

Rola przykomorowego jądra podwzgórza w oreksygenicznym działaniu relaksyny-3 u szczura – streszczenie

Relaksyna-3 (ang. relaxin-3, RLN3) to neuropeptyd syntetyzowany głównie przez neurony jądra niepewnego (ang. nucleus incertus, NI), znajdującego się w pniu mózgu. Swoistym receptorem RLN3 jest receptor rodziny peptydów relaksynowych 3 (ang. relaxin family peptide receptor 3, RXFP3). Jest to metabotropowy receptor wykazujący ekspresję w wielu strukturach centralnego układu nerwowego: m. in. w korze, hipokampie, ciele migdałowatym oraz podwzgórzu. Zachowany ewolucyjnie wzór ekspresji oraz struktura RLN3 i RXFP3 wskazują na ich istotne znaczenie fizjologiczne, potwierdzone przez liczne badania naukowe, pokazujące udział mózgowej sygnalizacji RLN3/RXFP3 w procesach takich jak: wzbudzenie, motywacja, pamięć przestrzenna, procesy poznawcze i afektywne oraz kontrola pobierania pokarmu. Ponadto wysoka wrażliwość neuronów syntetyzujących RLN3 na bodźce stresowe sprawia, że układ RLN3/RXFP3 jest łącznikiem między wspomnianymi procesami mózgowymi a wymaganiami stawianymi przez środowisko. RLN3 jest silnym czynnikiem oreksygenicznym, czyli stymulującym pobieranie pokarmu, a działanie to wiąże się z aktywacją receptora RXFP3 w przykomorowym jądrze podwzgórza (ang. paraventricular nucleus of the hypothalamus, PVN). Ponadto wykazano, że oreksygeniczne działanie RLN3 jest zróżnicowane płciowo, a neuropeptyd ten silniej stymuluje pobieranie pokarmu u samic niż i samców szczurów. Badania wskazują również na udział transmisji RLN3/RXFP3 w przebiegu zaburzenia z napadami objadania się (ang. binge eating disorder, BED), które jest najczęściej występującą formą zaburzeń odżywiania na świecie, dwa razy częściej dotyczącą kobiet niż mężczyzn. Pomimo wielu badań prowadzonych nad układem RLN3/RXFP3, molekularny i komórkowy mechanizm kontroli pobierania pokarmu przez ten układ nadal pozostaje niepoznany.

Przykomorowe jądro podwzgórza uważane jest za jedno z głównych centrów kontroli homeostazy w organizmach ssaków. Złożone z funkcjonalnie odmiennych populacji neuronalnych, PVN jest częścią podwzgórzowego układu neurowydzielniczego (wielko- i drobnokomórkowe neurony sekrecyjne) oraz ośrodkowej sieci autonomicznej (drobnokomórkowe neurony unerwiające ośrodki pnia mózgu i rdzenia kręgowego). Integrując i koordynując procesy neuroendokrynne oraz autonomiczne PVN kontroluje szereg procesów fizjologicznych: reakcję stresową, równowagę energetyczną oraz gospodarkę wodną, metabolizm, czucie bólu, reprodukcję i zachowania społeczne. Wielkokomórkowe neurony sekrecyjne (ang. magnocellular neurosecretory cells, MNCs) znajdujące się w PVN oraz jądrze

nadwzrokowym są jednymi z najlepiej poznanych typów komórek nerwowych w podwzgórzu. Stanowią one główne źródło oksytocyny (ang. oxytocin, OXT) i wazopresyny (ang. arginine vasopressin, AVP), neuropeptydów i hormonów, charakteryzujących się działaniem pleiotropowym: modulują one zarówno procesy homeostatyczne jak i zachowania społeczne czy procesy afektywne i poznawcze. Odkryto szereg różnic płciowych związanych zarówno z funkcją OXT i AVP, jak i anatomią tych układów peptyderygicznych w mózgowiu ssaków. Do tej pory nie zweryfikowano jednak istnienia różnic płciowych w przypadku rozmieszczenia i właściwości elektrofizjologicznych MNCs w PVN.

Celem niniejszej pracy było scharakteryzowanie sygnalizacji RLN3/RXFP3 w PVN oraz jej roli w kontroli pobierania pokarmu wraz z opisaniem rozmieszczenia i właściwości elektrofizjologicznych MNCs w PVN u szczura. Dodatkowo, zważając na wspomniane różnice płciowe w oreksygenicznym działaniu RLN3, jak i specyficzne płciowo funkcje OXT i AVP, większość opisanych doświadczeń przeprowadzono na samcach oraz samicach szczurów w celu identyfikacji potencjalnych źródeł różnic płciowych we wrażliwości na RLN3 oraz w funkcjach OXT i AVP. Zagadnienia te zostały dogłębnie zbadane z wykorzystaniem technik elektrofizjologicznych, molekularnych, anatomicznych oraz behawioralnych.

