

Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Élettani Intézet

**AZ INTRACEREBRÁLIS SZOMATOSZTATINERG
INGERLÉSSSEL KIVÁLTOTT ALVÁSGÁTLÁS ÉS IVÁS
MECHANIZMUSA**

PhD-értekezés tézisei

dr. Hajdú Ildikó

témavezető: dr. Obál Ferenc Jr. †

Szeged

2010

Bevezetés

A növekedési hormon (GH) szekréciónak a hypothalamus két neurohormonja szabályozza: a GHRH (GH-releasing hormone), amely serkenti a GH-t, és a szomatosztatin, amely gátolja mind a GH, mind a GHRH elválasztását. Emberben – és több emlős fajban – röviddel az elalvás után, a mély NREM-alvás alatt nagy mennyiségű GH szabadul fel. Ezt a jelenséget a GHRH-nak tulajdonítják, mely egyidejűleg serkenti a GH-elválasztást és a NREM-alvást. A GHRH hatására jelentkező NREM-alvás-fokozódást minden vizsgált fajban leírták. Az endogén GHRH akut gátlását alváscsökkenés követi; krónikusan GHRH-hiányos mutáns és transzgenikus állatok tartósan kevesebbet alszanak. A hypothalamus GHRH-mRNS-tartalma pedig alvásfüggően változik. A nucleus paraventricularis (PVN) és a nucleus arcuatus (ARC) GHRH-tartalmú neuronjai az anterior hypothalamikus–mediális preoptikus régióba (AH/MPO) projiciálódnak, ahol GABA-erg idegsejteket serkentenek – ez utóbbiak közvetítik az alvási hatásokat.

Mint ahogy a szomatosztatin gátolja a GHRH-erg neuronokat, várhatóan az alvást is csökkenti. Korábbi, patkányokon végzett kísérleteink szerint a szomatosztatin-analóg octreotid (OCT) valóban azonnali hatással gátolta az alvást és a GH-elválasztást. A GH-szint az injekció beadása után 1-2 órával állt helyre, és ezt a NREM-alvás intenzitásának fokozódása kísérte. Ezenkívül az OCT ivást váltott ki, amit mosakodás, vakarózás és evés követett, mely viselkedések önmagukban is az alvás ellen hatnak. Korábbi megfigyeléseink alapján feltételeztük, hogy a magatartási válaszokat angiotenzin mediálhatja, mivel ezeket gátolta az angiotenzin-konvertáz enzimet gátló captopril. Ugyanakkor a captopril nem befolyásolta az OCT okozta alváscsökkenést.

A dolgozatban foglalt kísérleteink célja az volt, hogy tanulmányozzuk az OCT kiváltotta alvási és ivási válaszok mechanizmusát.

Hipotézis

Feltételeztük, hogy az OCT kiváltotta ivás egy hármasszörös válasz része (ivás – vazopresszin-szekréciónak – vérnyomás-emelkedés), ami az intracerebrális angiotenzin és acetil-kolin hatására jellemző. Emellett az OCT alvásgátlást is okoz a GHRH-erg neuronok gátlása révén.

Célkitűzések

1. Dózis-hatás összefüggés kimutatása az OCT kiváltotta vízfogyasztásban patkányokban.
2. Az angiotenzin és az acetil-kolin szerepének tisztázása az OCT kiváltotta ivásban patkányokban.
3. Intracerebroventrikuláris (icv.) OCT-kezelés után a vérplazma vazopresszin-koncentrációjának mérése patkányokban.
4. Icv. OCT utáni vérnyomásmérés patkányokban.
5. MT-rGH transzgenikus egerek alvásának vizsgálata: spontán alvás és alvásmegvonásra adott válasz. (Az MT-rGH egerek transzgenikus állatok, melyek nagy mennyiségű patkány-GH-t termelnek, és GHRH-szintjük alacsonyabb a normál egerekénél).
6. OCT utáni alvási válasz csökkent GHRH-termelés esetén – intraperitoneális (ip.) OCT hatásának vizsgálata MT-rGH egerekben.
7. Az OCT hatására ivást és alvást kiváltó agyi struktúrák lokalizálása intracerebrális (ic.) OCT-mikroinjekciók segítségével patkányokban.

