

XXXI. OTDK Biológia Szekció

**A GnRH neuronok kapcsolata kisspeptin sejtekkel -
immunhisztokémiai vizsgálat nőstény egerek két agyterületén**

Készítette: Szilvász-Szabó Anett és Rabi Fruzsina



Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar

Biológus MSc, Idegtudomány és Humánbiológia szakirány, II. évfolyam



MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

Endokrin Neurobiológia Kutatócsoport

Témavezető: Dr. Kalló Imre

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
Bevezető	4
Célkitűzés	10
Anyag és módszer	11
A későbbi vizsgálatokhoz szükséges műtétek	11
Előkészítés kettős immunfluoreszcens jelölésre.....	11
Kettős immunfluoreszcens jelölés	12
Előkészítés elektronmikroszkópos vizsgálatra	12
Konfokális lézer mikroszkópos vizsgálat	13
Eredmények.....	14
Diskusszió.....	19
Összefoglaló	22
Summary	23
Irodalomjegyzék.....	24
Köszönetnyilvánítás	27
Nyilatkozat	28
Szilvász-Szabó Anett.....	28
Rabi Fruzsina	29

Rövidítések jegyzéke

ABC: avidin-biotin komplex

Arc: arcuatus mag

AVPV: anteroventrális periventrikuláris mag

DAB: diamino-benzidin

ER α : ösztrogénreceptor alfa

FSH: follikulus stimuláló hormon

GABA: gamma-amino-vajsav

GnRH: gonadotropin-releasing hormon

GPR54: G-fehérje receptor 54

HHG: hipotalamo-hipofizeo-gonádális tengely

IgG: immunoglobulin G

IR: immunreaktív

KP: kisspeptin

LH: luteinizáló hormon

NHS: normál lószérum

Ni-DAB: nikkel-diamino-benzidin

OVX: ovariectomia

PFA: paraformaldehid

RP3V: a harmadik agykamra körüli rostrális periventrikuláris área

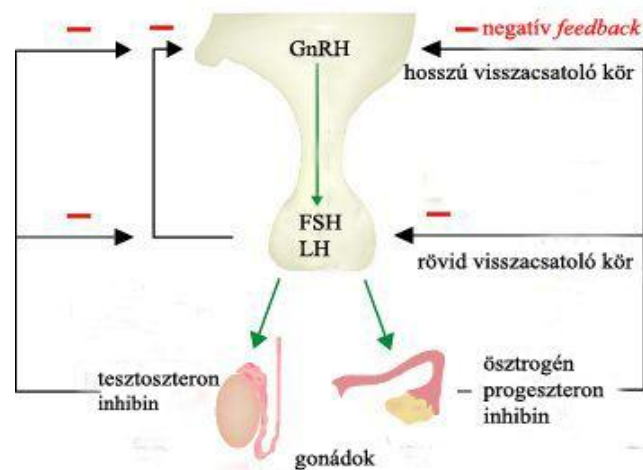
SCN: szuprakiazmatikus mag

TX100: Triton-X100

VGLUT-2: vezikuláris glutamát transzporter-2

Bevezető

A gonadotropin-releasing hormon (GnRH) neuronok a termékenységet szabályozó komplex idegsejthálózat végső kimenetét adják. Az agy szepto-preoptiko-hipotalamikus régiójában elszórtan elhelyezkedő GnRH neuronok a hipofízis elülső lebenyére hatva serkentik a follikulus stimuláló hormon (FSH) és a luteinizáló hormon (LH) elválasztását, amely a gonádokban tesztoszteron, ösztrogén, illetve progeszteron termeléséhez vezet. Így szerepet játszanak a hipotalamo-hipofizeo-gonádális (HHG) tengely kialakításában (1. ábra).



1. ábra: A hipotalamo-hipofizeo-gonádális tengely működése
(<http://www.endocrinesurgeon.co.uk/index.php/what-is-the-hypothalamo-pituitary-axis>)

A szepto-preoptiko-hipotalamikus régiót átjáró GnRH dózisdependens módon képes változtatni a plazma LH szintet: alacsony koncentrációban gátolja az LH szekréciót, magas szintje viszont stimuláló hatású. Ez alapján feltételezhető, hogy a GnRH képes szabályozni saját neuronjainak funkcióját. Egerekben az alacsony GnRH-szint csökkenti a GnRH neuronok aktivitását, míg magas koncentrációban serkenti azt. Ezzel a GnRH úgynevezett *ultrashort loop feedback*-et (ultrarövid visszacsatoló kört) képez; pozitív visszacsatolós mechanizmuson keresztül növeli a GnRH aktivitást, negatív *feedback*-kel pedig csökkenti azt (Christian és mtsai, 2010). A GnRH tehát saját neuromodulátorának tekinthető; e sejteknek ugyanakkor számos más reguláló faktora is ismert.

Az ösztrogén egyike a GnRH neuronok fő szabályozó tényezőinek. Szabályozza bioszintézisét és degradációját, a gonádok felől pedig a hipotalamuszra visszahatva befolyásolja a hormon elválasztását. A GnRH epizodikus ürülése a portális keringésbe pulzatilis mintázatú LH szekréciót okoz (Herbison és mtsai, 2011). A GnRH szekréció kétféle

típusát különböztetjük meg: pulzatilis - tónusos, folyamatosan alacsony szinten történő szekréció (Li és mtsai, 2009), illetve *surge*-szerű - hirtelen, gyorsan lecsengő, nagy koncentrációban történő szekréció (Kinoshita és mtsai, 2005), amelyek kialakulásában az ösztrogénszint jelentős szerepet játszik. A petefészek ciklusának különböző stádiumaiban az ösztrogén eltérő módon fejt ki hatását a GnRH szekrécióra. A follikuláris fázisban az ösztrogén negatív *feedback* mechanizmussal segít megtartani a GnRH tónusos szekrécióját, amely elengedhetetlen feltétele az LH és az FSH szintézisének és kiválasztásának. A GnRH folyamatos adása ugyanis *down*-regulálja a gonadotropin aktivitást, terméketlenséget eredményez (Herbison és mtsai, 2011). A follikuláris szakasz végén a cirkuláló ösztrogén emelkedő szintje ugyanakkor megváltoztatja a GnRH szekréciós mintázatát, ekkor lesz a legmagasabb az ösztrogénszint és a negatív *feedback* pozitívba csap át (ennek mechanizmusa még nem teljesen tisztázott). A pozitív *feedback* hatására GnRH *surge* keletkezik, amely LH *release*-ben, majd ovulációban folytatódik. Ez az úgynevezett preovulációs GnRH *surge* (Christian és mtsai, 2010).

Az ösztrogén GnRH sejtekre kifejtett pozitív és negatív hatása eltérő elhelyezkedésű neuronpopulációkon nyilvánul meg. A stimuláció, vagyis a GnRH *surge* az AVPV-ben érvényesül, amely a mediális preoptikus area rostrális részén, a harmadik agykamra közelében helyezkedik el és kevesebb GnRH neuront tartalmaz. Léziója az ösztrogén-mediálta LH *surge* megszűnését és perzisztens ösztrozt okoz. Ugyanitt ösztrogén receptort tartalmazó sejteket sikerült kimutatni, ezek olyan AVPV neuronok, amelyek direkt projektálnak a GnRH sejtekhez, tehát szerepük lehet a működés szabályozásában. Mindezek mellett ezek a neuronok direkt inputot kapnak az szuprakiazmatikus magból (SCN). Az ösztrogén, illetve a cirkadián input integrációjának, azok GnRH neuronokra kerülése előtt, az AVPV biztosít helyet.

Ovariectomizált patkányokban az arcuatus mag csökkenti az LH pulzus amplitúdóját és frekvenciáját, mivel az ösztrogén gátló hatása az Arc területén érvényesül (Herbison és mtsai, 2011).

Egerekben mindez cirkadián ritmus szerint zajlik. A cirkadián ritmus fő szabályozója az anterior hipotalamuszban található szuprakiazmatikus mag, amely a környezeti fény-sötét viszonyoknak megfelelően működik. A SCN-ba a retinohipotalamikus és genikulohipotalamikus pályákon keresztül fénnel kapcsolatos információ jut, amely lehetővé teszi, hogy a szervezet a nappal-éjszaka változásnak megfelelően, megközelítőleg 24 órás periódusban működjön. A SCN-hoz hasonló óramechanizmusok megtalálhatók a perifériás

szövetekben is, mint például a májban, bélben és zsírszövetben. Újabb kutatások alapján az is kiderült, hogy a cirkadián óra részt vesz számos sejtes és fiziológiai funkció szabályozásában, valamint az anyagcserében nélkülözhetetlen enzimek és hormonok expresszióját is befolyásolja (Froy és mtsai, 2011).

