A NESFATIN ÉS A MELANIN-KONCENTRÁLÓ HORMON SZEREPE A VIGILANCIA SZABÁLYZÁSÁBAN; A NESFATIN EEG HATÁSÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA ESCITALOPRAMMAL, AZ SSRI ANTIDEPRESSZÁNSSAL

Doktori tézisek

Kalmárné Vas Szilvia

Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola
Semmelweis Egyetem

Témavezetők:	Dr. Bagdy György, D.Sc Dr. Tóth Zsuzsanna, PhD
Hivatalos bírálók:	Dr. Molnár Márk, D.Sc Dr. Zachar Gergely, Ph.D
Szigorlati bizottság elnöke:	Dr. Köles László, Ph.D
Szigorlati bizottság tagjai:	Dr. Miklya Ildikó, Ph.D Dr. Wittner Lucia, Ph.D

Budapest
2015

1. BEVEZETÉS

A hypothalamus, számos élettani funkció agyi integrátoraként, kulcsszereppel bír az alvás-ébrenlét szabályzásában is, ezáltal a különböző neuropeptideket expresszáló hypothalamicus idegsejt populációk alvás-ébrenléti ciklus szabályzásában betöltött szerepe intenzív kutatás tárgyát képzi, számtalan nyitott kérdéssel.

A 19 aminosavat tartalmazó melanin-koncentráló hormon (melanin-concentrating hormone, MCH) alvásszabályzásban betöltött szerepét számos tudományos bizonyíték támasztja alá, egyéb fontos élettani funkciói mellett, mint például a táplálékfelvétel és energiaegyensúly szabályzása, de jelentőségét egyes kórfolyamatok kialakulásában is valószínűsítik, például depresszióban és elhízásban. Az MCH neuropeptidet tartalmazó idegsejtek hypothalamicus/thalamicus struktúrákban találhatók meg, az orexin/hypocretin-tartalmú neuronokkal szoros összefonódásban. Az MCH- és orexin/hypocretin-tartalmú sejtpopulációk interakciójának központi szerepet tulajdonítanak az egyes alvás-ébrenléti stádiumok közötti átkapcsolások stabilizálásában.

Az MCH neuropeptid alvás-ébrenléti ciklus szabályzásában betöltött szerepét mutatja, hogy centrális beadása jelentős mértékben fokozta a gyors szemmozgással kísért (rapid eye movement, REM) alvást (~200%), valamint kisebb mértékben a non-REM alvásban töltött időt. Továbbá, az MCH 1 receptorán (MCHR1) ható antagonisták dózisfüggően csökkentették a mély lassú hullámú alvásban és REM alvásban töltött időt, míg az aktív és passzív ébrenlétben töltött idő megnőtt.

Laborunk patkány modellen kimutatott korábbi eredményei pozitív korrelációt találtak az MCH-tartalmú sejtek neuronális (Fos) aktivációja és a REM alvásban töltött idő között a 72-órás REM alvásmegvonást követő 3-

órás REM visszacsapással jellemezhető alvás (’REM alvás visszacsapás’) során. E ’REM alvás visszacsapás’, mely a REM-ben töltött idő körülbelül 6-7-szeres növekedésével jellemezhető, az MCH-sejtek neuronális aktivációjában jelentős fokozódással párosul. Arról azonban nincs adat az irodalomban, hogy a ’REM alvás visszacsapás’ okoz-e különbséget az egyes hypothalamicus/thalamicus struktúrák MCH populációinak neuronális aktivációjában.

Noha az MCH-tartalmú neuronok jelentősége az alvásszabályozásban már ismert, a vele ko-expresszálódó nesfatin-1/NUCB2 (nesfatin) neuropeptid szerepét, valamint különböző hypothalamicus /thalamicus struktúrákban mérhető expresszióját munkánk megkezdéséig még nem vizsgálták. A 82 aminosavat tartalmazó nesfatin-1 neuropeptid a NEFA/nucleobinding-2 (NUCB2) prohormon poszttranszlációs hasításával keletkezik. A nesfatin a központi idegrendszerben széles körben megtalálható, de a legnagyobb nesfatin-tartalmú idegsejt populáció patkányban a hypothalamus perifornicalis area (PFA) és laterális hypothalamicus area (LH), valamint a thalamicus zona incerta (ZI) területén található. A hypothalamicus/thalamicus MCH neuronok mindegyike ko-expresszál nesfatint, azonban a nesfatint tartalmazó neuronok viszonylag kisebb populációja nem tartalmaz MCH-t. Míg az MCH esetében táplálékfelvételt növelő, energia-raktározó hatást mutattak ki, addig a nesfatin jóllakottság érzetet vált ki, mely patkányban főként a sötét (aktív) fázis alatti táplálékfelvételt csökkenti. Egyre több tudományos adat bizonyítja, hogy a nesfatin egyéb fontos élettani funkciókban is részt vesz, mint például a testhőmérséklet, vérnyomás, stressz-válasz és reprodukciós működések szabályzása. A nesfatin szerepét stresszel összefüggő pszichiátriai kórképek pathomechanizmusában is valószínűsítik, például szorongásban és depresszióban.