Módszerek

Állatok:

Hím Sprague-Dawley patkányokat, valamint hím MT-rGH egereket, ill. kontrollként azonos alomból való normál egereket használtunk. Az MT-rGH egerek nagy mennyiségű patkány-GH-t (rGH) termelő transzgenikus állatok, emiatt óriás növések. A transzgén az egér metallothionein (MT) gén promotor régiójának és az rGH-gén kódoló régiójának fúziós génje. A magas keringő rGH-szint – negatív visszacsatolás útján – gátolja a GHRH, és serkenti a szomatostatint elválasztását.

Az állatokat 12-12 órás fény-sötét ciklushoz adaptáltuk, állandó hőmérsékleten; a kísérletek alatt egyedül, zajszigetelt plexüveg ketrecekben voltak.

Műtétek:

Az alvás regisztrálásához a patkányok, ill. az egerek koponyájába EEG-elektrodákat helyeztünk; ezenkívül patkányok esetén egy termisztort, mely az agykéreg hőmérsékletének mérésére szolgált. Az egerekbe EMG-elektrodákat ültettünk (a patkányok motoros aktivitását a regisztráló kábel mozgásának detektálásával figyeltük).

Icv. injekciónál a kanülöket a bal oldalkamrába helyeztük; helyzetüket a kísérletek végén a kanülbe adott tripánkék festékkel ellenőriztük. Ic. kezelések esetén szövettani metszeteken, peroxidáz-H₂O₂ reakcióval tettük láthatóvá a mikroinjekciók helyét.

A vérnyomást beültetett aortakatéter segítségével mértük szabadon mozgó patkányokban.

Alvás regisztrálása

Az alvás-ébredési aktivitást 12 vagy 24 órán át regisztráltuk standard körülmények között (12-12 órás fény-sötét ciklus, állandó hőmérséklet). Az elektromos jeleket elvezető kábelek szabad mozgást biztosítottak az állatoknak. Az adatokat (EEG, EMG vagy motoros aktivitás, agyhőmérséklet) számítógép gyűjtötte. A vigilanciaállapotokat (ébredés, NREM, REM) 8 vagy 10 másodperces intervallumokban határoztuk meg. Az alvás intenzitását az EEG delta sávjának (0,25 és 4 Hz között) teljesítménysűrűségével jellemeztük.

Vazopresszinszint mérése

A vérplazma hormonszintjét dr. Gardi János mérte egyetemünk endokrin osztályán radio-immuno-assay módszerével.

Vízfelvétel mérése

Injekciók beadása előtt és 10 perccel azok után megmértük az itatóüvegek tömegét; a különbség adta az elfogyasztott víz mennyiségét.

Statisztika

Többnyire ANOVA-t használtunk, post hoc analízisként pedig t-próbát és Student–Newman–Keuls-tesztet.

Eredmények

1. OCT hatása a vízfelvételek patkányban

Az icv. OCT dózisfüggően ivást váltott ki az injekciót követő 1-2 percen belül. Megszakításokkal az ivás kb. 10 percig tartott; ezalatt az állatok napi vízszükségletük negyedét-ötödét itták meg.

2. Az OCT kiváltotta ivás farmakológiai vizsgálata patkányban

A következő anyagokkal végzett icv. előkezelések kivédtek az OCT ivást serkentő hatását: az angiotenzin-konvertázt gátló captopril, az angiotenzin-receptorokat bénító saralasin és losartan, és a muszkarinerg antagonistá atropin. Az opiátblokkoló naloxon nem befolyásolta az ivási választ.

3. OCT hatása a vazopresszinre patkányban

Az icv. OCT növelte a vérplazma vazopresszinszintjét. Captopril- és atropin-előkezelések ezen hatást kivédtek.

4. OCT hatása a vérnyomásra patkányban

Az icv. OCT vérnyomás-emelkedést okozott; captopril és atropin e hatást kivédte.

5. Az MT-rGH egerek alvása

A transzgenikus egerek csaknem kétszer annyi időt töltöttek REM-alvásban a világos (nyugalmi) periódusban, mint a kontrollállatok. A NREM-alvás időtartama csak enyhén emelkedett. Az MT-rGH egerek 12 órás alvásmegvonásra normálisan reagáltak.

6. OCT hatása MT-rGH egerek alvására

Korábbi kísérleteink szerint patkányokban a nyugalmi periódus kezdetekor adott szisztémás vagy icv. OCT az első órában gátolta az alvást, amit a NREM-alvás intenzitásának növekedése követett. A transzgenikus egerekben ip. OCT után mind a két válasz szignifikánsan gyengébb volt.

