effektus által is megvalósul.

Eredményeink azt bizonyítják, hogy az adrenerg rendszer direkt módon hat a VP termelésre az NH-ban. A VP szekréció adrenerg kontrollja és a GAL-adrenerg interakció a hipofízis hátsó lebenyének szintjén is érvényesül patkányban.

Összefoglalás

Kísérleteink során a neuropeptid, illetve a monoaminerg rendszer jelentőségét vizsgáltuk a hipotalamo-NH rendszer működésének szabályozásában.

In vivo kísérleteink során megállapítottuk, hogy a sertés bélből izolált, 29 aminosavból álló GAL fontos szerepet játszik az NH VP kiválasztásában. Kimutattuk, hogy i.c.v., illetve i.v. bejuttatás után a GAL nem befolyásolja a bazális VP kiválasztást. Az ozmotikus (2.5% NaCl oldat) és nem-ozmotikus (HA) inger hatására fellépő VP szint emelkedést az i.c.v. GAL kezelés részben, illetve teljes mértékben kivédte. Összehasonlítottuk a patkány, sertés és humán GAL hatását a VP szint csökkenés mértékére. Itt azonban különbséget nem találtunk.

A GAL molekula biológiai aktív centrumát tanulmányozva megállapítottuk, hogy a 30 aminosavat tartalmazó humán GAL 1-16 N-terminális fragmense, a teljes molekula hatásával megegyezően csökkenti a VP kiválasztást. Míg a 16-30 C-terminális GAL fragmens hatástalannak bizonyult. E megfigyelésből arra következtettünk, hogy az aktív centrum a GAL molekula első részére lokalizálódik. A GAL hatás specificitásának bizonyítására a GAL i.c.v. injekció beadása előtt GAL antagonistát galantidot (M15) adtunk. Megállapítottuk, hogy a GAL antagonistát teljesen kivédte a 2.5%-os NaCl oldat, illetve a HA adagolása által emelkedett plazma VP szintnek a GAL-okozta csökkenését.

In vitro kísérleteink alkalmával patkány GAL hatását tanulmányoztuk a VP kiválasztásra izolált patkány NH szövetkultúrában. Dr. Gálfi Márta tanárnő által korábban kidolgozott és publikált módszer segítségével olyan NH sejtkultúrát tudtunk előállítani, amely képes VP termelésre és kiválasztásra. A szövettenyésztés felülúszó médiumában megjelenő VP koncentrációját RIA

eljárással határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy a szövetkultúrában a VP kiválasztás az inkubáció kezdetétől számított 5-6. napon indul meg, fokozatosan növekszik, a 13-14. napon eléri a maximumot és a későbbiek során a felülúszó médium VP tartalma nem változik. Kísérleteink alkalmával 14 napos szövetkultúrákat használtunk. Megfigyeltük, hogy egy-két órás inkubáció után a felülúszó médiumban dózistól függően (10^{-9} - 10^{-6} M) a GAL szignifikáns módon csökkentette a VP koncentrációt.

A továbbiakban az aspecifikus ozmotikus inger VP szekréciónak gyakorolt hatását vizsgáltuk az NH szövettenyészetben. K^+ -ot adtunk a felülúszó médiumhoz és jelentős VP kiválasztás fokozódást észleltünk, a VP szekréció növekedés előzetes GAL kezeléssel nem védhető ki. Mivel a K^+ hormonszekréciónak fokozó hatása nem receptorokhoz kötött, ebből arra következtethetünk, hogy a tenyésztett pituiciták membránján GAL receptorok helyezkednek el, és a GAL-monoaminerg interakció a specifikus receptorok közreműködésével érvényesül.

A monoaminerg anyagok közül először a HA hatását tanulmányoztuk a VP kiválasztásra. Megállapítottuk, hogy a VP termelés a HA dózistól függően növekszik a felülúszó médiumban. A VP kiválasztás fokozódás részben blokkolható előzetesen adott H_1 és H_2 receptor antagonistákkal: MEP (H_1 receptor antagonist), illetve CIM (H_2 receptor antagonist). A H_3 - H_4 receptor antagonist TPE hatástalannak bizonyult. Amennyiben a MEP, illetve CIM adagolása a HA hozzáadása után történt, a VP szint emelkedés változatlan maradt. Kísérleteink alapján arra következtettünk, hogy a H_1 és H_2 receptorok szerepet játszanak a HA által kiváltott VP szekréció fokozódásban *in vitro* körülmények között, míg a H_3 + H_4 receptor antagonist TPE ineffektívnek bizonyult. A GAL-HA interakciót vizsgálva megállapítottuk, hogy a HA kezelés előtt adagolt GAL részben kivédi a VP szint

emelkedést, míg a HA adagolás után alkalmazott GAL nem csökkentette az NH VP kiválasztásának fokozódását. Ezt a jelenséget azzal magyaráztuk, hogy a HA-val történő 20 perces előinkubációs periódus alatt jelentős VP szekréció növekedés jön létre, amelyet az utólag adott HA antagonisták, illetve GAL jelentősen nem tudott csökkenteni. Eredményeink arra utalnak, hogy a HA-erg reguláció és a GAL-HA interakció a VP kiválasztás vonatkozásában a hipotalamusztól függetlenül, a hipofízis hátsólebeny szintjén is érvényesül.

A továbbiakban a DA hatását vizsgáltuk a VP kiválasztásra. Kimutattuk, hogy DA és a DA-aktív APM, illetve PLG növelte a VP szintet az NH szövetkultúrában. A DA-aktív vegyületek által kiváltott VP szint emelkedést a médiumhoz előzetesen hozzáadott GAL teljes mértékben kivédte. A GAL receptor antagonistá galantid (M15) viszont megelőzte a GAL DA-blokkoló hatását. Vizsgálataink arra utalnak, hogy az NH sejtjeiben (a pituicitákban) DA receptorok vannak és a DA-erg reguláció, valamint a GAL-DA interakció a hipotalamusztól függetlenül, a hipofízis hátsólebeny szintjén is érvényesül.

A neurotranszmittereknek az NH hormonok kiválasztásában játszott szerepét tanulmányozva a következő kísérletsorozatunkban az 5-HT hatását vizsgáltuk. A VP szint, az 5-HT dózisától függően szignifikáns emelkedést mutatott a szövetkultúra felülúszó médiumában. A VP kiválasztás fokozódása részben megakadályozható az 5-HT kezelés előtt adott 5-HT antagonistá KTS-sel, illetve MTG-vel. A WAY nem befolyásolta az 5-HT okozta VP szekréció fokozódást. Ezek alapján arra következtettünk, hogy az 5-HT₂ receptor a felelős az 5-HT által kiváltott VP szekréció növekedésben, izolált NH szövetkultúrában. Az 5-HT és a GAL interakcióját vizsgálva kimutattuk, hogy az 5-HT által kiváltott VP kiválasztás fokozódása részben kivédhető előzetesen adagolt GAL bejuttatásával.

Amennyiben az 5-HT adagolás megelőzte a GAL hozzáadását, a GAL preventív hatása nem érvényesült. Mindezek alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az 5-HT rendszer a VP kiválasztást direkt módon, a hátsó lebény szintjén is befolyásolja.