Az MCH és nesfatin neuropeptidek REM alvással való összefüggésének vizsgálatára a klasszikus ’virágcserép’ (’flower pot’) módszert alkalmaztunk. Ennek során szelektív REM alvásmegvonással ’REM alvás visszacsapást’ idéztünk elő, mellyel a REM alvás szabályozásában feltehetően szerepet játszó struktúrák fokozott idegi aktivációját válthatjuk ki. Az sem volt ismeretes az irodalomban, hogy az emelkedett szerotonerg tónus, mely köztudottan REM alvást csökkentő hatású még a fokozott REM mennyiséggel jellemezhető ’REM alvás visszacsapás’ során is, módosítja-e az MCH sejtek neuronális aktivációját. Az MCH- és nesfatin-pozitív neuronok ’REM alvás visszacsapás’-okozta aktivációját különböző hypothalamicus/thalamicus struktúrákban vizsgáltuk, nevezetesen a ZI-ban, LH-ban és a PFA-ban. Tekintve, hogy a nesfatin vigilancia-szabályzásban betöltött szerepéről nem állt rendelkezésre irodalmi adat, e kérdést immunhisztokémiai és elektrofiziológiai eszközökkel igyekeztünk megközelíteni patkány modellen.

2. CÉLKITŰZÉSEK

(1) Célunk annak vizsgálata volt, hogy a ’REM alvás visszacsapás’ okoz-e különbséget különböző hypothalamicus/thalamicus magvak MCH sejtpopulációinak neuronális aktivációjában, nevezetesen a ZI-ban, a LH-ban és a PFA-ban.

(2) Tekintve, hogy escitalopram, az extracelluláris szerotonin-szintet növelő antidepresszáns a REM alvás mennyiségét még a ’REM alvás visszacsapás’ során is képes csökkenteni, vajon hogyan befolyásolhatja az MCH-tartalmú sejtek ’REM alvás visszacsapás’ hatására kialakuló neuronális aktivációját a vizsgált hypothalamicus/thalamicus területeken?

(3) Hogyan változik a nesfatin-tartalmú sejtek aktivációja a vizsgált hypothalamicus/thalamicus területeken ’REM alvás visszacsapás’ hatására? Van-e különbség az MCH-pozitív és MCH-negatív nesfatint-tartalmazó sejtek neuronális aktivációjában?
(4) Hogyan befolyásolja az intracerebroventrikulárisan (icv), a passzív fázis kezdetén beadott nesfatin-1 az alvás-ébrenléti ciklus mintázatát?
(5) Hogyan módosítja a passzív fázis kezdetén icv bejuttatott nesfatin-1 a különböző alvás-ébrenléti stádiumok kvantitatív EEG spektrumát?
(6) A nesfatin-1 hatásában szerotonerg tónusnövekedést feltételezve, találunk-e hasonlóságot az icv beadott nesfatin-1 és a 2 ill. 10 mg/kg dózisban adagolt escitalopram kvantitatív EEG spektrumra gyakorolt hatása között?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérleteket valamint az állatok tartását az Európai Közösség 1986. november 24-ei 86/609/EEC számú direktívájának, a National Institute of Health (NIH) “Principles of Laboratory Animal Care” ajánlása alapján végeztük. Kísérleteinket az Állatkísérletes Tudományos Etikai Tanács jóváhagyásával és a Pest Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság 22.1/1375/7/2010 iktatószámú engedélye alapján végeztük. Kísérleteink során hím (300-350 g súlyú) Wistar patkányokat használtunk.