A cirkadián óra molekuláris mechanizmusa mind a SCN-ben, mind a perifériás sejtekben specifikus koexpresszált óragének révén valósul meg (Schibler és mtsai, 2003). Az óragének ritmikus transzkripciója és translációja határozza meg a sejtek metabolikus aktivitását. Annak ellenére, hogy az óragének számos perifériás szervben, agyi régióban is megtalálhatóak, ritmusuk fennmaradásának elengedhetetlen feltétele a szuprakiazmatikus mag jelenléte. A SCN szinkronizálja az élettani működések lokális szabályozását végző perifériás óragének működését.

A GnRH neuronok számos ritmikus működést mutatnak: a GnRH génexpressziójában napi ritmust, a hormon portális keringésbe ürülésében pulzatilitást figyelhetünk meg. A GT1-7 GnRH neuronális sejtvonal vizsgálata során kiderült, hogy számos óragént tartalmaz, *in vitro* körülmények között pedig a GnRH sejtekkel azonos pulzatilitást mutat. Tehát a szervezet számos más sejtjéhez hasonlóan az óragének nagy része a GnRH neuronokban is kimutatható. (Gillespie és mtsai, 2003).

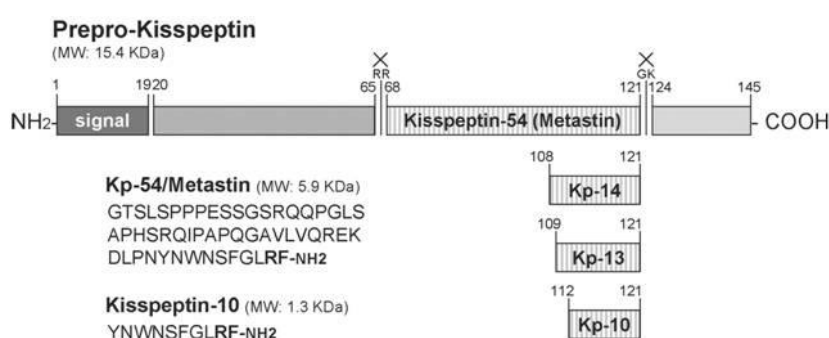
A GnRH-rendszer ritmikus működése tehát egyrészt a sejtek belső tulajdonságának köszönhető, ugyanakkor idegi bemenetek is befolyásolják. A szükséges információ forrása a SCN, amelynek bizonyítéka, hogy a mag lézióját követően ösztrogén beadásával nem lehet LH *surge*-öt kiváltani (Meyer-Bernstein és mtsai, 1999).

Mindezek alapján elmondható, hogy a *surge*-generálás az ösztrogén *feedback*től és a cirkadián ritmustól is függ (Christian és mtsai, 2010).

Az ösztrogénhatások jelentős részét nukleáris ösztrogénreceptorok közvetítik a GnRH felé. A hipotalamusz területén elhelyezkedő neuronok csekély mértékben mutatnak kolokalizációt ösztrogént expresszáló sejtekkel, ezért valószínű, hogy a hormonhatásért főként indirekt kapcsolatok felelősek. Ugyanakkor GT1 hipotalamusz GnRH sejtmodelleken alfa és béta ösztrogénreceptor expressziót is sikerült kimutatni, ezzel a direkt hatás is bizonyított (Roy és mtsai, 1999). A β -típusú ösztrogénreceptorok, amelyek *in vivo* detektálhatók a GnRH neuronokban (Hrabovszky, 2000 és 2001, Kalló, 2001), a szexuális érés, valamint a szaporodás centrális szabályozása szempontjából kisebb jelentőségűek. Ugyanakkor az α -altípus ($ER\alpha$) részt vesz a GnRH szekréció szabályozásában, mind a negatív, mind a pozitív

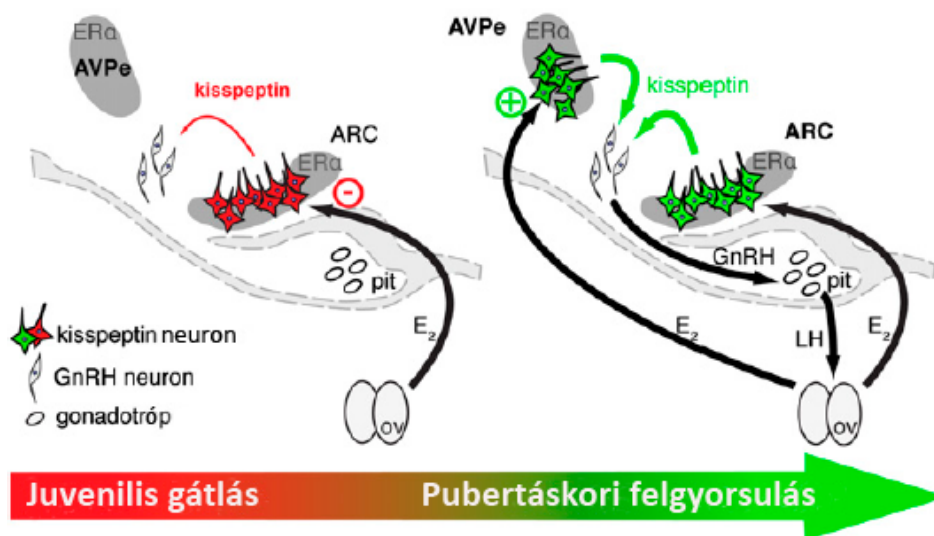
viSSzacsatolás mechanizmusának mediátoraként. Mivel *in vivo* még nem sikerült ER α -t azonosítani GnRH neuronokban, így valószínű, hogy az ösztrogén GnRH szekrécióra kifejtett hatása indirekt módon, alfa típusú receptorát expresszálni képes neuronokon keresztül érvényesül.

Immunhisztokémiai vizsgálatok kimutatták, hogy a GnRH számos célsejtje ösztrogénérzékeny: így van ez a kisspeptin (KP) neuropeptid esetében is, amely expresszálna az ER α -t. A metasztázis szupresszor *KiSS-1* génről átíródó kisspeptin 54 aminosavból álló C-terminális régiója természetes ligandja a G-fehérje kapcsolt GPR54 receptornak (Kotani és mtsai, 2001) (2. ábra).



2. ábra: A 54 aminosavnyi kisspeptin a prepro-kisspeptintről íródik át (Tena-Sempere, 2006).

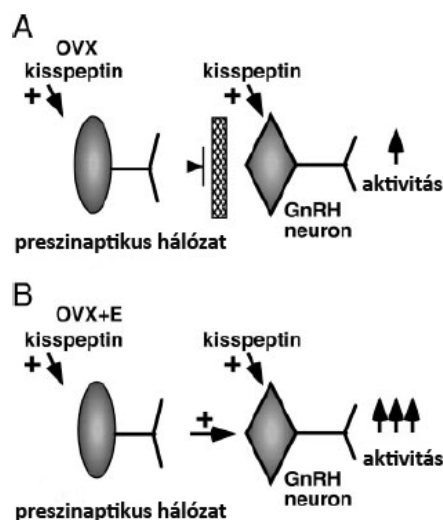
GPR54 receptorhiányos patkányokban a gonádok alulfejlettek, abnormálisak és a nemi érés is elmaradott (hipogonadotróp hipogonadizmus) (Mikkelsen és mtsai, 2009). A posztnatális fejlődés során a KP és a GPR54 mRNS szintek is emelkedettek a hipotalamusz területén, ami arra utal, hogy a hipotalamusz *up*-regulált a pubertás időszakában. A KP-rendszernek tehát fontos szerepe van a pubertáskori szexuális differenciációban, de felnőttkorban is nélkülözhetetlen, hiszen a gonadotropin szekréció esszenciális regulátoraként funkcionál (3. ábra).



3. ábra: A szaporodási ciklus és a szexuális érés ER α szignalizációjának, valamint a KP neuronok általi szabályozási mechanizmusának sematikus ábrája. A prepubertás szakaszában az ER α szignalizáció gátolja a KP expressziót az Arc-ban, így gátolja a GnRH szekréciót. A pubertás kezdete összefüggésben van az Arc szuppresszív mechanizmusának csökkenésével, miközben az AVPV KP neuronjainak ER α -aktivitása megnő. Ez utóbbi folyamat stimulálja a KP expressziót az AVPV sejtekben és emeli a GnRH release-t a pubertás végéig (Mayer, 2010). Rövidítések: GnRH: gonadotropin-releasing hormon, LH: luteinizáló hormon, ARC: arcuatus mag, OV: petefészek, E $_2$: ösztrogén, ER α : ösztrogén alfa receptor, pit: hipofízis, AVPe: anteroventrális periventrikuláris mag

In situ hibridizációval és immunocitokémiával is kimutatták, hogy a Kiss1 mRNS-t expresszáló sejtek három klaszterbe csoportosulnak a hipotalamusz területén: megtalálhatók a periventrikuláris preoptikus areában, a dorzomediális hipotalamuszban, illetve az arcuatus magban (Clarkson és mtsai, 2006).

