

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

BIOLÓGIAI INTÉZET

Krónikus pszichés stressz indukálta metabolikus változásokat kísérő mikroglia aktiváció vizsgálata egér hipotalamuszban

Készítette: Horváth Krisztina

Témavezető:

Dr. Kovács Krisztina

Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

Molekuláris Neuroendokrinológia Kutatócsoport, Tudományos tanácsadó

Társtémavezető:

Winkler Zsuzsanna

Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

Molekuláris Neuroendokrinológia Kutatócsoport, Kutató

Belső konzulens:

Csonka Diána

Állatorvostudományi Egyetem, Biológiai Intézet, Tudományos segédmunkatárs

Budapest, 2017

Tartalomjegyzék

	Oldal
1. Rövidítések jegyzéke.....	5
2. Bevezetés.....	6
2.1. Nucleus arcuatus, az agy egyik fő energia szenzora.....	7
2.2. Paraventriculáris mag és a stressz-tengely.....	8
2.3. Mikroglia sejtek szerepe	8
2.4. Fraktalkin és receptora	10
2.5. Krónikus stressz modellek állatokon	11
3. Célkitűzés	11
4. Anyag és módszer.....	12
4.1. Kísérleti állatok és kísérleti elrendezés	12
4.2. Krónikus variábilis stressz (CVS) procedúra során alkalmazott stresszorok.....	13
4.2.1. Dőlt ketrec	13
4.2.2. Megvilágítási periódus megváltoztatása.....	13
4.2.3. Erőltetett úsztatás.....	13
4.2.4. Szociális vereség.....	14
4.2.5. Predátor szag elkerülés	14
4.2.6. Elektromos sokk	14
4.2.7. Víz elkerülés	14
4.2.8. A szabad mozgás korlátozása	14
4.2.9. Egyéb alkalmazott stresszorok	15
4.3. Metabolikus vizsgálatok.....	16
4.4. Testtömeg mérés	17

4.5. Perfúzió és szövetfeldolgozás	17
4.6. Kortikoszteron plazma koncentráció mérése	17
4.7. Agyszövet feldolgozása	17
4.7.1. Iba-1 immunhisztokémia	17
4.7.1.1. Indirekt módszer.....	17
4.7.1.2. Direkt módszer	18
4.8. Iba-1 pozitív sejtek analízise	18
4.9. Statisztika	18
5. Eredmények.....	19
5.1. Krónikus stressz hatása a kísérleti állatok testtömegére	19
5.2. A mellékvese tömegének és a kortikoszteron plazmaszintjének változása krónikus variábilis stressz hatására	19
5.3. Metabolikus eredmények	20
5.3.1. Az állatok testtömeg- és testösszetétel változásai a metabolikus mérések alatt	20
5.3.2. Lokomotoros aktivitás	21
5.3.3. Táplálékfelvétel	21
5.3.4. Energia felhasználás	22
5.3.5. Légzési hányados.....	23
5.4. A fluoreszcensen festett Iba-1 pozitív mikroglia sejtek kvantitatív elemzése nucleus arcuatusban.....	25
5.5. DAB-al előhívott Iba-1 pozitív mikroglia sejtek kvantitatív elemzése nucleus arcuatusban	26
5.6. DAB-al előhívott Iba-1 pozitív mikroglia sejtek kvantitatív elemzése paraventriculáris magban	28

6. Megbeszélés/Következtetések	30
6.1. A krónikus stressz hatása a táplálékfelvételre és az energia metabolizmusra ...	30
6.2. Mikroglia aktiváció a nucleus arcuatusban és a paraventriculáris magban	33
7. Összefoglalás	35
8. Summary.....	36
9. Irodalomjegyzék	37
10. Köszönetnyilvánítás	40
11. Szerzői jogi nyilatkozat	41
12. Témavezetői nyilatkozat.....	43
13. Társtémavezetői nyilatkozat	44
14. Belső konzulensi nyilatkozat	45

1. Rövidítések jegyzéke

ABC (avidin biotin complex) – avidin biotin komplex

ADAM 10/17 (A Disintegrin And Metalloproteinase) – proteolitikus enzim

AGRP (agouti-related protein) – agouti-szerű fehérje

ARC (nucleus arcuatus) – arcuatus mag

CART (cocaine and amphetamine regulated transcript) – kokain és amfetamin által szabályzott transzkriptum

CD11b, CD22, CD45, CD68, CD200 (cluster of differentiation) – sejtfelszíni markerek

CRH (corticotropin-releasing hormone) – kortikotropint felszabadító hormon

CX3CL1 (fractalkine) – fraktalkin

CX3CR1 (fractalkine receptor) – fraktalkin receptor

CX3CR1^{-/-}; Cx^{-/-} – fraktalkin receptor deficiens

CVS (chronic variable stress) – krónikus variábilis stressz

DAB (3,3'-diaminobenzidine) – 3,3'-diaminobenzidin

GFP (green fluorescens protein) – zöld fluoreszcens protein

HPA (hypothalamo–pituitary–adrenal) – hipotalamo-hipofízis-mellékvesekéreg

Iba-1 (ionized calcium-binding adapter) – ionizált kalcium-kötő adapter molekula

IL-1b, IL-4, IL-12, IL-10, IL-13 (interleukin) – interleukinok

KPBS (potassium phosphate buffered saline) – kálium-foszfát puffer

MRI (magnetic resonance imaging) – mágneses magrezonancia képalkotás

NGS (normal goat serum) – normál kecske szérum

NO (nitric oxide) – nitrogén-monoxid

NPY (Y-neuropeptid) – neuropeptid Y

PBS (phosphate-buffered saline) – foszfát pufferelt sóoldat

POMC (proopiomelanocortin) – proopiomelanokortin

PVH (paraventricular nucleus) – a hipotalamusz paraventrikuláris magja

RER (respiratory exchange ratio) – légzési hányados

ROS (reactive oxygen species) – reaktív oxigén gyök

TNF α (tumor necrosis factor- α) – tumor nekrozis faktor alfa

WT (wild type) – C57Bl6 (Bl6), vad típusú egyedek

2. Bevezetés

A modernizáció következtében felgyorsult élet, a bizonytalanná váló élethelyzetek és a fokozott pszichés megterhelés miatt egyre inkább ki vagyunk téve a minket körülvevő és alkalmazkodásra készítő ingereknek, a stresszoroknak. Ezen pszichoszociális (zsúfoltság, izoláció) és fizikai behatások (sérülés, hideg, meleg, zaj, fertőzés), kiegészülve a genetikai faktorok hatásával, szervezet szintű, komplex választ, stresszt indukálnak (Joëls és Baram, 2009). Az említett külső és belső környezeti hatások következményeként folyamatosan nő világszerte a stressz okozta – pszichés (depresszió, neurózis) pszichoszomatikus (neurózis, viselkedés-, személyiség-, hangulatzavarok) és egyéb (pl. metabolikus szindróma, irritábilis bél szindróma) – megbetegedések száma is, melyek pontos kialakulásának mechanizmusa még nem ismert. Számos kutatás szerint a stressz a gyakoribb neurodegeneratív szindrómák (pl. Alzheimer-kór, sclerosis multiplex) rizikótényezője közé is tartozik (Esch et al., 2002). Fontos ugyanakkor megemlíteni, hogy a stressz hatással van olyan neuroendokrin szabályozás alatt álló folyamatokra is, mint a táplálékfelvételi magatartás és a szervezet energia felhasználása.

A stresszorok hatására felszabaduló mediátor molekulák specifikus neuronpopulációk receptoraihoz kötődve stresszválaszt hoznak létre, ami képessé teszi az élőlényt a változó körülményekhez való alkalmazkodásra. Attól függően, hogy a stresszorok mennyi ideig vannak jelen, beszélhetünk rövid ideig tartó akut, illetve akár hetekig, hónapokig elhúzódó krónikus stresszről. Utóbbi esetén irodalmi adatokkal alátámasztott tény, hogy a stresszérzékeny agyterületeken mikroglia aktiváció következik be rágsálókban, mely jelentős szerepet tölthet be a stresszválasz szabályozásában vagy éppen az adaptációban (Tynan et al., 2010) továbbá az említett neurodegeneratív betegségek kialakításában (Dheen et al., 2007).

Nem tudjuk azonban, hogy a krónikus stressz-indukálta neuroendokrin változások miként befolyásolják az egész szervezetet érintő metabolikus folyamatokat? Illetve, hogy kísérí-e ezeket a metabolikus változásokat mikroglia aktiváció a táplálékfelvételt és az energiaháztartást szabályozó központi idegrendszeri területeken? Nem ismerjük pontosan azokat a mechanizmusokat sem, amellyel a stressz-aktiválta neuronok jeleznek a mikroglia sejtek felé.

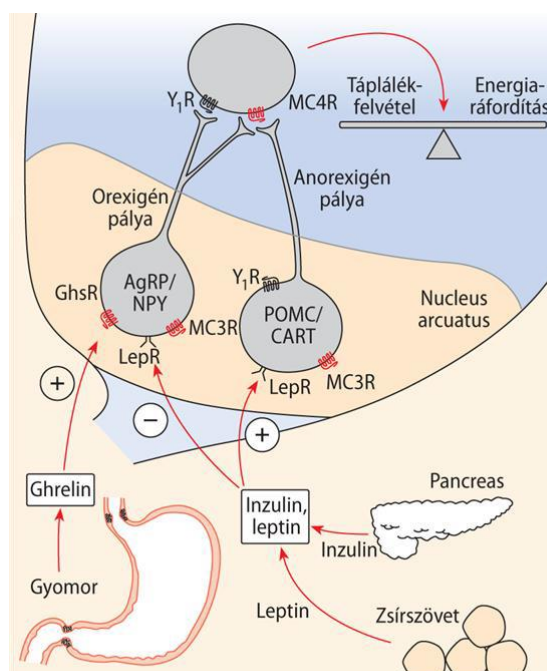
A fentiek alapján tehát időszerű és izgalmas kutatási téma a krónikus stressz metabolikus paraméterekre, illetve az agyi mikroglia aktivációjára gyakorolt hatásának vizsgálata, mely a jövőben lehetőséget adhat olyan soktényezős, poligénes és krónikus

stresszel összefüggésbe hozható betegségek vizsgálatára, mint például a metabolikus szindróma, inzulin rezisztencia vagy 2-es típusú diabetes.

2.1. Nucleus arcuatus, az agy egyik fő energia szenzora

A hipotalamusz a köztiagnak a talamusz alatti részén található, és a III. agykamra oldalfalát képező egység, melynek rostszegény, mediális bazális részében helyezkedik el a nucleus arcuatus (ARC). Az arcuatus mag az eminentia mediana közvetlen szomszédságában fekszik mely az agy fenesztrált kapillárisokat tartalmazó egyik circumventrikuláris szerve, ezáltal a nucleus arcuatus a makromolekulák számára könnyebben elérhető. Az ARC a központi idegrendszer energiaháztartást és metabolizmust szabályzó egyik fő régiója, melynek neuronjai két fő funkcionális egységre oszthatók: orexigén, azaz táplálékfelvételt fokozó NPY/AGRP neuropeptidet koexpresszáló és anorexigén, azaz táplálékfelvételt gátló POMC/CART-ot termelő sejtpopulációkra (Joly-Amado et al., 2014; Fonyó, 2011). A nucleus arcuatusban elhelyezkedő neuronok számos receptort fejeznek ki, amelyek képesek megkötni az agyba érkező, metabolizmust szabályzó hormonokat (leptin, inzulin, grelin) és metabolitokat (glükóz, zsírsavak) (**1. ábra**). Ezáltal az említett sejtcsoportok kiemelkedő szerepet játszanak a perifériáról érkező metabolikus információk érzékelésében, integrálásában, majd a válasz kialakításában.

1. ábra Nucleus arcuatus orexigén és anorexigén neuronjai, valamint szerepe az energiaháztartás homeosztázisában (Fonyó, 2011)

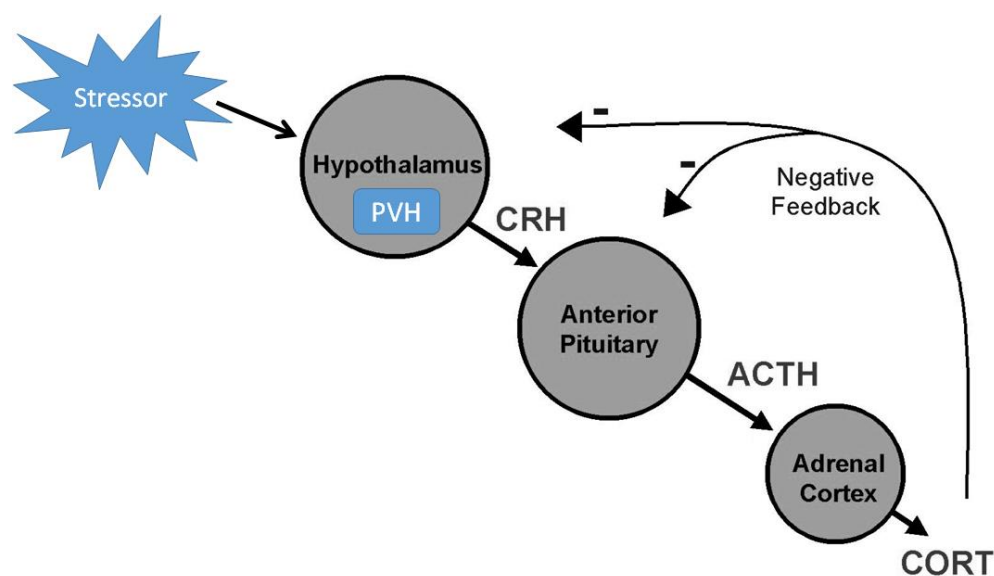


Megjegyzés: GhsR: grelinreceptor; LepR: leptinreceptor; MC3R: melanokortin 3. típusú receptor; MC4R: melanokortin 4. típusú receptor; Y1R: Y1 receptor

2.2. Paraventriculáris mag és a stressz-tengely

Ugyancsak a hipotalamusban található a paraventriculáris mag (PVH), mely a harmadik agykamra mellett szorosan elhelyezkedő pillangó alakú szövetállomány. Kissejtes neuronjai stressz hatására kortikotropin-felszabadító hormont (CRH) termelnek, mely összetett hatása révén az agyalapi mirigy elülső lebenyében termelődő adrenokortikotrop hormon (ACTH) felszabadítása mellett szerepet játszik a stressz hatására kialakuló autonóm, endokrin és viselkedésbeli válaszok létrejöttében is. A megemelkedett ACTH a mellékvese kéregállományában kortikoszteron termelést indukál (**2. ábra**). Ezt a stressz hatására aktiválódó jelátviteli utat hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengelynek, másik nevén stressz tengelynek nevezzük (Smith et al., 2006). A rendszer negatív visszacsatolás útján több szinten szabályzott. Feladata a stresszreakció mediálása, valamint kiemelkedő szerepe van a stressz jelenlétének monitorozhatóságában is (Mello et al., 2003).

2. ábra Hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely aktivációja stressz hatására



Megjegyzés: PVH: paraventriculáris mag; CRH: kortikotropin-felszabadító hormon; ACTH: adrenokortikotrop hormon; CORT: kortikoszteron

2.3. Mikroglia sejtek szerepe

Ugyanakkor a nucleus arcuatusban és a paraventriculáris magban -hasonlóan más agyterületekhez- a neuronokon kívül több más sejttípus is megfigyelhető, mint például ependima-, astroglia-, oligodendrocita, tanicita- és mikroglia sejtek (Kálin et al, 2015).

