

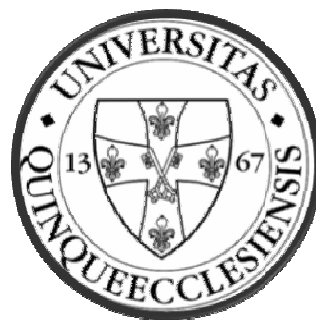
A testösszetétel és életkor hatásai az energia-háztartás szabályozására: a leptin szerepe

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Kórélettani és Gerontológiai Intézet

2012

Diplomamunka



Lőrincz Orsolya VI. évf.

Témavezető: Dr. Balaskó Márta

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés	4
II. Irodalmi áttekintés: A leptin	6
1. Történelmi háttér	6
2. Szintézis és szekréció	7
3. A leptin receptora, jelátviteli utak	8
4. A leptin hatásai	12
4.1. A leptin szerepe az energia-homeostasis és a testtömeg szabályozásában	12
4.2. A leptin és a glükóz metabolizmus	14
4.3. A leptin szerepe a csonttömeg szabályozásában	15
4.4. A leptin és a reprodukció	15
4.5. Egyéb funkciók	16
5. Leptin-rezisztencia	18
III. Hipotézis és célkitűzések	20
IV. Kísérletes munka	22
1. Kísérleti állatok	22
2. A kísérlet menete	24
3. Sebészeti beavatkozások	25
3.1. Transzmitter kapszula beültetése	25
3.2. ICV kanül és ozmotikus minipumpa beültetése	26
4. Alkalmazott anyagok	28
5. Mérések, analízis	28
V. Eredmények	30
1. A testtömeg (BW) és táplálékfelvétel (FI) változásai	30
2. A maghőmérséklet (Tc) változásai	31
3. A szívfrekvencia (HR) és a lokomotor aktivitás (ACT) változásai	32

4. A testösszetétel indikátorainak változásai	34
VI. Összefoglalás, következtetések	35
VII. Köszönetnyilvánítás	37
VIII. Rövidítések	38
IX. Irodalomjegyzék	40

I. Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben a fejlett nyugati országokban gyors ütemben nőtt az elhízott középkorú (illetve fiatal, sőt gyermekkorú) lakosok száma, mely jelentős mértékben hozzájárul a népesség egészségi állapotának romlásához. A Magyarországon végzett korábbi vizsgálatok azt mutatják, hogy a társadalom mintegy 60%-ának van súlyproblémája, 40%-uk túlsúlyos, 20%-uk elhízott (Halmy 2004). Az elhízás népegészségügyi jelentőségét elsősorban az adja, hogy olyan metabolikus elváltozások társulnak hozzá, amelyek jelentős mértékben fokozzák a cardiovascularis megbetegedéseket, illetve halálozást, további terheket róva ezzel a társadalomra és az egészségügyi ellátásra.

A testtömeg hosszú távú szabályozásban az elhízás mellett megfigyelhető másik trend a nagyon idősök hajlama a nagymértékű testtömeg vesztesre (cachexia) és izom leépülésre (sarcopenia). E két trend háttérében komplex perifériás és központi idegrendszeri, az anabolikus és katabolikus peptidrendszereket érintő szabályozási eltérések feltételezhetőek (Chapman 2008, Di Francesco 2007).

A leptin az energia-homeosztázis egyik olyan perifériás szabályozója, amely kapcsolatot teremt a zsírszövet, mint energiaraktár, és a metabolikus folyamatok között. Ez a peptid hormon érintett mind az elhízás, mind a diabetes, mind pedig a csonttritkulás kórtanában, továbbá fontos szerepet játszik a reprodukcióban, immunreakciókban, sőt napjainkban jelentőségét feltételezik a depresszió patogenezisében is (**4. ábra**).

Az adipocyták által termelt leptin a zsírtömeg indikátora. Rendellenes működése, hiánya súlyos zavart okoz a táplálékfelvételben, az energiaraktározásban és felhasználásban, ezzel súlyos elhízást okozva az érintett egyénnél (Friedman és mtsai 1998, Steiner és mtsai 2004). Korábbi vizsgálatok felvetették, hogy aktivitása mind életkor, mind testösszetétel-függő változásokat mutat (Scarpace és mtsai 2000). Elhízottakban például leptin-rezisztencia (Gabriely és mtsai 2002) figyelhető meg. Azonban az irodalmi adatok ellentmondásosak abban, hogy az életkorfüggő leptin-

rezisztencia javítható-e kalóriarestrikcióval (Fernández és mtsai 2002, Gabriely és mtsai 2002, Soós és mtsai 2009).

Ennek tisztázására vizsgáltuk a centrálisan alkalmazott leptinre adott válaszkésztséget különböző életkorú, illetve tápláltsági állapotú patkányban. A leptin hatásainak felderítése érdekében hatékonyságát nemcsak a táplálékfelvételre, hanem az energiaháztartás más paramétereire kiterjedően elemeztük.

II. Irodalmi áttekintés: A leptin

1. Történelmi háttér

Bár a leptin molekulát csupán 17 éve fedezték fel, létezését már ennél sokkal korábban, az 1950-es évektől fogva sejteni lehetett. Elsőként Kennedy vázolt egy szabályozó mechanizmust, amely az energiaraktárak változásait regisztrálva, egy beállított értéken tartja a zsír mennyiségét, a táplálékfelvétel és az energia-felhasználás összehangolt szabályozásán keresztül (Kennedy 1953). Modellje egybecsengett a korabeli megfigyelésekkel, miszerint a sebészeti úton eltávolított zsír hyperphagiát (Faust és mtsai 1977), míg a kényszerített táplálás miatt létrejövő súlynövekedés önkéntes táplálékmegvonást eredményezett (Harris és mtsai 1986).

Kísérletekkel igazolták, hogy a ventromedialis hypothalamus („jóllakottsági központ”) kétoldali károsítása hyperphagiát és következményes elhízást eredményezett. A lateralis hypothalamus („éhségközpont”) sértését követően azonban az állatok étvágytalanok lettek, vagy teljesen elhagyták a táplálkozást (Fonyó 2006).

További kísérletek folytak a ventromedialis hypothalamus sérülése következtében elhízott patkányokkal, amelyek keringését összekapcsolták kontroll egyedekével, és ez, az utóbbiak halálához vezetett. A patkányok éhen haltak. Ezek alapján merült fel egy lehetséges keringési faktor létezése, amelyet „jóllakottsági faktor”-nak neveztek el (Hervey 1958).

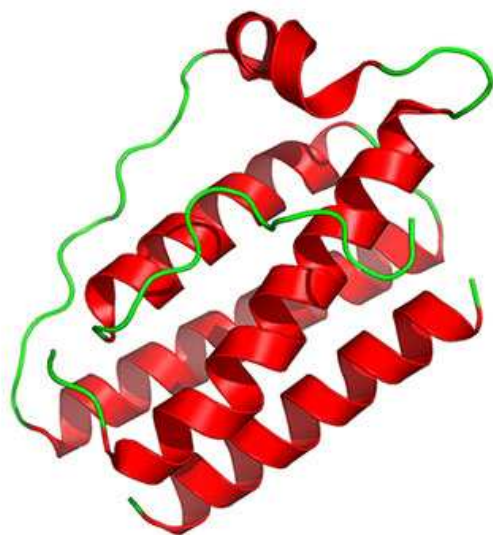
A molekula létezését támasztották alá az akkoriban felfedezett egértörzsek is, melyek a homozigóta mutáns alléljeiknek köszönhetően súlyosan elhízottak voltak (Ingalls és mtsai 1950, Coleman és mtsai 1969). Az egyik ilyen (leptin hiányos) egértörzs az obesitas, vagy elhízás szóra utaló *ob/ob* elnevezést kapta. Keringésüket összekapcsolva vad típusú egerekével, fogyást tapasztaltak a mutációt hordozókban (Coleman 1973). Ugyanez a kísérlet egy másik elhízott (leptin receptor hiányos), diabeteses *db/db* törzs esetében a vad típusú egerek halálra éhezését eredményezte. A két fajta elhízott egér keringésének keresztezésével az *ob/ob* fogyásnak indult, a *db/db* nem.

Friedman és munkatársai a fent említett megfigyelések alapján fogtak bele az elhízást okozó mutáció felderítésébe. Nyolc éven át tartott a leptin molekula felfedezése, melynek létezéséről ugyan a kutatók meg voltak győződve, de kezdetben a vizsgálatok nagyrészt eredménytelennek bizonyultak. Végeredményben a munkacsoport 1994-ben a Nature címlapján tudatta a világgal az egér obese génjének klónozását és humán megfelelőjének azonosítását (Zhang és mtsai 1994).

A leptin elnevezés a görög *leptos* szóból ered, melynek jelentése vékony, sovány, utalva arra az elképzelésre, hogy a molekula fő feladata a kövérség kialakulásának megelőzése. Az első megjelent publikációk valóban a leptin táplálékfelvételben és energiaegyensúlyban betöltött szerepéről szóltak. Az elmúlt évtizedek kutatásai alapján azonban mára árnyaltabbá vált a kép, és tudjuk, hogy a leptin számos más élettani funkcióban is fontos szerepet tölt be (4. ábra).

2. Szintézis és szekréció

Az ún. helikális citokinek családjába tartozó leptin (1. ábra) 167 aminosavból álló polypeptid, amelyet az obese (Ob) gén kódol (Zhang és mtsai 1997). Egérben, ez a gén a 6-



1.ábra: a leptin térbeli molekuláris szerkezete

os, emberben pedig a 7-es kromoszómán található (Zhang és mtsai 1994). A leptin expresszióját elsősorban az energiaraktárak helyzete, azaz a zsírszövet mennyisége határozza meg (Friedman és Halaas 1998, Hamilton és mtsai 1995). Főként a fehér zsírszövetben szintetizálódik, annak mennyiségével egyenes arányban termelődik és jut a vérkeringésbe. Ezen kívül kis mennyiségben ugyan, de termelődik többek között a placentában, a gyomor parietális sejtjeiben is, továbbá a vázizomzatban, a

csontvelő- és hypophysis sejtekben, sőt a primer osteoblast kultúrákban is leírták szintézisüket (Hoggard és mtsai 1997, Reseland és mtsai 2001).