3.1. *Első és Második kísérlet – Immunhisztokémia (IHC)*

3.1.1. A ’flower pot’ (’virágcserép’) REM alvásmegvonás

A ‘flower pot’ elnevezésű szelektív REM alvásmegvonást célzó módszer, a REM alvás egyik fő jellemzőjén, az izomtónus megszűnésén alapul. Az alvásmegvonás során a patkányokat egy vízzel teli tartályban kisméretű felfordított virágcserép (’small pot’, azaz ’kis porond’) felszínére helyezzük, így amint REM alvásba jutnak, izomtónus hiányában beleesnek a vízbe és felébrednek. A 72-órás ’kis porondon’ történő REM alvásmegvonást (’small pot deprived’ angol kifejezés alapján, SPD csoport) követően az állatok egy részét saját ketrecébe helyezzük vissza egy 3-órás zavartalan alvásra, mely időszakot a magas REM mennyiség folytán ’REM alvás visszacsapás’-ként említünk (’small pot rebound’ angol kifejezés alapján, SPR csoport). A REM alvásmegvonást (SPD csoport) ill. a ’REM alvás visszacsapás’ (SPR csoport) időszakát követően az állatok szervezetébe transzkardiális perfúzióval 4%-os paraformeldehid oldatot vezetünk, mellyel az agyszövetet fixáljuk és immunhisztokémiai vizsgálatra készítjük fel.

3.1.2. Immunhisztokémia

Az MCH- és nesfatin-tartalmú idegsejt populációk aktivációját MCH/Fos kettős- (*Első kísérlet)* illetve MCH/nesfatin/Fos hármas immunfestéssel (*Második kísérlet)* vizsgáltuk paraformaledhid-fixált 50µm-vastagságú metszeteken. Az MCH/Fos immunfestés esetén DAB (3,3’-diaminobenzidin)/NiDAB fénymikroszkópos technikát, míg az MCH/nesfatin/Fos immunfestés esetén fluoreszcens technikát alkalmaztunk. A neuronális aktivációt a Fos korai géntermék immunfestésével tettük láthatóvá. A morfometriai vizsgálat során meghatároztuk *(Első kísérlet)* az MCH-pozitív idegsejtek aktiválódott (Fos-pozitív) részét, valamint az

MCH-pozitív és MCH-negatív nesfatin-tartalmú neuronok aktiválódott hányadát *(Második kísérlet)*.

3.1.3. Kísérleti csoportok

Az *Első kísérlet* során annak vizsgálatára, hogyan befolyásolja az emelkedett szerotonerg tónus az MCH-tartalmú neuronok ’REM alvás visszacsapás’-okozta fokozott aktivációját, escitalopramot, egy szelektív szerotonin visszavétel gátló (selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI) antidepresszánst alkalmaztunk 10 mg/kg intraperitoneális (ip) injekció formájában, valamint vivőanyagot a kontroll csoport esetében.

Az immunhisztokémiai vizsgálatok során a következő kísérleti csoportokat alkalmaztuk:

Első kísérlet: vivőanyaggal (veh) vagy escitaloprammal (SSRI) kezelt ’kis porondon’ tartott 72-órás REM alvásmegvonáson, majd 3-órás ‘REM alvás visszacsapáson’ (’REM rebound’-on) átesett állatok (SPR-veh és SPR-SSRI), valamint vivőanyaggal vagy escitaloprammal kezelt saját ketrecben (home cage, HC) tartott állatok (HC-veh és HC-SSRI) csoportjai.
Második kísérlet: kis porondon tartott REM alvás-megvont (SPD), kis porondon tartott majd ‘REM alvás visszacsapás’-on átesett (SPR) és saját ketrecben tartott (HC) állatok csoportjai.

3.2. *Harmadik és Negyedik kísérlet - Elektroenkefalográfia (EEG)*

Az exogén úton (icv) beadott nesfatin-1 alvás-ébrenléti ciklus mintázatára és kvantitatív EEG teljesítményspektrumára gyakorolt

hatásának vizsgálata céljából *(Harmadik kísérlet)*, valamint a nesfatin-1 kvantitatív EEG spektrumának escitaloprammal történő összehasonlítása céljából *(Negyedik kísérlet)* EEG vizsgálatot végeztünk.