A mezenchimális progenitor- és keringő monocita sejtekből képződő (Kaur et al., 2001) mikroglia sejteket elsőként Nissl írta le az 1899-es években. A mikroglia sejtek az agy rezidens makrofágjai, melyek az agyi sejtek mennyiségének körülbelül 15%-át teszik ki.

Számos segítő, szabályozó és védelmi funkcióval rendelkeznek. Fagocitáló képességük által szerepük van a degenerált sejtek eltávolításában, jelentőségük van a neuroinflammatorikus folyamatokban, az antigén prezentációban – és mint újabban kimutatták – az idegsejthálózatok szinapszisainak átrendezésében is (Tremblay és Majewska, 2011; Kettenmann et al., 2013). Az egészséges agyban a neuronokkal való kommunikációjuk révén aktiválódhatnak vagy deaktiválódhatnak (Biber et al., 2007), illetve még jelenleg nem ismert folyamatok hatása révén serkenthetik a molekuláris és a sejtes védekezést, vagy – stressz és öregedés hatására (Jurgens és Johnson, 2012) – a neurológiai elváltozások kialakulását.

Az érett mikrogliá sejtek aktivitásuk szerint, morfológiailag, három fő csoportba sorolhatók. Az első a - nyugvó, illetve inaktív állapotnak emlegetett - nyúlványozott (ramifikált) fázis. Kutatásokkal bizonyított tény, hogy a korábbi elképzelésekkel ellentétben, a sejtek valójában ebben a formában sem inaktívak, hanem folyamatosan monitorozzák környezetüket (Nimmerjahn et al., 2005). Ebben a fázisban jellemzően sok vékony nyúlvánnyal rendelkeznek, melyek biztosítják számukra a nagyobb hatótávolságú környezeti felmérést, miközben az egymáshoz közel kerülő nyúlványok által összefüggő agyi mikrogliá-hálózatot alakíthatnak ki. A nyúlványozott sejtek negatív inger, sérülés, vagy betegség hatására aktiválódhatnak, azaz magasabb aktivációs szintre léphetnek. Az, hogy milyen aktivációs szintlépés történik, függ a sejtet ért behatás típusától, illetve az adott sejt előzetes aktivitási szintjétől (Mosser és Edwards, 2008). Kialakulhat M1-es (klasszikus) és M2-es aktiváció. Az előbbi állapot fő kialakító tényezője az intracelluláris patogének, fertőzések, kémiai behatások következtében fellépő sejtes immunválasz. A mikrogliá ennek jeleit észlelve magas szintű proinflammatorikus citokin- ($\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-12, szuperoxid, NO, ROS, proteázok) és mediátortermelésbe kezd. Mondhatni egy fokozott mikrobaölő képességű neurotoxikus sejtté alakul. Az M2-es állapot két további csoportra bontható. Az egyik az alternatív aktiváció, a másik pedig a szerzett deaktiváció. Az első esetben a fő kialakító tényező az IL-4, IL-13 és a makrofágok által felszaporított mannóz receptor jelenléte (Boche et al., 2013). Hatásukra a mikrogliá sejtek anti-inflammatorikus citokin termelésbe kezdenek (IL-4, IL-10, IL-13, Tgfb és Arg1). Az ilyen, alternatív aktiváció állapotában lévő mikrogliá szövetregeneráló, és sejtvédő funkciót lát el (Hoogland et al., 2015). Ugyanakkor a szerzett deaktiváció esetén a cél, a kialakult akut gyulladás enyhítése. Az elsődleges indukáló tényező az apoptotikus sejtek jelzése és az IL-10, melyek hatására a mikrogliá antagonistákat (IL-4, IL-13) kezd el termelni (Tang és Le, 2016). A mikrogliá sejtek aktivációs szintjének megállapítása mikrogliá specifikus markerek alkalmazásával lehetséges. Legfontosabbak közülük az ionizált kalciumkötő adaptor molekula (Iba-1), és a

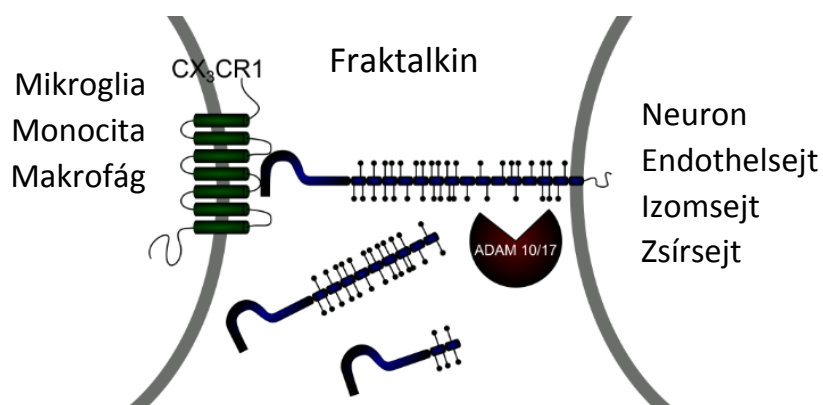
különböző sejtfelszíni markerek (CD45, CD68, DC11b). Az aktiválódott mikroglia sejtekre jellemző, hogy nyúlványaik megrövidülnek, illetve sejtestük mérete növekszik a nyúlványok méretéhez képest. Aktivációjukat jelzi továbbá adott agyterületre való toborzódásuk, a sejtszám növekedése is.

Nyugalomban, az egészséges agyban a mikroglia aktivitását és működését a neuronok számos szignállal befolyásolják. Ez végbemehet kemokinek, neurotranszmitterek, neurotrofinok és sejtfelszíni markerek (CD200, CD22) által (Biber et al., 2007).

2.4. Fraktalkin és receptora

Komplex hatásuk révén a kemokinek (kemotaktikus citokinek) bizonyítottan az egyik legideálisabb szignálcsoport a sokrétű neuron-mikroglia kommunikációban (Biber et al., 2008). A fraktalkin (CX3CL1) egy olyan kemokin, melyet neuronok termelnek és a specifikus receptoruk (CX3CR1) a mikroglían megtalálható. A fraktalkin a CX3C kemokinek családjába tartozó fehérje. Míg a periférián endothel-, zsír-, és izomsejtek-, addig az agyban a neuronok expresszálják. Membránkötött és szolubilis formája is van. Szolubilis formáját - az ADAM 10/17- proteolitikus enzim hasítja le. Receptora - a fraktalkin receptor (CX3CR1) – egy G-proteinhez kapcsolt, hét transzmembrán fehérje, mely a periférián a monocitákon, makrofágokon, az agyban pedig mikroglia sejteken fejeződik ki (Paolicelli et al., 2014) (3. ábra).

3. ábra Fraktalkin/fraktalkin receptor lokalizációja



Míg periférián a többi citokinhez hasonlóan a gyulladásos folyamatok kialakításában játszik szerepet azáltal, hogy kémiai inger hatására a gyulladás helyszínére vonzza a monocitákat, addig az agyban a specifikus receptorához kötődve szabályozza a mikroglia normális működését.

A fraktalkin kulcsfontosságú szerepet tölt be a neuron-mikroglia kommunikációban, és ezáltal a mikroglia aktiválódásában (Sheridan és Murphy, 2013). A fraktalkin rendszer aktiválódásának és citokin termelő funkciójának leírása alapvetően neuroimmunológiai betegségekhez és agyi károsodásokhoz fűződik (Ling et al., 2001). Kísérletünkben a fraktalkin szerepét a krónikus stressz okozta metabolikus változásokban, olyan transzgénikus állatokon vizsgáltuk, melyekben a fraktalkin szignalizáció hibás a fraktalkin receptor hiánya miatt (CX3CR1^{-/-}, genetikai háttér: C57Bl6).

2.5. Krónikus stressz modellek állatokon

A krónikus stressz által kiváltott betegség rágcsálókön való modellezésére számos módszert írtak már le az irodalomban. A kísérletben alkalmazott krónikus stressz protokoll kiválasztása mindig attól függ, hogy milyen betegséget vagy akár célfehérjét, molekulát szeretnénk vizsgálni. A krónikus stressz a depresszió egyik fő környezeti kiváltó oka, egereken való modellezésére alkalmazott eljárás például az ismételt erőltetett úsztatás, az ismételt mozgáskorlátozás és az ismétlődő szociális vereség (Monteiro et al., 2015; Habr et al., 2014). A depresszió együtt jár a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg (HPA) tengely túlműködésével, mivel hatására a hipotalamusz paraventrikuláris magjában (PVH) a stresszel kapcsolatos neuronok kortikotropin felszabadító hormon (CRH) termelése megnövekszik (Goncharova, 2013). A megszokás (habituáció) elkerülése céljából hatékonyabb lehet, ha a fent leírt módszereket kombináljuk, variábilis módon alkalmazzuk és kiegészítjük más enyhébb, de kiszámíthatatlanul megjelenő és az állatok számára elkerülhetetlen fenyegetettséget jelentő stresszorokkal (Monteiro et al., 2015). Így például a rágcsálókön végzett kísérletekben sok esetben a felnőttkori krónikus stressz protokollt kiegészítik immunológiai (lipopoliszaharid kezelés), vagy korai életciklusban alkalmazott stresszhatással (postnatalis anyai szeparáció) (Veenema et al., 2008). A krónikus stressz közismerten együtt jár a táplálkozási és metabolikus változásokkal, melyek neurobiológiai és élettani háttere még kevésbé ismert.

3. Célkitűzés

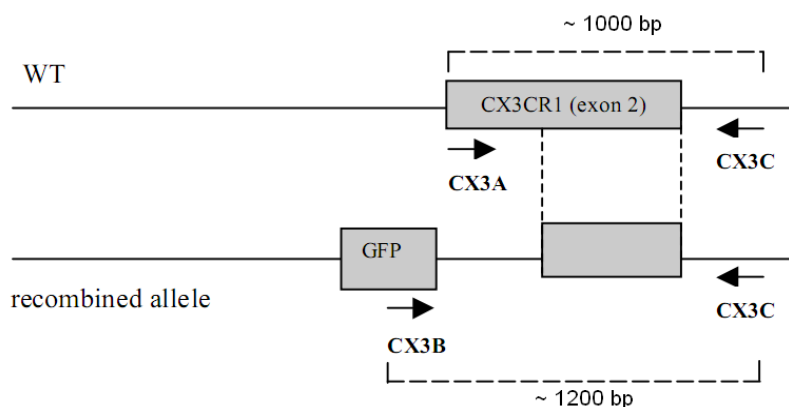
Jelen dolgozatban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy hogyan hat a felnőttkori krónikus variábilis stressz az egerek metabolikus paramétereire? Továbbá, hogy a krónikus stressz előidéző-e a stresszel és a metabolizmus szabályozásával kapcsolatos hipotalamikus struktúrákban mikroglia aktivációt, és ha igen, az milyen szintű és van-e benne szerepe a fraktalkin szignalizációnak?

4. Anyag és módszer

4.1. Kísérleti állatok és kísérleti elrendezés

Vizsgálatunkban felnőtt, hím, 26 ± 4 g induló súlyú homozigóta fraktalkin receptor-GFP knock-in egereket (CX3CR1^{-/-}, Cx^{-/-}), valamint kontroll állatként a genetikai háttérüket adó C57Bl/6 egereket használtunk. A CX3CR1^{-/-} transzgénikus egerek fraktalkin receptort (CX3CR1) kódoló génjének második exonjában a zöld fluoreszcens fehérje (GFP) cDNS által kódolt génje található (4. Ábra). A genetikai módosítás következtében a fraktalkin receptorhoz (CX3CR1) nem tud hozzákapcsolódni ligandja, a fraktalkin, mely így nem tudja kifejteni hatását a sejtre. Ugyanakkor a génmódosítás másik következményeként GFP fejeződik ki, így a homozigóta és heterozigóta állatokban a mikroglia zölden fluoreszkál. Az egyedek azonosítása fülbevágásos módszer alapján történt. A kísérletben a különböző genotípusú egereket két részre osztottuk: felnőttkori krónikus variábilis stressznek (CVS) kitett illetve kontroll kezelési csoportokat (n=10-9) alakítottunk ki. A krónikus variábilis stressz (CVS) procedúra során alkalmazott stresszorokat a következő fejezetpontban tárgyalom. A kontroll csoport állatainak nyugodt tartási körülményeket biztosítottunk. A kísérlet végső kimenetele alapján az állatokat randomizált módon további két csoportba soroltuk. Az egyik csoport a kísérlet végén magatartásteszteken ment keresztül, majd a különböző agyterületekből kvantitatív real-time PCR segítségével génexpressziós mérések történtek (n=6-5). A másik csoport állatain pedig a kezelést követően indirekt kalorimetriás mérést végeztünk (n=4-4), és a későbbi szövettani vizsgálatok céljából perfundáltuk őket. Szakdolgozatomban főként az utóbbi csoportba tartozó állatokon mért eddigi eredményeket részletezem. Az állatok a MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetének tenyészetéből származnak, ahol az egérszobákban 12D-12L megvilágítási ciklus, standard és állandó páratartalom és hőmérséklet ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) van. A víz, illetve a standard táp ad libitum állt az állatok rendelkezésére. Kísérleteinkben alkalmazott beavatkozások összhangban vannak az Európai Unió (86/609) direktívájával és a magyar Állatvédelmi Törvénynek (1998/XXVIII. sz.) megfelelően a kísérleti beavatkozásokat mind az intézeti, mind a területi hatóság (Fővárosi és Pest Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal, Élelmiszerlánc-Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság, Járványügyi és Állatvédelmi Főosztálya) jóváhagyta (MÁB engedély száma: 22.1/3347/003/2007).

4. Ábra A CX3CR1 gén vad típusú (WT) és rekombináns alléljának sematikus rajza



4.2. Krónikus variábilis stressz (CVS) procedura során alkalmazott stresszorok

A CVS kezelés során az egereket felnőtt korukban (7-9 hetesen) négy héten keresztül, napi két alkalommal, különböző enyhe, fizikai és pszichoszociális stresszoroknak tettük ki (Mineur et al, 2006) melyek a következők:

4.2.1. Dőlt ketrec

Az állattartó ketrecek egy-egy éjszakára 45°-os szögben megdőntöttük. A kísérlet előrehaladtával az adaptáció elkerülése végett kombináltuk az enyhébb stresszorokat az alom megnedvesítésével, illetve az egyedek ketrecenkénti számának növelésével, zsúfolásukkal.

4.2.2. Megvilágítási periódus megváltoztatása

Időzítő segítségével a 12-12 órás világos és sötét periódust egy napra felcseréltük.

4.2.3. Erőltetett úsztatás

Az állatokat 5 percre egyesével egy vízzel teli üveghengerbe helyeztük (**5. A ábra**). A CVS kezdetén 25°C-os vizet használtunk, míg végén a víz hőmérsékletet 20°C-osra hűtöttük. A módszer fontos tényezője, hogy az állatok lába és farka nem ér le az üveghenger aljára, illetve a henger oldalán megkapaszkodásra nincs lehetőségük. Ezek következményeként az állatok tehetetlenül, menekülési útvonal megléte nélkül próbálnak a mozgó vízfelszínen maradni. Az egyes egyedeket mindig új, tiszta vízzel teli hengerbe helyeztük.