7. Az OCT kiváltotta alvászgátlásért és ivásért felelős agyi struktúrák lokalizálása patkányban
Az alvászgátlást vagy ivást kiváltó ic. mikroinjekciós pontok csoportokat alkottak, amelyek megfeleltethetőek voltak egyes agyi struktúráknak. Ivást a subfornicalis szervbe (SFO) és a PVN-be adott OCT váltott ki; alvászváltozást ez esetekben nem észleltünk. Ellenben az AH/MPO-ba vagy az ARC-ba adott OCT alvászgátlást, majd azt követő alvásintenzitás-fokozódást okozott (mint ahogy icv. OCT-nál láttuk). A hypothalamus és a preoptikus régió laterálisabb pontjaiba adott OCT az első órában fokozta a NREM-alvást.

Megbeszélés

Eredményeink összhangban állnak azon feltételezésünkkel, hogy az OCT alvásra és ivásra gyakorolt hatását különböző agyi struktúrák eltérő mechanizmusai okozzák. Ismervén az OCT receptorkötődési jellemzőit, valamint a szomatosztatin-receptorok agyi eloszlását, állítható, hogy az OCT ismertetett hatásai az sst2 típusú szomatosztatin-receptorokhoz fűződhetnek.

Az OCT indukálta ivás létrejöttében angiotenzinerg és kolinerg mechanizmusok is közreműködnek. Az ivási reakció – a vazopresszin-szekrúcióval és a vérnyomás-növekedéssel együtt – egy olyan hármasszoros válasz része, amely az angiotenzinre és az acetil-kolinra egyaránt jellemző. Lokalizációs kísérleteink szerint az ivás az angiotenzinerg dipszogen kör struktúráihoz köthető. A vízháztartás központi szabályozásában párhuzamosan működnek angiotenzinerg és kolinerg mechanizmusok. Feltételezhető, hogy ezen mechanizmusok szimultán GABA-erg gátlás alatt állnak, és a szomatosztatin ill. az OCT e gátlás eltávolítása révén engedi érvényesülni az angiotenzin és az acetil-kolin hatását.

Az MT-rGH egerekben végzett kísérleteink azt tanúsítják, hogy az OCT alvászgátló hatása nagymértékben gyengül alacsony GHRH-szint mellett. (Későbbi vizsgálataink ezt alátámasztották működésképtelen GHRH-receptorokkal rendelkező állatokon is, valamint igazoltuk, hogy az OCT gátolja az intrahypothalamikus GHRH-felszabadulást.)

Az OCT alváscsökkenést okozott a GHRH-tartalmú idegsejtekben gazdag ARC magba adva, valamint az AH/MPO-ban, ahol az előbbi neuronok termináljai találhatóak. Az intraarcuatus GHRH-erg sejtek szomatosztatinerg gátlása jól ismert. Az AH/MPO régióban a szomatosztatin gátolhatja a GHRH-tartalmú idegvégződések GABA-erg célsejtjeit, vagy preszinaptikusan a GHRH-t szállító axonokat.

A hypothalamus és a preoptikus régió laterális pontjaiba adott OCT fokozta a NREM-alvást; ez azzal magyarázható, hogy ezzel gátoltuk a bazális előagy kolinerg projekciós idegsejtjeit, melyek az arousal fenntartásában szerepelnek. Az OCT ezen hatását sst5 szomatosztatin-receptorok közvetíthetik.

Ismert a GH REM-alvást serkentő hatása, amivel összhangban áll az MT-rGH egerek megnövekedett spontán REM-alvás-mennyisége. Az enyhén emelkedett NREM-alvási idő azonban ellentétben áll az alacsony GHRH-szinttel – feltételezzük, hogy a NREM változása a GH valamely direkt metabolikus hatásának köszönhető.

Köszönetnyilvánítás

Hálámat szeretném kifejezni néhai témavezetőmnek, mentoromnak, Dr. Obál Ferenc Jr. professzornak munkám irányításáért, támogatásáért graduális tanulmányaim óta, emberi és szakmai példamutatásáért.

Köszönettel tartozom Dr. Jancsó Gábor professzornak, az Idegtudományi Doktori Iskola vezetőjének, jelenlegi intézetvezetőnek segítségéért, tanácsaiért.

Köszönöm Dr. Benedek György professzornak, volt intézetvezetőnek, hogy lehetőséget adott munkámat az Élettani Intézetben végezni.

Köszönöm a technikai segítséget Tóth Szilveszternek.