3.2.1. Elektroenkefalográfia

A patkányokat tartósan beültetett elektroenkefalográfiás (EEG) és elektromiográfiás (EMG) elektródokkal láttuk el. Az EEG felvételek elemzése (Sleep Sign for animal program és vizuális ellenőrzés) során a következő alvás-ébrenléti stádiumokat különítettük el: aktív és passzív ébrenlét (active and passive wake, AW és PW), felszínes és mély lassú hullámú alvás (light and deep slow wave sleep, SWS1 és SWS2), REM alvás, valamint átmeneti (intermediate stage of sleep, IS, más néven pre-REM, REM-et megelőző, ritkán követő) stádium. A kvantitatív EEG analízis során Fast Fourier Transzformáció (FFT) segítségével meghatároztuk az egyes vigilancia-stádiumokhoz tartozó releváns frekvenciatartományok EEG teljesítményét [pl. REM alvás során a téta (5-9 Hz) teljesítményt]. Az alábbi EEG hullámokat különítettük el az EEG spektrumanalízis során: delta (0,5-4 Hz), téta (5-9 Hz), alfa (9-13 Hz), szigma (12-14 Hz), béta (15-30 Hz) és gamma (>30 Hz).

A *Harmadik kísérletben*, az állatok 25 pmol nesfatin-1-et (illetve vivőanyagot) kaptak a jobb oldalsó agykamrába tartósan beültetett (intracerebroventrikuláris, icv) kanülön keresztül a passzív (világos) fázis kezdetén. Az icv beadás-okozta stressz miatt az első órát kihagyva, EEG elemzést a 2-6. (passzív fázis) és a 13-18. órákban (aktív fázis) végeztünk. A kiértékelés során meghatároztuk az egyes vigilancia-stádiumokban eltöltött időt, valamint az egyes alvás-ébrenléti stádiumok epizódjainak darabszámát és átlagos hosszát.

A *Negyedik kísérletben* a nesfatin-1-gyel valamint (2 és 10 mg/kg ip) escitaloprammal kezelt csoportok kvantitatív EEG spektrumát hasonlítottuk össze az alvás összevont 2-3. óráját alapul véve ('state space analysis technique') hőtérkép analízis módszerrel, majd az eredményeket hagyományos EEG teljesítményspektrum analízissel is megvizsgáltuk.

3.2.2. Hőtérkép analízis

A nesfatin EEG spektrum-hatásának escitaloprammal történő összehasonlítása céljából a kezeléseket követő összevont 2-3. óra EEG spektrum adatait egy viszonylag új módszerrel, hőtérkép-analízissel értékeltük ki. A módszer lényege, hogy az EEG spektrumadatokból (4 s egységekben, azaz epochokban) két arányt [Arány 1 (6,5-9/0,5-9 Hz) az *x* tengelyen és Arány 2 (0,5-20/0,5-60 Hz) az *y* tengelyen] képzünk. Az EEG adatokból képzett két arány 2-dimenziós spektrumot határoz meg, melyen a főbb vigilancia-stádiumoknak (REM és nem-REM alvásnak, valamint ébrenlétnek) megfelelő EEG adatpont csoportok ('cluster'-ek) elkülönülnek. A módszer a hőtérkép létrehozásával (melyen egy pont egy epochnak felel meg) gyors áttekintő képet ad az alvás-ébrenléti ciklus topográfiájáról, így a 'cluster'-ek sűrűségében, kiterjedésében történt változások (pl. eltolódások) az EEG spektrumban bekövetkezett változásokat szabad szemmel is jól látható módon szemléltetik. Mivel a nem-REM, REM és ébrenléti stádiumok topográfiája az EEG teljesítményspektrumukon alapul, a hőtérkép módszer az alvás-ébrenléti stádiumok vizuális kiértékelését nem igényli. A nem-REM, REM és ébrenléti stádiumoknak megfeleltethető 'cluster'-ek centroidja (azaz számtani közepe) kiszámolható, így a kezelés hatására a centroidokban történő eltolódás számszerűsíthető, a módszer statisztikai kiértékelésre is alkalmassá válik.

4. EREDMÉNYEK

4.1. *Első kísérlet:* Az MCH-tartalmú idegsejt populációk ’REM alvás visszacsapás’ hatására létrejött aktivációja különböző hypothalamicus/ thalamicus magokban

A REM alvás megvonást követő ’REM alvás visszacsapás’ hatására az MCH-tartalmú idegsejtek aktivációja szignifikánsan megnőtt az összes vizsgált hypothalamicus/thalamicus területen, nevezetesen a ZI-ban (65,69±6,98%), a LH-ban (64,99±5,47%) és a PFA-ban (56,24±7,15%) a kontroll csoporthoz képest (<2%).