4.2.4. Szociális vereség

A kísérleti állatot egy előre meghatározott szempontok alapján kiválasztott (Golden et al, 2011) CD1-es egértörzsből származó, domináns egér ketrecébe („home cage”) helyeztük 10 percre (**5. B ábra**). Ez a fajta stressz egy állandó (pszichés), másrészt egy véletlenszerűen bekövetkező (fizikai) komponensből áll. A behatoló (kísérleti állatunk) és a rezidens (CD1-es agresszív egér) egyed között mindvégig vizuális és olfaktorikus kontaktus áll fenn. Ezt egészítik ki a rezidens egér területvédelési magatartásából adódó harcok.

4.2.5. Szag alapú elkerülés

A CVS csoportunk állatait elkülönítettük, majd dobozukba patkány ürülékkel tartalmazó lyuggatott centrifugacsövet helyeztünk éjszakára. Lehetséges predátoruk szagmintája stresszt vált ki az egerekben (Kondoh et al., 2016).

4.2.6. Elektromos sokk

A módszerhez használt készülék egy kb. 20x20x20 centiméteres átlátszó, műanyag plexilap oldalú, lefedhető doboz. Padlózata fémrácsos szerkezetű, mely alatt egy, a vizelet és ürülék felfogására alkalmas tálca helyezkedik el. Az állatot a készülékbe helyezése után 20 másodpercenként 0.5 mA erősségű áramütés éri 10 percen keresztül (**5. C ábra**). A letranszformált egyenáram a fém rudakon fut végig 1-2 másodpercig, melyeken az állat áll. Az egyes egyedek kezelését követően a szerkezet tálcáját és belsejét 70%-os alkohollal tisztítottuk meg.

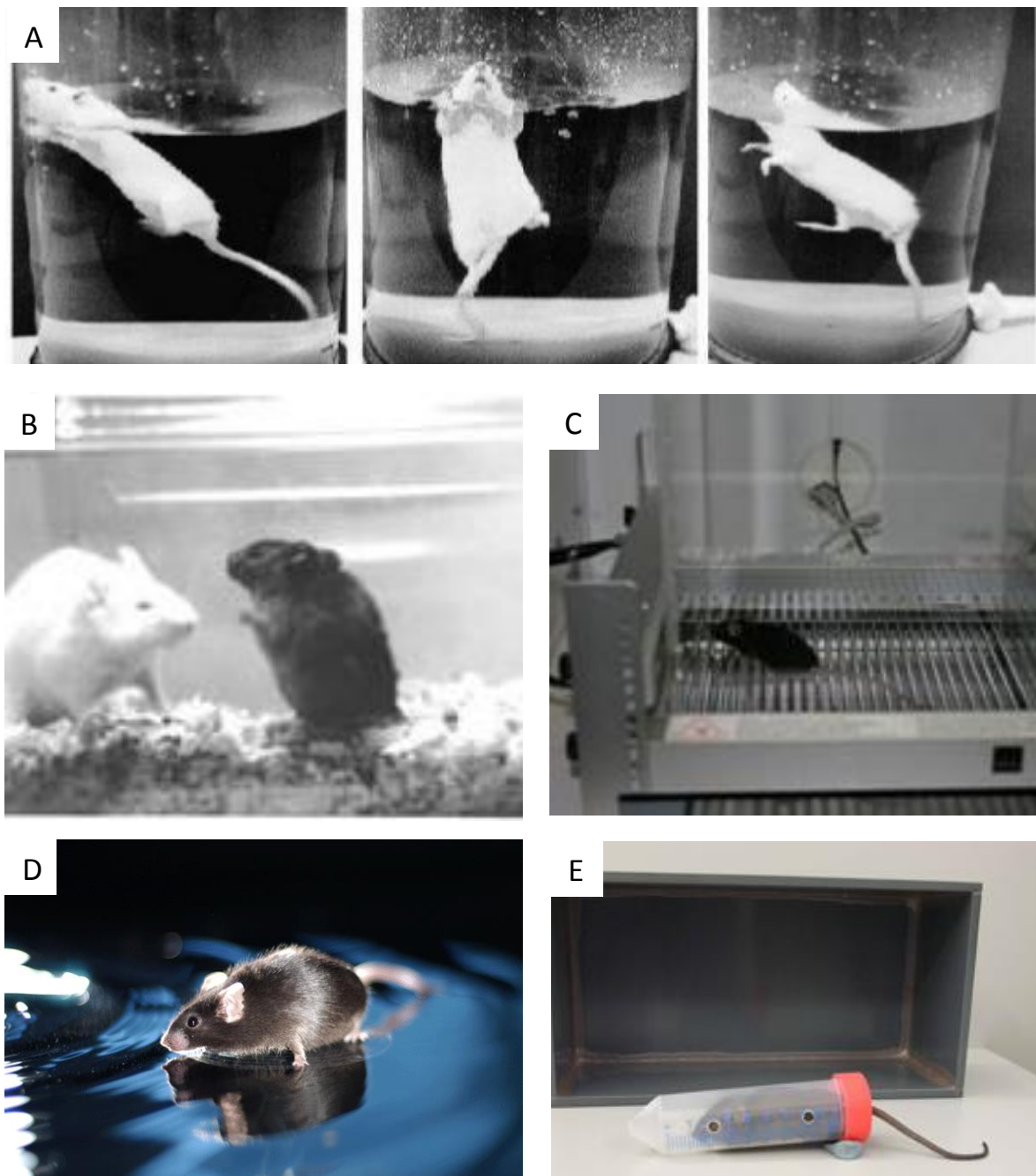
4.2.7. Víz elkerülés

Az állatokat egyesével egy órás időtartamra egy vizes medence közepén rögzített szigetre helyeztük (**5. D ábra**). A medencében lévő víz hőmérsékletét a kísérlet előrehaladtával folyamatosan csökkentettük. A módszer alkalmazása során az egerek kiutat keresvén, a vízbe ugranak. Ebben az esetben minden alkalommal visszahelyeztük az egyedet a szigetre. Idővel az egerek feladták a menekülési próbálkozásukat, magatehetetlenül kuporogtak a vízzel körülvett kis területen.

4.2.8. A szabad mozgás korlátozása

A kísérleti egereket egy 50 milliliteres, végén levágott centrifugacsőbe zártuk egy órára, mely által mozgásuk korlátozottá vált (**5. E ábra**).

5. ábra CVS procedúra során alkalmazott stresszorok



4.2.9. Egyéb alkalmazott stresszorok

A fentiekén kívül, ugyancsak az állatok stresszelésére szolgált az egyedek zsúfolása vagy éppen izolálása, mely során az egereket egyesével tiszta almot tartalmazó ketrecekbe tettük. A módszerek az alkalmazkodás elkerülése végett kiegészíthetők az állattartó dobozok mozgatásával, illetve a megvilágítási periódus változtatásával. A CVS során alkalmazott stresszorok beosztása az **1. táblázatban** látható.

Dátum		CVS	
		Délelőtt	Délután
10.febr	Sze	víz elkerülés	éjszakai világosság
11.febr	Cs	szociális vereség	elektromos sokk
12.febr	P	erőltetett úsztatás (25 C°)	dőlt ketrec, nedves alom
13.febr	Szo	rázatás-zsúfoltság	zsúfoltság-sötétség (18h)
14.febr	V	mozgáskorlátozás	izolációs stressz (új alom)
15.febr	H	szociális vereség	éjszakai világosság
16.febr	K	rázatás-zsúfoltság	dőlt ketrec, nedves alom
17.febr	Sze	erőltetett úsztatás (25 C°)	elektromos sokk
18.febr	Cs	víz elkerülés	éjszakai világosság
19.febr	P	szociális vereség	elektromos sokk
20.febr	Szo	izolációs stressz, patkány ürülék	izoláció-sötétség, patkány ürülék
21.febr	V	rázatás-zsúfoltság	zsúfoltság, dőlt ketrec, nedves alom
22.febr	H	erőltetett úsztatás (21-22 C°)	éjszakai világosság
23.febr	K	szociális vereség	mozgáskorlátozás
24.febr	Sze	sötétség, patkány ürülék	rázatás-zsúfoltság, éjszakai világosság
25.febr	Cs	izolációs stressz	elektromos sokk
26.febr	P	erőltetett úsztatás (21-22 C°)	kisdoboz, zsúfoltság-nedves alom
27.febr	Szo	szociális vereség	izolációs stressz, sötétség
28.febr	V	víz elkerülés (hideg víz)	elektromos sokk
29.febr	H	sötétség	rázatás, zsúfoltság, CD1-es egerek
1.marc	K	zsúfoltság, dőlt ketrec, nedves alom	izoláció, patkány ürülék
2.marc	Sze	elektromos sokk	erőltetett úsztatás (20-21 C°), rázatás
3.marc	Cs	víz elkerülés	éjszakai világosság
4.marc	P	zsúfoltság, CD1-es egerek, kis doboz	izoláció-sötétség, patkány ürülék
5.marc	Szo	szociális vereség	dőlt ketrec, nedves alom
6.marc	V	elektromos sokk	mozgáskorlátozás, rázatás

1. táblázat Az alkalmazott stresszorok pontos beosztása

4.3. Metabolikus vizsgálatok

A négy hetes CVS procedúrát követően a stresszelt, illetve a nem stresszelt kontroll állatokat egyesével metabolikus ketrecekbe (TSE Phenomaster System) helyeztük. A környezet megváltozásából adódó stresszhelyzet elkerülése céljából, a kísérleti állatok a metabolikus mérés megkezdése előtt egy napig akklimatizálódtak. Az indirekt kalorimetriás mérés három napon át, zavarásmentesen, számítógépes adatrögzítés segítségével zajlott. A metabolikus ketrecek zárt rendszerének köszönhetően, folyamatosan felvételezhettük az egerek által leadott széndioxid (VCO_2) és felvett oxigén (VO_2) mennyiségét (ml/h/kg), amiből kiszámolhattuk az egyedek légzési hányadosát (RER) a VCO_2/VO_2 képlet alapján. Az állatok rendelkezésére álló, ad libitum táplálék-, illetve a csöpögésmentes itató tartalmi

fogyását magas precíziós szenzorok rögzítették. A ketrecekben lévő többdimenziós infravörös lézer sugarak (X és Y és Z tengelyirányú) megszakítottságának számával detektáltuk az állatok vertikális és horizontális lokomotoros aktivitását. Az állatok testösszetételének meghatározása a metabolikus mérés előtt és közvetlenül utána EchoMRI készülékkel történt.

4.4. Testtömeg mérés

Az állatok testtömeg mérése a kísérlet kezdetén, majd a négy hetes kezelési fázis végén történt.

4.5. Perfúzió és szövetfeldolgozás

A feldolgozás első lépéseként az egereket túlaltattuk 200 mg/ttkg Nembutállal. Az eutanáziát követően az állatok mellékvese tömegét lemértük. Ezt követően transzkardiálisan perfundáltuk először fiziológiás sóoldattal (0.9% NaCl), majd 70 mL jéghideg fixálóval (4% paraformaldehid, 0.4 M foszfát pufferben, pH:7). Az eltávolított agyakat utófixáltuk 3 órán keresztül 10%-os cukros (szacharóz) fixálóban, majd egy éjszakára 10%-os szacharózt tartalmazó 0.1 M kálium-foszfát (KPBS) pufferben (pH=7.2) tartottuk, hogy a fagyasztott metszet készítésekor megakadályozzuk a nagy jégkristályok képződését. Az agyakból 25 µm vastagságú koronális metszet sorozatot készítettünk, a metszeteket steril fagyálló folyadékba gyűjtöttük és a felhasználásig -20°C-on tároltuk.

4.6. Kortikoszteron koncentráció mérése

Az állatok szemzugából a négy hetes kezelési periódus végén vért vettünk. A vérvétel 20 µl 20%-os K-EDTA-ra történt, a csöveket rögtön centrifugáltuk és a plazma mintákat felhasználásig -20°C-on tároltuk. A plazma kortikoszteron koncentrációját direkt radioimmunoassay segítségével határoztuk meg.

4.7. Agyszövet feldolgozása

4.7.1. Iba-1 immunhisztokémia

4.7.1.1. Indirekt módszer

Az egér Iba-1 protein C-terminális része ellen nyúlban termelt poliklonális ellenanyagot (WAKO, 1:1000) használtunk. Ez az antiszérum specifikusan reagál az aktivált mikroglia/makrofágokban expresszáldó 17 kDa-os Iba-1 fehérjével. Az immuncitokémiai reakció szabadon úszó metszeteken, standard avidin- biotin- peroxidáz módszerrel történt.

A szöveti peroxidázok kimerítésére 3%-os H_2O_2 -dal 10 percig, a nem-specifikus fehérjekötés elkerülésére 2%-os kecske szérummal 1 órán át keresztül inkubáltam a metszeteket a primer ellenanyag előtt. Az inkubációk közé kétszer tízperces KPBS-es öblítéseket iktattam. A primer ellenanyagot 4°C -on 24 órán keresztül hagytam a metszeteken. Ezt követte a szekunder ellenanyag (biotinilált-anti nyúl IgG, Vector, Burlingame, CA, USA), és az avidin-biotin-HRP (Elite Plus kit, Vector) komplex 1-1 órás inkubációja, majd az előhívás. Kromogénként 3,3'-diaminobenzidint használtam. A folyamat eredményeként kapott metszeteket fénymikroszkóppal (Nikon Eclipse 600 microscope) vizsgáltuk, 20x-os nagyítás mellett.

4.7.1.2. Direkt módszer

A fluoreszcens előhívás során a metszetek H_2O_2 -al történő kezelése elmarad. A nem-specifikus fehérjekötés blokkolására 2%-os szamar szérumot használtam. Ebben az esetben a primer antitesthez (anti-Iba-1; WAKO 1:1000) a fluorofórral konjugált szekunder antitest, esetünkben ALEXA 594 flourofórral konjugált anti-nyúl IgG (Life technologies, 1:500) közvetlenül kötődött. Fluoreszcens előhívás után Nikon Ni-E C2 konfokális mikroszkóppal, 20x-os objektív alatt, azonos lézerintenzitással és expozíciós idővel fényképeket készítettünk.

4.8. Iba-1 pozitív sejtek analízise

Kvantitatív analízis során a mikroszkópos képeket digitalizáltuk, és az Iba-1 pozitív sejtek számát, nucleus arcuatusban és paraventrikuláris magban elfoglalt területét ImageJ programmal, egységes háttér-, szín- és méret-küszöb használata mellett számoltuk. A fluoreszcens mikroszkópos képeken a nucleus arcuatus Iba-1 pozitív sejtjeinek integrált denzitását mértük meg, mely arányos az Iba-1 fehérje expressziójának mértékével. A mikroglia morfológiai változásáról a sejttest és a nyúlványok területének hányadosából következtettünk.