Opisane w niniejszej rozprawie wyniki eksperymentów dotyczących sygnalizacji RLN3/RXFP3 w PVN szczura pokazują jej bezpośredni, hamujący wpływ na większość domniemanych MNCs, co stanowi potencjalny mechanizm neuronalny oreksygenicznego działania RLN3. Ponadto pokazano, że hiperpolaryzacja wywołana przez stymulację RXFP3 w domniemanych MNCs szczurów obu płci, następuje w konsekwencji aktywacji potasowego prądu podobnego do prądu M. Nie zaobserwowano różnic płciowych w działaniu sygnalizacji RLN3/RXFP3 w domniemanych MNCs. Ponadto wykazano, że gęstość włókien zawierających RLN3 jest niższa na obszarze PVN w porównaniu do strefy bezpośrednio przylegającej do tego jądra, co sugeruje udział transmisji wolumetrycznej w oddziaływaniu RLN3 na neurony PVN. Równocześnie pokazano, że gęstość włókien RLN3, zarówno w obszarze PVN, jak i tuż przy jego granicy jest wyższa u samic niż u samców, co może stanowić anatomiczne podłoże różnic płciowych w podatności na zaburzenia odżywiania, takie jak wspomniane powyżej BED. Ostatecznie, wykorzystując zwierzęcy model BED u samic szczurów, udowodniono, iż blokada RXFP3 w PVN przeciwdziała napadom objadania się.

Badania skupiające się na zidentyfikowaniu potencjalnych różnic płciowych w anatomii i elektrofizjologii domniemanych MNCs w PVN u samic i samców szczurów dostarczyły szeregu nowych informacji o tych neuronach. Zaobserwowano różnice w liczbie neuronów

OXT- i AVP-immunopozytywnych, z których te ostatnie były bardziej liczne u obu płci. Dodatkowo pokazano, że samce charakteryzują się wyższą liczbą domniemanych MNCs (zarówno OXT- jak i AVP-immunopozytywnych) niż samice. Co ważne, odkryto szereg dotychczas nieopisanych różnic w elektrofizjologii domniemanych MNCs, z których najwyraźniejszą jest kształt potencjału czynnościowego. Wskazane różnice, a zwłaszcza przebieg hiperpolaryzującego potencjału następczego (ang. hyperpolarising after-potential, HAP), który szybciej osiąga wartość minimalną w przypadku domniemanych MNCs syntetyzujących OXT niż tych syntetyzujących AVP, pozwoliły po raz pierwszy na jednoznaczne rozróżnienie tych neuronów w warunkach *ex vivo*. Wyniki eksperymentów elektrofizjologicznych wykazały wiele podobieństw pomiędzy domniemanyymi MNCs samców i samic; zidentyfikowano także pojedyncze różnice: wolniejsza kinetyka HAP w przypadku domniemanych MNCs syntetyzujących OXT u samców w porównaniu do samic oraz wyższy opór błony zarejestrowany w domniemanych MNCs samców w porównaniu do samic.

Podsumowując, wyniki zgromadzone w niniejszej rozprawie stanowią dowód na istotną rolę sygnalizacji RLN3/RXP3 w PVN w kontroli pobierania pokarmu, jak również jej udział w anormalnym, niehomeostatycznym jedzeniu. Dodatkowo stanowią one cenny wkład w wiedzę dotyczącą właściwości MNCs, które wpływają na ich różnorakie funkcje fizjologiczne.

A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'Gy / Ken' or similar, located in the lower right quadrant of the page.

The involvement of the hypothalamic paraventricular nucleus in the neuronal mechanism of relaxin-3 orexigenic action in the rat - abstract