A monoaminerg vegyületek közül végül az adrenerg rendszer jelentőségét tanulmányoztuk. Megállapítottuk, hogy az ADR, illetve az NADR egyaránt növeli az NH sejtek VP termelését. Előzetesen adott α receptor antagonistá PTA ($\alpha_1 + \alpha_2$ receptor antagonistá), illetve CAT (α_1 receptor antagonistá) kivédte a VP szint emelkedést, míg az α_2 receptor antagonistá YOB nem befolyásolta az ADR-okozta VP koncentráció fokozódást. A $\beta_1 + \beta_2$ receptor antagonistá PNL az NADR adás előtt megakadályozta a VP szint emelkedést. Az ATL (β_1 receptor antagonistá) nem változtatta meg az NADR indukálta VP koncentráció növekedést. Meglepő eredményt kaptunk a PDL ($\beta_1 + \beta_2$ receptor antagonistá) kezelést követően. A PDL önmagában (az NADR adáshoz hasonlóan) fokozta a VP termelést. Az ellentmondó eredményt az magyarázhatja, hogy a PDL-nek nemcsak β receptor blokkoló hatása van, hanem jelentős „intrinsic sympathomimetic action (ISA)” tulajdonságának megfelelően erős adrenerg agonista hatással is rendelkezik. Megvizsgáltuk a GAL-adrenerg rendszer interakcióját is. Azt találtuk, hogy előzetesen adott GAL kivédte az ADR, illetve NADR-okozta VP szint emelkedést. Vizsgálataink alapján arra következtettünk, hogy az α_1 és β_2 adrenerg receptorokon keresztül érvényesül az ADR, illetve NADR által kiváltott VP termelés fokozódás NH szövetkultúrában. A VP kiválasztás adrenerg regulációja és a GAL-adrenerg interakció a hipofízis hátsólebeny szintjén is kimutatható.

Summary

The significance of the neuropeptide and monoaminergic systems in regulation of the function of the hypothalamo-neurohypophyseal system was examined.

Our *in vivo* experiments revealed that the 29 amino-acid-containing GAL, isolated from the porcine intestine, plays an important role in the regulation of VP secretion. There were no changes in the basal VP secretion after i.v. or i.c.v. GAL administration. I.c.v. GAL treatment partially or totally blocked the VP level enhancement induced by 2.5% NaCl or HA administration. There was no significant difference in the inhibitory effects of rat, porcine or human GAL. Study of the active centre of the GAL molecule revealed that the human GAL 1-16 N-terminal fragment decreased the level of VP secretion. The GAL 16-30 C-terminal fragment was ineffective. This observation suggested that the active centre is localized in the N-terminal part of the GAL molecule. To prove the specificity of the GAL effect, we administered the GAL antagonist galantid (M15) before the GAL i.c.v. injection. We found that the GAL antagonist totally prevented the inhibitory effect of GAL on the increased plasma VP level following the administration of 2.5% NaCl solution or HA.

In our *in vitro* experiments the effects of GAL on VP secretion in isolated rat NH tissue cultures were studied. Using the method of Gálfi, we could make NH tissue cultures capable of VP production and secretion. The VP content of the supernatant medium was determined by RIA. We proved that the VP content of the medium appeared on day 5 or 6, and gradually increased up to day 13 or 14. The hormone secretion had become constant by this time. We used 13–14-day

cultures of NH tissue for our experiments. A significantly and dose-dependently decreased content of VP was detected following the administration of 10^{-9} – 10^{-6} M doses of GAL.

In the next experimental phase, we examined the effects of non-osmotic stimuli on VP secretion in isolated NH tissue cultures. Significantly elevated VP levels were measured after K^+ administration. The enhancement of VP secretion could not be prevented by previous GAL treatment. The enhancing effects of K^+ on hormone secretion is not dependent on the receptors, and we therefore concluded that there are GAL receptors on the membrane of the pituicytes of the isolated tissue cultures, and specific receptors are involved in the interactions between GAL and the monoaminergic system.

Of the monoaminergic compounds, the effects of HA on VP secretion were examined first. Significantly increased levels of VP production were detected in the tissue culture media following HA administration, depending on the HA dose. The VP secretion elevation could be partially blocked by previous administration of the H_1 -receptor antagonist MEP or the H_2 -receptor antagonist CIM. The H_3 – H_4 receptor antagonist TPE did not influence the VP secretion increase induced by HA. MEP or CIM application after HA administration proved ineffective. We concluded that mainly the H_1 - and H_2 -receptors are involved in the HA-induced increase of VP secretion, while the H_3 – H_4 -receptor antagonist TPE proved ineffective in isolated NH tissue cultures. Study of the interaction between GAL and HA demonstrated that the HA-induced elevation of the VP level was partially blocked by GAL administration before HA treatment. GAL administration after HA treatment did not decrease the enhancement of VP secretion. This phenomenon can be explained in that the 20-min preincubation period is probably long enough

for the VP level-increasing action of HA, and thus GAL is ineffective. The results indicate that the HA-ergic control and GAL-HA interaction relating to VP secretion from the NH tissue in rats can occur independently of the hypothalamus, at the level of the posterior pituitary.

In the next experimental series, the effects of DA on VP secretion were studied. We observed that DA and DA-active compounds (APM and PLG) increased the VP level in the medium of isolated NH tissue cultures. The VP level elevations induced by DA-active compounds were totally blocked by the previous administration of GAL. The DA-blocking effect of GAL was prevented by addition of the GAL receptor antagonist galantid (M15). Our results indicate that there are DA receptors in the cells of the NH (pituicytes), and that the DA-ergic regulation and the GAL-DA interaction can occur independently of the hypothalamus, at the level of the posterior pituitary.

As concerns the role of neurotransmitters in VP secretion, the effects of 5-HT were examined in the following experimental phase. Significantly increased levels of VP production were detected in the tissue culture media following 5-HT administration, depending on the 5-HT dose. The VP secretion elevation could be partially blocked by previous administration of the 5-HT antagonist KTS or MTG. WAY did not influence the VP secretion increase induced by 5-HT. Accordingly, we conclude that mainly the 5-HT₂ receptors are involved in the 5-HT-induced increase of VP secretion in isolated NH tissue cultures. Examination of the interaction between 5-HT and GAL indicated that GAL administration before 5-HT treatment partially blocked the 5-HT-induced elevation of the VP level. GAL administration after 5-HT treatment proved ineffective. These results reveal that

VP release from the NH is influenced by the 5-HT-ergic system directly at the level of the posterior pituitary.

Finally, the significance of the actions of ADR and NADR on VP secretion was studied. Significantly increased VP levels were detected in the tissue culture media following the administration of ADR or NADR, depending on the dose. The VP secretion elevation was totally blocked by the previous administration of PTA (an $\alpha_1+\alpha_2$ -receptor antagonist) or CAT (an α_1 -receptor antagonist). YOB (an α_2 -receptor antagonist) did not influence the VP secretion increase induced by ADR. PNL (a $\beta_1+\beta_2$ -receptor antagonist) before NADR administration prevented the VP secretion increase. ATL (a β_1 -receptor antagonist) did not block the VP secretion elevation induced by NADR. Surprisingly, the administration of PDL (a $\beta_1+\beta_2$ -receptor antagonist) enhanced VP secretion. This contradictory effect can be explained in that PDL not only acts as a β -receptor blocker, but also exerts “intrinsic sympathomimetic action (ISA)” and a strong adrenergic agonist effect. As regards the interactions between GAL and the adrenergic system, we observed that GAL administration before ADR or NADR treatment prevented the VP level elevation induced by ADR or NADR. We concluded that mainly the α_1 - and β_2 -adrenergic receptors are involved in the ADR- or NADR-induced increase of VP secretion in isolated NH tissue cultures. The adrenergic control of VP secretion and the interactions between GAL and the adrenergic system can occur at the level of the posterior pituitary.

Zárszó

Kutatásaink alapkutatásnak minősülnek. Eredményeink újabb adatokat szolgáltatnak a hipotalamo-NH rendszer működésének jobb megértéséhez.