4.9. Statisztika

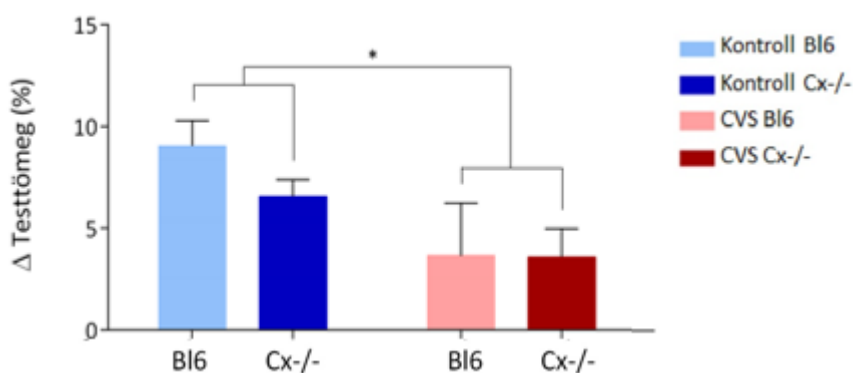
A kapott eredményeket a GraphPad Prism 7.01-es verziójával értékeltük ki. A csoportok közötti különbségek megállapítására az ismételt testtömeg-mérések esetén ismételt mérések, a többi paraméter elemzése esetén pedig független mérések kétutas ANOVA-t alkalmaztunk. Post-hoc tesztként Bonferroni-féle többszörös összehasonlítást végeztünk. Az eltéréseket $p < 0.05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

5. Eredmények

5.1. Krónikus stressz hatása a kísérleti állatok testtömegére

A kéttényezős ANOVA alapján négy hetes kezelési periódus alatt a stressz procedúra szignifikánsan csökkentette az állatok testtömeg-gyarapodásának mértékét ($F(1,33)=6.534$; $p=0.0154$) (6. ábra). A genotípusnak nem volt szignifikáns hatása ($F(1,33)=0.6006$; $p=0.4439$).

6. ábra A csoportok testtömeg változása a kísérlet alatt (átlag+SEM)

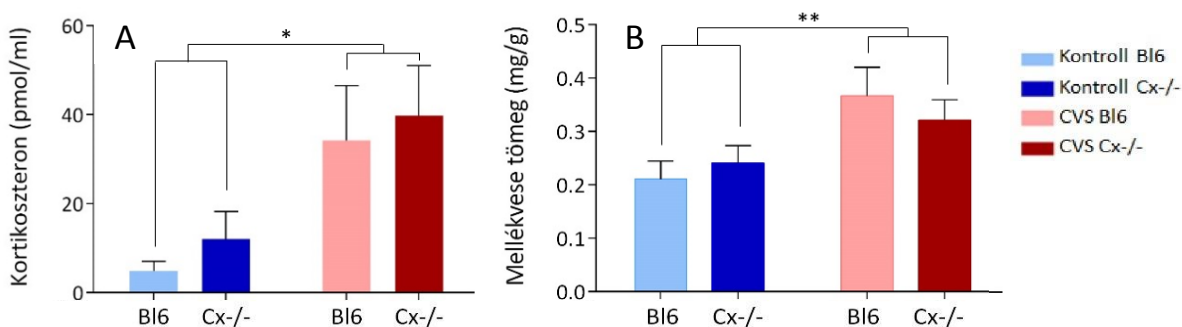


Megjegyzés: * $p<0.05$ „CVS” vs. „Kontroll”

5.2. A mellékvese tömegének és a kortikoszteron plazmakoncentrációjának változása krónikus variábilis stressz hatására

A krónikusan stresszelt állatok plazma kortikoszteron koncentrációja szignifikánsan magasabbnak bizonyult a nem stresszelt csoportok állataihoz képest ($F(1,25)=5.749$; $p=0.0243$) (7. A ábra). A genotípusnak nem volt szignifikáns hatása ($F(1,25)=0.2942$; $p=0.5923$). A stresszelt állatok testtömegre normalizált mellékvese tömege szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll állatoké ($F(1,17)=8.625$; $p=0.0092$) (7. B ábra). A genotípusnak itt sem volt hatása a mellékvesék tömegére ($F(1,17)=0.03745$; $p=0.8488$).

7. ábra A csoportok plazma kortikoszteron koncentrációja (A), illetve relatív mellékvesetömege (B) (átlag+SEM)



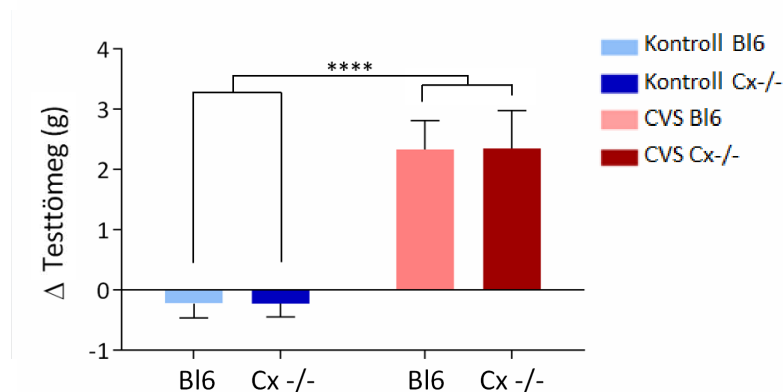
Magyarázat: * $p<0.05$; ** $p<0.01$ „CVS” vs. „Kontroll”

5.3. Metabolikus eredmények

5.3.1. Az állatok testtömeg- és testösszetétel változásai a metabolikus mérések alatt

Az előzőleg CVS-en átesett egerek testtömege (**8. ábra**) szignifikánsan megnőtt a 3 napos metabolikus mérés alatt a kontrollhoz képest ($F(1,12) = 35.89$; $p < 0.0001$). A genotípusok között nem találtunk különbséget.

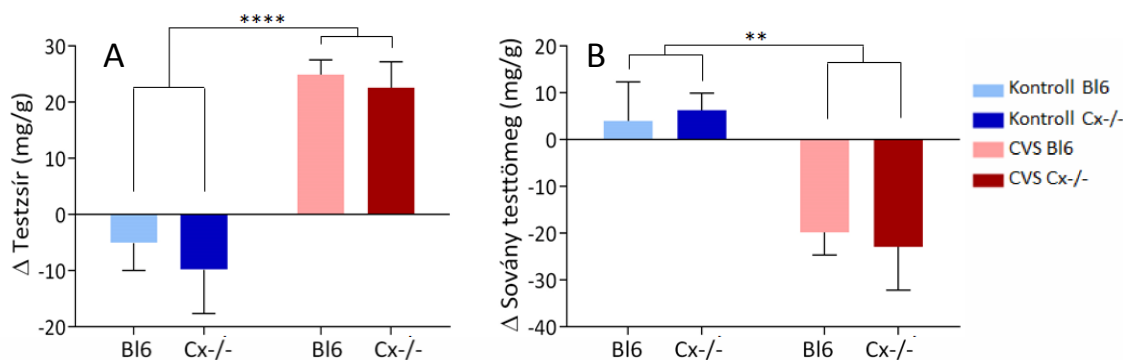
8. ábra A kísérleti állatok testtömeg változásai a 3 napos metabolikus mérés során (átlag+SEM)



Magyarázat: **** $p < 0.0001$ „CVS” vs. „Kontroll”

Az állatok zsírszövetének, illetve sovány – zsír nélküli – testtömegének változását vizsgálva (**9. ábra**) megállapíthatjuk, hogy míg a kezelésnek mindkét esetben volt szignifikáns hatása ($F(1,12)=34.06$; $p < 0.0001$ ill. $F(1,12)=14.75$; $p = 0.0023$), addig a genotípusnak egyikben sem ($F(1,12)=0.4363$; $p = 0.5214$ ill. $F(1,12)=0.00377$; $p = 0.9521$). Az állatok testtömegre normalizált teljes zsírszövetének tömege szignifikánsan nőtt a krónikus variábilis stressz után, míg a relatív sovány testtömegük szignifikánsan csökkent a kezelés utáni 3 napon.

9. ábra A csoportok relatív zsírszövetének tömege (A), illetve relatív sovány testtömegének változásai (B) (átlag+SEM)

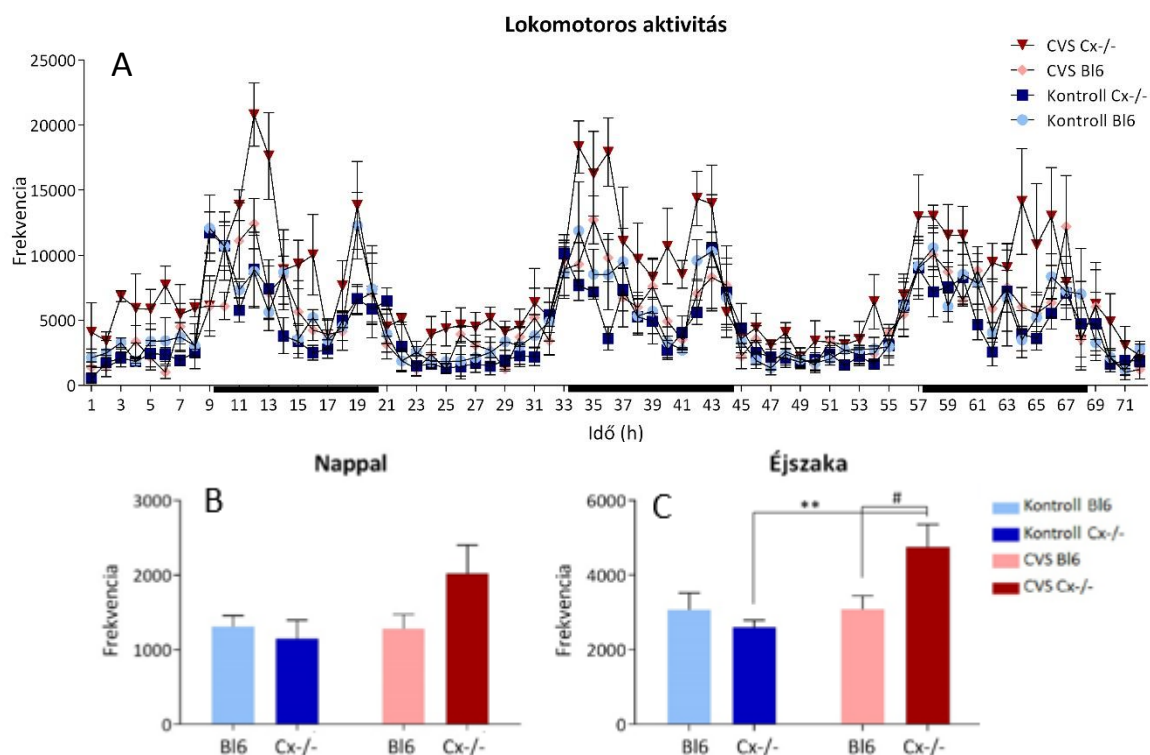


Magyarázat: ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ „CVS” vs. „Kontroll”

5.3.2. Lokomotoros aktivitás

Az összesített diagramon (**10. A ábra**) látható, hogy az egerek éjszakai aktivitása (az x tengely megvastagított vonala jelzi az éjszakai periódust) magasabb a nappalihoz képest. Ha külön vizsgáljuk a két napszakban a lokomotoros aktivitásukat, látható, hogy a nappali fázisban (**10. B ábra**) nincs szignifikáns eltérés a csoportok között, viszont éjszaka (**10. C ábra**) a krónikusan stresszelt fraktalkin receptor deficiens állatok (CVS Cx^{-/-}) szignifikánsan többet mozogtak a kontroll „Cx^{-/-}”-hoz képest ($t=3.558$; $p<0.01$; poszt-hoc Bonferroni) és az előzőleg krónikusan stresszelt vad típusú (CVS Bl6) egyedekhez képest ($t=2.757$; $p<0.05$; poszt-hoc Bonferroni).

10. ábra A kísérleti állatok lokomotoros aktivitása folytonos idővonalon (A), illetve napszakonkénti bontásban (B és C) (átlag+SEM)

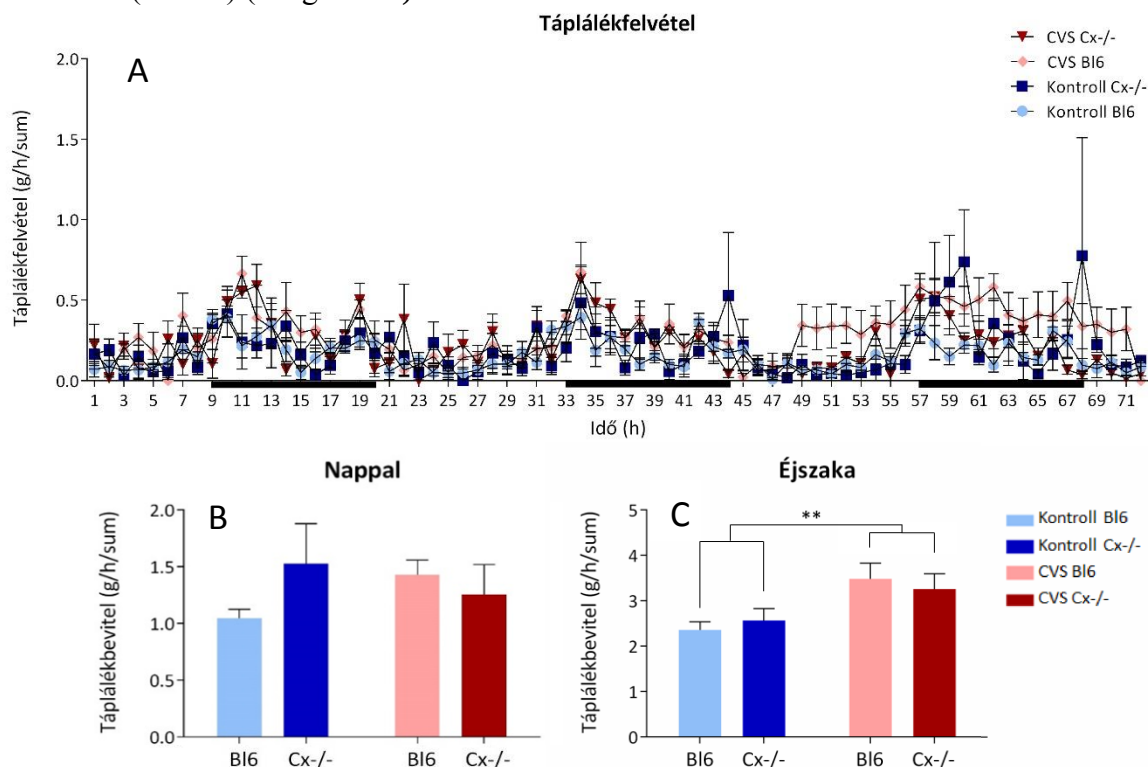


Magyarázat: * $p<0.05$ „CVS Cx^{-/-}” vs. „CVS Bl6”, ill. ## $p<0.01$ „CVS Cx^{-/-}” vs. „Kontroll Cx^{-/-}”

5.3.3. Táplálékfelvétel

A **11. A ábrán** látható, hogy az éjszakai aktív fázisban az egerek táplálékfelvétele megnőtt a nappali fázishoz képest. Elmondható, hogy míg a nappali periódusokban (**11. B ábra**) nem látható szignifikáns eltérés a csoportok között, addig az éjszakai periódusban (**11. C ábra**) a krónikus stressznek kitett egerek genotípustól függetlenül szignifikánsan több tápot ettek a nem stresszelt, kontroll állatokhoz képest ($F(1,12)=9.920$; $p=0.0084$).

