

A pályázat által támogatott kutatás célja a melanin-koncentráló hormont (MCH) termelő neuron populáció jellemzése volt rágcsálók agyában. Emlősökben az MCH neuronok sejtteste a hypothalamus rostro-caudálisan behatárolt területén, elsősorban a laterális hypothalamikus régióban (LHA) és a zona incertában (ZI) helyeződnek, nyúlványrendszerük azonban igen kiterjedt. Legfontosabb projekciós területeik a telencephalonban, illetve az agytörzsben találhatóak (Bittencourt et al., 1992, Cvetkovic et al., 2004, Bittencourt, 2011). Terjedelmes nyúlványrendszerük és hypothalamuson belüli idegsejt-hálózatokban való részvételük révén az MCH neuronok több fontos élettani folyamat – mint a táplálékfelvétel és az alvás-ébrenlét ritmus – szabályozásában vesznek részt (Pissios és Maratos-Flier, 2003, Pissios et al., 2006, Faigne és Peever, 2013)

Munkánk egyik célja egy olyan módszer kifejlesztése volt, melynek segítségével három dimenzióban jeleníthetjük meg a hypothalamus neuronjainak térbeli eloszlását, úgy, hogy összehasonlíthatóvá váljanak különböző laboratóriumokból származó, eltérő módszerekkel kapott adatok. A kidolgozott módszert elsőként saját, MCH neuronokra vonatkozó eredményeinkre alkalmaztuk (Reinitz et al. 2016).

Kiindulási alapként egér agyból készült rostro-caudális coronális metszetsorozatok szolgáltak, melyekben az MCH neuronokat poliklonális anti-MCH ellenanyaggal (Sigma-Aldrich M8440) jelöltük meg. Az immunreakciót ABC módszer alkalmazásával, 3, 3'-diaminobenzidin (DAB) kromogén szubsztráttal tettünk láthatóvá, majd a metszetekről digitális mikrofotókat készítettünk.

A mikrofotókat képszerkesztő program (Gimp) segítségével szürkeárnyaltos formába alakítottunk át, majd invertáltuk. Az így feldolgozott képeket optimalizált technikai paraméterek alkalmazása mellett 3DS Slicer szoftverbe (Fedorov et al., 2012) exportáltuk. A további műveletek során az így kapott STL formátumú fájlokat használtuk.

Paxinos és Franklin „The mouse brain in stereotaxic coordinates” (2. kiadás, 2001) művében közölt adatok alapján, a 3DS Max program segítségével (Murdoch, 2010), a „Loft” módszer alkalmazásával megszerkesztettük az egér hypothalamus és a ZI 3D modelljét, tengelyként a 3. agykamrát jelölve.

A coronális metszetekben immunhisztokémiai módszerrel azonosított MCH neuronokról készült képek STL formátumra alakított változatát egyesítettük a hypothalamus és a ZI 3DS Max programmal létrehozott 3D modelljével. Ezzel lehetővé vált az MCH sejtek térbeli eloszlásának 3D-ben történő megjelenítése, ami szemléltetésre és többféle szempont szerinti analízisre egyaránt alkalmas. Példaként megemlítjük, hogy a jelölt sejtek térbeli eloszlása a kísérlet során alkalmazottól eltérő síkokban is tanulmányozhatóak.

Adatainkat feltöltöttük a 3D Slicer “DataStore” moduljában az “Anatomy” kategóriában elérhető online adatbázisokba. A meglévő adatokat saját további eredményeinkkel és más laboratóriumok adataival kibővítve várhatóan egy jól kezelhető, a hypothalamus neuronjainak 3D-ben történő összehasonlító analízisére alkalmas adatbázis állítható össze.

Az MCH peptid, amelynek aminosav-szekvenciája evolúciós szempontból figyelemreméltóan konzervatív, emlősökben két létfontosságú, cirkadián ritmust mutató élettani folyamat szabályozásában vesz részt; orexigén (táplálékfelvételt elősegítő), valamint alvást előmozdító és stabilizáló neuropeptidként fejt ki hatását (Pissios et al., 2006, Faigne és Peever, 2013). További kísérleteinkben ezért arra kerestünk választ, hogy az MCH neuronban lévő MCH peptid mennyisége mutat-e napszaki ingadozást. Korábbi vizsgálatok szerint patkány

hypothalamusban a világosság (nyugalmi fázis) kezdete után 2 órával az MCH-t kódoló mRNS mennyisége ugyanígy, mint a sötét (aktív fázis) kezdete után 2 órával. Egy másik, egérben végzett megfigyelés alapján az MCH-t kódoló Pmch gén expressziója nem mutat korrelációt az ételiszor bevitellel (Stütz et al., 2007). Dias Abdo Agamme és munkatársai (2015), közelmúltban végzett komplex vizsgálatsorozatukban napszaktól független Pmch gén expressziót tapasztaltak kontroll körülmények (zavartalan alvás/ébrenlét ciklus) között.