Az ozmoreguláció, illetve vízháztartás szempontjából jelentős VP termelésének és kiválasztásának szabályozását vizsgáltuk. A humán betegségekben, például Alzheimer-kórban [199], is szerepet játszó GAL élettani hatásainak megismerését, valamint a GAL- monoaminerg rendszer kapcsolatának kutatását tűztük ki célul.

Kísérleteink során bizonyítottuk, hogy *in vivo* körülmények között a GAL-erg rendszer jelentős szerepet játszik a VP kiválasztás regulációjában. *In vitro* eredményeink alapján a VP szekréció GAL-erg kontrollja és a GAL-monoaminerg interakció az izolált NH szövetkultúrában a hipotalamusztól függetlenül, a hipofízis hátsólebeny szintjén is érvényesül.

Eredményeinkkel hozzájárulni kívánunk a GAL-erg rendszer működésének jobb megértéséhez, amely perspektivikus lehet az Alzheimer-kór hatékony kezelési eljárásainak kidolgozásában.

Köszönetnyilvánítás

Hálával és köszönettel tartozom témavezetőimnek, hogy munkámat szüntelenül támogatták: Dr. László A. Ferenc tudományos tanácsadónak, neuroendokrinológiai ismereteim elsajátításához nyújtott segítségével és a kutatómunka irányításáért; ifj. Dr. László Ferenc professzornak és Dr. Varga Csaba egyetemi docensnek a mind elméleti, mind gyakorlati téren nyújtott hasznos tanácsaikért.

Köszönetemet fejezem ki továbbá

Dr. Toldi József tanszékvezető egyetemi tanárnak, aki lehetővé tette számomra, hogy kutatómunkámat az SZTE TTK Összehasonlító Élettani Tanszékén végezhessem;

Dr. Gálfi Márta főiskolai tanárnak, Radács Mariann és Nagyéri György Ph.D. hallgatóknak az *in vitro* módszerek megismeréséhez és kivitelezéséhez nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért;

Dr. Gardi Jánosnak, az SZTE ÁOK Endokrinológiai Önálló Osztály és Kutató Laboratórium tudományos munkatársának, a jelzett VP elkészítéséért;

Dr. Balásperi Lajos professzornak a GAL vegyületek előállításáért.

Berkó Anikó laboratóriumi operátornak a kutatómunkám során felmerült összes megoldhatatlannak tűnő metodikai probléma megoldásáért,

az Összehasonlító Élettani Tanszék Endokrin Laboratórium kutatócsoportjának: Pósa Anikó és Horváth Krisztina Ph.D. hallgatóknak, Kunstár Éva, Szabó Györgyi és Szalai Zita szakdolgozóknak a számos technikai nehézség leküzdéséért.

Köszönetet szeretnék mondani az Összehasonlító Élettani Tanszék valamennyi dolgozójának a munkámhoz nyújtott emberi és szakmai segítségért, valamint a barátságos légkörért, amelyben munkámat végezhettem.

Köszönöm a disszertáció megírásához szükséges nyugodt munkahelyi körülményeket az SZTE JGYPK Testnevelési és Sporttudományi Intézet munkatársainak, valamint mindazoknak, akik munkám elvégzését valamilyen úton-módon megkönnyítették.

...és végezetül köszönöm családomnak, Katának és Zsigmondnak, akik az egész munkám háttérében a legfontosabbakat adták nekem.

Irodalomjegyzék

- [1] Rhodes CH, Morrell JI, Pfaff DW. Immunohistochemical analysis of magnocellular elements in rat hypothalamus: distribution and numbers of cells containing neurophysin, oxytocin, and vasopressin. *J Comp Neurol* 1981;198:45-64.
- [2] Swaab DF, Nijveldt F, Pool CW. Distribution of oxytocin and vasopressin in the rat supraoptic and paraventricular nucleus. *J Endocrinol* 1975;67:461-462.
- [3] Jirikowski GF, Sanna PP, Maciejewski-Lenoir D, Bloom FE. Reversal of diabetes insipidus in Brattleboro rats: intrahypothalamic injection of vasopressin mRNA. *Science* 1992;255:996-998.
- [4] Boersma CJ, Van Leeuwen FW. Neuron-glia interactions in the release of oxytocin and vasopressin from the rat neural lobe: the role of opioids, other neuropeptides and their receptors. *Neuroscience* 1994;62:1003-1020.
- [5] László FA, Gálfi M, Jójárt I, Vecsernyés M, Laczi F, Maderschpach K. Neurohypophysis Tissue Culture as a Model of Hormonal Activity of Rat Pituicytes. In: *Proc 4th Int Conf Neurohypophysis, New Aspects of Morphology Function and Regulation*, Copenhagen: Oxford Univ Press 1989;pp. 87-91.
- [6] Janáky T, Szabo P, Kele Z, Balaspiri L, Varga C, Galfi M, Vecsernyes M, Gaspar L, Juhasz A, Laszlo FA. Identification of oxytocin and vasopressin from neurohypophyseal cell culture. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1998;12:1765-1768.
- [7] Boersma CJ, Sonnemans MA, Van Leeuwen FW. Immunoelectron microscopic demonstration of oxytocin and vasopressin in pituicytes and in nerve terminals forming synaptoid contacts with pituicytes in the rat neural lobe. *Brain Res* 1993;611:117-129.
- [8] Mohr E, Zhou A, Thorn NA, Richter D. Rats with physically disconnected hypothalamo-pituitary tracts no longer contain vasopressin-oxytocin gene transcripts in the posterior pituitary lobe. *FEBS Lett* 1990;263:332-336.
- [9] Tweedle CD, Hatton GI. Morphological adaptability at neurosecretory axonal endings on the neurovascular contact zone of the rat neurohypophysis. *Neuroscience* 1987;20:241-246.
- [10] du Vigneaud V, Gash DT, Katsyannis PG. A synthetic preparation possessing biological properties associated with arginine-vasopressin. *J Am Chem Soc* 1954;76:4751.
- [11] Valtin H. Renal actions by which vasopressin may aid the concentration of urine. *Nephrology*, Vol 1 (R R Robinson, ed), pp 397-406, Springer-Verlag, New York 1984
- [12] Share L. Role of vasopressin in cardiovascular regulation. *Physiol Rev* 1988;68:1248-1284.
- [13] Wied D. Hormonal influences on motivation, learning, and memory processes. *Hosp Pract* 1976;11:123-131.
- [14] Schang JC, Dapoigny M, Devroede G. Stimulation of colonic peristalsis by vasopressin: electromyographic study in normal subjects and patients with chronic idiopathic constipation. *Can J Physiol Pharmacol* 1987;65:2137-2141.

