

A dorsolateralis hypothalamus funkcionális anatómiai vizsgálata patkányban

Doktori értekezés

Papp Rege Sugárka

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Palkovits Miklós egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

Hivatalos bírálók: Dr. Vigh Béla egyetemi tanár, az MTA doktora

Dr. Reglődi Dóra egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Halász Béla egyetemi tanár, az MTA tagja

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lovas Gábor egyetemi adjunktus, Ph.D.

Dr. Hrabovszky Erik tud. tanácsadó, az MTA doktora

Budapest
2014

3.4.2. Immunhisztokémia	40
3.4.2.1. <i>BDA-tartalmú sejtek és rostok kimutatása</i>	40
3.4.2.2. <i>Orexin A és tirozin-hidroxiláz (TH) kettős jelölés</i>	41
3.4.2.3. <i>Orexin A és feniletanolamin-N-metiltranszferáz (PNMT) kettős jelölés</i>	42
3.4.2.4. <i>Orexin A, TH/PNMT és szinaptofizin többszörös jelölés</i>	42
3.4.2.5. <i>Elektronmikroszkópos kettős festések</i>	43
3.4.2.6. <i>Orexin és Fos kettős immunhisztokémia</i>	44
3.5. Dokumentáció	45
3.6. Kiértékelés és statisztika	45
3.6.1. <i>Orexin és Fos kettős festések analízise</i>	45
3.6.2. <i>A BDA-beadások verifikálása és a BDA-jelölés hisztológiai analízise</i>	46
3.6.3. <i>Konfokális képek kvantitatív analízise</i>	47
4. EREDMÉNYEK	48
4.1. Orexin A-tartalmú neuronok aktivációja különböző funkcionális modellekben	48
4.1.1. Az orexin A-tartalmú sejtek száma, denzitása és eloszlása	48
4.1.1.1. <i>A dorsolateralis hypothalamus (DLH) kvantitatív adatai</i>	48
4.1.1.2. <i>Egyes DLH szubdivíziók kvantitatív adatai</i>	49
4.1.2. Az orexin-tartalmú sejtek Fos aktivációja különböző kísérleti modellekben	50
4.1.2.1. <i>A DLH szubdivíziók orexin sejtjeinek aktivációja éheztetés után</i>	51
4.1.2.2. <i>A DLH szubdivíziók orexin sejtjeinek aktivációja REM alvás-megvonás után</i>	53
4.1.2.3. <i>A DLH szubdivíziók orexin sejtjeinek aktivációja formalin-indukált stressz hatására</i>	53
4.1.2.4. <i>Az aktiválódott orexin sejtek rostrocaudalis eloszlása</i>	55
4.2. A dorsolateralis hypothalamus (DLH) különböző szubdivízióinak kapcsolata az alsó agytörzssel	57
4.2.1. BDA-beadási helyek lokalizációja	57
4.2.1.1. <i>Area hypothalamica dorsomedialis</i>	58
4.2.1.2. <i>Area perifornicalis</i>	58
4.2.1.3. <i>Lateralis hypothalamus</i>	58

4.2.2. BDA-tartalmú rostok eloszlása az alsó agytörzsben	59
4.2.2.1. Középagy	59
4.2.2.2. Hid	62
4.2.2.3. Nyúltvelő.....	64
4.3. Orexin A-tartalmú neuronok kapcsolata az agytörzsi katekolamin sejtcsoportokkal	69
4.3.1. Orexin A rosthálózat az agytörzsi adrenalin sejtcsoportok területén	69
4.3.2. Orexin A rosthálózat az agytörzsi noradrenalin sejtcsoportok területén ..	71
4.3.3. Orexin-TH és orexin-PNMT közeli összefekvések demonstrációja a C1, C2, C3 adrenalin és az A1, A2 noradrenalin sejtcsoportok területén	74
4.3.4. Orexin-PNMT és orexin-TH szinaptikus kapcsolatok demonstrációja	76
4.3.4.1. Orexin-PNMT szinaptikus kapcsolatok a C1 és C2 sejtcsoportok területén	76
4.3.4.2. Orexin-TH szinaptikus kapcsolatok az A1, A2 és A6 sejtcsoportok területén	77
5. MEGBESZÉLÉS	80
5.1. Az orexin-tartalmú sejtek funkcionális heterogenitása	80
5.1.1. A DLH területeinek és szubdivízióinak topográfiája	80
5.1.1.1. Area hypothalamica dorsomedialis	80
5.1.1.2. Area perifornicalis.....	81
5.1.1.3. Lateralis hypothalamus	82
5.1.2. Az „orexinerg mező” felosztása	82
5.1.3. Az orexin-tartalmú neuronok aktivációja	83
5.1.4. Nincsenek funkció-specifikus orexin-tartalmú sejtcsoportok	85
5.2. A DLH alsó agytörzsi kapcsolatai	90
5.2.1. Metodikai megfontolások	90
5.2.2. A DLH agytörzsi projekcióinak eloszlási mintázata	91
5.2.2.1. A DLH neuronjai az alsó agytörzs nagy részét beidegzik	92
5.2.2.2. A különböző DLH szubrégiók részvétele az alsó agytörzs beidegzésében nem egyenlő	92
5.2.2.3. Kevés vagy néhány DLH szubdivízió erőteljesen innervál néhány agyttörzsi területet	93

5.2.2.4. <i>A formatio reticularis különböző területeinek beidegzése</i>	94
5.2.2.5. <i>A DLH szubdivízióinak részvétele az alsó agytörzsi biogén amin sejtcsoportok beidegzésében</i>	94
5.3. Az orexin-tartalmú sejtek szinaptikus kapcsolata az alsó agytörzsi katekolamin sejtcsoportokkal	96
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	99
6.1. A DLH orexin-tartalmú neuronjainak funkcionális heterogenitása	99
6.2. A DLH kapcsolata az agytörzsi területekkel	99
7. ÖSSZEFOGLALÁS	101
8. SUMMARY	102
9. IRODALOMJEGYZÉK	103
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	130
10.1. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények	130
10.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó tudományos cikkek	130
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	131

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A1 - A1 noradrenalin sejtsoport

A5 - A5 noradrenalin sejtsoport

A7 - A7 noradrenalin sejtsoport

ABC - avidin-biotin-tormaperoxidáz komplex

ac - commissura anterior

AHA - area hypothalamica anterior

AP - area postrema

Aq - aqueductus cerebri

Bar - Barrington mag

BDA - biotinizált dextrán-amin

BDHC - benzidin-dihidroklorid

BNST - bed nucleus of the stria terminalis

C1 - C1 adrenalin sejtsoport

CART - (cocaine- and amphetamine-related transcript) kokain- és amfetamin-kapcsolt transzkriptum

c - corpus callosum

cc - canalis centralis

CRHR1, CRHR2 - CRH receptor 1, CRH receptor 2

CRH - (corticotropin-releasing hormone) kortikotropin-releasing hormon

CWFSG - Cold Water Fish Skin Gelatin

DAB - 3,3'-diaminobenzidin

DLH - dorsolateralis hypothalamus

DM - area hypothalamica dorsomedialis

DMH - dorsomedialis hypothalamus

DMN - nucleus dorsomedialis

DMNd - nucleus dorsomedialis, dorsalis rész

DpMN - (deep mesencephalic nucleus) mély mesencephalicus mag

DR - nucleus raphe dorsalis

dscp - decussatio pedunculorum cerebellarium superiorum

DTg - nucleus tegmentalis dorsalis

EEG - elektroencefalogram

f - fornix

FITC-tiramid - tiramid-konjugált fluoreszcein-izotiocianát

GABA - γ -amino vajsav

Gi - nucleus reticularis gigantocellularis

Gr - nucleus gracilis

h - hypophysis

HC - (home cage) saját ketrecben tartott

HPA - (hypothalamic-pituitary-adrenal) hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengely

IC - infralimbicus cortex

icv - intracerebroventricularis

LC - locus coeruleus

LepR - leptin receptor

LH - lateralis hypothalamus

LHd - lateralis hypothalamus, dorsalis rész

LHv - lateralis hypothalamus, ventralis rész

LP - (lateral periaqueductal grey matter) központi szürkeállomány, lateralis rész

Lrt - nucleus reticularis lateralis

LS - septum lateralis része

LSO - oliva superior, lateralis rész

m5 - tractus mesencephalicus nervi trigemini

MC3R - (melanocortin receptor 3) melanokortin receptor 3

MC4R - (melanocortin receptor 4) melanokortin receptor 4

MCH - (melanin-concentrating hormone) melanin-koncentráló hormon

MdV - nucleus reticularis medullaris, ventralis rész

ME - eminentia mediana

ml - lemniscus medialis

mlf - fasciculus longitudinalis medialis

MPB - nucleus parabrachialis medialis

MnR - nucleus raphe medianus

mt - tractus mamillothalamicus

MV - nucleus vestibularis medialis

nAcSh - nucleus accumbens köpeny (shell) része
NPY - neuropeptid Y
NTS - nucleus tractus solitarii
oc - chiasma opticum
ot - tractus opticus
Ox - orexin-tartalmú neuron
OX1R - orexin-1 receptor
OX2R - orexin-2 receptor
PAG - (periaqueductal grey matter) periaqueductalis szürkeállomány
PB - 0,1 M, pH 7,4 (phosphate buffer) foszfát puffer
PBN - nucleus parabrachialis
pc - commissura posterior
PeF - area perifornicalis
PeFr - area perifornicalis, rostralis rész
PeFcm - area perifornicalis, caudomedialis rész
PeFcl - area perifornicalis, caudolateralis rész
PeVe - area periventricularis
PMR - nucleus raphe paramedianus
Pn - pons
PnC - nucleus reticularis pontis, caudalis rész
PNMT - (phenylethanolamine-N-methyltransferase) feniletanolamin-N-metiltranszferáz
PnO - nucleus reticularis pontis, oralis rész
POMC - (pro-opiomelanocortin) pro-opiomelanokortin
PR - nucleus raphe pontis
PVN - nucleus paraventricularis
py - tractus pyramidalis
Rbd - nucleus rhabdoideus
REM - (rapid eye movement) gyors szemmozgásos alvás
RMg - nucleus raphe magnus
ROb - nucleus raphe obscurus
RPa – nucleus raphe pallidus
RVLM - rostro-ventrolateral medulla

s5 - nervus trigeminus szenzoros gyökere

SCA - area subcoerulea

SCN - nucleus suprachiasmaticus

scp - pedunculus cerebellaris superioris

SD - (sleep-deprived) alvásmegvont

Sp5 - nucleus tractus spinalis nervi trigemini

TH - tirozin-hidroxiláz

V - vermis

VLP - (ventrolateral periaqueductal grey matter) periaqueductalis szürkeállomány,
ventrolateralis rész

VLPO - area preoptica, ventrolateralis rész

Y1R - neuropeptid Y receptor 1

10N - nucleus motorius nervi vagi

12N - nucleus hypoglossus

3V - harmadik agykamra

4V - negyedik agykamra

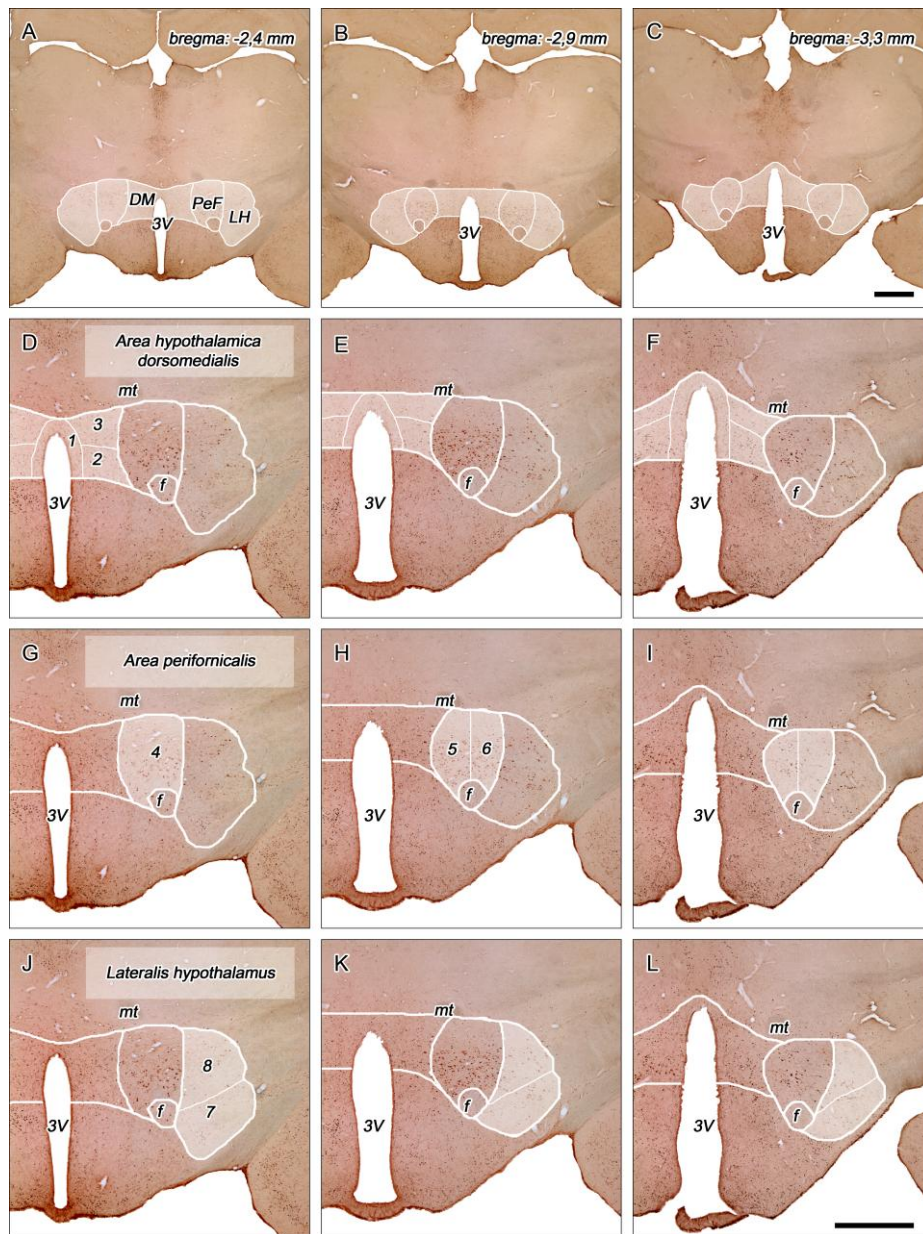
1. BEVEZETÉS

1.1. A dorsolateralis hypothalamus

A dorsolateralis hypothalamus (DLH) a hypothalamus hátsó részén található, viszonylag nagy, de pontosan körül nem írt terület. Patkányban ez a terület rostrocaudalisán a nucleus paraventricularis caudalis szélétől (körülbelül 2,2 mm-re a bregma szintjétől caudalisán) kezdődik és a harmadik agykamra recessus mamillarisának szintjéig tart (körülbelül 3,4 mm-re a bregma szintjétől caudalisán).

A DLH mediolateralis és dorsoventralis kiterjedése mai napig vita kérdése, mivel egzakt topográfiai határvonalai nincsenek. A terület medialisán eléri a harmadik agykamrát, és még caudalisabban a kamra fölé húzódik, magába foglalja az area hypothalamica dorsalis egy részét, a nucleus dorsomedialis (DMN) felső-oldalsó részét, határa a nucleus ventromedialis lateralis széle mentén éri el a hypothalamus ventralis felszínét. Dorsolateralis határvonala a thalamus és a zona incerta alatt egészen a capsula interna medialis széléig követhető. A DLH magába foglalja a hátulsó zona periventricularis egy részét, a DMN és a nucleus perifornicalis közti területet, az area perifornicalist (PeF; ami nagyobb, mint a nucleus perifornicalis maga) és a lateralis hypothalamus hátsó részét.

A DLH egy igen heterogén terület, ahol több szubdivíziót lehet elkülöníteni az ott található különböző sejttípusok és különböző denzitású neuronpopulációk eltérő afferentációja és efferentációja alapján. Különböző szerzők a DLH területét más-más módon osztották fel. Egyesek egyszerűen egy medialis és egy lateralis részre osztották a sejtcsoportot a fornixon keresztül húzott egyenes által (de Lecea és Sutcliffe 1999, Fadel és Deutch 2002, Baldo és mtsai 2004, Sunanaga és mtsai 2009, Zhang és mtsai 2009). Mások igyekeztek a hypothalamus hagyományos anatómiai határait is figyelembe venni a DLH felosztásakor, és így három részt különítettek el: DMN, PeF és lateralis hypothalamus (LH) (Murphy és mtsai 2003, Nixon és Smale 2004, Harris és mtsai 2005), esetleg négyet, egy ventralis területet is körülírva (Sato és mtsai 2003). Swanson és mtsai, valamint Hahn egy sokkal precízebb felosztást készített, a hypothalamust 13 régióra osztotta (Swanson és mtsai 2005, Hahn 2010). Munkám során korábbi, a hypothalamus coronalis sorozatmetszeteire vonatkozó sejtdenzitás mérések



1. ábra. A dorsolateralis hypothalamus területeinek és szubdivízióinak topográfiája. (A-C) A dorsolateralis hypothalamus coronalis metszeten való profilja különböző távolságokra a bregma szintjétől (jobb felső sarokban jelölve). Az A, B és C nagyobb nagyításban a [D, G, J], [E, H, K] és [F, I, L] paneleken láthatók. Az area hypothalamica dorsomedialis (D-F), az area perifornicalis (G-I) és a lateralis hypothalamus (J-L) szubdivízióit halvány fehér alapon fehér vonalak és számok jelölik: 1. area periventricularis, 2. nucleus dorsomedialis, dorsalis rész, 3. dorsomedialis hypothalamus, 4. area perifornicalis, rostralis rész, 5. area perifornicalis, caudomedialis rész, 6. area perifornicalis, caudolateralis rész, 7. lateralis hypothalamus, ventralis rész, 8. lateralis hypothalamus, dorsalis rész. Rövidítések: DM: area hypothalamica dorsomedialis, f: fornix, LH: lateralis hypothalamus, mt: tractus mamillothalamicus, PeF: area perifornicalis, 3V: harmadik agykamra. Lépték: 1 mm. Forrás: Papp és Palkovits. 2014. *Front Neuroanat* 8:34.

(Palkovits 1975), valamint az ezen a területen található különböző neuropeptid-tartalmú sejtek kvantitatív topográfiai elemzése (Papp és mtsai, közlésre benyújtva, Vas és mtsai, közlésre benyújtva) alapján a DLH területét három részre (1. ábra A-C), és ezeken belül további nyolc szubrégióra osztottuk (1. ábra D-L). Az *area hypothalamica dorsomedialis* magában foglalja az *area periventricularis* (PeVe) hátsó részének felső részét, a DMN dorsalis részének (DMNd) lateralis részét, és a dorsomedialis hypothalamust (DMH), ami az *area perifornicalis* és a DMN közti területet jelenti (1. ábra D-F). Az *area perifornicalis* a rostralis (PeFr), a caudomedialis (PeFcm) és a caudolateralis (PeFcl) PeF-ből áll. A PeFr felnőtt patkányokban a fornix és a tractus mamillothalamicus közti területet jelenti a DMN-től az LH medialis határáig (1. ábra G). Rostrocaudalisan 2,2 és 2,8 mm-nyire található a bregma szintjétől caudalisan. A fornix fölötti nagy terület a bregma szintjétől caudalisan 2,8 és 3,4 mm között képezi a PeF caudalis részét (1. ábra H-I). Egy, a fornixtól induló függőleges vonal egy medialis és egy lateralis részre osztja ezt a területet (1. ábra H-I). A *lateralis hypothalamust* a fornix aljától a pedunculus cerebri/capsula interna medialis széléhez induló egyenes egy ventralis (LHv) és egy dorsalis (LHd) szubdivízióra osztja (1. ábra J-L).

Bár a felosztás némileg szubjektív, a határvonalak jól felismerhetőek. A szubdivíziók pontos topográfiai leírását és az általunk használt felosztás irodalmi hátterét a Megbeszélésben, az 5.1.1. fejezetben részletezem.

1.2. Az orexin-tartalmú neuronális rendszer áttekintése

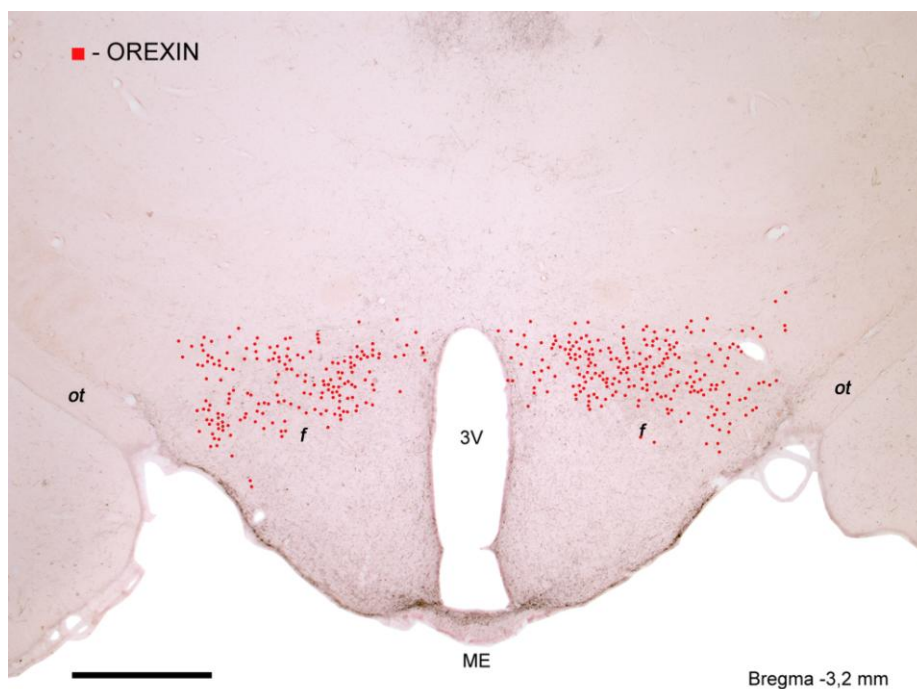
1.2.1. Az orexin-tartalmú sejtek elhelyezkedése

Az orexin A és B, vagy más néven hipokretin 1 és 2 neuropeptidok azonosítása 1998-ban történt két, egymástól független laboratóriumban. Molekuláris biológiai módszerekkel de Lecea és mtsai izoláltak két, kizárólag a hypothalamus területén expresszálódó neuropeptidet (de Lecea és mtsai 1998). Elhelyezkedésük és a szekretin családdal való hasonlóságuk alapján a két neuropeptidet hipokretin 1-nek és hipokretin 2-nek nevezték el. Velük egy időben Sakurai és mtsai G-fehérje kapcsolt árvareceptorok még nem ismert ligandumai után kutattak és így találtak két neuropeptidet, melyek intracerebroventricularisan (icv) beadva dózisfüggően megnövelték a táplálékfelvételt (Sakurai és mtsai 1998). Ezen hatásuk alapján a görög orexis (étvágy) után kapták a

neuropeptidok a nevüket: orexin A és orexin B, a két receptort pedig orexin-1 és orexin-2 receptornak (OX1R, OX2R) nevezték el.

Az orexin A patkányban egy 33 aminosavas, lineáris neuropeptid, melynek N-terminálisa piroglutamil maradványt tartalmaz, C-terminálisa pedig amidált. Az orexin B a C-terminálisan amidált, 28 aminosavas, lineáris neuropeptid (Sakurai és mtsai 1998). A két neuropeptid közös prepro-peptidből, a patkányban 130, emberben pedig 131 aminosavas prepro-orexinből keletkezik proteolitikus hasítással (Sakurai és mtsai 1998).

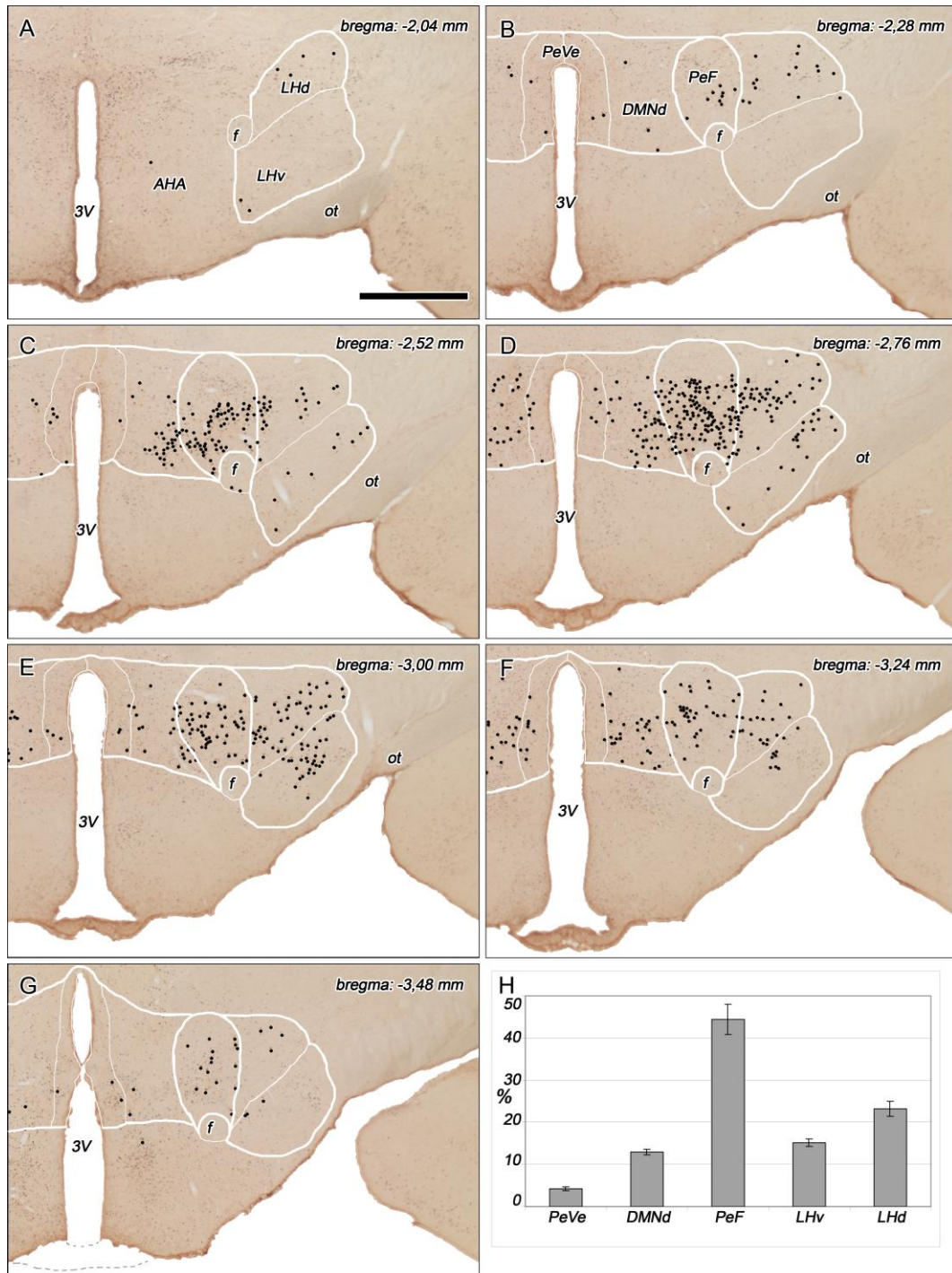
Az orexineket expresszáló neuronok a központi idegrendszerben kizárólag a DLH területén találhatóak (de Lecea és mtsai 1998, Sakurai és mtsai 1998, Cutler és mtsai 1999). A patkány agyban (2. ábra) az orexin-tartalmú neurális mező a nucleus paraventricularistól caudalisan, a nucleus tuberomamillaristól rostralisan található, a harmadik agykamrától laterális irányba terjed egészen a tractus opticusig (Peyron és mtsai 1998). Néhány sejt megtalálható a nucleus subincertus területén (Peyron és mtsai 1998) és elszórva az anterior hypothalamus ventralis részén (Nambu és mtsai 1999).



2. ábra. Az orexin-tartalmú neuronok (piros pöttyök) elhelyezkedése a dorsolateralis hypothalamus területén patkány coronalis agymetszetén. Rövidítések: f: fornix, ME: eminentia mediana, ot: tractus opticus, 3V: harmadik agykamra. Lépték: 1 mm. Forrás: saját, publikálatlan ábra.

Ezek a sejtek az orexineken kívül még számos más kémiai anyagot is expresszálnak. Ilyen például a dinorfín (Chou és mtsai 2001, Bayer és mtsai 2002), a szekretogranin II (Bayer és mtsai 2002), a vezikuláris glutamát transzporter VGLUT1 és VGLUT2 (Rosin és mtsai 2003), a neurotenzin (Furutani és mtsai 2013), a nociceptin/orfanin FQ (Maolood és Meister 2010), valamint a pancreaticus polipeptid Y4 receptor (Campbell és mtsai 2003), a leptin receptor (Hakansson és mtsai 1999), kortikotropin-releasing hormon receptor 1 és 2 (CRHR1, CRHR2) (Winsky-Sommerer és mtsai 2004). Az orexin-tartalmú neuronok egy része ko-expresszál leucin-enkefalint (Ciriello és mtsai 2013).

A DLH területén az orexin-tartalmú sejtek részben ko-disztribúciót mutatnak más neuropeptidet, úgymint melanin-koncentráló hormont (MCH) (Broberger és mtsai 1998, Bayer és mtsai 2002, Steininger és mtsai 2004), neurális nitrogén oxid-szintáz (Cutler és mtsai 2001), nesfatin1/NUCB2-t (Fort és mtsai 2008), γ -amino vajsavat (GABA) (Hassani és mtsai 2010) és leucin-enkefalint (Ciriello és mtsai 2013) termelő sejtekkel. A ko-disztribúció ellenére elmondható, hogy az orexin sejtek eloszlási mintázata egyedi és nem tisztelik az anatómiai határokat. Az orexin-tartalmú sejtek topográfiája és denzitása, valamint a DLH felosztása (1. ábra) alapján a patkány hypothalamus orexin-tartalmú területeit három részre és azt további öt alterületre osztottuk a következőképpen: az area hypothalamica dorsomedialis itt is jól körülhatárolható, de csak két szubdivíziót (a PeVe-t és a DMNd-t) különítettünk el benne, a PeF-t nem osztottuk további részekre, az LH-n belül pedig elhatároltunk egy ventralis és egy dorsalis részt (3. ábra).



3. ábra. A hypothalamicus orexinerg mező felosztása. (A-G) A dorsolaterális hypothalamus területei (fehér vastag vonal) és szubrégiói (fehér vékony vonal) jól elkülöníthetők a patkány agy coronalis rostrocaudalis metszetein. A fekete pöttyök az orexin-tartalmú neuronokat jelzik. A bregmától való távolságot a kép jobb oldalán fent tüntettük fel. (H) Az orexin-tartalmú sejtek százalékos eloszlása a szubdivíziók közt. Rövidítések: AHA: area hypothalamica anterior, DMNd: nucleus dorsomedialis, dorsalis rész, f: fornix, LHd: laterális hypothalamus dorsalis része, LHv: laterális hypothalamus ventralis része, mt: tractus mamillothalamicus, ot: tractus opticus, PeF: area perifornicalis, PeVe: area periventricularis, 3V: harmadik agykamra. Lépték: 500 μ m. Forrás: saját, közlésre benyújtott cikk ábrája.

1.2.2. Orexin receptorok a központi idegrendszerben

Az orexineknek két receptorát írták le: OX1R és OX2R (Sakurai és mtsai 1998). Az előbbi sokkal nagyobb affinitással köti az orexin A-t, mint az orexin B-t, az utóbbihoz pedig hasonló affinitással kötődik mindkét neuropeptid (Sakurai és mtsai 1998). A két orexin receptor a központi idegrendszer valamennyi orexin által beidegzett területén megtalálható, egymástól eltérő, komplementer eloszlásban (Trivedi és mtsai 1998, Lu és mtsai 2000, Marcus és mtsai 2001).

Az agykéregben az OX1R leginkább a prelimbicus és az infralimbicus kérgi területeken található meg, ott is főleg a 2. és 3. réteg sejtjeiben, míg az OX2R-t tartalmazó sejtek diffúz eloszlásban, a neocortex számos régiójában megtalálhatóak (Marcus és mtsai 2001). A hippocampus területén az OX1R mRNS a CA2, míg az OX2R mRNS a CA3 régióban volt a legnagyobb denzitásban megfigyelhető (Marcus és mtsai 2001). A bazális előagyban csak az OX2R mRNS-t expresszálják a nucleus septalis medialis és a substantia innominata sejtjei, míg a nucleus tractus diagonalis (Broca) neuronjai mindkét receptort expresszálják (Marcus és mtsai 2001). Az amygdala területén a nucleus medialis sejtjei expresszálják az OX1R mRNS-t, a nucleus corticalis posterior sejtjei pedig az OX2R-t (Marcus és mtsai 2001).

A thalamus területén mindkét receptor megtalálható a nucleus paraventricularis thalami, a nucleus rhomboideus és a középvonali thalamicus magok sejtjeiben.

A hypothalamus területén a nucleus hypothalamicus anterior és a nucleus ventromedialis sejtjei nagy mennyiségben expresszálják az OX1R-t. A hypothalamus dorsalis és hátsó részén, a nucleus premamillaris ventralis részén és a nucleus supramamillaris területén lévő neuronokban is megtalálható az OX1R. Az LH területén OX1R mRNS-t expresszáló sejtek diffúzan helyezkednek el. A nuclei paraventricularis, arcuatus és tuberomamillaris neuronjaiban az OX2R mRNS található meg. A DMN sejtjei inkább OX2R mRNS-t expresszálnak, de az OX1R mRNS-e is megtalálható (Trivedi és mtsai 1998, Marcus és mtsai 2001).

A középagyban, a hídban és a medullában is eltérő területeken található meg a két receptor. A locus coeruleus, az A5 és A7 noradrenalin sejtcsoport, valamint a ventrolateralis medulla neuronjai OX1R-t tartalmaznak, akárcsak a nucleus tegmentalis laterodorsalis és nucleus tegmentalis pedunculopontinus sejtjei, ugyanakkor a nucleus

motorius nervi trigemini neuronjai OX2R-t (Marcus és mtsai 2001). Az area tegmentalis ventralis és a nucleus raphe dorsalis neuronjai mindkét receptort expresszálják (Marcus és mtsai 2001).

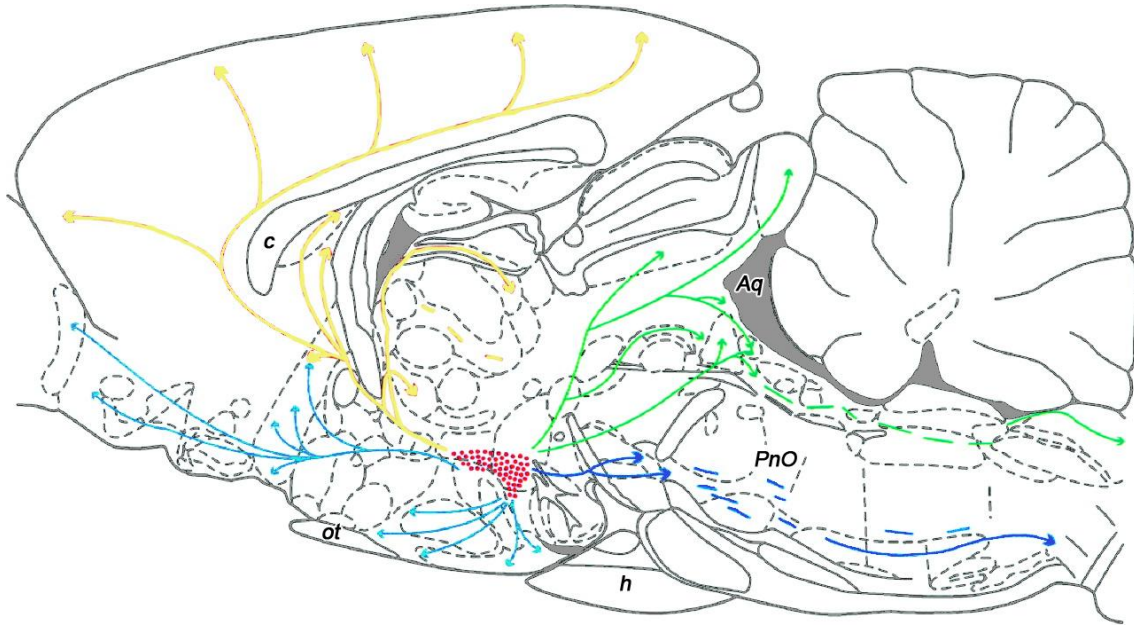
1.2.3. Az orexin-tartalmú sejtek efferenciációja

Bár az orexin-tartalmú sejtek az agy viszonylag kis területén, a DLH-ban találhatóak, belőlük négy pálya indul ki, egy dorsalis és egy ventralis felszálló, valamint egy dorsalis és egy ventralis leszálló (4. ábra), ezek rostjai gazdagon behálózzák a teljes idegrendszert (Peyron és mtsai 1998, Nambu és mtsai 1999, van den Pol 1999).