Relaxin-3 (RLN3) is a neuropeptide expressed mainly in the nucleus incertus (NI) of the brainstem. The cognate receptor for RLN3 – relaxin family peptide receptor 3 (RXFP3) is metabotropic receptor present in the central nervous system, with expression spreading throughout various brain regions including: cortex, hippocampus, amygdala and hypothalamus. Conserved expression pattern and structure of both RLN3 and RXFP3 imply their physiological importance. Indeed, excessive research to date has shown modulatory role of the RLN3/RXFP3 signalling in arousal and motivation, spatial memory and cognition, food intake or emotional processing. Moreover, a high sensitivity of RLN3-synthesising neurons to stress-related factors positions the RLN3/RXFP3 system at the interface between environmental demands and mentioned physiological processes. RLN3 is a powerful orexigenic peptide and activation of RXFP3 in the PVN is considered to underline the orexigenic action of RLN3. Moreover, sex specific effects of central RLN3 administration on food intake have been identified, highlighting the higher sensitivity of female rats to RLN3. Notably, the RLN3/RXFP3 signalling have been implied to be involved in the binge eating disorder (BED), which is the most common eating disorder worldwide, affecting women twice as frequently as men. Nevertheless, cellular and molecular mechanisms of action associated with RLN3/RXFP3 orexigenic effect have not been identified.

The paraventricular hypothalamic nucleus (PVN) is considered a major hub of homeostatic control in mammals. Composed of functionally distinct neuronal populations, the PVN contributes to the hypothalamic neurosecretory systems (magnocellular neurosecretory cells) and central autonomic network (brain stem and spinal cord projecting parvocellular neurons). Integrating and orchestrating neuroendocrine and autonomic responses, the PVN controls stress reaction, energy and fluid balance, metabolism, nociception, reproduction and social behaviours. Magnocellular neurosecretory cells (MNCs) clustered in the PVN and the supraoptic nucleus constitute a major source of oxytocin (OXT) and arginine vasopressin (AVP) peptides and are among the best described peptidergic neurons in the mammalian hypothalamus. OXT and AVP are involved in a range of homeostatic processes, social behaviours, emotional processing and learning. Notably, their actions can be sex-specific, and several sex differences in the anatomy of OXT and AVP systems have been reported. Nonetheless, the existence of sex differences in MNC properties have not been extensively examined.

The aim of present study was to thoroughly investigate the RLN3/RXFP3 signalling in the PVN and its potential role in food intake control, as well as characterise the distribution and electrophysiological properties of PVN MNCs in the rat. Moreover, considering mentioned sex differences in the RLN3 orexigenic action and sex-specific physiological roles of OXT and AVP, majority of experiments were conducted on male and female rats to investigate the putative source of sex differences in the sensitivity to RLN3, as well as functions of OXT and AVP. To achieve this goals several electrophysiological, molecular, anatomical and behavioural techniques were utilised.

Studies on the RLN3/RXP3 signalling in the rat PVN demonstrated its direct, inhibitory influence on electrical activity of majority of putative MNCs (OXT and AVP synthesising), which is considered a plausible neuronal mechanisms of the RLN3 orexigenic effect. Moreover, the inhibitory action of RXFP3 in putative MNCs required the activation of M-like current. No sex differences were revealed in the RLN3/RXFP3 signalling in the PVN. Furthermore, this study identified that RLN3 fibres are far less abundant in the PVN somatic-rich area than in adjacent perinuclear zone region, suggesting RLN3 actions via non-somatic sites and/or volume transmission. Notably, higher intra- and peri-PVN RLN3-ir fibre densities were observed in females than males, what may constitute anatomical substrate for sex differences in the susceptibility to eating disorders e.g. binge eating disorder (BED). Finally, using a rat model of BED in female rats, present study showed that a blockage of RXFP3 within the PVN prevents binge eating behaviour.

The study exploring sex differences among OXT and AVP MNCs in male and female rats focused on distribution and electrophysiology of the putative MNCs in the PVN. Differences in the number of OXT- and AVP-immunoreactive (ir) PVN neurons were observed, with the latter being more numerous in both sexes. Moreover, sex differences in the number of the PVN neurons were revealed, with male rats having more putative OXT- and AVP-ir neurons than females. Importantly several novel characteristics of OXT and AVP putative MNC electrophysiology were described, with the most prominent being the action potential shape. Reported different time course of hyperpolarising after-potential (HAP), which reaches the minimum value faster in case of AVP than OXT putative MNCs for the first time allowed for an unequivocal identification of these cell types in *ex vivo* preparations. Finally, except for reporting similarities in number of electrophysiological parameters of putative MNCs, several sex differences were observed: a slower HAP kinetics in putative OXT MNCs in male vs. female and a higher membrane resistance in male putative MNCs.

To sum up, results presented here provide an evidence for the important physiological role of PVN RLN3/RXFP3 signalling in control of food intake, as well as its involvement in abnormal, non-homeostatic eating behaviour. Additionally, these results constitute a thorough addition to the knowledge of MNC properties shaping their diverse physiological actions.

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'G' followed by a series of loops and a final horizontal stroke.