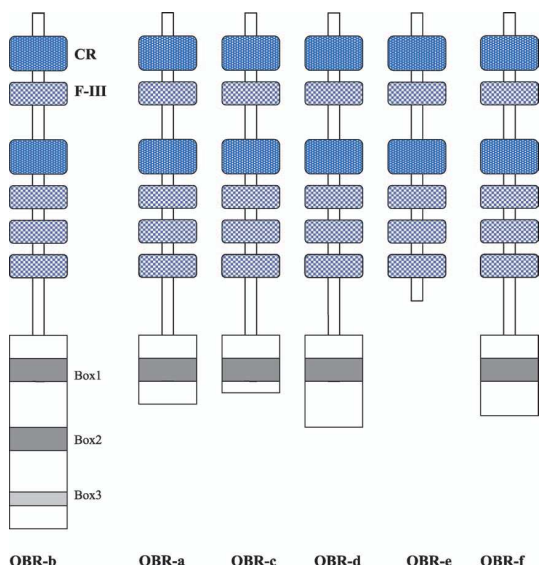
A zsírszöveten felül bizonyos hormonok, cytokinek is befolyásolják a leptin szintézisét. Így gátló hatást fejt ki a tesztoszteron, a pajzsmirigy hormonok, az IL-6 (Saladin és mtsai 1995), valamint serkentőleg hat többek között az inzulin, a glükokortikoidok, a TNF, az IL-1 is (Sarraf és mtsai 1997).

Emberben és rágcsálóban végzett megfigyelések alapján a leptin koncentrációja a vérben napszakonként változó, csúcsát éjjel, illetve kora hajnalban éri el (Barb 1999). Szekréciója számos más protein hormonhoz hasonlóan (pl. FSH/ folliculus stimuláló hormon, LH/ luteinizáló hormon) pulzáló.

3. A leptin receptora, jelátviteli utak

A leptin receptora (Zhang 1997) az I-es típusú cytokin receptorcsalád tagja (Tartaglia és mtsai 1995). Hat izoformáját írták le (Löllmann és mtsai 1997), amelyek többsége

alternatív *splicing*-gal keletkezik a *db* génről. Elnevezésük rendre OBR-a, -b, -c, -d, -e, és -f. Az összes izoforma azonos ligandkötő doménnel rendelkezik, azonban C-terminálisuk eltérő (2. ábra). Teljes funkcióval csak az OBR-b típus rendelkezik, amely a szignalizációban fontos régiót is hordozza. A leptin fő hatásaiért felelős STAT (signal transducer and activator of transcription) útvonal csak ezen a formán keresztül képes aktiválódni. Ezt a receptor típust elsősorban a hypothalamus



2. ábra: A leptin receptor különböző izoformái.

A fehérje extracellulárisan ciszteinben gazdag cytokin receptor, intracellulárisan box1, -2, -3 doméneket tartalmaz. OBR=leptin receptor, CR=cytokin receptor domén, F-III=III-as típusú fibronectin (Hegyi és mtsai 2004)

expresszálja (Bjørbaek és mtsai 1997), de jelenléte kimutatható a tüdő, a vese, a zsírszövet sejtjein, az endothelen és a mononukleáris sejteken, a gyomorban, az izomban, a májban, a hasnyálmirigy sziget-sejtjein is. A receptor expresszálódik továbbá az osteoblastokon, valamint az endometriumban, a placentán, és a köldökzsinórban is (Hoggard és mtsai 1997, Pedro és mtsai 1997).

A csupán extracelluláris kötőhelyekkel rendelkező OBR-a (Bjørbaek és mtsai 1997) izoforma döntően az agyban fordul elő. Feltételezések szerint a leptin transzportját segíti elő a vér-agy gáton. Ezt a receptor típust nagy mennyiségben izolálták a vese szöveteiből is, itt feltehetően a leptin kiválasztásában játszik szerepet.

Az „e” formából hiányzik mind a transzmembrán, mind pedig a citoplazmatikus régió. Szolubilis receptorként a vérben keringve fontos szerepet tölt be a biológiailag aktív, szabad és kötésben lévő inaktív leptin szintek szabályozásában (Chua és mtsai 1996).

A leptin receptor egyik legrégebben felfedezett mutációja a diabeteses C57B1 *db/db* egerekben előforduló *db/db* mutáció (Chen és mtsai 1996). Ebben az esetben báziscsere következtében csonkolt receptor forma keletkezik, melyből hiányoznak az aktivitásért felelős részek. Az egereket hyperleptinaemia jellemzi, de a magas leptin szintek ellenére, arra érzéketlenek. Ezen kívül diabetes, hyperphagia, következményes elhízás, metabolikus eltérések, hypothermia, hypogonadizmus adja a *db/db* egértörzs fő karaktervonásait.

A Zucker patkányok (Zucker diabetic fatty/ZDF, *fa/fa*) ugyancsak kövérek és diabetesben szenvednek. Pontmutáció következtében ezeknél az egyedeknél a membrán receptorok száma csökkent.

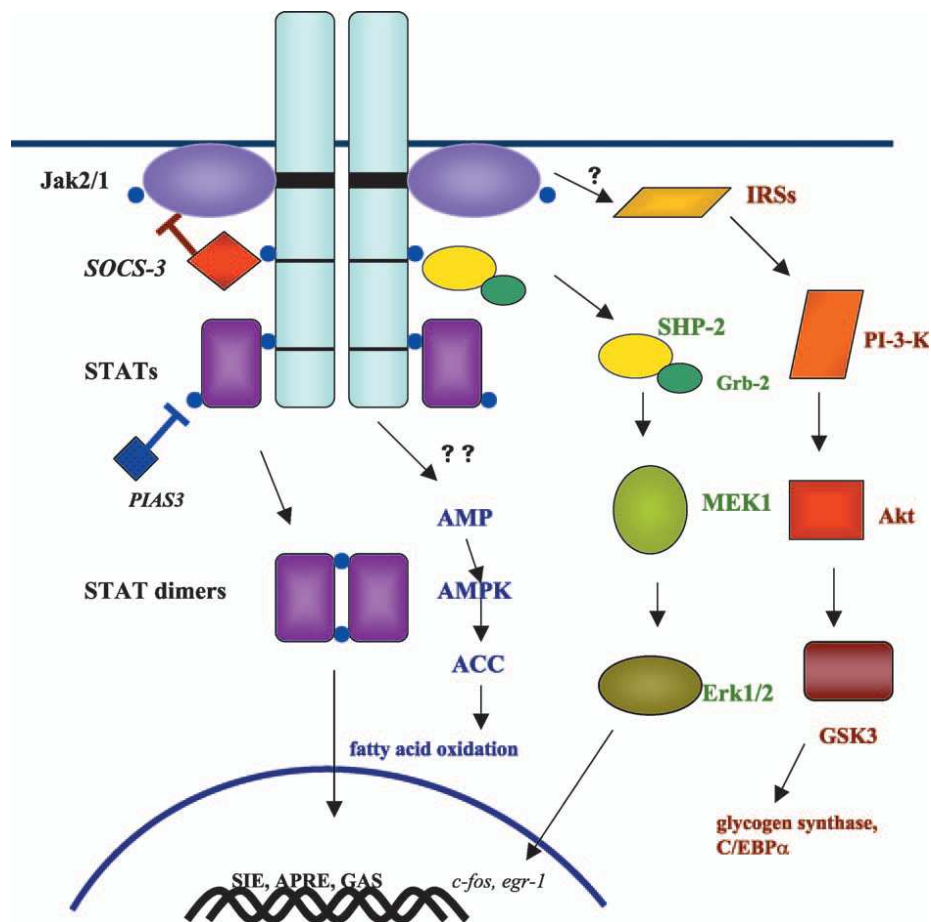
Emberben a leptin receptor mutációja rendkívül ritka. Az első esetet Clément és munkacsoportja írta le (Clément és mtsai 1998). Az általuk vizsgált családban kilenc gyermek közül három esetében extrém elhízást tapasztaltak, és közülük egy, már 19 éves korában meghalt. A három érintett leánygyermek normál testsúllyal született, de már újszülött korban abnormális testsúlygyarapodást mutattak. Pubertaskori fejlődésük elmaradt, emlőjük nem a koruknak megfelelően növekedett, szőrzetük hiányos volt, 19 évesen még nem menstruáltak. Hormonmeghatározás során kiderült, hogy az alap oestrogen, FSH, illetve LH szintjük alacsony volt, amely a testi tünetekkel egybevetve centrális hypogonadizmusra utalt. Ugyanakkor a *db/db* egereknél kimutatható

hyperglycaemia és hypothermia náluk nem alakult ki. Esetükben a mutációt egy báziscsere okozta, így a receptor szolubilis változata jött létre. A vérben található leptin 80%-a inaktív, kötött formában volt jelen.

A leptinnek receptorához való kötődése során 2 leptin molekula aktivál 4 receptort úgy, hogy 2 leptin 3-3 kötőhelye kapcsolódik az OBR-b megfelelő extracelluláris doménjével (Peelman és mtsai 2006). Az OBR-b aktivációja következtében a receptorhoz asszociált Janus-kináz (JAK2) a megfelelő receptor régióhoz kötődik (**3. ábra**), a receptor autofoszforilálódik. A citoplazmatikus farok részen található Tyr-csoportok foszforilációjával további szignalizációs molekulák kapcsolódhatnak.

A jelátvitel fő útja (Hegyi és mtsai 2004) a STAT molekula közvetítésével jön létre, de a MAPK (mitózis aktiváló protein kináz) és az IRS-en (inzulin receptor szubsztrát) keresztli inzulin jelátviteli útvonal is fontos szerepet játszik a leptin hatásainak kialakításában. Eddig még nem teljesen tisztázott módon a receptor befolyásolja a zsírsavoxidációt is, az AMPK/ACC (5'-AMP-aktivált protein kináz/ acetylcoenzim A-carboxiláz) út aktiválásával.

Az elsődleges jelátviteli út során a már foszforilált Tyr-gyökök a STAT molekula család tagjai számára biztosítanak dokkoló helyeket. Elsősorban a STAT3 proteinek kötődését és foszforilációját indukálják, melyek leválva a receptorról dimerizálódnak, és a sejtmagba vándorolva, target gének transzkripcióját aktiválják {POMC (proopiomelanokortin) és SOCS3 (suppressor of cytokine signaling-3)}.