Maga a hypothalamus is gazdag orexin-tartalmú rostokban, és bár a rostok nagy része csak áthalad a DLH-n, számos végződés is található itt. Orexin-tartalmú terminálisokat mutattak ki orexin- (Li és mtsai 2002) és MCH-tartalmú (Guan és mtsai 2002) sejteken. Nagyszámú orexin-tartalmú rost található a nucleus paraventricularis parvocellularis részében, míg a magnocellularis részbe csak néhány rost lép be (Date és mtsai 1999). A DMN és a nucleus ventromedialis, valamint a nucleus preopticus medialis részének orexinerg beidegzése mérsékelt (Peyron és mtsai 1998). A nuclei supraopticus és suprachiasmaticus területére csak néhány rost lép be (Peyron és mtsai 1998, Date és mtsai 1999). A nucleus arcuatus területén sok hosszú, vastag, varikózus orexin rost látható, az itt található neuropeptid Y- (NPY) és pro-opiomelanokortin- (POMC) tartalmú sejteken kimutatták az orexin-terminálisokat (Horvath és mtsai 1999a, Guan és mtsai 2001). A hypothalamus caudalis részén a nucleus supramamillaris és a nucleus tuberomamillaris gazdagon innervált (Nambu és mtsai 1999), a nucleus tuberomamillaris hisztamin-tartalmú sejtjeit az orexinek közvetlenül serkentik OX2R-n keresztül (Bayer és mtsai 2001, Schöne és mtsai 2012).

Az orexin-tartalmú rostok a felszálló dorsalis pályán keresztül a zona incertán áthaladva elérik a nucleus paraventricularis thalamit, a nucleus centromedialis thalamit és a habenula lateralis részét, ugyanakkor a thalamus többi területét elkerülik a rostok. Az orexinerg rostok megtalálhatóak még a substantia innominata, a bed nucleus of stria terminalis, illetve a nucleus septalis medialis és lateralis területén. Bár a cortex területén elszórva mindenhol megtalálhatóak, a rostok denzitása a corpus callosum mellett nagyobb (Peyron és mtsai 1998). Az insularis, a prelimbicus, a piriform és az

infralimbicus kéreg mérsékelt beidegzést kap, valamint a szenzoros és motoros kéregben is csak néhány rost figyelhető meg (Date és mtsai 1999). Az amygdala területére a tractus opticus mentén jutnak el az orexin-tartalmú rostok (Peyron és mtsai 1998).



4. ábra. Az orexin-tartalmú sejtek projekciós rendszere. Sematikus összefoglaló ábra Peyron és mtsai munkája alapján (Peyron és mtsai 1998). A sagittalis metszési sík Paxinos és Watson atlaszából (1986) származik. Piros pöttyök: orexin-tartalmú neuronok, sárga: dorsalis felszálló pálya, világoskék: ventralis felszálló pálya, zöld: dorsalis leszálló pálya, sötétkék: ventralis leszálló pálya. Rövidítések: Aq: aqueductus cerebri, c: corpus callosum, h: hypophysis, ot: tractus opticus, PnO: nucleus reticularis pontis.

A ventralis felszálló pálya által érik el az orexin-tartalmú rostok a pallidum ventralis részét, a Broca-féle diagonális köteg vertikális és horizontális kötegét, a nucleus accumbens medialis részét és a bulbus olfactoriust (Peyron és mtsai 1998).

A hypothalamustól caudalis irányba haladó dorsalisan leszálló rostok a substantia grisea centralison (periaqueductalis szürkeállomány, PAG) keresztül érik el a colliculus superiort és inferiort, a híd szürkeállományát, a nucleus raphe dorsalist és a nucleus tegmentalis laterodorsalist (Peyron és mtsai 1998, Date és mtsai 1999). Továbbá ezen az úton érik el az orexin-tartalmú rostok a locus coeruleust, amely az agy egyik leggazdagabb orexinerg beidegzését kapja (Peyron és mtsai 1998, Date és mtsai 1999, Horvath és mtsai 1999b). Az area tegmentalis dorsalis területén keresztül jutnak az orexin-tartalmú rostok a nucleus pedunculopontinus, a nucleus parabrachialis és az area

subcoerulea területére (Peyron és mtsai 1998). A nucleus vestibularest elkerülve a nucleus tractus solitarii dorsolateralis részébe lépnek be a rostok (Peyron és mtsai 1998).

A ventralis leszálló pálya esetében az orexinerg rostok áthaladnak a nucleus interpeduncularis, az area tementalis ventralis és a substantia nigra pars compacta területén (Peyron és mtsai 1998). A hídban és a medullában az orexinerg rostok beidegzik a raphe magokat (Berthoud és mtsai 2005), valamint a formatio reticularis több részét, a nucleus reticularis gigantocellularis α és a medulla ventralis részét (Peyron és mtsai 1998). Különösen gazdag beidegzést kap a nucleus raphe magnus, a nucleus paragigantocellularis lateralis és az A5 noradrenalin sejtsoport (Peyron és mtsai 1998).

Az orexin rostokat nyomon lehet követni a gerincvelő teljes hosszában egészen a sacralis szegmentumokig (van den Pol 1999). A gerincvelő fehérállományában az orexin-tartalmú rostok leginkább az oldalsó köteg dorsalis részében futnak (van den Pol 1999). A szürkeállományban az orexin-tartalmú rostok megfigyelhetők az I., II. és VII. Rexed laminában, az intermediolateralis magoszlop területén, valamint a canalis centralis körüli központi autonóm területen, a X. Rexed laminában (van den Pol 1999).

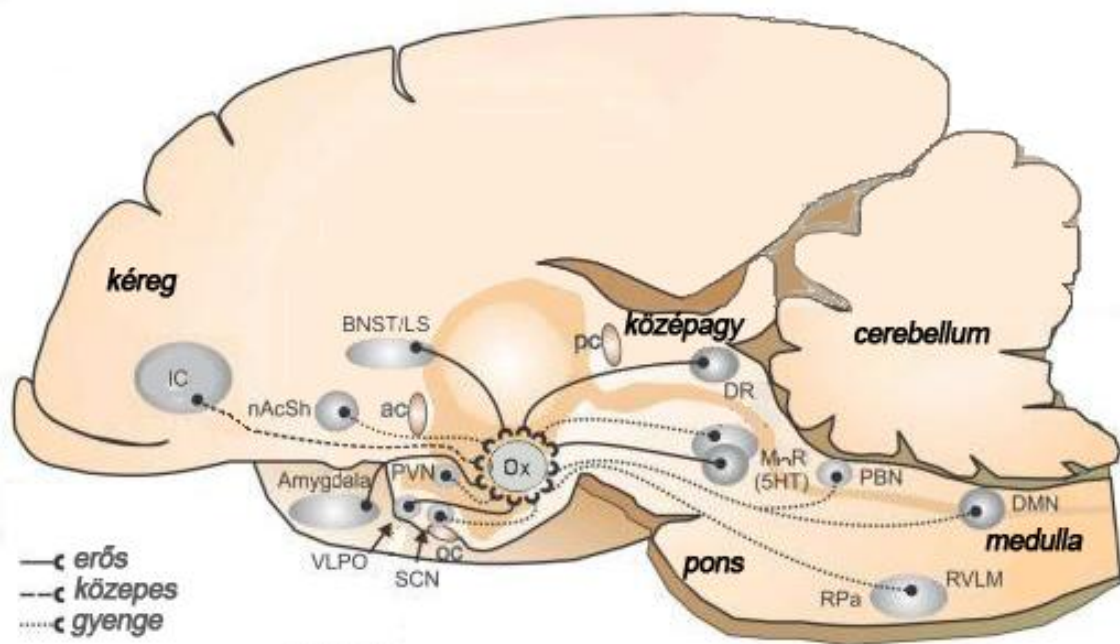
1.2.4. Az orexin-tartalmú sejtek afferenciációs rendszere

Pályajelöléses és transzgénikus egereken végzett kísérletek szolgálnak alapul az orexin-tartalmú sejtek afferenciációs rendszerének feltérképezéséhez (Sakurai és mtsai 2005, Henny és Jones 2006, Yoshida és mtsai 2006). Erről ad áttekintést az 5. ábra.

Több olyan hypothalamicus terület van, melyeknek sejtjei gazdagon beidegzik az orexin-tartalmú neuronokat, ilyen például az area preoptica medialis és lateralis (Sakurai és mtsai 2005, Yoshida és mtsai 2006). A nucleus suprachiasmaticus az orexin sejtek 11%-át idegzi be, ezek a sejtek leginkább a fornixtól medialisan helyezkednek el (Yoshida és mtsai 2006). A nucleus paraventricularis parvocelluláris része, a DMN, a nucleus ventromedialis és a nucleus arcuatus nagy számban tartalmaz olyan sejtet, amelyek rostokat küldenek a DLH orexin sejtjeihez (Yoshida és mtsai 2006). Varikózus aguti-kapcsolt peptid-tartalmú rosthálózat figyelhető meg a DLH területén az MCH- és az orexin-expresszálló sejtek körül (Broberger és mtsai 1998). Ezen területek és az

orexin-tartalmú neuronok kapcsolata kiemelt jelentőséggel bír az intrahypothalamicus neuronális kapcsolatok között, a táplálékfelvétel szabályozásában betöltött szerepük miatt (Palkovits 2003).

A DLH és a PeF ugyancsak gazdagon beidegzi az orexin sejteket (Yoshida és mtsai 2006). Az orexin sejteken orexin-tartalmú szinapszisokat mutattak ki, melyek serkentő jellegét is igazolták (Li és mtsai 2002, Yamanaka és mtsai 2010). Az orexin és MCH sejtek közt is megfigyelhető egy kétirányú szinaptikus kapcsolat, ami fontos szereppel bír a táplálékfelvétel és az alvás-ébrenlét szabályozásában is (Guan és mtsai 2002).



5. ábra. Az orexin-tartalmú sejtek afferentációs rendszere. Módosított sematikus összefoglaló ábra Johnson és mtsai munkája alapján (Johnson és mtsai 2012). A különböző vonalak (folytonos, szaggatott, pontozott) a projekciók erősségét jelzik (magyarázatot lásd az ábrán alul bal oldalon). Rövidítések: ac: commissura anterior, BNST/LS: bed nucleus of the stria terminalis/septum lateralis része, DMN: nucleus dorsomedialis, DR: nucleus raphe dorsalis, IC: infralimbicus cortex, MnR: nucleus raphe medianus, nAcSh: nucleus accumbens köpeny része, oc: chiasma opticum, Ox: orexin-tartalmú neuron, PAG: periaqueductalis szürkeállomány, PBN: nucleus parabrachialis, pc: commissura posterior, PVN: nucleus paraventricularis, RPa: nucleus raphe pallidus, RVLM: rostro-ventrolateral medulla, SCN: nucleus suprachiasmaticus, VLPO: area preoptica, ventrolateralis rész.

A nucleus premamillaris dorsalis és ventralis, valamint a corpus mamillare középső régiója és a nucleus supramamillaris is innerválja az orexin sejteket (Yoshida és mtsai 2006). A thalamus területén csak elszórva található néhány ilyen neuron, azok is leginkább a nucleus paraventricularis thalamiban (Yoshida és mtsai 2006).

A „limbicus rendszer” egyes komponensei, így a septum, a bed nucleus of the stria terminalis, az amygdala, a bazális előagy és a hippocampus (subiculum) is részt vesz az orexinerg terület beidegzésében (Henny és Jones 2006, Yoshida és mtsai 2006).

Az agytörzsből az orexin sejtekhez elsősorban a PAG, az area tementalis ventralis és a raphe magok területéről indulnak rostok, ugyanakkor a locus coeruleus és a nucleus tractus solitarii projekciója nem túlságosan erős (Sakurai és mtsai 2005, Yoshida és mtsai 2006). Sakurai és mtsai (2005) találtak a nucleus dorsalis nervi vagi területén is az orexin sejtekhez projiciáló neuronokat, akárcsak Niu és mtsai (2010) a nucleus parabrachialis lateralis részében.

Az orexin-tartalmú sejteken végződő terminálisok kémiai karakterét tekintve számos adat áll a rendelkezésünkre. A klasszikus neurotranszmitterek közül a serkentő glutamát és a gátló GABA közvetlenül, szinaptikus úton szabályozza az orexin sejtek aktivitását. GABAerg gátló rostokat kap például az area preoptica ventrolateralis részéről (Sakurai és mtsai 2005). Közvetlen glutamáterg beidegzést kapnak az orexin-tartalmú sejtek többek között a nucleus parabrachialis lateralis részének neuronjaitól (Niu és mtsai 2010), illetve a bazális előagyból (Henny és Jones 2006). Ez utóbbi területről glutamáterg mellett GABAerg végződések is eléri az orexin-tartalmú sejteket (Henny és Jones 2006).

A szerotonerg raphe magokat az orexin sejtek gazdagon innerválják, az orexin sejtekkel pedig appozícióban szerotonin-transzportert, a szerotonin-tartalmú terminálisok preszinaptikus membránjában lokalizált fehérjét mutattak ki (Muraki és mtsai 2004). A szerotonin hiperpolarizáló hatását az orexin sejtek membránjában található 5-HT_{1A} szerotonin receptor közvetíti (Muraki és mtsai 2004). Az agytörzsi raphe magvak különböző mértékben vesznek részt az orexin-tartalmú sejtek beidegzésében (Sakurai és mtsai 2005, Yoshida és mtsai 2006).

A felszálló noradrenerg rendszer gazdagon ellátja rostokkal a hypothalamust (Moore és Card 1984). Számos noradrenalin-tartalmú varikózus rost található az orexin-tartalmú sejtek és dendritek közvetlen közelében (Baldo és mtsai 2003). A noradrenalin orexin-

tartalmú neuronokat hiperpolarizáló hatását az α_2 adrenerg receptor közvetíti (Li és van den Pol 2005). Ez a receptor a D2 dopamin receptor mellett részt vesz a dopamin gátló hatásának közvetítésében (Li és van den Pol 2005, Yamanaka és mtsai 2006).

Az acetilkolin gátló és serkentő hatást is gyakorol az orexin sejtekre, ezeket az acetilkolin különböző muszkarinos receptorai közvetítik (Yamanaka és mtsai 2003b, Li és van den Pol 2005). Bár az orexint expresszáló neuronok gazdagon beidegzik a nucleus tuberomamillaris területét, annak hisztamin-tartalmú sejtjeinek axonjai nem érik el közvetlenül az orexin sejteket (Sakurai és mtsai 2005).

1.3. Az orexinek különböző funkcionális szerepe a központi idegrendszerben

Az orexin-tartalmú neuronok számos funkcióban betöltött szabályozó szerepét mind a sejtek, mind pedig a rostok eloszlása sejteti. Már 1998 óta ismert a táplálékfelvétel szabályozásában való részvétele (Sakurai és mtsai 1998), egy évvel később ismertté vált az alvás-ébrenlét szabályozásában való központi szerepe (Chemelli és mtsai 1999, Lin és mtsai 1999), nem sokkal később pedig kapcsolatba hozták a stresszválasszal (Ida és mtsai 2000), a fájdalomcsillapítással (Bingham és mtsai 2001), a jutalmazással és az addikcióval (Boutrel és mtsai 2013), a légzés (Young és mtsai 2005) és a vízháztartás szabályozásával (Kunii és mtsai 1999), a termoregulációval (Morrison és mtsai 2012), valamint az endokrin (Lopez és mtsai 2010) és a kardiovaszkuláris rendszer (Samson és mtsai 1999, Shirasaka és mtsai 1999) szabályozásával is.

1.3.1. Az orexinek szerepe a táplálékfelvétel és a metabolizmus szabályozásában

Az orexinek a nevüket is a táplálékfelvételt serkentő hatásuk révén kapták, hiszen *in vivo* dóziszfüggően fokozták a táplálékfelvételt (Sakurai és mtsai 1998, Haynes és mtsai 1999, Sweet és mtsai 1999). Ez az orexigén hatás mindkét neuropeptid (orexin A és B) esetében hasonló volt és intenzitásában megegyezett az ugyanígy beadott MCH és galanin hatásával, de kisebb mértékű volt az NPY-hoz képest (Edwards és mtsai 1999). Ugyanezt a hatást mutatták ki, amikor orexin A-t a DMN, a PeF vagy az LH területére juttattak, viszont az orexin B beadásakor ezt nem tapasztalták (Dube és mtsai 1999, Sweet és mtsai 1999). Orexin antitest központi beadása szignifikánsan lecsökkentette az éheztetett állatok táplálékfelvételét (Yamada és mtsai 2000). OX1R antagonistá, az SB-334867 intraperitoneális beadása lecsökkentette az alap táplálékfelvételt, és mérsékelte a hypothalamusba injektált orexin táplálékfelvételt indukáló hatását, valamint blokkolta az éheztetett állatok táplálékfelvételét (Haynes és mtsai 1999). Éheztetés következtében megnőtt a prepro-orexin mRNS mennyisége (Cai és mtsai 1999, Mondal és mtsai 1999), és a Fos-pozitív orexin sejtek száma (Diano és mtsai 2003). Azok az egerek, amelyekből hiányoztak az orexin-tartalmú neuronok, hipofágok voltak és idővel kórosan elhízottakká váltak (Hara és mtsai 2001).

Orexin A hatására számos, a táplálékfelvétel szabályozásában részt vevő hypothalamicus, limbicus és agytörzsi terület sejteiben megjelenik a Fos fehérje, ami egy azonnal indukálható transzkripciós faktor (Mullett és mtsai 2000, Yamanaka és mtsai 2000).

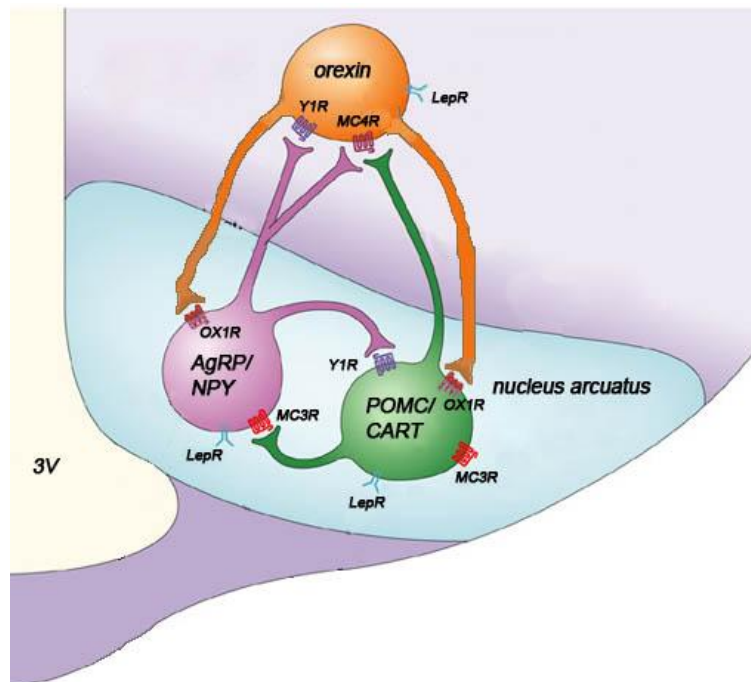
A szervezet energiaállapotáról többek között humorális úton értesülnek az orexin-tartalmú sejtek. Közvetlenül érzékelik az extracelluláris glükóz változását, a magas glükóz koncentráció gátolja őket, azaz az orexin-tartalmú neuronok glükóz-érzékenyek (Muroya és mtsai 2001). Akut hipoglikémia hatására megnő az orexin sejtek Fos aktivációja (Moriguchi és mtsai 1999, Cai és mtsai 2001, Kiss és mtsai 2004) és megemelkedik a prepro-orexin mRNS szintje (Cai és mtsai 1999).

Leptin, egy, a zsírszövetből felszabaduló molekula, melynek mennyisége arányosan változik a szervezet zsírtartalmával, a táplálékfelvételt gátló, anorexigén hatású receptorán keresztül fejt ki, melyet az orexin-tartalmú sejtek is expresszálnak (Hakansson és mtsai 1999). A leptin gátolja az orexin sejteket, hiperpolarizálja azokat és csökkenti tüzelési frekvenciájukat (Yamanaka és mtsai 2003a). Az NPY- és a galanin-indukálta táplálékfelvétel teljes mértékben kivédhető leptin beadásával, ugyanakkor az ezzel megegyező vagy magasabb dózisban beadott leptin csak csökkenti, de meg nem szünteti az orexin orexigén hatását (Zhu Y. és mtsai 2002). Ez alapján feltételezhető, hogy az orexin egy leptin-függő és egy leptin-független úton is kifejtheti táplálékfelvételt indukáló hatását.

Ghrelin, egy, a gyomorból felszabaduló orexigén hatású peptid, izolált orexin sejtekre aktiváló hatású, depolarizálja azokat és megnöveli a sejtek akciós potenciáljának frekvenciáját (Yamanaka és mtsai 2003a). Icv beadva, vagy közvetlenül a DLH-ba injektálva az orexin-tartalmú neuronokban Fos indukciót vált ki (Lawrence és mtsai 2002, Olszewski és mtsai 2003).

A szervezet energiaállapotáról neurális úton is kapnak információt az orexin-tartalmú sejtek. Egyrészt a gyomor állapotáról információt kap a nucleus tractus solitariiból közvetlenül, illetve közvetett módon a nucleus parabrachialisson keresztül (Cai és mtsai 2001, Williams és mtsai 2004, Niu és mtsai 2010). Másrészt a nucleus arcuatus táplálékfelvétel-szabályozásában részt vevő anorexigén (kokain- és amfetamin-kapcsolt transzkriptumot és POMC-t ko-expresszáló) és orexigén (NPY-t és aguti-kapcsolt peptidet ko-expresszáló) sejtcsoportjai felől is kap információt (6. ábra) (Broberger és

mtsai 1998, Elias és mtsai 1998). Míg az előbbi sejtszoporton belül elkülönítenek GABAerg és glutamaterg szubpopulációt, addig az utóbbi sejtjei GABA-t tartalmaznak (Krashes és mtsai 2013, Wittmann és mtsai 2013). Orexin-tartalmú rostok gazdag hálózata figyelhető meg a nucleus arcuatus területén, és az itt lévő NPY- és POMC-pozitív sejteken kimutathatóak orexin-tartalmú terminálisok (Horvath és mtsai 1999a, Guan és mtsai 2001). Orexin hatására a nucleus arcuatus POMC sejtjei hiperpolarizálódnak, tüzelési frekvenciájuk csökken (Ma és mtsai 2007). Az NPY-tartalmú sejtekben icv orexin hatására Fos expresszió figyelhető meg (Yamanaka és mtsai 2000). Az orexin A által indukált táplálékfelvétel bizonyos mértékig megelőzhető NPY Y1 receptor antagonistá, BIBO3340 icv beadásával, ami az NPY-indukált táplálékfelvételt teljesen megszünteti (Yamanaka és mtsai 2000). Ezek alapján



6. ábra. Az orexin-tartalmú sejtek kapcsolata a nucleus arcuatus táplálékfelvétel-szabályozásban részt vevő neuronjaival. Módosított, sematikus ábra Barsh és Schwartz munkája nyomán (Barsh és Schwartz 2002). A táplálékfelvételt beindító hatású neuropeptid Y (NPY) és aguti-kapcsolt protein (AgRP), valamint az azt gátló pro-opiomelanokortin (POMC) és kokain- és amfetamin-kapcsolt transzkriptum (CART) neuropeptideket ko-expresszáló sejtek szinaptikus kapcsolatban állnak a dorsolaterális hypothalamus orexin-tartalmú neuronjaival. Az orexin-tartalmú sejtek is szinapszist képeznek ezeken a neuronokon. Rövidítések: LepR: leptin receptor, MC3R: melanokortin receptor 3, MC4R: melanokortin receptor 4, OX1R: orexin-1 receptor, Y1R: neuropeptid Y receptor 1.

valószínűsíthető, hogy az orexin táplálékfelvételt beindító hatása részben az NPY-tartalmú neuronok révén valósul meg.

Orexin A- és B-tartalmú varikózus rostok találhatóak a nucleus dorsalis nervi vagi területén, ahol OX1R-t és kisebb mértékben OX2R-t is kimutattak (Krowicki és mtsai 2002). Pályajelöléses módszerrel igazolták, hogy a nucleus dorsalis nervi vagi gyomrot beidegző preganglionaris idegsejtjei OX1R-t expresszálnak (Krowicki és mtsai 2002). A nucleus dorsalis nervi vagi rostralis részébe adott orexin hosszantartó antrum kontraktilitást okoz, míg a caudalis részbe injektált orexinnek nincs ilyen hatása (Krowicki és mtsai 2002). Az ipsilateralis vagotómia átmenetileg megszünteti az orexin gyomormotilitást előidéző hatását (Krowicki és mtsai 2002). A gastrointestinalis rendszer beidegzésében részt vevő preganglionaris neuronok közül leginkább a gyomor fundusát és corpusát beidegzők depolarizálódnak orexin hatására (Grabauskas és Moises 2003). Továbbá az intraciszternalisán adott orexin A megnöveli a gyomor motoros aktivitását (Nozu és mtsai 2011). Ez a hatás intraperitonealisán adott atropinnal gátolható, tehát az orexin a nervus vaguson keresztül hat a gyomor motilitására (Nozu és mtsai 2011).

Intraciszternalis orexin beadás dózisfüggően stimulálja a gyomorsav szekréciót (Takahashi és mtsai 1999). Ez a hatás vagotómiával, illetve atropin beadással kivédhető (Takahashi és mtsai 1999). Patkány medulla szeletekből származó elvezetések alapján a nucleus dorsalis nervi vagi sejtjeinek 30%-át depolarizálja az orexin, ezek egy része preganglionaris paraszimpatikus neuronnak bizonyult (Hwang és mtsai 2001).

Ugyancsak gyomorsav elválasztást eredményez az orexin A nucleus ventromedialisba való injektálása, ahol az OX1R-t expresszáló sejtek nagy számban megtalálhatóak (Eliassi és mtsai 2009). Az intraperitonealisán beadott OX1R blokkolóval, SB-334867-tel, vagy subcutan atropinnal való előkezelés kivédi az orexin gyomorsav szekréciót indukáló hatását (Eliassi és mtsai 2009).

Ezek alapján elmondható, hogy az orexin sejtek premotor neuronokként a szimpatikus és paraszimpatikus preganglionaris sejtszövetekkel való kapcsolatuk által a bennük integrálódott információk függvényében befolyásolják a táplálékfelvételt és a szervezet energiaháztartását.

1.3.2. Az orexinek szerepe az alvás-ébrenlét ciklus szabályozásában

A magasabbrendű állatoknál a központi idegrendszer két, egymást kizáró működési állapotát különíthetjük el: az alvást és az ébrenlétet. Az alvás állapotát tovább lehet osztani lassú hullámú alvásra, amit non-REM alvásnak is neveznek, illetve gyors szemmozgásos (rapid eye movement - REM), vagy más néven paradox alvásra. Ezeket az állapotokat diszkrét elektroencefalográfiás (EEG) és elektromiogrammos tulajdonságok jellemzik. A lassú hullámú alvás alatt az EEG jelet mind emberben, mind állatban a nagy amplitúdójú, lassú (1-4 Hz) delta hullámok dominálják. Ekkor a szívfrekvencia, a vérnyomás és az izomtónus csökkenése tapasztalható. REM alvás során az EEG deszinkronizálódik, az izomtónus megszűnik és gyors szemmozgások figyelhetők meg. Ez utóbbi jelenségről kapta ez az alvási stádium a nevét. A REM fázis során egyebek mellett tapasztalható még a szívfrekvencia és a vérnyomás emelkedése. Ébrenlét alatt alacsony amplitúdójú, kevert frekvenciájú oszcillációk jellemzik az EEG-t. Ilyenkor megnő a motoros aktivitás, a szenzoros bemenetekre való válaszkészség, az emocionális reaktivitás és felerősödnek a kognitív képességek.

Elhelyezkedésük (von Economo 1931), anatómiai kapcsolataik (Peyron és mtsai 1998), valamint az orexinerg rendszer sérülése esetén fellépő narkolepszia (Chemelli és mtsai 1999, Lin és mtsai 1999) alapján elég hamar egyértelművé vált, hogy az orexin-tartalmú sejtek fontos komponensei az alvás és az ébrenlét szabályozásában részt vevő idegi hálózatnak.

A narkolepszia egy olyan alvászavar, mely során abnormális REM alvás tulajdonságok lépnek fel, úgymint az ébrenlétbe átmenet nélkül betörő REM epizódok, kataplekszia, azaz tónustalan összeesés és álomszerű hallucinációk. Narkolepsziában szenvedő emberek cerebrospinalis folyadékában nincs vagy kevés a detektálható orexin A (Kanbayashi és mtsai 2002), a *post-mortem* agyak vizsgálata során az orexin-tartalmú sejtek számának csökkenését tapasztalták (Thannickal és mtsai 2000). Prepro-orexin knockout (Chemelli és mtsai 1999), illetve szaporin-orexin B konjugátummal orexin-sejt irtott patkányokban (Gerashchenko és mtsai 2001), orexin/ataxin transzgénikus egerekben (Hara és mtsai 2001), valamint olyan kutyákban, amelyekben valamilyen OX2R génmutáció lépett fel (Lin és mtsai 1999), megfigyelhető a narkolepszia jelensége. A prepro-orexin knockout egerek a vad típusú egyedekhez képest

soványabbak (Willie és mtsai 2001), míg azok, melyekben az orexin sejteket kiirtották, elhízottak (Hara és mtsai 2001). Ez az ellentmondás azzal magyarázható, hogy knockout egerekből csak az orexin hiányzik, más metabolikus szabályozásban részt vevő neurotranszmitter (pl. dinorfin) nem (Hara és mtsai 2005). Ezek a neuropeptidok és neurotranszmitterek kompenzálhatják az orexin hiányát; Beuckmann és mtsai szerint az orexin-tartalmú neuronok az energia homeosztázisra gyakorolt hatásukat nem csak az orexin neuropeptideken keresztül fejtik ki (Beuckmann és Yanagisawa 2002).

Orexin A agykamrába, vagy specifikus magvakba való injektálása megnöveli az időt, amit a patkány ébren tölt, míg lecsökkenti a REM alvás mennyiségét, illetve a lassú hullámú alvással töltött epizódok számát és hosszát (Hagan és mtsai 1999, Bourgin és mtsai 2000, Piper és mtsai 2000, Xi és mtsai 2001, Espana és mtsai 2002).

Az orexin-tartalmú neuronok projekciós és afferenciációs rendszerét az 1.2.3. és 1.2.4. pontokban részletesen tárgyaltam. Ebből emelném ki azokat a kapcsolatokat, amelyek fontos szereppel bírnak az alvás-ébrenlét ciklus szabályozásában.

A locus coeruleus, a nucleus raphe dorsalis és a nucleus tuberomamillaris neuronjainak aktivitása és neurotranszmitter ürülése ébrenlét során a legmagasabb, non-REM alvás során alacsonyabb és REM alváskor a legalacsonyabb (Aston-Jones és Bloom 1981, Ko és mtsai 2003, Monti 2010, Takahashi és mtsai 2010). Ezek a sejtszoportok fontos szereppel bírnak az ébrenlét előidőzésében, a „felszálló reticularis aktiváló rendszer” részei (Saper és mtsai 2010).

A locus coeruleus és a nucleus raphe dorsalis területén gazdag orexin-tartalmú rosthálózat található, sejteik expresszálják az orexin receptorokat (Bourgin és mtsai 2000, Wang és mtsai 2005). A locus coeruleus noradrenerg, valamint a nucleus raphe dorsalis szerotonerg sejteit az orexin aktiválja (Hagan és mtsai 1999, Horvath és mtsai 1999b, Bourgin és mtsai 2000, Brown és mtsai 2001, Liu és mtsai 2002). A locus coeruleus noradrenerg neuronjain Gray I típusú orexin-tartalmú szinapszisok vannak (Horvath és mtsai 1999b) és a nucleus raphe dorsalis területén is megtalálhatóak az orexin-pozitív terminálisok (Wang és mtsai 2003), amelyek 84%-a Gray I típusú (Wang és mtsai 2005). A nucleus raphe dorsalisban a mikrodialízissel beadott orexin A dózisfüggően megnöveli a szerotonin extracelluláris mennyiségét (Tao és mtsai 2006).

A nucleus tuberomamillaris az ébresztő rendszerek egyike, hisztamin-tartalmú sejteit OX2R-t expresszálják, az orexin neuronok közvetlenül aktiválják őket (Bayer és mtsai

2001, Eriksson és mtsai 2001, Yamanaka és mtsai 2002, Schöne és mtsai 2012). A nucleus tuberomamillaris sejtjein is megtalálhatóak az orexin-tartalmú szinapszisok (Yamanaka és mtsai 2002). Ezen axonterminálisok 90%-a glutamátot is tartalmaz (Torrealba és mtsai 2003).

Az icv beadott orexin ébrenlét-indukáló hatása H1 hisztamin receptor blokkolásával vagy kiütésével kivédhető (Huang és mtsai 2001, Shigemoto és mtsai 2004). Az orexin A szignifikánsan megemeli a locus coeruleus sejtjeinek tüzelési frekvenciáját *in vitro* (Hagan és mtsai 1999). A locus coeruleusba lokálisan adott orexin A dózisfüggően csökkenti a REM alvást és növeli az ébrenlétet, míg az orexin B beadása nem befolyásolja ezeket (Bourgin és mtsai 2000). Az orexin A ezen hatásai kivédhetőek orexin-antitest locus coeruleusba való beadásával (Bourgin és mtsai 2000). A channelrhodopsin2-t expresszáló orexin neuronok közvetlen és szelektív fotostimulációja megnöveli az alvás-ébrenlét átmenetek előfordulásának lehetőségét (Adamantidis és mtsai 2007) és aktiválja a locus coeruleus és a nucleus tuberomamillaris sejtjeit (Carter és mtsai 2009). Orexin-tartalmú axonokból optogenetikai stimuláció hatására felszabaduló glutamát a nucleus tuberomamillaris hisztamin sejtjeinek tüzelési frekvenciájának gyors és reverzibilis megnövekedéséhez vezet (Schöne és mtsai 2012). Ez a hatás α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionsav-típusú (AMPA) glutamát receptor gátló segítségével teljes egészében kivédhető (Schöne és mtsai 2012). Optogenetikailag aktivált orexin sejtek ébresztő hatását a locus coeruleus sejtjeinek gátlásával ki lehet védeni (Carter és mtsai 2012).

A bazális előagyat is innerválják az orexin-tartalmú neuronok (Peyron és mtsai 1998), ezek 80%-a ipsilateralisan helyezkedik el (España és mtsai 2005). Az orexin a bazális előagy kolinerg sejtjeire is aktiváló hatást fejt ki (Eggermann és mtsai 2001).

A REM alvás generálásában fontos szereppel bíró nucleus tegmentalis pedunculo pontinus és nucleus tegmentalis laterodorsalis kolinerg sejtjei körül is gazdag orexin-tartalmú rosthálózat figyelhető meg (Peyron és mtsai 1998, Nambu és mtsai 1999). A nucleus tegmentalis pedunculo pontinus és a nucleus tegmentalis laterodorsalis sejtjei OX1R-t és OX2R-t is expresszálnak (Greco és Shiromani 2001).

Az orexin mRNS cirkadián változást mutat: a nappali órákban alacsony és az állatok aktív periódusában, éjszaka magas az mRNS szint (Taheri és mtsai 2000). Az orexin

sejtek Fos pozitívítása is korrelál az állatok éberségével (Estabrooke és mtsai 2001, Martinez és mtsai 2002, Kodama és mtsai 2005). Alvás-megvonás, valamint antinarkolepsziás drogok, pl. metamfetamin és mofanadil hatására megemelkedik a sejtek Fos aktivitása (Modirrousta és mtsai 2005). A cerebrospinalis folyadékban található orexin mennyisége is változik a nap folyamán, ébrenlét során a legmagasabb és a pihenéssel töltött periódus közepén éri el a legalacsonyabb szintet, ami az aktív periódus kezdetéig változatlan marad (Deboer és mtsai 2004). Ez az alvás és ébrenlét közt detektálható különbség megszűnik, amennyiben a nucleus suprachiasmaticust roncsolják (Deboer és mtsai 2004).

Összegezve, a mai elgondolás szerint az orexin sejtek aktiválják a nucleus tuberomamillaris hisztamin-, a locus coeruleus noradrenalin-, a raphe magok szerotonin-tartalmú, és a bazális előagy kolinerg sejtjeit, amelyek aktiválják a thalamicus és a kérgi központokat, előidézve az ébredést és ezt az állapotot az orexin sejtek stabilizálják. Az area preoptica ventrolateralis részének alvást előidéző GABA-, és galanin-tartalmú sejtjei gátolják az orexin és az előbb felsorolt aminerg magok neuronjait.

1.3.3. Az orexinek szerepe a stresszválaszban

Az orexin központi idegrendszerbe való beadása a szervezetben olyan válaszokat indukál, amelyek különböző stressz szituációkban is megfigyelhetők, úgymint a hypothalamus-hypophysis-mellékvese (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) tengely aktiválása (Kuru és mtsai 2000), a szívfrekvencia és a vérnyomás megemelése (Samson és mtsai 1999), a szimpatikus neuronok aktivitásának (Antunes és mtsai 2001), a vázizomzat cukor felvételének (Shiuchi és mtsai 2009), valamint a plazmában a katekolaminok mennyiségének megnövekedése (Shirasaka és mtsai 1999). Ezekkel együtt a stresszválaszra jellemző sztereotip viselkedés és megnövekedett lokomotoros aktivitás is megfigyelhető az állatoknál (Ida és mtsai 2000, Espana és mtsai 2002).

Orexin-deficiens egerek vérnyomása alacsonyabb, mint a vad típusúaké (Kayaba és mtsai 2003, Zhang és mtsai 2006). Orexin icv, vagy intrathecalis beadása megnöveli a vérnyomást és a szívfrekvenciát. Ez a vérnyomásra és a szívfrekvenciára gyakorolt orexin hatás anti-orexin A, β -adrenerg és α_1 -adrenerg receptor antagonistá beadásával

megelőzhető (Samson és mtsai 1999, Shirasaka és mtsai 1999, Antunes és mtsai 2001). A nucleus tractus solitarii középső és dorsolateralis részébe injektált orexin A dózisfüggően csökkenti a vérnyomást és a szívfrekvenciát, míg a commissuralis részbe injektálva megemeli az artériás nyomást (de Oliveira és mtsai 2003).