- [15] Rofe AM, Williamson DH. Metabolic effects of vasopressin infusion in the starved rat. Reversal of ketonaemia. *Biochem J* 1983;212:231-239.
- [16] Barberis C, Audigier S, Durroux T, Elands J, Schmidt A, Jard S. Pharmacology of oxytocin and vasopressin receptors in the central and peripheral nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 1992;652:39-45.
- [17] Streefkerk JO, Pfaffendorf M, van Zwieten PA. Endothelium-dependent, vasopressin-induced contractions in rabbit renal arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;42:703-709.
- [18] Tribollet E. Vasopressin and oxytocin receptors in the rat brain. In: Björklund, A, Hökfelt, T, Kuhar, M J eds, *Handbook of chemical neuroanatomy* New York: Elsevier, 1992;11:289-320.
- [19] Antoni FA, Holmes MC, Makara GB, Karteszi M, Laszlo FA. Evidence that the effects of arginine-8-vasopressin (AVP) on pituitary corticotropin (ACTH) release are mediated by a novel type of receptor. *Peptides* 1984;5:519-522.
- [20] Holmes CL, Landry DW, Granton JT. Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1--receptor physiology. *Crit Care* 2003;7:427-434.
- [21] Sladek CD, Armstrong WE. Effect of neurotransmitters and neuropeptides on vasopressin release. In: *Vasopressin: Principles and properties* (Gash, D M, Boer, G J eds), pp 275-333, Plenum Press, New York 1987
- [22] Knigge U, Warberg J. The role of histamine in the neuroendocrine regulation of pituitary hormone secretion. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991;124:609-619.
- [23] Knigge U, Willems E, Kjaer A, Jorgensen H, Warberg J. Histaminergic and catecholaminergic interactions in the central regulation of vasopressin and oxytocin secretion. *Endocrinology* 1999;140:3713-3719.
- [24] Buijs RM, Geffard M, Pool CW, Hoorneman EM. The dopaminergic innervation of the supraoptic and paraventricular nucleus. A light and electron microscopical study. *Brain Res* 1984;323:65-72.
- [25] Lindvall O, Björklund A, Skagerberg G. Selective histochemical demonstration of dopamine terminal systems in rat di- and telencephalon: new evidence for dopaminergic innervation of hypothalamic neurosecretory nuclei. *Brain Res* 1984;306:19-30.
- [26] Falke N. Modulation of oxytocin and vasopressin release at the level of the neurohypophysis. *Prog Neurobiol* 1991;36:465-484.
- [27] Reichlin S. Neuroendocrinology. In: Wilson J D, Foster D W, Kronenberg H M, Larsen PR, eds *Textbook of Endocrinology* 1998;Philadelphia:165-248.
- [28] Leng G, Brown CH, Russell JA. Physiological pathways regulating the activity of magnocellular neurosecretory cells. *Prog Neurobiol* 1999;57:625-655.
- [29] Stone JD, Crofton JT, Share L. Sex differences in central adrenergic control of vasopressin release. *Am J Physiol* 1989;257:R1040-1045.
- [30] Tatemoto K, Rokaeus A, Jornvall H, McDonald TJ, Mutt V. Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett* 1983;164:124-128.
- [31] Vrontakis ME, Peden LM, Duckworth ML, Friesen HG. Isolation and characterization of a complementary DNA (galanin) clone from estrogen-induced pituitary tumor messenger RNA. *J Biol Chem* 1987;262:16755-16758.

- [32] Rokaesus A, Carlquist M. Nucleotide sequence analysis of cDNAs encoding a bovine galanin precursor protein in the adrenal medulla and chemical isolation of bovine gut galanin. *FEBS Lett* 1988;234:400-406.
- [33] Bersani M, Johnsen AH, Hojrup P, Dunning BE, Andreasen JJ, Holst JJ. Human galanin: primary structure and identification of two molecular forms. *FEBS Lett* 1991;283:189-194.
- [34] Hokfelt T, Bártfai T, Wiesenfeld-Hallin Z. Neuropeptides: Recent Advances with Special Reference to Galanin. *Neurosci Facts* 1992;3:77-78.
- [35] Bartfai T, Fisone G, Langel U. Galanin and galanin antagonists: molecular and biochemical perspectives. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13:312-317.
- [36] Bauer FE, Ginsberg L, Venetikou M, MacKay DJ, Burrin JM, Bloom SR. Growth hormone release in man induced by galanin, a new hypothalamic peptide. *Lancet* 1986;2:192-195.
- [37] Bek T, Ottesen B, Fahrenkrug J. The effect of galanin, CGRP and ANP on spontaneous smooth muscle activity of rat uterus. *Peptides* 1988;9:497-500.
- [38] Amiranoff B, Lorinet AM, Lagny-Pourmir I, Laburthe M. Mechanism of galanin-inhibited insulin release. Occurrence of a pertussis-toxin-sensitive inhibition of adenylate cyclase. *Eur J Biochem* 1988;177:147-152.
- [39] Schepp W, Prinz C, Tatge C, Hakanson R, Schusdziarra V, Classen M. Galanin inhibits gastrin release from isolated rat gastric G-cells. *Am J Physiol* 1990;258:G596-602.
- [40] Dunning BE, Ahren B, Veith RC, Bottcher G, Sundler F, Taborsky GJ, Jr. Galanin: a novel pancreatic neuropeptide. *Am J Physiol* 1986;251:E127-133.
- [41] Hooi SC, Koenig JI, Gabriel SM, Maiter D, Martin JB. Influence of thyroid hormone on the concentration of galanin in the rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology* 1990;51:351-356.
- [42] Leibowitz SF. Hypothalamic paraventricular nucleus: interaction between alpha 2-noradrenergic system and circulating hormones and nutrients in relation to energy balance. *Neurosci Biobehav Rev* 1988;12:101-109.
- [43] Mastropaolo J, Nadi NS, Ostrowski NL, Crawley JN. Galanin antagonizes acetylcholine on a memory task in basal forebrain-lesioned rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:9841-9845.
- [44] Kondo K, Murase T, Otake K, Ito M, Kurimoto F, Oiso Y. Galanin as a physiological neurotransmitter in hemodynamic control of arginine vasopressin release in rats. *Neuroendocrinology* 1993;57:224-229.
- [45] Landry M, Roche D, Calas A. Short-term effects of centrally administered galanin on the hyperosmotically stimulated expression of vasopressin in the rat hypothalamus. An in situ hybridization and immunohistochemistry study. *Neuroendocrinology* 1995;61:393-404.
- [46] Brancheck TA, Smith KE, Gerald C, Walker MW. Galanin receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21:109-117.
- [47] Burazin TC, Larm JA, Gundlach AL. Regulation by osmotic stimuli of galanin-R1 receptor expression in magnocellular neurones of the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Neuroendocrinol* 2001;13:358-370.
- [48] Gundlach AL, Burazin TC. Galanin-galanin receptor systems in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. Some recent findings and future challenges. *Ann N Y Acad Sci* 1998;863:241-251.