3. ábra: A leptinre jellemző jelátviteli utak
(Hegyi és mtsai 2004)

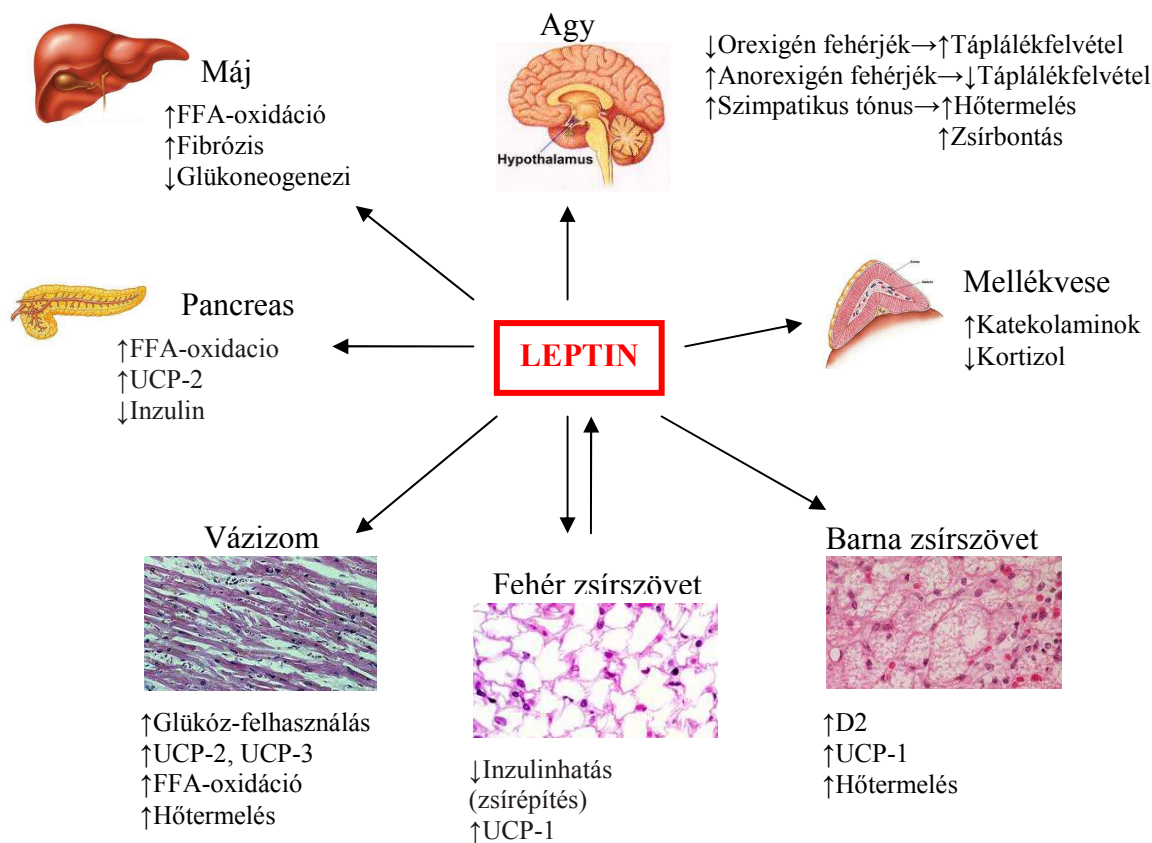
A leptin a Jak-STAT útvonalon elsősorban a hypothalamusban hat, ott is főként a táplálkozással összefüggő magokban mutattak ki STAT3 aktivitást.

Az aktivált OBR-b által foszforilált Tyr a SOCS3 működését serkentve a leptinindukált válasz terminálását eredményezi. A protein-tirozin foszfatáz-1B (PTP1B), amely a Jak2 defoszforilációját végzi szintén a leptin válasz inhibitora. Mind a SOCS3, mind pedig a PTP1B fokozott aktivitásának szerepet tulajdonítanak a kalóriatöbblet okozta humán obesitast jellemző ún. leptin-rezisztencia kialakulásában (Bjørbaek és mtsai 1998).

4. A leptin hatásai

4.1. A leptin szerepe az energia-homeostasis és a testtömeg szabályozásában

Az energia-homeostasis és a testtömeg szabályozása (Székely és Szelényi 2005, Schwartz és mtsai 2000) egy negatív visszacsatolós rendszerben valósul meg, melyben a zsírtömeg nagyságáról adipositas-szignálok (leptin, inzulin, amylin), a pillanatnyi tápláltsági állapotról intestinális peptidhormonok (ghrelin, peptid YY/PYY, pancreas polipeptid/PP, pholecystokinin/CCK) és a n. vagus szállítanak információt a központi idegrendszerbe. A rendszer szabályozásában a hypothalamus központi integráló szereppel bír.



4. ábra: A leptin centrális és perifériás hatásai

Ribeiro és mtsai nyomán (2006), saját módosítás

A leptin, amelyet a fehér zsírszövet adipocytái termelnek, mindenben megfelel az adipositas-szignál kritériumoknak (Cancello és mtsai 2004): vérszintje korrelál a test zsírtömegével, saturabilis transzportmechanizmus révén jut át a vér-agy-gáton, és ott receptorait aktiválva energia-homeostasist befolyásoló neuropeptidek termelését indítja el.

A perifériáról érkező afferentáció humorális komponenseként a leptin (az inzulinhoz hasonlóan) az agyban, az elsődleges átkapcsoló központban, a hypothalamicus nucleus arcuatusban (ARC) hat szabályozó jelleggel (Winkler és mtsai 2000, Wilding 2001, Ahima 2005). E magban találhatók mind táplálékfelvételt fokozó, mind az étvágyat csökkentő neuroncsoportok, és mindkét csoport expresszál leptin receptorokat. A leptin, receptorához kapcsolódva a táplálékfelvételt fokozó neuronokban csökkenti az orexigen (táplálékfelvételt növelő) mediátorok (4. ábra), mint pl. a neuropeptid Y (NPY) és az Agouti-related peptide (AgRP) mennyiségét, így gátolja az anabolikus (felépítő) folyamatokat.

Emellett a leptin a katabolikus (lebontó) folyamatokat serkenti, így hatására az étvágyat csökkentő neuronokban fokozódik az anorexigen (táplálékfelvételt csökkentő) POMC és a kokain-amfetamin-regulált transzkript (CART) termelődése (4. ábra). A POMC poszttranszlációs fragmentációjával alfa-melanocyt-stimuláló hormon (α -MSH) képződik, mely melanocortin receptorokon (MC1R-5R) keresztül fejti ki hatását. Az energiaháztartásban az MC3 és MC4R-ok bírnak kiemelt jelentőséggel.

Az ARC étvágyat csökkentő elsődleges (first order) neuronjai a másodlagos (second order) szabályozó neuronokhoz adnak összeköttetéseket, amelyek többek között a nucleus paraventricularisban (PVN) végződnek. Az anorexigén hatású jelátvitelt a CRH {a hypothalamo-hypophysealis-adrenalis (HPA) rendszert stimulálja}, a TRH (a hypophysis-thyreoidea tengelyt serkenti), valamint az oxitocin továbbítja, és kapcsolja egyéb endokrin funkciókhoz.

Összességében, a leptin hatására a táplálékfelvétel csökken, az anyagcsere pedig fokozódik, az energiaegyensúly a testtömeg csökkenése irányába tolódik el.

4.2. A leptin és a glükóz metabolizmus

A táplálkozási szünetekben a szigorúan szabályozott plazma glükóz koncentráció felelős a sejtek számára szükséges energia folyamatos biztosításáért. A glükóz szint állandóságát a glükóz termelés és felhasználás közötti egyensúly szabja meg. Leptin receptor (OBR-b) többek között a hasnyálmirigy szigetsejtjein is expresszálódik. Számos támadásponton befolyásolja a bazális, illetve a glükóz által stimulált inzulin elválasztást (**4. ábra**), így közvetett hatást gyakorol a cukor háztartásra (Frühbeck és Salvador 2000, Emilsson és mtsai 1997). Egyrészt az ATP-érzékeny káliumcsatornák gátlása útján mérsékli az inzulin elválasztását (Harvey és mtsai 1997), másrészt specifikus targeteken keresztül, a foszfolipáz-C, és terméke a foszfatidil-inozitol 1,4,5-trifoszfát gátlása által csökkenti a sejten belüli Ca^{2+} koncentrációt és így az inzulin exocytosisát. Ezen felül a protein-kináz-C aktivitásának csökkentésével közvetlen gátló hatást fejt ki az inzulin elválasztására (Ookuma és mtsai 1998). A felsorolt gátló mechanizmusoknak a 2-es típusú, inzulin-rezisztencia talaján kialakuló diabetes mellitus pathogenesisében lehet jelentőségük.

A májban (**4. ábra**) a leptin csökkenti az inzulin által stimulált hatásokat. A laktát felvétel fokozása révén serkenti a glükoneogenezist, valamint elősegíti a zsírsavak béta-oxidációját. A glikogenolízis fokozásában is szerepet játszik (Rossetti és mtsai 1997).

A harántcsíkolt izomszövetben (**4. ábra**) is leírtak leptin hatásokat. A GLUT-4 transzporter expressziójának fokozásán keresztül a leptin elősegíti a glükóz felvételét és a glikogén szintézist (Ceddia és mtsai 1998).

In vitro vizsgálatok eredményei igazolták, hogy nemcsak a leptin hat a cukor háztartásra, hanem fordítva is igaz, a glükóz is fontos szerepet játszik a leptin szekréció szabályozásában (Tucholski és Otto-Buczkowska 2011). Izolált patkány zsírsejteken a glükóz dóziszfüggő módon emeli a sejtek leptin elválasztását, illetve a glükóz által indukált leptin szekréció inzulin adásával tovább fokozható.

4.3. A leptin szerepe a csonttömeg szabályozásában

Napjainkra számos tanulmány összefüggésbe hozza a leptint és a csontszerkezet alakulását, illetve leírja bonyolult kapcsolatrendszerüket. A leptin ilyen irányú szerepének fontosságára az a megfigyelés hívta fel a figyelmet, amely szerint az elhízott emberek kisebb hányadát érinti az osteoporosis (Soyka és mtsai 1999), illetve az alacsony testtömeg alacsony leptin szintekkel és kisebb csonttömeggel társul.

Feltételezik, hogy a leptin két eltérő csont-homeostasist szabályozó folyamatban is szerepet játszik. Egyrészt, közvetlen hatást fejt ki a csontvelői őssejtekre, serkenti az osteoblastok differenciálódását, míg az osteoclastok osztódását gátolja (Holloway és mtsai 2002). Másrészt, a hypothalamuson keresztül indirekt hatást fejt ki két, egymással ellentétes mechanizmuson keresztül: 1. a szimpatikus idegrendszer aktiválása útján elősegíti a csont lebontást (Ducy és mtsai 2000); 2. a CART expresszió fokozásával gátolja az osteoclastok differenciálódását (Eleftheriou és mtsai 2005).