A gerincvelő intermediolateralis magoszlopának területén megtalálhatóak az orexin-tartalmú rostok (van den Pol 1999). Az intermediolateralis magoszlop preganglionaris szimpatikus neuronjain kimutatták az orexin-festett axonterminálisokat (Llewellyn-Smith és mtsai 2003). Mind *in vivo*, mind *in vitro* kísérletekkel alátámasztották, hogy az orexin az intermediolateralis magoszlop területén felszabadulva aktiválja a preganglionaris szimpatikus neuronokat (Antunes és mtsai 2001).

Orexin-tartalmú rostok megtalálhatóak a nucleus paraventricularis területén, melynek sejtjei OX2R-t expresszálnak (Peyron és mtsai 1998, Marcus és mtsai 2001). Orexin A és orexin B hatására is megemelkedik a *c-fos* mRNS expressziója a nucleus paraventricularis parvocelluláris sejtjeiben (Kuru és mtsai 2000) és az orexin A megnöveli a kortikotropin-releasing hormon (CRH), valamint az arginin-vazopresszin mRNS mennyiségét (Al-Barazanji és mtsai 2001, Brunton és Russell 2003). Az orexin A stimulálja a CRH-felszabadulást hypothalamicus explantátumokból (Russell és mtsai 2001) és hypothalamicus szeleteken a nucleus paraventricularis sejtjeit depolarizálja, azok tüzelési frekvenciáját megnöveli (Samson és mtsai 2002). Orexin A szisztémás adminisztrációja megnöveli a plazma kortikoszteron szintjét patkányban, míg a plazma adrenokortikotrop hormon szintjére nincs hatással (Malendowicz és mtsai 1999, Malendowicz és mtsai 2001). Orexin A icv beadása megemeli a plazma arginin-vazopresszin koncentrációját nyulakban (Matsumura és mtsai 2001), valamint az adrenokortikotrop hormon felszabadulását és a plazma kortikoszteron szintjét patkányban (Hagan és mtsai 1999, Ida és mtsai 2000, Jaszberenyi és mtsai 2000, Kuru és mtsai 2000, Al-Barazanji és mtsai 2001, Russell és mtsai 2001, Brunton és Russell 2003). Ez a hatás indirekt módon, a CRH sejteken keresztül érvényesül, mivel hypophysealis sejt kultúra alap adrenokortikotrop hormon szekrécióját az orexinek nem befolyásolják (Samson és Taylor 2001), és nincsenek hatással a hypophysis sejtjeinek POMC mRNS expressziójára sem (Al-Barazanji és mtsai 2001). Ugyancsak ezt támasztja alá, hogy CRH antagonistá, α -helikális CRH(9-41) icv vagy intravénás

beadása kivédi az orexin A által kiváltott plazma adrenokortikotrop hormon és kortikoszteron növekedést (Ida és mtsai 2000, Samson és mtsai 2002).

Az orexin sejtek expresszálnak CRH receptort, CRHR1-t és 2-t, és a sejteken megtalálhatóak a CRH-tartalmú végződéses (Winsky-Sommerer és mtsai 2004). Kimutatták, hogy a CRH aktiválja az orexin-tartalmú neuronokat CRHR1-n keresztül (Paneda és mtsai 2005).

Különböző stressz-hatások, mint például a patkány fényesen megvilágított, új környezetbe való expozíciója (España és mtsai 2003), áramütés (Zhu L. és mtsai 2002, Watanabe és mtsai 2005), immobilizáció (Ida és mtsai 2000, Sakamoto és mtsai 2004, Winsky-Sommerer és mtsai 2004), vagy hideg expozíció (Ida és mtsai 2000, Sakamoto és mtsai 2004), megnövelik az orexin-tartalmú sejtek Fos aktivációját vagy a prepro-orexin mRNS szintjét.

Tehát a különböző stressz-hatásra aktiválódó orexin-tartalmú neuronok a HPA tengelyt és a szimpatikus-adrenomedullaris rendszert is képesek befolyásolni.

1.3.4. Az orexinek további szerepe

1.3.4.1. Az orexinek szerepe a fájdalomcsillapításban

Az orexin-tartalmú rostok és az OX1R megtalálható olyan agyterületeken, amelyek a fájdalomcsillapításban szerepet játszanak (pl. PAG ventrolateralis része) (Peyron és mtsai 1998). Kimutatták, hogy az orexin A a morfinhoz hasonló fájdalomcsillapító hatású és ezt a hatást az SB-334867, OX1R antagonistá blokkolja (Bingham és mtsai 2001). A nucleus paragigantocellularis lateralis területére injektált orexin A dóziszfüggően csökkenti a formalin-indukálta nociceptív viselkedést (a fájós végtag tehermentesítése, nyalogatása) és forró lemez (hot-plate) teszt során is érvényesül antinociceptív hatása (Erami és mtsai 2012).

1.3.4.2. Az orexinek kapcsolata a motivációval, a jutalmazással és az addikcióval

A jutalom érzés kialakulásában fontos szerepe van az area tegmentalis ventralis dopaminerg neuronjaiból kiinduló pályáknak. Dopamin-tartalmú rostok érik el innen a nucleus accumbens, az amygdala és a medialis prefrontalis kéreg sejtjeit (Meyne és Adan 2014). A nucleus accumbens két anatómiailag jól elkülöníthető részből áll, a köpeny

(shell) és a mag (core) szubrégiókból (Záborszky és mtsai 1985). A DLH orexin-tartalmú sejtjei beidegzik az area tegmentalis ventralis dopamin- és GABA-expresszázó sejtjeit (Peyron és mtsai 1998, Fadel és Deutch 2002, Balcita-Pedicino és Sesack 2007), és orexin-tartalmú rostok elérik a nucleus accumbens köpeny régióját, valamint a medialis prefrontalis kérgét is (Peyron és mtsai 1998). Mindhárom területen megtalálhatóak az orexinek receptorai, a nucleus accumbens sejtjei az OX2R-t expresszázzák, a prefrontalis kéreg sejtjei OX1R-t, ugyanakkor az area tegmentalis ventralis neuronjai mindkét receptort (Marcus és mtsai 2001). Az orexin serkentő hatással van az area tegmentalis ventralisra: mind a dopaminerg, mind pedig a nem-dopaminerg sejteket direkt, poszt-szinaptikus úton aktiválja (Nakamura és mtsai 2000, Korotkova és mtsai 2003). Az area tegmentalis ventralisba injektált orexin az area tegmentalis ventralis dopaminerg neuronjaiban Fos-expressziót indukál (Vittoz és mtsai 2008), és a nucleus accumbens köpeny részében, valamint a medialis prefrontalis kéreg területén megnöveli a dopamin mennyiségét (Narita és mtsai 2006, Vittoz és Berridge 2006). Az orexin nucleus accumbensre gyakorolt közvetlen hatása ellentmondásos, az irodalomban az OX2R-en keresztül kialakuló gátlásra és aktiválásra is van példa (Martin és mtsai 2002, Mukai és mtsai 2009). Az icv beadott orexin A szignifikánsan megemeli a dopamin forgalmat a medialis prefrontalis kéreg területén (Hagan és mtsai 1999).

Az orexin-rendszer szerepét az addikció kialakulásában számos droggal kapcsolatban leírták, így opiáttal, morfinnal, heroinnal, alkohollal és nikotinnal kapcsolatban (Boutrel és mtsai 2013). Az orexin-tartalmú sejtek expresszáznak μ -opioid receptort, morfin-megvonás hatására bennük Fos aktiváció mutatható ki (Georgescu és mtsai 2003).

1.3.4.3. Orexinek szerepe a légzés szabályozásában

A nyúltvelőben, a ritmikus légzés szabályozásában részt vevő pre-Böttinger régióban találhatóak orexin rostok, akárcsak a diaphragmát beidegző gerincvelői motoneuronok körül (Young és mtsai 2005). Mindkét terület sejtjei expresszázzák az OX1R-t és ezek aktiválása orexin mikroperfúziójával dóziszfüggően és szignifikánsan megnöveli a diaphragma elektromiográfus aktivitását (Young és mtsai 2005). A fornixtól dorsolaterálsan elhelyezkedő orexin-pozitív sejtek projiciálnak mind a pre-Böttinger régióba, mind a diaphragmát beidegző motoros neuronokhoz (Young és mtsai 2005).

Orexin knockout állatokban 50%-kal csökken a CO₂-indukálta légzés és nő a spontán alvási apnoé frekvenciája a vad típusú állatokhoz képest (Williams és Burdakov 2008). Az orexinek és a légzés közti kapcsolat kétirányúnak tűnik: a légzési ráta kontrollálja a CO₂ és sav szintjét, és ezek a jelek befolyásolják az orexin sejtek elektromos aktivitását *in vitro* (Williams és Burdakov 2008). A levegő magas CO₂ szintje a medialisan elhelyezkedő orexin-tartalmú sejtek Fos-expresszióját eredményezi (Sunanaga és mtsai 2009).

1.3.4.4. Orexinek szerepe a vízháztartás szabályozásában

Az icv beadott orexin dózisfüggően megemeli a vízfogyasztást (Kunii és mtsai 1999). Az orexin A hatása jóval erősebb, mint az orexin B-é, sugallva, hogy a hatás az OX1R-on keresztül történik (Kunii és mtsai 1999). Orexin-tartalmú rostok figyelhetőek meg a vízfelvétel szabályozásában központi szereppel bíró subfornicalis szerv és az area postrema területén (Kunii és mtsai 1999, Nambu és mtsai 1999). Az area postrema sejtjeivel az orexin-tartalmú terminálisok szinaptikus kapcsolatot alakítanak ki (Guan és mtsai 2005). Az orexin A vízfelvélet indukáló hatása csaknem annyira hatékony, mint az angiotenzin II-é (Kunii és mtsai 1999). A prepro-orexin mRNS szintje 1,6-szorosára nő 48 órás víz-depriváció esetén (Kunii és mtsai 1999). Az arginin-vazopresszin vagy más néven az antidiuretikus hormon is aktiválja az orexin sejteket a V1a receptorán keresztül (Tsunematsu és mtsai 2008). A nucleus paraventricularis arginin-vazopresszin-tartalmú sejtjei expresszálják az OX1R-t (Backberg és mtsai 2002).

1.3.4.5. Orexinek szerepe a termoregulációban

A termoreguláció egyik fontos része a hideg elleni védekezés, melyben központi szereppel bír a barna zsírszövet. Sejtjeiben, elsősorban szimpatikus hatásra, fokozódik az oxidáció és ezáltal a barna zsírszövet lokálisan melegíti a környező szöveteket. A barna zsírszövet szimpatikus beidegzését a nucleus raphe pallidus szimpatikus premotoros sejtjei által beidegzett thoracalis gerincvelőben található szimpatikus preganglionaris sejtek végzik.

A DLH orexint expresszáló sejtjei gazdagon beidegzik a nucleus raphe pallidus szerotonin-tartalmú neuronjait (Tupone és mtsai 2011). A negyedik agykamrába injektált orexin A a nucleus raphe pallidus sejtjeiben Fos-expressziót indukál (Zheng és

mtsai 2005). Az ide injektált orexin A szignifikánsan megemeli a barna zsírszövetet beidegző neuronok aktivitását, és ezáltal megnöveli a hőtermelést és a szívfrekvenciát (Tupone és mtsai 2011).

1.3.4.6. Orexinek szerepe egyes endokrin funkciók irányításában

A HPA rendszer befolyásolása mellett az orexinek szerepét kimutatták mindegyik endokrin tengellyel kapcsolatban (Lopez és mtsai 2010). Ezen funkcióját támasztja alá az, hogy rostjai megtalálhatóak az eminentia mediana külső és belső rétegében is (Date és mtsai 2000), receptorai pedig neurohormonokat expresszáló sejtekben, például az OX1R a nucleus paraventricularis és a nucleus supraopticus magnocellularis, vagy nucleus periventricularis szomatosztatin-tartalmú neuronjaiban (Backberg és mtsai 2002).

A növekedési hormon szekrécióját gátolja az icv beadott orexin A (Seoane és mtsai 2004), és csökkenti a nucleus paraventricularis parvocellularis sejtjeiben a növekedési hormon-releasing hormon mRNS szintjét (Lopez és mtsai 2004). Progeszteron-előkezelt ovariectomizált nőstény állatokban az icv adott orexin A és orexin B stimulálja a luteinizáló hormon szekrécióját, míg progeszteron-előkezelés nélkül gátolják a szekréciót (Pu és mtsai 1998). Az orexinek hatása a prolaktin termelésére nem egyértelmű, függ a vérben keringő nemi hormonok mennyiségétől (Lopez és mtsai 2010). Orexin A perifériás beadása gátolja a thyrotropin-releasing hormon szekrécióját, ami a plazma thyroidea stimuláló hormon mennyiségének csökkenését eredményezi (Mitsuma és mtsai 1999).

2. CÉLKITŰZÉSEK

Annak érdekében, hogy a DLH funkcionális anatómiáját jobban megértsük, két vizsgálati megközelítést alkalmazva vizsgáltam szerepét és kapcsolatait.

1. Az első kísérleti csoportban a DLH orexin-tartalmú neuronjainak Fos aktiválódását vizsgáltam három különböző funkcionális modellben: éheztetés, alvás-megvonás és akut fájdalom stressz után. A következő céljaim voltak:
 - a. a Fos aktiválódások összehasonlítása, annak megállapítására, hogy az orexin-tartalmú neuronok milyen mértékben vesznek részt a vizsgált három funkció szabályozásában;
 - b. a DLH különböző szubdivízióiban található Fos-aktivációt mutató orexin-tartalmú neuronok százalékos arányának összehasonlítása, hogy megtudjam, kimutathatóak-e funkció-specifikus orexin-tartalmú sejtcsoportok vagy szubdivíziók.
2. A második kísérletcsoport során a DLH alterületeinek agytörzsi kapcsolatait vizsgáltam, különös tekintettel az agytörzsi biogén amin sejtcsoportokra, annak megismerése érdekében, hogy az orexin-tartalmú neuronok mely agytörzsi struktúrákon keresztül érvényesítik a táplálékfelvételt, az alvás-ébrenléteket és a stresszválaszt szabályozó hatásukat. Ezen belül a következő céljaim voltak:
 - a. annak megállapítása, hogy melyik alsó agytörzsi mag, magcsoport és terület kap a DLH-ből eredő rostokat; és hogy a DLH különböző szubdivíziói milyen mértékben vesznek részt az agytörzsi területek beidegzésében;
 - b. anterográd jelölésű axonok sűrűségének meghatározásával megbecsülni, hogy a DLH különböző szubdivízióiban levő neuronok milyen mértékben vesznek részt egyes alsó agytörzsi sejtcsoportok innerválásában (nyolc szubdivízió projekciói 7 alsó agytörzsi sejtcsoportban - pl. monoamin sejtcsoportok);
 - c. annak megállapítása, hogy mely alsó agytörzsi adrenalin és noradrenalin sejtcsoport kap közvetlenül a DLH orexin-tartalmú sejtjeiből beidegzést.

3. MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez felnőtt, Wistar törzsből származó, 250-300 g súlyú hím patkányokat (Charles Rivers Laboratories, Isaszeg, Magyarország), valamint felnőtt, C57/Bl6 törzsből származó, 30 g súlyú hím egereket (Charles Rivers) használtunk. Az állatokat hármassával, automatikusan szabályozott hőmérsékleti ($22\pm 1^\circ\text{C}$) és fényviszonyok (12 órás fény és 12 órás sötét periódus; a világítás reggel 6 órakor kapcsolt be) között tartottunk.

Minden, a következőkben felsorolt kísérletet az Európai Közösség 1986 november 24-i, 86/609/EEC számú direktívájának, a National Institutes of Health "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH Publications No. 85-23, revised 1985) című ajánlása, valamint a 243/98 számú kormányrendelet irányelvének útmutatásai és etikai előírásai szerint folytattuk le. Az állatkísérleteket az Állatkísérletes Tudományos Etikai Tanács ÁNTSZ 3453/003/2009 iktatószámú, illetve a Pest Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság XIV-I-001/2263-4/2012 iktatószámú engedélye alapján végeztük. A kísérleteinkben felhasznált állatok számát és a kísérletek stressz voltát minimalizáltuk, amennyiben ez nem befolyásolta a kísérletek minőségét és értékelhetőségét.

3.2. Aktivációs modellek

Kísérleteinkben három különböző aktivációs modellt alkalmaztunk, melyek egy részét korábban már használtuk (Renner és mtsai 2010, Kitka és mtsai 2011), illetve a fájdalom-stressz modellre vonatkozóan előkísérleteket is végeztünk. Mindegyikük megfelelőnek bizonyult arra, hogy a megváltozott homeosztázis következtében aktiválódott orexin-tartalmú neuronokat vizsgálhassuk minőségi és mennyiségi szempontokból. Minden egyes kísérlethez optimalizáltuk a paramétereket (dózis, időzítés, kísérleti körülmények).

3.2.1. Éheztetés-újraetetés

Az állatokat random módon három fő csoportba osztottuk. A kontroll csoport (n=4) egyedei számára a táp korlátlanul elérhető volt. Az éheztetett csoport (n=7) 48 órán keresztül éhezett, míg az újraetetés csoport (n=6) a 48 órás éheztetést követő 2 órában korlátlanul hozzáfért a táphoz. Mindhárom csoport patkányainak *ad libitum* hozzáférést biztosítottunk a vízhez.

3.2.2. REM alvás-megvonás

Az állatokat random módon két csoportba osztottuk:

- Saját ketrecében tartott (home cage, HC) csoport (n=8): az alvás-megvonás ideje alatt saját ketrecükben tartott állatok; ennek a csoportnak a tagjait az alvás-megvonás végével egyidőben perfundáltuk,
- REM alvás-megvont csoport (n=6): 72 órát töltöttek egy kis platformon, ezt követően a csoport tagjait rögtön perfundáltuk.

A REM alvás-megvonáshoz az állatokat különálló víztartály közepén elhelyezkedő platformra helyeztük. A platformok kialakítása a következőképpen történt: a víztartály belső átmérője 41 cm, a platform átmérője 6,5 cm volt, a vízmélység 18 cm, a platform a víz fölött helyezkedett el 0,5 cm-rel. A platform felszínét PVC-vel borítottuk, hogy megakadályozzuk az állatok kihülését. A platform köré, a vízfelszín alá 4 cm-rel egy PVC gyűrűt helyeztünk, hogy az állatok könnyen vissza tudjanak mászni a platformra. A gyűrűn állva a kijutáshoz szükséges időnél több időt nem töltöttek. Az állatok a platformokon 72 órát töltöttek, a HC csoport tagjai ez idő alatt a ketrecükben voltak. A 72 órát követően az állatokat perfundáltuk.

A víz és a táp az állatok számára a kísérlet folyamán végig korlátlanul elérhető volt.

3.2.3. Formalin injekció

Az állatokat random módon két csoportba osztottuk. A kontroll (n=4) állatokat zavarás nélkül a ketreceikben hagytuk a kísérlet idejére és a másik csoport állataival egyidőben perfundáltuk. A második csoport állatainak (n=5) hátsó lábába, közvetlenül a bőr alá

formalint (8%-os formaldehid oldat, Merck KGaA, Németország, 0,2 ml/100 g testtömeg), mint gyorsan ható, nociceptív stresszort, injektáltunk. Irodalomból ismert, hogy egyetlen formalin injekció legalább egy órán át tartó, lokális fájdalmat idéz elő a szúrás követő 5 percen belül (Abbott és mtsai 1995). Ez a fájdalom patkányokban a plazma kortikoszteron, adrenokortikotrop hormon és katekolamin szintjének szignifikáns emelkedéséhez vezet (Stark és mtsai 1970). Tekintettel arra, hogy ebben az esetben nem a formalin-okozta fájdalom hatását kívántuk mérni, hanem a stressz-modell hatékonyságát, amibe beletartozott az állatok rögzítése az injektáláshoz („handling”), a szúrás okozta, majd a beadott formalin által kiváltott fájdalom, megfelelő kontrollnak intakt állatokat használtunk.

Az állatokat egy órával az injekció után perfundáltuk.

3.3. Sztereotaxikus biotinilált dextrán-amin-beadás

Az állatokat 1 ml/kg ketamin (100 mg/ml, CP-Pharma, Burgdorf, Németország) és 0,5 ml/kg xylazin (20 mg/ml; CP-Pharma) intramuscularisan beadott keverékével elaltattuk, majd fejüket sztereotaxikus készülék (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) segítségével rögzítettük. A koponyán mindkét félteke fölé nyíló ablakot nyitottunk, láthatóvá téve a sinus sagittalist (ezáltal a laterális irányú koordináta szükség szerint módosítható a sinushoz képest), majd a dura matert egy metszéssel megnyitottuk.

Biotinilált dextrán-amint (BDA – 25 mg/250 µl 0,1M, pH 7,4 foszfát puffer [PB], 10000 MW, Molecular Probes, Invitrogen Ltd., Paisley, Glasgow, Egyesült Királyság), egy anterográd pályajelölő anyagot, juttattunk iontoforetikusan (6,5-7,5 µA pozitív áramimpulzusok [7 s be, 7 s ki], 20 percen át) a patkányok (n=42) jobb oldali DLH-jának különböző szubrégióiba. A beadási helyeket és a koordinátákat a 13. ábra tartalmazza.

A kapillárisokat (hegyük belső átmérője 18-25 µm), hogy megakadályozzuk a szűrsatorna BDA-szennyeződését, a beadást követő 10 percben a beadási helyen tartottuk és csak ezután húztuk ki.

Az állatokat két héttel a beadást követően perfundáltuk.

3.4. Hisztológiai módszerek

3.4.1. Perfúzió, fixálás, metszés

Az állatokat 1 ml/kg ketamin (100 mg/ml, CP-Pharma) és 0,5 ml/kg xylazin (20 mg/ml; CP-Pharma) intramuscularisan beadott keverékével elaltattuk, rögzítettük. A mellkas felnyitása után a szív bal kamráján át kanült vezettünk az aortába, majd a jobb pitvar megnyitását követően állatonként 50 ml 0,9%-os fiziológiás sóoldattal kimostuk a vért az érrendszerből. Ezután fixálószerként 300 ml 4%-os paraformaldehid oldatot (pH 7,4) használtunk.

A perfúzió után kivett agyakat 24 órán át 4°C-on 4%-os paraformaldehid oldatban utófixáltuk, majd a krioprotekció következett: az agyak egy éjszakán át 20%-os, PB-ben oldott cukoroldatban voltak 4°C-on. Az agyakból fagyasztó mikrotóm (Frigomobil, Reichert-Jung, Bécs, Ausztria) segítségével coronalis metszeteket készítettünk. Aktivációs vizsgálatokhoz és az egér agyak esetében a metszetek vastagsága 40 µm, a parallel metszetek száma öt. A többi esetben a metszetek vastagsága 50 µm, a parallel metszetek száma négy.

Elektronmikroszkópos vizsgálatokra szánt állatok esetében a fixáló oldat még 0,08% glutáraldehidet (Sigma-Aldrich Co., Budapest, Magyarország) is tartalmazott, az agyak a posztfixálást követően VT 1000 S vibratómon (Leica Biosystems, Wetzlar, Németország) lettek metszve. A metszetek vastagsága 50 µm, a parallel metszetek száma négy.

A metszeteket további felhasználásig Na-azidos PB oldatban tároltuk 4°C-on.

3.4.2. Immunhisztokémia

3.4.2.1. BDA-tartalmú sejtek és rostok kimutatása

A BDA-t tartalmazó sejtek kimutatásához a metszeteket először PB-ben mostuk, majd 1 órán át 0,5%-os Triton X-100 (Reanal, Budapest, Magyarország) oldatban rázattuk antigénfeltárás céljából. Újabb mosást követően az endogén peroxidáz blokkolása történt 15 percen át 3%-os H₂O₂ (Reanal) oldatban. Ezt követően egy órás avidin-biotin tormaperoxidáz-komplex (ABC, 1:500, Vector Laboratories ABC, Burlingame, CA, USA), 15 perces biotin-tiramid (1:10000, Invitrogen, Caelsbad, CA, USA) és újabb 30

perces ABC (1:500; Vector Laboratories) inkubáció következett. Az inkubációs lépések közt a metszeteket háromszor mostuk PB oldatban. A peroxidáz reakció kimutatásához kékes-fekete csapadékot képző nikkellel erősített 3,3'-diaminobenzidint (Ni-DAB, Sigma-Aldrich) használtunk kromogénként. A metszeteket zselatinos tárgylemezre húztuk, majd derítés után DPX Mountant oldat (Sigma-Aldrich) segítségével fedtük.

A BDA-t tartalmazó rostok kimutatása során az első ABC oldatban való inkubációt követően a BDA-t tiramid-konjugált fluoreszcsein-izotiocianáttal (FITC-tiramid, Sigma-Aldrich) tettük láthatóvá. A metszeteket Superfrost tárgylemezre (Intersan Kereskedelmi és Szolgáltató Kft., Budapest, Magyarország) húztuk fel és Aqua-Poly/Mount (Polysciences Inc., Warrington, USA) használatával fedtük le.

3.4.2.2. *Orexin A és tirozin-hidroxiláz (TH) kettős jelölés*

Az úszó metszeteket antigénfeltárást és endogén peroxidáz blokkolást (ld. 3.4.2.1.) követően 10%-os normál ló-szérummal (Sigma-Aldrich) kezeltük egy órán át szobahőmérsékleten a nem specifikus antigén-kötőhelyek blokkolása céljából, majd a metszeteket kecskében termeltetett orexin A antitest (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) 1:10000-es hígítású oldatában inkubáltuk 24 órán át 4°C-on. A primer antitest kimosása után egy-egy órás biotinilált lóban termeltetett anti-kecske IgG (1:1000, Vector Laboratories), és ABC (1:500, Vector Laboratories) oldatokban való inkubáció következett. Ezen lépések között és után PB-ben mostuk a metszeteket. Az orexin A-t Ni-DAB-bal (Sigma-Aldrich) tettük láthatóvá. Többszöri mosás után a metszeteket egérben termeltetett anti-tirozin-hidroxiláz (TH, 1:1000, DiaSorin, Stillwater, USA) szérumba tettük 24 órára 4°C-on. Ezt követően többszöri mosás után a metszeteket egy-egy órára lóban termeltetett biotinilált anti-egér antitest 1:1000-s hígítású oldatába (Vector Laboratories) és ABC oldatba (1:500, Vector Laboratories) tettük. A lépések közt a metszeteket háromszor PB-ben mostuk. Kromogénként DAB-ot használtunk.

A metszeteket zselatinos tárgylemezre húztuk, majd xyloolban (Sigma-Aldrich) való derítés után DPX Mountant oldat (Sigma-Aldrich) segítségével fedtük.

Fluoreszcens jelölés során ugyanezeket a lépéseket követően az orexin A-t FITC-tiramiddal (Sigma-Aldrich), a TH-t (1:200, DiaSorin) kecskében termeltetett Alexa Fluor 594 anti-egér IgG-vel (1:500, Invitrogen) tettük láthatóvá.

A metszeteket Superfrost tárgylemezekre (Intersan) húztuk fel és Aqua-Poly/Mount (Polysciences) használatával fedtük le.

3.4.2.3. Orexin A és feniletanolamin-N-metiltranszferáz (PNMT) kettős jelölés

Az orexin A festés lépései megegyeznek a 3.4.2.2.-ben leírtakkal. A Ni-DAB-bal (Sigma-Aldrich) történő jelölés után a metszeteket többször mostuk PB oldatban, majd nyúlban termeltetett anti-feniletanolamin-N-metiltranszferáz (PNMT, 1:1000, DiaSorin, Stillwater, USA) szérumba tettük 24 órára 4°C-on. Ezt követően többszöri mosás után a metszeteket egy-egy órára kecskében termeltetett biotinilált anti-nyúl antitest 1:1000-s hígítású oldatába (Vector Laboratories), majd ABC oldatba (1:500, Vector Laboratories) tettük. A lépések közt a metszeteket háromszor PB-ben mostuk. A PNMT-t DAB-bal (Sigma-Aldrich) tettük láthatóvá.

A metszeteket zselatinos tárgylemezre húztuk, majd xyloolban (Sigma-Aldrich) való derítés után DPX Mountant oldat (Sigma-Aldrich) segítségével fedtük le.

Fluoreszcens jelölés során ugyanezeket a lépéseket követően az orexin A-t FITC-tiramiddal (Sigma-Aldrich), a PNMT-t (1:1000, DiaSorin) kecskében termeltetett Alexa Fluor 594 anti-nyúl IgG-vel (1:500; Invitrogen) tettük láthatóvá.

A metszeteket Superfrost tárgylemezekre (Intersan) húztuk fel és Aqua-Poly/Mount (Polysciences) használatával fedtük le.

3.4.2.4. Orexin A, TH/PNMT és szinaptofizin többszörös jelölés

A kezdeti lépések megegyeznek a korábban leírtakkal (lásd 3.4.2.2.): antigénfeltárás, endogén-peroxidáz és nem specifikus antigén-kötőhely blokkolás, orexin A elleni szérumban, szekunder antitest és ABC (Vector Laboratories) oldatban való inkubálás, majd FITC-tiramiddal (Sigma-Aldrich) való jelölés. Normál kecske-szérumban (Sigma-Aldrich) való egy órás blokkolást követően a metszetekre egérben termeltetett anti-TH (1:200, DiaSorin) vagy nyúlban termeltetett anti-PNMT (1:1000, DiaSorin) szérum került 24 órára 4°C-on. A primer antitestek kimosását követően megfelelő (kecskében termeltetett anti-egér, illetve anti-nyúl) Alexa Fluor 594 (Invitrogen) szekunder antitest 1:500-as hígítású oldatában inkubáltuk a metszeteket 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Továbbiakban, a keresztreakciók megakadályozása érdekében, a TH-festett metszeteket 5 percig citromsav pufferben (pH 6,0) mikrohullámmal kezeltük,

majd 30 percig hagytuk hűlni (Tóth és Mezey 2007). Többszöri mosást követően folytattuk az immunhisztokémiai jelölést a harmadik antitest, az egérben termeltetett anti-szinaptofizin (1:1000, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) szérumban való 24 órás inkubációval 4°C-on. A primer antitest kimosása után a szinaptofizint kecskében termeltetett anti-egér Cy5-tel (1:100; Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, Anglia) jelöltük.

A metszeteket Superfrost tárgylemezekre (Intersan) húztuk fel és Aqua-Poly/Mount-tal (Polysciences) lefedtük.

3.4.2.5. Elektronmikroszkópos kettős festések

Elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a metszeteket krioprotekció céljából előbb 10%-os cukor oldatban inkubáltuk egy órán keresztül szobahőmérsékleten, majd 30%-os cukor oldatban egy éjszakán át 4°C-on. Az antitestek penetrációjának felerősítése érdekében a metszeteket folyékony nitrogén fölött fagyasztottuk háromszor 3 másodpercnyi ideig, figyelve arra, hogy a metszetek ne érjenek össze. A cukor oldatot többszöri mosással eltávolítottuk, majd az endogén peroxidáz aktivitást blokkoltuk 3%-os H₂O₂ (Reanal) oldattal 15 percen keresztül. Az orexin A festési lépései a következőkben megegyeztek a 3.4.2.2. pontban leírtakkal, végül DAB-bal (Sigma-Aldrich) jelöltük a neuropeptidet. A metszeteket PB-ben való mosás után a második antitest (TH, vagy PNMT, nyúlban termeltetett, DiaSorin) 1:1000-es hígítású oldatában inkubáltuk 24 órán át 4°C-on. Ezt követően négyszer 10 percig mostuk a metszeteket PB-ben, majd PB-ben oldott 0,1%-os Cold Water Fish Skin Gelatin (CWFSG, Aurion, Wageningen, Hollandia) oldatban inkubáltuk 30 percig. Ezt követően kecskében termeltetett 0,8 nm kolloidális arannyal konjugált anti-nyúl IgG (1:80 oldva 0,1%-os CWFSG-ben, Aurion) oldatában inkubáltuk 24 órán át 4°C-on. Az inkubációt követően a szekunder antitestet előbb 0,1%-os CWFSG oldattal, majd PB-vel mostuk ki, végül a metszeteket PB-ben oldott 1%-os glutáraldehid oldatba tettük 10 percre. PB mosást követően az arany részecskéket ezüsttel intenzifikáltuk (Aurion R-Gent SE-LM). Az intenzifikációt folyamatos fénymikroszkópos kontroll alatt végeztük.

Egyes esetekben a másodikként festett TH enzim kimutatására a metszeteket lóban termeltetett biotinilált anti-nyúl antitest 1:1000-s hígítású oldatába (Vector

Laboratories) és ABC oldatba (1:500, Vector Laboratories) tettük, majd az enzimet benzidin-dihidrokloriddal (BDHC) jelöltük.

A BDHC fénymikroszkóposan kékes-zöld színű csapadékot képez, ami az elektronmikroszkópban kristályos csapadékként látszik. A BDHC, szemben a DAB csapadékkal, nem kötődik hozzá a sejtoranellumok membránjához, ezáltal a két festés elektronmikroszkópos szinten jól elkülöníthető.

Az immunreakciót követő 10 perces ozmiummal (PB-ben oldott 1%-os OsO₄) való kezelés és felszálló alkoholsor segítségével történő dehidráció után a metszeteket Durcupan műgyantába (Sigma-Aldrich) ágyasztuk be. Az ultravékony metszeteket Formvarral (Polysciences) bevont egy-lyukú gridekre szedtük fel. A kontrasztot PB-ben oldott 1%-os ólom-citráttal (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) és 70%-os alkoholban oldott 1%-os uranil-acetáttal (Sigma-Aldrich) végeztük.

3.4.2.6. *Orexin és Fos kettős immunhisztokémia*

A metszeteket először PB-ben mostuk, majd az antigénfeltárást és az endogén peroxidáz blokkolást (ezen lépések megegyeznek a 3.4.2.1-ben leírtakkal) követően a nem specifikus antigén-kötőhelyeket 10%-os normál kecske-szérummal (Sigma-Aldrich) blokkoltuk egy órán át szobahőmérsékleten, majd a metszeteket nyúl anti-cFos antitest oldatában (1:30000, Santa Cruz Biotechnology) inkubáltuk egy éjszakán keresztül 4°C-on. A primer antitest kimosása után egy-egy órára biotinizált kecske anti-nyúl IgG (1:1000, Vector Laboratories), majd ABC (1:500, Vector Laboratories) oldatban történő inkubáció következett. Ezen lépések között és után PB-ben mostuk a metszeteket. A Fos fehérjét Ni-DAB-bal (Sigma-Aldrich) jelöltük. Többszöri PB mosást követően a metszeteket előbb nyúlban termeltetett orexin A elleni antitest (1:5000; Biosensis Pty Ltd., Thebarton, Ausztrália) oldatában inkubáltuk 24 órán át 4°C-on, majd biotinizált másodlagos antitestben (kecskében termeltetett biotinizált anti-nyúl IgG; 1:1000; Vector Laboratories) egy órán keresztül, végül ABC oldatban (1:500; Vector Laboratories) újabb egy órán át. Az inkubációs lépések közt a metszetek háromszor mostuk PB oldatban. A peroxidáz reakció kimutatásához DAB-ot (Sigma-Aldrich) használtunk kromogénként. Végül a metszeteket zselatinos tárgylemezre húztuk, majd xyloolban (Sigma-Aldrich) való derítés után DPX Mountant oldat (Sigma-Aldrich) használatával lefedtük.

3.5. Dokumentáció

Az elkészült Ni-DAB/DAB, illetve a fluoreszcens kettős festett metszeteket Olympus BX60 mikroszkóp (Olympus Corporation, Tokió, Japán) segítségével vizsgáltuk, és az ehhez csatlakoztatott SPOT Xplorer digitális CCD fényképezőgép (SPOT Imaging Solutions, Sterling Heights, MI, USA) és a SPOT Advanced szoftver segítségével készítettük el a fényképeket.

A konfokális képeket Nikon Eclipse E800 konfokális mikroszkóppal (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) és a mikroszkóphoz csatlakoztatott Bio-Rad Radiance (2100) Rainbow konfokális lézerpasztázó rendszer (Bio-Rad Hungary Ltd., Budapest, Magyarország) segítségével készítettük el. Az orexin A/TH, az orexin A/PNMT kettős festések, az orexin A/TH/szinaptofizin, illetve az orexin A/PNMT/szinaptofizin hármas festések esetében 40-szeres nagyítású objektív lencsét (Plan Fluor 40×/1.30 Oil) használtunk és 2 µm-es lépésközzel 1 µm-es optikai síkokból álló sorozatfelvételeket készítettünk. A képeket Confocal Assistant 4.02 és az Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Software Ireland Ltd., Dublin, Írország) szoftverek segítségével elemeztük.

Az ultravékony metszetek vizsgálatát JEOL 2300 EX elektronmikroszkóp (JEOL Ltd., Tokió, Japán) segítségével végeztük. A fotókat az elektronmikroszkóphoz csatolt Olympus Morada digitális kamerával (Olympus Corporation) készítettük.

Az Adobe Photoshop CS 8.0 segítségével állítottuk be az egyes képeken a fényességet, a kontrasztot és a szürkeárnyalatot, valamint ugyanezzel a programmal készítettük el a fotómontázsokat.

3.6. Kiértékelés és statisztika

3.6.1. Orexin és Fos kettős festések analízise

A különböző hypothalamicus területek méretét a következő módon határoztuk meg: először a területek határait Adobe Photoshop CS 8.0 segítségével szabad kézzel megrajzoltuk. Majd az így körülírt területek felületét az Image J 1.32j szoftver (Wayne

Rasband, NIH, Bethesda, MD, USA) segítségével mértük meg. Az így kapott felszín, illetve számított térfogatértékeket a fixálás során bekövetkező zsugorodás mértékét meghatározó faktorról (jelen esetben 20%) korrigáltuk (Palkovits és mtsai 1971).