Köszönöm a segítséget, bátorítást az intézet jelenlegi és volt munkatársainak: dr. Bodosi Balázsnak, dr. Gardi Jánosnak, Jász Anikónak, dr. Kapás Leventének, dr. Lelkes Zoltánnak, Liszli Péternek, dr. Péterfi Zoltánnak, dr. Sáry Gyulának, dr. Szentirmai Évának.

Köszönöm James M. Krueger professzornak, hogy nyolc hónapot intézetükben tölthettem (Department of Veterinary and Comparative Anatomy, Pharmacology and Physiology, Washington State University, Pullman, WA, USA), és köszönöm a pullmani munkatársak, mindenekelőtt Richard Brown, Jidong Fang és Ping Taishi támogatását.

A munka anyagi támogatását Obál és Krueger professzorok pályázatai biztosították (OTKA-30456, OTKA-043156, ETT P04/033/2000, ETT 103 04/2003, NIH NS-25378, NS-27250).

Publikációk

A tézisek alapjául szolgáló publikációk

Hajdu I, Obál F Jr, Gardi J, Laczi F, Krueger JM. Octreotide-induced drinking, vasopressin and pressure responses: role of central angiotensin and acetylcholine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R271-R277, 2000

IF: 2.765

Hajdu I, Obál F Jr, Fang J, Krueger JM, Rollo CD. Sleep of transgenic mice producing excess rat growth hormone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R70-R76, 2002

IF: 3.156

Hajdu I, Szentirmai E, Obál F Jr, Krueger JM. Different brain structures mediate drinking and sleep suppression elicited by the somatostatin analog, octreotide, in rats. *Brain Res* 994, 115-123, 2003

IF: 2.474

Egyéb publikációk

Beranek L, Hajdu I, Gardi J, Taishi P, Obál F Jr, Krueger JM. Central administration of the somatostatin analog octreotide induces captopril-insensitive sleep responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 277: R1297-R1304, 1999

IF: 2.453

Bodosi B, Gardi J, Hajdu I, Szentirmai E., Obál F Jr, Krueger JM. Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R1071-1079, 2004

IF: 3.405

Gardi J, Szentirmai E, Hajdu I, Obál F Jr, Krueger JM. The somatostatin analog, octreotide, causes accumulation of growth hormone-releasing hormone and depletion of angiotensin in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 315, 37-40, 2001

IF: 2.021

Peterfi Z, Churchill L, Hajdu I, Obál F Jr, Krueger JM, Parducz A. Fos-immunoreactivity in the hypothalamus: dependency on the diurnal rhythm, sleep, gender, and estrogen.

Neuroscience 124, 695-707, 2004

IF: 3.456

Szentirmai E, Hajdu I, Obál F Jr, Krueger JM. Ghrelin-induced sleep responses in ad libitum fed and food-restricted rats. *Brain Res* 1088, 131-140, 2006

IF: 2.341

Poszterek

Beranek L, Hajdu I, Taishi P, Gardi J, Obál F Jr, Krueger JM. Sleep alterations elicited by intracerebral somatostatinergic stimulation.

14th ESRS Congress, Madrid, 1998

Hajdu I, Obál F Jr, Beranek L, Laczi F, Krueger JM. Drinking and vasopressin secretion to somatostatinergic stimulation are mediated by angiotensin.

Endocrine Society's Meeting, San Diego, 1999

Hajdu I, Beranek L, Gardi J, Taishi P, Obál F Jr, Krueger JM. Sleep and behavioral responses to somatostatinergic stimulation.

APSS Meeting, Orlando, 1999

Hajdú I, Obál F Jr, Gardi J, Laczi F, Krueger JM. Szomatosztatinerg ingerléssel kiváltott ivás, vazopresszin-szekréció és vérnyomás-emelkedés.

MITT Vándorgyűlése, Szeged, 2001

Gardi J, Szentirmai E, Hajdu I, Obál F Jr, Krueger JM. Sleep, behavioral, and hypothalamic GHRH and angiotensin responses to the somatostatin agonist, octreotide.

16th ESRS Congress, Reykjavík, 2002

Bodosi B, Gardi J, Hajdu I, Szentirmai E, Obál F Jr, Krueger JM. Ghrelin and leptin responses to sleep deprivation and to reversed feeding schedule in rats.

17th ESRS Congress, Prága, 2004

Előadás

Hajdú I, Obál F Jr, Szentirmai É. Szomatosztatin-receptorok ingerlésével kiváltott alvásgátlás és ivás.

MÉT Vándorgyűlése, Pécs, 2003