4.4. A leptin és a reprodukció

A humán leptin és a testösszetétel összefüggéseit vizsgálva nyilvánvalóvá vált, hogy a nők leptin szintje megegyező testtömegindex (body mass index/BMI) mellett is 2-3-szor magasabb a férfiakénál (Ostlund és mtsai 1996). Nőkben jellemzően magasabb a zsírszövet százalékos aránya, így a zsírsejtek által termelt leptin mennyisége is várhatóan magasabb értékeket mutat. A leptin szintek eltérése a pubertásban válik igen jelentőssé, ami azt sugallja, hogy a test zsírtartalma mellett a nemi hormonok is befolyásolják a peptid hormon szintjét. Kamaszkor kezdetén mindkét nemben növekvő tendenciát mutat a szérumban leptin szintje, mely arra utal, hogy a leptinnek fontos szerepe lehet a hypothalamus-hypophysis-gonád tengely aktiválásában. Jelez az agynak a test megfelelő érettségéről, és az energiatartalékok kielégítő mennyiségéről a reprodukciós korbba lépéshez. Ez a koncentráció emelkedés főleg lányok esetében ölt drámai méreteket. A fiúknál a leptin szint csak közvetlenül a pubertás előtt magasabb és ezután fokozatosan csökken, feltehetően azért, mert az izomszövet mennyisége nő meg a testtömegben belül a zsír rovására. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, mely szerint leptin hiányos *ob/ob*

egerekben hypogonadismus tapasztalható, illetve, hogy sovány női élsportolóknál az adolescencia késik és rendszerint amenorrhea alakul ki (Wauters és mtsai 2000). A metabolikus eredetű anovuláció jellemző klinikai példája az anorexia nervosa (Miller és Golden 2010).

Patkány eredetű túlélő hypophysis és mediobasalis hypothalamicus metszeteken bebizonyították, hogy a leptin közvetlenül hat a hypothalamusra és a hypophysisre: elősegíti az LHRH (luteinizing hormone releasing hormone) termelődését, ez által növeli az LH és az FSH kibocsátását (Zieba és mtsai 2005). Mindezek mellett a leptin indirek úton, a hypothalamicus GnRH-neuronokon keresztül képes fokozni a hypophysis FSH- és LH- termelését (Liefers és mtsai 2005).

A leptin nemcsak a nemi érést befolyásolja, hanem a terhességre is hatással van. Megfigyelték ugyanis, hogy a placenta leptin termelésének köszönhetően koncentrációja a terhesség előrehaladtával fokozatosan emelkedik a vérben (Henson és Castracane 2006). Magas szérum leptin szint elsősorban a terhesség késői szakaszában és a szülés körül észlelhető, amikor az anyai zsírraktárak feltöltődtek, és a szervezet felkészült a szoptatásra. A szülést követően a leptin szintje meredeken csökkenni kezd.

A leptinnek jelentőséget tulajdonítanak kóros terhességben is, mint például prae-eclampsiaiban, amelyben az anyai keringésben mind a leptin szintje, mind pedig az azt kódoló mRNS koncentrációja eltér a normálistól (McCarthy és mtsai 1999). Prae-eclampsiaival szövődött terhességben már jóval a tünetek jelentkezése előtt fokozódik a keringésben a leptin koncentráció (Anim-Nyame és mtsai 2000). Felvetődik a kérdés, hogy az emelkedett leptin-szintek mögött nem a metabolikus zavar következtében fellépő fokozott zsírsejt-termelés állhat-e.

4.5. Egyéb funkciók

A leptin és az immunrendszer

A leptin fokozza a T-lymphocyták proliferációját és gátolja apoptózisukat. Emelett serkentő hatást gyakorol a monocyta/macrophag aktiválódásra, az immunsejtek cytokin termelésére. A leptin összeköti a proinflammatorikus Th1 immunválaszt a

táplálékfelvétellel, ugyanis táplálék hiányában a csökkent leptin szint mérsékli az immunrendszer kapacitását (Fantuzzi és Faggioni 2000).

Érett humán adipocyttal végzett vizsgálatok szerint krónikus gyulladásokban a TNF- α csökkenti, vagy gátolja a leptin mRNS expresszióját és felszabadulását (Fawcett és mtsai 2000).

Egerekben végzett kísérletekben az elhízott állatok nagyobb eséllyel éltek túl a sepsist, ezért a kutatók feltételezték, hogy bár a leptin hatástalan a testtömeg szabályozásra nézve, az immunrendszer megőrizte leptin-érzékenységét. Ennek bizonyítására a kutatók olyan egereket hoztak létre, amelyekben a központi idegrendszer kivételével hiányoztak a leptin receptorok. Kiderült, hogy a sepsisre adott megfelelő immunválaszhoz szükség van leptin-dependens agyi pályákra. Amennyiben ez károsodik, vagy leptinhiány lép fel, megnő a sepsis halálozási kockázata (Tschöp és mtsai 2010).

Autoimmun betegségmodellekben a leptinhiányos állapot enyhébb gyulladást, bakteriális és vírusos infekciókkal szemben pedig fokozott érzékenységet eredményez (Mancuso és mtsai 2002). Autoimmun gyulladásos bélbetegségekben szignifikánsan nagyobb a leptin szekréciója a hypertrophiás zsírszövetben, illetve a Crohn-betegség által érintett bélszakaszok mentén elhelyezkedő fehér zsírszövetben (Barbier és mtsai 2003), mint a kontroll csoport esetében.

Egyedfejlődés

Mivel a leptin receptora nagy mennyiségben mutatható ki magzati szövetekben, ez felveti a leptin lehetséges szerepét az egyedfejlődésben is. Feltehetően elsősorban a neurobiológiai fejlődésre gyakorol hatást, hiszen *ob/ob* és *db/db* egerekben az agy tömegének csökkenését figyelték meg. Ezeknél az egértörzseknél idegrendszeri rendellenességeket, károsodott myelinizációt, neuronális- és gliasejt fehérje hiányt találtak (Ahima és Flier 2000).

Hypertensio

Az elhízás szoros összefüggést mutat a cardiovascularis halálozással. Ennek következtében vizsgálták a leptin hypertensióban betöltött szerepét is. A vizsgálatok azt mutatták, hogy a leptin szint növekedése a vérben (pl. elhízás során) a vérnyomás

emelkedésével járt, illetve krónikus exogén leptin kezelés is kiváltja a vérnyomás növekedését. Eddigi ismereteink alapján úgy tűnik, hogy a leptin indirekten, a szimpatikus idegrendszert aktiválva emeli a vérnyomást (Rahmouni és Haynes 2004).

Depresszió

Anorexiás, normál testtömegű és túlsúlyos nőkön végzett megfigyelések azt mutatják, hogy a leptin egyértelműen hangulatjavító hatású (Lawson és mtsai 2011). Szoros negatív korreláció áll fenn a leptin vérszintje és a hangulati tünetek között, vagyis a magasabb leptin koncentráció egyértelműen alacsonyabb szorongásos és depressziós tünetekkel társult.

5. Leptin-rezisztencia

A leptin felfedezését követően, illetve az *ob/ob* egértörzsben kialakuló súlyos elhízás alapján azt feltételezték, hogy a humán obesitas hátterében is a leptin hiánya állhat (Montague és mtsai 1997). Később a rágcsló modellekről (pl. *db/db*) készült tanulmányok, illetve a humán elhízásról szóló publikációk fő témája a leptin receptor zavarok, illetve a hyperleptinaemia lettek (Spiegelman és Flier 1996). Ezek alapján született meg a leptin-rezisztencia koncepciója.

Leptin-rezisztenciának nevezzük azt az állapotot, amikor az emelkedett leptin koncentráció ellenére a leptin nem képes funkcióját megfelelően ellátni, ennek eredményeként a leptin szintje *circulus vitiosus*-ként tovább növekszik a megfelelő hatás elérése érdekében (Carrascosa és mtsai 2007). Az elhízott emberekben túlnyomórészt magas szérum leptin szintek mérhetők, és ezen szenélyek exogén leptin adására kedvezőtlenül reagálnak (Rosenbaum és mtsa 2002).

A leptin hatás egyik legnyilvánvalóbb hibája a receptorfunkció rendellenessége: a károsodott receptor expresszió, illetve szignalizáció, melyet jól szemléltet a *db/db* egér modell is. A jelátviteli utak deficienciájának hátterében az intracelluláris szignáltranszdukciót gátló mechanizmusok fokozott működése, azaz mind a SOCS3, mind pedig a PTP1B fokozott aktivitása áll.

A cytokin család legtöbb tagja fehérjéhez kötve található a szérumban. Ezek a kötő fehérjék igen fontos szerepet játszanak az általuk kötésben tartott molekula szabályozásában, növelve vagy csökkentve a ligand biológiai aktivitását. Sinha és munkatársai (1996), valamint Houseknecht és munkacsoportja (1996) kísérleteik során megfigyelték, hogy sovány egérben és emberben a vérben keringő leptin nagy része fehérjéhez kötött formában található, és a szabad leptin aránya pozitív korrelációt mutat a növekvő túlsúllyal, valamint a BMI-vel. Tehát obesitasban a leptin-kötő fehérjék telíthetők. A leptin kötéséért felelős fehérjék identifikálása még ma sem teljes. Ismert azonban a leptin receptor egyik variánsa (OBR-e), mely szolubilis receptorként részt vesz a szérum leptin transzportjában. Ezt az izoformát csupán 10%-ban sikerült kimutatni a humán szérum immunprecipitációs vizsgálatainak során, tehát e szolubilis receptor forma szerepe elenyésző. Ebből az a következtetés vonható le, hogy a leptin transzportja a vér-agy-gáton (blood-brain-barrier/BBB) szintén szaturábilis mechanizmus útján történik (Schwartz és mtsai 1996). A kísérleteket alátámasztja, hogy e transzport hatékonysága csökken elhízásban. Feltételezések szerint, a különböző szérum leptin kötő molekulák igen fontos szerepet töltenek be a leptin-rezisztencia kialakulásában.

III. Hipotézis és célkitűzések

Korábbi vizsgálatok felvetették, hogy a leptin expressziója, aktivitása és hatékonysága mind az életkorral, mind a testösszetétel eltéréseinek megfelelően (Soós és mtsai 2009, Gabriely és mtsai 2002, Mitchell és mtsai 2009) változik.

A leptin hatásmechanizmus feltérképezése során leírták (Schwartz és mtsai 1996), hogy a liquor leptin szintje szoros korrelációt mutat a plazma leptin koncentrációval és közvetetten a testösszetétellel. Összehasonlítva a leptin transzport mechanizmusának hatékonyságát alacsony és magas leptin szérumszintek esetében, az utóbbinál igen jelentősen csökkent a leptin plazma-liquor aránya. Ezen megfigyelések alapján felvetődött, hogy a BBB transzport mechanizmusai károsodnak elhízásban, így ez a mechanizmus is hozzájárul az elhízásban kialakuló leptin-rezisztenciához.

Scarpace és mtsai arra a megállapításra jutottak, hogy a leptin-rezisztencia kialakulásában az életkor az elsődleges szerep, korral a leptin hatástalansága következtében az NPY-ra kifejtett gátló hatás csökken (Scarpace és mtsai 2000). Megfigyelésük szerint, a leptin-infúzió közel 50%-kal csökkentette az NPY mennyiségét fiatal patkányokban, míg az idős állatokban nem tapasztaltak mennyiségi változást. Feltételezésük szerint, ez a pathomechanizmus áll a korfüggő elhízás és az emelkedett leptin szintek hátterében.