A hypothalamus minden ötödik metszetén megszámláltuk a Fos-pozitív és a Fos-negatív orexin A sejteket az agy mindkét oldalán a bregma szintje utáni 2,0 mm-től 3,5 mm-ig. A sejszámlálást követően a kvantifikált immunhisztokémiai adatokat, azaz a Fos-negatív és a Fos-pozitív orexin A-tartalmú sejtek számát összesítettük minden állatban. A kettős festett sejtek és az orexin-tartalmú sejtek arányát a DLH minden egyes szubdivíziójára meghatároztuk. Minden egyes hypothalamicus területen megvizsgáltuk a STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) program segítségével, hogy az alkalmazott kezelésnek volt-e statisztikailag kimutatható Fos-aktiváló hatása az orexin A-tartalmú sejtekre nézve.

Faktoriális variancia analízis (ANOVA) segítségével minden egyes területre meghatároztuk a kezelés (éheztetés, alvás-megvonás, formalin injekció) hatását, valamint azt, hogy az egyes területek és a kezelés között áll-e fenn interakciós hatás. Az egyes kezeléseket Fos-aktiváló hatását a DLH szubdivíziók között külön-külön kiértékeltek együttes ANOVA-val. Mindkét típusú ANOVA-t követően (szignifikáns kezelés-hatás esetén) Tukey *post hoc* tesztet végeztünk. A kezeléseket hatását a Fos-pozitív és a Fos-negatív orexin sejtek százalékos eloszlására az egyes DLH szubdivíziókon belül a bregma szintjétől mért hét különböző rostrocaudalis síkban is megvizsgáltuk Student t-teszt segítségével. Minden adatot átlag \pm SEM-ben tüntettünk fel. Statisztikailag szignifikáns hatást $p < 0,05$ esetén állapítottunk meg.

3.6.2. A BDA-beadások verifikálása és a BDA-jelölés hisztológiai analízise

Összesen 42 állatnak adtam be BDA-t. Az agykból coronalis síkú sorozatmetszeteket készítettem és a metszeteket megfestettem a beadási helyek topográfiai meghatározása céljából. Csak azokat az állatokat fogadtuk el, amelyeknél a BDA-jelölt neuronális terület megfelelő méretű volt és elhelyezkedését tekintve a megfelelő DLH szubdivízióin belül volt. Végeredményben 22 állat felelt meg a kritériumoknak (részletesen lásd 4.2.1. fejezet) és azok agytörzsét használtam fel a BDA projekciók feltérképezéséhez. A felhasznált állatok számát és a beadási helyek koordinátáit és kiterjedését a 13. ábra tartalmazza.

Az alsó agytörzs területén a BDA-jelölt rostok denzitását elemeztük minden olyan állatban, ahol a BDA-tartalmú beadási hely a vizsgálatainknak megfelelő helyen volt lokalizálható. A BDA-tartalmú rostok relatív abundanciáját a következőképpen jelöltük: rostok hiánya (-), nagyon alacsony denzitás (\pm), alacsony denzitás (+), közepes denzitás (++) és magas denzitás (+++), lásd 3. táblázat.

Az adatokat az egyenként értékelt agyakból csoportosítottuk a beadási helyek alapján. Az adatok kiértékelése a következő szempontok alapján történt:

1. melyik és hány agytörzsi terület/mag/szubdivízió tartalmazott BDA-pozitív rostokat a nyolc DLH szubdivízióba való BDA-beadást követően;
2. a nyolc DLH szubdivízió részvétele az agytörzsi területek/magok/szubdivíziók beidegzésében (hány szubdivízió projíciál az adott agytörzsi területre);
3. mely agytörzsi területen/magban/szubdivízióban volt magas a jelölt rostok denzitása;
4. a BDA rostdenzitás elemzése speciális agytörzsi sejtcsoportokban (biogén aminok, formatio reticularis, stb. beidegzése; lásd a 3. táblázatban található csoportosítást).

3.6.3. Konfokális képek kvantitatív analízise

Az orexin A-tartalmú axonok és varikozitások kapcsolatát a C1, C2 és C3 adrenalin sejtcsoport területén lévő PNMT-tartalmú sejtekkel és dendritekkel, valamint azok szinaptofizin tartalmát 216 konfokális képen (295 μm x 295 μm képenként) vizsgáltuk, míg az A1 és A2 noradrenalin sejtcsoport TH-tartalmú sejtjeivel és dendritjeivel való kapcsolatát és azok szinaptofizin tartalmát 131 konfokális képen. Minden jelölt axont, dendritet és sejtet meghatároztunk és megszámláltunk. Az orexin A-tartalmú axonok és varikozitások kapcsolatát a PNMT- vagy TH-tartalmú sejtekkel akkor tekintettük szoros összefekvésnek („close contact”), amennyiben nem volt észrevehető rés a két felszín között. Meghatároztuk, hogy az adrenalin és a noradrenalin sejtekre eső orexin-tartalmú szoros összefekvések hány százaléka tartalmaz szinaptofizint.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Orexin A-tartalmú neuronok aktivációja különböző funkcionális modellekben

4.1.1. Az orexin A-tartalmú sejtek száma, denzitása és eloszlása

4.1.1.1. A dorsolateralis hypothalamus (DLH) kvantitatív adatai

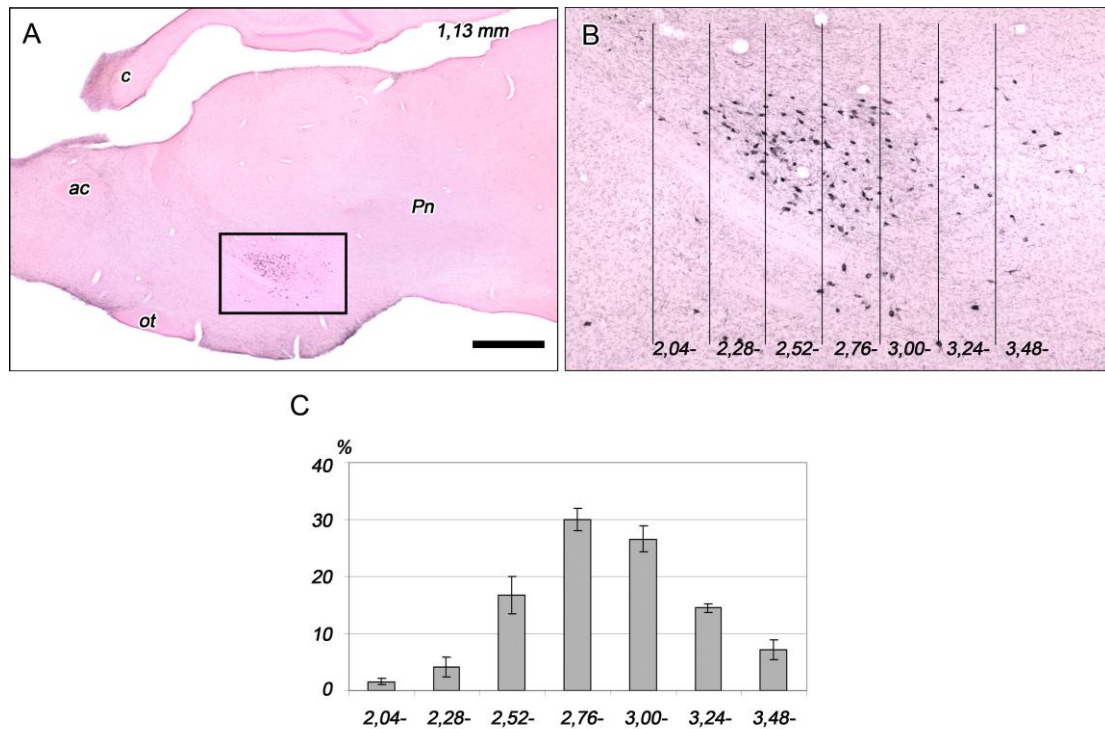
Az orexin-tartalmú neuronális mezőn belül, figyelembe véve a DLH szubdivízióit, az orexin-immunreaktív sejtek denzitását és topográfiáját, öt régiót különítettük el: PeVe, PeF, DMNd, LHv és LHd (3. ábra). Az állatonként megszámlált orexin-festett sejtek száma $1332,3 \pm 22,6$ ($n = 40$). A coronalis metszeteken vizsgált DLH térfogat a teljes DLH-nak körülbelül 20%-át képviseli (minden ötödik rostrocaudalis metszeten számoltunk). Így az orexin-tartalmú neuronok teljes száma 6500 és 7000 közé tehető. Ez a szám megegyezik a korábban publikált adatokkal (Modirrousta és mtsai 2005). Az alkalmazott kísérleti modellek nem változtatták meg szignifikáns mértékben az orexin-tartalmú sejtek számát a kontrollokhöz képest. Nagy, de nem szignifikáns különbségeket találtunk az orexin-tartalmú sejtek számában a három vizsgálati csoport közt.

Néhány orexin-festett sejt a DLH-n kívül is megtalálható az area hypothalamica anterior (3. ábra A), vagy a subthalamus területén. Ezek az összes orexin-tartalmú neuronnak kevesebb, mint 1%-át teszik ki. A statisztikai kiértékelés során ezt a néhány sejtet nem vettük figyelembe.

1. táblázat. Az orexin-tartalmú neuronok eloszlása a dorsolateralis hypothalamus szubregióiban kontroll állatban. Rövidítések: AHA: area hypothalamica anterior, DMNd: nucleus dorsomedialis, dorsalis rész, LHd: lateralis hypothalamus dorsalis része, LHv: lateralis hypothalamus ventralis része, PeF: area perifornicalis, PeVe: area periventricularis. $n = 6$. Forrás: saját, publikációra beküldött eredmény.

területek	a bregma szintjétől caudalisan (mm)							összesen
	2,04-2,28	2,28-2,52	2,52-2,76	2,76-3,00	3,00-3,24	3,24-3,48	3,48-	
AHA	0,41±0,13							0,41±0,13
PeVe	0,02±0,02	0,10±0,05	0,32±0,10	1,08±0,24	1,16±0,27	1,06±0,18	0,51±0,15	4,25±0,40
PeF	0,18±0,15	1,77±0,90	8,28±1,95	14,38±1,33	12,26±1,27	5,26±0,55	2,13±0,59	44,26±3,63
DMNd	0,15±0,15	0,21±0,15	1,77±0,52	4,54±0,53	3,18±0,65	2,18±0,46	0,81±0,28	12,84±0,75
LHv	0,06±0,02	0,48±0,19	2,33±0,28	3,64±0,37	4,17±0,20	3,33±0,38	1,23±0,47	15,24±0,90
LHd	0,44±0,21	1,41±0,70	4,06±0,90	6,35±0,44	5,85±0,94	2,71±0,43	2,18±0,48	23,00±1,85
	1,26	3,97	16,76	29,99	26,62	14,54	6,86	

Az orexin-tartalmú neuronális mezőt hét rostrocaudalis síkra osztottuk (7. ábra A-B, 1. táblázat). A legrostralisabb sík, 2,04-2,28 mm közt a bregma szintjétől caudalisan, csak néhány neuront tartalmazott, ami az összes orexin-festett sejtek mindössze 1,26%-a. A legtöbb orexin-tartalmú neuron a bregmától caudalisan 2,76 és 3,00 mm közt található, ahol az összes orexin sejt 29,99%-a volt (1. táblázat, 7. ábra).



7. ábra. Az orexin-tartalmú neuronok rostrocaudalis eloszlása a dorsolaterális hypothalamus területén. (A) Orexin-tartalmú neuronok patkány agy parasagittális metszetén a középvonaltól 1,13 mm-re laterális irányba. A bekeretezett rész a (B) panelen látható kinagyítva. (B) Az orexin-tartalmú neuronális mező hét rostrocaudalis részre osztva. A számok a bregma szintjétől való távolságot mutatják. (C) A DLH orexin-tartalmú neuronjainak százalékos eloszlása a hét vizsgált rostrocaudalis szinten kontroll állatban. Rövidítések: ac: commissura anterior, c: corpus callosum, ot: tractus opticus, Pn: pons. Lépték: 1 mm. n = 6. Forrás: saját, közlésre benyújtott cikk ábrája.

4.1.1.2. Egyes DLH szubdivíziók kvantitatív adatai

A PeVe orexin-tartalmú neuronjai a harmadik agykamra caudalis porciójának dorsalis része mentén és fölött helyezkednek el (3. ábra B-G). Ennek a területnek a térfogata kicsi, és viszonylag magas az orexin-festett sejtek denzitása ($68,48 \pm 3,11$ sejt/mm³): az orexin-tartalmú neuronok $4,25 \pm 0,40\%$ -a található itt (1. táblázat, 3. ábra H).

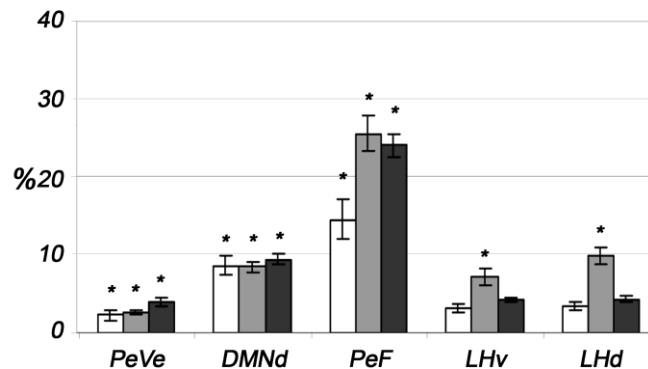
A legtöbb orexin-tartalmú neuron ($44,26 \pm 3,63\%$) a PeF területén található. Ugyanitt van ezen sejtek legnagyobb denzitása is a DLH-ban: $222,65 \pm 12,94$ sejt/ mm^3 (3. ábra B-H). Ez a sejtdenzitás a rostrocaudalis metszeteken szignifikáns eltéréseket mutat (1. táblázat).

A DMNd területén a második legmagasabb az orexin-jelölt sejtek denzitása ($88,99 \pm 2,46$ sejt/ mm^3), itt található ezen neuronok $12,84 \pm 0,75\%$ -a (1. táblázat, 3. ábra B-H).

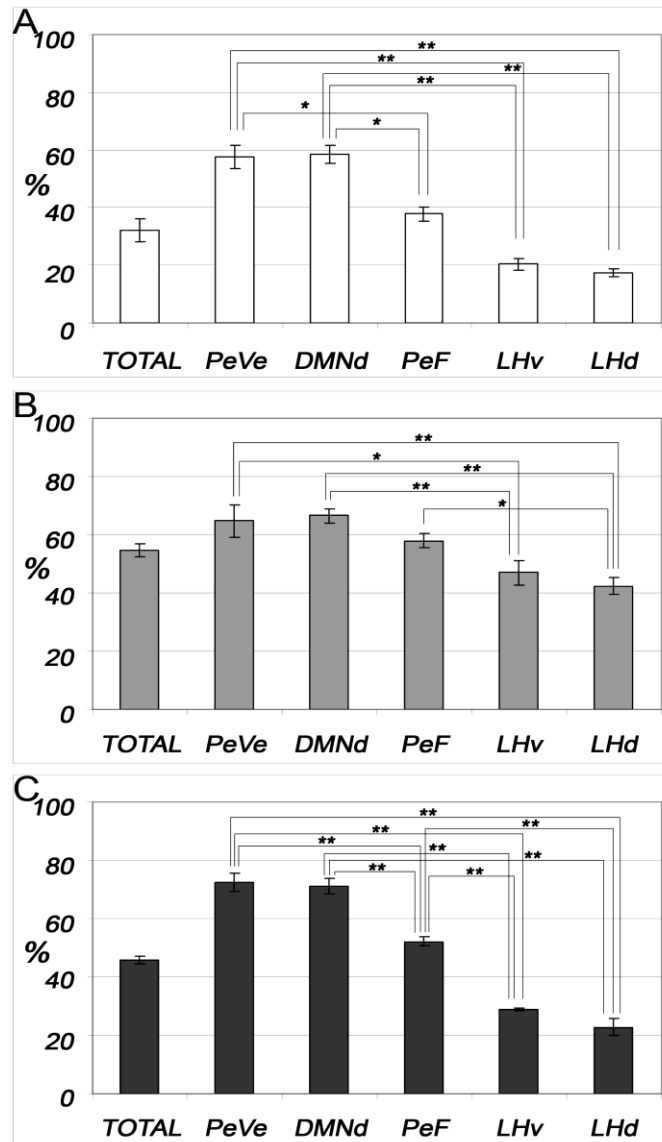
Az LH caudalis részének ventralis régiójában (LHv) az orexin sejtek denzitása alacsony ($39,89 \pm 1,73$ sejt/ mm^3), a sejtek $15,24 \pm 0,90\%$ -a található itt, míg az LHd a sejtek $23,00 \pm 1,85\%$ -t tartalmazza viszonylag magas sejtdenzitás mellett ($84,70 \pm 4,16$ sejt/ mm^3 ; 1. táblázat, 3. ábra A-H).

4.1.2. Az orexin-tartalmú sejtek Fos aktivációja különböző kísérleti modellekben

Általánosságban elmondható, hogy az általunk alkalmazott három különféle beavatkozás nagyszámú orexin-tartalmú sejt aktivációját eredményezte. Az aktiválódott sejtek eloszlási mintázata eltéréseket mutatott a szubdivíziók, a rostrocaudalis síkok és a kísérletek között.



8. ábra. Az aktiválódott orexin-tartalmú neuronok százalékos aránya a dorsolateralis hypothalamus különböző szubrégióiban éheztetés (fehér oszlop), alvás-megvonás (szürke oszlop) és formalin-injekció (fekete oszlop) után. $100\% = a$ DLH összes orexin-tartalmú sejtje. Ahol a Tukey *post hoc* analízis által szignifikáns ($p < 0,05$) Fos aktivációt találtunk a megfelelő kontrollhoz képest, azt csillag jelöli. Rövidítések: DMNd: nucleus dorsomedialis dorsalis része, LHd: lateralis hypothalamus dorsalis része, LHv: lateralis hypothalamus ventralis része, PeF: area perifornicalis, PeVe: area periventricularis. $n = 5-7$. Forrás: saját, közlésre benyújtott cikk ábrája.



9. ábra. Az aktiválódott orexin-tartalmú neuronok százalékos aránya a dorsolaterális hypothalamus különböző szubrégióiban éheztetés (A), alvás-megvonás (B) és formalin-injekció (C) után. 100% = az adott szubdivízió összes orexin-tartalmú neuronja. Ahol a Tukey *post hoc* analízis szignifikáns (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) különbséget mutatott a szubrégiók Fos-aktivációja között, azt csillag jelöli. Rövidítések: DMNd: nucleus dorsomedialis dorsalis része, LHd: laterális hypothalamus dorsalis része, LHv: laterális hypothalamus ventralis része, PeF: area perifornicalis, PeVe: area periventricularis. $n = 5-7$. Forrás: saját, közlésre benyújtott cikk ábrája.

4.1.2.1. A DLH szubdivíziók orexin sejteinek aktivációja éheztetés után

A kontroll állatokban az orexin-tartalmú sejtek $6,19 \pm 3,53\%$ -a volt Fos-pozitív. Ezen aktivált sejtek eloszlása inhomogén volt: a legmagasabb (PeVe: $8,18 \pm 4,14\%$) és a legalacsonyabb (LHd: $4,65 \pm 2,40\%$) értékek összehasonlíthatóak voltak.

2. táblázat. Az Fos aktivált orexin-tartalmú neuronok eloszlása a dorsolaterális hypothalamus szubregióiban különböző kísérleti modellekben. A vastagított értékek esetében a kontrollhoz képest szignifikáns ($p < 0,05$) különbség volt. Rövidítések: AHA: area hypothalamica anterior, DMNd: nucleus dorsomedialis, dorsalis rész, f: fornix, LHd: laterális hypothalamus dorsalis része, LHv: laterális hypothalamus ventralis része, PeF: area perifornicalis, PeVe: area periventricularis. $n = 5-7$. Forrás: saját, publikációra beküldött eredmény.

Éheztetett								
a bregma szintjétől caudalisan (mm)								
területek	2,04-2,28	2,28-2,52	2,52-2,76	2,76-3,00	3,00-3,24	3,24-3,48	3,48-	összesen
AHA	0,07±0,02							0,07±0,02
PeVe	0,00	0,07±0,02	0,19±0,09	0,52±0,14	0,52±0,10	0,76±0,14	0,31±0,08	2,36±0,67
PeF	0,00	0,16±0,09	1,76±0,56	5,45±0,91	4,78±0,91	1,66±0,27	0,72±0,22	14,53±2,60
DMNd	0,00	0,00	0,97±0,40	3,10±0,42	2,52±0,37	1,37±0,26	0,51±0,18	8,48±1,27
LHv	0,01±0,01	0,20±0,07	0,55±0,16	0,76±0,18	0,79±0,16	0,74±0,16	0,27±0,12	3,31±0,50
LHd	0,03±0,03	0,10±0,02	0,37±0,12	0,87±0,15	1,10±0,14	0,57±0,09	0,35±0,19	3,40±0,43
	0,11	0,53	3,84	10,70	9,71	5,10	2,16	32,15±3,92

Alvás-megvont								
a bregma szintjétől caudalisan (mm)								
területek	2,04-2,28	2,28-2,52	2,52-2,76	2,76-3,00	3,00-3,24	3,24-3,48	3,48-	összesen
AHA	0,25±0,04							0,25±0,04
PeVe	0,01±0,01	0,07±0,04	0,19±0,06	0,62±0,13	0,60±0,27	0,71±0,10	0,36±0,10	2,57±0,35
PeF	0,08±0,08	1,23±0,68	4,93±1,36	8,27±0,89	7,07±0,91	3,05±0,26	1,49±0,39	26,11±2,19
DMNd	0,14±0,14	0,19±0,14	1,23±0,35	2,98±0,52	2,14±0,41	1,43±0,31	0,59±0,19	8,69±0,75
LHv	0,02±0,02	0,18±0,08	1,19±0,17	1,66±0,34	1,76±0,35	1,73±0,26	0,65±0,27	7,20±1,01
LHd	0,18±0,11	0,78±0,52	1,50±0,46	2,64±0,20	2,52±0,43	1,13±0,16	1,08±0,29	9,83±1,11
	0,68	2,45	9,04	16,17	14,09	8,05	4,17	54,65±2,37

Formalin-injektált								
a bregma szintjétől caudalisan (mm)								
területek	2,04-2,28	2,28-2,52	2,52-2,76	2,76-3,00	3,00-3,24	3,24-3,48	3,48-	összesen
AHA	0,09±0,03							0,09±0,03
PeVe	0,00	0,09±0,05	0,43±0,10	1,27±0,17	1,04±0,13	0,68±0,15	0,43±0,21	3,94±0,47
PeF	0,15±0,15	0,54±0,31	4,25±0,98	11,00±1,01	5,90±1,05	1,77±0,24	0,19±0,06	23,80±1,54
DMNd	0,00	0,03±0,03	1,93±0,72	3,79±0,32	1,68±0,54	1,69±0,38	0,18±0,15	9,30±0,69
LHv	0,03±0,02	0,20±0,09	0,73±0,14	1,00±0,16	1,28±0,16	0,92±0,15	0,10±0,07	4,26±0,23
LHd	0,03±0,02	0,20±0,03	0,63±0,12	1,76±0,13	1,13±0,32	0,47±0,12	0,07±0,04	4,29±0,49
	0,30	1,06	7,97	18,82	11,03	5,53	0,97	45,68±1,31

Éhezés hatására az orexin-tartalmú sejtek 32,15±3,92%-a válaszolt Fos expresszióval. A legtöbb (az összes orexin-tartalmú neuron 14,53±2,60%-a) aktivált orexin-tartalmú neuron a PeF területén volt (8. ábra, 2. táblázat). A DMNd és a PeVe aktiválódott a legnagyobb mértékben, ugyanis mindkét szubdivízió orexin-tartalmú sejtjeinek több, mint 50%-a tartalmazott Fos-festést (9. ábra A). Az LH orexin-tartalmú neuronjainak

aktivációja viszonylag alacsony volt, a kettős festett sejtek aránya nem érte el a 20%-ot sem az LHv, sem az LHd területén (9. ábra A).

A két órás újraetetés az éheztetés után tapasztalt Fos-aktivációt nem változtatta meg szignifikánsan (nem mutatjuk).

Statisztikai analízisünk szerint az éheztetés szignifikánsan megemelte az orexin-tartalmú neuronok Fos-pozitivitását ($p < 0,0001$, $F_{1,45} = 93,7151$). A Tukey *post hoc* analízis szignifikáns különbséget mutatott ki az éheztetett és a kontroll csoportok közt a PeF ($p < 0,05$), DMNd és PeVe (mindkét esetben: $p < 0,005$) területén (8. ábra). Újraetetés után ugyancsak a Fos festődés kontrollhoz képesti szignifikáns emelkedését tapasztaltuk ($p < 0,0001$, $F_{1,40} = 141,09$). A Tukey *post hoc* analízis szignifikáns különbséget mutatott ki a kontroll csoporthoz képest a PeF, DMNd és PeVe ($p < 0,001$) területén.

4.1.2.2. A DLH szubdivíziók orexin sejteinek aktivációja REM alvás-megvonás után

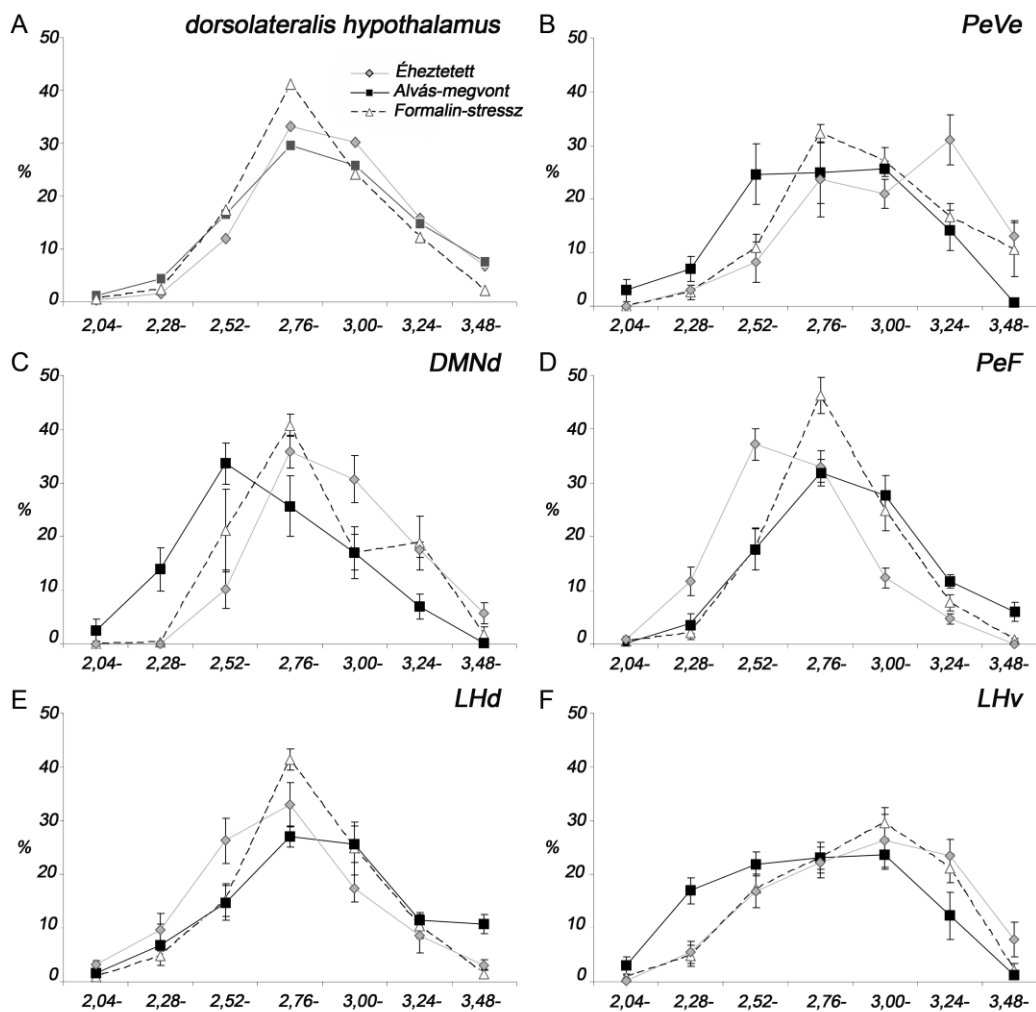
Az alvás-megvonás során a saját ketrecben tartott (home cage, HC) állatok feleltek meg kontrollnak. A kísérleti körülményeknek köszönhetően viszonylag magas Fos aktivációt találtunk ezekben az állatokban: az orexin-tartalmú sejtek $20,79 \pm 5,51\%$ -a tartalmazott Fos jelölést.

A 72 órás REM alvás-megvonás erőteljes *c-fos* expressziót eredményezett: az orexin sejtek $54,65 \pm 2,37\%$ -a ($p < 0,0001$, $F_{1,50} = 105,8929$) aktiválódott, ami 33,86%-kal több, mint a HC esetében. A legtöbb aktiválódott orexin-tartalmú neuron (az összes orexin-festett sejt $26,11 \pm 2,19\%$ -a) a PeF területén volt (8. ábra, 2. táblázat), ugyanakkor a legerőteljesebb választ a DMNd és a PeVe adták, mindkét esetben az itt lévő orexin-tartalmú sejteknek több mint 60%-a volt Fos pozitív (9. ábra B). A kettős festett sejtek százalékos aránya az LHv és LHd területén is meghaladta a 40%-ot (9. ábra B). Tukey *post hoc* összehasonlítás szerint a Fos aktiváció mindegyik vizsgált terület esetén szignifikáns ($p < 0,001$) volt a kontroll csoporthoz képest (8. ábra).

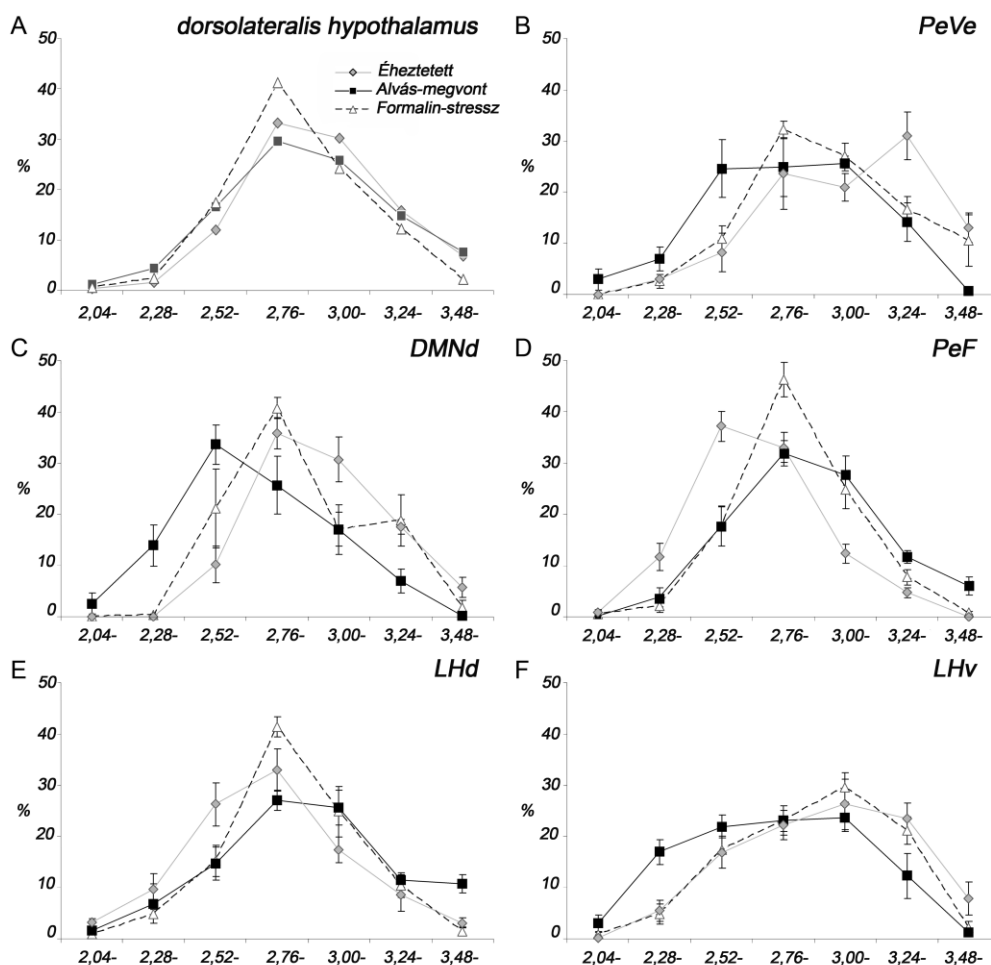
4.1.2.3. A DLH szubdivíziók orexin sejteinek aktivációja formalin-indukált stressz hatására

A kontroll állatok esetében az orexin sejtek $16,92 \pm 6,68\%$ -a volt Fos pozitív.

A subcutan formalin injekció szignifikánsan megnövelte az orexin sejtek Fos-pozitivitását ($p < 0,0001$, $F_{1,35} = 59,3332$), az összes orexin-tartalmú neuron $45,68 \pm 1,31\%$ -a volt kettős festett (2. táblázat). A PeF tartalmazta az összes aktivált sejt $23,80 \pm 1,54\%$ -t (8. ábra, 2. táblázat), ugyanakkor a DMNd és a PeVe válaszolt a legintenzívebben az akut fájdalomra, mivel az itt található sejteknek több, mint 70% -a volt Fos-pozitív (9. ábra C). A Tukey *post hoc* összehasonlítás szerint szignifikáns különbség volt az injektált állatokban a kontrollokhöz képest a PeF ($p < 0,01$), DMNd ($p < 0,005$) és a PeVe ($p < 0,01$) területén (8. ábra).



10. ábra. Az aktiválódott orexin-tartalmú neuronok rostrocaudalis eloszlása a három különböző kísérleti modellben a dorsolateralis hypothalamus (A) és szubdivíziói (B-F) területén. 100% = az adott szubdivízió (A esetén a dorsolateralis hypothalamus) összes aktiválódott orexin-tartalmú sejtje. Rövidítések: DMNd: nucleus dorsomedialis dorsalis része, LHd: lateralis hypothalamus dorsalis része, LHv: lateralis hypothalamus ventralis része, PeF: area perifornicalis, PeVe: area periventricularis. $n = 5-7$. Forrás: saját közlésre benyújtott cikk ábrája.



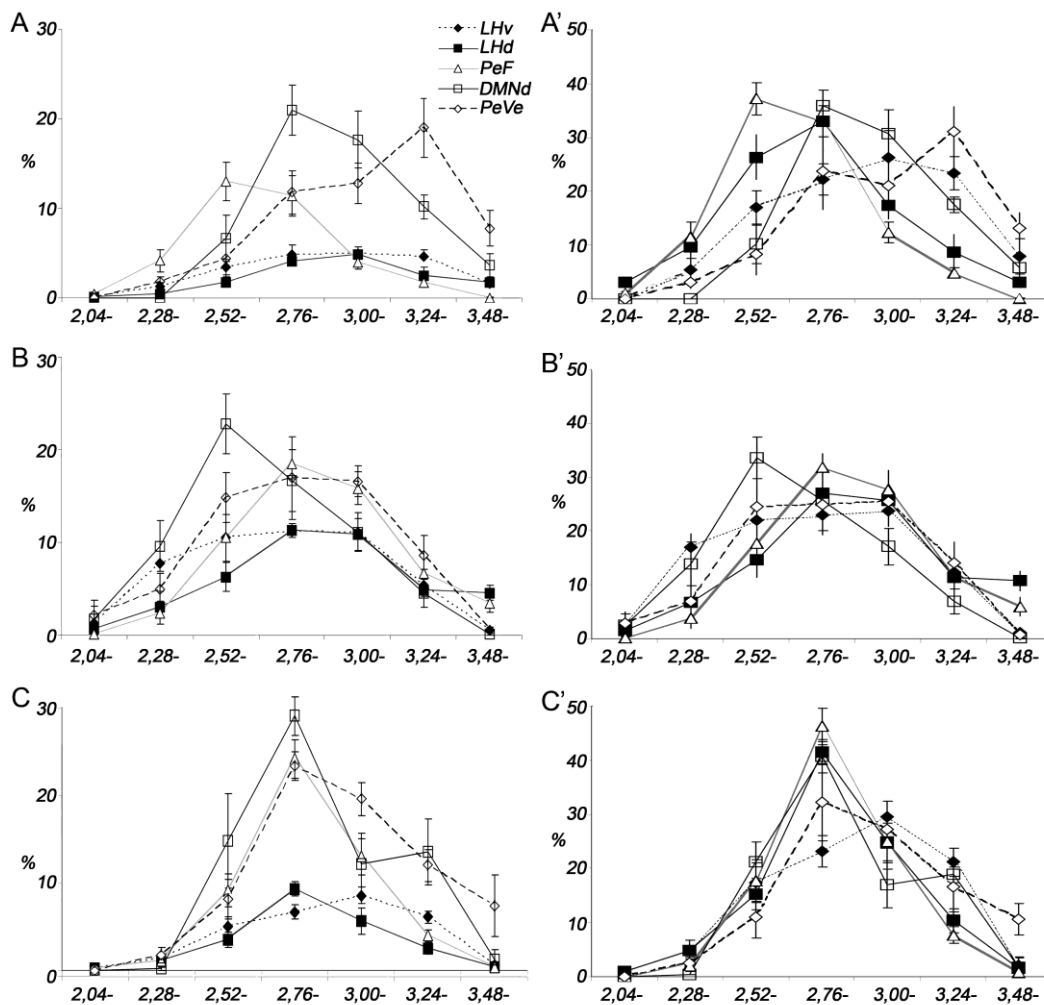
11. ábra. Az aktiválódott orexin-tartalmú neuronok rostrocaudalis eloszlása a három különböző kísérleti modellben a dorsolateralis hypothalamus (A) és szubdivíziói (B-F) területén. 100% = az adott szubdivízió (A esetén a dorsolateralis hypothalamus) összes orexin-tartalmú sejtje. Rövidítések: DMNd: nucleus dorsomedialis dorsalis része, LHd: lateralis hypothalamus dorsalis része, LHv: lateralis hypothalamus ventralis része, PeF: area perifornicalis, PeVe: area periventricularis. n = 5-7. Forrás: saját, közlésre benyújtott cikk ábrája.