Az MCH neuronok ’REM alvás visszacsapás’ hatására létrejövő fokozott aktivációját előzetes 10 mg/kg ip escitalopram kezelés szignifikánsan lecsökkentette a ZI (56,33±11,32%), a LH (52,03±8,52%) és a PFA (46,08±9,79%) területén egyaránt. Ezzel szemben HC-veh és HC-SSRI csoportok között egyik vizsgált területen sem kaptunk különbséget.

Ugyanakkor, az MCH sejtek területegységre viszonyított számát (Fos-pozitív és Fos-negatív egyaránt) a ’REM alvás visszacsapás’ valamint az escitalopram kezelés egyik területen sem befolyásolta.

4.2. *Második kísérlet:* A nesfatin-tartalmú idegsejt populációk ’REM alvás visszacsapás’ hatására létrejött aktivációja különböző hypothalamicus/ thalamicus magokban

Az MCH/nesfatin/Fos hármas immunfestés alapján az MCH/nesfatin ko-lokalizáció kontroll (HC) állatokban a következőképp alakult: 81,9±1,7% a ZI-ban, 75,4±2,1% a LH-ban és 66,2±4,8% a PFA-

ban. A ko-lokalizáció mértékét a REM alvásmegvonás, valamint az azt követő ’REM alvás visszacsapás’ nem befolyásolta.

Ugyanakkor ’REM alvás visszacsapás’ hatására az MCH-pozitív és MCH-negatív nesfatin-tartalmú sejtpopulációk neuronális aktivációja jelentősen elkülönült. Míg az MCH-pozitív populáció kontroll (HC) és REM alvásmegvont (SPD) csoportokban minimális aktivációt mutatott (<0,5%), addig ’REM alvás visszacsapás’ (SPR) erős fokozódást váltott ki a sejtpopuláció Fos-aktivációjában a ZI (86,9%±2,9%), a LH (79,0±1,8%) és a PFA (78,3±2,7%) területén. Ezzel szemben az MCH-negatív nesfatin populáció magasabb aktivációt mutatott kontroll és REM alvásmegvont csoportokban, különösen a PFA területén (HC: 24±8,1% és SPD: 39,4±7,4%). A ’REM alvás visszacsapás’ hatására emelkedett aktivációt azonban csak a LH területén sikerült kimutatnunk (SPR: 37,6±4,8% vs. HC: 6±2,4%).

4.3. *Harmadik kísérlet*: Exogén módon (icv) bejuttatott nesfatin-1 hatása az alvás-ébrenléti ciklus mintázatára

Az MCH-t és nesfatint ko-expresszáló neuronok ’REM alvás visszacsapás’ hatására kialakuló magas Fos aktivációja felvetette a kérdést, vajon a nesfatin-1 neuropeptid, a NUCB2 fehérje N-terminális fragmense, befolyásolja-e az alvás-ébrenléti ciklust vagy sem. E kérdés tisztázására 25 pmol nesfatin-1-et juttattunk patkányok agykamrájába (icv) a passzív fázis kezdetén. Az alvás-ébrenléti ciklusra gyakorolt hatást az injekciót követő 2-6. órában (passzív fázis), valamint a következő aktív fázis első 6 órájában (13-18. óra) vizsgáltuk.

A nesfatin-1 icv beadást követően jelentősen megnövelte az alvás töredezettségét, azaz fokozta az ébredések számát, ugyanakkor az alvás teljes időtartama csupán tendencia-szintű csökkenést mutatott.

A nesfatin különböző alvás-ébrenléti stádiumokra gyakorolt hatását tekintve a legmarkánsabb változást REM alvásban láttuk. A kontroll csoporthoz képest szignifikánsan csökkentette a REM alvásban töltött időt, mely a 2. órában körülbelül 60%-os volt, a következő három órában a 90%-ot is elérte, a 6. órában pedig 70% körüli csökkenést mutatott. Az IS alvásfázisban töltött idő is szignifikáns csökkenést mutatott, melynek legalacsonyabb értékét a 3. órában láttuk. A REM alvás- és IS -mérséklő hatás az epizódok darabszámának és átlagos hosszának csökkenésében is megjelent. A nem-REM alváson belül megkülönbözetett SWS1 szignifikáns növekedést mutatott a 2., 3. és 4. órában. Az SWS2 mennyiségében azonban nem kaptunk változást. Az ébrenléti stádiumokat tekintve, PW-ben szignifikáns növekedést kaptunk a 3., 5. és 6. órában, míg az AW-ben töltött idő nem mutatott változást. Megjegyzendő, hogy az SWS1-ben és PW-ben töltött idő fokozódása párhuzamos növekedést mutatott e stádium-epizódok darabszámában is, míg az epizódok átlagos hossza nem változott.