11. ábra Az állatok táplálékfelvétele folytonos idővonalon (A), illetve napszakonkénti bontásban (B és C) (átlag+SEM)

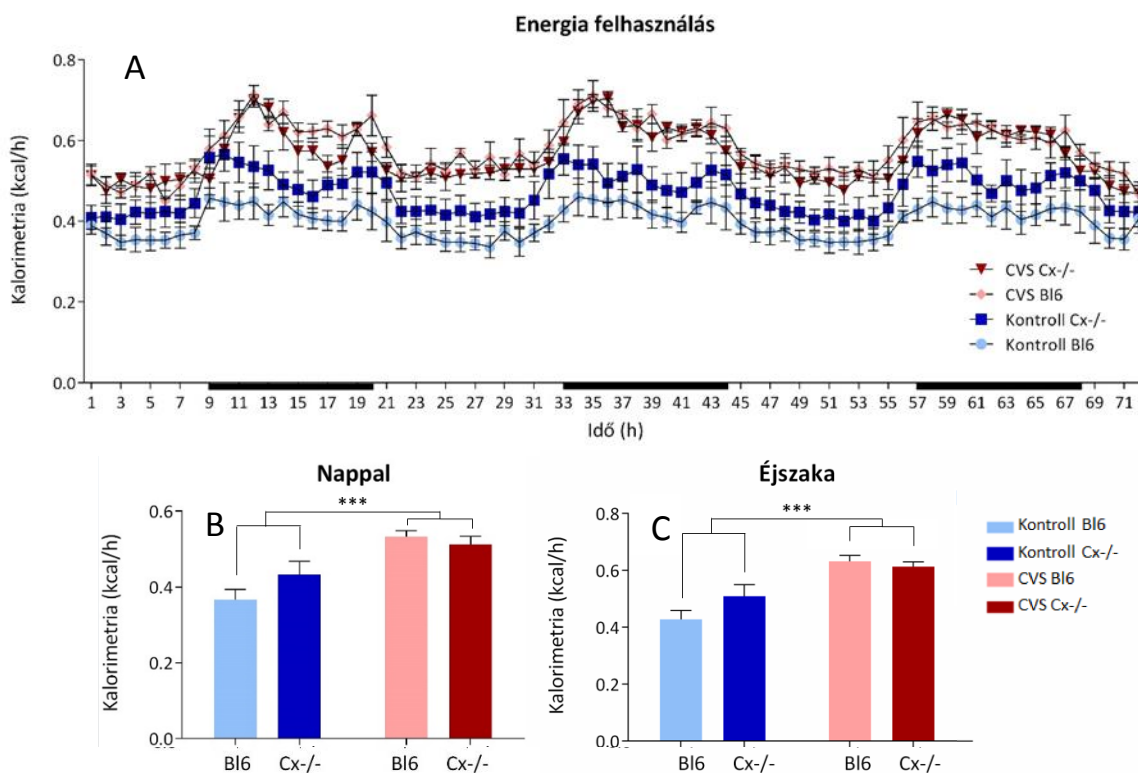


Magyarázat: ** $p < 0.01$ „CVS” vs „Kontroll”

5.3.4. Energia felhasználás

A **12. A ábra** összefoglaló diagramja mutatja, hogy alapvetően az egerek éjszakai energiafelhasználása nagyobb, mint a nappali időszakban. De az is látható, hogy az előzőleg krónikus stressz procedúrán (CVS) átment állatok energiafelhasználása a metabolikus mérés teljes ideje alatt nagyobb, mint a nyugalomban tartott kontroll állatoké. A stresszelt egerek a nappali nyugalmi periódusban (**12. B ábra**) és az éjszakai aktív fázisban is (**12. C ábra**) szignifikánsan több energiát használtak fel a kontroll egerekhez képest ($F(1,12)=23.29$; $p=0.0004$ ill. $F(1,12)=28.64$; $p=0.0002$).

12. ábra A kísérleti egerek energia felhasználása folytonos idővonalon ábrázolva (A), illetve napszakonkénti bontásban (B és C) (átlag+SEM)

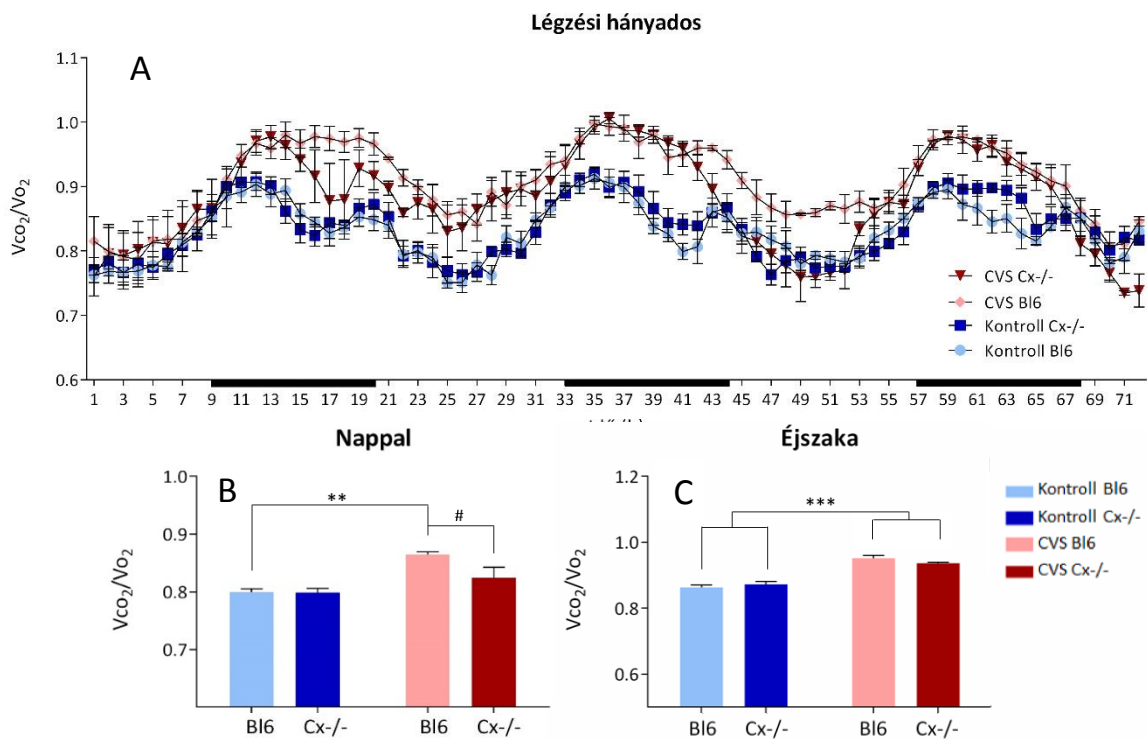


Magyarázat: *** $p < 0.001$ „CVS” vs „Kontroll”

5.3.5. Légzési hányados

Az éjszakai aktív periódusban az egerek légzési hányadosa (RER) is magasabb, mint a nappali időszakban (**13. A ábra**). A négy hetes CVS procedúra szignifikánsan megnövelte a nappali ($F(1,12)=17.80$; $p=0.0012$), és az éjszakai légzési hányados szintjét is ($F(1,12)=107.5$; $p<0.0001$). CVS után az egerek éjszakai légzési hányadosa közelített az 1-hez. Az éjszakai légzési hányadosban nem (**13. C ábra**), míg a nappal mért értékek (**13. B ábra**) genotípus különbséget is mutattak. A krónikusan stresszelt, fraktalkin receptor deficiens egerek (CVS Cx-/-) nappali légzési hányadosa szignifikánsan kisebbnek mutatkozott, mint a stresszelt vad típusú egerek (CVS Bl6) légzési hányadosa (poszt hoc teszt $t=2.651$, $p<0.05$). Ez a különbség abból adódhatott, hogy a „CVS Cx-/-” egerek nappali légzési hányadosa már a második mérési napon visszacsökkent a kontroll egerek légzési hányadosának szintjére (**13. A ábra**).

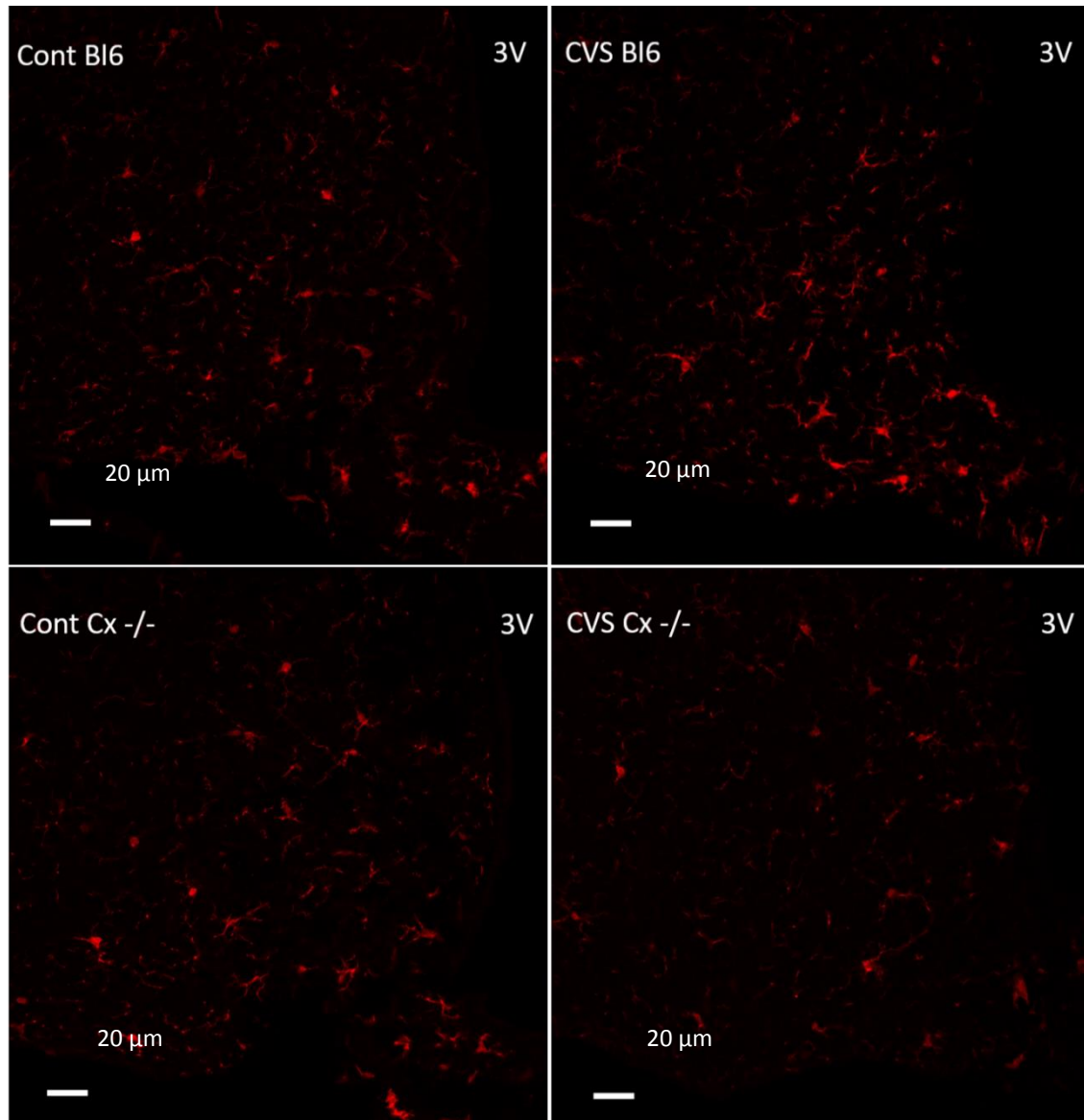
13. ábra Az egerek légzési hányadosa folytonos idővonalon (A), illetve napszakonkénti bontásban (B és C) (átlag+ SEM)



Magyarázat: ** $p < 0.01$ „CVS Bl6” vs. „Kontroll Bl6” ill. # $p < 0.05$ „CVS Cx-/-” vs. „CVS Bl6”; *** $p < 0.001$ „CVS” vs. „Kontroll”

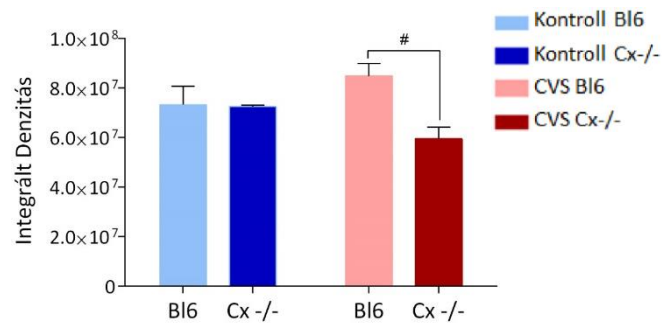
5.4. A fluoreszcensen festett Iba-1 pozitív mikroglia sejtek kvantitatív elemzése nucleus arcuatusban

14. ábra Az Iba-1 pozitív mikroglia sejtek mikroszkópos képe



A CVS megemelte a Bl6-os egerek nucleus arcuatusában (ARC) festődő Iba-1 pozitív sejtek integrált denzitását a kontrollokéhoz képest, de ez a különbség nem volt szignifikáns. Viszont a genotípusnak szignifikáns hatása volt ($F(1,7)=6.218$; $p=0.0414$) az Iba-1 pozitív mikroglia sejtek integrált denzitására (**15. ábra**). A két stresszelt csoport állatai közti eltérés a mikroglia integrált denzitásának értékében szignifikánsnak bizonyult (poszt hoc teszt $t=3.248$; $p<0.05$). Az Iba-1 pozitív mikroglia sejtek mikroszkópos képe a **14. ábrán** látható.