4.1.2.4. Az aktiválódott orexin sejtek rostrocaudalis eloszlása

Rostrocaudalisan vizsgálva a DLH aktiválódott és nem aktiválódott orexin-tartalmú sejtjeinek eloszlását, az éhezés hatására a kontrollhoz képest szignifikáns ($p < 0,05$) aktiválódást találunk a PeF és az LHd rostralis részén (10. ábra D és E, 11. ábra D és E, 12. ábra A és A'). Ezzel szemben a PeVe, a DMNd és az LHv területén az aktiválódott sejtek a caudalis részben voltak nagyobb százalékban (10. ábra B, C és F, 11. ábra B, C és F, 12. ábra A és A').

A teljes DLH területén az orexin-tartalmú neuronok figyelemreméltó Fos-aktiválódását tapasztaltuk alvás-megvonás eredményeképpen, ugyanakkor rostrocaudalisan a

szubdivíziók közt nagyfokú eltéréseket találtunk (10. ábra A, 11. ábra A, 12. ábra B és B', 2. táblázat). Szignifikáns Fos indukciót találtunk a DMNd területén caudalisan a bregma szintjétől 2,52 és 2,76 mm között (10. ábra C, 11. ábra C, 12. ábra B és B'). A PeVe és az LHv területén egy magas plató volt megfigyelhető a bregma szintjétől caudalisan 2,52 és 3,00 mm közt (10. ábra B és F, 11. ábra B és F, 12. ábra B és B'), akárcsak a PeF és az LHD területén 2,76 és 3,00 mm közt (10. ábra D és E, 11. ábra D és E, 12. ábra B és B').

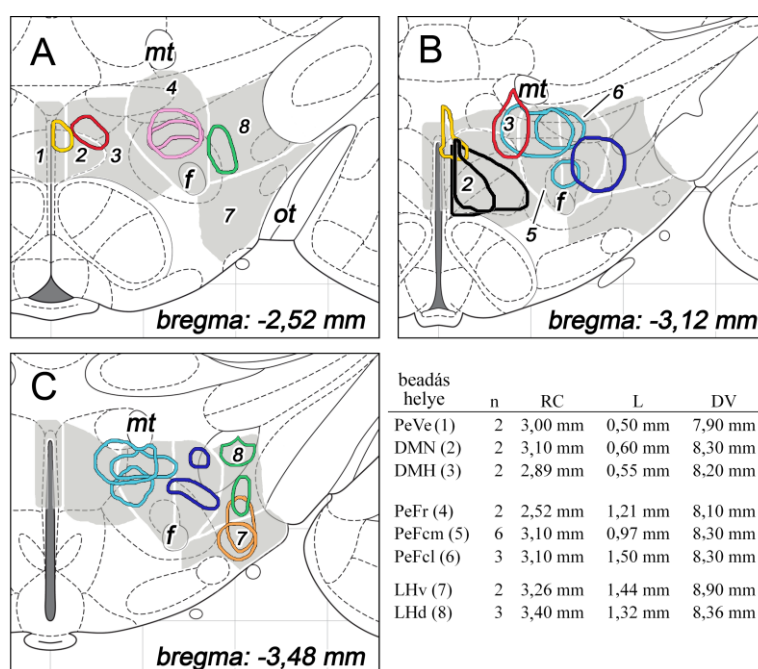


12. ábra. Az aktiválódott orexin-tartalmú neuronok rostrocaudalis eloszlása a három különböző kísérleti modellben az egyes szubdivíziókban éheztetés (A és A'), alvás-megvonás (B és B') és formalin-injekció (C és C') után. 100% = az adott szubdivízió összes orexin-tartalmú sejtje (A-C); illetve az adott szubdivízió összes aktiválódott orexin-tartalmú sejtje (A'-C'). Rövidítések: DMNd: nucleus dorsomedialis dorsalis része, LHd: lateralis hypothalamus dorsalis része, LHv: lateralis hypothalamus ventralis része, PeF: area perifornicalis, PeVe: area periventricularis. n = 5-7. Forrás: saját, közlésre benyújtott cikk ábrája.

Formalin-indukálta stressz hatására rostrocaudalisan a DMNd, a PeF és az LHd mutatott magas Fos-aktivitást a bregma szintjétől caudalisan 2,76 mm-nyire (10. ábra C-E, 11. ábra C-E, 12. ábra C és C'). Továbbá viszonylag sok kettős festett sejt volt az LHv caudalis részén (10. ábra F, 11. ábra F, 12. ábra C és C').

4.2. A dorsolateralis hypothalamus (DLH) különböző szubdivízióinak kapcsolata az alsó agytörzzsel

4.2.1. BDA-beadási helyek lokalizációja



13. ábra. BDA-beadási helyek a dorsolateralis hypothalamus különböző régióiban. A képek alapjául Paxinos és Watson agyatlasza (2007) szolgált. A dorsolateralis hypothalamus különböző régióit szürke háttéren fehér vonalak jelölik és számokkal jelzettek, a beadási helyeket színes vonalak jelzik: 1. area periventricularis (PeVe, citromsárga), 2. nucleus dorsomedialis (DMN, fekete), 3. dorsomedialis hypothalamus (DMH, piros), 4. area perifornicalis, rostralis rész (PeFr, rózsaszín), 5. area perifornicalis, caudomedialis rész (PeFcm, világoskék), 6. area perifornicalis, caudolateralis rész (PeFcl, sötétkék), 7. lateralis hypothalamus, ventralis rész (LHv, narancssárga), 8. lateralis hypothalamus, dorsalis rész (LHd, zöld). A bregma szintjétől való távolság a képek jobb alsó sarkában látható. Az ábra jobb alsó részén táblázatban foglaltam össze a beadási koordinátákat és a felhasznált állatok számát (n). A rostrocaudalis koordináták (RC) a bregma szintjétől való caudalis távolságot, a lateralis koordináták (L) a középvonaltól való lateralis irányú eltérést és a dorsoventralis koordináták (DV) a dura matertől való ventralis távolságot mutatják. Rövidítések: f: fornix, mt: tractus mamillothalamicus, ot: tractus opticus. Forrás: Papp és Palkovits 2014. Front Neuroanat. 8:34.

4.2.1.1. *Area hypothalamica dorsomedialis*

Összesen hat patkányban volt megfelelő BDA-beadás az area hypothalamica dorsomedialis területén, 2-2 mindegyik szubdivízióban.

A PeVe esetében a beadási helyek nagyon kicsik voltak, az átlagos mediolateralis átmérőjük coronalis metszeten nem haladta meg a 250 μm -t, ugyanakkor rostrocaudalis és posteroventralis irányban nagyobb területet fedtek le. A beadási helyek közvetlenül a harmadik agykamra mellett láthatóak, némileg a kamra fölé nyúltak dorsalisán és csak kis átfedést mutattak a DMN-nel (13. ábra A-B, 14. ábra A).

A DMN területén a beadások 400 és 500 μm közöttiek voltak (13. ábra B, 14. ábra B). Az egyik esetben a beadás viszonylag nagy területet ölelt fel, majdnem a teljes DMN-t lefedte. A másik állatban a beadási hely jóval kisebb volt. Mindkét esetben a BDA kissé átterjedt a PeVe posterior részébe.

A DMH-ba adott beadások 350 és 400 μm -esek voltak (13. ábra A-B, 14. ábra C), és a DMN és a PeF medialis része közé estek. A BDA kissé átterjedt mindkét szomszédos területre.

4.2.1.2. *Area perifornicalis*

Tizenegy esetben volt a beadási hely az area perifornicalis területén (13. ábra A-C): kettő a PeFr, hat a PeFcm és három a PeFcl területén.

A PeFr területére adott beadások mérete 350 és 450 μm volt. Mindkét esetben a beadási hely a terület határain belül volt (13. ábra A és 14. ábra D).

A PeFcm esetében a beadások átlagos mérete 250 és 700 μm között volt. Három esetben a BDA-pozitív neuronok nagyrészt a terület határai közt voltak, míg a másik három állatnál a BDA némileg átszivárgott a szomszédos lateralis területre (13. ábra B-C, 14. ábra E).

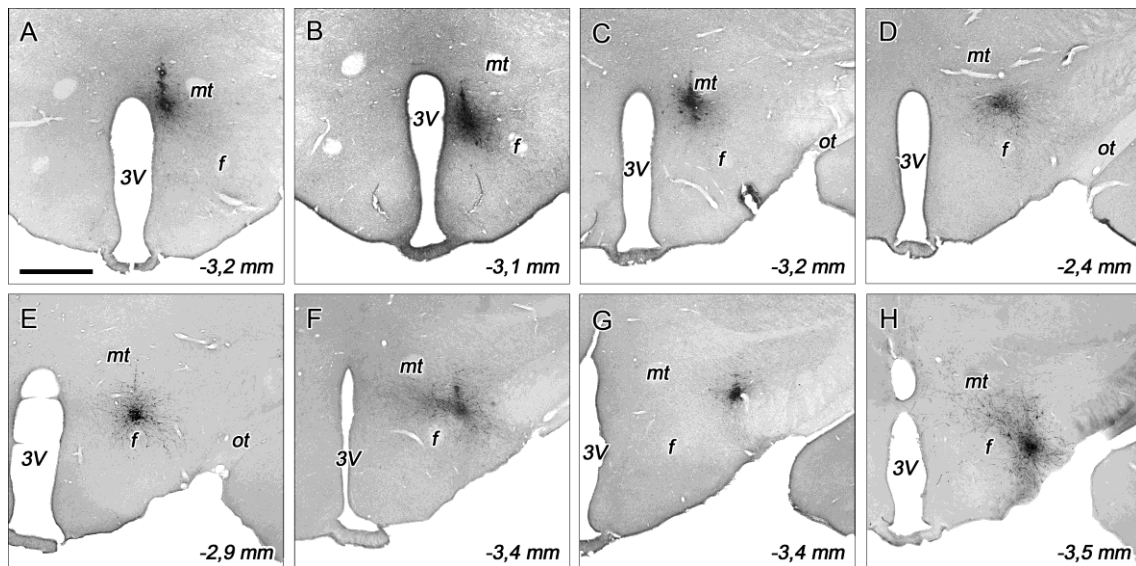
A PeFcl területére adott BDA-beadások mérete 200 és 450 μm között volt (13. ábra B-C és 14. ábra F). Ezek közül a két kisebb a PeFcm határain belül volt (13. ábra C), míg a harmadik állat esetében a BDA átszivárgott a szomszédos LHd területére (13. ábra B).

4.2.1.3. *Lateralis hypothalamus*

Öt beadás került a hátsó LH területére: kettő a ventralis és három a dorsalis részébe (13. ábra A-C). (A beadások esetében LH alatt a hypothalamus teljes rostrocaudalis kiterjedésében megtalálható LH hátsó része értendő, ami a bregma szintjétől caudalisan 2,2 és 3,4 mm közé esik.)

Az LHv területén lévő mindkét beadás a terület határain belül maradt. Méretük 400 μm körül volt (13. ábra C, 14. ábra H).

Az LHD-be adott BDA 250 és 350 μm -nyire terült szét. Két esetben a beadás a terület határain belül maradt, míg egy esetben az LHv területére átszivárgott egy kevés BDA (13. ábra A, C és 14. ábra G).

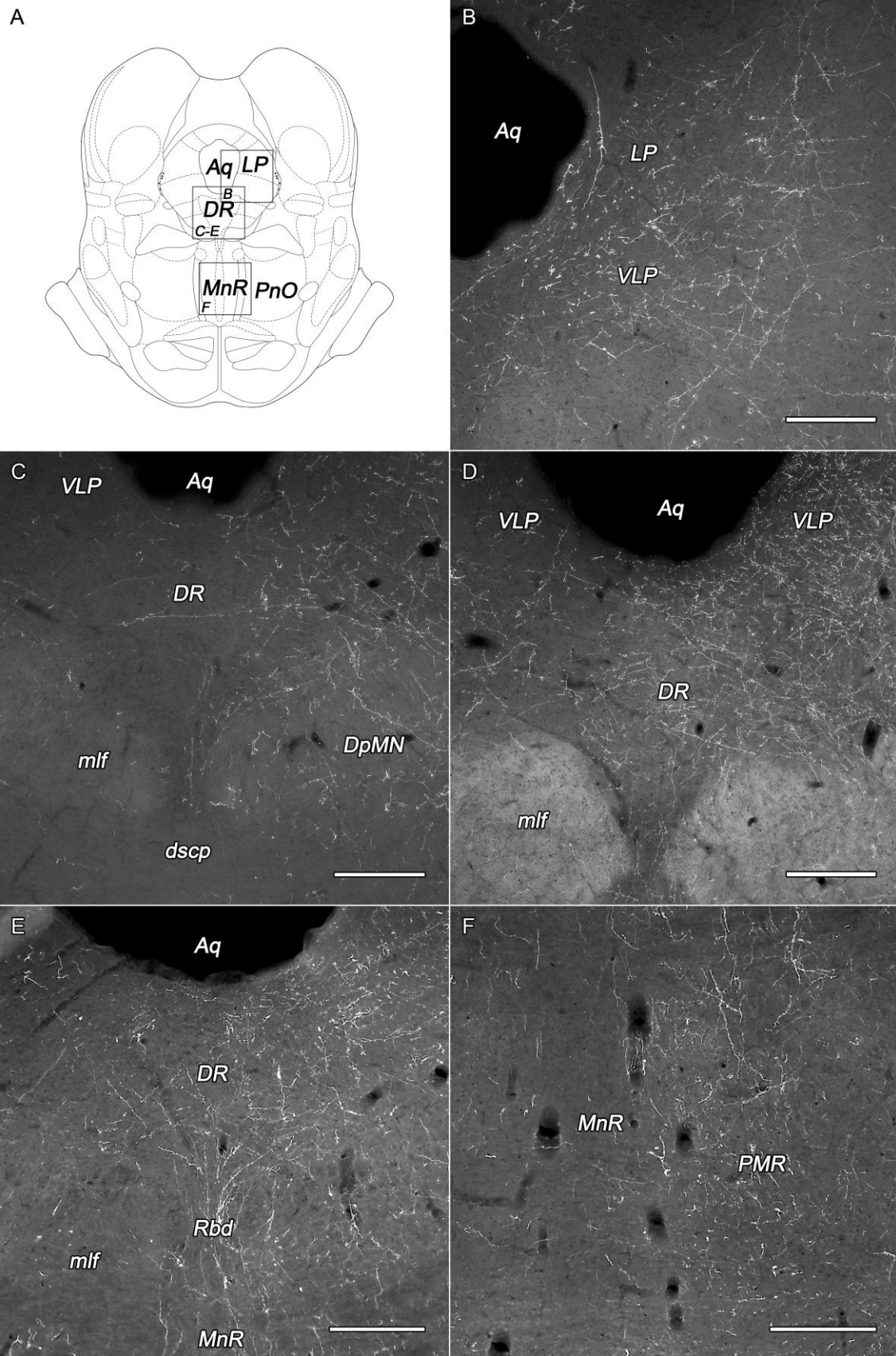


14. ábra. Reprezentatív BDA-beadási helyek a dorsolaterális hypothalamus különböző régióiba: area periventricularis (A), nucleus dorsomedialis (B), dorsomedialis hypothalamus (C), area perifornicalis, rostralis rész (D), area perifornicalis, caudomedialis rész (E), area perifornicalis, caudolaterális rész (F), laterális hypothalamus dorsalis része (G), laterális hypothalamus ventralis része (H). Rövidítések: f: fornix, mt: tractus mamillothalamicus, ot: tractus opticus, 3V: harmadik agykamra. Lépték: 1 mm. Forrás: Papp és Palkovits 2014. *Front Neuroanat.* 8:34.

4.2.2. BDA-tartalmú rostok eloszlása az alsó agytörzsben

4.2.2.1. Középgagy

Általánosságban elmondható, hogy BDA-tartalmú rostokat a középgagy területén ipsilaterális dominanciában találtunk az egyoldali DLH beadás után (15. ábra C-F).



15. ábra. Jelölt rostok a központi szürkeállomány és a középagyi raphe magvak területén a dorsolateralis hypothalamus különböző szubdivízióiba történt BDA-beadás után. (A) Paxinos és Watson atlaszának (2007) ábráján körülhatárolt részek jelölik a megfelelő B-F képeket. (B) Az area perifornicalis rostralis részéből eredő BDA-tartalmú rosthálózat a központi szürkeállomány lateralis és a ventrolateralis részén. (C-E) Varikózus BDA-tartalmú rostok a nucleus raphe dorsalis területén area perifornicalis rostralis (C-D) és caudolateralis (E) részébe való BDA-beadás után. (F) Közepesen sűrű varikózus rosthálózat a nuclei raphe medianus és paramedianus területén az area perifornicalis caudolateralis részébe való BDA-beadás után. Megjegyzés: a BDA-t minden egyes esetben az agy jobb oldalába injektáltuk. A C-F képeken jól látható a rostok ipsilateralis dominanciája. Rövidítések: Aq: aqueductus cerebri, DpMN: mély mesencephalicus mag, DR: nucleus raphe dorsalis, dscp: decussatio pedunculorum cerebellarium superiorum, LP: központi szürkeállomány, lateralis rész, mlf: fasciculus longitudinalis medialis, MnR: nucleus raphe medianus, PMR: nucleus raphe paramedianus, PnO: nucleus reticularis pontis, oralis rész, Rbd: nucleus rhabdoideus, VLP: központi szürkeállomány, ventrolateralis rész. Lépték: 300 µm. Forrás: Papp és Palkovits 2014. *Front Neuroanat.* 8:34.

A BDA-jelölt rostok legnagyobb denzitásban a PAG területén voltak láthatóak, melyek nagyrészt a DLH PeF és az area hypothalamica dorsomedialis PeVe régiójából eredtek (3. táblázat). Sűrű BDA-pozitív rosthálózatot találtunk a PAG ventralis és ventrolateralis részében (15. ábra B-D), míg a PAG többi területén csak gyenge és közepes erősségű volt a BDA-tartalmú rostok sűrűsége. Bár a rostok egy része áthaladó axonnak („axon of passage”) tűnt, köztük számos varikózus rost is látható volt, melyek lehetséges szinaptikus kapcsolatokra utaltak.

Számos rostot találtunk a PAG-tól lateralisán és ventralisan, leginkább a nucleus cuneiformis (másik neve: mély mesencephalicus mag; 15. ábra A, C), az area precuneiformis és a formatio reticularis isthmicus részének területén.

A nucleus raphe dorsalisban közepes és erős denzitásban találtunk BDA-tartalmú rostokat PeF és LHv beadások után (15. ábra A, C-E). A nucleus raphe medianus (más néven nucleus centralis superior vagy „midbrain raphe”) csak gyenge vagy nagyon gyenge projekciót kapott (15. ábra A, F), míg a mellette található nuclei raphe paramedianus és rhabdoideus területén közepes denzitásban találtunk BDA rostokat (15. ábra A, E és F).

A többi vizsgált középagyi magban és területen, köztük a nuclei oculomotoriusban és trochlearisban vagy nagyon alacsony volt a rostok denzitása (3. táblázat), vagy egyáltalán nem találtunk bennük rostokat (nem mutatjuk).

4.2.2.2. *Híd*

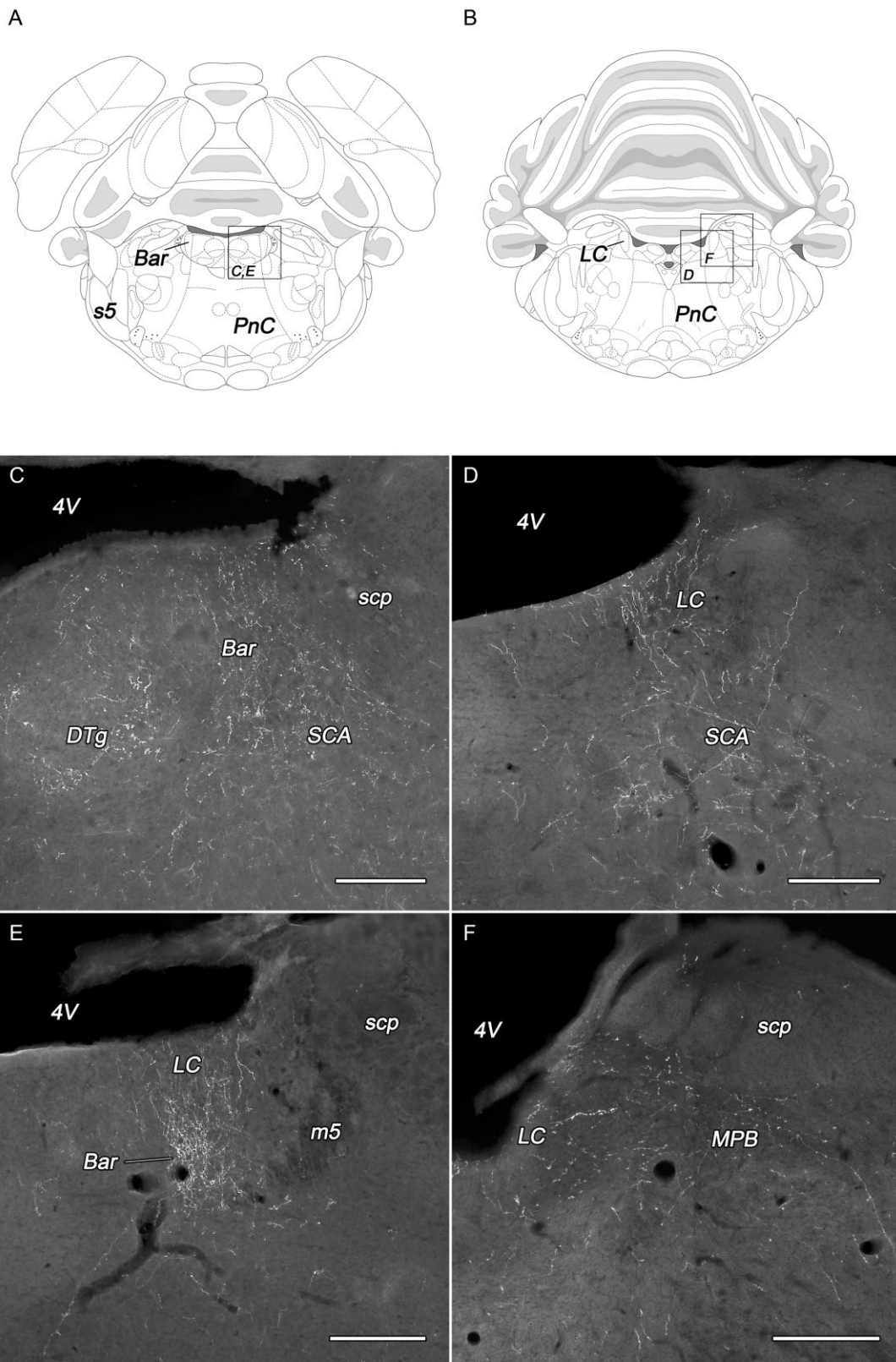
Ahogy a közepagyban, a híd területén is jellemző a BDA-tartalmú rostok bilaterális eloszlása erős ipsilaterális dominanciával.

Közepes denzitásban találtunk részben áthaladó BDA-tartalmú rostokat a formatio reticularis pontis oralis részében PeFcm és PeFcl beadások után, és némileg gyengébb projekció indult a DLH többi részéről. Gyenge és közepes denzitásban voltak jelölt rostok mind az oralis, mind a caudalis részében a formatio reticularis pontisnak a DLH PeVe, PeFr és LHv területére való beadás után (3. táblázat).

Mindegyik szubdivízió küld rostokat a nucleus tegmentalis laterodorsalis területére, és a nucleus tegmentalis pedunculopontinus is hat különböző DLH szubdivízióból kap rostokat (3. táblázat). Nagy sűrűségben találtunk jelölt rostokat mindkét területen az LHv-be való BDA- beadás után (3. táblázat).

Sűrű BDA-tartalmú rosthálózatot találtunk a Barrington magban PeVe beadás után (16. ábra A, C, E). A BDA rostok denzitása a locus coeruleus területén majdnem megegyezett a Barrington magban találttal. A PeVe és a PeF szubdivíziói közepesen, míg a DLH többi régiója gyengén (vagy a DMH esetében nagyon gyengén) projiciáltak a locus coeruleus területére (16. ábra D és E). A locus coeruleus caudalis részén nagyon ritkák voltak a jelölt rostok (16. ábra B, F). A locus coeruleustól ventralisan, az area subcoerulea területén, annak is a dorsalis részében közepesen sűrű rosthálózat volt megfigyelhető. A rostok nagyrészt a DLH PeFr, PeFcm és LHv régióiból eredtek (16. ábra C-D). BDA-pozitív rostokat figyeltünk meg gyenge és közepes denzitásban a nuclei parabrachiales lateralis és medialis területén. A PeFr és a PeFcl sejtei közepesen innerválják mindkét magot.

A híd ventrolaterális részén, ahol az A5 noradrenalin sejtcsoport található, néhány BDA-tartalmú rostot találtunk. Ugyancsak néhány rost volt megfigyelhető a nuclei pontis és raphe pontis és néhány hídi szenzoros és motoros mag területén (3. táblázat), ugyanakkor más magokban, mint például a nuclei cochlearis és a vestibularis lateralis egyáltalán nem volt BDA-tartalmú rost, vagy terminális (nem mutatjuk).



16. ábra. Jelölt rostok a locus coeruleus és a Barrington mag területén a dorsolateralis hypothalamus különböző szubdivízióiba történt BDA-beadás után. Paxinos és Watson atlaszból (2007) való módosított ábrákon körülhatárolt részek jelölik a megfelelő C és E (A), valamint D és F (B) képeket. (C) Közepes

sűrűségben láthatóak rostok a Barrington magban, a nucleus tegmentalis dorsalis és az area subcoerulea területén az area perifornicalis caudomedialis részébe való beadás után. (D) BDA-tartalmú rostok a locus coeruleus rostralis részén az area perifornicalis caudomedialis részébe való beadás után. (E) Sűrű rosthálózat található a locus coeruleus rostralis részén és a Barrington mag területén periventricularis beadást követően. (F) Finom, varikózus BDA-tartalmú rostok figyelhetők meg a locus coeruleus caudalis részén és a nucleus parabrachialis medialis területén az area perifornicalis rostralis részébe való beadás után. Rövidítések: Bar: Barrington mag, DTg: nucleus tegmentalis dorsalis, LC: locus coeruleus, m5: tractus mesencephalicus nervi trigemini, MPB: nucleus parabrachialis medialis, PnC: nucleus reticularis pontis, caudalis rész, s5: nervus trigeminus szenzoros gyökere, SCA: area subcoerulea, scp: pedunculus cerebellaris superioris, 4V: negyedik agykamra. Lépték: 300 µm. Forrás: Papp és Palkovits 2014. *Front Neuroanat.* 8:34.

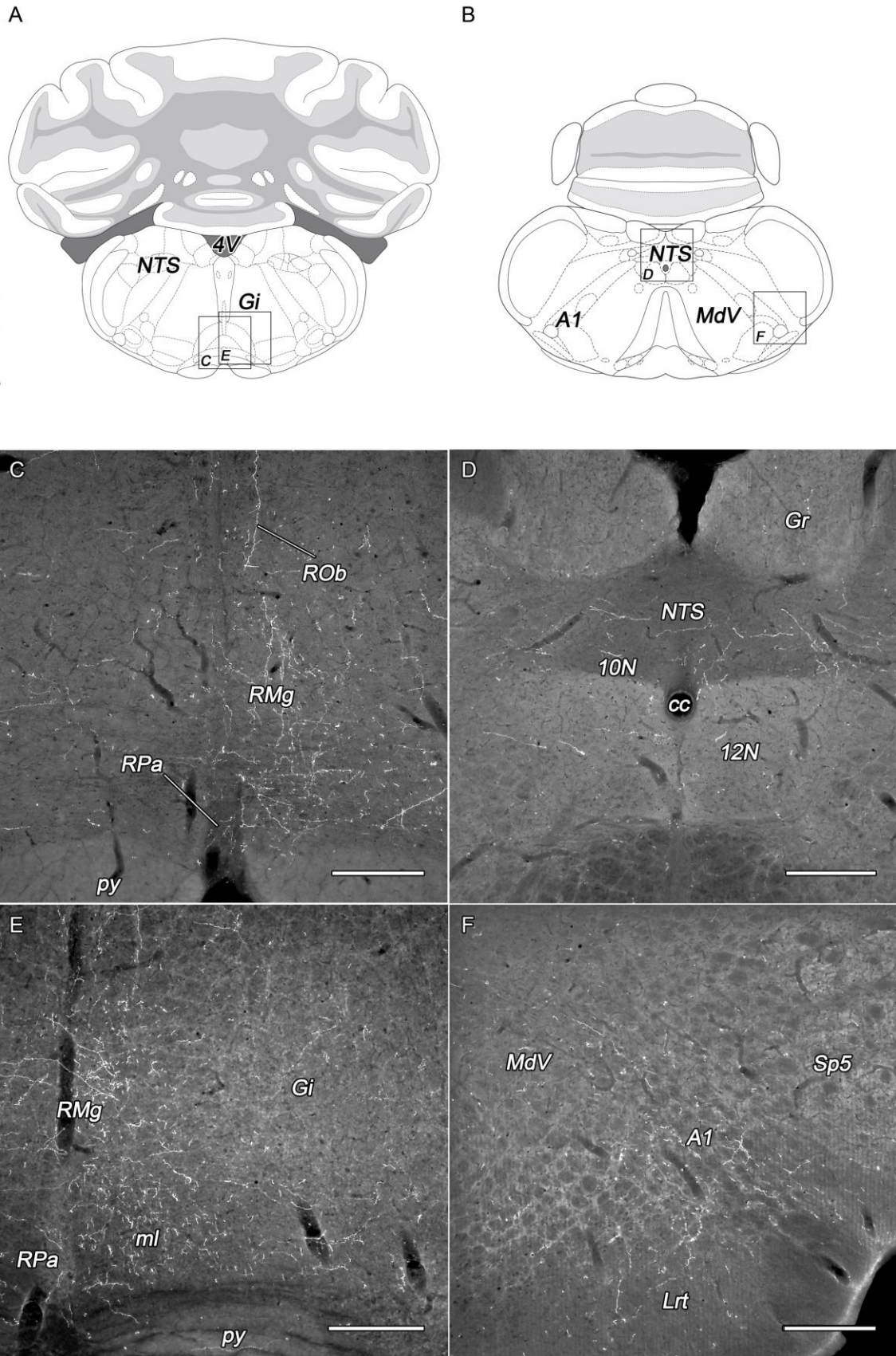
4.2.2.3. Nyúltvelő

Bár általában alacsony a BDA-rostok denzitása a medulla oblongata területén, a rostok topográfiai eloszlása és sűrűsége igen heterogén. Bilateralis szimmetriában, ipsilateralis dominanciában találtuk meg a rostokat.

A DLH különböző szubdivízióiból kiinduló rostok alacsony denzitásban jelentek meg a nucleus reticularis gigantocellularis területén (17. ábra A, C, E). A szomszédságában lévő nucleai paragigantocellularis lateralis és reticularis intermedia területén pedig még ritkábbak voltak a rostok. A DMN kivételével a DLH mindegyik szubdivíziója beidegezte ez utóbbi két területet (3. táblázat).

A nucleus tractus solitarii területére a DMN kivételével az összes DLH terület küldött projekciót: gyengén projiciált a PeVe, PeFr és LHv, a többi terület pedig még kevésbé vett részt az innerválásában (17. ábra B, D). A nucleus dorsalis nervi vagi kevés rostot kapott a DMN, PeFr, PeFcm, LHv és LHd területéről, és csak egy-két rostot találtunk PeFcl beadás után.

A medullaris katekolamin sejtcsoportok területén jellemző a jelölt rostok alacsony denzitása, ugyanakkor ezek a rostok a DLH több szubdivíziójából eredtek (3. táblázat). Az A2 noradrenalin sejtcsoportot beidegző rostok (17. ábra B, D) a DLH mind a nyolc általunk elhatárolt régiójába történt beadás után megjelentek. Az A1 noradrenalin sejtcsoport caudalis részét (17. ábra B, F), valamint a C1 adrenalin sejtcsoportot ellátó DLH rostok hét, míg az A1 noradrenalin sejtcsoport rostralis részét, valamint a C2 adrenalin sejtcsoportot ellátók öt különböző szubrégióból származtak (3. táblázat).



17. ábra. Jelölt rostok az alsó agytörzsben a dorsolateralis hypothalamus különböző szubdivízióiba történt BDA-beadás után. Paxinos és Watson atlaszból (2007) való módosított ábrakon körülhatárolt részek jelölik a megfelelő C és E (A), valamint D és F (B) képeket. (C, E) Sűrű BDA-tartalmú rosthálózat látható a nucleii raphe pallidus, obscurus és magnus területén az area perifornicalis caudomedialis részébe való BDA-beadást követően. A C ábrán jól látható a rostok eloszlásának ipsilateralis dominanciája. Az area perifornicalis caudolateralis részéből eredő varikózus BDA-tartalmú rostok találhatóak a nucleus tractus solitarii caudalis részén (D), és az A1 katekolamin sejtcsoport területén (F). Rövidítések: A1: A1 noradrenalin sejtcsoport, cc: canalis centralis, Gi: nucleus reticularis gigantocellularis, Gr: nucleus gracilis, Lrt: nucleus reticularis lateralis, MdV: nucleus reticularis medullaris, ventralis rész, ml: lemniscus medialis, NTS: nucleus tractus solitarii, py: tractus pyramidalis, RMg: nucleus raphe magnus, ROb: nucleus raphe obscurus, RPa: nucleus raphe pallidus, Sp5: nucleus tractus spinalis nervi trigemini, 10N: nucleus motorius nervi vagi, 12N: nucleus hypoglossus, 4V: negyedik agykamra. Lépték: 300 µm. Forrás: Papp és Palkovits 2014. Front Neuroanat. 8:34.

A nucleus raphe magnusban a DLH nyolc különböző területéről eredő rostok alacsony és közepes denzitásban voltak megfigyelhetőek (17. ábra A, C és E). A nucleus raphe pallidus és a raphe obscurus területén finom, varikózus rostok találhatóak a DLH hét különböző szubrégiójába való BDA-beadást követően (17. ábra A, C és E). Néhány, szinte a metszés síkjával párhuzamos BDA-tartalmú rost megfigyelhető volt a nucleus raphe obscurus és a nucleus reticularis paramedianus területén (17. ábra A, C).

A legtöbb PeF és LH beadás után BDA-tartalmú rostokat találtunk a pályák és a kötegek rostjai között. A rostok denzitása igen alacsony volt, kivéve a lemniscus medialis, a fasciculus longitudinalis medialis és a pedunculus cerebellaris superiorist, ahol a BDA-rostok denzitása egyes esetekben közepes volt (3. táblázat).

Az agytörzsben elkülönített területek/magok/szubdivíziók (Paxinos és Watson 2007) több mint egyharmadában nem voltak BDA-tartalmú rostok és terminálisok. Ezeket a területeket nem tartalmazza a 3. táblázat.

3. táblázat. A biotinilált dextrán-amin-tartalmú rostok relatív denzitása az alsó agytörzsben a dorsolateralis hypothalamus különböző régióiba történő beadást követően. Rövidítések: DMH: dorsomedialis hypothalamus, DMN: nucleus dorsomedialis, LHd: lateralis hypothalamus dorsalis része, LHv: lateralis hypothalamus ventralis része, PeFcl: area perifornicalis, caudolateralis rész, PeFcm: area perifornicalis, caudomedialis rész, PeFr: area perifornicalis, rostralis rész, PeVe: area periventricularis. A táblázatban szereplő anatómiai kifejezések alapjául Paxinos és Watson atlasz (2007) szolgált. Forrás: Papp és Palkovits 2014. Front Neuroanat. 8:34.