A KP a GnRH neuronokra direkt és indirekt módon is képes kifejteni hatását, amely ösztrogén-asszociált. Ösztrogén hiányában a KP közvetlenül aktiválja a GnRH-t, valamint az ezekkel szomszédos, egyelőre be nem azonosított neuronokat. Azonban, mivel ösztrogén nincs jelen a rendszerben, ez az ismeretlen sejtek által képzett, a GnRH neuronokra vonatkozó afferens beidegzés gátolt, így csak a KP kifejtette direkt hatás érvényesül. Ösztrogén jelenlétében viszont az afferens hálózat és a GnRH sejtek közötti kapcsolat megengedett, így a KP nem csupán közvetlenül, hanem afferens inputokon keresztül is stimulálja a GnRH aktivitást (4. ábra) (Pielecka-Fortuna és mtsai, 2008).



4. ábra: A kisspeptin direkt (A) és indirekt hatása (B) a GnRH neuronokra (Pielecka-Fortuna, 2008). Rövidítések: OVX: ovariectomia, E: ösztrogén.

A GnRH lehetséges targetjei, amelyek megtalálhatók mind a RP3V (amely magában foglalja az AVPV-t és a periventriculáris preoptikus magot) mind az Arc területén, expresszálják az α -típusú ösztrogénreceptort. A két terület KP-populációinak működése jelentős eltéréseket mutat. Az AVPV területén minden Kiss1 expresszál $ER\alpha$ -t, az ösztrogén pedig az $ER\alpha$ -n keresztül *up*-regulálja a Kiss1 kifejeződését. A preoptikus áréában az endogén KP blokkolása törli az LH-surge-öt proösztroszban. Ezek alapján a RP3V területén pozitív *feedback* valósul meg (Kinoshita és mtsai, 2005). Ezzel szemben az Arc-ban a nemi hormonok - ösztrogén - eltávolítása (ovariectomia) emeli a Kiss1 mRNS szintjét, miközben ösztrogén vagy tesztoszteron adása megakadályozza ugyanezt (Roa és mtsai, 2011).

Az előbb ismertettek alapján jól látszik, hogy a KP mennyire jelentős szerepet játszik a GnRH szabályozásában. Mivel a mediobazális hipotalamikus sejteken is találtak GnRH receptorokat (Seong és mtsai, 1998), felmerülhet az a kérdés, hogy a már ismert útvonallal ellenkező irányban is létezik-e és ha igen, hogyan valósul meg a szabályozás. Azaz, a GnRH neuronok beidegzik-e a KP sejteket, illetve, hogy köztük milyen morfológiai kapcsolatok jönnek létre. Mivel a szinaptikus varikozitások méretükben és alakjukban nem különböznek a nem szinaptikus varikozitásoktól és az axonterminálisból felszabaduló átvivőanyag képes viszonylag nagy távolságra történő diffúzióra, a valódi szinapszis kiépülése mellett fennállhat a nem szinaptikus interneuronális kapcsolat lehetősége is (*volume transition*) (Vizi E, 1987).

Célkitűzés

Kísérleteink során a hipotalamo-hipofizeo-gonádális tengely hipotalamikus szabályozási központját tanulmányoztuk. A KP sejtek GnRH neuronokra gyakorolt hatása jól ismert, az irodalomban azonban kevés információ áll rendelkezésre arról, hogy a GnRH sejtek képesek-e befolyásolni az őket beidegző RP3V és Arc neuronok működését. Jelenleg kevésbé vizsgált, hogy vajon létezik-e egyfajta visszacsatolás a GnRH sejtek felől az őket beidegző KP sejtekre. Ez fontos önszabályozó kört jelenthetne a GnRH működésében. Emiatt célul tűztük ki annak az immunhisztokémiai módszerekkel történő vizsgálatát, hogy a GnRH neuronok vetülnek-e az RP3V és az Arc területeire, valamint, hogy ezekben a régiókban létrehoznak-e kapcsolatot KP sejtekkel. Célunk volt továbbá annak kiderítése, hogy ha érkeznek GnRH rostok a KP sejtek területére, akkor az általuk létrehozott kapcsolatok nem szinaptikus interneuronális kapcsolatok, vagy szinaptikus jellegűek. A megfigyelt szinapszisok típusát, morfológiai és funkcionális jellegét elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

Anyag és módszer

Kísérleteink során 50 napos CD1 nőtény egereket (n=20) használtunk, amelyek átlagos tömege 40 gramm volt. A műtéteket minden esetben mélyaltatásban végeztük, az intraperitoneálisan bejuttatott altatószer összetétele: ketamin (25 mg/testtömeg-kilogramm), xilavet (5 mg/testtömeg-kilogramm) és pipolfen (2,5 mg/testtömeg-kilogramm) volt, fiziológiás sóoldatban.

A későbbi vizsgálatokhoz szükséges műtétek

Az összehasonlíthatóság érdekében a kontrollcsoporton és a kezelt állatokon párhuzamosan végeztük a beavatkozásokat. A kísérleti állatokon elsőként ovariektómiát (OVX) hajtottunk végre annak érdekében, hogy az ivarszervek hormontermelése ne befolyásolja vizsgálatainkat. A petefészek eltávolítását követő hetedik napon 3,18 mm hosszú és 1,57 mm átmérőjű szilikonkapszulát ültettünk be szubkután, amely 0,625 µg ösztradiol-benzoátot tartalmazott 20 µl napraforgóolajban (Szilvász-Szabó Anett, SZA). Ugyanezek a beavatkozások történtek a kontroll állatokon is azzal a különbséggel, hogy esetükben a kapszulát 20 µl napraforgóolajjal töltöttük fel (Rabi Fruzsina, RF). A kapszula beültetése után három nappal a kísérleti állatok mindegyikén sztereotaxikus műtét formájában kolchicinkezelést hajtottunk végre (SZA). A koponya feltárását követően Hamilton-fecskendő segítségével 30 µg kolchicint 3 µl, 0,9%-os sóoldatban feloldva juttattunk be az egerek oldalkamrájába. A beavatkozás után görcsoldás céljából minden állat 0,1 ml 6%-os nátrium-pentobarbitált tartalmazó oldatot kapott. A kezelés másnapján ösztrogén negatív (11-12 óra között), illetve pozitív (16-17 óra között) *feedback* fázisban történt az állatok perfúziója (RF). A perfúziót a konfokális mikroszkópos elemzésre szánt egereknél 4%-os paraformaldehiddel (PFA), míg az elektronmikroszkópos vizsgálatra kiválasztottak esetében 2% PFA és 4% acrolein, illetve 4% PFA és 1% glutáraldehid keverékével hajtottuk végre. Az eltávolított fixált agyak utófixálás céljából 2% PFA-ba kerültek, majd egy éjszakán át 4°C-os hűtőszekrényben tároltuk őket.

Előkészítés kettős immunfluoreszcens jelölésre

Az utófixálást követően az agyakat egy éjszakára 30%-os cukoroldatba (300 g szukróz, 0,5 g nátrium-azid, Milli Q) helyeztük, majd fagyasztó mikrotómmal (Leica SM 2000R) 30 mikronos metszeteket készítettük. Ezután a metszetek fagyálló oldatba kerültek, amelynek összetétele: 30% etilén-glikol, 25% glicerol, 0,05 M foszfát-puffer, pH = 7,4. Az Arc és a RP3V területéről (bregma +0,38 mm-től bregma -2,46 mm-ig) minden agyból

reprezentatív metszeteket választottunk ki, amelyek alapos PBS-es mosást követően a fixálószer és a fagyálló oldat teljes eliminálása érdekében 30 percig 1%-os nátrium-borohidrides kezelést kaptak. Az endogén peroxidáz aktivitás megszüntetésére 20 perces, 0,5% hidrogén-peroxidos mosást, majd a membránpermeabilitás növelésére szintén 20 perces, 0,5%-os TX-100 kezelést alkalmaztunk. A metszetek a nem specifikus antitestkötés megelőzése érdekében 20 percig inkubálódtak blokkolóban (NHS, 2%) (SZA).

Kettős immunfluoreszcens jelölés

Az ösztrogénkezelt agyak RP3V régiójából, illetve az olajkezelt agyak Arc-ából kiválasztott metszeteket 72 órán keresztül, 4°C-on inkubáltuk *guinea pig* anti-GnRH (#1018, 1:10000) és *rabbit* anti-KP (#566, 1:10000) elsődleges antitestek keverékében. Ezt követően a metszeteket másodlagos szérumba tettük; a GnRH vizualizálására CY3-konjugált *anti-guinea pig* IgG-t (1:1000, 12h), míg a KP esetében biotinilált *donkey anti-rabbit* (1:1000, 2h) antitestet használtunk. Annak érdekében, hogy a KP a konfokális mikroszkópos vizsgálat során láthatóvá váljon, Alexa-488-streptavidint (1:5000, 12 h) alkalmaztunk, amelyet avidin-biotin komplex (ABC, 1:1000, 1 h), biotinilált tiramid- (1:1000, 0,5 h) és H₂O₂- (0,006%, 0,5 h) kezelés előzött meg. A metszeteket - tárgylemezre történő felhúzásukat követően - VectaShield (Vector Laboratories Inc. H-1400) fedőszerrel, 0,15 mm-es vastagságú fedőlemezzel lefedtük (SZA).