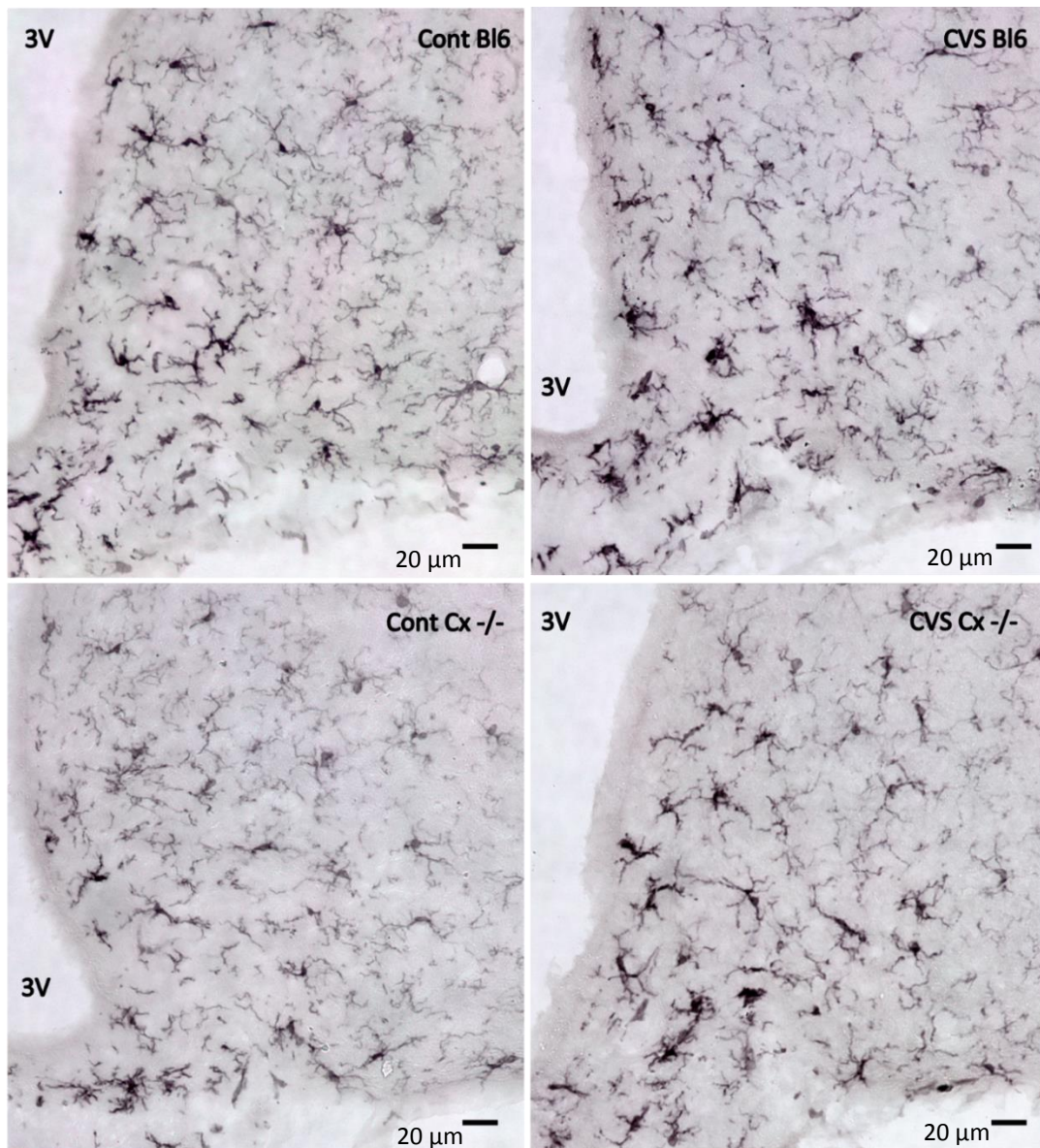
15. ábra Az Iba-1 pozitív mikroglia sejtek integrált denzitása nucleus arcuatusban (átlag+SEM)



Magyarázat: #p<0.05 „CVS BL6” vs. „CVS Cx-/-

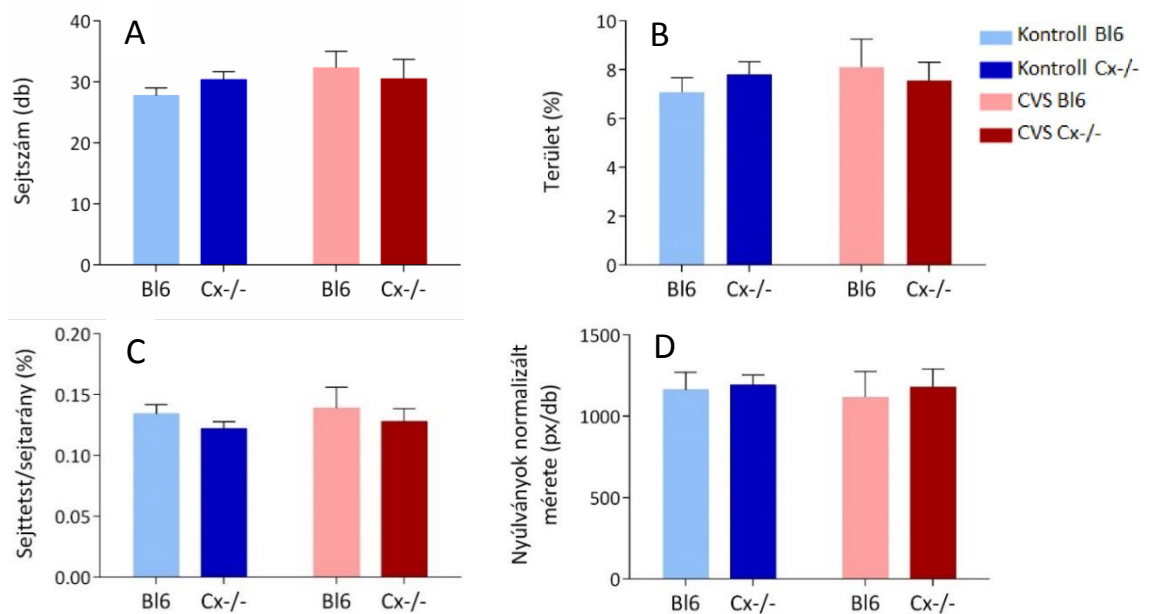
5.5. DAB-al előhívott Iba-1 pozitív mikroglia sejtek kvantitatív elemzése nucleus arcuatusban

16. ábra Az Iba-1 pozitív mikroglia sejtek képe fénymikroszkópban



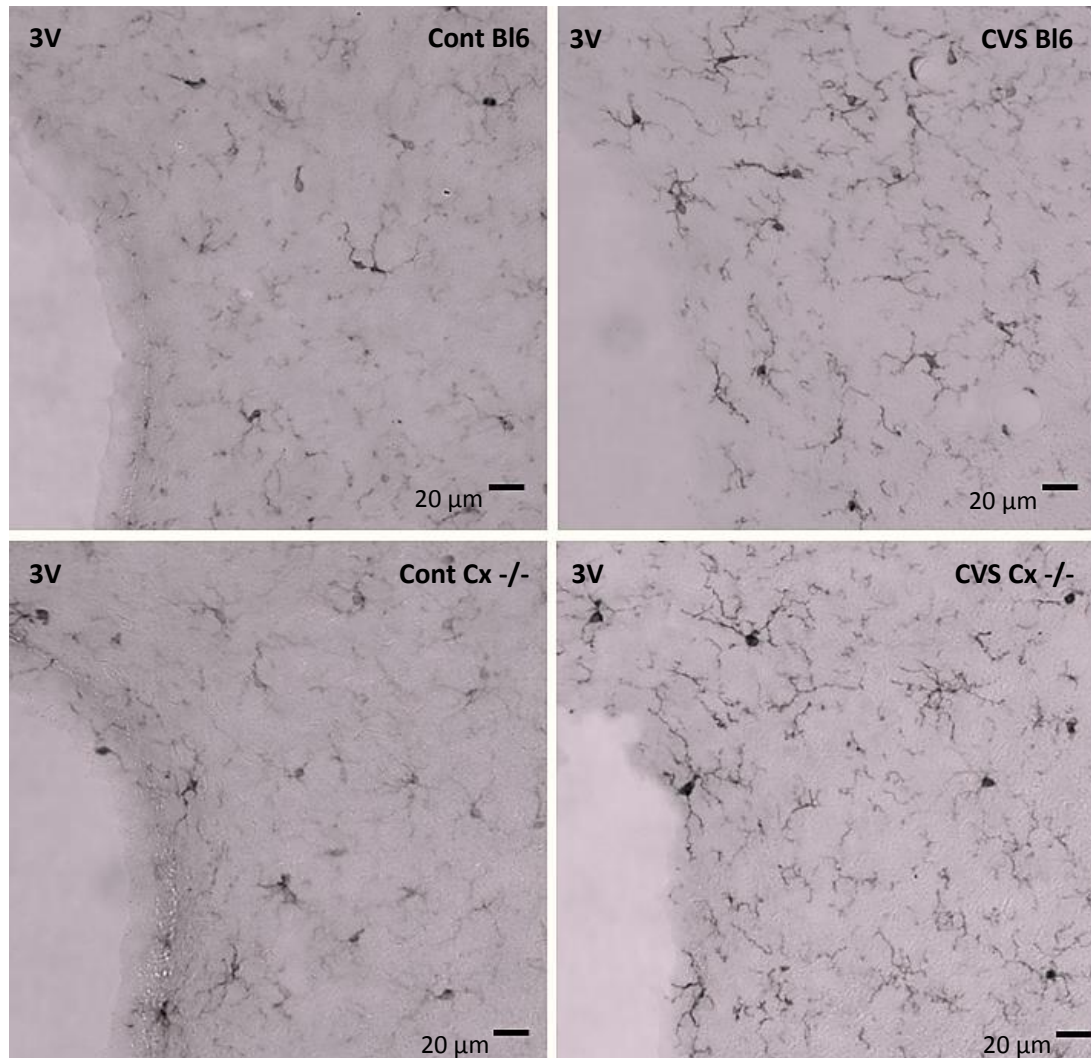
A hagyományos immunhisztokémiai eljárás során kromogénként alkalmazott DAB-os előhívás után is azt figyeltük meg, hogy csakúgy, mint a fluoreszcens metszeteken az Iba-1 a nucleus arcuatus területén festődött a legintenzívebben. A krónikus variábilis stressz procedúra ugyanakkor nem idézte elő szignifikáns mértékben az Iba-1 pozitív sejtek számának emelkedését (**17. A ábra**), és az aktivált mikroglia sejtek területének aránya sem növekedett ARC-ban (**17. B ábra**). Nem találtunk szignifikáns eltérést az Iba-1 pozitív sejtek morfológiáját jellemző paraméterekben sem ezen az agyterületen (**17. C és D ábra**). A Iba-1 pozitív mikroglia sejtek fénymikroszkópos képe a **16. ábrán** látható.

17. ábra Az Iba-1 pozitív mikroglia sejtek száma nucleus arcuatusban (A), és elfoglalt területük aránya (B), valamint származtatott morfológiai paraméterei (C és D) (átlag+SEM)



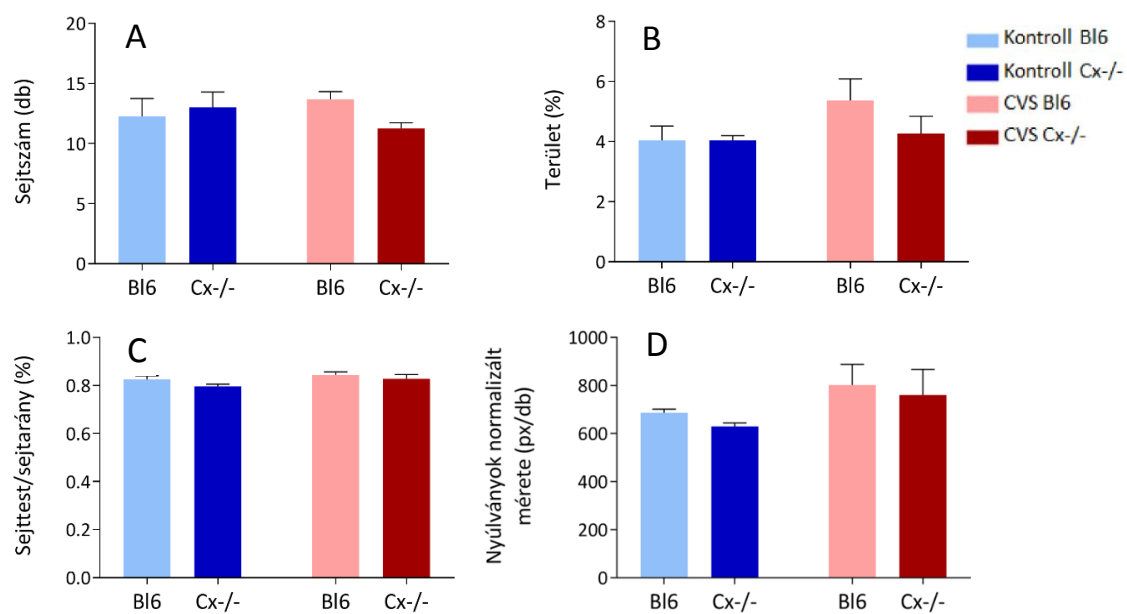
5.6. DAB-al előhívott Iba-1 pozitív mikroglia sejtek kvantitatív elemzése paraventrikuláris magban

18. ábra Az Iba-1 pozitív mikroglia sejtek képe fénymikroszkópban



A DAB-os előhívás után megvizsgáltuk az Iba-1 pozitív mikroglia sejtek paramétereit. Sem a kezelésnek, sem a genotípusnak nem volt szignifikáns hatása a sejtek számára (**19. A ábra**), az aktivált mikroglia sejtek területének arányára (**19. B ábra**) és morfológiai paramétereikre a paraventrikuláris magban. (**19. C és D ábra**). A Iba-1 pozitív mikroglia sejtek fénymikroszkópos képe a **18. ábrán** látható.

17. Ábra Az Iba-1 pozitív mikroglia sejtek száma paraventrikuláris magban (A), és elfoglalt területük aránya (B), valamint származtatott morfológiai paraméterei (C és D) (átlag+SEM)



6. Megbeszélés/Következtetések

6.1. A krónikus stressz hatása a táplálékfelvételre és az energia metabolizmusra

A mellékvese tömegének megnagyobbodása, és az alap kortikoszteron hormon plazma szintjének szignifikáns emelkedése, azt bizonyítja, hogy az általunk alkalmazott krónikus variábilis stressz protokoll eredményesen aktiválta a stressz-tengelynek is nevezett, hipotalamo-hipofízis-mellékvesekéreg tengelyt.

Humán vizsgálatok alapján, az akut és az hosszan tartó stressz hatására az esetek körülbelül 40%-ában csökken, 40%-ában pedig nő az emberek táplálékfelvétele (Torres és Nowson, 2007). Megfigyelték továbbá, hogy a fokozott táplálékfelvételt preferenciaváltozás is kíséri: magasabb zsírtartalmú és nagyobb élvezeti értékű ételek fogyasztása kerül előtérbe (Yau és Potenza, 2013). Állatok esetén is leírták ezt a kettősséget (Morley et al., 1983; Levine és Morley, 1981). Viszont általában az állatkísérletek az egyedek krónikus stresszt követő testtömeg-gyarapodásának, energia hatékonyságának és gyakran - de nem minden esetben - táplálékfelvételének csökkenését támasztják alá. Ez a különbség azzal magyarázható, hogy az említett paraméterek erősen függenek az állatokat érő stressz típusától és az egyedi különbségektől. Egerek esetén bizonyítottan a szociális státuszuktól is. Mozgáskorlátozás (restraint) és szociális vereségek következtében kialakult szociális alárendeltség az egyedek fogását eredményezheti (Jeong et al., 2013). Ugyanakkor a stressznek kitett domináns egerek jobban tudják tartani testsúlyukat (Moles et al., 2006; Sanghez et al 2013).

Kísérletünkben mi is gyakran alkalmaztuk stresszorként a zsúfoltságot és a szociális vereséget, melyek az egerek szociális státuszát befolyásolhatták. Eredményeink alapján a négy hetes kezelési periódus alatt a CVS-nek kitett egyedek testtömeg-gyarapodása szignifikánsan kisebb volt a kontroll csoport állataihoz képest (**6. ábra**). Ebben a kísérletben elmaradt az állatok táplálékfelvételének mérése a négy hetes krónikus variábilis stressz alatt, viszont a kutatócsoport előzetes munkája alapján elmondható, hogy a posztnatalis anyai szeparáción, majd felnőttkori CVS-en átesett egerek táplálékfelvételének dinamikája két nagy populációra osztotta a kísérleti állatokat genotípustól függetlenül. Az egyik csoport egy hét CVS után többet evett, majd harmadik hétre lecsökkent az elfogyasztott táp mennyisége, a másik csoport táplálékfelvétele pedig egy hét után nőtt, de az utolsó héten már ők ettek kevesebbet (Nem publikált adat). A CVS utáni metabolikus ketrecben való megfigyelés azt mutatta, hogy éjszaka, az állatok aktív periódusában az előzőleg stresszelt állatok táplálékfelvétele szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoport állataihoz képest.