	Area hypothalamica dorsomedialis			Area perifornicalis			Lateralis hypothalamus	
	PeVe	DMN	DMH	PeFr	PeFcm	PeFcl	LHv	LHd
Substantia grisea centralis								
Substantia grisea centralis, ventrolateralis rész	++	++	++	+++	+++	++	++	+
Substantia grisea centralis, lateralis rész	+++	+	++	+++	+++	+++	++	+
Substantia grisea centralis, dorsomedialis rész	++	+	+	±	+	±	-	±
Substantia grisea centralis, dorsolateralis rész	+	+	+	+	++	-	±	+
Somato- és visceromotoros magok								
nucleus oculomotorius	±	-	+	±	±	-	-	-
nucleus trochlearis	±	-	±	±	+	±	+	±
nucleus paratrochlearis	-	-	±	±	+	+	+	-
nucleus nervi abducentis	-	-	-	-	±	±	-	±
area precuneiformis	+	-	+	+	++	+	-	-
nucleus motorius nervi trigemini	-	-	-	±	±	±	-	±
nucleus nervi facialis	-	-	-	-	-	±	-	-
zona perifacialis	-	-	-	±	+	+	+	+
nucleus ambiguus	±	-	±	±	-	±	±	±
nucleus retroambiguus	-	-	±	-	±	±	+	-
nucleus nervi hypoglossi	-	-	-	±	±	±	+	±
nucleus Edinger-Westphal	+	±	±	+	+	+	+	+
nucleus salivatorius superior	±	-	+	+	+	±	+	+
nucleus salivatorius inferior	-	-	-	+	-	±	±	-
nucleus motorius nervi vagi	-	+	-	+	+	±	+	+
Somato- és viscerosensoros magok								
nucleus sensorius principalis nervi trigemini	-	-	-	-	-	±	±	-
nucleus supratrigeminalis	-	-	-	+	+	+	+	±
zona peritrigeminalis	-	-	±	±	±	±	±	-
nucleus tractus solitarii	+	±	-	+	±	±	+	±
trigemino-solitaris átmeneti zóna	-	-	-	+	±	±	-	+
nucleus sagulum	-	-	-	-	-	±	-	-
nucleus juxtaolivaris	-	-	-	-	+	±	±	-
oliva superior, lateralis rész	-	-	-	+	-	-	-	-
nucleus periolivaris caudalis	-	-	-	-	±	-	-	-
nucleus corporis trapezoidei	-	-	-	-	±	-	-	-
nuclei lemnisci laterales	-	-	-	-	-	-	+	-
nucleus perilemniscalis, ventralis rész	-	-	-	-	±	±	-	±
nucl. vestibularis medialis, magnocellularis rész	-	-	-	+	±	±	-	-
nucleus supragenualis	±	-	-	±	-	-	±	-
Monoamin sejtsoportok								
nucleus raphe dorsalis	+	+	+	++	++	++	++	+
nucleus raphe medianus	±	+	±	±	+	+	±	-
nucleus rhabdoideus	-	-	±	-	±	±	-	+
nucleus raphe pontis	-	-	±	-	+	+	+	±
nucleus raphe magnus	+	+	+	++	++	++	++	±
nucleus raphe pallidus	++	+	-	+	++	++	+	+
nucleus parapyramidalis	-	-	-	±	±	±	±	±
nucleus raphe obscurus	+	-	±	+	+	+	±	±
nucleus raphe paramedianus	+	±	±	±	+	+	+	±
A1 noradrenalin sejtsoport, rostralis rész	++	-	-	+	±	+	++	-
A1 noradrenalin sejtsoport, caudalis rész	+	+	±	+	+	+	+	-
A2 noradrenalin sejtsoport	+	+	±	+	+	+	±	±

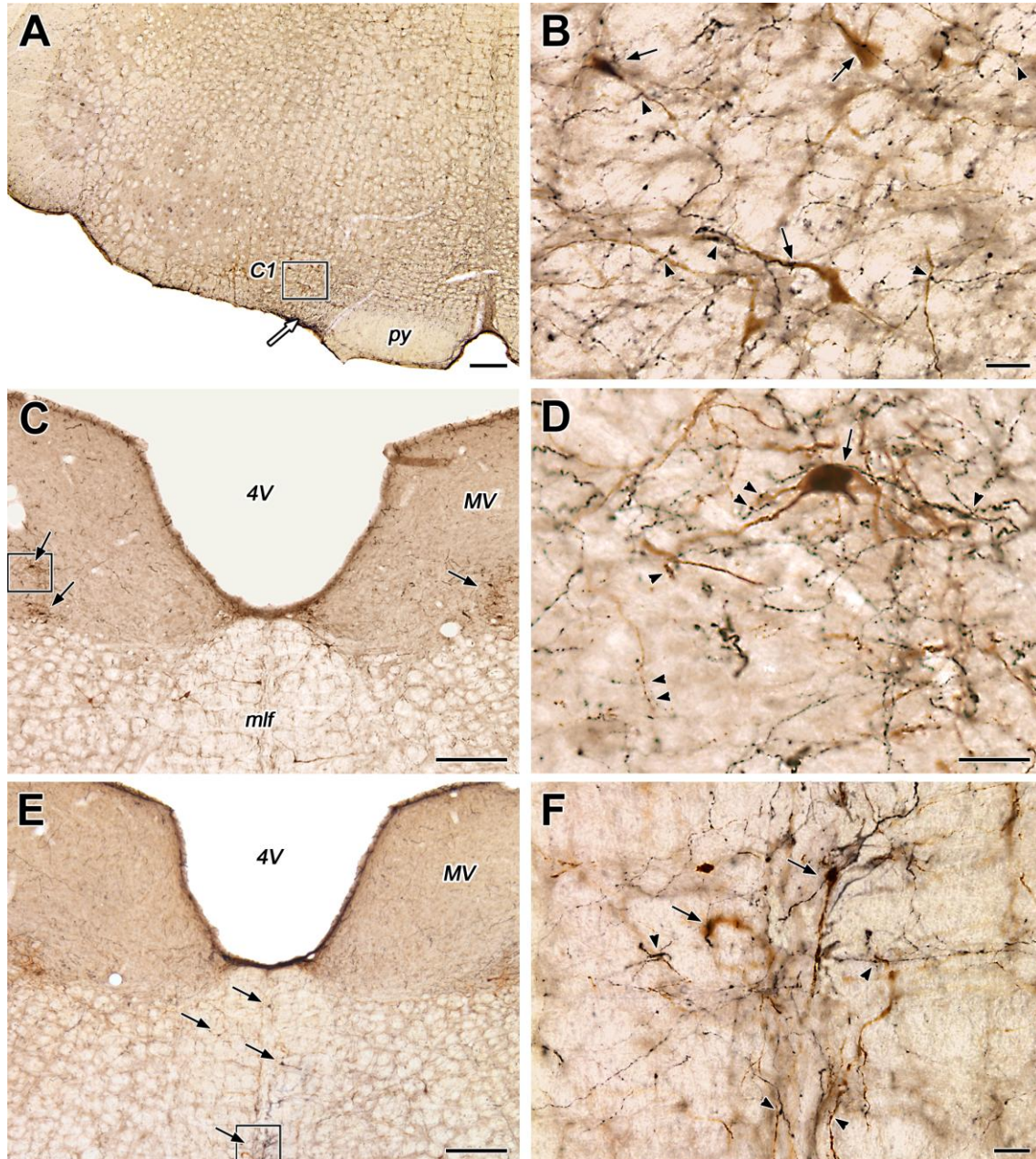
	Area hypothalamica dorsomedialis			Area perifornicalis			Lateralis hypothalamus	
	PeVe	DMN	DMH	PeFr	PeFcm	PeFcl	LHv	LHd
A5 noradrenalin sejtsoport	-	-	+	+	+	+	+	±
locus coeruleus	++	+	±	++	++	++	+	+
nucleus subcoeruleus, dorsalis rész	+	-	±	++	++	+	++	±
nucleus subcoeruleus, ventralis rész	-	-	±	+	+	+	±	±
nucleus subcoeruleus, alpha rész	±	-	±	+	+	+	+	+
A7 noradrenalin sejtsoport	-	-	+	±	±	+	±	-
C1 adrenalin sejtsoport	-	+	±	++	±	+	+	+
C2 adrenalin sejtsoport	-	-	-	±	+	±	±	±
C3 adrenalin sejtsoport	-	-	-	+	±	-	+	-
Pons a formatio reticularis kivételével								
nucleus cuneiformis	+	-	±	-	-	±	±	-
nucleus paralemniscalis medialis	-	-	±	-	±	±	±	-
nuclei pontis	-	-	-	±	±	±	-	-
Barrington nucleus	+++	+	+	+	+	+	±	-
nucleus parabrachialis lateralis	+	±	±	++	+	++	+	±
nucleus parabrachialis medialis	+	+	±	++	+	++	+	+
Kölliker-Fuse mag	-	-	+	±	±	+	+	-
nucleus tegmentalis ventralis	+	-	±	±	+	+	+	+
nucleus tegmentalis dorsalis, centralis rész	-	-	-	-	±	-	-	-
nucleus tegmentalis dorsalis, pericentralis rész	-	-	-	±	+	±	-	±
nucleus pedunculopontinus dorsalis	-	-	-	+	+	-	-	-
nucleus tegmentalis laterodorsalis	+	+	+	+	++	++	++	±
nucleus tegmentalis pedunculopontinus	+	-	+	+	+	++	+++	-
area tegmentalis dorsomedialis	+	-	±	±	+	+	±	+
nucleus tegmentalis subpeduncularis	+	±	±	±	+	±	++	-
nucleus sphenoidalis	-	-	-	-	±	±	-	+
nucl. interstitialis fasciculi longitudinalis med.	-	-	-	-	-	±	±	-
Medulla a formatio reticularis kivételével								
nucleus X	-	-	-	-	-	-	-	±
oliva inferior	-	-	-	±	-	±	-	-
nucleus epifascicularis	-	-	-	+	±	±	-	-
nucleus prepositus	-	-	-	±	±	±	±	±
Bötzing complex	-	-	±	±	-	±	+	-
Pre-Bötzing complex	-	-	±	±	±	+	++	±
area respiratorica rostroventralis	-	-	±	±	-	+	+	+
Roller mag	-	-	-	±	±	-	-	-
nucleus linearis medullae	-	-	-	±	-	±	-	-
nucleus parasolitarius	-	-	-	-	-	±	-	-
nucleus cervicalis centralis	-	-	-	±	±	±	-	±
Formatio reticularis								
formatio reticularis, isthmicus rész	+	-	+	++	++	+	++	+
nucleus reticularis pontis, oralis rész	+	-	±	+	++	++	+	+
nucleus reticularis pontis, caudalis rész	+	±	±	+	+	++	+	-
nucleus reticularis pontis, ventralis rész	+	-	±	+	+	+	+	±
formatio reticularis pontis, paramedian rész	-	-	±	-	-	-	±	±
nucleus reticularis parvicellularis	±	±	+	++	-	-	-	+
nucleus reticularis parvicellularis, alpha rész	+	-	±	+	+	±	-	-
nucleus reticulotegmentalis pontis	±	-	-	±	+	+	-	±
nucleus reticularis intermedius	+	-	+	++	+	+	++	+

	Area hypothalamica dorsomedialis			Area perifornicalis			Lateralis hypothalamus	
	PeVe	DMN	DMH	PeFr	PeFcm	PeFcl	LHv	LHd
nucleus paragigantocellularis dorsalis	-	-	-	±	±	+	±	±
nucleus paragigantocellularis lateralis	±	-	±	±	+	++	++	++
nucl. paragigantocellularis lat., externalis rész	+	±	-	±	+	±	-	+
nucl. paragigantocellularis lat., alpha rész	-	±	±	±	+	+	+	-
nucleus reticularis gigantocellularis	-	-	+	+	+	+	+	+
nucleus reticularis gigantocell., alpha rész	±	-	±	+	+	+	++	±
nucleus reticularis gigantocell., ventralis rész	+	-	-	++	+	+	±	+
nucleus reticularis paramedianus	-	-	±	-	±	±	-	-
nucleus reticularis lateralis	±	-	±	±	±	±	+	±
nucleus reticularis medullaris, dorsalis rész	+	-	+	+	+	+	+	±
nucleus reticularis medullaris, ventralis rész	-	-	-	+	±	±	+	±
BDA rostok agypályákban								
lemniscus medialis	++	+	+	±	+	++	+	±
tractus trigeminothalamicus	-	-	±	+	+	±	±	-
tractus mesencephalicus nervi trigemini	-	-	-	±	-	-	±	±
fasciculus longitudinalis medialis (középagy)	-	-	±	+	++	++	+	±
fasciculus longitudinalis medialis (pons)	-	-	-	±	±	±	-	-
tractus vestibulomesencephalicus	-	-	-	+	±	±	±	±
tractus vestibulospinalis	-	-	-	±	±	±	-	-
tractus tectospinalis	-	-	±	±	±	±	±	+
tractus rubrospinalis	+	-	-	+	+	±	±	-
tractus spinocerebellaris ventralis	-	-	±	±	-	-	-	-
nervus facialis (intracranialis rész)	-	-	-	±	-	-	-	-
pedunculus cerebellaris superioris	+	±	+	++	++	+	+	±
tractus pyramidalis	-	-	-	±	-	±	-	+
tractus solitarius	-	-	-	±	-	±	±	±

4.3. Orexin A-tartalmú neuronok kapcsolata az agytörzsi katekolamin sejtsoportokkal

4.3.1. Orexin A rosthálózat az agytörzsi adrenalin sejtsoportok területén

Orexin A és feniletanolamin-N-metiltranszferáz (PNMT) kettős festéssel kimutattuk, hogy minden agytörzsi adrenalin sejtsoport kap orexin innervációt. A ventrolateralis medullában a C1 adrenalin sejtsoport neuronjai körül finom, varikózus orexin-tartalmú rostokat lehet megfigyelni (18. ábra A és B) a PNMT-tartalmú perikarionokkal és dendritekkel juxtapozícióban. Ilyen szoros kapcsolatok a sejtsoport teljes rostrocaudalis kiterjedésében megfigyelhetőek.



18. ábra. Orexin A-tartalmú rostok (fekete) és feniletanolamin-N-metiltranszferáz (PNMT)-pozitív neuronok (barna) az alsó agytörzs adrenalin-tartalmú sejtcsoportjainak területén. (A) A patkány C1 adrenalin sejtcsoportjáról készült kis nagyítású kép. A fehér nyíl a közvetlenül a medulla felszíne alatt, a piramis pályától lateralisán futó orexin A-tartalmú rostokra mutat. A bekeretezett terület a (B) képen látható kinagyítva. (B) Nagy nagyítású kép a C1 adrenalin sejtcsoportról. A PNMT-tartalmú neuronok és az orexin-immunfestett rostok között jól megfigyelhető a szoros kapcsolat (nyílak), akárcsak a PNMT-festett rostokhoz közeli appozícióban lévő orexin-varikozitások (nyílfejek). (C) Patkányagy coronalis metszete, a nyílak a C2 adrenalin sejtcsoport neuronjaira mutatnak. A bekeretezett terület a (D) képen látható kinagyítva. (D) Nagy nagyítású kép a C2 adrenalin sejtcsoportról. Megfigyelhető, hogy a PNMT-tartalmú sejt közvetlen közelében egy hosszú, varikózus orexin-tartalmú rost fut (nyíl). Számos PNMT-pozitív rost körül jól látható orexin-tartalmú varikozitások találhatók (nyílfejek). (E) Patkányagy

coronalis metszete, a nyilak a C3 adrenalin sejtcsoport PNMT-tartalmú sejtjeire mutatnak. A bekeretezett terület az (F) képen látható kinagyítva. (F) Nagy nagyítású kép a C3 adrenalin sejtcsoportról. Megfigyelhető a PNMT-pozitív sejtek (nyilak) és rostok (nyílfejek) és az orexin-tartalmú varikozitások közti szoros kapcsolat. Bregma szintjétől mért caudalis távolságok: (A, B): 12,48 mm, (C, D): 12,60 mm, (E, F): 12,36 mm. Rövidítések: C1: C1 adrenalin sejtcsoport, mlf: fasciculus longitudinalis medialis, MV: nucleus vestibularis medialis, py: tractus pyramidalis, 4V: negyedik agykamra. Lépték: A: 100 µm, C-E: 250 µm, B, D és F: 25 µm. Forrás: Puskas és mtsai 2010. Peptides 31: 1589-1597.

A nucleus tractus solitarii rostralis részénél elhelyezkedő C2 adrenalin sejtcsoport területén ugyancsak megfigyelhetőek a varikózus orexin-immunreaktív rostok. Sok rost közvetlenül a PNMT-tartalmú perikarionok és dendritek felszínén található (18. ábra C és D).

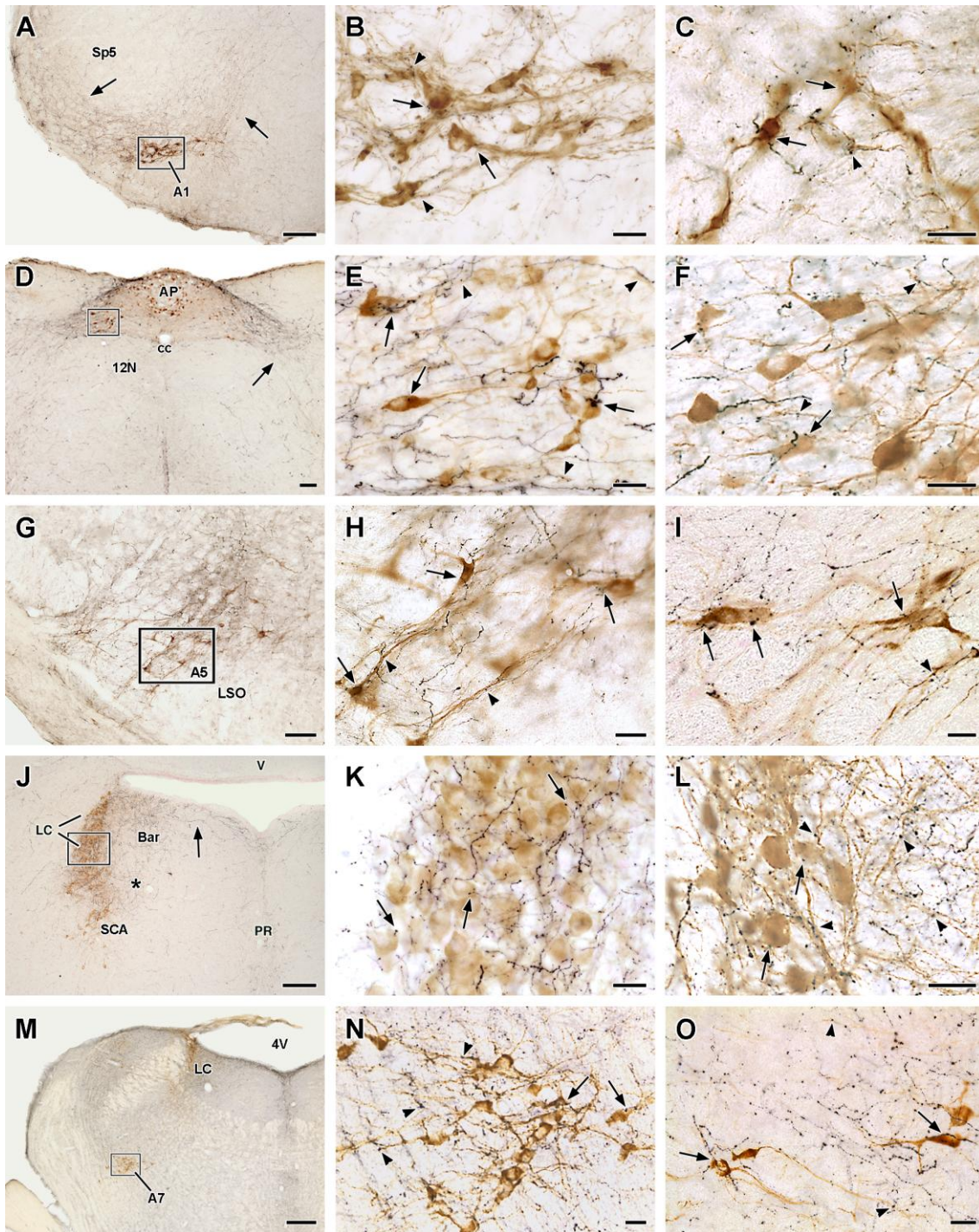
A rostralis medulla dorsomedialis és paramedian részén lévő C3 adrenalin sejtcsoportban mindössze néhány PNMT-tartalmú neuron található. A PNMT-pozitív sejtek körül hosszú, vékony, varikózus orexin-tartalmú rostok figyelhetőek meg (18. ábra E és F), ahogy a PNMT-sejtek perikarionjai és dendritjei közvetlen közelében futnak (18. ábra F).

4.3.2. Orexin A rosthálózat az agytörzsi noradrenalin sejtcsoportok területén

Finom, orexin A-tartalmú neuronális hálózat figyelhető meg az agytörzsi noradrenalin sejtcsoportok területén mind egérben, mind pedig patkányban. Ezen a területen az orexin-immunreaktív rosthálózat innervációs mintázata nagy hasonlóságot mutat a két faj esetében (19. ábra). A caudalis ventrolateralis medulla területén, az A1 noradrenalin sejtcsoportban és a sejtcsoport körül az orexin-tartalmú rostok egy nagyon sűrű hálózatot képeznek (19. ábra A–C).

Két orexin-tartalmú rostköteg figyelhető meg, amint lateralis és dorsomedialis irányból az A1 noradrenalin sejtcsoport felé fut (19. ábra A). Ezen a területen jól láthatóak a TH-tartalmú sejtek és dendritek mellett juxtapozícióban lévő varikózus orexin A-festett rostok (19. ábra B és C).

Az A2 noradrenalin sejtcsoportban, leginkább a nucleus tractus solitarii területén, számos orexin-pozitív varikózus rost figyelhető meg (19. ábra D-F). A magon belül rostrocaudalisan a rostok denzitása növekedik. A nucleus tractus solitarii commissuralis



19. ábra. Orexin A-tartalmú rostok (fekete) és tirozin-hidroxiláz (TH)-pozitív neuronok (barna) az alsó agytörzs noradrenalin sejtsoportjainak területén. (A) Az eger A1 noradrenalin sejtsoportjáról készült kis nagyítású kép. A bekeretezett terület a (B) képen látható nagyobb nagyításban. A nyilak az A1 sejtsoportot innerváló két orexin-tartalmú rostköteget (egy lateralis és egy dorsomedialis) mutatja. (B és C) Eger (B) és patkány (C) A1 noradrenalin sejtsoport. Jól megfigyelhetők a varikózus orexin-rostok és a TH-pozitív perikarionok (nyilak) és dendritek (nyílfejek) közvetlen közelében. (D) Nucleus tractus

solitarii (NTS), azaz A2 noradrenerg sejtsoport egérben. A bekeretezett terület az (E) képen látható nagyobb nagyításban. A nyíl az NTS-től ventrolateralisan futó orexin-tartalmú rostokat mutatja. (E és F) Egér (E) és patkány (F) NTS. Jól megfigyelhetőek a varikózus orexin-rostok és a TH-pozitív perikarionok (nyilak) és dendritek (nyílfejek) közvetlen közelében. (G) A5 noradrenalin sejtsoport egéragyból. A bekeretezett terület a (H) képen látható nagyobb nagyításban. (H és I) Egér (H) és patkány (I) A5 noradrenalin sejtsoport. Jól megfigyelhetőek a varikózus orexin-rostok és a TH-pozitív perikarionok (nyilak) és dendritek (nyílfejek) közvetlen közelében. (J) Egér locus coeruleus és area subcoerulea. A bekeretezett terület a (K) képen látható nagyobb nagyításban. A nyíl a negyedik agykamra felszíne alatt futó orexin-tartalmú rostokat mutatja. A csillag a locus coeruleustól medialisán elhelyezkedő denz rosthálózatot jelöli. (K és L) Egér (K) és patkány (L) locus coeruleus. Jól megfigyelhetőek a varikózus orexin-rostok és a TH-pozitív perikarionok (nyilak) és dendritek (nyílfejek) közvetlen közelében. (M) Patkány A7 noradrenalin sejtsoport. A bekeretezett terület az (N) képen látható nagyobb nagyításban. (N és O) Patkány (N) és egér (O) A7 noradrenalin sejtsoport. Jól megfigyelhetőek a varikózus orexin-rostok és a TH-pozitív perikarionok (nyilak) és dendritek (nyílfejek) közvetlen közelében. Bregma szintjétől mért caudalis távolságok: (A, B): 7,76 mm, (C): 14,28 mm, (D, E): 7,48 mm, (F): 4,16 mm, (G, H): 5,40 mm, (I): 9,60 mm, (J, K): 5,34 mm, (L): 9,84 mm, (M, N): 8,88 mm, (O): 4,96 mm. Rövidítések: A1: A1 noradrenalin sejtsoport, A5: A5 noradrenalin sejtsoport, A7: A7 noradrenalin sejtsoport, AP: area postrema, Bar: Barrington mag, cc: canalis centralis, LC: locus coeruleus, LSO: oliva superior, lateralis rész, PR: nucleus raphe pontis, SCA: area subcoerulea, Sp5: nucleus tractus spinalis nervi trigemini, V: vermis, 12N: nucleus nervi hypoglossi, 4V: negyedik agykamra. Lépték: A, D, G, J, és M: 120 µm, B, E, H, K, és N: 30 µm, C, F, I, L, és O: 25 µm. Forrás: Puskas és mtsai 2010. Peptides 31: 1589-1597.

szubdivíziójában egy orexin-tartalmú rosthálózat figyelhető meg, főleg a szubdivízió dorsalis és lateralis részén, közvetlenül a nucleus gracilis mellett (19. ábra D). A magon belül horizontálisan futó rostok kereszteződnek közvetlenül a canalis centralis felett dorsalisán. A nucleus tractus solitarii teljes hosszában megfigyelhető orexin-tartalmú rostok nagyszámú varikozitással rendelkeznek és számos szoros kapcsolatot létesítenek a TH-pozitív sejtekkel (19. ábra E és F).

Az A5 sejtsoport teljes rostrocaudalis hosszában megfigyelhető a noradrenerg sejtek orexinerg innervációja. Vékony, hosszú, varikózus rostok veszik körül a TH-tartalmú sejteket és dendriteket (19. ábra G-I). Két orexin rostköteg éri el az A5 noradrenalin sejtsoportot, az egyik az area subcoerulea felől, a másik pedig ventrolateralis irányból. Az alsó agytörzsben az orexin-tartalmú rostokat a legnagyobb sűrűségben a locus coeruleus, azaz az A6 noradrenalin sejtsoport területén találjuk (19. ábra J-L).

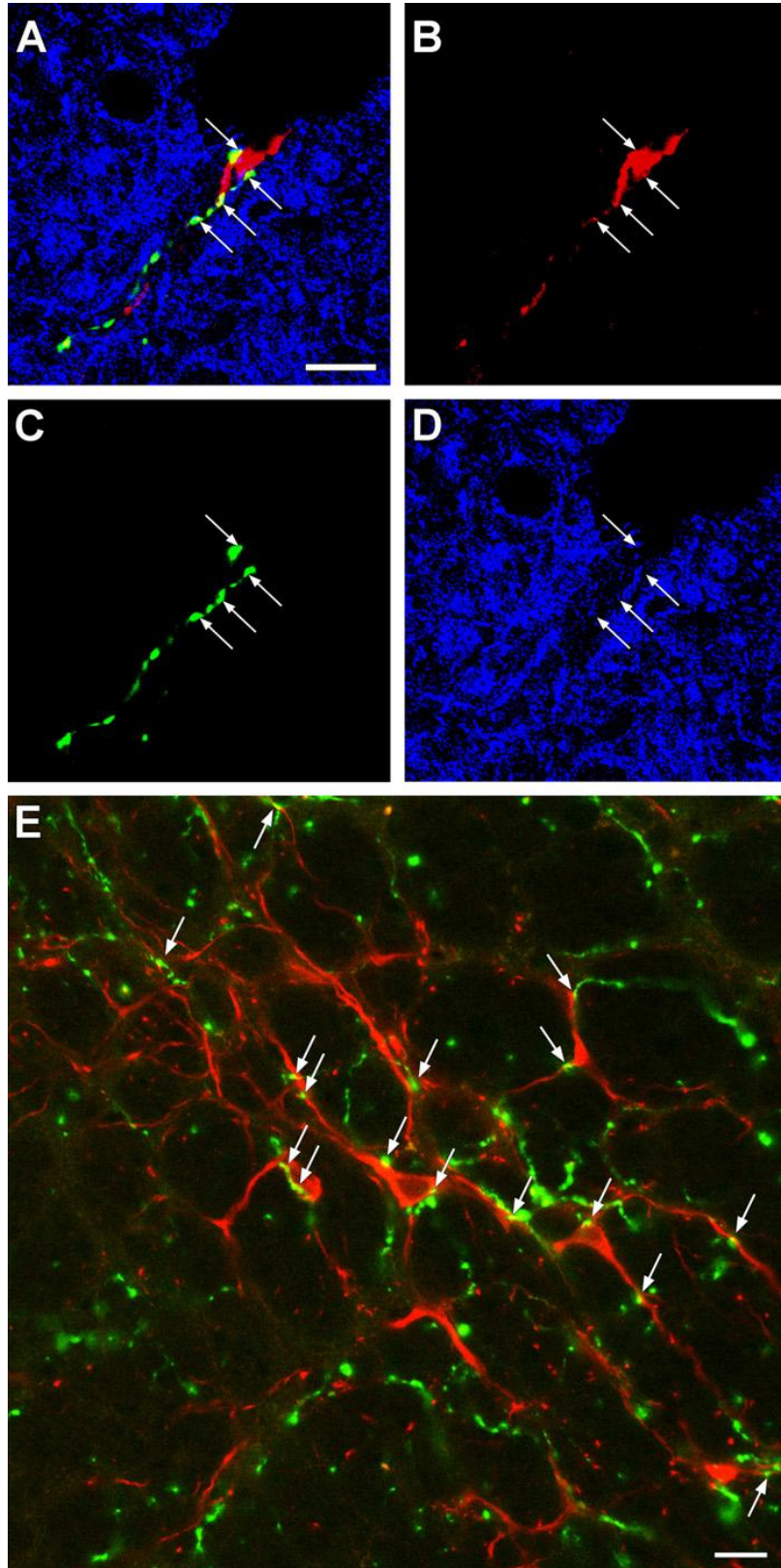
A vastag, varikózus orexin-pozitív rostok finom hálózatot képeznek a locus coeruleuson belül, végig a mag medialis részén, ahol zömmel a locus coeruleus neuronjainak dendritjei találhatóak. Ugyanez a hálózat figyelhető meg az area subcoerulea területén, a locus coeruleus és az A5 noradrenalin sejtszomszéd között. Hosszú, párhuzamosan futó orexin-immunreaktív rostok futnak a negyedik agykamra alatt, a felszínhez nagyon közel (19. ábra J). Párhuzamos, varikózus rostokat találunk a negyedik agykamra falában is a subependymalis noradrenalin-tartalmú sejtek (A4) és az ependyma sejtek közt (nem mutatjuk). Szoros kapcsolat látható a TH-tartalmú perikarionok és dendritek, valamint a varikózus orexin-festett rostok közt a locus coeruleus teljes területén (19. ábra K és L). A locus coeruleustól ventralisan, az area subcoeruleában, ahol a TH-tartalmú sejtek denzitása némileg kisebb, mint a locus coeruleuson belül, az orexin-pozitív rosthálózat elhelyezkedése jól megfigyelhető a noradrenalin sejtek körül (19. ábra J).

Az A7 sejtszomszéd viszonylag kevés TH-pozitív noradrenalin sejtet tartalmaz. Mint ahogyan más noradrenalin sejtszomszédban, az A7 területén is megfigyelhető a finom, orexin-tartalmú rosthálózat, amely ezt a magot ventralis irányból éri el (19. ábra M-O). A TH-tartalmú sejtek és dendritek, valamint az orexin-pozitív rostok közötti szoros kapcsolatok ritkábbak, de jól megfigyelhetőek (19. ábra N és O).

4.3.3. Orexin-TH és orexin-PNMT közeli összefekvések demonstrációja a C1, C2, C3 adrenalin és az A1, A2 noradrenalin sejtszomszédok területén

Az orexin-TH és orexin-PNMT kettős festések egyértelműen jelzik, hogy szoros kapcsolat van az orexin-tartalmú rostok és az adrenalin és noradrenalin sejtek közt (18. és 19. ábrák). Felmerült a kérdés, hogy ez a kapcsolat mindössze topográfiai, vagy szinaptikus specializáció is kialakul? Ennek megválaszolására kettős (orexin/TH és orexin/PNMT) és hármas (orexin/TH/szinaptofizin és orexin/PNMT/szinaptofizin) immunfluoreszcens festéseket alkalmaztunk. A kapcsolatok milyenségének meghatározására a varikozitások szinaptofizin tartalmát vizsgáltuk.

Kettős immunfluoreszcens festéssel axo-dendritikus és axo-szomatikus szoros összefekvéseket figyeltünk meg varikózus orexin-tartalmú rostok és PNMT-, vagy TH-tartalmú neuronok és dendritek között (20. ábra). Nagyszámú konfokális felvételt



20. ábra. Orexin A-tartalmú varikózus rostok és catecholamin neuronok és dendritek az agytörzsben. (A-D) Feniletanolamin-N-metiltransferáz (PNMT, piros, B), orexin A (zöld, C) és szinaptofizin (kék, D) tripla fluoreszcens jelölés a C1 adrenalin sejtcsoport területén. Az egyetlen optikai rétegből álló nagy

nagyítású képen jól látszódnak a szinaptofizin-tartalmú szoros összefekvések a varikózus orexin A-tartalmú rost és a PNMT-festett sejt és principális dendrit között. (A) B, C és D egyesített képe. A nyilak a szinaptofizin-tartalmú szoros összefekvésekre mutatnak. (E) Tirozin-hidroxiláz (piros) és orexin A (zöld) kettős festés az A1 noradrenalin sejtsoport területéről. Az egyetlen optikai rétegből álló nagy nagyítású képen jól látszódik, hogy az orexin A-tartalmú varikózus rostok juxtapozícióban vannak a TH-tartalmú sejtekkel és dendritekkel (nyilak). Lépték: A:15 μm , E: 20 μm . Forrás: Puskas és mtsai 2010. Peptides 31: 1589-1597.

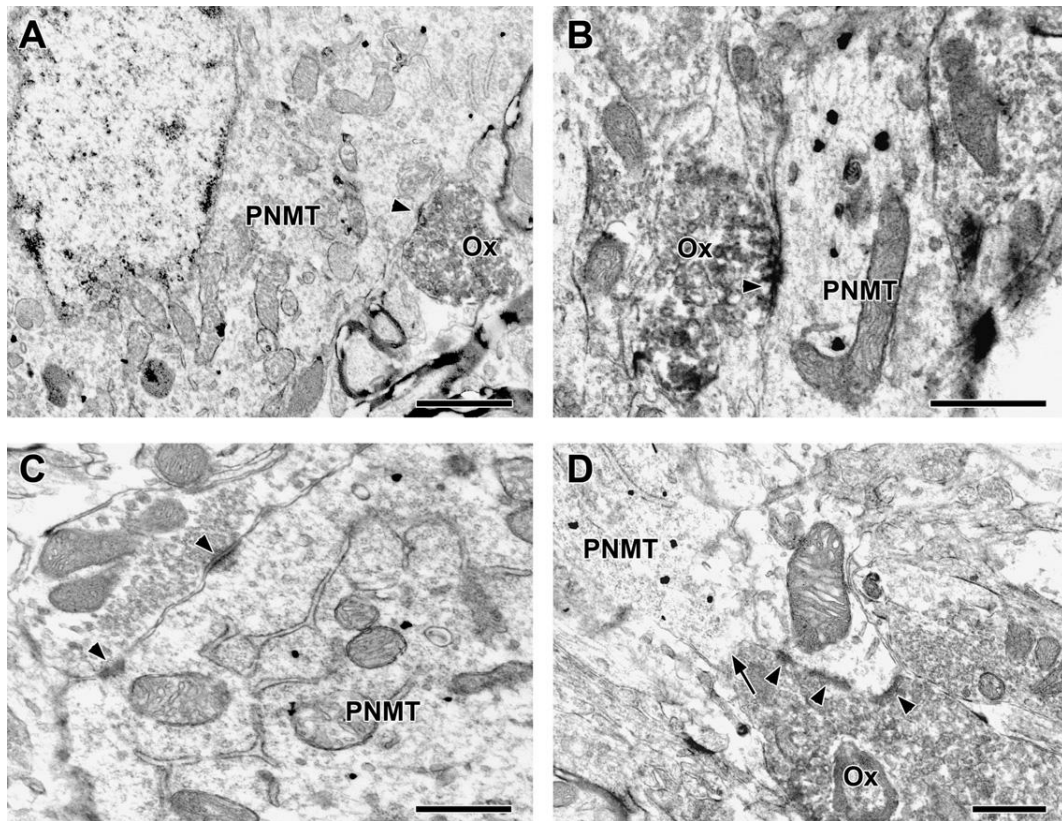
készítettünk a C1, C2, C3 sejtsoportok területéről. A képeken meghatároztuk, hogy az egy adrenalin-tartalmú neuronra eső szoros összefekvések hány százaléka tartalmaz szinaptofizint. Hasonlóan, az A1 és A2 noradrenalin sejtsoport esetében is analizáltuk a konfokális felvételeket.

Ezek alapján megállapítottuk, hogy az orexin+PNMT szoros összefekvések 69,2%-a, az orexin+TH szoros összefekvések 70,6%-a tartalmazott szinaptofizint.

4.3.4. Orexin-PNMT és orexin-TH szinaptikus kapcsolatok demonstrációja

4.3.4.1. Orexin-PNMT szinaptikus kapcsolatok a C1 és C2 sejtsoportok területén

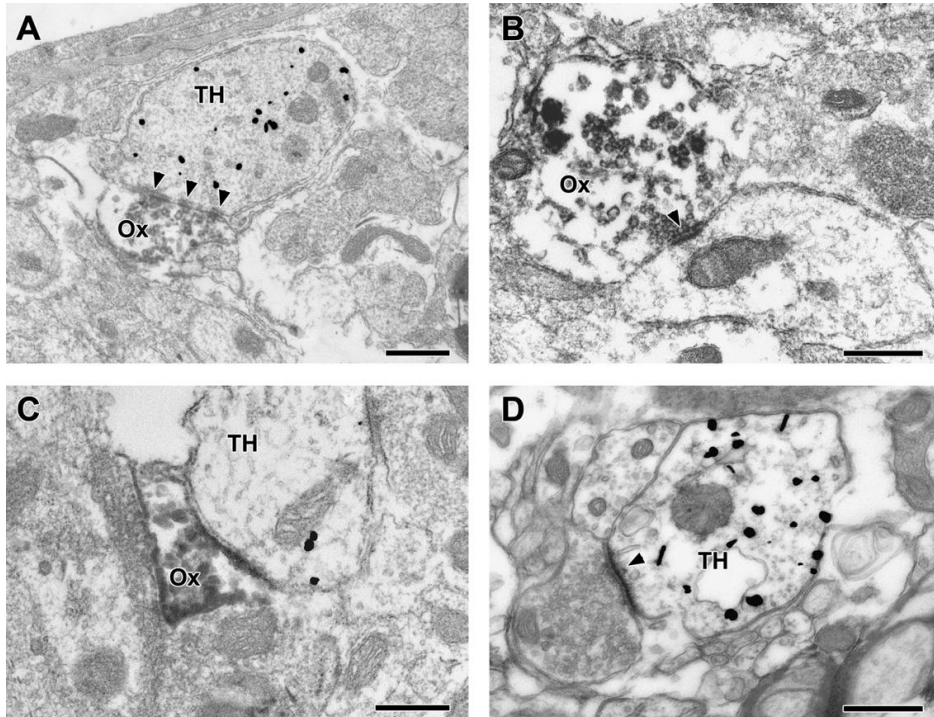
A kettősfestett anyagok elektronmikroszkópos vizsgálata során demonstráltuk a C1 adrenalin sejtsoport területén orexin A-tartalmú axonterminális és PNMT-pozitív perikarion (21. ábra A) és dendrit (21. ábra B) közti szinaptikus kapcsolatot. Az orexin-tartalmú axonok közül néhány szinaptikus kapcsolatot nem létesítve, csak szoros kapcsolatban állt a PNMT-jelzett dendritekkel (21. ábra D). Néhány orexin-immunreaktív terminális nem jelzett dendritekkel létesített szinaptikus kapcsolatot (21. ábra D). PNMT-tartalmú neuronokon nagy számban találtunk orexin-negatív axonterminálist (21. ábra C). Hasonló eredményekre jutottunk a C2 sejtsoporttal is (nem mutatjuk).