A passzív fázisban látott alvásmintázatbeli változásokkal szemben, az aktív fázisban szignifikáns különbséget már nem sikerült kimutatni.

4.4. *Negyedik kísérlet*: A nesfatin-1 és escitalopram EEG teljesítményspektrumának összehasonlítása ’hőtérkép analízissel’

Tekintve a nesfatin-1 jelentős REM alvást csökkenető és passzív ébrenlétet növelő hatását, továbbá irodalmi adatok arról számolnak be, hogy icv bejuttatott nesfatin-1 szignifikáns Fos aktivációt okozott a dorzális és mediális raphe magokban, melyek az agy fő szerotonerg beidegzését adják,

felvetődött a kérdés, vajon az icv nesfatin-1 hatásában részt vesz-e a szerotonerg rendszer tónus-fokozódása vagy sem. E kérdés vizsgálatára az icv nesfatin-1 EEG spektrumhatását escitaloprammal, egy szerotonerg tónust növelő SSRI antidepresszáns EEG spektrumával hasonlítottuk össze.

A REM alvásnak megfelelő EEG adatpont halmaz, azaz ’cluster’ kiterjedése és sűrűsége nesfatin-1 hatásra látványosan lecsökkent a kontroll csoporthoz képest, megerősítve az icv nesfatin-1 korábban kapott REM alvást gátló hatását. A REM alvás ’cluster’ centroidjának pozíciójában jelentős balra tolódást tapasztaltunk az *x*-tengelyen. A nesfatin-1 ugyancsak szignifikáns balra tolódást okozott az ébrenlétnek megfelelő ’cluster’ centroidjában is, a kontroll csoporthoz képest. Mivel az *x*-tengelyen feltűntetett ’Arány 1’ értékek az EEG spektrum magas téta tartományára (6,5-9 Hz) érzékenyek, így a centroidok pozíciójának az *x*-tengelyen balra történő elmozdulása REM alvásban és ébrenlétben, e stádiumok magas téta EEG teljesítményének csökkenésre utalnak. Ugyanakkor, az icv nesfatin-1 a nem-REM stádium centroid-pozíciójában nem okozott változást.

A nesfatin-1 ’hőtérkép spektrumának’ szerotonerg-tónust növelő szerrel való összehasonlítása céljából 2 és 10 mg/kg ip dózisban adagolt escitalopramot alkalmaztunk. Mindkét escitaloprammal kezelt csoport estén, a REM alvásnak megfelelő ’cluster’ kiterjedése REM-gátló hatást mutatott, a REM ’cluster’-centroid pozíciójának balra tolódása azonban csak a 10 mg/kg-os csoportnál mutatott szignifikáns eredményt. Az ’ébrenlét-cluster’ esetében mind a 2, mind a 10 mg/kg escitalopram-kezelt csoport esetében szignifikáns balra tolódást tapasztaltunk a centroidok pozíciójában, kontrollokhoz képest. Az ébrenlétben és REM alvásban tapasztalt változások ellenére, a ’hőtérkép analízis’ nem-REM alvásban nem mutatott változást a kontroll csoporthoz képest.

A jóval részletesebb ’konvencionális’ EEG spektrum-analízis azonban már különbségeket mutatott a nesfatin-1 és escitalopram hatásai között. Míg a REM alvásban és ébrenlétben mérhető téta teljesítmény csökkentésében a nesfatin-1 és escitalopram hasonlóságot mutatott, addig a passzív és aktív ébrenlét összehasonlításával már különbségeket láttunk. Míg a nesfatin-1 a téta teljesítményt kizárólag passzív ébrenlétben csökkentette, addig a két dózisban alkalmazott escitalopram a tétát csupán aktív ébrenlétben befolyásolta. Továbbá, az escitalopram a téta teljesítmény lassulását (azaz a téta oszcilláció csúcsfrekvenciájának csökkenését) váltotta ki. Míg teljes és passzív ébrenlétben mindkét dózisban alkalmazott escitalopram 7 Hz-ről 6 Hz-re tolta el a téta teljesítmény csúcsát, addig aktív ébrenlétben ez az eltolódás csupán a 10 mg/kg dózissal kezelt csoportban volt látható. A nesfatin-1 hatására a téta csúcsfrekvenciájában eltolódást nem tapasztaltunk.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A legfontosabb következtetések az alábbiak:

(1) A szelektív REM alvásmegvonást követő ‘REM alvás visszacsapás’ jelentősen fokozta az MCH/nesfatin-tartalmú idegsejtek aktivációját a ZI, a LH és a PFA területén, mely szoros funkcionális kapcsolatot valószínűsít a REM alvás szabályozása és az említett struktúrák MCH/nesfatin neuron populációi között.

(2) A ‘REM alvás visszacsapás’ hatására létrejövő erős neuronális aktivációt a fokozott szerotonerg tónus minden vizsgált struktúrában mérsékelte, mely valószínűsíti a szerotonerg rendszernek e neuronokra kifejtett közvetlen vagy közvetett gátló hatását, egybehangzóan az escitalopram jelentős REM alvást csökkentő hatásával.

(3) Az MCH-negatív nesfatin-tartalmú idegsejtek működése kizárólag a LH területén mutathat összefüggést a REM alvás szabályozásával, a ZI és PFA területek MCH-negatív nesfatin neuronjai valószínűleg eltérő szabályozás alatt állnak.

(4) A nesfatin az alvás-ébrenléti ciklus potenciálisan új szabályzó tényezője lehet. A főleg REM alvást gátló és passzív ébrenlétet növelő nesfatin a nem-REM alvást csak minimálisan befolyásolja, így alvás-ébrenlét mintázatára gyakorolt hatása számtalan antidepresszánssal mutat hasonlóságot.

(5) A nesfatin passzív ébrenlétben és REM alvás alatt tapasztalt téta teljesítményt csökkentő hatása valószínűsíti, hogy e neuropeptid befolyásolhatja a téta oszcillációval összefüggő agyi funkciókat, mint például a figyelem, memória, ugyanakkor, a nem-REM alvás alatti delta teljesítményt, azaz az alvás pihentető jellegét nem befolyásolja.

(6) A nesfatin-1 és escitalopram EEG hatásában talált hasonlóságok mellett, a különbségek azt mutatják, hogy a téta oszcillációt eltérően befolyásolják, noha a nesfatin hatásában a szerotonerg tónus fokozódása, mint potenciális hatáskomponens megjelenhet.

A nesfatin alvás-ébrenléti ciklust és EEG spektrumot befolyásoló hatásának tisztázásához, valamint e hatásmechanizmusban a szerotonerg rendszer vagy egyéb komponens részvételének bizonyításához további tanulmányok szükségesek. A nesfatin REM alvást valamint téta teljesítményt csökkentő hatása a depresszió illetve a szorongás pathomechanizmusában betöltött szerepét valószínűsíti.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. *Az értekezés alapjául szolgáló közlemények*

1. Vas S, Adori C, Konczol K, Katai Z, Pap D, Papp RS, Bagdy G, Palkovits M, Toth ZE Nesfatin-1/NUCB2 as a Potential New Element of Sleep Regulation in Rats. PLOS ONE 8:(4) p. e59809. 10 p. (2013)

2. Katai Z, Adori C, Kitka T, Vas S, Kalmar L, Kostyalik D, Tothfalusi L, Palkovits M, Bagdy G Acute escitalopram treatment inhibits REM sleep rebound and activation of MCH-expressing neurons in the lateral hypothalamus after long term selective REM sleep deprivation. PSYCHOPHARMACOLOGY 228:(3) pp. 439-449. (2013)

3. Vas S, Katai Z, Kostyalik D, Pap D, Molnar E, Petschner P, Kalmar L, Bagdy Differential adaptation of REM sleep latency, intermediate stage and theta power effects of escitalopram after chronic treatment. JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION 120:(1) pp. 169-176. (2013)

6.2. *A disszertációhoz nem kapcsolódó tudományos közlemények*

1. Bergman P, Adori C, Vas S, Kai-Larsen Y, Sarkanen T, Cederlund A, Agerberth B, Julkunen I, Horvath B, Kostyalik D, Kalmar L, Bagdy G, Huutoniemi A, Partinen M, Hokfelt T Narcolepsy patients have antibodies that stain distinct cell populations in rat brain and influence sleep patterns. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 111:(35) pp. E3735-E3744. (2014)