Előkészítés elektronmikroszkópos vizsgálatra

Az elektronmikroszkópos elemzésre szánt agyak lemetszése vibratómmal történt (Vibratome S 1000). A 30 mikrométeres metszetek a metszés során a fixáló oldat kimosása érdekében PBS-be kerültek, ezt 30 perces nátrium-borohidrides kezelés követte. Többszöri PBS-es mosás után a metszeteket 10%-os, majd 30%-os cukoroldatba helyeztük, egy éjszaka elteltével folyékony nitrogénes fagyasztást alkalmaztunk. A fagyasztás befejezése után a 30%-os cukoroldatot 10%-osra cseréltük le, majd a metszeteket körülbelül tíz percig állni hagytuk 0,1%-os H₂O₂ oldatban. Ezt követően bódiános (3 ml formalin, 10,8 ml abszolút alkohol, 16,2 ml desztillált víz), illetve tioglikolsavas (4 ml tioglikolsav, 24 ml desztillált víz) előkezelést alkalmaztunk, majd a metszetek 20 percre blokkolóba (2% NHS) kerültek.

Az immunfestés során először primer szérumba (*guinea-pig* anti-GnRH, #1018, 1:600,000, illetve *rabbit* anti-KP, #566, 1:100,000) helyeztük a metszeteket. A GnRH vizualizálása biotinilált *anti-guinea pig* IgG-vel (1:1,000, 24 h) történt, amelyet ABC-kezelés, illetve H₂O₂ jelenlétében nikkel-diamino-benzidines (Ni-DAB) hívás (peroxidáz-reakció)

követett. A GnRH kimutatásakor Gallyas-ezüstözést, majd aranyozást alkalmaztunk, ezt követte a KP vizualizálása, amely során a metszeteket biotinilált *donkey anti-rabbit IgG* (1:1,000, 1,5 h) másodlagos szérumban inkubáltuk. Az ABC-kezelést követően a KP esetében a peroxidáz-reakció H_2O_2 jelenlétében diaminobenzidinnel (DAB) történt (RF).

Az immunfestést követően a metszeteket 1%-os ozmium-tetroxidban 1 órán át, majd 2%-os uranil-acetátban (70%-os etanolban oldva) 40 percig inkubáltuk. A metszetek dehidrációját felszálló alkoholsorral érték el (30%-tól 100%-ig), végül propilén-oxidos kezelést alkalmaztunk. Ezt követően 40 percre 50%-os (propilén-oxid és műgyanta /TAAB 812 epoxy resin/ keveréke), majd 100%-os gyantába helyeztük a metszeteket. A műgyantával átitatott metszeteket *liquid release agent*-tel bevont fedő- és tárgylemezek közé emeltük át, majd polimerizálódás céljából 56°C-on két napig inkubáltuk. A félvékony (1 μ m) és ultravékony (50-60 nm) metszeteket Leica UCT ultramikrotóm (Leica Microsystems, Vienna, Austria) segítségével készítettük. Az ultravékony metszeteket Formvar-hártyával borított egylyukú gridekre gyűjtöttük, amelyeket 2%-os ólom-citrátos kontrasztosítás után Jeol-100 C transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

Konfokális lézer mikroszkópos vizsgálat

A leírtak szerint előkészített metszetek vizsgálata konfokális lézer mikroszkóppal (Radiance 2100, Bio-Rad Laboratories, UK) történt. A kettős immunfluoreszcens jellel ellátott metszetek közül a sztereotaxikus atlasz alapján három-három reprezentatív metszet került kiválasztásra. Az RP3V esetén a metszetek szagittális síkban való kiterjedése a bregmától +0,26 mm-től +0,38, illetve +0,14 mm-ig, valamint +0,02 mm-től -0,1 mm-ig; az Arc esetében pedig a bregmától -1,46 mm-től -1,7 mm-ig, -1,94 mm-től -2,06 mm-ig, illetve -2,3 mm-től -2,54 mm-ig volt.

A metszetek digitalizálása a LaserSharp program segítségével történt, amely a következő paraméterekkel futott: felbontás: 512x512 pixel, *z-steps*: 0,6 mikrométer, objektív: VCPlan 60x, olajimmerziós. A flurokrómok kimutatására a következő lézernyalábokat és szűrőket használtuk: az Alexa-t 488 nm-es, a CY3-at 543 nm-es hullámhosszúságú lézerrel mutattunk ki, a dikroikus/emissziós filterek paraméterei a következők voltak: Alexa 488-ra 560 nm/500–540 nm, CY3-ra 650 nm/560-610 nm. A piros és a zöld csatornák elkülönítve kerültek beolvasásra, ezek egyesítése, illetve a KP sejteken appozíciót képző GnRH neuronok boutonjainak kvantifikálása az ImageJ program segítségével történt (RF). A kvantifikált adatokból statisztikát készítettünk, átlagot és standard hibáját számoltunk, egyenlő szórásnégyzeteknél kétmintás t-próbát végeztünk (SZA).

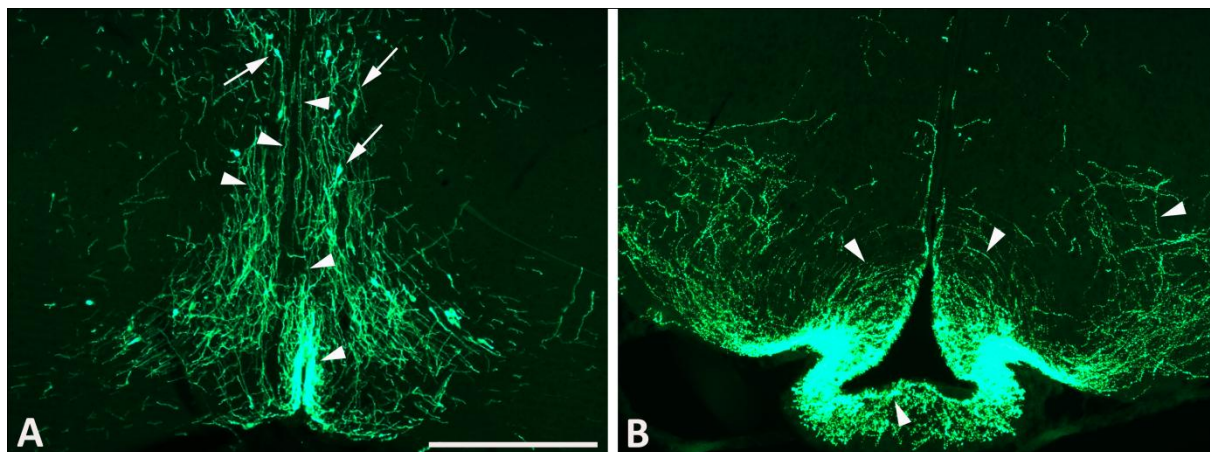
Eredmények

Kísérleteink során kettős immunfluoreszcens jelöléssel, valamint elektronmikroszkópos eljárásokkal térképeztük fel a GnRH-immunreaktív (GnRH-IR) rostok és a legjelentősebb KP-IR neuronpopulációkat tartalmazó agyi régiók anatómiai kapcsolatát.

A korábbi tanulmányokat (King és mtsai, 1984) megerősítve a konfokális lézer mikroszkópos elemzéseink eredményeként elmondhatjuk, hogy a GnRH-IR neuronok axonális vetülést mutatnak a preoptikus área, illetve a mediobazális hipotalamusz területére. Vizsgálatunk szempontjából ezek a régiók kiemelkedő jelentőségűek, mivel mindkettő tartalmaz KP-t expresszáló neuronokat. A vizsgált két terület ösztrogén szabályozása, valamint KP expressziója eltérően működik: míg a preoptikus régióban ösztrogénkezelés következtében KP *up*-reguláció tapasztalható, addig az Arc esetében ösztrogénbevitel hatására a KP expressziója jelentősen csökken.