- [49] Mitchell V, Habert-Ortoli E, Epelbaum J, Aubert JP, Beauvillain JC. Semiquantitative distribution of galanin-receptor (GAL-R1) mRNA-containing cells in the male rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1997;66:160-172.
- [50] Landry M, Aman K, Hokfelt T. Galanin-R1 receptor in anterior and mid-hypothalamus: distribution and regulation. *J Comp Neurol* 1998;399:321-340.
- [51] Ohtaki T, Kumano S, Ishibashi Y, Ogi K, Matsui H, Harada M, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M. Isolation and cDNA cloning of a novel galanin-like peptide (GALP) from porcine hypothalamus. *J Biol Chem* 1999;274:37041-37045.
- [52] Arrang JM, Gulat-Marnay C, Defontaine N, Schwartz JC. Regulation of histamine release in rat hypothalamus and hippocampus by presynaptic galanin receptors. *Peptides* 1991;12:1113-1117.
- [53] Jansson A, Fuxe K, Eneroth P, Agnati LF. Centrally administered galanin reduces dopamine utilization in the median eminence and increases dopamine utilization in the medial neostriatum of the male rat. *Acta Physiol Scand* 1989;135:199-200.
- [54] Nordstrom O, Melander T, Hokfelt T, Bartfai T, Goldstein M. Evidence for an inhibitory effect of the peptide galanin on dopamine release from the rat median eminence. *Neurosci Lett* 1987;73:21-26.
- [55] Melander T, Hokfelt T, Rokaeus A, Cuellar AC, Oertel WH, Verhofstad A, Goldstein M. Coexistence of galanin-like immunoreactivity with catecholamines, 5-hydroxytryptamine, GABA and neuropeptides in the rat CNS. *J Neurosci* 1986;6:3640-3654.
- [56] Hatton GI, Perlmutter LS, Salm AK, Tweedle CD. Dynamic neuronal-glia interactions in hypothalamus and pituitary: implications for control of hormone synthesis and release. *Peptides* 1984;5 Suppl 1:121-138.
- [57] Gaymann W, Martin R. Immunoreactive galanin-like material in magnocellular hypothalamo-neurohypophysial neurones of the rat. *Cell Tissue Res* 1989;255:139-147.
- [58] Koenig JI, Hooi S, Gabriel SM, Martin JB. Potential involvement of galanin in the regulation of fluid homeostasis in the rat. *Regul Pept* 1989;24:81-86.
- [59] Meister B, Cortes R, Villar MJ, Schalling M, Hokfelt T. Peptides and transmitter enzymes in hypothalamic magnocellular neurons after administration of hyperosmotic stimuli: comparison between messenger RNA and peptide/protein levels. *Cell Tissue Res* 1990;260:279-297.
- [60] Skofitsch G, Jacobowitz DM, Amann R, Lembeck F. Galanin and vasopressin coexist in the rat hypothalamo-neurohypophysial system. *Neuroendocrinology* 1989;49:419-427.
- [61] Shen J, Larm JA, Gundlach AL. Galanin-like peptide mRNA in neural lobe of rat pituitary. Increased expression after osmotic stimulation suggests a role for galanin-like peptide in neuron-glia interactions and/or neurosecretion. *Neuroendocrinology* 2001;73:2-11.
- [62] Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press 1996; Compact Third Edition
- [63] Kennedy PG, Lisak RP, Raff MC. Cell type-specific markers for human glial and neuronal cells in culture. *Lab Invest* 1980;43:342-351.
- [64] Michler-Stuke A, Bottenstein JE. Proliferation of glial-derived cells in defined media. *J Neurosci Res* 1982;7:215-228.

- [65] Huszti Z, Rimanoczy A, Juhasz A, Magyar K. Uptake, metabolism, and release of [3H]-histamine by glial cells in primary cultures of chicken cerebral hemispheres. *Glia* 1990;3:159-168.
- [66] Julesz J, Gálfi M, Molnár J, Vecsernyés M. Central effects of tricyclic compounds on the endocrine system-- an in vitro study. *ProgBrain Res* 1992;91:89-92.
- [67] Laczi F, Fekete M, De Wied D. Antidiuretic activity and immunoreactive arginin-vasopressin levels in eye plexus blood during passive avoidance behavior in rats. *Life Sci* 1983;32:577-589.
- [68] Dogterom J, van Wimersma Greidanus TB, De Wied D. Vasopressin in cerebrospinal fluid and plasma of man, dog, and rat. *Am J Physiol* 1978;234:E463-467.
- [69] Laczi F, Ivanyi T, Julesz J, Janaky T, Laszlo FA. Plasma arginine-8-vasopressin responses to osmotic or histamine stimulation contribute to the differential diagnosis of central diabetes insipidus. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1986;113:168-174.
- [70] Hunter WM, Greenwood FC. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 1962;194:495-496.
- [71] Janáky T, Tóth G, Penke B, Kovács K, László FA. Iodination of peptide hormones and purification of iodinated peptides by HPLC. *J Liq Chromatogr* 1982;5:1499-1507.
- [72] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
- [73] Skofitsch G, Jacobowitz DM. Immunohistochemical mapping of galanin-like neurons in the rat central nervous system. *Peptides* 1985;6:509-546.
- [74] Melander T, Hokfelt T, Rokaeus A. Distribution of galaninlike immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 1986;248:475-517.
- [75] Palkovits M, Rokaeus A, Antoni FA, Kiss A. Galanin in the hypothalamo-hypophyseal system. *Neuroendocrinology* 1987;46:417-423.
- [76] Rokaeus A, Young WS, 3rd, Mezey E. Galanin coexists with vasopressin in the normal rat hypothalamus and galanin's synthesis is increased in the Brattleboro (diabetes insipidus) rat. *Neurosci Lett* 1988;90:45-50.
- [77] Skofitsch G, Sills MA, Jacobowitz DM. Autoradiographic distribution of 125I-galanin binding sites in the rat central nervous system. *Peptides* 1986;7:1029-1042.
- [78] Melander T, Kohler C, Nilsson S, Hokfelt T, Brodin E, Theodorsson E, Bartfai T. Autoradiographic quantitation and anatomical mapping of 125I-galanin binding sites in the rat central nervous system. *J Chem Neuroanat* 1988;1:213-233.
- [79] Merchenthaler I, Lopez FJ, Negro-Vilar A. Anatomy and physiology of central galanin-containing pathways. *Prog Neurobiol* 1993;40:711-769.
- [80] Balaspiri L, Janaky T, Mak M, Blazso G, Jozsa R, Takacs T, Kasa P. Syntheses of galanins, their fragments, and analogs. *Ann N Y Acad Sci* 1998;863:414-416.
- [81] Murakami Y, Ohshima K, Mochizuki T, Yanaihara N. Effect of human galanin on growth hormone prolactin, and antidiuretic hormone secretion in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1436-1438.
- [82] Balment RJ, al Barazanji K. Renal, cardiovascular and endocrine effects of centrally administered galanin in the anaesthetised rat. *Regul Pept* 1992;38:71-77.

- [83] Kondo K, Murase T, Otake K, Ito M, Oiso Y. Centrally administered galanin inhibits osmotically stimulated arginine vasopressin release in conscious rats. *Neurosci Lett* 1991;128:245-248.
- [84] Yagita K, Okamura H, Iyata Y. Rehydration process from salt-loading: recovery of vasopressin and its coexisting galanin, dynorphin and tyrosine hydroxylase immunoreactivities in the supraoptic and paraventricular nuclei. *Brain Res* 1994;667:13-23.
- [85] Bartfai T, Bedecs K, Land T, Langel U, Bertorelli R, Girotti P, Consolo S, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Nilsson S, Pieribone VA, Hokfelt T. M-15: high-affinity chimeric peptide that blocks the neuronal actions of galanin in the hippocampus, locus coeruleus, and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:10961-10965.
- [86] Lindskog S, Ahren B, Land T, Langel U, Bartfai T. The novel high-affinity antagonist, galantide, blocks the galanin-mediated inhibition of glucose-induced insulin secretion. *Eur J Pharmacol* 1992;210:183-188.
- [87] Ogren SO, Pramanik A, Land T, Langel U. Differential effects of the putative galanin receptor antagonists M15 and M35 on striatal acetylcholine release. *Eur J Pharmacol* 1993;242:59-64.
- [88] Spinedi E, Hadid R, Gaillard RC. Increased vasopressinergic activity as a possible compensatory mechanism for a normal hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to stress in BALB/c nude mice. *Neuroendocrinology* 1997;66:287-293.
- [89] Venetikou MS, Lacoumenta S, Ghatei MA, Burrin JM, Bloom SR. Comparative studies on the release of vasopressin and 7B2 from isolated hypothalami. *Regul Pept* 1990;29:163-172.
- [90] Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg M, Pollard H, Ruat M. Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol Rev* 1991;71:1-51.
- [91] Hough LB. Cellular localization and possible functions for brain histamine: recent progress. *Prog Neurobiol* 1988;30:469-505.
- [92] Kjaer A, Knigge U, Warberg J. Involvement of oxytocin in histamine- and stress-induced ACTH and prolactin secretion. *Neuroendocrinology* 1995;61:704-713.
- [93] Tuomisto L, Eriksson L, Fyhrquist F. Vasopressin release by histamine in the conscious goat. *Eur J Pharmacol* 1980;63:15-24.
- [94] Tuomisto L, Eriksson L, Fyhrquist F. Plasma vasopressin levels after I.C.V. infusion of histamine agonists in the conscious goat. *Agents Actions* 1984;14:558-560.
- [95] Kjaer A, Knigge U, Olsen L, Vilhardt H, Warberg J. Mediation of the stress-induced prolactin release by hypothalamic histaminergic neurons and the possible involvement of vasopressin in this response. *Endocrinology* 1991;128:103-110.
- [96] Weiss ML, Yang QZ, Hatton GI. Magnocellular tuberomammillary nucleus input to the supraoptic nucleus in the rat: anatomical and in vitro electrophysiological investigations. *Neuroscience* 1989;31:299-311.
- [97] Smith BN, Armstrong WE. Histamine enhances the depolarizing afterpotential of immunohistochemically identified vasopressin neurons in the rat supraoptic nucleus via H1-receptor activation. *Neuroscience* 1993;53:855-864.