Ugyanakkor a stresszelt csoportok nappali és éjszakai energiafelhasználása is szignifikánsan megnőtt a nyugalomban tartott társaikhoz képest. A felhasznált energia egy része a mozgásra fordítódik. A CVS-en átesett kezelési csoportok közül csak a CX3CR1-/- genotípusú egerek éjszakai lokomotoros aktivitása volt kiemelkedően magas, a stresszelt C57Bl6-os állatok nem mozogtak többet. Mivel a krónikusan stresszelt állatok nappali energia felhasználása is megemelkedett, arra következtethetünk, hogy megnövekedett a nyugalmi metabolikus rátájuk. Az energiafelhasználás az egyedek időegység alatt leadott CO₂ és felvett O₂ térfogatának arányából számolt származtatott érték.

A VCO₂/VO₂ hányadosa megadja a légzési hányados értékét. A sejtek anyagcseréjük során szerves anyagokat égetnek el (oxidálnak), melyekből energiát nyernek élettani folyamataik fenntartásához. Fő energiaforrásnak a szénhidrátokat, zsírokat és a proteineket tekinthetjük, melyek 50-30-15% arányban vesznek részt az energiaszolgáltatásban. A RER értékéből arra (is) következtethetünk, hogy éppen milyen anyag lebontásából szerez a szervezet energiát. Abban az esetben, ha kizárólag csak szénhidrátok biológiai oxidációja zajlik, értéke 1 lesz. Ugyanakkor kevert szubsztrát égetésekor a légzési hányados értéke 0.85, fehérjék bontásakor 0.82, zsírok felhasználásakor pedig körülbelül 0.71.

Kísérleti méréseinkből leolvasható, hogy az egerek légzési hányadosa a sötét periódusban általánosan megemelkedik a nappalihoz képest éjszakai aktivitásuk és táplálkozásuk miatt. Ugyanakkor CVS után a nappali és az éjszakai periódusban is szignifikánsan megnőtt az állatok légzési hányadosa a kontrollokéhoz képest. Az éjszakai időszakban a kontroll csoport állatainak RER értéke 0.85 körül ingadozott, míg a stresszelt egyedeké az 1-hez közelített. A nappali, nyugalmi periódusban bár a RER értékek csökkentek, de a kezelések közti különbség megmaradt. Ezen adatok arra utalnak, hogy az aktív fázisban a kontroll egerek kevert szubsztrátot, míg az előzőleg krónikusan stresszelt egyedek elsősorban szénhidrátokat hasznosítanak. Feltételezhetően a CVS-en átesett egyedek nyugodt körülmények közé kerülve, inkább az aktuálisan rendelkezésükre álló energiaforrást hasznosítják, kímélik zsírtartalékukat. Ezt bizonyítja az az MRI eredmény is, hogy a CVS utáni három nap alatt az egerek teljes zsírszöve szignifikánsan megnőtt a kontrollokhoz képest (**9. A ábra**). A krónikus stressz szignifikáns hatását a légzési hányadosra már mások is publikálták. Krónikus szociális stressz procedúrát követően az alárendelt státuszú egerek indirekt kalorimetriával mért RER értéke ugyancsak szignifikánsan magasabbnak bizonyult a kontroll csoporthoz képest (Sanghez et al., 2013).

A nappali időszakban szignifikáns genotípus különbséget is detektáltunk a kísérleti állatok RER értékeiben. A CVS-en átesett fraktalkin receptor deficiens egerek már a

második nyugalmi napon, a nappali fázisban csökkentették szelektív szénhidrátégetésüket. A CX3CR1-/- egerek zsírszöveti felhalmozása is kisebb volt, mint a vad típusú állatoké, bár ez a különbség nem volt szignifikáns. Feltételezhető ez alapján a fraktalkin receptor hiányos egerek gyorsabb metabolikus adaptációja. A fraktalkin periférián betöltött metabolikus szerepe szintén kutatott téma. A fraktalkin hatással van a hasnyálmirigy inzulin termelő b-sejtjeire is (Rutti et al 2014), és mivel a fraktalkint zsírsejtek is expresszálják, ami a fraktalkin receptort expresszáló leukocitákat a zsírszövetbe vonzza, ezáltal fokozza a zsírszöveti gyulladást. Munkacsoportunk leírta, hogy a tíz hetes magas zsírtartalmú diétán tartott fraktalkin receptor deficiens egerek kevésbé híztak el, a viscerális fehér zsírszövetük mennyisége kisebb maradt, mint az ép fraktalkin szignalizációval rendelkező állatoknak. Továbbá az elhízalt CX3CR1-/- egerekben nem alakult ki glükóz intolerancia, és a zsírszöveti gyulladás mértéke is kisebb volt, amit ráadásul a vad típusú állattól eltérő fehér zsírszöveti citokin expressziós mintázat kísért (Polyák et al., 2014). Azt is bizonyították már, hogy a fraktalkin szignalizáció hiányában lecsökken a magas zsírtartalmú tápon tartott egerekben a makrofágok barna zsírszövetbe történő akkumulációja is (Polyák et al., 2016). A barna zsírszövet esszenciális szerepet tölt be a metabolikus és termoregulációban, és nagy morfológiai és funkcionális plaszticitása van a környezeti és metabolikus változásokra. Így például elhízalt állatokban a barna zsírszövet „gyulladását” a lipogénikus enzimek fokozott expressziója kíséri, ami a barnazsírszövet „kifehéredését” eredményezi (Polyák et al., 2016). Nem kizárt, hogy a krónikus variábilis stresszt követő metabolikus mérésekben tapasztalt szignifikáns változások a barna zsírszövet plaszticitásának köszönhető.

A metabolikus paraméterek tekintetében jövőbeli célunk indirekt kalorimetriás mérést végezni akut stressz közben, illetve érdekes lenne megvizsgálni, hogy a krónikus stressz procedúra különböző (hetenkénti) időpontjaiban hogyan alakulnak a fő metabolikus paraméterek? Továbbá szeretnénk választ kapni arra is, hogy az eltérő genotípusú egerek metabolikus válaszában időbeli lefolyása különbözik-e egymástól? A megfigyelt metabolikus különbségek mögött álló mechanizmusok feltérképezésére további génexpressziós méréseket tervezünk perifériás szervekből (máj, barna- és fehér zsírszövet), valamint az energia-háztartást szabályozó agyterületekből.

6.2. Mikroglia aktiváció a nucleus arcuatusban és a paraventriculáris magban

A mikroglia aktivációja szerepet játszik számos kórkép kialakításában, mint például az Alzheimer-kór, Parkinson-kór, prionbetegségek, szklerózis multiplex és a HIV demencia (Dheen et al., 2007; Schlachetzki és Hüll, 2009), másrészt kialakulhat speciális hatások, kezelések következtében is. Ide tartozik például a stroke és a bakteriális eredetű lipopoliszacharid intracerebroventrikuláris vagy intraperitoneális beinjektálása (Chen et al., 2012; Pablos et al., 2014). Több agyterületen leírtak pszichoszociális stressz hatására bekövetkező mikroglia aktivációt jelző morfológiai változásokat (Wohleb et al., 2013). Újabb megfigyelések alapján azonban metabolizmust érintő kezelések (pl. magas zsírtartalmú diéta) is befolyásolják a mikroglia aktivációját az agyban, és hatásukra a periférián lévő szövetek gyulladása mellett, hipotalamikus gyulladás is létrejöhet (Kälin et al., 2015; Mamounis és Reopke, 2015). A magas zsírtartalmú diétával való kezelés első hetében reaktív gliózis és neuron károsodás következhet be, mely a kezelés folytatásával azonban visszahúzódik és a mediobazalis hipotalamusz területére korlátozódik (Thaler et al., 2012). A magas zsírtartalmú tápon tartott egerek hipotalamikus mikroglia aktiválódását sikerült munkacsoportunknak is megerősíteni (Nem publikált adat). A jelenséget patkányokon és egereken kívül, emberi esetekben is megfigyelték. MRI-vel kimutatták, hogy elhízott emberek agyának mediobazalis hipotalamuszában szintén megnövekedett a gliózisok száma. Ezek alapján kijelenthető, hogy az elhízás összefüggésbe hozható agyi neuronális sérülésekkel, melyekben a mikroglia is érintett lehet és ezek a változások a testsúly megváltozott szabályozását eredményezik (Thaler et al., 2012).

Vizsgálatunkban a mikroglia tanulmányozására Iba-1 festést alkalmaztunk. Az Iba-1-re specifikus antitest, az emlősök központi idegrendszerében (KIR) jelenlévő aktivált makrofágok és mikroglia sejtek szövettani jelölésére szolgál. Agyi sérülések, neuronális sejthalál hatására megnövekszik az aktivált mikroglia sejtek reprezentáltsága. Immunhisztokémiai és gén expressziós vizsgálatok kimutatták, hogy az Iba-1 expresszióját a központi idegrendszerben mechanikai sérülések és kémiai stimulusok (ATP) szabályozzák. Kísérletünkben a fluoreszcensen előhívott Iba-1-re specifikusan festett nucleus arcuatus metszeteken szignifikáns különbséget mértünk. A krónikusan stresszelt csoportok közül a vad típusú egyedek mikrogliajának integrált denzitása magasabb volt a kontroll csoportok állataihoz képest. Míg a CVS-en átesett CX3CR1^{-/-} egerekben az Iba-1 pozitív mikroglia sejtek immunreaktivitása szignifikánsan kisebb volt, mint a vad típusú társaikban. Ez alapján állíthatjuk, hogy a krónikus variábilis stressz ezen agyterületen fokozta az Iba-1 fehérje expresszióját, vagyis a mikroglia sejtek aktiválódását nucleus arcuatusban a vad típusú

egerekben, de a fraktalkin receptor hiányos egerekben nem. A DAB-bal előhívott Iba-1 immunhisztokémiai elemzésből a nucleus arcuatus esetén azt kaptuk, hogy bár nem szignifikánsan, de megnövekedett a kontroll csoportok állataihoz képest a krónikusan stresszelt egyedek mikroglia sejtszáma az ARC területén (**17. A ábra**). Ugyancsak ez a tendencia figyelhető meg az Iba-1 pozitív sejtek sejttest/sejt arányát, és az általuk elfoglalt területét illetően is. A sejtek nyúlványozottságában nem találtunk eltérést a különböző kezelési és genotípusú csoportok között. Ugyanakkor a paraventrikuláris mag fénymikroszkópos vizsgálata során nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést az mikroglia sejtek paramétereiben. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy eredményeink területspecifikusak.

Egy kísérletben azt találták, hogy lipopoliszaharid kezelést követően négy órával, az agykéreg és a hippokampusz területén az Iba-1 mRNS csökkenése mérhető, de ezzel egyidőben az Iba-1 fehérje expressziója fokozódik, ami viszont a mikroglia aktivációt jelzi (Silverman et al., 2014). A mikroglia aktivációját sokáig egyetlen módon tudták elképzelni: a sejt egy nyugvó, inaktív állapotból átalakul egy aktív állapotot jelző amőboid, makrofághoz hasonló sejté. Új kísérleti technikáknak köszönhetően mára kiderült, hogy a kép árnyaltabb, a mikrogliának számos morfofunkcionális állapota van, ami inkább mozog egy folytonos skála mentén, mint sem egyszerűen leírható kategóriákról beszélhetünk. Megjelenési formájuk attól függ, hogy meddig és milyen stimulus éri ezeket a sejteket. Ugyanakkor a mikroglia morfológiai változása önmagában nem írja le az aktivált sejt funkcionális polarizáltságát. Ehhez szükséges vizsgálnunk azt is, hogy a mikroglia sejtek milyen citokin expressziós mintázatot mutatnak (Silverman et al., 2014).

A fentiek alapján a továbbiakban célszerű lenne megvizsgálni, hogy milyen proinflammatorikus citokineket (pl. IL-1a, IL-1b, TNFa) illetve antiinflammatorikus citokineket (IL-10, IL-4) termelnek az Iba-1 pozitív sejtek nucleus arcuatusban? Ezáltal ugyanis információt szerezhetnénk a mikroglia sejtek funkcionális tulajdonságairól. Ugyanakkor a NPY és a POMC mRNS fluoreszcens in situ hibridizációjának, illetve az Iba-1 immunhisztokémia kombinációjával felderíthetnénk, hogy az aktivált mikroglia sejtek nyúlványai orexigén vagy anorexigén neuronokkal állnak-e kapcsolatban?

7. Összefoglalás

A modernizáció hatására nő az alkalmazkodásra készítő ingerek, stresszorok száma. Ezen pszichoszociális és fizikai behatások szervezet szintű, komplex választ, stresszt indukálnak. A neuroendokrinológiai és immunológiai válaszok mellett a krónikus variábilis stressz (CVS) az anyagcsere folyamatokban is változást okoz.

Az agy mikroglia sejtjei jelentős szerepet játszanak a neuroinflammatorikus folyamatok létrehozásában és az idegsejthálózatok szinapszisainak átrendezésében. Mivel a fraktalkin az egyik fontos kemokin, amit neuronok termelnek és specifikus receptoruk (CX3CR1) mikroglia sejteken van, kulcsszerepet tölt be a neuron-mikroglia kommunikációban, befolyásolván a mikroglia aktivációt.

Célunk a CVS hatására bekövetkező szervezet szintű metabolikus, és a mikroglia aktivációt jelző morfológiai változások detektálása a metabolikus szabályozásban kulcsszerepet játszó arcuatus magban és a stressz tengelyt aktiváló paraventriculáris magban. Kísérletünkben fraktalkin szignalizáció hibás, transzgénikus egereket használtunk (CX3CR1^{-/-}, genetikai háttér: C57Bl6). Az állatokat felnőttkorukban négy héten át tartó, CVS-nek tettük ki. A kísérlet során feljegyeztük az állatok testtömeg változásait, majd a stressz procedúra végén indirekt kalorimetria segítségével felvételeztük főbb metabolikus paramétereiket. Megmértük a mellékvesék tömegét, illetve a vér kortikoszteron koncentrációját. Az agyi mikroglia morfológiai változásait specifikus, mikroglia aktivációt jelző molekuláris marker (Iba1) használatával, klasszikus és fluoreszcens immunhisztokémiai módszerekkel vizsgáltuk.

A CVS-nek kitett egerek mellékvese tömege és plazma kortikoszteron koncentrációja szignifikánsan nőtt a kontrollokéhoz képest. A stresszelt egyedek testtömeg-gyarapodása a kezelés idején szignifikánsan elmaradt, a nyugalmi időszakban pedig megnőtt a nem stresszelt állatokétól. A CVS megnövelte a CX3CR1^{-/-} állatok éjszakai lokomotoros aktivitását vad típusú és kontroll társaikhoz képest. Továbbá, stressz hatására a kontroll csoport egereitől szignifikáns növekedést mutatott az egyedek energiafelhasználása, illetve éjszakai táplálékfelvétele és légzési hányadosa (RER). Valamint, CVS hatására az egyik fő energia-homeosztázist szabályzó agyterületen, a nucleus arcuatusban (ARC) megnőtt a mikroglia sejtek Iba1festődési intenzitása vad típusú egyedekben, míg CX3CR1^{-/-} egerekben nem.