Figyelemre méltóak azonban azok a tapasztalatok, melyek szerint rendellenességek, pl. éhezés, vagy az alvás megzavarása napszaktól függő módon befolyásolják a Pmch gén expresszióját (Harthoorn et al., 2005, Dias Abdo Agamme et al. 2015).

Az MCH peptid mennyiségének napszaki ingadozásával ismereteink szerint eddig csak Harthoorn és munkatársai (2005) foglalkoztak: 25-25 MCH neuron vizsgálata alapján a napszaki ritmus hiányára következtek.

Mindezek alapján nem dönthető el egyértelműen, hogy a hypothalamusban lévő MCH neuron populációban az MCH peptid mennyisége mutat-e napszaki ingadozást. A kérdést egy kísérletsorozatban igyekeztük tisztázni, melynek során az MCH peptidet immunhisztokémiai módszerrel detektáltuk, majd az immunreaktivitás mértékét denzitometriával értékeltük (Gerics et al., közlésre előkészített kézirat).

Fiatál hím egereket 2 hétig standard állatházi körülmények között tartottunk, ad libitum ivóvíz és rágcsálótáp biztosításával, 12-12 órás világos/sötét periódus mellett. Ezután az állatokat két csoportban, közvetlenül a sötét periódus végén (ZT0 csoport), illetve a világos periódus végén (ZT12 csoport) Zamboni féle fixáló oldattal végzett transcardiális perfúciónak vetettük alá. Az MCH immunhisztokémiai módszerrel történő kimutatását a korábban bevált módszerrel végeztük (Reinitz et al., 2016). A különböző időpontokban perfundált állatokból nyert metszeteket egy kísérletben, parallel dolgoztuk fel, a kísérleti körülmények eltéréséből származó hibák kiküszöbölése céljából. A kiértékelés során kizárólag hiánytalan – az összes immunreaktív neuront tartalmazó – rostro-caudális metszetsorozatokat vettünk figyelembe. A követelménynek megfelelő metszetsorozatokat minimum 18, maximum 22 metszetről álltak. 3 ZT0 és 3 ZT12 csoportba tartozó egér agyának vizsgálatára volt lehetőségünk.

A metszetekről standard megvilágítással, DMC2900 kamerával felszerelt Leica DM750 mikroszkóppal, 10 x nagyítású objektív használatával 2048 x 1536 pixeles felvételeket készítettünk, a hypothalamus jobb és bal oldalát minden metszetben külön dokumentálva. A képeket szürke árnyalatossá (8 bit) konvertáltuk, majd denzitometriás módszerrel kiértékeljük, a Scion Image Program v4.02 β for Windows verziójának segítségével, a küszöb értéket a háttér festődéshez igazítva. A fotókon a denzitást egy állandó méretű keretben mértük. A keretet úgy helyeztük el, hogy mindegyik immunpozitív neuron azon belül legyen. A kapott adatok - egy önkényes skálán - arányosak a kereten belüli immunpozitív területtel. A ZT0 csoportba tartozó egerekből nyert preparátumok feldolgozása révén 121, a ZT12 csoportból 122 adatot nyertünk. Ezeket az adatokat statisztikai analízissel vizsgáltuk.

A statisztikai analízist a Stata13 szoftver segítségével végeztük, „unpaired t test” módszerrel, 95 %-os megbízhatósági határral (CI). A metszetsorozatokból kapott denzitometriás adatok statisztikai értékelése során a hypothalamus bal és jobb oldala között nem találtunk szignifikáns eltérést. Ez megmutatja, hogy kísérleteinkben a metszési síkok coronálistól való kismértékű eltérése nem befolyásolta az eredményt.

A ZT0 és a ZT12 csoportba tartozó egerekből készített metszetsorozatokból nyert adatokat statisztikai elemzéssel értékeltük. Az itt vázolt módszer az immunreaktív anyag mennyiségének meghatározását nem teszi lehetővé, de összehasonlító vizsgálatokra alkalmas. Az egyes állatok hypothalamusának teljes MCH tartalmát az összes MCH neuront tartalmazó coronális metszet denzitometriás adatának összegzésével jellemeztük. A ZT0 és a ZT12 csoportba tartozó egerek hypothalamusának teljes MCH tartalma között erősen szignifikáns különbséget találtunk ($p=0.0017$, CI (95%): 22.54-96.40). Az MCH mennyiség a ZT12 csoportban, vagyis a nyugalmi (világos) fázis végén volt magasabb. Ez az észlelet számos új kérdést vet fel, elsősorban azzal kapcsolatban, hogy mi a napszaki különbség oka és funkcionális következménye. A világos fázis alatt az MCH-nak a sejttetekben észlelt nagyobb mértékű felhalmozódása a peptid megnövekedett keletkezési sebességének, vagy a felhasználás alacsonyabb szintjének tulajdonítható. Fontos lenne megvizsgálni, hogy melyik mechanizmus felelős az észlelt napszaki különbségért. Ennek során számolni kell azzal, hogy az MCH- t kódoló mRNS mennyisége korábbi vizsgálatok alapján független a napszaktól, így az MCH peptid keletkezési sebességét valószínűleg a translációban vagy a prepro-MCH poszttranszlációs hasításában szerepet játszó folyamatok határozzák meg. Érdekesnek ígérkezik annak vizsgálata is, hogy vajon a hypothalamuson belüli lokalizációjuk vagy neuropeptid tartalmuk alapján megkülönböztethető MCH neuron csoportok napszaki ritmusa megegyezik-e.