- [98] Hatton GI, Yang QZ. Ionotropic histamine receptors and H2 receptors modulate supraoptic oxytocin neuronal excitability and dye coupling. *J Neurosci* 2001;21:2974-2982.
- [99] Kjaer A, Knigge U, Rouleau A, Garbarg M, Warberg J. Dehydration-induced release of vasopressin involves activation of hypothalamic histaminergic neurons. *Endocrinology* 1994;135:675-681.
- [100] Kjaer A, Larsen PJ, Knigge U, Moller M, Warberg J. Histamine stimulates c-fos expression in hypothalamic vasopressin-, oxytocin-, and corticotropin-releasing hormone-containing neurons. *Endocrinology* 1994;134:482-491.
- [101] Kjaer A, Larsen PJ, Knigge U, Jorgensen H, Warberg J. Neuronal histamine and expression of corticotropin-releasing hormone, vasopressin and oxytocin in the hypothalamus: relative importance of H1 and H2 receptors. *Eur J Endocrinol* 1998;139:238-243.
- [102] Kjaer A. Neurohypophysial peptides. Histaminergic regulation and function in adeno-hypophysial secretion. *Dan Med Bull* 1996;43:391-406.
- [103] Dogterom J, van Wimersma Greidanus TB, De Wied D. Histamine as an extremely potent releaser of vasopressin in the rat. *Experientia* 1976;32:659-660.
- [104] Leibowitz SF. Histamine: a stimulatory effect on drinking behavior in the rat. *Brain Res* 1973;63:440-444.
- [105] Negro-Vilar A. Effect of catecholamines and histamine on vasopressin release from the median eminence (ME) or the neural lobe *in vitro*. *Fedn Proc Fedn Am Socs exp Biol* 1979;38:1026.
- [106] Roberts F, Calcutt CR. Histamine and the hypothalamus. *Neuroscience* 1983;9:721-739.
- [107] Leibowitz SF. Histamine: modification of behavioral and physiological components of body fluid homeostasis. In: *Histamine Receptors*, ed Yellin T O, Spectrum, New York 1979;pp. 219-253.
- [108] Jablonowski JA, Carruthers NI, Thurmond RL. The histamine H4 receptor and potential therapeutic uses for H4 ligands. *Mini Rev Med Chem* 2004;4:993-1000.
- [109] Nguyen T, Shapiro DA, George SR, Setola V, Lee DK, Cheng R, Rauser L, Lee SP, Lynch KR, Roth BL, O'Dowd BF. Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Mol Pharmacol* 2001;59:427-433.
- [110] Repka-Ramirez MS. New concepts of histamine receptors and actions. *Curr Allergy Asthma Rep* 2003;3:227-231.
- [111] Yamashita M, Fukui H, Sugama K, Horio Y, Ito S, Mizuguchi H, Wada H. Expression cloning of a cDNA encoding the bovine histamine H1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:11515-11519.
- [112] Gantz I, Schaffer M, DelValle J, Logsdon C, Campbell V, Uhler M, Yamada T. Molecular cloning of a gene encoding the histamine H2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:5937.
- [113] Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ, Jiang X, Pyati J, Huvar A, Jackson MR, Erlander MG. Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor. *Mol Pharmacol* 1999;55:1101-1107.
- [114] Eriksson L, Tuomisto L. Effects of centrally infused histamine (HA) and its analogues in the conscious goat. *Acta physiol scand* 1978;102:23A-24A.
- [115] Inagaki N, Yamatodani A, Ando-Yamamoto M, Tohyama M, Watanabe T, Wada H. Organization of histaminergic fibers in the rat brain. *J Comp Neurol* 1988;273:283-300.

- [116] Panula P, Pirvola U, Auvinen S, Airaksinen MS. Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience* 1989;28:585-610.
- [117] Antoni FA. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr Rev* 1986;7:351-378.
- [118] Jones MT, Gillham B. Factors involved in the regulation of adrenocorticotropin hormone/beta-lipotropin hormone. *Physiol Rev* 1988;68:743-818.
- [119] Abdelmoumene S, Gardner JD. Cholecystokinin-induced desensitization of enzyme secretion in dispersed acini from guinea pig pancreas. *Am J Physiol* 1980;239:G272-G279.
- [120] Pap A, Lechene de la Porte P, Sarles H. Exogenous and endogenous stimulations during different phases of pancreatic secretion in conscious rats. *Pflugers Arch* 1979;383:19-27.
- [121] Stark HA, Sharp CM, Sutliff VE, Martinez J, Jensen RT, Gardner JD. CCK-JMV-180: a peptide that distinguishes high-affinity cholecystokinin receptors from low-affinity cholecystokinin receptors. *Biochim Biophys Acta* 1989;1010:145-150.
- [122] Melander T, Fuxe K, Harfstrand A, Eneroth P, Hokfelt T. Effects of intraventricular injections of galanin on neuroendocrine functions in the male rat. Possible involvement of hypothalamic catecholamine neuronal systems. *Acta Physiol Scand* 1987;131:25-32.
- [123] Leibowitz SF, Jhanwar-Uniyal M, Dvorkin B, Makman MH. Distribution of alpha-adrenergic, beta-adrenergic and dopaminergic receptors in discrete hypothalamic areas of rat. *Brain Res* 1982;233:97-114.
- [124] Stefanini E, Devoto P, Marchisio AM, Vernaleone F, Collu R. [³H]Spiroperidol binding to a putative dopaminergic receptor in rat pituitary gland. *Life Sci* 1980;26:583-587.
- [125] Holzbauer M, Sharman DF, Godden U, Mann SP, Stephens DB. Effect of water and salt intake on pituitary catecholamines in the rat and domestic pig. *Neuroscience* 1980;5:1959-1968.
- [126] Oki Y, Ohgo S, Yoshimi T. Effects of water deprivation and administration of hypertonic saline on dopamine concentrations in posterior pituitary and vasopressin release in rats. *Brain Res* 1985;348:9-14.
- [127] Passo SS, Thornborough JR, Ferris CF. A functional analysis of dopaminergic innervation of the neurohypophysis. *Am J Physiol* 1981;241:E186-190.
- [128] Pelletier G. Identification of ending containing dopamine and vasopressin in the rat posterior pituitary by a combination of radioautography and immunocytochemistry at the ultrastructural level. *J Histochem Cytochem* 1983;31:562-564.
- [129] Lightman SL, Iversen LL, Forsling ML. Dopamine and [D-ALA², D-Leu⁵]enkephalin inhibit the electrically stimulated neurohypophyseal release of vasopressin in vitro: evidence for calcium-dependent opiate action. *J Neurosci* 1982;2:78-81.
- [130] Bicknell RJ, Leng G. Endogenous opiates regulate oxytocin but not vasopressin secretion from the neurohypophysis. *Nature* 1982;298:161-162.