Egy másik kutatócsoport megfigyelései szerint azonban idős patkányban a táplálékbevitel korlátozásával a leptin-érzékenység csökkenése megakadályozható (Fernández és mtsai 2002). Kalória megvonás hatására csökkenő leptin szintet és fokozódó hypothalamicus OBR expressziót írtak le. Feltételezésük szerint a leptin-rezisztencia kialakulásában a korfüggő elhízás kulcsfontosságú.

Gabriely és kutatócsoportja szerint (Gabriely és mtsai 2002) a hyperleptinaemia és következményes leptin-rezisztencia a természetes öregedési folyamat része, amely független az elhízástól, vagy a testzsír eloszlásától. A kor előrehaladtával a leptin receptorok károsodása és a jelátviteli út hibája az elhízás okozója. Ennek hátterében nemcsak a receptor mennyiségi csökkenése, hanem a Jak-STAT jelátviteli útvonal fokozott

gátlása, a SOCS3 molekula mennyiségének emelkedése is szerepet játszik. Kimutatták, hogy az idős patkányok hypothalamusában háromszor magasabb a SOCS3 szintje, mint fiatal korcsoportokban.

A fenti eredmények tükrében nem egyértelmű, hogy az életkor, vagy a testösszetétel hatása erősebb a leptin aktivitás tekintetében. Ellentmondásosak a megfigyelések arra nézve is, hogy a testösszetétel kedvező irányú változtatása (zsírtömeg csökkentése pl. kalória restrikció útján) javítja-e és ha igen, milyen mértékben az életkorfüggő leptin-rezisztenciát (Fernández és mtsai 2002, Gabriely és mtsai 2002). Vizsgálataink célja a leptin-rezisztencia kor-, illetve testösszetétel-függő elemeinek részletesebb megismerése volt.

Hipotézisünk szerint a testösszetétel kedvező változtatása képes a korfüggő leptin-rezisztencia mérséklésére. Ennek tisztázására kísérleteink során regisztráltuk a centrálisan alkalmazott leptinre adott energetikai válaszkészséget különböző életkorú, illetve tápláltsági állapotú patkány csoportokban. A leptin hatásainak felderítése érdekében hatékonyságát nemcsak a táplálékfelvételre, testtömegre, hanem az energiaháztartás más paramétereire kiterjedően is elemeztük.

IV. Kísérletes munka

1. Kísérleti állatok

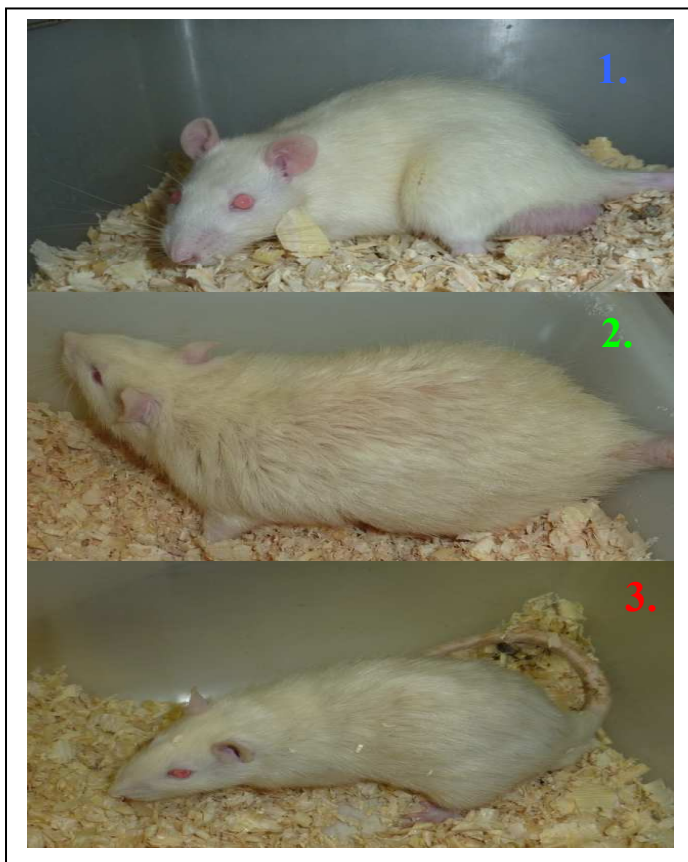
Kísérleteink során hím Wistar patkányokat alkalmaztunk. (A nőstény állatok aktuális testtömegét és testösszetételét a nemi hormonok ciklusa nagymértékben befolyásolja) Az állatok enyhén hűvös 23-26 °C-os külső környezeti hőmérsékleten, külön-külön faforgáccsal bélelt, fém ráccsal fedett műanyag ketrecben (38 cm x 22 cm x 15 cm) voltak tartva. Mesterséges fény biztosította a nappali és éjszakai periódusok 12 óránkénti váltakozását reggel 6 és este 6 óra között. Víz minden állat számára *ad libitum* rendelkezésre állt.

Bár az állatok mozgásukban nem voltak korlátozottak sem a kísérlet során, sem azt megelőzően, számottevő fizikai aktivitásra nem volt lehetőségük (Ketrecükben nem állt rendelkezésre sem nagy tér, sem pedig futókerék.). Ennek megfelelően állapotuk hozzávetőleg a mozgásszegény emberi életmódnak felel meg.

A leptin hatás vizsgálata érdekében különböző tápláltsági - és korcsoportokat (**5. ábra**) alakítottunk ki:

1. 2 hónapos *ad libitum* táplált (**NF2**)
2. 12 hónapos *ad libitum* táplált (**NF12**)
3. 12 hónapos kalória-restrikciós (**CR12**)

A normál táplálású állatokból álló csoport (normally-fed/NF) olyan állatokat foglal magába, amelyek standard, 2,7 kcal/g {11,3 kJ/g, CRLT/N patkánytáp (Szindbád Kft., Gödöllő), a 36% szárazanyag 20% fehérjét, 31% szénhidrátot, 4,5% zsírt, 4,5% növényi rostot tartalmaz} energiatartalmú tápot kaptak, *ad libitum* {Az *ad libitum* táplálás a szakirodalom adatai alapján eleve kismértékű túltáplálást jelent, ami vadon élő állatoknál általában nem jellemző (Keenan és mtsai 1997)}. Felvetődött, hogy laboratóriumi állatok esetében 10%-al csökkentett tápbevitel állhat legközelebb a normális értékhez.}



5. ábra: kísérleti állatok

1. 2 hónapos ad libitum táplált

(**NF2**) testtömegük: 200 – 220g

2. 12 hónapos ad libitum táplált

(**NF12**) testtömegük: 500 – 520g

3. 12 hónapos kalória-restrikciós

(**CR12**) testtömegük: 330 – 320g

A kalória-restrikciós (calorie-restricted/CR) csoport egyedei csökkent kalóriatartalmú diétán (csökkentett mennyiségű standard laboratóriumi táp) voltak tartva már az elválasztásuktól kezdve. Ez a diéta egy felnőtt patkány esetén a tápfelvétel 60%-át jelenti, azaz naponta 16g standard portápot.

Ezek a csoportok a mérsékelten mozgásszegény, de még optimális testösszetételű fiatal felnőtt, a mérsékelten mozgásszegény és kissé túlsúlyos, ill. a sovány középkorú emberi populációt reprezentálták.

Mindhárom csoporton belül el lettek különítve olyan állatok, amelyek centrális leptin-infúziót kaptak, illetve a kísérleti csoportokhoz azonos korú és tápláltsági állapotú patkányokból álló kontroll csoportok tartoztak (**1. táblázat**). A különböző kísérleti, illetve kontroll csoportok 6-8 állatból álltak.

NF2	kísérleti csoport: centrális leptin-infúzió
	kontroll csoport: fiziológias sóoldat
NF12	kísérleti csoport: centrális leptin-infúzió
	kontroll csoport: fiziológias sóoldat
CR12	kísérleti csoport: centrális leptin-infúzió
	kontroll csoport: fiziológias sóoldat

1. táblázat: kísérleti állatcsoportok

Kísérleteinket a PTE-ÁOK Állatkísérletes Etikai Bizottság jóváhagyásával, a Baranya Megyei Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás engedélyével (BA02/2000-13/2006) az Európai Bizottság állatetikai követelményeivel (86/609/EEC) összhangban végeztük.

2. A kísérlet menete

Annak érdekében, hogy az állatok megszokják a kísérletes körülményeket - az új környezetet, a napi táp - és testtömeg méréseket - még a beavatkozások előtt a kísérletben alkalmazott biotelemetriás rendszerbe kerültek behelyezésre. Ezután került sor (7-10. napon) az e-mitter, és a hozzá kapcsolt szívfrekvenciát mérő nyúlványok beültetésére a patkányok hasüregébe, ill. mellkas bőre alá. Legalább 1 héttel később történt a krónikus intracerebroventricularis (ICV) kanül, valamint ezzel egy ütésben a kanülhöz kapcsolódó leptinnel, illetve kontrollcsoport esetén fiziológias sóoldattal feltöltött ozmotikus minipumpa beültetése a nyaki régió bőre alá, dorsalisán. Ezt követően 10-12 órán belül érte el az agykamrát a 7 napig tartó ICV infúzió. Az ICV műtét napját tekintjük a kísérlet 0. napjának.

A kísérlet végeztével az állatokat narkotikummal {intraperitonealis (IP) uretán, 3-5 g/ttkg} túlaltattuk és boncolást végeztünk.

3. Sebészeti beavatkozások

A szoktatás után ketamin + xylazin anesztéziában végeztük {78mg/ttkg – ketamin (Calypsol) + 13mg/ttkg – xylazin (Sedaxylan)} a műtéteket. Az altatószerek IP kerültek beadásra. Így, kb. 1 – 1,5 órás mély alvást idéztünk elő, mely elegendő időt biztosított a beavatkozások elvégzéséhez. A műtétek során intramuscularisan gentamycint (2 mg/ttkg) kaptak az állatok, az esetleges fertőzések elkerülése céljából. Posztoperatív fájdalomcsillapításra nem volt szükség.