Az MCH-t termelő neuronoknak két, neuropeptid tartalom alapján elkülönülő populációja található meg az emlősök hypothalamusában. Az egyik populációban egyetlen neuropeptid, az MCH van jelen, a másokban az MCH-n kívül CART (cocain and amphetamin regulated transcript) is expresszálódik (Cvetkovic et al., 2004, Croizier et al., 2013). A két MCH neuron populáció projekciós területei különböznek egymástól: a csupán MCH-t tartalmazó (MCH+) neuronok nyúlványai elsősorban az agytörzs felé, az MCH-t és CART-ot is expresszáló (MCH+/CART+) neuronok nyúlványai pedig a telencephalon különböző régiói felé irányulnak. A két populáció egymáshoz viszonyított aránya és a nyúlványok térbeli helyzete faj-specifikus különbségeket mutat (egér és patkány összehasonlításáról ld. Croizier et. al, 2010).

A két MCH neuron populáció térbeli eloszlásának és morfológiai jellegzetességeinek további megismerése céljából kettős immunfluoreszcens jelöléses vizsgálatokat végeztünk egér agyban (Jancsik et al., közlésre előkészített kézirat)

Az agyszövet fixálását és a coronális metszetek készítését laboratóriumunkban bevált módszerrel végeztük. Primer ellenanyagokként a Sigma cég poliklonális M8440 jelzésű anti-MCH készítményét, valamint az R&D AF163 jelzésű anti-CART-ot használtuk. A kettős jelölést szekvenciális módszerrel végeztük. A blokkolás után elsőként anti-MCH-val inkubáltuk a metszeteket, majd Alexa Fluor® 555-tel jelölt szamar anti-nyúl IgG-t alkalmaztunk. Újabb blokkolási lépés után a metszeteket anti-CART-tal, majd Alexa Fluor® 488- al jelölt szamar anti-kecske IgG-vel kezeltük. Lefedés után a kész preparátumokat Zeiss LSM 780 konfokális mikroszkóppal (Simmelweis Egyetem Általános Orvosi kar, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet) vizsgáltuk, majd a képeket a Zeiss cég ZEN szoftverének segítségével analizáltuk.

Kettős immunfluoreszcens jelöléssel végzett megfigyeléseink során elsőként megvizsgáltuk, hogy a két MCH neuron populáció azonosítható-e az általunk kiválasztott ellenanyagokkal. A két populáció elkülöníthetőnek mutatkozott, hypothalamuson belüli eloszlásuk hasonló volt Croizier és munkatársai (2010) korábbi leírásával.

A jelölési módszer optimalizálásával elértük, hogy a két neuropeptid intracelluláris eloszlása megfigyelhetővé vált. Konfokális lézer pásztázó mikroszkóp használatának köszönhetően (Zachar G., SE Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet közreműködésével) nagy részletgazdagságú képek állnak rendelkezésünkre.

Az MCH+ neuron populációban a sejttesteken belül egy központi helyzetű, erősen immunpozitív, anasztomizáló hálózatot figyeltünk meg, melynek kinyúló részei esetenként betérjednek a neuronok proximális nyúlványaiba is. Morfológiai jellegzetességei alapján ez a struktúra a Golgi apparátusnak felel meg. Finom immunpozitív szemcsék – neuropeptid tartalmú „dense core” vezikulák – találhatóak a perikaryonokban és a proximális sejtnyúlványokban is. Azt találtuk, hogy a sejttestekből általában két vagy három immunpozitív nyúlvány indul ki.