- [131] Pitzel L, Konig A. Lack of response in the release of oxytocin and vasopressin from isolated neurohypophyses to dopamine, met-enkephalin and leu-enkephalin. *Exp Brain Res* 1984;56:221-226.
- [132] Racke K, Ritzel H, Trapp B, Muscholl E. Dopaminergic modulation of evoked vasopressin release from the isolated neurohypophysis of the rat. Possible involvement of endogenous opioids. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1982;319:56-65.
- [133] Treiman M, Greengard P. D-1 and D-2 dopaminergic receptors regulate protein phosphorylation in the rat neurohypophysis. *Neuroscience* 1985;15:713-722.
- [134] Bridges TE, Hillhouse EW, Jones MT. The effect of dopamine on neurohypophysial hormone release in vivo and from the rat neural lobe and hypothalamus in vitro. *J Physiol* 1976;260:647-666.
- [135] van Heuven-Nolsen D, de Kloet ER, Versteeg DH. Pro-Leu-GlyNH₂ affects dopamine and noradrenaline utilization in rat limbic-forebrain nuclei. *Brain Res* 1984;322:213-218.
- [136] Woodman OL, Lang WJ. Dopamine-induced vasodilatation in the isolated perfused rat kidney. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1980;243:228-235.
- [137] Forsling ML, Williams H. Central effects of dopamine on vasopressin release in the normally hydrated and water-loaded rat. *J Physiol* 1984;346:49-59.
- [138] Rowe JW, Shelton RL, Helderman JH, Vestal RE, Robertson GL. Influence of the emetic reflex on vasopressin release in man. *Kidney Int* 1979;16:729-735.
- [139] Yamaguchi K, Hama H. Facilitatory role of central dopamine in the osmotic release of vasopressin. *Brain Res* 1989;481:388-391.
- [140] Tsuchihashi H, Sasaki T, Kojima S, Nagatomo T. Binding of [³H]haloperidol to dopamine D₂ receptors in the rat striatum. *J Pharm Pharmacol* 1992;44:911-914.
- [141] Kawagishi S, Yoshino K, Jones TE, Iwamoto M, Arai S, Amano N. Dopamine receptor antagonists increase markedly the quantity of retrograde transport of HRP in the rat masseteric motoneuron. *Brain Res* 1992;585:196-204.
- [142] L'Hereault S, Barden N. Monoaminergic regulation of proopiomelanocortin messenger RNA concentrations in primary cell cultures of rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res* 1991;9:327-332.
- [143] Lovenberg TW, Roth RH, Nichols DE, Mailman RB. D₁ dopamine receptors of NS20Y neuroblastoma cells are functionally similar to rat striatal D₁ receptors. *J Neurochem* 1991;57:1563-1569.
- [144] Kondo K, Murase T, Otake K, Ito M, Kurimoto F, Oiso Y. Galanin as a physiological neurotransmitter in hemodynamic control of arginine vasopressin release in rats. *Neuroendocrinology* 1993;57:224-229.
- [145] Landry M, Roche D, Calas A. Short-term effects of centrally administered galanin on the hyperosmotically stimulated expression of vasopressin in the rat hypothalamus. An in situ hybridization and immunohistochemistry study. *Neuroendocrinology* 1995;61:393-404.
- [146] Melander T, Fuxe K, Harfstrand A, Eneroth P, Hokfelt T. Effects of intraventricular injections of galanin on neuroendocrine functions in the male rat. Possible involvement of hypothalamic catecholamine neuronal systems. *Acta Physiol Scand* 1987;131:25-32.

- [147] Nordstrom O, Melander T, Hokfelt T, Bartfai T, Goldstein M. Evidence for an inhibitory effect of the peptide galanin on dopamine release from the rat median eminence. *Neurosci Lett* 1987;73:21-26.
- [148] Ferris CF, Melloni RH, Jr., Koppel G, Perry KW, Fuller RW, Delville Y. Vasopressin/serotonin interactions in the anterior hypothalamus control aggressive behavior in golden hamsters. *J Neurosci* 1997;17:4331-4340.
- [149] Sawchenko PE, Swanson LW, Steinbusch HW, Verhofstad AA. The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Brain Res* 1983;277:355-360.
- [150] Ferris CF, Delville Y. Vasopressin and serotonin interactions in the control of agonistic behavior. *Psychoneuroendocrinology* 1994;19:593-601.
- [151] Van de Kar LD, Javed A, Zhang Y, Serres F, Raap DK, Gray TS. 5-HT_{2A} receptors stimulate ACTH, corticosterone, oxytocin, renin, and prolactin release and activate hypothalamic CRF and oxytocin-expressing cells. *J Neurosci* 2001;21:3572-3579.
- [152] Pergola PE, Sved AF, Voogt JL, Alper RH. Effect of serotonin on vasopressin release: a comparison to corticosterone, prolactin and renin. *Neuroendocrinology* 1993;57:550-558.
- [153] Jorgensen H, Kjaer A, Knigge U, Moller M, Warberg J. Serotonin stimulates hypothalamic mRNA expression and local release of neurohypophysial peptides. *J Neuroendocrinol* 2003;15:564-571.
- [154] Iovino M, Steardo L. Effect of substances influencing brain serotonergic transmission on plasma vasopressin levels in the rat. *Eur J Pharmacol* 1985;113:99-103.
- [155] Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of serotonergic (5-HT) neurons. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1991;31:289-320.
- [156] Jorgensen H, Knigge U, Kjaer A, Warberg J. Serotonergic involvement in stress-induced vasopressin and oxytocin secretion. *Eur J Endocrinol* 2002;147:815-824.
- [157] Friedman E, Krieger DT, Mezey E, Leranth C, Brownstein MJ, Palkovits M. Serotonergic innervation of the rat pituitary intermediate lobe: decrease after stalk section. *Endocrinology* 1983;112:1943-1947.
- [158] Leranth C, Palkovits M, Krieger DT. Serotonin immunoreactive nerve fibers and terminals in the rat pituitary--light- and electron-microscopic studies. *Neuroscience* 1983;9:289-296.
- [159] Lemay A, Brouillette A, Denizeau F, Lavoie M. Melatonin-and serotonin-stimulated release of vasopressin from rat neurohypophysis in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 1979;14:157-166.
- [160] Holzbauer M, Racke K, Sharman DF. Release of endogenous 5-hydroxytryptamine from the neural and the intermediate lobe of the rat pituitary gland evoked by electrical stimulation of the pituitary stalk. *Neuroscience* 1985;15:723-728.
- [161] Hynie S. [5-hydroxytryptamine (serotonin) receptors--nomenclature and classification of types and subtypes]. *Cesk Fysiol* 1995;44:135-138.
- [162] Bagdy G, Sved AF, Murphy DL, Szemeredi K. Pharmacological characterization of serotonin receptor subtypes involved in vasopressin and plasma renin activity responses to serotonin agonists. *Eur J Pharmacol* 1992;210:285-289.