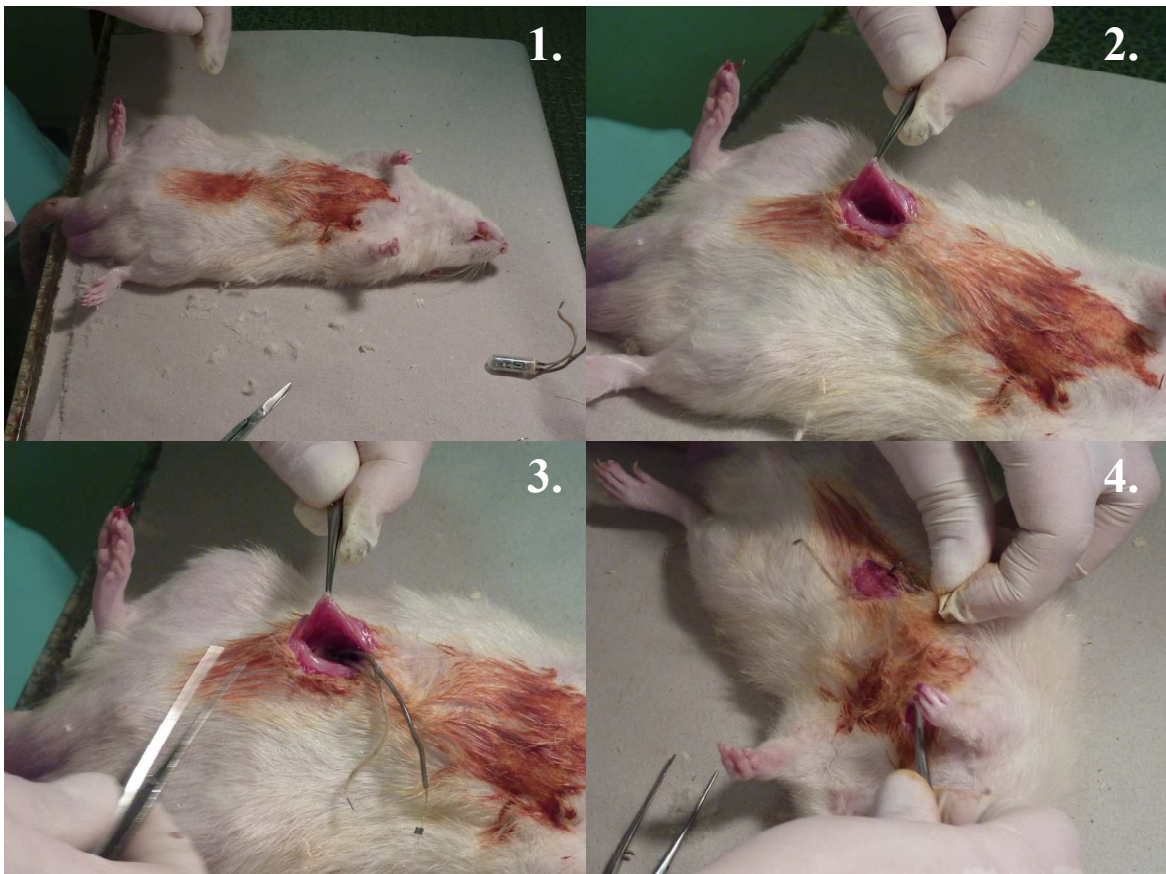
3.1. Transzmitter kapszula beültetése

Minimitter® biotelemetriás mérőrendszer segítségével vizsgáltuk a leptin 7 napos ICV infúziójának különböző energetikai paraméterekre kifejtett hatását. A szoktatási periódus 7-10. napján egy kis méretű implantálható transzmitter (**6. ábra**) (E-mitter kapszula) lett az állatok hasüregébe ültetve.



6. ábra: E-mitter és elektródái

Szörtelenítés, és dezinficiálás (**7/1. ábra**) után az állat hasfalának összes rétegét áthidaló, kb. 2 cm-es metszést ejtettünk medialisán, craniocaudalis irányban (**7/2. ábra**). Ezen sebzésen keresztül, az abdominalis képletek épségére ügyelve a hasüregbe helyeztük a transmittert (**7/3. ábra**), majd a szívfrekvencia méréséhez szükséges két elektródát, melyek hozzávetőleg a mellkasi V₂ elvezetésnek felelnek meg, subcutan vezetve (**7/4. ábra**), bilaterálisan a mellkas izomzatához öltve rögzítettük. A műtét végén öltésekkel zártuk a hasfalat, és a mellkasi metszéseket.



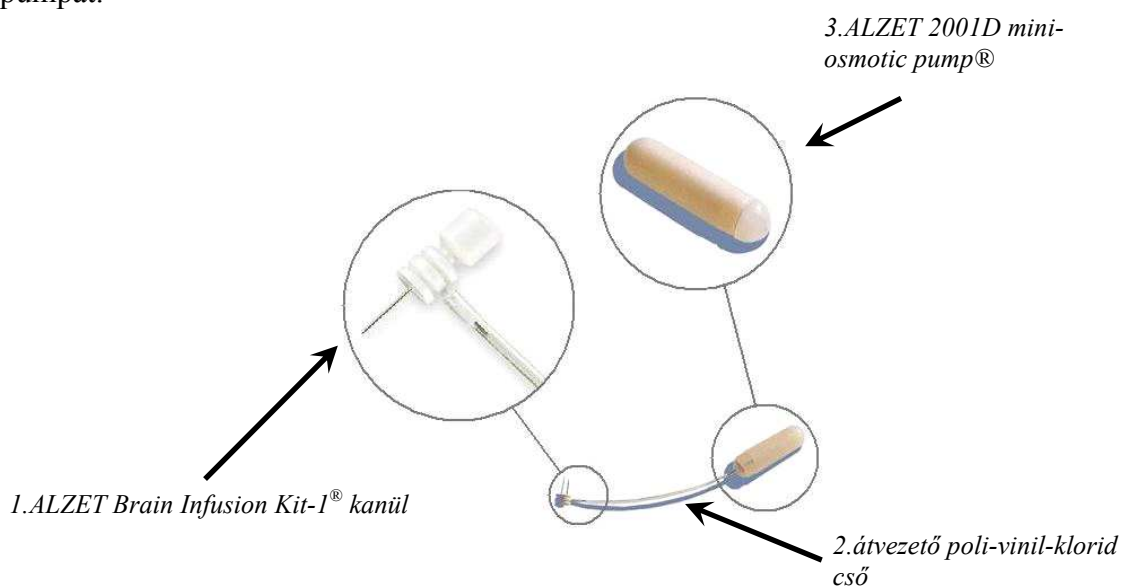
7. ábra: Az e-mitter beültetésének műtéti képei: (1.) szőrtelenítés és dezinficiálás; (2.) kb. 2cm-es metszés mediálisan, craniocaudalis irányban; (3.) e-mitter behelyezése a hasüregbe; (4.) szívfrekvencia nyúlványok felhelyezése a mellkas bőre alá;

3.2. ICV kanül és ozmotikus minipumpa beültetése

Az e-mitter kapszula behelyezését legalább 7-10 nappal követően a patkány jobb laterális agykamrájába ICV kanül és a hozzá kapcsolt ozmotikus minipumpa (**8. ábra**) beültetésére került sor. A fejtető szőrtelenítése, és dezinficiálása után sagittális irányú metszést ejtettünk a bőrön. A csontfelszín letisztítottuk, majd stereotaxias készülékkel kimértük a kanül beépítésének pozícióját, nevezetesen: a bregmától jobbra laterálisan 1,5, dorsálisan 1, a durától ventrálisan pedig 3,8 mm. A koponyacsontba fogászati fűróval 3 lyukat fűrtünk, melyek közül kettő a rögzítést szolgálta, így ezekbe fémcsavarokat helyeztünk. A harmadik lyukat pedig az ALZET Brain Infusion Kit-1[®] agykamrai kanül

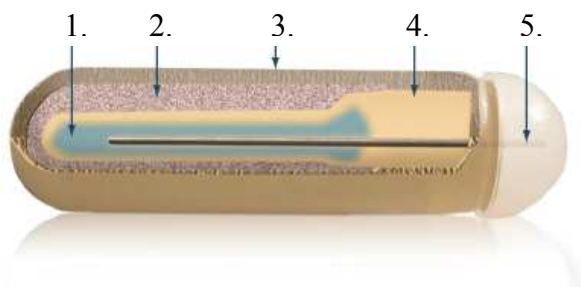
számára készítettük. A kanült fogászati cementtel rögzítettünk a koponyához és a 2 csavarhoz.

A minipumpa behelyezéséhez a metszést meghosszabbítottuk caudalis irányba, majd tompa preparációval elválasztva a nyaki régió bőrét az alatta fekvő lágyrészekről behelyeztük az előzetesen a vizsgálni kívánt anyaggal feltöltött ALZET 2001D ozmotikus minipumpát.



8. ábra: ICV kanül és az Alzet ozmotikus minipumpa

A minipumpa (9. ábra) 7 napig tartó folyamatos infúziót tett lehetővé $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{h}$ dózisban. A pumpa neve is utal működési alapelveire. Speciális szerkezetének köszönhetően az ozmózis mechanizmusát kihasználva juttatja a kívánt anyagot a hozzá kapcsolt poli-vinil-klorid csőbe, a kanülbe, innen pedig a liquor térbe. A pumpa falszerkezete belülről kifelé haladva: 1. impermeabilis membrán; 2. magas ozmolalitású sóhüvely; 3. semipermeabilis membrán.



9. ábra: ALZET 2001 mini-osmotikus pumpa® szerkezete:

1. alkalmazott anyag
2. ozmotikus réteg
3. semipermeabilis membrán
4. impermeabilis reservoir
5. áramlás szabályozó

A vizsgálandó anyagot az impermeabilis membránnal határolt hüvely tartalmazza. A magas ozmolalitású réteg a külső szövetekből folyadékot szív magába a semipermeabilis membránon keresztül, nyomást gyakorolva az át nem eresztő hüvelyre, amellyel biztosítja a pumpa belsejében található anyag folyamatos áramlását a kanül felé. Tehát a folyadékáramlás mozgatórugója a permeabilitás, továbbá a nyomás kiegyenlítés, és független az alkalmazott anyag minőségétől. Mivel az ozmózis sebessége állandó, a folyamatos és egyenletes anyagbeadás biztosított.

4. Alkalmazott anyagok

Az állatok centrálisan fiziológiás sóoldatot (kontroll), továbbá humán rekombináns leptint (Bachem) tartalmazó infúziót kaptak 1 µg/µl/h dózisban 7 napon keresztül. Az ALZET ozmotikus minipumpába injektált leptin oldat hozzávetőleg 200 µg leptint tartalmazott 200 µl fiziológiás sóoldatban feloldva.

5. Mérések, analízis

A fent említett műtétek által lehetővé vált a leptin energetikai hatásainak vizsgálata biotelemetriás rendszerben (VitalView Data Acquisition System Series 4000 for Temperature, Activity and Heart Rate®). E rendszer segítségével folyamatosan monitorizálható és számítógépen automatikusan regisztrálható a maghőmérséklet (Tc), a szívfrekvencia (HR, heart rate - az anyagcsere indikátora), a spontán horizontális lokomotor aktivitás (ACT) és ezek napszaki ritmusának változásai. A biotelemetriás

készülék két fő komponense a már említett e-mitter, valamint a ketrec alatt található speciális jelfogó berendezés, mely a kapszula által küldött adatokat 5 percenként regisztrálja. Ezeket 12 órára átlagolva nyertük az állatok éjszakai és nappali periódusának megfelelő átlagértékeket, amelyeket számítógépes program segítségével grafikusán ábrázoltunk.