21. ábra. Orexin A-tartalmú axonterminálisok a C1 és C2 adrenalin sejtcsoport területén. (A) Orexin A-immunreaktív buton (Ox) axo-szomatikus szinapszist (nyílfej) képez egy feniletanolamin-N-metiltranszferáz (PNMT)-tartalmú sejtrel a C1 adrenalin sejtcsoport területén. (B) Orexin A-immunreaktív buton (Ox) axo-szomatikus szinapszist (nyílfej) képez egy PNMT-tartalmú dendrittel a C1 adrenalin sejtcsoport területén. (C) Aszimmetrikus axo-dendritikus szinapszis (nyílfejek) egy nem jelölt terminális és egy PNMT-tartalmú sejt között a C1 adrenalin sejtcsoport területén. (D) Aszimmetrikus axo-dendritikus szinapszis (nyílfejek) egy orexin A-tartalmú buton (Ox) és egy nem jelölt dendrit között a C2 adrenalin sejtcsoport területén. Jól látható a szinapszist nem létesítő orexin A-jelzett buton közvetlenül a PNMT-tartalmú sejt mellett (nyíl). Lépték: A: 1 μ m, B-D: 500 nm. Forrás: Puskas és mtsai 2010. Peptides 31: 1589-1597.

4.3.4.2. Orexin-TH szinaptikus kapcsolatok az A1, A2 és A6 sejtcsoportok területén

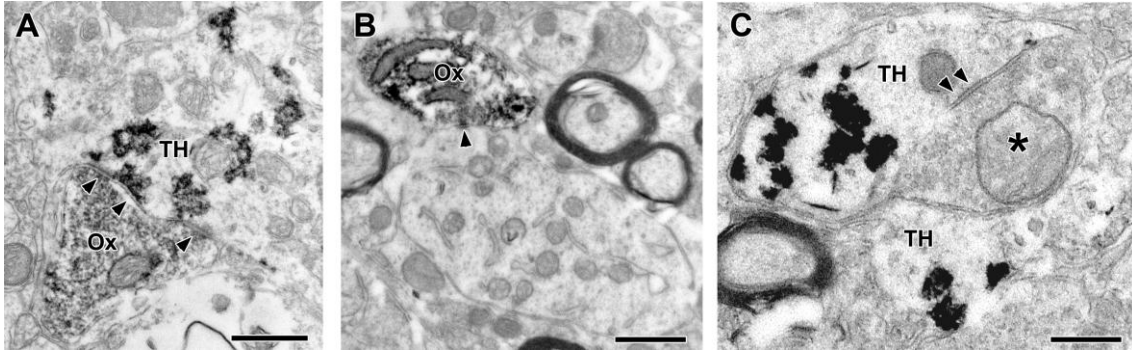
Az orexin A-tartalmú axonterminálisok aszimmetrikus axo-dendritikus szinapszisokat képeznek noradrenalin sejtek TH-festett dendritjein a vizsgált sejtcsoportokban, ahogy az A2, illetve az A6 sejtcsoport területéről készített reprezentatív képen is látható (22. ábra A és 23. ábra A). Ugyanígy számos szinapszist találtunk orexin A-festett axonterminálisok és nem jelölt dendritek között (22. ábra B és 23. ábra B). Orexin-immunreaktív rostok számos esetben voltak közvetlenül a TH-tartalmú dendritek mellett, de köztük szinaptikus kapcsolat nem volt detektálható (22. ábra C).



22. ábra. Orexin A-tartalmú axonterminálisok a nucleus tractus solitarii területén. (A) Orexin A-immunreaktív buton (Ox) axo-dendritikus szinapszist (nyílfejek) képez egy noradrenalin-tartalmú, tirozin-hidroxilázzal (TH) jelzett dendrittel. (B) Orexin A-immunreaktív buton (Ox) axo-dendritikus szinapszist (nyílfejek) képez egy jelöletlen dendrittel. (C) Jól látható a szinapszist nem létesítő orexin A-jelzett buton közvetlenül a TH-tartalmú dendrit mellett. (D) Aszimmetrikus axo-dendritikus szinapszis (nyílfej) egy nem jelölt buton és egy TH-tartalmú dendrit között. Lépték: A, C és D: 500 nm, B: 250 nm. Forrás: Puskas és mtsai 2010. Peptides 31: 1589-1597.

A TH-tartalmú neuronokon végződő szinapszisok legtöbbje nem tartalmazott orexin A-t (22. ábra D és 23. ábra C).

A talált szinapszisok aszimmetrikusak voltak, ami arra utal, hogy ezen kapcsolatok serkentőek. A preszinaptikus butonok sok kicsi, üres vezikulát tartalmaznak a nagyobb ún. “denz core” vezikulák mellett. Vizsgálataink alapján elmondható, hogy a medulla adrenalin és noradrenalin sejtcsoportjaihoz projíciáló orexin-tartalmú axonok egy része szinaptizálás nélkül megy keresztül ezeken a magokon. Az itt található orexin-immunreaktív varikozitásokat nem jelölt axonok és glianyúlványok kötegei veszik körül. Nem tapasztaltuk, hogy a varikozitások szinapszisokat alkottak volna.



23. ábra. Orexin A-tartalmú axonterminális a locus coeruleus területén. (A) Orexin A-immunreaktív buton (Ox) axo-dendritikus szinapszist (nyílfejek) képez egy tirozin-hidroxiláz (TH)-tartalmú dendrittel. (B) Orexin A-immunreaktív buton (Ox) axo-dendritikus szinapszist (nyílfej) képez egy nem jelzett dendrittel. (C) Axo-dendritikus szinapszis (nyílfejek) egy nem jelölt buton (*) és egy TH-tartalmú dendrit között. A nem jelzett axon (*) közvetlenül egy másik TH-tartalmú dendrit mellett található, kettőjük közt szinaptikus kapcsolat nem látható. Lépték: A és C: 500 nm, B: 1 μ m. Forrás: saját, publikálatlan eredmény.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Az orexin-tartalmú sejtek funkcionális heterogenitása

5.1.1. A DLH területeinek és szubdivízióinak topográfiája

A DLH felosztható három területre (Murphy és mtsai 2003, Harris és mtsai 2005), azon belül mi további nyolc részt különítettünk el (1. ábra).

5.1.1.1. Area hypothalamica dorsomedialis

Ez a terület három szubrégiót foglal magába:

Az általunk elkülönített *area periventricularis* körülbelül 200-300 µm széles a harmadik agykamra hátsó része mentén és még a harmadik agykamra fölött is áthúzódik (1. ábra D-F). Ennek a területnek „önálló” létezése, kiterjedése és hovatartozása régóta vita tárgya. A dorsomedialis hypothalamushoz való tartozása viszont nem vitatott, ebben szerepet játszik az orexin (és az MCH) neuronok jelenléte és topográfiai kontinuitása a DLH többi areájával. A kamra melletti része Paxinos és Watson atlaszában nucleus periventricularisként (Pe) szerepel és a bregma szintjétől caudalisan 2,24 és 3,48 mm közt található. Swanson ugyanezt a területet „intermediate hypothalamic periventricular nucleus”-nak nevezi és PVi-ként jelöli (Swanson 1987, Swanson 2004). Ugyanezen terület caudalis (2,92 és 3,48 mm közt) részét Paxinos és Watson „dorsal part of the posterior hypothalamic area” (PHD) névvel illeti (Paxinos és Watson 2007). Ez a terület viszonylag alacsony sejtdenzitással bír (Palkovits 1975), a sejtek rétegesen helyezkednek el a DMN és a harmadik agykamra között.

A DMN három részből áll: dorsalis, compacta és ventralis. A dorsalis divízió medialis és dorsolateralis része a sejtdenzitásuk alapján elkülöníthető egymástól (Palkovits 1975). Csak ez utóbbi tartozik a dorsolateralis hypothalamicus areához. Szemben a dorsomedialis mag többi részével, itt kevesebb, lazán elhelyezkedő (jelentős mértékben orexin-tartalmú) sejt található. Ez a terület (amit Paxinos és Watson (2007) DMD-nek jelöl) 2,28 és 3,48 mm között található a bregma szintjétől caudalisan (1. ábra D-F). Dorsolateralis irányból a DMH határolja.

A *DMH*, amit „dorsal hypothalamic area”-nak is neveznek (DHA-nak jelöli Bernardis és Bellinger (1993), Paxinos és Watson (2007) pedig DA-nak), többféle sejtből álló, alacsony sejtdenzitású terület, mely mintegy áthidalja a kétoldali DLH-t a harmadik agykamra felett. Dorsalisan a zona incerta, ventromedialis irányból a DMN, ventrolateralisan a PeF és lateralis irányból pedig az LH határolja (Bernardis és Bellinger 1993). Paxinos és Watson atlaszában (2007) 2,48 és 3,24 mm közt található, caudalisabban a nagyobb sejtdenzitású nucleus hypothalamicus posterior veszi át a helyét. Orexin sejtek csak elszórtan találhatóak itt.

5.1.1.2. *Area perifornicalis*

Eredetileg ezt a területet nucleus perifornicalis néven írták le (Gurdjian 1927, Christ 1969, Bleier és mtsai 1979). Számos sejttípus nagy denzitásban megtalálható a fornix fölött és a fornix körül egy kis területen a bregma szintjétől caudalisan 2,64 és 3,60 mm között (Paxinos és Watson 2007). Az area perifornicalis nagyobb, mint a nucleus perifornicalis, a mag határán minden irányba túlnyúlik, és magában foglalja a fornixtól dorsomedialisan és dorsolateralisan elhelyezkedő alacsonyabb sejtdenzitású területeket is. A nucleus perifornicalis (PFn-nek jelölte Palkovits (1975), PFX-nek Geeraedts és mtsai (1990) és PeF-nek Paxinos és Watson (2007)) az area perifornicalisnak (Paxinos és Watson PeFLH-nak jelöli (2007)) csak egy részét foglalja magában. A „nucleus” és az „area” egyértelműen elkülöníthető a sejtdenzitás és a sejttípus alapján (Palkovits 1975). Az area perifornicalis a bregma szintjétől caudalisan 2,16 mm-től 3,48 mm-ig tart (Paxinos és Watson 2007) és dorsalisan beleolvad a zona incerta medialis részébe. Medialisan egy viszonylag sejtzegény terület választja el a DMN-től és a DMH-től, akárcsak lateralisán az LH-től (Palkovits 1975). A perifornicalis arean belül Geeraedts és mtsai elkülönítettek egy rostralis és egy caudalis részt (Geeraedts és mtsai 1990).

A *perifornicalis area rostralis részén (PeFr)* (2,2 és 2,8 mm között található a bregma szintjétől caudalisan, 1. ábra G) viszonylag nagy sejtek találhatóak és magas a sejtdenzitás (Palkovits 1975). Ez a terület nemcsak dorsalis irányba, hanem némileg a fornixtól medialisan is kinyúlik (Paxinos és Watson 2007).

A nucleus és az area perifornicalis caudalis része (2,8 és 3,4 mm között található a bregma szintjétől caudalisan) nagyobb és hosszabb, mint a rostralis rész. Dorsalisan felnyúlik szinte a tractus mamillothalamicusig. Mi ezt a területet egy *medialis (PeFcm)*

és egy *lateralis (PeFcl)* részre osztottuk a fornixot kettészelő függőleges egyenes által (1. ábra H és I). A PeFcm területén a sejtdenzitás magasabb, mint a PeFcl területén, emellett pedig a PeFcm szubdivízióban több heterogén sejtpopuláció is megtalálható (Palkovits 1975). Pályajelölési vizsgálataink a szétválasztást igazolták (3. táblázat).

5.1.1.3. Lateralis hypothalamus

Ezen elnevezés alatt a hypothalamus teljes hosszában megtalálható lateralis area csak egy részét értjük, ami a bregma szintjétől caudalisan 2,2 és 3,4 mm között található. Paxinos és Watson ezt a területet a lateralis hypothalamus peduncularis részének (PLH) nevezi (Paxinos és Watson 2007). Oldalt az area subthalamica területéig nyúlik ki, ahol a pedunculus cerebri/capsula interna és a tractus opticus határolja. Dorsomedialisan a PeF, míg ventromedialisan a nucleus ventromedialis határolja. Dorsalisan a zona incerta és a Forel mező fedi ezt a területet (Paxinos és Watson 2007). Az LH egy magas sejtdenzitású ventralis és egy alacsonyabb sejtdenzitású dorsalis szubdivízióra osztható (Geeraedts és mtsai 1990, Bernardis és Bellinger 1993, Swanson 2004, Paxinos és Watson 2007). Mindezek ismerete ellenére is a két terület közti határvonal nem igazán egyértelmű. Két verzió is megtalálható az irodalomban/atlaszokban ennek meghatározására: 1) a fornix és a pedunculus cerebri medialis határának középpontját összekötő enyhén ferde, felfelé tartó vonal elválaszt egy ventralis (LHv) és egy dorsalis (LHd) szubdivíziót (Bernardis és Bellinger 1993, Paxinos és Watson 2007); 2) egy vízszintes lateralis irányú vonal, ami a fornix felől indul a pedunculus cerebri felé (Geeraedts és mtsai 1990). Mi az előbbi felosztást használtuk.

5.1.2. Az „orexinerg mező” felosztása

A DLH orexin neuronokat tartalmazó részét számos módon osztották már fel (26. ábra). A legtöbb szerző két-, három-, vagy négyfelé osztotta fel (26. ábra A, C, E) (Fadel és mtsai 2002, Murphy és mtsai 2003, Baldo és mtsai 2004, Nixon és Smale 2004, Harris és mtsai 2005, Sunanaga és mtsai 2009, Zhang és mtsai 2009), mások sokkal pontosabb felosztást használtak, ezáltal több apró régiót különítettek el a DLH-n belül (Swanson és mtsai 2005, Hahn 2010). Swanson és mtsai, valamint Hahn 13 különböző területet különített el az LH területén belül (26. ábra G) (Swanson és mtsai 2005, Hahn 2010),

ezek nagy része az orexin sejteknek kevesebb, mint 3%-át tartalmazta és hat régió lefedte az orexin-tartalmú neuronok 90%-át (Hahn 2010). Bár a felosztás ezekben a munkákban nagyon precíz, az alacsony sejtszám miatt kvantitatív kiértékelésre kevésbé használható. A hat terület, amely nagy számú orexin-festett sejtet tartalmazott, a következő volt: az LH juxtadorsomedialis (az orexin-tartalmú neuronok 15,64%-át tartalmazta), supraforncialis (21,83%), dorsalis (28,55%) régiója, az LH medialis zónájának ventralis régiója (9,50%), valamint a dorsomedialis (9,77%) és a posterior hypothalamus (7,10%). Ezek a régiók nem egyeznek meg teljes mértékben az általunk használt szubdivíziókkal. Mi három DLH régiót (dorsomedialis, periventricularis és LH) és azon belül öt szubdivíziót határoltunk körül, egyrészt a DLH anatómiáját (ld. részletesen az 5.1.1. fejezetben), másrészt az orexin-tartalmú sejtek eloszlását figyelembe véve (3. ábra; 26. ábra I). Ez az öt terület 99%-ban lefedi az orexin-tartalmú neuronális mezőt, és mindegyik szubdivízió statisztikai szempontból nagyszámú orexin sejtet tartalmaz. A különbségek Swanson és mtsai (2005) és Hahn (2010) felosztásával szemben a következők: (1) mi elkülönítettünk egy orexin-tartalmú sejtcsoportot a harmadik agykamra körül (PeVe); (2) a mi felosztásunkban a DMNd tartalmazza a Swanson-féle felosztásból a dorsomedialis hypothalamus lateralis részét, az LH juxtadorsomedialis régiója elülső részének medialis részét és a posterior hypothalamus medialis részét; (3) az általunk használt PeF régió a következő Swanson által meghatározott területeket fedi le: a rostralis LH juxtadorsomedialis régiója elülső részének lateralis része, a caudalis LH juxtadorsomedialis régiója, az LH supraforncialis régiója, és a posterior hypothalamus perifornicális része; (4) az LHd megfelel az LH dorsalis régiójának, valamint az LH medialis zónája ventralis régiójának dorsalis részének, míg az LHv azok ventralis részének. Összességében elmondható, hogy a mi felosztásunk több információt tartalmaz, mint a kettő vagy három részre osztott DLH és mivel nincsenek apró, csak néhány sejtet tartalmazó szubdivíziók, statisztikai kiértékelésekhez is jól használható. Ami nagyon lényegesnek bizonyult: felosztásunk a pályajelölési eredményekkel jól egyezik, az egyes szubdivíziókban lévő sejtek projekciói speciális, individuális eloszlást mutatnak.

5.1.3. Az orexin-tartalmú neuronok aktivációja

Az idegsejtek az ingerekre indukálható transzkripciós faktorok, pl. *c-fos*, azonnali expressziójával válaszolnak, ugyanakkor az alap *c-fos* expresszió viszonylag alacsony (Herdegen és Leah 1998). Ezért a neurális aktivitás érzékeny indikátorának tekintik a *c-fos* gén termékének, a Fos fehérjének a megjelenését, annak immunhisztokémiai kimutatása pedig széles körben elfogadott módszer az idegsejtek aktivációjának demonstrációjára (Morgan és Curran 1991, Hughes és Dragunow 1995). A Fos technika alkalmazásának is megvannak a limitációi, mivel a Fos fehérje az idegsejtet ért inger követően 30-60 perccel jelenik meg, és egy egyszeri akut stimulust követően rövid ideig, 2–2,5 órán át detektálható. Permanens hatás esetén a *c-fos* expresszió napokig is fennállhat (Miyata és mtsai 2001).

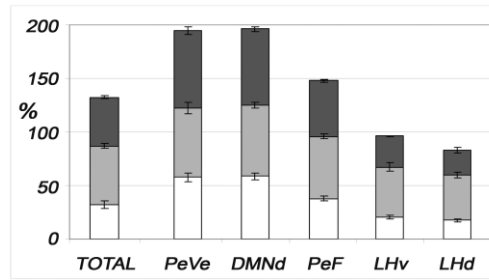
Munkám során az orexin-tartalmú neuronok Fos aktivációját vizsgáltam három különböző funkcionális modellben: éheztetés, alvás-megvonás és formalin-indukálta akut fájdalom stressz. Tekintettel arra, hogy ezek egymástól nagyon eltérő modellek, a Fos fehérje detektálására az irodalmi adatok és az előkísérleteinkben szerzett tapasztalatok figyelembe vételével eltérő időpontokat alkalmaztam, melyek hatásuk alapján leginkább optimálisnak és egyben összehasonlíthatónak bizonyultak. Éheztetéses modellekben Fos-immunfestésre 48 óra volt az elfogadott (Renner és mtsai 2010), míg alvás-megvonás esetén ez az idő 2 és 72 óra között változott attól függően, hogy milyen technikát alkalmaztak (Carter és mtsai 2009, Kitka és mtsai 2011). Az általunk is használt “flower pot” (virágcserep) módszer esetén általában 72 órás depriváció az elfogadott (Kitka és mtsai 2011). Akut fájdalom stressz modellek esetében a Fos aktivációt 60-120 perccel a fájdalmas stimulus után vizsgálták (Nagao és mtsai 1993, Palkovits 2008).

A vizsgált területeken összesen $1332,3 \pm 22,6$ ($n = 40$) orexin-pozitív neuront számoltam. Az irodalomban fellelhető néhány adat szerint az orexin sejtek száma bizonyos hatásokra változik. Ilyen például a 96 órás REM alvás-megvonás (Galvao és mtsai 2009), vagy pedig 24, 36, 48, 60 és 72 órás éheztetés (Park és mtsai 2004). Nem tapasztaltunk az orexin-tartalmú neuronok számában szignifikáns eltéréseket sem az egyes vizsgálati modellek között, sem a kontrollokhöz képest. Ezért 100%-nak tekintettük az egyes csoportokban az orexin-tartalmú sejtek számát, a Fos aktiváció százaléka ennek arányában lett feltüntetve.

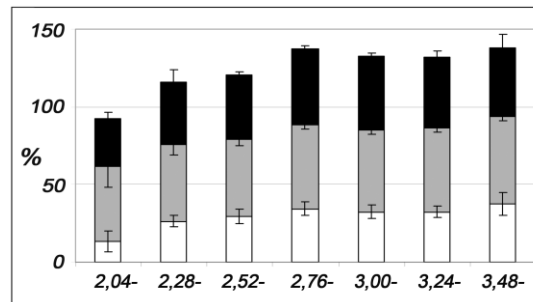
5.1.4. Nincsenek funkció-specifikus orexin-tartalmú sejtcsoportok

A célkitűzések egyike volt igazolni vagy eldönteni, hogy vannak-e a dorsolaterális hypothalamusban topográfiailag jól körülírt speciális orexin sejtcsoportok vagy akár szubdivíziók. Az általunk használt modellekből nyert adatok alapján válaszunk negatív, ilyenek elkülönítése nem volt lehetséges. A különböző funkcionális modellekben a Fos-tartalmú orexin-festett neuronok eloszlása a DLH-ban részleges átfedést mutatott. Nem volt adott funkcióra specifikus terület, ugyanakkor a Fos-aktiváció mértékében voltak eltérések, de a különböző számban aktiválódott orexin-tartalmú sejtek a három vizsgált modellben és a szubdivíziókban is random eloszlást mutattak (8. és 9. ábra). Mindhárom modellben a teljes DLH-ra vonatkoztatva hasonló rostrocaudalis eloszlást mutattak az aktiválódott orexin-tartalmú neuronok (10. ábra A, 11. ábra A): a bregma szintjétől caudalisan 2,76 és 3,00 mm közt volt a legtöbb kettős festett sejt, populációs görbájuk Gauss-eloszlást mutatott. Hasonló eredményre vezetett az adatok különböző vizsgálata is (lásd 10., 11. és 12. ábra). A DLH szubdivízióinak rostrocaudalis felosztásának elemzése rámutatott arra, hogy bár funkció-specifikus területek nincsenek, a Fos-aktivációs válaszok mintázata függ az alkalmazott kísérleti modelltől és a vizsgált szubdivíziótól (10., 11. és 12. ábra, 2. táblázat). Éheztetés hatására a PeF orexin sejtek közül a rostralis, a PeVe orexin sejtek közül a caudalisan elhelyezkedők aktiválódtak nagyobb mértékben (10. ábra B, D, 11. ábra B, D és 12. ábra A, A'). Alvás-megvonás eredményeképpen több aktiválódott orexin-tartalmú sejt volt a DMNd rostralis részében és az LHd caudalis részében (10. ábra C, E, 11. ábra C, E és 12. ábra B, B'). Formalin-indukálta fájdalom stressz során a DMNd caudalis részében volt szignifikánsan több aktiválódott sejt (10. ábra C, 11. ábra C és 12. ábra C és C').

Alvás-megvonás viszonylag magas Fos aktivációt idézett elő (54,65%), ami 33,86%-kal magasabb, mint a HC kontroll csoport esetében. Akut formalin stressz hatására némileg alacsonyabb volt az aktiváció mértéke (45,68%), a kontroll csoporthoz képest ez az aktiválódás viszonylag magas volt (28,76%). Éheztetés eredményeképpen az orexin-tartalmú neuronok 32,15%-a volt Fos-pozitív, míg a nem-éheztetett kontroll csoportban csak 6,19%. A három kísérleti csoportban az orexin/Fos kettős festett sejtek összesített százaléka 132,48% (24. ábra). Ez arra enged következtetni, hogy egyetlen orexin-tartalmú neuron akár két vagy három különböző funkcióban is részt vehet.



24. ábra. A három különböző kísérleti modellben (éheztetés - fehér oszlop, alvás-megvonás - szürke oszlop, formalin-injekció - fekete oszlop) tapasztalt aktivációk együttes ábrázolása. 100% = az adott szubdivízió (az első oszlop esetén a DLH) összes orexin-tartalmú sejtje. Rövidítések: DMNd: nucleus dorsomedialis dorsalis része, LHd: lateralis hypothalamus dorsalis része, LHv: lateralis hypothalamus ventralis része, PeF: area perifornicalis, PeVe: area periventricularis. n = 5-7. Forrás: saját, közlésre benyújtott cikk ábrája.



25. ábra. A hét rostrocaudalis sík mentén a három különböző kísérleti modellben (éheztetés - fehér oszlop, alvás-megvonás - szürke oszlop, formalin-injekció - fekete oszlop) tapasztalt aktivációk együttes ábrázolása. 100% = az adott rostrocaudalis sík összes orexin-tartalmú sejtje. n = 5-7. Forrás: saját, közlésre benyújtott cikk ábrája.

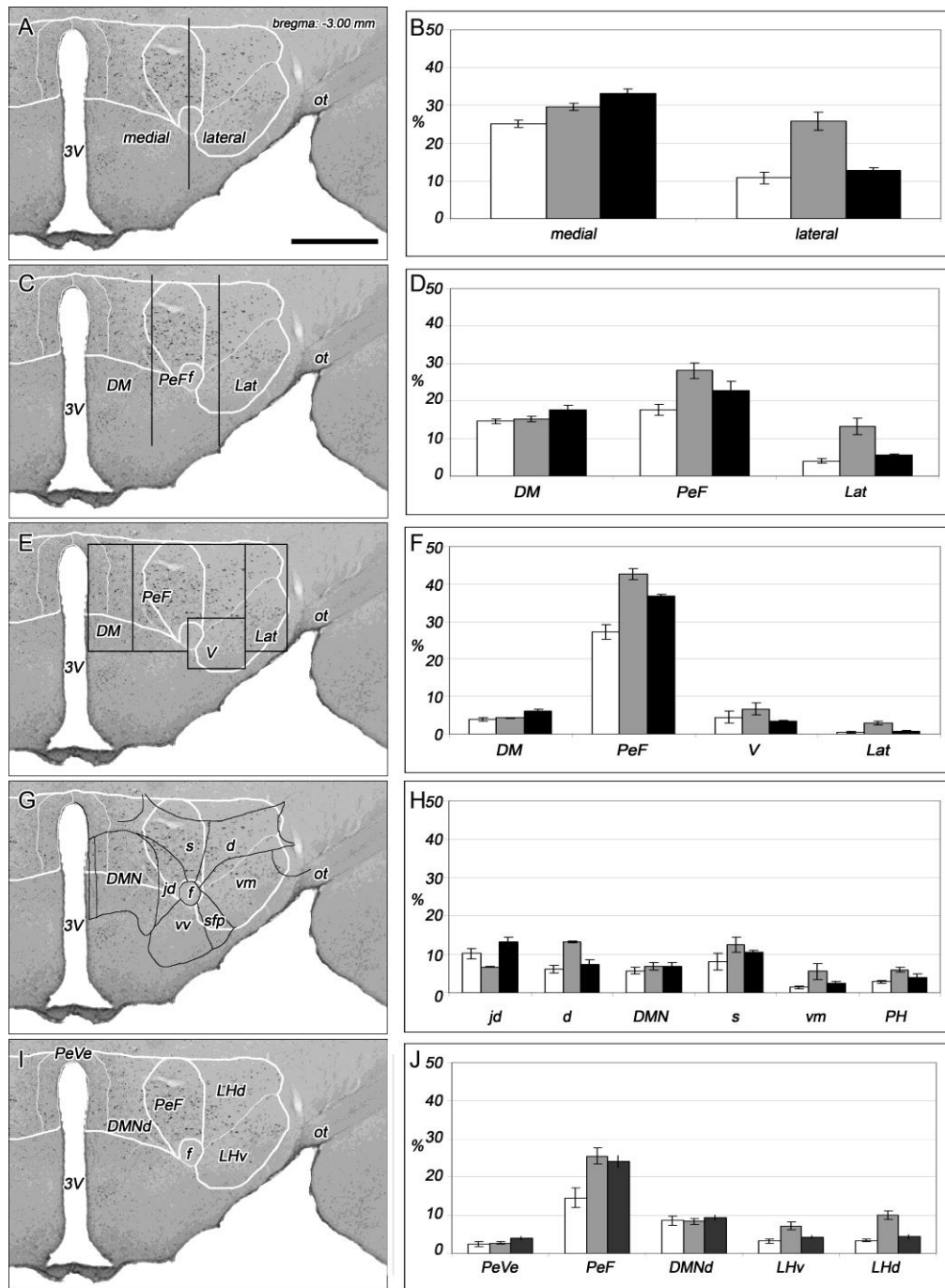
A szubdivíziókat tekintve a PeVe és a DMNd területén lévő orexin-tartalmú neuronok mutatták a legnagyobb aktivitást az alkalmazott kísérleti modellekben. Mindkét terület orexin-pozitív sejtjeinek teljes (a három modellben együttes) aktivációja külön-külön közel 200% (24. ábra). A PeF orexin-tartalmú neuronjai esetében az összesített aktiváció 147,9%. A két lateralis szubdivízió esetében tapasztaltunk alacsonyabb aktivációt: az LHv összesített aktivációja 96,2%, az LHd-jé pedig 82,8%. Ez arra enged következtetni, hogy a PeVe, PeF és DMNd területén több orexin-tartalmú neuron mutat funkcionális heterogenitást, mint az LHv és LHd területén lévők.

Megvizsgálva az egyes rostrocaudalis síkok orexin-tartalmú neuronjainak összesített aktiválódását a három modellben (25. ábra) láthatjuk, hogy az aktiválódás mértékében itt kisebb eltérések voltak, mint a szubdivíziók esetén. A legrostralisabb területeket

kivéve, ahol 90% körüli az aktiváció mértéke, mindegyik vizsgált rostrocaudalis síkban az orexin-pozitív sejtek teljes aktivációja meghaladta a 100%-ot.

Az orexin-tartalmú neuronok funkcionális heterogenitását számos korábbi tanulmány eredménye is alátámasztja. Furlong és mtsai (2009) az orexin sejtek Fos aktivációját vizsgálták különböző stressz stimulusok után. Különböző hatásokra a kettős festett sejtek eloszlási mintázata eltért egymástól, a legmagasabb aktivációt a medialis területeken találták (Furlong és mtsai 2009). A PeF és a DMN orexin-tartalmú sejtjeinek Fos-aktivációja napszaki ritmust mutatott, míg az LH orexin sejtjei esetében ezt nem tapasztalták (Estabrooke és mtsai 2001). Harris és mtsai eredményei azt sugallják, hogy az LH orexin-tartalmú neuronjai a jutalmazással (pl. étel, drog) állnak kapcsolatban, míg a DLH medialis része vesz részt a stressz-vezérelte viselkedésben (Harris és mtsai 2005). Ezzel ellentétben, a nucleus accumbensbe injektált mu-opioid receptor agonista, D-Ala2-N-Me-Phe4-gly5-ol-enkefalin, a perifornicalisan elhelyezkedő orexin-tartalmú neuronokban idézett elő Fos-aktivációt (Zheng és mtsai 2010). Számos irodalmi adat áll rendelkezésre azzal kapcsolatban, hogy az orexin-tartalmú sejtek aktiválódnak éheztetés, étel-megvonás, hipoglikémia vagy glükopriváció eredményeképpen, de az aktiválódott sejtek nem mutattak speciális lokalizációt, a DLH mind lateralis, mind medialis részén megtalálhatóak voltak (Moriguchi és mtsai 1999, Cai és mtsai 2001, Kurose és mtsai 2002, Diano és mtsai 2003).

A mi eredményeink is azt sugallják, hogy nincsenek olyan specifikus orexin-tartalmú sejtcsoportok, amelyek egyetlen funkcióért lennének felelősek. A kontroll csoporthoz hasonlítva, az éheztetés és a subcutan formalin injekció hasonló Fos-aktivációt eredményezett a PeF, a DMNd és a PeVe orexin-tartalmú neuronjaiban, míg a 72 órás alvás-megvonás mindegyik orexinerg szubrégióban szignifikáns Fos-aktivációt idézett elő (8. ábra). Ez alapján az LHv és LHd azok a területek, amelyek némiképp specifikusnak tűnhetnek egy adott funkcióra, hiszen az ott lévő orexin-tartalmú sejtek sorrendben 46,9% és 42,4%-a volt kettős festett alvás-megvonás után (9. ábra B). Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a másik két kísérleti modell során is találtunk itt aktivációt: akut fájdalom stressz hatására az LHv orexin-tartalmú sejtjeinek 28,9%-a, az LHd orexin-tartalmú sejtjeinek 22,9%-a volt Fos-pozitív; éheztetéskor pedig 20,6% és 17,5% volt ez az arány (9. ábra A, C). Mivel a DLH számos szubrégiót tartalmaz és ezek határvonalai némiképp eltérnek egyes agyatlaszokban és különböző



26. ábra. Fos/orexin kettős festett sejtek százalékos aránya a dorsolateralis hypothalamus (DLH) összes orexin-tartalmú sejtjéhez képest a három kísérleti modellben a DLH különböző felosztásai után. (A) A fornix közepén húzott fekete vonal a DLH-t egy medialis és egy laterális részre osztja (Baldo és mtsai 2004, Sunanaga és mtsai 2009, Zhang és mtsai 2009). (C) Két vonallal háromfelé oszthatjuk a DLH-t, egy dorsomedialis, egy perifornicális és egy laterális részre (Murphy és mtsai 2003, Harris és mtsai 2005). (E) Négyfelé osztva a DLH orexinerg területét dorsomedialis, perifornicális, ventralis és laterális területeket kapunk (Satoh és mtsai 2003). (G) Swanson szerinti körülhatárolás (Swanson 2004). (I) Öt szubdivízió,

ahogy a disszertációban használtuk. A DLH régióinak általunk használt körülhatárolását az A, C, E, G képeken fehér vonal jelzi. (B, D, F, H, J) Orexin/Fos kettős festett neuronok az összes orexin-tartalmú sejt százalékos arányában éheztesítés (fehér oszlop), alvás-megvonás (szürke oszlop), és formalin-injekció (fekete oszlop) után. (A Swanson-féle felosztás (H) esetében a legtöbb orexin sejtet tartalmazó hat területet ábrázoltam.) Rövidítések: d: lateralis hypothalamus dorsalis régiója, DM: a DLH dorsomedialis része, DMN: nucleus dorsomedialis, DMNd: nucleus dorsomedialis dorsalis része, f: fornix, Lat: DLH lateralis része, LHd: lateralis hypothalamus (LH) dorsalis része, jd: LH juxtadorsomedialis része, LHv: LH ventralis része, ot: tractus opticus, PeF: area perifornicalis, PeVe: area periventricularis, PH: posterior hypothalamus, s: LH supraformalis része, V: LH ventralis része, vm: LH medialis-ventralis része, 3V: harmadik agykamra. Lépték: 1 mm. n = 3-7. Forrás: saját, közlésre benyújtott cikk ábrája.

tanulmányokban, felmerült a kérdés, hogy az általunk használt határvonalakat átrajzolva eltérő eredményre jutunk-e. Újrászámoltam az orexin és az orexin/Fos sejteket a DLH-t a 26. ábrán bemutatott módokon felosztva. Hasonlóan a mi eredményeikhez, az új felosztások sem vezettek funkció-specifikus orexinerg sejtcsoportokhoz (26. ábra B, D, F, H, J). A DLH kettéosztása után a medialis DLH orexin-tartalmú sejtjei közel azonos mértékben aktiválódtak mindhárom kísérleti modellben, bár a formalin injekciót követően volt a legmagasabb a Fos-tartalmú orexin neuronok aránya (26. ábra A-B). A lateralis DLH esetében 2,5x annyi orexin neuron volt Fos-pozitív alvás-megvonás után, mint éheztesítést vagy formalin injekciót követően (26. ábra B). A három részre osztott DLH-ban különbséget csak a PeF és a lateralis részben találtunk, mindkét területen az alvás-megvonás eredményezte az orexin-tartalmú sejtek legnagyobb mértékű Fos-aktiválódását (26. ábra C-D). Satoh és mtsai (2003) munkája alapján négyfelé osztva a DLH-t a dorsomedialis, a ventralis és a lateralis részben nem, vagy csak kisebb különbségeket találtunk az aktiválódott orexin sejtek arányában a három kísérleti modellben, míg a perifornicalis rész orexin-tartalmú neuronjai más-más mértékben aktiválódtak alvás-megvonás (42,6%), formalin-injekció (36,7%) és éheztesítés (27,2%) után (26. ábra E-F). Swanson felosztását követve a többi kísérleti modellhez képest viszonylag magas aktivációt találtam az LH dorsalis régiójában 72 órás alvás-megvonást követően, valamint az LH juxtadorsomedialis régiójában formalin stressz után, ugyanakkor az éheztesítés egyik területen sem okozott intenzív Fos-aktivációt (26. ábra G-H).