- [163] Jorgensen H, Riis M, Knigge U, Kjaer A, Warberg J. Serotonin receptors involved in vasopressin and oxytocin secretion. *J Neuroendocrinol* 2003;15:242-249.
- [164] Lacau-Mengido IM, Libertun C, Becu-Villalobos D. Different serotonin receptor types participate in 5-hydroxytryptophan-induced gonadotropins and prolactin release in the female infantile rat. *Neuroendocrinology* 1996;63:415-421.
- [165] Ruotsalainen S, Sirvio J, Jakala P, Puumala T, MacDonald E, Riekkinen P, Sr. Differential effects of three 5-HT receptor antagonists on the performance of rats in attentional and working memory tasks. *Eur Neuropsychopharmacol* 1997;7:99-108.
- [166] Cao C, Han JH, Kim SZ, Cho KW, Kim SH. Diverse regulation of atrial natriuretic peptide secretion by serotonin receptor subtypes. *Cardiovasc Res* 2003;59:360-368.
- [167] McGuire M, Zhang Y, White DP, Ling L. Serotonin receptor subtypes required for ventilatory long-term facilitation and its enhancement after chronic intermittent hypoxia in awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286:R334-341.
- [168] Radhakrishnan R, King EW, Dickman JK, Herold CA, Johnston NF, Spurgin ML, Sluka KA. Spinal 5-HT(2) and 5-HT(3) receptors mediate low, but not high, frequency TENS-induced antihyperalgesia in rats. *Pain* 2003;105:205-213.
- [169] Miller KJ, King A, Demchyshyn L, Niznik H, Teitler M. Agonist activity of sumatriptan and metergoline at the human 5-HT_{1D} beta receptor: further evidence for a role of the 5-HT_{1D} receptor in the action of sumatriptan. *Eur J Pharmacol* 1992;227:99-102.
- [170] Yamada J, Sugimoto Y, Noma T, Yoshikawa T. Effects of the non-selective 5-HT receptor agonist, 5-carboxamidotryptamine, on plasma glucose levels in rats. *Eur J Pharmacol* 1998;359:81-86.
- [171] Smith BK, York DA, Bray GA. Activation of hypothalamic serotonin receptors reduced intake of dietary fat and protein but not carbohydrate. *Am J Physiol* 1999;277:R802-811.
- [172] Seutin V, Verbanck P, Massotte L, Dresse A. Galanin decreases the activity of locus coeruleus neurons in vitro. *Eur J Pharmacol* 1989;164:373-376.
- [173] Xu ZQ, Zhang X, Pieribone VA, Grillner S, Hokfelt T. Galanin-5-hydroxytryptamine interactions: electrophysiological, immunohistochemical and in situ hybridization studies on rat dorsal raphe neurons with a note on galanin R1 and R2 receptors. *Neuroscience* 1998;87:79-94.
- [174] Kehr J, Yoshitake T, Wang FH, Razani H, Gimenez-Llort L, Jansson A, Yamaguchi M, Ogren SO. Galanin is a potent in vivo modulator of mesencephalic serotonergic neurotransmission. *Neuropsychopharmacology* 2002;27:341-356.
- [175] Yoshitake T, Yoshitake S, Yamaguchi M, Ogren SO, Kehr J. Activation of 5-HT(1A) autoreceptors enhances the inhibitory effect of galanin on hippocampal 5-HT release in vivo. *Neuropharmacology* 2003;44:206-213.
- [176] Fuxe K, Jansson A, Diaz-Cabiale Z, Andersson A, Tinner B, Finnman UB, Misane I, Razani H, Wang FH, Agnati LF, Ogren SO. Galanin modulates 5-hydroxytryptamine functions. Focus on galanin and galanin fragment/5-hydroxytryptamine_{1A} receptor interactions in the brain. *Ann N Y Acad Sci* 1998;863:274-290.

- [177] Brooks DP, Share L, Crofton JT. Central adrenergic control of vasopressin release. *Neuroendocrinology* 1986;42:416-420.
- [178] Day TA, Randle JC, Renaud LP. Opposing alpha- and beta-adrenergic mechanisms mediate dose-dependent actions of noradrenaline on supraoptic vasopressin neurones in vivo. *Brain Res* 1985;358:171-179.
- [179] Cole RL, Sawchenko PE. Neurotransmitter regulation of cellular activation and neuropeptide gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci* 2002;22:959-969.
- [180] Randle JC, Bourque CW, Renaud LP. Alpha 1-adrenergic receptor activation depolarizes rat supraoptic neurosecretory neurons in vitro. *Am J Physiol* 1986;251:R569-574.
- [181] Yamashita H, Inenaga K, Kannan H. Depolarizing effect of noradrenaline on neurons of the rat supraoptic nucleus in vitro. *Brain Res* 1987;405:348-352.
- [182] Randle JC, Mazurek M, Kneifel D, Dufresne J, Renaud LP. Alpha 1-adrenergic receptor activation releases vasopressin and oxytocin from perfused rat hypothalamic explants. *Neurosci Lett* 1986;65:219-223.
- [183] Khanna S, Sibbald JR, Day TA. Alpha 2-adrenoceptor modulation of A1 noradrenergic neuron input to supraoptic vasopressin cells. *Brain Res* 1993;613:164-167.
- [184] Kimura T, Share L, Wang BC, Crofton JT. The role of central adrenoceptors in the control of vasopressin release and blood pressure. *Endocrinology* 1981;108:1829-1836.
- [185] Kimura T, Shoji M, Iitake K, Ota K, Matsui K, Yoshinaga K. The role of central alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors in the regulation of vasopressin release and the cardiovascular system. *Endocrinology* 1984;114:1426-1432.
- [186] Yamashita H, Inenaga K, Dyball RE. Thermal, osmotic and chemical modulation of neural activity in the paraventricular nucleus: in vitro studies. *Brain Res Bull* 1988;20:825-829.
- [187] Dudas B, Semeniken KR, Merchenthaler I. Morphological substrate of the catecholaminergic input of the vasopressin neuronal system in humans. *J Neuroendocrinol* 2006;18:895-901.
- [188] Brede M, Philipp M, Knaus A, Muthig V, Hein L. alpha2-adrenergic receptor subtypes - novel functions uncovered in gene-targeted mouse models. *Biol Cell* 2004;96:343-348.
- [189] Docherty JR. Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 1998;361:1-15.
- [190] Hein L, Kobilka BK. Adrenergic receptors - From molecular structure to in vivo function. *Trends Cardiovasc Med* 1997;7:137-145.
- [191] Zhong H, Minneman KP. Alpha1-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 1999;375:261-276.
- [192] Sladek CD, Kapoor JR. Neurotransmitter/neuropeptide interactions in the regulation of neurohypophyseal hormone release. *Exp Neurol* 2001;171:200-209.
- [193] Heintzen MP, Strauer BE. Peripheral vascular effects of beta-blockers. *Eur Heart J* 1994;15 Suppl C:2-7.
- [194] Pieribone VA, Xu ZQ, Zhang X, Grillner S, Bartfai T, Hokfelt T. Galanin induces a hyperpolarization of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in the brainstem slice. *Neuroscience* 1995;64:861-874.

- [195] Sevcik J, Finta EP, Illes P. Galanin receptors inhibit the spontaneous firing of locus coeruleus neurones and interact with mu-opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 1993;230:223-230.
- [196] Xu ZQ, Tong YG, Hokfelt T. Galanin enhances noradrenaline-induced outward current on locus coeruleus noradrenergic neurons. *Neuroreport* 2001;12:1779-1782.
- [197] Kehr J, Yoshitake T, Wang FH, Wynick D, Holmberg K, Lendahl U, Bartfai T, Yamaguchi M, Hokfelt T, Ogren SO. Microdialysis in freely moving mice: determination of acetylcholine, serotonin and noradrenaline release in galanin transgenic mice. *J Neurosci Methods* 2001;109:71-80.
- [198] Tsuda K, Yokoo H, Goldstein M. Neuropeptide Y and galanin in norepinephrine release in hypothalamic slices. *Hypertension* 1989;14:81-86.
- [199] Mufson EJ, Kahl U, Bowser R, Mash DC, Kordower JH, Deecher DC. Galanin expression within the basal forebrain in Alzheimer's disease. Comments on therapeutic potential. *Ann N Y Acad Sci* 1998;863:291-304.