2. Kostyalik D, Katai Z, Vas S, Pap D, Petschner P, Molnar E, Gyertyan I, Kalmar L, Tothfalusi L, Bagdy G Chronic escitalopram treatment caused dissociative adaptation in serotonin (5-HT) 2C receptor antagonist-induced effects in REM sleep, wake and theta wave activity. EXPERIMENTAL BRAIN RESEARCH 232:(3) pp. 935-946. (2014)

3. Kostyalik D, Vas S, Katai Z, Kitka T, Gyertyan I, Bagdy G, Tothfalusi L Chronic escitalopram treatment attenuated the accelerated rapid eye movement sleep transitions after selective rapid eye movement sleep deprivation: a model-based analysis using Markov chains. BMC NEUROSCIENCE 15:(1) Paper 120. 16 p. (2014)

4. Adori C, Ando RD, Balazsa T, Soti C, Vas S, Palkovits M, Kovacs GG, Bagdy G Low ambient temperature reveals distinct mechanisms for MDMA-induced serotonergic toxicity and astroglial Hsp27 heat shock response in rat brain. NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL 59:(5) pp. 695-705. (2011)

5. Kitka T, Adori C, Katai Z, Vas S, Molnar E, Papp RS, Toth ZE, Bagdy G Association between the activation of MCH and orexin immunorective neurons and REM sleep architecture during REM rebound after a three day long REM deprivation. NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL 59:(5) pp. 686-694. (2011)

6. Adori C, Ando RD, Ferrington L, Szekeres M, Vas S, Kelly PAT, Hunyady L, Bagdy G Elevated BDNF protein level in cortex but not in hippocampus of MDMA-treated Dark Agouti rats: A potential link to the long-term recovery of serotonergic axons NEUROSCIENCE LETTERS 478:(2) pp. 56-60. (2010)

7. Volk B, Nagy BJ, Vas S, Kostyalik D, Simig G, Bagdy G Medicinal chemistry of 5-HT5A receptor ligands: a receptor subtype with unique therapeutical potential CURRENT TOPICS IN MEDICINAL CHEMISTRY 10:(5) pp. 554-578. (2010)

8. Kalmar L, Bors A, Farkas H, Vas S, Fandl B, Varga L, Fust G, Tordai A Mutation screening of the C1 inhibitor gene among Hungarian patients with hereditary angioedema HUMAN MUTATION 22:(6) Paper 673. 8 p. (2003)

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Bagdy György professzor úrnak és Dr. Tóth Zsuzsannának, a segítségükért és szakmai iránymutatásukért, amivel gondolkodásomat formálták. Külön köszönetemet szeretném kifejezni Palkovits Miklós professzor úrnak és Dr. Ádori Csabának, valamint az Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet munkatársainak, amiért bevezettek a neuromorfológia világába és a patkányagy anatómiájába. Nagyon köszönöm a Semmelweis Egyetem Gyógyszerhatástani Intézetben működő Bagdy EEG Labor jelenlegi és korábbi munkatársainak a kísérletekhez nyújtott segítséget, valamint a barátságukat, amivel átsegítettek a nehézségeken. Szintén hálás vagyok a publikációim társszerzőinek a közleményekhez nyújtott segítségükért és ötleteikért: Prof. Bagdy Györgynek, Prof. Palkovits Miklósnak, Dr. Tóth Zsuzsannának, Dr. Ádori Csabának, Dr. Kalmár Lajosnak, Dr. Könczöl Katalinnak, Dr. Pap Dorottyának, Dr. Papp Rege Sugárkának, Dr. Kátai Zitának, Dr. Kostyalik Diánának, Dr. Kitka Tamásnak, Dr. Tóthfalusi Lászlónak, Dr. Petschner Péternek és Dr. Molnár Eszternek. Utoljára, de nem utolsó sorban köszönöm férjemnek, Lalinak és drága kislányaimnak, Borinak és Lucának a bátorítást, a megértést, a türelmet és a szeretet.

E munka megszületése a Magyar Tudományos Akadémia (MTA-SE Neuropszichofarmakológiai és Neurokémiai Kutatócsoport), valamint a Nemzeti Agykutatási Program (KTIA_NAP_13-1-2013-0001) támogatásával valósult meg (szerződés nyilvántartási száma: KTIA_13_NAP- A-II/14.).