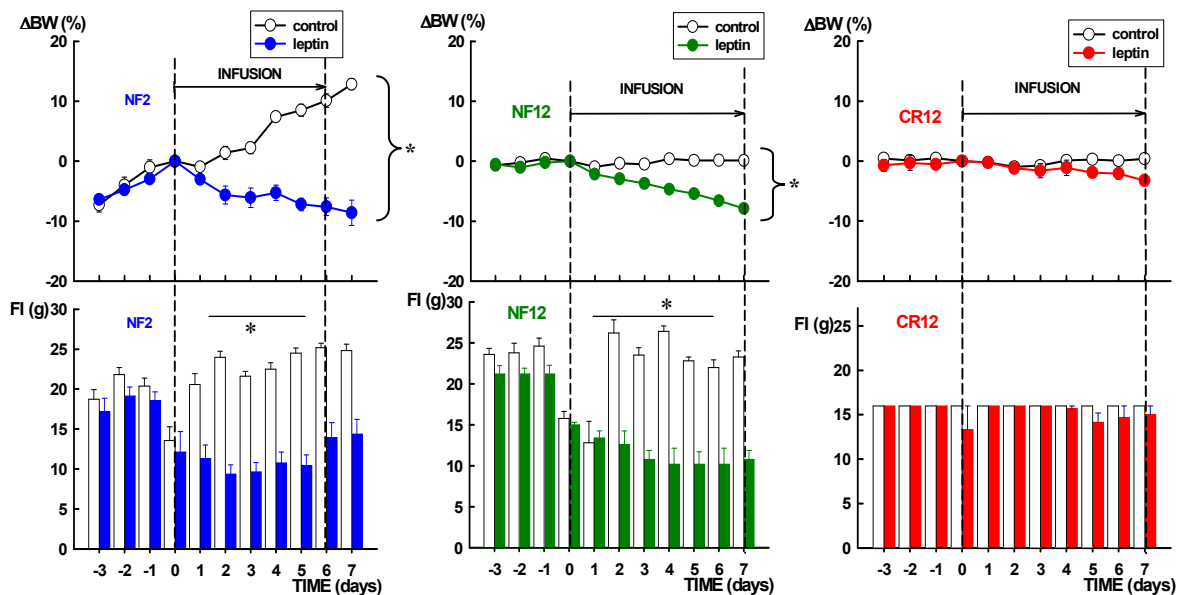
Adataink statisztikai értékelésére SPSS 11.0 for Windows programot használtunk. Alkalmazott módszerek: one-way ANOVA, és ANOVA repeated-measures teszt. Szignifikánsnak tekintettük azokat a változásokat, amelyek esetében $p < 0,05$ értéknél. Ezt az ábráimon a nappali minimum értékek esetében #-tel, az éjszakai maximum értékekre vonatkozóan *-gal jelöltem.

V.Eredmények

1. A testtömeg (BW) és a táplálékfelvétel (FI) változásai

Leptin-infúzió hatására létrejövő testtömeg-változás és a táplálékbevitel mértékét állítottam párba az azonos korú kontroll patkányokban mért adatokkal (**10. ábra**). A teli szimbólumok jelölik a leptin-infúzióval kezelt kísérleti csoportokat, az üres szimbólumok pedig a hozzájuk tartozó kontrollcsoportokat. Az összes ábrán kék szín jelöli a normál táplálású 2 hónapos állatokat, zöld a normál táplálású 12 hónapos csoportot, és piros a 12 hónapos kalória-restríktós állatcsoportot.

A **testtömeg** változását a kiindulási testtömeghez viszonyítottam ($\Delta\text{bodyweight}/\Delta\text{BW}$) az idő függvényében. A ΔBW értékeket g-ban, az idő múlását pedig napokban adtam meg. A teli szimbólumok jelölik a leptin-infúzióval kezelt kísérleti csoportokat, az üres szimbólumok a hozzájuk tartozó kontrollcsoportokat ábrázolják.



10. ábra: A testtömeg (ΔBW) és táplálékfelvétel (FI) változásai 7 napos ICV leptin-infúzió során

ICV alkalmazott leptin-infúzió hatására a BW igen nagymértékű, szignifikáns csökkenést mutatott a fiatal NF2-es csoport esetében. Kisebb mértékben ugyan, de szignifikánsan csökkent a középkorú NF12-es csoport állatainak testtömege is, azonban a sovány középkorú CR12-es állatoknál nem jött létre számottevő fogyás.

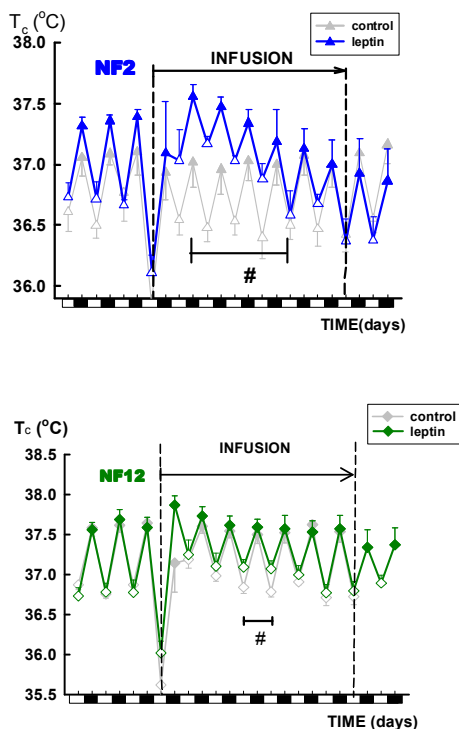
A **táplálékfelvétel** (food intake/FI) tekintetében az ordinátán a 24 óra alatt felvett táplálék mennyiségét grammok jelölik, az abszcisszán pedig az időt napokban. A színnel kitöltött oszlopok jelölik a leptin-infúzióval kezelt állatok paramétereit, a kontroll csoport táplálékfelvételét pedig üres oszlopokkal ábrázolják.

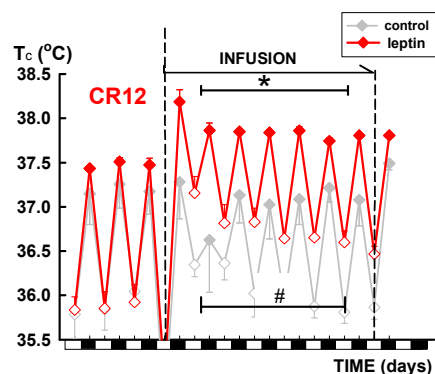
A táplálékfelvételt tekintve a testtömeg változásaihoz hasonló tendenciákat tapasztaltam. A leptin-infúzió szignifikáns csökkenést okozott az NF2, illetve az NF12-es csoportok napi tápfelvételében. A sovány középkorú CR12-es állatok táplálékfelvételében az infúzió nem eredményezett anorexiát.

2. A maghőmérséklet (T_c) változásai

A 11. ábrán a maghőmérséklet változásait ábrázoltam az idő függvényében.

A grafikonon a hőmérsékleti adatokat °C, az időt pedig napok jelölik.





11. ábra: A T_c változásai ICV leptin-infúzió hatására

Az abszcisszán fekete négyzetek jelölik az állatok éjszakai aktív periódusát (18:00-06:00), fehér négyzetek pedig az inaktív nappalokat. Teli szimbólumok reprezentálják az éjszakai maximum, üres szimbólumok a nappali minimum hőmérsékleteket. A szürkével jelölt görbe minden esetben a kontroll csoportra vonatkozik.

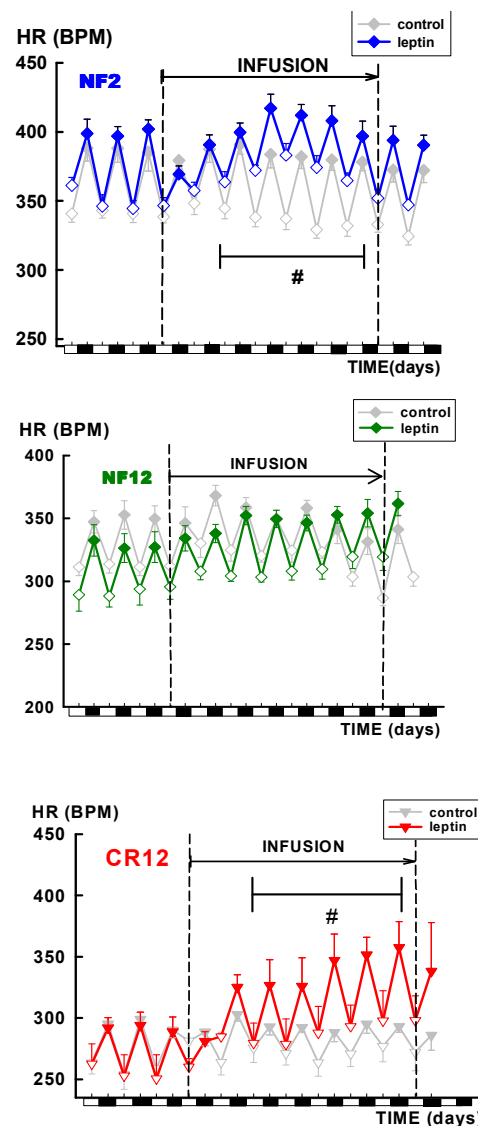
Az infúzió indításának napján látható T_c zuhanás a műtéti beavatkozás következtében jött létre, nem kapcsolható a leptin hatásához, ugyanis a NaCl-dal kezelt állatoknál is éppúgy megjelenik, mint leptin esetében.

A kísérlet során minden állatcsoportban növekedtek a nappali maghőmérséklet átlagok. Szembetűnő és szignifikáns emelkedés volt látható leptin hatására az NF2-es csoport esetén, míg az NF12-es állatok alig mutattak válaszkészséget az infúziós kezelésre, ez a minimális változás viszont statisztikailag szignifikáns volt. A sovány középkorú CR-es csoportban, ellentétben a FI és BW változásaiban tapasztaltakkal, igen nagyfokú, tartós és szignifikáns emelkedés volt tapasztalható. A T_c emelkedés ebben a csoportban volt a legkifejezettebb, nemcsak a nappali minimumok, de az éjszakai maximumok is jelentős emelkedést mutattak, amely a csoport fokozott leptin-érzékenysége utalhat.

3. A szívfrekvencia (HR) és a lokomotor aktivitás (ACT) változásai

A **szívfrekvencia** értékeit reprezentáló grafikon (**12. ábra**) hasonlóképpen épül fel, mint a **11. ábra**, azzal a különbséggel, hogy most az ordinátán a HR értékek vannak feltüntetve.