Összefoglalva, a CVS hatással volt az egerek metabolikus paramétereire és az ARC-ban létrejövő mikroglia aktivációra, melyben szerepe volt a fraktalkin szignalizációnak.

8. Summary

Psychosocial and physical stressors posed by the modern lifestyle, induce centrally mediated complex adaptive changes referred to as systemic stress response. In addition to the neuroendocrine and immune changes, chronic stress results in significant rearrangements in the metabolism.

Microglia - the resident macrophages of the brain - play an important role in generating neuroinflammatory processes, and contribute to the formation, operation and adaptation of neuronal circuitry in health and disease. Fractalkine is a key regulator of microglial activity and is highly involved in neuron-microglia communication upon binding to G-protein coupled receptor CX3CR1 on microglial cells.

The aim of our experiment was to characterize chronic variable stress (CVS) - induced metabolic changes, and associated microglial morphofunctional alterations in metabolic and stress-related brain regions. In the experiment we used wild type C57Bl6 mice and transgenic mice with impaired fractalkine signaling (CX3CR1^{-/-}, C57Bl6 background). Adult male mice were exposed to chronic variable stress for four weeks. Body weight of the animals and the main metabolic parameters were analyzed by indirect calorimetry. Iba-1 immunohistochemistry followed by morphometrical analysis was used to visualize morphological changes of microglia in the arcuate nucleus.

CVS procedure significantly increased the weight of the adrenal glands and plasma corticosterone indicating increased hypothalamo-pituitary-adrenocortical activation. In addition, significant changes were detected in body composition, home cage locomotor activity and metabolic parameters after CVS. Chronic stress resulted in increased respiratory exchange ratio (RER) in wild type but not in CX3CR1^{-/-} animals. Furthermore, chronic stress resulted in microglia activation in the arcuate nucleus, which is one of the main energy sensor in the brain, but this activation was not seen in stressed CX3CR1^{-/-} mice.

In conclusion, we provided evidence for chronic stress induced metabolic changes in mice and that were parallel with activation of microglia in the hypothalamic arcuate nucleus, which have a key regulatory role in food intake and energy metabolism. Because these stress-induced changes were not fully seen in CX3CR1^{-/-} mice, we hypothesized the role of fractalkine signaling in mediating chronic stress induced activation of hypothalamic microglia and related metabolic changes.

9. Irodalomjegyzék

1. BIBER, K., NEUMANN, H., INOUE, K., BODDEKE, H.W., 2007: Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends Neurosci.* 30(11):596-602.
2. BIBER, K., VINET, J., BODDEKE, H.W., 2008: Neuron-microglia signaling: chemokines as versatile messengers. *J Neuroimmunol.* 198(1-2):69-74.
3. BOCHE, D., PERRY, V.H, NICOLL, J.A., 2013: Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 39(1):3-18.
4. CHEN, Z., JALABI, W., SHPARGEL, K.B., FARABAUGH, K.T., DUTTA, R., YIN, X., KIDD, G.J., BERGMANN, C.C., STOHLAM, S.A., TRAPP, B.D., 2012: Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. *J Neurosci.* 32(34):11706-15.
5. DHEEN, S.T., KAUR, C., LING, E.A., 2007: Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem.* 14(11):1189-97.
6. ESCH, T., STEFANO, G.B., FRICCHIONE, G.L., BENSON, H., 2002: The role of stress in neurodegenerative diseases and mental disorders. *Neuro Endocrinol Lett.* 23(3):199-208.
7. FONYÓ, A., 2011: Az orvosi élettan tankönyve. Budapest, Medicina Könyvkiadó Zrt. p.896
8. GOLDEN, S.A., COVINGTON, H.E.3RD., BERTON, O., RUSSO, S.J., 2011: A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat Protoc.* 6(8):1183-91.
9. GONCHAROVA, N.D., 2013: Stress responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: age-related features of the vasopressinergic regulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 4:26.
10. JOELS, M., BARAM, T.Z., 2009: The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci.* 10(6):459-466.
11. JOLY-AMADO, A., CANSELL, C., DENIS, R.G., DELBES, A.S., CASTEL, J., MARTINEZ, S., LUQUET, S., 2014: The hypothalamic arcuate nucleus and the control of peripheral substrates. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metlab.* 28(5):725-37.
12. JURGENS, H.A., JOHNSON, R.W., 2012: Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. *Exp Neurol.* 233(1):40-8.
13. HABR, S.F., MACRINI, D.J., FLORIO, J.C., BERNARDI, M.M., Repeated forced swim stress has additive effects in anxiety behavior and in catecholamine levels of adult rats exposed to deltamethrin. *Neurotoxicol Teratol.* 46:57-61.
14. HOOGLAND, I.C., HOUBOLT, C., VAN WESTERLOO, D.J., VAN GOOL, W.A., VAN DE BEEK, D., 2015: Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation.* 12:114.
15. JEONG, J.Y., LEE, D.H., KANG, S.S., 2013: Effects of Chronic Restraint Stress on Body Weight, Food Intake, and Hypothalamic Gene Expressions in Mice. *Endocrinol Metlab (Seoul).* 28(4): 288–296.
16. KAUR, C., HAO, A.J., WU, C.H., LING, E.A., 2001: Origin of microglia. *Microsc Res Tech.* 54(1):2-9.
17. KALIN, S., HEPPNER, F.L., BECHMANN, I., PRINZ, M., TSCHÖP, M.H., YI, C.X., 2015: Hypothalamic innate immune reaction in obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 11(6):339-51.

18. KETTENMANN, H., KIRCHOFF, F., VERKHRATSKY, A., 2013: Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*. 77(1):10-8.
19. KONDOH, K., LU, Z., YE, X., OLSON, D.P., LOWELL, B.B., BUCK, L.B., 2016: A specific area of olfactory cortex involved in stress hormone responses to predator odours. *Nature*. 532(7597):103-6.
20. LEVINE, A.S., MORLEY, J.E., 1981: Stress-induced eating in rats. *Am J Physiol*. 241(1):R72-6.
21. LING, E.A., NG, Y.K., WU, C.H., KAUR, C., 2001: Microglia: its development and role as a neuropathology sensor. *Prog Brain Res*. 132:61-79.
22. MAMOUNIS, K., REOPKE, T., 2015: Obesity and Hypothalamic Inflammation from High Fat Diets of Different Fatty Acid Profile. *The FASEB Journal*. 746.2.
23. MINEUR, Y.S., BELZUNG, C., CRUSIO, W.E., 2006: Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behav Brain Res*. 175(1):43-50.
24. NIMMERJAHN, A., KIRCHHOFF, F., HELMCHEN, F., 2005: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 308(5726):1314-8.
25. MELLO, A.F., MELLO, M.F., CARPENTER, L.L., PRICE, L.H., 2003: Update on stress and depression: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Rev Bras Psiquiatr*. 25(4):231-8.
26. MOLES, A., BARTOLOMUCCI, A., GARBUGINO, L., CONTI, R., CAPRIOLI, A., COCCURELLO, R., RIZZI, R., CIANI, B., 2006: Psychosocial stress affects energy balance in mice: modulation by social status. *Psychoneuroendocrinology*. 31(5):623-33.
27. MONTEIRO, S., ROQUE, S., DE SÁ-CALCADA, D., SOUSA, N., CORREIA-NEVES, M., CERQUEIRA, J.J., 2015: An efficient chronic unpredictable stress protocol to induce stress-related responses in C57BL/6 mice. *Front Psychiatry*. 6:6.
28. MORLEY, J.E., LEVINE, A.S., ROWLAND, N.E., 1983: Stress induced eating. *Life Sciences*. 32(19):2169-82.
29. MOSSER, D.M., EDWARDS, J.P., 2008: Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 8(12):958-69.
30. PABLOS, DE R.M., HERRERA, A.J., ESPINOSA-OLIVIA, A.M., SARMIENTO, M., MUNOZ, M.F., MACHADO, A., VENERO, J.L., 2014: Chronic stress enhances microglia activation and exacerbates death of nigral dopaminergic neurons under conditions of inflammation. *J Neuroinflammation*. 11:34.
31. PAOLICELLI, R.C., BISHT, K., TREMBLAY, M.É., 2014: Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. *Front Cell Neurosci*. 8:129.
32. POLYÁK, A., FERENCZI, S., DÉNES, A., WINKLER, Z., KRISZT, R., PINTÉR-KÜBLER, B., KOVÁCS, K.J., 2014: The fractalkine/Cx3CR1 system is implicated in the development of metabolic visceral adipose tissue inflammation in obesity. *Brain Behav Immun*. 38:25-35.
33. POLYÁK, Á., WINKLER, ZS., KUTI, D., FERENCZI, S., KOVÁCS, K.J., 2016: Brown adipose tissue in obesity: Fractalkine-receptor dependent immune cell recruitment affects metabolic-related gene expression. *Biochim Biophys Acta*. 1861(11):1614-1622.
34. RUTTI, S., AROUS, C., ACHVARTZ, D., TIMPER, K., SANCHEZ J-C., DERMATZAKIS, E., DONATH, M.Y., HALBAN, P.A., BOUZAKRI, K., 2014: Fractalkine (CX3CL1), a new factor protecting β -cells against TNF α . *Mol Metab*. 3(7): 731-741.

35. SANGHEZ, V., RAZZOLI, M., CAROBBIO, S., CAMPBELL, M., MCCALLUM, J., CERO, C., CERESINI, G., CABASSI, A., GGOVONI, P., FRANCESCHINI, P., DE SANTIS, V., GURNEY, A., NINKOVIC, I., PARMIGIANI, S., PALANZA, P., VIDAL-PUIG, A., BARTOLOMUCCI, A., 2013: Psychosocial stress induces hyperphagia and exacerbates diet-induced insulin resistance and the manifestations of the Metabolic Syndrome. *Psychoneuroendocrinology*. 38(12):2933-42.
36. SCHLACHETZKI, J.C., HÜLL, H., 2009: Microglial activation in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 6(6):554-63.
37. SHERIDAN, G.K., MURPHY, K.J., 2013: Neuron-glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage. *Open Biol*. 3(12):130181.
38. SILVERMAN, H.A., DANCHO, M., REGNIER-GOLANOV, A., NASIM, M., OCHANI, M., OLOFSSON, P.S., AHMED, M., MILLER, E.J., CHAVAN, S.S., GOLANOV, E., METZ, C.N., TRACEY, K.J., PAVLOV, V.A., 2014: Brain region-specific alterations in the gene expression of cytokines, immune cell markers and cholinergic system components during peripheral endotoxin-induced inflammation. *Mol Med*. 20:601-11.
39. SMITH, S.M., VALE, W.W., 2006: The Role of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Neuroendocrine Responses to Stress. *Dialogues Clin Neurosci* 8 (4), 383-395.
40. THALER, J.P., YI, C.X., SCHUR, E.A., GUYENET, S.J., HWANG, B.H., DIETRICH, M.O., ZHAO, X., SARRUF, D.A., IZGUR, V., MARAVILLA, K.R., NGUYEN, H.T., FISCHER, J.D., MATSEN, M.E., WISSE, B.E., MORTON, G.J., HORVATH, T.L., BASKIN, D.G., TSCHÖP, M.H., SCHWARTZ, M.W., 2012: Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest*. 122(1):153-62.
41. TANG, Y., LE, W., 2016: Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 53(2):1181-94.
42. TORRES, S.J., NOWSON, C.A., 2007: Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition*. 23(11-12):887-94.
43. TREMBLAY, M.E., MAJEWSKA, A.K., 2011: A role for microglia in synaptic plasticity? *Commun Integr Biol*. 4(2):220-2.
44. TYNAN, R.J., NAICKER, S., HINWOOD, M., NALIVAICO, E., BULLER, K.M., POW, D.V., DAY, T.A., WALKER, F.R., 2010: Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. *Brain Behav Immun*. 24(7):1058-68.
45. YAU, Y.H., POTENZA, M.N., 2013: Stress and eating behaviours. *Minerva Endocrinol*. 38(3):255-67.
46. VEENEMA, A.H., REBER, S.O., SELCH, S., OBERMEIER, F., NEUMANN, I.D., 2008: Early life stress enhances the vulnerability to chronic psychosocial stress and experimental colitis in adult mice. *Endocrinology*. 149(6):2727-36.
47. WOHLER, E.S., POWELL, N.D., GODBOUT, J.P., SHERIDAN, J.F., 2013: Stress-induced recruitment of bone marrow-derived monocytes to the brain promotes anxiety-like behavior. *J Neurosci*. 33(34):13820-33.

10. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Kovács Krisztinának kutatási témaválasztásom lehetőségét és munkám minden fázisát támogató szakmai segítségét. Hálával tartozom Winkler Zsuzsannának a vizsgálatokba való gyakorlati bevezetésért és hasznos tanácsaiért, mellyel kísérleti munkám minden fázisát, továbbá dolgozatom elkészülését felügyelte. Továbbá a KOKI Neuroendokrinológia Kutatócsoport valamennyi tagjának a kísérleti munkavégzés során nyújtott önzetlen támogatásért. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm Csonka Diánának iránymutatását, mely segített ezt a tudományos érdeklődési területemnek megfelelő összetartó, segítőkész munkacsoportot megtalálni.

11. Szerzői jogi nyilatkozat

HuVetA

ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: Horváth Krisztina

Elérhetőség (e-mail ím): falatka008@gmail.com

A feltöltendő mű címe: Krónikus pszichés stressz indukálta metabolikus változásokat kísérő mikrogliá aktiváció vizsgálata egér hipotalamuszban

A mű megjelenési adatai: 2017, Budapest, Biológiai Intézet

Az átadott fájlok száma: 1

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédtől PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

- ☐ engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- ☐ az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- ☐ a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- ☐ csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**

☐

Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2017. 04. 23.

aláírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

—

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hútyra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;
- a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;
- az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;
- a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,
- a nyílt hozzáférés támogatása.

12. Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Dr. Kovács Krisztina, mint témavezető nyilatkozom, hogy Horváth Krisztina II. évfolyamos biológus MSc hallgató „Krónikus pszichés stressz indukálta metabolikus változásokat kísérő mikroglia aktiváció vizsgálata egér hipotalamuszban” című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2017. 04. 23.

.....

a témavezető neve és aláírása

.....

tanszék

13. Társtémavezetői nyilatkozat

Alulírott Winkler Zsuzsanna, mint társtémavezető nyilatkozom, hogy Horváth Krisztina II. évfolyamos biológus MSc hallgató „Krónikus pszichés stressz indukálta metabolikus változásokat kísérő mikroglia aktiváció vizsgálata egér hipotalamuszban” című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2017. 04. 23.

.....
a társtémavezető neve és aláírása

.....
tanszék

14. Belső konzulensi nyilatkozat

Alulírott Csonka Diána, mint belső konzulens nyilatkozom, hogy Horváth Krisztina II. évfolyamos biológus MSc hallgató „Krónikus pszichés stressz indukálta metabolikus változásokat kísérő mikroglia aktiváció vizsgálata egér hipotalamuszban” című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2017. 04. 23.

.....

a belső konzulens neve és aláírása

.....

tanszék