A fent említettek miatt a két régió KP populációinak összehasonlíthatósága érdekében eltérő modelleket alkalmaztunk. Korábbi kutatások alapján az ösztrogén GnRH neuronokra gyakorolt pozitív hatását a preoptikus área KP sejtjein keresztül fejtí ki, így a RP3V área neuronjainak vizsgálatára ovariectomizált és ösztrogénkezelt nőstény egereket használtunk. Az Arc-ban lokalizált KP sejtek a negatív *feedback* mediátorai, így morfológiájuk tanulmányozására ovariectomizált és olajkezelt nőstény egereket használtunk. A kísérleti állatokon alkalmazott kolchicinkezeléssel maximalizáltuk a neuropeptidek immunreaktivitását, a gátolt axonális transzport a sejtestek jobb láthatóságának kedvezett. Az egerek perfúziója eltérő napszakokban (délelőtt és délután) történt, ezzel biztosítottuk, hogy az ösztrogén szempontjából pozitív, illetve negatív visszacsatolásos modelleket is kapjunk.

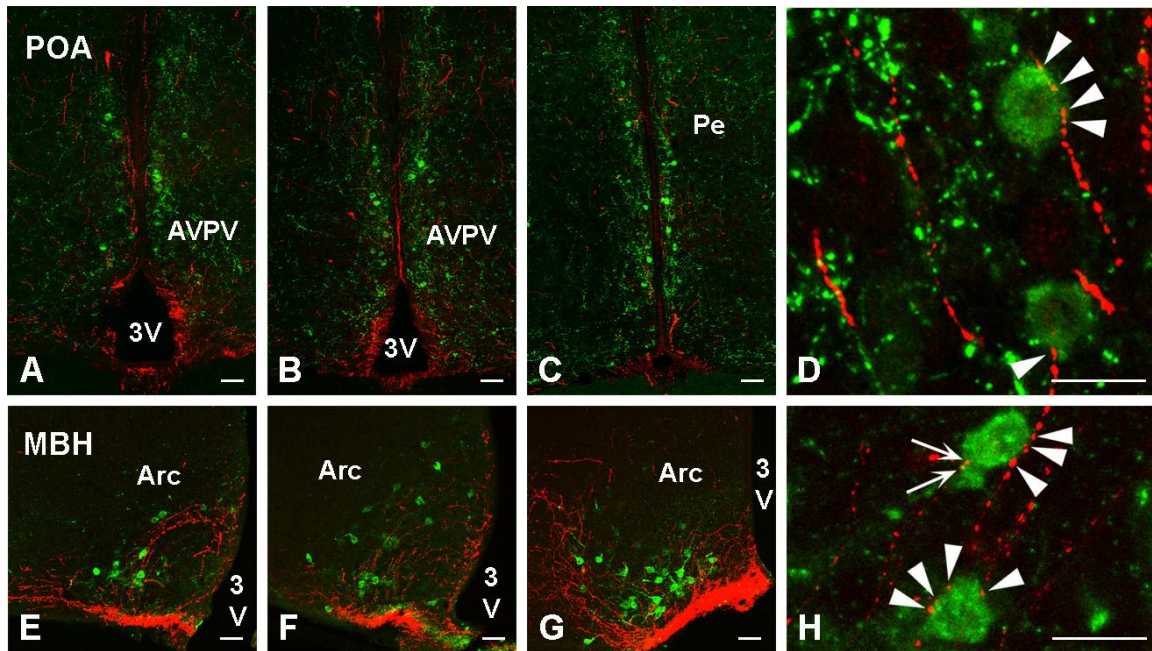
Munkacsoportunk egy korábbi, kétszeresen jelölt GnRH-KP immunfluoreszcens festésén *guinea-pig* anti-GnRH-val jelölt és Alexa 488-cal vizualizált sejtesteket és rostokat találtunk (5. ábra) jellegzetes elrendeződésben. Jelen kísérleteink ugyanezt a mintázatot támasztják alá. A kettős immunfluoreszcens jelöléssel ellátott KP neuronok és GnRH rostok konfokális mikroszkópos vizsgálata során a RP3V területén olyan KP-IR sejteket találtunk, amelyek a GnRH-IR rostkötegeken belül helyezkedtek el. E rostok nagy része a harmadik agykamra endimális rétegéhez közel futott, ahol a legmediálisabb KP neuronok találhatóak. Az Arc régiójában olyan GnRH rostok körül találtunk KP sejteket, amelyek a harmadik agykamrától laterális irányban ívelnek, majd sűrű ventrális köteget képeznek az eminentia mediana felé.



5. ábra Fluoreszcens mikroszkóppal fotózott részlet a preopikus área (A), illetve az Arc (B) GnRH rostjairól. Utóbbi felvételen az eminentia mediana felé sűrű kötegben húzódnak a GnRH rostok a hipotalamusz bazális részén. Nyilak: GnRH sejtestek, nyílhegyek: a harmadik agykamra mentén futó (A), illetve a kamrától laterális irányban ívelő, az eminentia mediana területén masszív kötegeket képző (B) GnRH rostok. Lépték: 1000 μ m. Saját felvételek.

A fent ismertetett eredmények alapján a metszetek kettős immunfluoreszcens jelölést követően konfokális mikroszkópos elemzésre kerültek, amely során megállapítottuk, hogy a GnRH és a KP sejtek morfológiai kapcsolatokat alakítanak ki.

A konfokális mikroszkópos vizsgálat során KP-IR neuronok perikarionján, illetve proximális dendritjén mind a RP3V, mind az Arc területén találtunk GnRH-IR axonvarikozitásokat. Ehhez szekvenciálisan szkennelt metszetekről készült fotósorozatokon végeztünk számolásokat. A GnRH neuronok rostátmetszetei közül azt tekintettük appozíciót kialakítónak, amely legalább két síkon látható volt, illetve, amely esetében találtunk legalább egy olyan síkot, ahol az axonterminális és a KP neuron között szemmel láthatóan nem volt rés (*gap*), azaz a GnRH nagy valószínűséggel közvetlen kapcsolatot alakított ki a KP neuronnal. A 6. ábrán két reprezentatív koronális metszeten szemléltetjük festéseink eredményét.

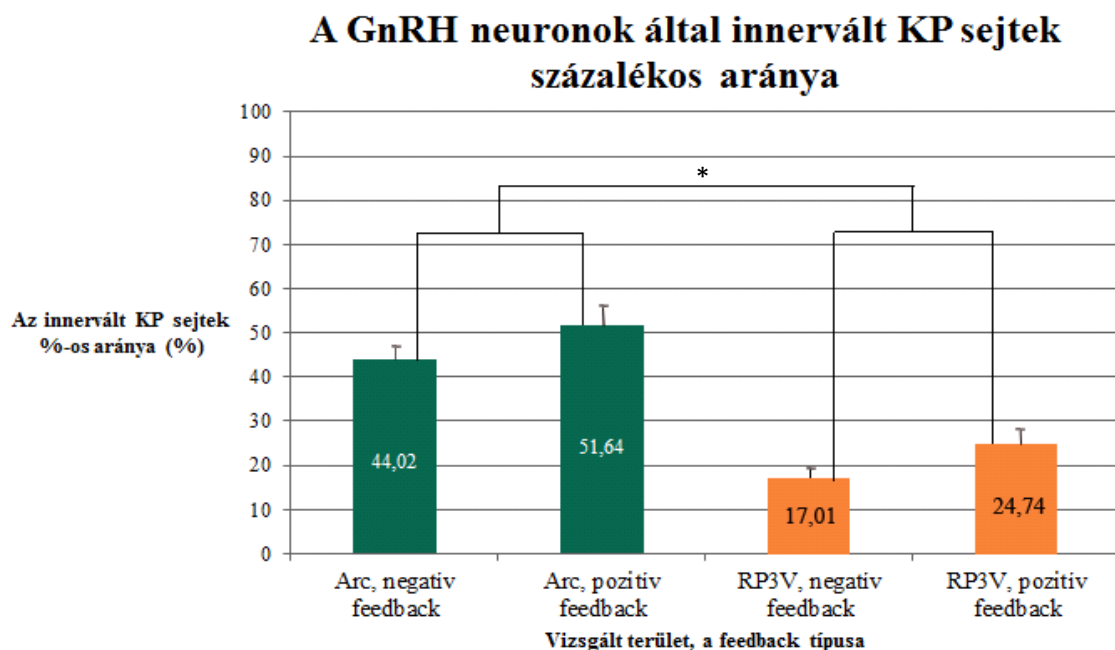


6. ábra: Immunhisztokémiai kettős jelölés gonadotropin-relasing hormonra (GnRH, piros) és kisszeptinre (KP, zöld) egéragy koronális metszeteiből. A-C: preoptikus área, E-G: mediobazális hipotalamusz. KP-immunreaktív sejtestek található az anterovetrális periventrikuláris mag (AVPV), a periventrikuláris mag (Pe), illetve az arcuatus mag (Arc) területén. A nagyobb felbontású fotókon jól látszanak a GnRH neuronok axonjai által kialakított appozíciók (nyílhegyek) a POA területén (D), valamint az Arc területén (H) található KP neuronokkal. Skála: 50 μ m (A-C, E-G), 20 μ m (D, H) Rövidítések: POA: preoptikus área, AVPV: anteroventrális periventrikuláris mag, 3V: harmadik agykamra, Pe: periventrikuláris mag, MBH: mediobazális hipotalamusz. Saját felvételek.