Az MCH immunpozitív elemek megjelenési formája és eloszlása az MCH+/CART+ populációban is hasonlóan mutatkozott. Ennek a populációnak a sejttesteiben centrálisan erős, jellemzően egymás mellett elhelyezkedő, nagyobb foltokból összetevődő CART immunreaktivitás detektálható. A sejttestek perifériás területein és általában több proximális nyúlványban finom, szemcsés CART immunpozitivitás fordul elő. Az MCH és CART immunreaktív elemek együttes vizsgálatakor a központi, mindkét neuropeptid által erősen jelölt területen nagymértékű kolokalizáció figyelhető meg. A sejttestek perifériás területein és az immunpozitív nyúlványokban megfigyelhető dense-core vezikulák vagy MCH-t, vagy CART-ot tartalmaznak, a két neuropeptid egy vezikulán belüli kolokalizációját nem tapasztaltuk. A proximális nyúlványok mindegyikében egymás mellett fordulnak elő MCH+ és CART+ vezikulák. A sejttesttől távolabbi nyúlványok – melyek eredete a felvételen nem tisztázható – neuropeptid tartalmuk szerint lehetnek kettős pozitívok, MCH immunreaktívok, vagy CART immunreaktívok. Az egyetlen neuropeptidet tartalmazó, MCH+ vagy CART+ vezikulák egyazon nyúlványban egymás mellett való előfordulása lehetővé teszi, hogy e két neuropeptid kibocsátása adott helyen és időben összehangolt módon, illetve egymástól függetlenül is végbemehessen.

A beszámolóban bemutatott eredményeinket az MCH-t termelő neuronok eddig nem kutatott szerkezeti és funkcionális sajátosságainak feltárására irányuló lépéseknek tekintjük, melyek hosszú távon elvezetnek működési mechanizmusuk megértéséhez.

Hivatkozások

Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J., Nahon JL, Vale W, Sawchenko PE (1992): The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* 319:218–245.

Bittencourt JC (2011): Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain. *Gen Comp Endocrinol* 172:185–197.

Croizier S, Cardot J, Brischoux F, Fellmann D, Griffond B, Risold PY (2013): The vertebrate diencephalic MCH system: a versatile neuronal population in an evolving brain. *Front Neuroendocrinol* 34: 65-87. doi: 10.1016/j.yfrne.2012.10.001

Croizier S, Franchi-Bernard G, Colard C, Poncet F, La Roche A, Risold PY (2010):
A comparative analysis shows morphofunctional differences between the rat and mouse
melanin-concentrating hormone systems.

PLoS One 5:e15471. doi: 10.1371/journal.pone.0015471

Cvetkovic V, Brischoux F, Jacquemard C, Fellmann D, Griffond B and Risold PY (2004):
Characterization of subpopulations of neurons producing melanin-concentrating hormone in
the rat ventral diencephalon.

J Neurochem. 91, 911-9

Dias Abdo Agamme AL, Aguilar Calegare BF, Fernandes L, Costa A, Lagos P,
Tortorolo P, D'Almeida V (2015):

MCH levels in the CSF, brain preproMCH and MCHR1 gene expression during paradoxical
sleep deprivation, sleep rebound and chronic sleep restriction.

Peptides. 74:9-15. doi: 10.1016/j.peptides.2015.10.001

Fedorov A, Beichel R, Kalpathy-Cramer J, Finet J, Fillion-Robin J-C, Pujol S, Bauer C, Jennings
D, Fennessy F, Sonka M, Buatti J, Aylward SR, Miller JV, Pieper S, Kikinis R (2012):

3D Slicer as an image computing platform for the Quantitative Imaging Network.

Magn Reson Imaging 30:1323-41. doi: 10.1016/j.mri.2012.05.001

Fraigne JJ, Peever JH (2013):

Melanin-concentrating hormone neurons promote and stabilize sleep.

Sleep. 36(12):1767-8. doi: 10.5665/sleep.3186

Harthoorn LF, Sañé A, Nethe M, Van Heerikhuizen JJ (2005):

Multi-transcriptional profiling of melanin-concentrating hormone and orexin-containing
neurons.

Cell Mol Neurobiol. 25(8):1209-23.

Murdock KL. 2010. 3ds Max Bible. Ed.: Wiley

Paxinos G, Franklin KBJ. 2001. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2nd Ed.
Academic Press, San Diego.

Pissios P, Maratos-Flier E (2003):

Melanin-concentrating hormone: from fish skin to skinny mammals.

Trends Endocrinol Metab. 14(5):243-8.

Pissios P, Bradley RL, Maratos-Flier E (2006):

Expanding the scales: The multiple roles of MCH in regulating energy balance and other
biological functions.

Endocr Rev. 27, no.6, p. 606-20.

Reinitz LZ, Szóke B, Várkonyi EÉ, Sótónyi P, Jancsik V (2016):

Three-dimensional visualization of the distribution of melanin-concentrating hormone
producing neurons in the mouse hypothalamus.

J Chem Neuroanat. 71:20-5. doi: 10.1016/j.jchemneu.2015.11.009

Stütz AM, Staszkiwicz J, Ptitsyn A, Argyropoulos G (2007):
Circadian expression of genes regulating food intake.
Obesity (Silver Spring). 15(3):607-15