ICV leptin-infúzió hatására az NF2-es kísérleti csoportban a nappali minimum értékek tartós emelkedése jött létre. Az NF12-es állatcsoport HR értékei nem változtak az infúzió során, jelezve a középkorúakban már kialakulóban lévő leptin-rezisztenciát. A CR12-es patkányok éjszakai HR maximum értékei különösen nagymértékű és tartós változást mutattak, melynek mértéke az idő előrehaladtával csökkent, de a kontroll tartományba nem tért vissza.



12. ábra: A szívfrekvencia változásai ICV leptin-infúzió hatására

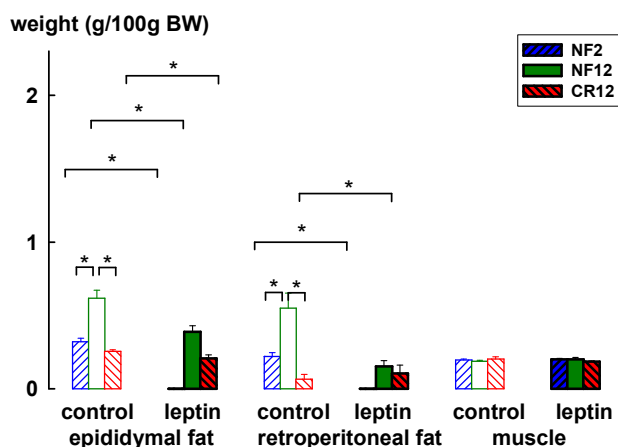
A **spontán horizontális lokomotor aktivitás** terén nem volt detektálható szignifikáns eltérést sem az éjszakai, sem pedig a nappali aktivitásra vonatkozóan, ami alátámasztja azt, hogy a Tc és HR emelkedése egyik állatcsoport esetében sem magyarázható az aktivitás fokozódásával. Feltételezhetően a megfigyelt Tc és HR növekedés hátterében inkább az anyagcsere emelkedése állt.

4. A testösszetétel indikátorainak változásai

A **13. ábra** a boncolás során eltávolított epididymalis- és retroperitonealis zsírszövet, illetve a musculus tibialis anterior (nedves) tömegét mutatja g-ban kifejezve, 100g testtömegre vonatkoztatva.

A **zsírszövet** tömege (az indikátorok alapján) az életkorral számottevően nőtt. Ezt a zsírtömeg növekedést a kalória-restrikció szignifikáns mértékben mérsékelte. A leptin-infúzió eredményeként a vizsgált zsírszöveti indikátorok tömege szignifikáns mértékben csökkent az NF2-es és NF12-es csoportokban. A CR12-es csoportban nem alakult ki értékelhető csökkenés.

Az **izomtömegre** vonatkozóan nem volt látható szignifikáns eltérés az NF12-es és CR12-es patkányok kontroll eredményei között, tehát kalória-restrikció nem idézett elő izomsorvadást. A leptin-infúzió nem befolyásolta az izomtömeget egyik csoportnál sem.



13. ábra: Az epididymalis- és retroperitonealis zsírszövet, valamint a musculus tibialis anterior tömege 100 g nedves testtömegre vonatkoztatva.

VI. Összefoglalás, következtetések

A leptin az egyik legjelentősebb perifériás eredetű katabolikus hatású mediátor, melynek szérumszintje a zsírszövet mennyiségével arányos (Friedman és Halaas 1998, Hamilton és mtsai 1995). A leptin szintje tartós éhezés hatására csökken, míg a test zsírtartalmának növekedésével fokozódik (Ahima 2000). A leptin szint emelkedése stimulálja a POMC, illetve a CART, gátolja viszont a NPY és AgRP neuronokat, ezzel csökkentve a táplálékfelvételt és növelve a metabolikus rátát (Schwartz és mtsai 2000, Székely és Szelényi 2005). A leptin így az energetikai egyensúlyt a testtömeg csökkenése irányába tolja el.

A kísérleti eredmények azt mutatták, hogy a krónikus (10 hónapos) kalória-restrikció számottevő mértékben csökkentette a BW-t, illetve a zsírtömeget, ugyanakkor a kontroll, *ad libitum* táplált állatokéhoz képest nem idézett elő izomtömeg csökkenést. A 7 napos leptin-infúzió hatására a FI és BW értékek mind a fiatal, mind a normál táplálású középkorú állatcsoportban számottevően csökkentek. Ezek a hatások a sovány, kalória-restrikciós középkorú csoportban nem bizonyultak szignifikánsnak. Ugyanakkor a fiatal, illetve a sovány középkorú kísérleti csoportban jelentős hypermetabolismusra utaló változások alakultak ki. A nappali Tc átlagok növekedtek, melyek a nappali periódus jellegzetes inaktivitása miatt feltehetően főként az anyagcsere növekedésnek tulajdoníthatók. A fiatal NF2 csoportban ezt támasztja alá a nappali HR átlagok növekedése is. Az éjszakai Tc és HR maximumok csupán a sovány, középkorú CR12-es csoportban növekedtek. Miután a leptin-infúzió során sehol nem észleltünk szignifikáns aktivitás-növekedést, a jelenség hátterében itt is fokozott anyagcsere állhat.

Összességében a leptin-infúzió hatásai életkorfüggő csökkenést mutattak. Az NF12-es patkányokban mért minimális, rövidtávú nappali Tc emelkedés messze elmaradt a fiatalokban kialakuló hypermetabolismustól, míg a FI- és BW-csökkenés tekintetében a korfüggő eltérés jóval mérsékeltebb volt.

A CR12-ben észlelhető leptin hatások sem párhuzamosan változtak: az anorexigén válaszok jelentős mértékben csökkentek, míg a hypermetabolicus hatások igen kifejezettek

voltak. A kalória-restríkción állatokban a leptin anorexigén hatásainak gyengesége feltehetően a hosszútávú depriváció során kialakult, fokozott orexigén tónussal magyarázható.

Az eredmények alapján úgy tűnik, hogy a kalória-restríkción hatására a leptin hatékonysága részlegesen javult a már jelentős leptin-rezisztenciát mutató középkorú patkányokban.

Jelen vizsgálat eredményei ellentmondani látszanak azon korábbi megállapításoknak, melyek szerint a kalória-restríkción hatástalanoknak bizonyult öreg patkányok leptin-rezisztenciáját illetően (Gabriely és mtsai 2002). Ezek a vizsgálatok kizárólag anorexigén leptin hatásokra irányultak, amelyek kalória-restríkción állatokban már korábbi 6-, illetve 12-hónapos korban sem válthatók ki. A hypermetabolicus hatások terén a kalória-restríkción képes volt a korfüggő leptin-rezisztenciát hatásosan visszaszorítani. Ezen következtetéseink egybecsengenek a szakirodalom egyes megfigyeléseivel, amelyek az FI mellett metabolikus paraméterekre is kiterjedtek (Soós és mtsai 2009). Ugyancsak hasonló következtetésekre vezetett az a vizsgálat, amelyben enyhe (80%-os) átmeneti (3 hónapos) kalória megszorítást követően öreg állatok *re-feeding* értékeit (a megszorítást követő *ad libitum* tápfelvétel során) a leptin eredményesen csökkentette (Fernández és mtsai 2002).

Megfigyeléseinkből, illetve a szakirodalom adataiból azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a kalóriabevitel krónikus megszorítása, amely a testösszetételt előnyös irányban változtatja meg (az izomtömeg csökkenése nélkül jelentősen mérsékli a zsírtömeget) nemcsak megakadályozhatja a leptin-rezisztencia kialakulását, hanem idősebb korban is növelheti a leptin hatékonyságát bizonyos energetikai paraméterekre.

Ezen eredmények későbbi humán vonatkozásai igen jelentősek lehetnek, hiszen alátámasztják a kalória-restríkción jelentőségét már túlsúlyos, középkorú, leptin-rezisztens egyének esetében is. További vizsgálatokat tervezünk öreg, 24 hónapos normál táplálású, illetve kalória-restríkción állatcsoportok leptinre adott energetikai válaszkészségének összevetésére.

VII. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani dr. Balaskó Márta témavezetőmnek, a dolgozat megírása során nyújtott szakmai támogatásáért, tanácsaiért, türelméért.

Köszönöm dr. Székely Miklós professzor úrnak valamint, dr. Pétervári Erikának és dr. Soós Szilviának a dolgozat megírásához nyújtott szakmai segítségüket.

Köszönettel tartozom továbbá a Kórélettani Intézet Hőszabályozási és Anyagcsere Laboratóriuma összes dolgozójának, kiemelten Gáspárné Koncsecskó Margitnak és Mihálffyné Jech Andreának, akik nagyban segítettek a kísérleti technikák elsajátításában és természetesen TDK hallgatótársaimnak, akik hozzájárultak a kísérletes munkához.

VIII. Rövidítések

ACT	spontán horizontális lokomotor aktivitás
AgRP	agouti-related peptide
AMPK/ACC	5'-AMP-aktivált protein kináz/ acetylcoenzim A-carboxiláz
ARC	nucleus arcuatus
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
BBB	blood-brain-barrier
BMI	body mass index
CART	kokain-amfetamin-regulált transzkript
CCK	cholecystokinin
CR	calorie-restricted
CRH	corticotropin-releasing hormon
D2	II-es típusú dehidrogén
FFA	free fatty acid
FI	food intake
F-III	III-as típusú fibronektin
FSH	folliculus stimuláló hormon
GLUT-4	glükóz transzporter 4
GnRH	gonadotropin-releasing hormone
HPA	hypothalamo-hypophysealis-adrenalis
HR	szívfrekvencia
ICV	intracerebroventricularis
IL-1	interleukin-1
IL-6	interleukin-6
IP	intraperitonealis
IRS	inzulin receptor szubsztrát
JAK2	Janus-kináz
LH	luteinizáló hormon

LHRH	luteinizing hormone releasing hormone
MAPK	mitózis aktiváló protein kináz
MC1R-5R	melanocortin receptor
NF	normally-fed
NPY	neuropeptid Y
Ob	obes gén
OBR	leptin receptor
POMC	proopiomelanokortin
PP	pancreas polipeptid
PTP1B	protein-tirozin foszfatáz-1B
PVN	nucleus paraventricularis
PYY	peptid YY
SOCS3	suppressor of cytokine signaling-3
STAT	signal transducer and activator of transcription
Tc	maghőmérséklet
Th1	T-helper 1
TNF	tumor necrosis faktor
TRH	thyrotropin-releasing hormon
Tyr	tyrosin
UPC	uncoupling
ZDF	zucker diabetic fatty
α -MSH	alfa-melanocyta-stimuláló hormon
Δ BW	testtömeg/body weight/ változás