Az appozíciók kvantifikálása alapján megállapíthatjuk, hogy a kapcsolatok százalékos arányában szignifikáns eltérés volt. A RP3V régiójában a KP-IR neuronok átlagosan körülbelül 20%-án, míg az Arc területén a sejtek közel felén tapasztaltunk GnRH axonvarikozitásokat. Ezzel szemben a negatív és a pozitív *feedback* periódusban perfundált állatok ugyanilyen értékei között a különbség nem szignifikáns (1. táblázat, 7. ábra).

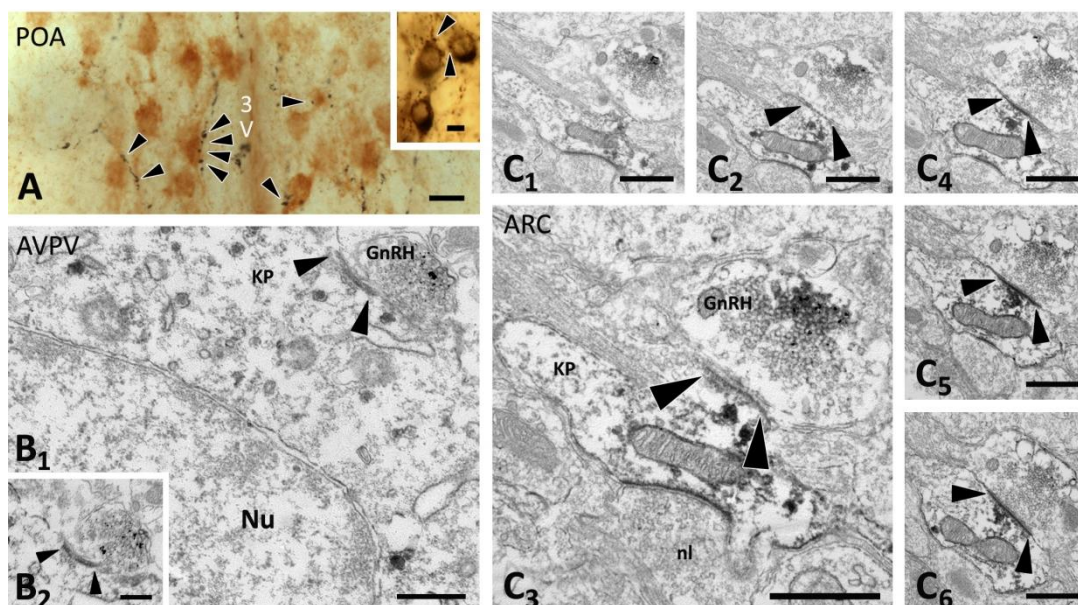
	RP3V		Arc	
	negatív feedback fázis	pozitív feedback fázis	negatív feedback fázis	pozitív feedback fázis
A KP-IR neuronok kapcsolatának százalékos aránya GnRH-IR boutonokkal (%)	17,02 ± 1,83	24,74 ± 3,26	44,02 ± 2,96 *	51,64 ± 3,90 *
A GnRH-IR boutonok átlagos száma innervált KP neurononként	2,57 ± 0,48	3,05 ± 0,30	3,12 ± 0,32	3,42 ± 0,35

1. táblázat: A KP-IR neuronok kapcsolatának százalékos aránya ($\pm$ standard hibaráta) GnRH-IR axonvarikozitásokkal, illetve GnRH-IR boutonok átlagos száma innervált KP neurononként a rostrális periventrikuláris területen (RP3V) illetve az arcuatus mag (Arc) régiójában. Az állatok perfúziója eltérő időpontokban történt: 11-12 óra között (ösztrogén negatív-*feedback* fázis), valamint 16-17 óra között (ösztrogén pozitív-*feedback* fázis)
*: az adott időintervallumban kapott értékek közül az Arc-ban szignifikáns ($p < 0,003$) különbséget tapasztalunk a RP3V ugyanilyen értékeihez képest.



7. ábra: Az innervált KP sejtek %-os aránya a RP3V és Arc területén (standard hibaráttával, *: $p < 0,003$, $n=20$)

A konfokális elemzések által kimutatott gyakori GnRH-appozíciók a KP-IR neuronokon további elektronmikroszkópos vizsgálatokra adtak lehetőséget. A beágyazott mintákat két különböző elektrondenz markerrel (diaminobenzidin, DAB és arany-ezüst impregnált nikkel-DAB) jelöltük meg, amelyekkel a kapcsolatok kimutathatóvá és azonosíthatóvá váltak. A sorozat ultravékony metszeteken valódi szinapszisokat detektáltunk, amelyek típusa axo-szomatikus, illetve axo-dendritikus (8. ábra). Mind a RP3V, mind az Arc területén aszimmetrikus szinapszisokat találtunk. A szinapszisok aszimmetrikus típusából adódóan feltételezhetjük, hogy a KP sejteket innerváló GnRH axonok serkentő neurotranszmittert is tartalmaznak.



8. ábra: Kisspeptin immunreaktív (KP-IR) neuronok és GnRH-IR axonok, amelyek vizualizálása barna reakciótermékű diaminobenzidinnel (DAB – közepesen elektrondenz), illetve arany-ezüst kezelést követő nikkel-DAB-os intenzitásnöveléssel (erősen elektrondenz) történt (A). Az appozíciók egy részét *bright-field* körülmények között detektáltuk (A ábrán belüli kis kép). Az elektronmikroszkóppal detektált szinapszisok aszimmetrikusak voltak. A RP3V területéről axo-szomatikus kapcsolatokat (B1, B2), míg az Arc területéről axo-dendritikus szinapszisokat (C1-C6) mutattunk ki (nyílhegyek). Lépték: 20µm (A), 10µm (kis kép az A-n belül), 500nm (B1, C1-C6), 250nm (B2). Rövidítések: POA: preoptikus área, ARC: arcuatus mag, KP: kisspeptin, Nu: sejtmag, GnRH: gonadotropin-releasing hormon, 3V: harmadik agykamra. Bardóczi Zsuzsanna felvételei.

Diszkusszió

Korábban már kimutatták, hogy a szaporodás centrális szabályozásában kiemelkedő szerepet játszó GnRH neuronok számos rostot küldenek a hipotalamusz területére (Merchenthaler és mtsai, 1984). Ismert, hogy a gonádok hormonjai, így az ösztrogén is nagy jelentőséggel bír a GnRH neuronok szabályozásában. Az ösztrogén pozitív és negatív *feedback* mechanizmussal is képes visszahatni a HHG-tengely működésére, így a GnRH és más neuronokon keresztül végül önmaga elválasztására hat. A GnRH sejtek azonban nem, vagy csak elenyésző mennyiségben expresszálnak a hatás továbbításában nélkülözhetetlen ösztrogénreceptorokat. Az ösztrogén hatása a gonadotropin releasing hormont termelő neuronokra tehát nagyrészt indirekt, azaz más közvetítő sejteken keresztül valósul meg.

Korábbi kutatásokból ismert, hogy a KP hat a GnRH neuronokra, valamint expresszálja az alfa típusú ösztrogénreceptort (Pielecka-Fortuna, 2008). Az ösztrogénhatás tehát a KP-ben megtalálható nukleáris α -típusú ösztrogénreceptorokon keresztül valósul meg (Mitchell és mtsai, 2003).

A GnRH targetjei között szerepelnek a preoptikus áréában és az Arc-ban megtalálható olyan neuronok, amelyek szintén expresszálnak $ER\alpha$ -t (Franceschini és mtsai, 2006). E megfigyelések alapján merült fel annak a gondolata, hogy a KP általi GnRH-szabályozás mellett a GnRH rostok is befolyásolhatják a KP neuronok működését. Kísérleteink során ezért azt vizsgáltuk, hogy a GnRH axonterminálisai létrehozna-e anatómiai kapcsolatokat KP neuronokkal. Ezzel ugyanis egy kétirányú, visszacsatolós mechanizmus valósulna meg a GnRH és a KP neuronok között, amely a GnRH önszabályozás egy újabb szintjének megjelenését jelentené. Immunhisztokémiai módszerrel, konfokális és elektronmikroszkópos szinten tanulmányoztuk a GnRH-KP rendszert, vizsgálataink eredményeként a KP sejtek felszínén GnRH axonvarikozitásokat mutattunk ki, tehát morfológiai kapcsolatot mutattunk ki a két általunk tanulmányozott területen.

A RP3V területén található KP neuronok direkt *input*ot küldenek a GnRH neuronokra (Clarkson, 2006, Kalló 2012). Jelen kutatásunk során immunhisztokémiai módszerekkel ugyanakkor GnRH axonterminálisokat találtunk a régió KP neuronjain. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy reciprok kapcsolat áll fenn a két rendszer között. Azaz feltételezhető, hogy a GnRH közvetlenül befolyásolja a pozitív *feedback* szabályozásban részt vevő RP3V KP neuronjait.

Vizsgálataink során az Arc területén található KP neuronokon szintén találtunk GnRH szinaptikus bemeneteket. A kétirányú kapcsolat megnyilvánulása a két vizsgált neuronpopulációban lehetőséget ad egy GnRH önszabályozó kör kialakulására.

A RP3V área és az Arc területén található GnRH-KP kapcsolatok kvantitatív jellemzésének érdekében a konfokális lézermikroszkópos vizsgálat eredményeként kapott felvételeken számolásokat végeztünk. A mennyiségi elemzés alapján szignifikáns különbség mutatkozott a két terület GnRH-IR rostok által innervált KP neuronjainak százalékos arányában. Míg a RP3V területén a GnRH-IR axonok a KP neuronok ötödén, addig az Arc-ban a KP sejtek mintegy felén képeznek varikozításokat. A kvantitatív elemzés eredményét annak fényében kell értékelnünk, hogy a kolchicinkezelés egyrészt növelte a KP sejtek szomatodendritikus részének kimutathatóságát, ugyanakkor elképzelhető, hogy a GnRH neuronokét az axonterminálisokban csökkentette. Továbbá a hormonális státuszt az adott régióban a KP kimutathatóságának növelésére optimalizáltuk – tehát eltérő modellekben kvantifikáltuk.

Mivel a szinaptikus varikozítások méretükben és alakjukban nem különböznek a nem szinaptikus varikozításoktól, a valódi szinapszis kiépülése mellett fennállhat a nem szinaptikus interneuronális kapcsolat lehetősége is. Ekkor az átvivőanyag képes viszonylag nagy távolságra diffundálni. A kapcsolat helyén tehát érvényesülhet peptidhatás (GnRH vagy más együttesen termelt peptid, például galanin), de szerepet játszhatnak a klasszikus transzmitterek is. Annak kiderítése érdekében, hogy a KP sejtek felszínén detektált GnRH axonvarikozítások által kialakított kapcsolatok szinaptikus vagy nem-szinaptikus jellegűek, elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk. Az elemzés során valódi, axo-szomatikus és axo-dendritikus szinapszisokat mutattunk ki. Mindkét vizsgált régióban aszimmetrikus szinaptikus kapcsolatokat detektáltunk, amely tulajdonság a szinapszisok serkentő jellegére utal. Ezt megerősíti az a korábbi megfigyelés, hogy a GnRH sejtek és axonok többsége kettes típusú vezikuláris glutamát transzporter (VGLUT-2) immunreaktív (Hrabovszky és mtsai, 2006). Ezek alapján valószínű, hogy a KP-t innerváló GnRH axonok serkentő neurotranszmittert is tartalmaznak.

A GnRH KP működését fokozó hatásának bizonyítására a jövőben elektrofiziológiai (*in vitro*, *whole cell patch-clamp*, illetve *loose patch*) módszerekkel tervezzük megvizsgálni, hogy a GnRH peptid miként befolyásolja a KP sejtek membránpotenciálját, posztzinaptikus áramait és tüzelési frekvenciáját. A hatás direkt jellegét specifikus antagonisták (pl. a GnRH receptor antagonista Antide) alkalmazásával, illetve a szinaptikus *input* felfüggesztésére

alkalmas nátriumcsatorna-blokkoló tetrodotoxin és/vagy GABA, glutamát receptor antagonisták jelenlétében szeretnénk vizsgálni és bizonyítani.

A szaporodás centrális szabályozási rendszerének hibája számos kórképpel rendelkezik. Ezek közül az egyik a hipogonadotróp hipogonadizmus, amely terméketlenséget eredményez. Ez a betegség egyes esetekben GnRH adásával helyrehozható. Amennyiben azonban ez a kezelés eredménytelennek bizonyul, a kór kialakulása nagy valószínűséggel a kisspeptin rendszer genetikai/funkcionális hibájára vezethető vissza (Ratnasabapathy és mtsai, 2012). Ha tisztázzuk a kisspeptin szerepét az LH-pulzusgenerálásban, illetve megismerjük a GnRH-surge működését a szaporodás centrális szabályozásában, képesek lehetünk olyan genetikai kórképek kezelésére, mint a hipogonadotróp hipogonadizmus. A morfológiai és elektrofiziológiai vizsgálatok mellett ezért a GnRH neuronok által termelt neuropeptidek/neurotranszmitterek pulzus- és surge generátor funkciójára gyakorolt hatásának feltárása is szükséges.

Összefoglaló

A gonadotropin releasing hormon (GnRH) neuronok alapvető szerepet játszanak a szaporodás centrális regulációjában, a hipotalamusz fő kimeneteli jeleként részt vesznek a hipotalamo-hipofizeo-gonádális tengely kialakításában. A GnRH sejtek működésére a harmadik agykamra körül, a rostrális periventrikuláris areában (RP3V), illetve az arcuatus mag (Arc) területén elhelyezkedő kisspeptin (KP) neuronok közvetlen és közvetett, ösztrogén-mediált hatást is gyakorolnak.

A KP sejtek GnRH neuronokra kifejtett hatása jól ismert, ugyanakkor az egyelőre kevésbé tanulmányozott, hogy a GnRH sejtek képesek-e befolyásolni a RP3V és Arc neuronok működését. Kísérleteinkben ezért azt vizsgáltuk, hogy létezik-e egyfajta visszacsatolás a GnRH neuronok felől az őket beidegző KP sejtekre. Ez fontos önszabályozó kört jelenthetne a GnRH működésében.

Vizsgálatainkat 50 napos CD1 nőtény egereken végeztük, amelyekből kezelt és kontroll csoportokat hoztunk létre. A kísérleti állatokon ovariectómiát hajtottunk végre, majd a kezelt csoportba ösztrogén-, a kontroll csoportba olajtartalmú kapszulát ültettünk be. Három nap elteltével az egereken kolhicinkezelést hajtottunk végre, majd az ösztrogén pozitív, illetve negatív *feedback* fázisában az állatokat perfundáltuk. Az eltávolított agyakat fagyasztó mikrotómmal, illetve vibratómmal 30 µm-enként lemetszettük.

Az ösztrogénkezelt agyak RP3V régiójából, illetve az olajkezelt agyak Arc-ából kiválasztott metszeteket kettős immunfluoreszcens jellel láttuk el és fluoreszcens festékekkel tettük láthatóvá.

Konfokális lézer mikroszkópos elemzéssel immunreaktív GnRH nyúlványokat mutattunk ki mind az Arc, mind a RP3V területén, ahol e nyúlványok a KP sejtek felszínén varikozitásokat képeztek. A kapcsolatokat kvantifikálása során megállapítottuk, hogy a RP3V régióban a KP sejtek 20%-án, míg az Arc-ban a sejtek közel felén találhatók GnRH axonvarikozitások. A kapcsolatok jellegének tanulmányozása céljából a metszeteinket elektronmikroszkópos vizsgálatra készítettük elő, amely során valódi, aszimmetrikus szinapszisokat detektáltunk, ebből a szinapszisok serkentő jellegére következtettünk.

Eredményeink alapján a GnRH neuronok mindkét régióban közvetlenül befolyásolják a KP sejtek működését, tehát köztük reciprok kapcsolat áll fenn, ami valószínűleg serkentő hatású. Ennek bizonyítására további elektrofiziológiai vizsgálatokat tervezünk.

Summary

The gonadotrophin releasing hormone (GnRH) neurons play an essential role in the central regulation of reproduction. By producing the main output signal of the hypothalamus, they participate in the formation of the hypothalamo-hypophyseal-gonadal axis. The kisspeptin (KP) neurons located in the rostral periventricular area (RP3V) and in the arcuate nucleus (Arc) affect the GnRH neurons both directly and indirectly in an estrogen-mediated way.

The effect of kisspeptin on GnRH neurons is well-studied. In contrast, little is known whether the GnRH neurons themselves can affect the function of the RP3V and Arc cells. Therefore, we aimed to investigate a potential feedback mechanism from the GnRH neurones to the KP cells, which would complete a self-regulatory circuit important for controlling GnRH secretion.

Our studies were carried out on 50 day-old female mice. Animals were ovariectomised, separated into groups by implanting half of the animals with estradiol or sunflower oil-containing capsules. After three days, the mice were colchicine-treated and transcardial perfusion was carried out during either oestrogen's positive or negative feedback phase. After removal of the brain, 30 μ m sections were cut using either a vibratome or a freezing microtome.

Immunohistochemical double-labelling for GnRH and KP were carried out on sections containing the RP3V region of the estrogen-treated mice and the Arc region of the oil-treated animals.

By using confocal laser microscopy, we detected immunoreactive GnRH axonal projections in both RP3V and Arc regions, where they established varicosities in apposition to KP soma and/or dendrites. Quantification of the appositions revealed that nearly 20 percent in the RP3V and 50 percent in the Arc of the KP neurons are contacted by GnRH axonvaricosities. The nature of these connections were further studied at the electron microscopic level. This revealed exclusively asymmetric synapses suggesting an excitatory influence of GnRH neurons on KP cells in both regions.

These morphological results support our hypothesis that the GnRH neurones affect the function of the KP cells in both regions. Demonstration of reciprocal connections between individual GnRH and KP neurons, as well as the effect of neurotransmitters/neuropeptides released by the GnRH neurons on KP cells require further electrophysiological studies.

Irodalomjegyzék

1. Christian CA, Moenter SM. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocrine Reviews*. 2010; 31:544-577.
2. Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 2006; 147(12): 5817-25.
3. Everett JW, Sawyer CH. A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology*. 1950; 47: 198-218.
4. Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett*. 2006; 401(3): 225-30.
5. Froy O, The circadian clock and metabolism. *Clinical Science*. 2011; 20: 65–72.
6. Gillespie JMA, Chan BPK, Roy D, Cai F, Belsham DD. Expression of Circadian Rhythm Genes in Gonadotropin-Releasing Hormone-Secreting GT1-7 Neurons. *Endocrinology*. 2003; 144(12): 5285–5292.
7. Herbison AE, Moenter SM. Depolarising and hyperpolarising actions of GABA_A receptor activation on Gonadotrophin-releasing hormone neurones: Towards an emerging consensus. *Journal of Neuroendocrinology*. 2011; 23:557–569.
8. Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszán T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL. Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology*. 2000; 141(9):3506-9.
9. Hrabovszky E, Steinhäuser A, Barabás K, Shughrue PJ, Petersen SL, Merchenthaler I, Liposits Z. Estrogen receptor-beta immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology*. 2001; 142(7):3261-4.
10. Hrabovszky E, Kalló I, Turi GF, May K, Wittmann G, Fekete C, Liposits Z. Expression of vesicular glutamate transporter-2 in gonadotrope and thyrotrope cells of the rat pituitary. Regulation by estrogen and thyroid hormone status. *Endocrinology*. 2006; 147(8):3818-25.
11. Kallo I, Butler JA, Barkovics-Kallo M, Goubillon ML, Coen CW. Oestrogen receptor beta-immunoreactivity in gonadotropin releasing hormone-expressing neurones: regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol*. 2001; 13(9): 741-8.

12. Kallo I, Vida B, Deli L, Molnar CS, Hrabovszky E, Caraty A, Ciofi P, Coen CW, Liposits Z. Co-localisation of kisspeptin with galanin or neurokinin B in afferents to mouse GnRH neurones. *J Neuroendocrinol.* 2012; 24(3): 464-76.
13. King JC, Anthony EL. LHRH neurons and their projections in humans and other mammals: species comparisons. *Peptides.* 1984; 5 Suppl 1195-207.
14. Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H, Maeda K. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology.* 2005; 146(10): 4431-6.
15. Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden J, Le Poul E, Brezillon E, Tyldesley S, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart K, Parmentier M. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G Protein-coupled receptor GPR54. *The Journal of Biological Chemistry.* 2001; 276(37): 34631-6.
16. Legan SJ, Karsch FJ. A daily signal for the LH surge in the rat. *Endocrinology.* 1975; 96: 57-62.
17. Li XF, Kinsey-Jones JS, Cheng Y, Knox AM, Lin Y, Petrou NA, Roseweir A, Lightman SL, Milligan SR, Millar RP, O'Byrne KT. Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat. *PLoS One.* 2009; 4(12): e8334.
18. Magyar K, Vizi ESz. A neurokémia alapjai. Medicina könyvkiadó, Budapest, 1987.
19. Mayer C, Acosta-Martinez M, Dubois SL, Wolfe A, Radovick S, Boehm U, Levine JE. Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor alpha-signaling in kisspeptin neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107(52):22693-8.
20. Merchenthaler I, Gorcs T, Setalo G, Petrusz P, Flerko B. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain. *Cell Tissue Res.* 1984; 237(1): 15-29.
21. Meyer-Bernstein EL, Jetton AE, Matsumoto SI, Markuns JF, Lehman MN, Bittman EL. Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology.* 1999; 140: 207-218.
22. Mikkelsen JD, Simonneaux V. The neuroanatomy of the kisspeptin system in the mammalian brain. *Peptides.* 2009; 30(1): 26-33.
23. Mitchell V, Loyens A, Spergel DJ, Flactif M, Poulain P, Tramu G, Beauvillain JC. A confocal microscopic study of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron inputs

to dopaminergic neurons containing estrogen receptor alpha in the arcuate nucleus of GnRH-green fluorescent protein transgenic mice. *Neuroendocrinology*. 2003; 77(3): 198-207.

24. Pielecka-Fortuna J, Chu Z, Moenter SM. Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. *Endocrinology*. 2008; 149(4): 1979-86.
25. Ratnasabapathy R, Dhillon WS. The effects of kisspeptin in human reproductive function - therapeutic implications. *Curr Drug Targets*. 2012.
26. Roa J, Navarro VM, Tena-Sempere M. Kisspeptins in reproductive biology: Consensus knowledge and recent developments. *Biology of reproduction*. 2011; 85(4):650-60.
27. Roy D, Angelini NL, Belsham DD. Estrogen directly represses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in estrogen receptor-alpha (ERalpha)- and ERbeta-expressing GT1-7 GnRH neurons. *Endocrinology*. 1999; 140(11):5045-53.
28. Schibler U, Ripperger J, Brown SA. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J. Biol. Rhythms* 2003; 18: 250–260.
29. Seong JY, Kang SS, Kam K, Han YG, Kwon HB, Ryu K, Kim K. Differential regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor expression in the posterior mediobasal hypothalamus by steroid hormones: implication of GnRH neuronal activity. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998; 53(1-2): 226-35.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnénk megköszönni Dr. Kalló Imrének, hogy TDK dolgozatunkat az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetének Endokrin Neurobiológia Kutatócsoportjában írhattuk. Köszönjük a dolgozat megírása során nyújtott segítségét, javaslatait. Hálával tartozunk továbbá Dr. Vida Barbarának a konfokális lézer mikroszkópos, Bardóczi Zsuzsannának az elektronmikroszkópos vizsgálatainknál nyújtott segítségéért. Köszönetet érdemel László Barna, aki a műtéti beavatkozások módszertanába vezetett be minket.

Nyilatkozat

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Szilvász-Szabó Anett

Alulírott Szilvász-Szabó Anett nyilatkozom, hogy a dolgozatban bemutatott munkafolyamatok közül a következőket végeztem el:

1. Kísérleti állataimon mélyaltatásban ösztrogénkezelést hajtottam végre, amelyhez elsőként ovariectomiát végeztem, majd általam gyártott ösztrogénkapszulákat ültettem be szubkután.
2. Kolchicinkezelést végeztem, majd a perfundált állatok agyát cukorkezelést követően fagyasztó mikrotómmal metszettem.
3. Kettős immunfluoreszcens jelölést alkalmaztam a kisszeptint tartalmazó agyi régiókon, amelyek ezután konfokális mikroszkópos vizsgálatra kerültek.
4. A GnRH-kisszeptin morfológiai kapcsolatokra vonatkozó kvantifikált adatokat kiértékeltem, egyenlő szórásnégyzeteknél kétmintás t-próbát végeztem, amely alapján megállapítottam, hogy eredményeink szignifikánsak-e.

.....

Szilvász-Szabó Anett

Rabi Fruzsina

Alulírott Rabi Fruzsina nyilatkozom, hogy a dolgozatban bemutatott munkafolyamatok közül a következőket végeztem el:

1. Kísérleti állataimból kontroll csoportot hoztam létre, amelyhez elsőként mélyaltatásban ovariektómiát végeztem, majd általam gyártott olajkapszulákat ültettem be szubkután.
2. A kolchicinkezelt állatokat perfundáltam, agyukat utófixálást követően vibratómmal metszettem, a metszeteket előkészítettem és megfestettem későbbi elektronmikroszkópos vizsgálat céljából.
3. Konfokális lézer mikroszkóppal vizsgáltam a metszeteket és detektáltam, hogy a GnRH neuronok vetülnek a kisspeptint tartalmazó arcuatus mag és rostrális periventrikuláris área területére.
4. A szkennelt régiókban ImageJ program segítségével megszámoltam a kisspeptin sejtekkel szinapszist képező GnRH rostokat.

.....

Rabi Fruzsina

Budapest, 2013. január 9.