Összefoglalva, munkám ezen része arra mutat rá, hogy 1) nincsenek funkcionálisan elkülöníthető és topográfiailag körülírható orexin-tartalmú sejtcsoportok. Mindhárom

kísérleti modellben *valamennyi* DLH szubdivízióban az alkalmazott stimulus aktivitást hozott létre az orexin-tartalmú neuronokban. Az aktivált orexin neuronok *valamennyi* szubdivízióon belül *random* eloszlást mutattak. Kvantitatív analízisünk viszont kimutatta, hogy ezen random eloszlást mutató orexin sejtek nem azonos számban/sűrűségben jelentek meg a DLH egyes szubdivízióiban. A különbségek főleg rostrocaudalisan voltak kimutathatóak, ami funkcionális topográfiai heterogenitást jelent. E megfigyelés jelentősége: I) Ezzel a ténnyel az orexin-tartalmú sejtek funkcionális szerepét bizonyítandó kísérletek értékelésénél számolni kell; II) tekintettel arra, hogy a DLH sejteinek projekciós területei nem azonosak (lásd 5.2. fejezet), a különböző szubdivíziókban különbözőképpen aktiválódott sejtek különböző agyi területekkel vannak kapcsolatban.

2) Eredményeink alapján ugyanakkor elmondható, hogy a DLH területén vannak olyan orexin-tartalmú sejtek, amelyek többféle stimulusra is képesek *c-fos* expresszióval válaszolni. Ez a megfigyelés az orexin-tartalmú neuronok multifunkcionális kapacitását látszik indirekt módon igazolni.

5.2. A DLH alsó agytörzsi kapcsolatai

5.2.1. Metodikai megfontolások

1. Annak ellenére, hogy a kontrollálható körülményeket (úgy mint a kapilláris csúcsának átmérője, az áramerősség nagysága, az iontoforetikus beadás hossza, a beadást követően a kapilláris eltávolításáig eltelt [poszt-injekciós] idő és a hisztotechnikai eljárás) standardizáltuk, a beadási helyek méretében eltérések voltak. A fenti faktorokon túl a beadási célterületek hisztológiai struktúrája (mint például a sejtdeinitás, a rosthálózat denzitása és a kapillarizáltság mértéke) sem volt egységes, és ezek is befolyásolhatták a beadás méretét.
2. A beadási helyek méretéhez hasonlóan annak a területnek/szubdivízióknak/magnak a mérete, ahova a pályajelölő anyagot beadni szeretnénk, is kérdéseket vet fel a kiértékeléssel kapcsolatban. Általánosságban elmondható, hogy az adott területet/szubdivíziót/magot nem tudjuk pályajelölő anyaggal teljes mértékben feltölteni, főleg nem annak háromdimenziós kiterjedésében. Ennek ellenére a beadás

vagy a beadási helyről induló rostok denzitásának kiértékelésénél a különböző területeket/szubdivíziókat/magokat egymással összevethetőnek tekintjük.

3. A szubjektív kiértékelés során a rostdenzitás meghatározásához a pályajelölési munkák során és a leíró neuroanatómiában elfogadott és használt kategóriákat (mint például magas, közepes, alacsony, elszórt) használtunk. Fontosnak tartom megjegyezni, hogy ilyen kiértékelések során a csoportok összehasonlítása jobban elfogadott, mint az egyedi beadások összehasonlítása. Ezen munkák során az alapvető kritériumok közt említendőek a következők: az innervációs helyek korrekt körülhatárolása, a kísérleti paraméterek megfelelő részletezése, valamint megfelelő számú állat és metszet használata.

5.2.2. A DLH agytörzsi projekcióinak eloszlási mintázata

A BDA-tartalmú rostok heterogén topográfiai eloszlást mutattak az alsó agytörzsben a nyolc különböző DLH szubdivízióba való BDA-beadást követően. A vizsgált agytörzsi struktúrák 60%-ában mutattunk ki DLH-ből származó rostot.

Bár az eredményeink egy része a DLH agytörzsi projekciójával kapcsolatos korábban közölt eredményeket támasztja alá, a nyolc különböző hypothalamicus szubdivízió projekciójának elemzése új információkkal szolgál.

Minden esetben megfigyeltünk a beadási helytől caudalisan olyan rostokat, amelyek a középvonalat átlépték. Standard átkereszteződési hely volt a PAG a nucleus raphe dorsalis magasságában, a tegmentum pontis és a nucleus tractus solitarii területe.

Az orexin- és az MCH-expresszáló neuronok kizárólag a DLH területén találhatóak (Skofitsch és mtsai 1985, Bittencourt és mtsai 1992, Peyron és mtsai 1998, Nambu és mtsai 1999, Hahn 2010, Bittencourt 2011). Mindkét neuropeptid fontos komponense a táplálékfelvétel, az energia egyensúly és az alvás-ébrenlét ciklus szabályozásának (Bittencourt 2011, Barson és mtsai 2013, Inutsuka és Yamanaka 2013), az orexin pedig a stresszválasz szabályozásában is szereppel bír (Ida és mtsai 2000). A DLH területéről eredő orexin- és MCH-tartalmú rostok a teljes központi idegrendszerben megtalálhatóak, és többek között az agytörzsi magokat/régiókat (pl. szimpatikus premotor neuronok) is beidegzik (Skofitsch és mtsai 1985, Bittencourt és mtsai 1992, Peyron és mtsai 1998, Nambu és mtsai 1999, Bittencourt 2011). Ezen neuropeptid-

tartalmú rostok agytörzsi topográfiai eloszlását részletesen feltérképezték, és bár a rostok disztribúciós mintázatában átfedés van, különbségek is megtalálhatóak (Bittencourt és mtsai 1992, Peyron és mtsai 1998). A kettő együttes eloszlása nagyrészt átfed a BDA-jelölt rostok általunk leírt eloszlásával és bár ez az átfedés nem teljes, mégis kijelenthető, hogy a jelölt rostok egy része a DLH orexin- és/vagy MCH-tartalmú sejtjeiből ered, de az sem zárható ki, hogy ezen terület más neuropeptidet vagy neurotranszmittert tartalmazó sejtjeiből.

5.2.2.1. A DLH neuronjai az alsó agytörzs nagy részét beidegzik

Általánosságban elmondható, hogy a DLH szubdivízióiból eredő rostok alacsony denzitásban találhatóak meg az agytörzsi területeken. Ugyanakkor a 194 leírt agytörzsi mag, szubdivízió és terület (Paxinos és Watson 2007) közül 116-ban találtunk BDA-tartalmú rostot.

Az alsó agytörzsben kettő vagy három leszálló pálya (dorsalis, ventromedialis, ventrolateralis) fut (Roeling és mtsai 1994, Peyron és mtsai 1998, Goto és mtsai 2005, Hahn és Swanson 2010, Hahn és Swanson 2012). Ezen pályákat alkotó rostok egy része a DLH-ből, főleg az area perifornicalis neuronjaiból ered (Roeling és mtsai 1994). A DLH szubrégiói projekciójának elemzése során nem találtunk a BDA-tartalmú rostok által kirajzolt pályát vagy köteget, ugyanakkor a jelölt rostok 14 különböző ismert pályához csatlakoztak különböző mértékben, hosszabb-rövidebb szakaszon (3. táblázat). Az eltérés hátterében az állhat, hogy korábbi elemzések során a pályajelölő anyagot a hypothalamus nagyobb területére injektálták, így azt jóval több sejt vette fel, míg az általunk elemzett beadások viszonylag kisméretűek voltak, így jóval kevesebb sejt projekcióját vizsgáltuk egy-egy állat esetében. Ebből következően a párhuzamosan futó rostoknak csak egy kisebb hányada tartalmazott BDA-t, amelyek nem keltették egy vagy több leszálló pálya benyomását.

5.2.2.2. A különböző DLH szubrégiók részvétele az alsó agytörzs beidegzésében nem egyenlő

Huszonkét állat agytörzséből származó sorozatmetszetek elemzése alapján megállapítottuk, hogy a nyolc DLH szubdivízió projekciós mintázata *egyedi*. Kétszer annyi (90-99 db) agytörzsi terület és mag kap rostokat az area perifornicalis három

régiójából, mint az area hypothalamica dorsomedialis három szubdivíziójából (26-58 db). A lateralis hypothalamus területéről az LHv neuronjai több agytörzsi területre (83 db) projiciálnak, mint az LHD sejtjei (69 db). Mindössze 13 olyan agytörzsi mag vagy terület volt, amely a DLH mind a 8 szub régiójából kapott rostokat, és további 25 olyan terület volt, amelyet 7 különböző szubdivízió látott el rostokkal.

A legerősebb projekció a vizsgált nyolc szubdivízió közül a perifornicalisokból indult. Ugyancsak perifornicalis beadások után találtuk a legtöbb agytörzsi területen BDA-tartalmú rostokat (3. táblázat). A perifornicalis területekről származó rostok disztribúciós mintázata hasonló a korábban Hahn és Swanson (2010) által leírtakkal, mindössze kisebb eltéréseket találtam. Ezek a különbségek nem a rostok topográfiai eloszlásában jelentkeztek, hanem inkább az egyes területeken tapasztalt rostdenzitásbeli különbségekben. Ezek a különbségek származhattak az alkalmazott kiértékelési módszer, illetve a beadott pályajelölő anyag mennyiségének különbségeiből.

Közepes és alacsony denzitásban találtunk BDA-tartalmú rostokat az alsó agytörzsből a lateralis hypothalamus két területére adott beadások után. A jelölt rostok eloszlása némiképp eltért, de a rostdenzitások nagyrészt hasonlóak voltak. A három dorsomedialis szubdivízióba való beadást követően a jelölt rostok denzitásában nagy eltéréseket találtam, legnagyobb denzitást a PeVe sejtjeiből induló rostok esetében tapasztaltam.

5.2.2.3. Kevés vagy néhány DLH szubdivízió erőteljesen innervál néhány agytörzsi területet

Összesen 116 agytörzsi magban/szubdivízióban/területen találtunk BDA-tartalmú rostokat. Ezek közül mindössze négyben volt a rostok denzitása magas (3. táblázat). A PAG ventralis és ventrolateralis részében nagy denzitásban voltak jelölt rostok több DLH szubdivízióba való beadást követően is (PeVe, PeFr, PeFcm és PeFcl). A Barrington mag területén magas rostdenzitást találtunk PeVe, míg az alvás-ébrenlét szabályozásában fontos szereppel bíró nucleus tegmentalis pedunculopontinus területén LHv beadást követően.

A PAG ventralis és ventrolateralis részével kapcsolatos megfigyeléseinket, miszerint bennük sűrű DLH-eredetű rosthálózat található, számos korábbi adat is megerősítette (Goto és mtsai 2005, Hahn és Swanson 2010, Hahn és Swanson 2012). Ugyanakkor a

PAG caudalis részében a DMN területéről eredő rostokat mutattak ki (Thompson és mtsai 1996). Mi mindössze néhány rostot találtunk a DMN-be való beadást követően, de meg kell jegyezni, hogy vizsgálataink során nem a teljes DMN-be adtunk be BDA-t. Az area hypothalamica dorsomedialis magában foglalja az A13 dopamin sejtcsoport egy részét. Nemrégiben a PAG dorsolateralis részében az A13 sejtcsoportból eredő dopamin-tartalmú rostokat mutattak ki (Messanvi és mtsai 2013).

Munkánk során kimutattuk, hogy BDA-tartalmú rostok ágaznak le a PAG területéről a tegmentum pontis felé, ahol a Barrington mag kap nagyon erős beidegzést, leginkább PeVe beadást követően. Hahn és Swanson (2010) hasonlóan intenzív jelölődést talált ezen a területen perifornicalis beadás után. Ezen eredményeinket részben alátámasztják Thomson és mtsai (1996), valamint Allen és Cechetto (1992) korábbi munkái. Fontos tudni a Barrington magról, hogy neuronjai beidegzik az intermediolateralis magoszlop sejtjeit (Loewy és mtsai 1979), azaz szimpatikus premotor neuronok. Bár leginkább a vizeletürítés szabályozásával hozzák kapcsolatba ezt a magot (Marson 1997), néhány adat szerint szerepe lehet a stresszválaszban is (Imaki és mtsai 1991, Imaki és mtsai 1992, Sved és mtsai 2002).

Közepesen denz rosthálózatot találtunk a nucleus tegmentalis laterodorsalis és a nucleus parabrachialis területén (3. táblázat). Ezek a megfigyelések megegyeznek korábbi pályajelöléses munkák eredményeivel (Goto és mtsai 2005, Hahn és Swanson 2010, Hahn és Swanson 2012).

5.2.2.4. A formatio reticularis különböző területeinek beidegzése

A DLH szubdivízióiból az agytörzsi formatio reticularis húsz különböző magja/része kap rostokat. A DMN kivételével elmondható, hogy a DLH szubdivíziók mindegyike rostokat küld az agytörzsi formatio reticularis 70-90%-ához, bár a rostok denzitása alacsony. Meg kell említeni, hogy az itt látott rostok egy része feltehetően áthaladó axon.

5.2.2.5. A DLH szubdivízióinak részvétele az alsó agytörzsi biogén amin sejtcsoportok beidegzésében

A biogén amin-tartalmú sejtcsoportok fontos komponensei a táplálékfelvétel-, az alvás-ébrenlét ciklus és a stresszválasz szabályozásának. Az A1, A2 és A6 (locus coeruleus)

noradrenalin sejtsoportokból, valamint a C1 caudalis részéből és a C2 adrenalin sejtsoportból származó rostok képezik a felszálló katekolamin rendszert (Hökfelt és mtsai 1984, Moore és Card 1984, Kvetnansky és mtsai 2009). A leszálló DLH rostok fontos feedback jeleket szállíthatnak ezekhez a sejtsoportokhoz. Az A5, A6 (locus coeruleus) és az A7 noradrenalin, valamint a rostralis C1 adrenalin sejtsoportok, akárcsak az alsó agytörzs szerotonin-tartalmú sejtjei szimpatikus premotor neuronok (Hökfelt és mtsai 1984, Moore és Card 1984, Steinbusch 1984, Kvetnansky és mtsai 2009). A leszálló DLH rostok ezek működését befolyásolhatják.

A kilenc-kilenc noradrenalin és szerotonin, valamint a három adrenalin sejtsoport területén a BDA-tartalmú rostok eloszlását külön-külön vizsgáltuk. Mindegyik sejtsoport kapott BDA-pozitív rostokat, a legtöbbjük hat különböző hypothalamicus szubdivízióból. A rostok nagy része a három perifornicalis és a két lateralis hypothalamicus szubdivízióból eredt. A rostok denzitása váltakozott a nagyon gyenge és a közepes közt. A 25 alsó agytörzsi mag/terület közül, ahol a DLH szubdivízióiból eredő rostok denzitása közepes volt, 18 a monoamin sejtsoportok közé tartozott.

A BDA-tartalmú rostok közepes denzitása az alsó agytörzsi katekolamin és szerotonin sejtsoportok területén hasonlít az orexin- és az MCH-tartalmú rostok eloszlására (Bittencourt és mtsai 1992, Peyron és mtsai 1998). Orexin- és MCH-pozitív axonterminálisokat írtak le az ébrenlétkor aktív locus coeruleusban (Horvath és mtsai 1999b, Yoon és Lee 2012), az A1, A2 noradrenalin és C1, C2 adrenalin sejtsoport területén kimutattuk az orexin rostokat és szinapszisokat (lásd 5.3. fejezet; Puskas és mtsai 2010). Praktikusán az összes aminerg sejtsoportban kimutattuk a BDA-jelölt rostokat a DLH szubdivízióiba való beadásokat követően (3. táblázat).

A nucleus raphe dorsalis és a nucleus raphe medianus az alvás-ébrenlét szabályozásának fontos elemei, sejtjeik ébrenlét során aktívak (Rolls és mtsai 2010). Mindkettő területén kimutatták az orexin- és az MCH-tartalmú axonterminálisokat (Peyron és mtsai 1998, Wang és mtsai 2003, Yoon és Lee 2012, Hill és mtsai 2013). Sűrű orexin- és MCH-pozitív rosthálózatot írtak le a nucleus raphe pallidus és a raphe obscurus területén (Berthoud és mtsai 2005, Tupone és mtsai 2011). Jelölt rostokat közepes és gyenge denzitásban mi is kimutattunk ezekben a raphe magokban a DLH szubdivízióiba való BDA-beadást követően (3. táblázat).

5.3. Az orexin-tartalmú sejtek szinaptikus kapcsolata az alsó agytörzsi katekolamin sejtcsoportokkal

Mindegyik alsó agytörzsi adrenalin és noradrenalin sejtcsoportban kimutattuk az orexin-tartalmú rosthálózatot. Fénymikroszkópos szinten számos DAB-bal festett orexin-pozitív axont találtunk a TH-tartalmú perikarionok és dendritek közvetlen közelében az A1, A2, A5 és A6 (azaz locus coeruleus) sejtcsoportban, valamint PNMT-tartalmú neurális elemek közelében a C1, C2 és C3 adrenalin sejtcsoportban. Kimutattuk továbbá, hogy az orexin-tartalmú butonok aszimmetrikus szinaptikus kapcsolatban vannak PNMT-tartalmú neuronokkal a C1 adrenalin és TH-tartalmú neuronokkal az A2 és az A6 noradrenalin sejtcsoportokban.

A kizárólag a DLH területén található orexin-tartalmú neuronok beidegzik a teljes központi idegrendszert az előagytól az alsó agytörzsig és a gerincvelőig (Peyron és mtsai 1998, Date és mtsai 1999, Harrison és mtsai 1999, Nambu és mtsai 1999). Az orexin-tartalmú rostok a locus coeruleus területén találhatóak meg a legnagyobb denzitásban (Peyron és mtsai 1998, Cutler és mtsai 1999, Hagan és mtsai 1999, Horvath és mtsai 1999b, Nambu és mtsai 1999, Hervieu és mtsai 2001). Közepes és erős orexin innervációt mutattak ki a dorsalis vagus complex (nucleus tractus solitarii, nucleus dorsalis nervi vagi, area postrema), a nucleus ambiguus és a ventrolateralis medulla területén (Peyron és mtsai 1998, Date és mtsai 1999, Nambu és mtsai 1999, Marcus és mtsai 2001, Kukkonen és mtsai 2002, Ciriello és mtsai 2003, de Oliveira és mtsai 2003, Guan és mtsai 2005, Zheng és mtsai 2005, Shih és Chuang 2007). Az itt felsorolt területek nagy részén, például a locus coeruleus területén kimutatták az OX1R-t (Trivedi és mtsai 1998, Greco és Shiromani 2001, Hervieu és mtsai 2001, Marcus és mtsai 2001, Ciriello és de Oliveira 2003, de Oliveira és mtsai 2003).

Az orexin sejtek projekciója egyes alsó agytörzsi noradrenalin sejtcsoportokhoz már ismert volt az irodalomból, de szinaptikus kapcsolatot orexin-festett rostok és TH-tartalmú neuronok között csak a locus coeruleus területén írtak le (Horvath és mtsai 1999b). Ennek a kapcsolatnak a létét munkám során megerősítettem (23. ábra). Az A1, A2 és az A5 sejtcsoportok területén csak elszórt orexin-immunfestett rostokról számoltak be, de nem mutattak ki szinaptikus kapcsolatot az orexin és a noradrenalin rendszer között (Baldo és mtsai 2003, Zheng és mtsai 2005). A locus coeruleus

(Horvath és mtsai 1999b) és az A2 (saját eredmény) területén talált orexin-tartalmú preszinaptikus axonok a serkentő axonok tipikus morfológiai jegyeit mutatták kis üres és nagy „dense core” vezikulákkal.

Jól ismert, hogy a központi noradrenalin rendszer részt vesz az ébresztés és a viselkedési állapotok szabályozásában (Baldo és mtsai 2003, Li és van den Pol 2005). Hasonlóan, számos eredmény alátámasztja, hogy az orexin szignalizációs rendszer szignifikáns szerepet játszik az alvás-ébrenlét és az ébresztés szabályozásában (Chemelli és mtsai 1999, Hagan és mtsai 1999, Willie és mtsai 2001, Steininger és mtsai 2004, Li és van den Pol 2005). A hypothalamicus orexin sejtek és az alsó agytörzsi noradrenalin sejtesoportok közti szoros topográfiai kapcsolat felveti a két rendszer közti funkcionális kapcsolat létét. A locus coeruleus számos funkcióban vesz részt, úgymint ébresztés, viselkedési állapotok és állapot-függő kognitív folyamatok kontrollja (Aston-Jones 1995, Berridge és Waterhouse 2003, Li és van den Pol 2005). Mivel a locus coeruleus biztosítja az előagy noradrenalin beidegzését, valószínű, hogy az orexin a locus coeruleus noradrenalin sejtjeinek aktiválásán keresztül fejti ki az alvás-ébrenlét szabályozásában való hatását. Az orexinek fizioiógias hatása a noradrenalin- és adrenalin-tartalmú sejtekre serkentő. Az orexin aktiválja a locus coeruleus neuronjainak posztzinaptikus membránjában lévő receptorokat és megnöveli a sejtek akciós potenciáljának frekvenciáját (Horvath és mtsai 1999b). Orexin icv beadása megnöveli a locus coeruleus neuronjainak alap tüzelési rátáját (Hagan és mtsai 1999), Fos expressziót indukál a locus coeruleus TH-tartalmú neuronjaiban (Date és mtsai 1999), ahogyan az A1 és A2 sejtesoport noradrenalin sejtjeiben is (Zheng és mtsai 2005).

Az orexin táplálékfelvételben és energia-leadásban való szerepe jól ismert (Williams és mtsai 2001, Berthoud és mtsai 2005, Morton és mtsai 2006). Bár az *in vivo* és *in vitro* eredmények sugallják, hogy a táplálékfelvétel és a glükóz anyagcsere szabályozásában az orexin és az adrenalin sejtek közt az alsó agytörzsből kapcsolat van (Ritter és mtsai 1998, Zheng és mtsai 2005), az adrenalin sejtek orexin beidegzésének neuroanatómiai megerősítése eddig hiányzott. Elsőként mutattuk ki a C1-C3 sejtesoportok adrenalin-tartalmú neuronjainak orexin innervációját, amely a táplálkozás és az energia homeosztázis fontos neuronális köre lehet. A 2-deoxi-D-glükóz ezeket az adrenalin-

tartalmú sejteket szelektíven aktiválja: hatására Fos expresszió figyelhető meg bennük (Ritter és mtsai 1998).

Az orexin részt vesz a stresszválasz kialakításában (Johnson és mtsai 2012). Orexin centralis beadása megnöveli az adrenokortikotrop hormon felszabadulást és a plazma kortikoszteron szintjét patkányban (Kuru és mtsai 2000). Orexin-tartalmú rostokat mutattunk ki az agytörzsi katekolamin sejtcsoportok területén. Ezekről a neuronokról ismert, hogy gyorsan és szelektíven válaszolnak különböző stresszorokra (Kvetnansky és mtsai 2009).

A központi katekolamin és az orexin rendszer reciprok kapcsolatban áll egymással. Noradrenalin-tartalmú axonok a DLH orexin sejtjeivel kapcsolatban állnak (Baldo és mtsai 2003, Yamanaka és mtsai 2003b). Finom adrenalin-tartalmú axonhálózatot és terminálisakat mutattak ki a DLH területén (Hököfelt és mtsai 1988, Palkovits és mtsai 1992). Ezek a rostok nagyrészt a ventrolateralis medulla C1 sejtcsoportjából származnak. Meg kell említeni, hogy 2-deoxi-D-glükóz hatására szelektív Fos expresszió figyelhető meg a hypothalamusba projiciáló C1/A1 sejtekben (Tucker és mtsai 1987, Ritter és mtsai 1998). Mind a noradrenalin, mind az adrenalin inhibitoros hatással van az orexin sejtekre (Li és van den Pol 2005), amelyek nagy része $\alpha 1A$ -adrenerg receptort, kisebb hányaduk pedig $\alpha 2A$ -adrenerg receptort expresszál (Modirrousta és mtsai 2005). A tény, hogy orexin neuronok serkentő projekciót küldenek az alsó agytörzsi adrenalin és noradrenalin sejtekhez, amelyek a hypothalamusba projiciálva gátolják az orexin sejtek aktivitását, alátámasztja azt a hipotézist, mely szerint az orexin és a központi katekolamin szabályozó körben egy negatív feedback mechanizmus van (Li és van den Pol 2005).

6. KÖVETKEZTETÉSEK

6.1. A DLH orexin-tartalmú neuronjainak funkcionális heterogenitása

- A DLH orexin-tartalmú neuronjai Fos-aktivációval válaszolnak éheztetésre, alvás-megvonásra és akut fájdalom stresszre egyaránt. A legnagyobb mértékű aktiválódást az alvás-megvonás idézte elő, valamivel kevesebb kettős festett sejtet találtunk akut fájdalom stressz után és még kevesebbet éheztetés után, azaz az orexin-tartalmú sejtek eltérő mértékben vesznek részt a három funkció szabályozásában.
- Az aktivált orexin-tartalmú sejtek hasonló topográfiai eloszlást mutattak mindhárom funkcionális modellben. Ebből következik, hogy nincsenek funkció-specifikus orexin-tartalmú sejtcsoportok.
- A három modellben az orexin-tartalmú sejtek teljes aktivációja meghaladta a 100%-ot, ami arra utal, hogy ugyanazon orexin-tartalmú neuron több funkcionális mechanizmusban is részt vehet.

6.2. A DLH kapcsolata az agytörzsi területekkel

- Az agytörzsi struktúrák legalább 60%-a kap a DLH területéről innervációt, és ebben az innervációban különböző mértékben mind a nyolc vizsgált DLH szubdivízió részt vesz. Kimutattam, hogy a projekció tekintetében számottevő különbségek vannak a szubdivíziók között. A legtöbb agytörzsi területre az area perifornicalis sejtjei küldenek rostokat és innen indul ki a legerősebb projekció is. Az area hypothalamica dorsomedialis területeiről feleannyi projekció indul ki, mint a perifornicalis területekről és a lateralis hypothalamus ventralis részének sejtjei is több agytörzsi területet idegeznek be, mint a dorsalis szubdivízió neuronjai.
- A táplálékfelvétel, az alvás-ébrenlét és a stresszválasz szabályozásában szerepet vivő *valamennyi* alsó agytörzsi noradrenalin, adrenalin és szerotonin sejtcsoport területén az átlagnál nagyobb sűrűségben vannak a DLH szubdivízióiból eredő rostok, sugallva, hogy a DLH neuronjai ezeken a sejtcsoportokon keresztül fejtik ki funkcionális hatásukat.

- Az alsó agytörzsi noradrenalin és adrenalin sejtekkel szoros összefekvésben lévő varikózus orexin-festett rostok közel 70%-a tartalmazott szinaptofizint, egy preszinaptikus fehérjét. Ez a szinaptikus kapcsolat meglétére utal.
- A szinaptikus kapcsolat létét elektronmikroszkóppal igazoltam több katekolamin sejtcsoport területén orexin-festett rost és adrenalin- vagy noradrenalin-tartalmú neuron között. Ez egyrészt a hypothalamusból leszálló feedback szignál létére utal, másrészt arra, hogy a DLH orexin sejtjei ezeken a sejtcsoportokon keresztül fejtik ki különböző funkcionális hatásukat.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásaim fő célja a dorsolateralis hypothalamus (DLH) orexin sejtcsoportjának funkcionális anatómiai vizsgálata volt. Egyrészt vizsgáltam az orexin neuronok aktiválódását, és az aktiválódott orexin sejtek eloszlását három funkcionális modellben (táplálékfelvétel, alvás-ébrenlét ciklus, stresszválasz). Másrészt pedig, hogy az orexin sejtek hatása ezen funkciók szabályozásában az agytörzs mely területein érvényesülhet. Megállapítottuk, hogy az orexin neuronok Fos-aktivációval válaszolnak mindhárom modell esetében, de az aktiválódás mértéke az egyes modellekben eltérő: alvás-megvonás hatására volt a legintenzívebb, valamivel alacsonyabb formalin stressz és még gyengébb éheztes hatására. Az aktivált orexin sejtek eloszlásában nem találtunk különbségeket a három modellben, csak az egyes szubdivíziók területén lévő aktiválódott orexin sejtek százalékos arányában. Ez azt jelenti, hogy bár a DLH különböző szubdivízióiban, sőt azokon belül rostrocaudalisan az orexin sejtek különböző mértékben (számban) aktiválódtak, az adott behatásra aktiválódó sejtek nem rendeződnek specifikus magcsoportokba, hanem random helyezkednek el. A három modellben az orexin sejtek összesített aktivációja a DLH legtöbb szubdivíziójában meghaladta a 100%-ot, ami az orexin sejtek funkcionális multipotenciálját látszik igazolni.

Kimutattuk az agytörzsi struktúrák 60%-ában a DLH szubdivízióiból eredő rostokat. Az egyes szubdivíziók agytörzsi projekciója egyedinek bizonyult és csak részleges átfedést mutatott. Kiemelt jelentőséggel bírtak az agytörzsi monoamin sejtcsoportok, ahol az átlagosnál jóval magasabb volt a DLH-eredetű rostok sűrűsége. Megállapítottuk, hogy az orexin sejtek részt vesznek ezen területek innervációjában. A katekolamin sejtcsoportok területén az adrenalin- és a noradrenalin-tartalmú neuronok közelében számos orexin-tartalmú rost található, ezek nagy része tartalmaz szinaptofizint, és a C1, A2 és A6 sejtcsoportban az orexin-katekolamin szinaptikus kapcsolatot is igazoltuk.

Eredményeink irodalmi adatokkal való összevetése arra enged következtetni, hogy nincs a táplálékfelvétel, az alvás-ébrenlét vagy a stresszválasz szabályozására specifikus orexin sejtcsoport, ugyanakkor valószínűsíthető, hogy egyetlen orexin neuron akár több funkció szabályozásában is részt vehet. Ezen mechanizmusokban a DLH orexin és az alsó agytörzsi biogén neuronok együttes szerepe valószínűsíthető.

8. SUMMARY

The aim of our experiments was the functional anatomical examination of the orexin-containing neurons of the dorsolateral hypothalamus (DLH). First, we studied the Fos-activation of the orexin neurons and the topographical distribution of the activated cells in three experimental models: after fasting, rapid eye movement sleep-deprivation (SD), and acute painful stress. Second, we examined the potential brainstem location of the orexinergic effect on the control of food intake, sleep-wake cycle and stress response.

In the first part of our experiments we established that the orexin-containing neurons of the DLH respond with Fos-activation upon both fasting, SD and acute pain stress, but the extent of activation was different. The highest Fos-activation was found after SD, somewhat lighter after formalin injection and the smallest after fasting. The density of Fos-containing orexin neurons was different within DLH, even in subdivisions, but the activated neurons were arranged in random distribution, rather than separated cell groups within the investigated subdivisions. The summarized activation of orexin-immunoreactive neurons in the three functional models far exceeded the 100%.

In the second part of our experiments we showed that more than 60% of the brainstem structures receive inputs from the DLH. The projection patterns of the eight investigated subdivisions of the DLH to the brainstem were all individual with only partial overlaps. The monoamine cell groups were innervated by the subdivisions of the DLH in higher extent than the other brainstem areas. High number of varicose orexin-containing fibers was shown in the vicinity of adrenaline and noradrenaline cells. These varicosities contained synaptophysin. At electron microscopic level, synaptic contacts between orexin-containing boutons and catecholaminergic neural elements in C1 adrenaline, A2 and A6 noradrenaline cell groups were demonstrated.

These findings suggest that there are no separate function-specific orexin-containing cell groups in the DLH regarding the control of food intake, sleep-wake cycle and stress-response. Quantitative histological data suggest that certain orexin-containing neurons presumably are involved in more than one different functional mechanism. The orexin-containing neurons take part in the control of these functions through neuronal connections with the biogenic amine cell groups of the lower brainstem.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Abbott FV, Franklin KB, Westbrook RF. (1995) The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain*, 60: 91-102.

Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, de Lecea L. (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature*, 450: 420-424.

Al-Barazanji KA, Wilson S, Baker J, Jessop DS, Harbuz MS. (2001) Central orexin-A activates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and stimulates hypothalamic corticotropin releasing factor and arginine vasopressin neurones in conscious rats. *J Neuroendocrinol*, 13: 421-424.

Allen GV, Cechetto DF. (1992) Functional and anatomical organization of cardiovascular pressor and depressor sites in the lateral hypothalamic area: I. Descending projections. *J Comp Neurol*, 315: 313-332.

Antunes VR, Brailoiu GC, Kwok EH, Scruggs P, Dun NJ. (2001) Orexins/hypocretins excite rat sympathetic preganglionic neurons in vivo and in vitro. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281: R1801-R1807.

Aston-Jones G, Bloom FE. (1981) Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci*, 1: 876-886.

Aston-Jones G, Shipley MT, Grzanna R. The locus coeruleus, A5 and A7 noradrenergic groups. In: G Paxinos (szerk.), *The rat nervous system*. Academic Press, Sydney, 1995: 183-213.

Backberg M, Hervieu G, Wilson S, Meister B. (2002) Orexin receptor-1 (OX-R1) immunoreactivity in chemically identified neurons of the hypothalamus: focus on orexin targets involved in control of food and water intake. *Eur J Neurosci*, 15: 315-328.

Balcita-Pedicino JJ, Sesack SR. (2007) Orexin axons in the rat ventral tegmental area synapse infrequently onto dopamine and gamma-aminobutyric acid neurons. *J Comp Neurol*, 503: 668-684.

Baldo BA, Daniel RA, Berridge CW, Kelley AE. (2003) Overlapping distributions of orexin/hypocretin- and dopamine-beta-hydroxylase immunoreactive fibers in rat brain regions mediating arousal, motivation, and stress. *J Comp Neurol*, 464: 220-237.

Baldo BA, Gual-Bonilla L, Sijapati K, Daniel RA, Landry CF, Kelley AE. (2004) Activation of a subpopulation of orexin/hypocretin-containing hypothalamic neurons by GABAA receptor-mediated inhibition of the nucleus accumbens shell, but not by exposure to a novel environment. *Eur J Neurosci*, 19: 376-386.

Barsh GS, Schwartz MW. (2002) Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat Rev Genet*, 3: 589-600.

Barson JR, Morganstern I, Leibowitz SF. (2013) Complementary roles of orexin and melanin-concentrating hormone in feeding behavior. *Int J Endocrinol*, 2013: 1-10.

Bayer L, Eggermann E, Serafin M, Saint-Mieux B, Machard D, Jones B, Muhlethaler M. (2001) Orexins (hypocretins) directly excite tuberomammillary neurons. *Eur J Neurosci*, 14: 1571-1575.

Bayer L, Mairet-Coello G, Risold PY, Griffond B. (2002) Orexin/hypocretin neurons: chemical phenotype and possible interactions with melanin-concentrating hormone neurons. *Regul Pept*, 104: 33-39.

Bernardis LL, Bellinger LL. (1993) The lateral hypothalamic area revisited: neuroanatomy, body weight regulation, neuroendocrinology and metabolism. *Neurosci Biobehav Rev*, 17: 141-193.

Berridge CW, Waterhouse BD. (2003) The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev*, 42: 33-84.

Berthoud HR, Patterson LM, Sutton GM, Morrison C, Zheng H. (2005) Orexin inputs to caudal raphe neurons involved in thermal, cardiovascular, and gastrointestinal regulation. *Histochem Cell Biol*, 123: 147-156.

Beuckmann CT, Yanagisawa M. (2002) Orexins: from neuropeptides to energy homeostasis and sleep/wake regulation. *J Mol Med (Berl)*, 80: 329-342.

Bingham S, Davey PT, Babbs AJ, Irving EA, Sammons MJ, Wyles M, Jeffrey P, Cutler L, Riba I, Johns A, Porter RA, Upton N, Hunter AJ, Parsons AA. (2001) Orexin-A, an hypothalamic peptide with analgesic properties. *Pain*, 92: 81-90.

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

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 immunohistochemical and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol*, 319: 218-245.

Bleier R, Cohn P, Siggelkow IR. A cytoarchitectonic atlas of the hypothalamus and hypothalamic third ventricle of the rat. In: PJ Morgane, J Panksepp (szerk.), *Anatomy of the Hypothalamus, Vol 1*. Marcel Dekker, New York, 1979: 137-220.

Bourgin P, Huitron-Resendiz S, Spier AD, Fabre V, Morte B, Criado JR, Sutcliffe JG, Henriksen SJ, de Lecea L. (2000) Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *J Neurosci*, 20: 7760-7765.

Boutrel B, Steiner N, Halfon O. (2013) The hypocretins and the reward function: what have we learned so far? *Front Behav Neurosci*, 7: 59.

Broberger C, De Lecea L, Sutcliffe JG, Hökfelt T. (1998) Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol*, 402: 460-474.

Brown RE, Sergeeva O, Eriksson KS, Haas HL. (2001) Orexin A excites serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Neuropharmacology*, 40: 457-459.

Brunton PJ, Russell JA. (2003) Hypothalamic-pituitary-adrenal responses to centrally administered orexin-A are suppressed in pregnant rats. *J Neuroendocrinol*, 15: 633-637.

Cai XJ, Evans ML, Lister CA, Leslie RA, Arch JR, Wilson S, Williams G. (2001) Hypoglycemia activates orexin neurons and selectively increases hypothalamic orexin-B levels: responses inhibited by feeding and possibly mediated by the nucleus of the solitary tract. *Diabetes*, 50: 105-112.

Cai XJ, Widdowson PS, Harrold J, Wilson S, Buckingham RE, Arch JR, Tadayyon M, Clapham JC, Wilding J, Williams G. (1999) Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes*, 48: 2132-2137.

Campbell RE, Smith MS, Allen SE, Grayson BE, Ffrench-Mullen JM, Grove KL. (2003) Orexin neurons express a functional pancreatic polypeptide Y4 receptor. *J Neurosci*, 23: 1487-1497.

Carter ME, Adamantidis A, Ohtsu H, Deisseroth K, de Lecea L. (2009) Sleep homeostasis modulates hypocretin-mediated sleep-to-wake transitions. *J Neurosci*, 29: 10939-10949.

Carter ME, Brill J, Bonnavion P, Huguenard JR, Huerta R, de Lecea L. (2012) Mechanism for hypocretin-mediated sleep-to-wake transitions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: E2635-E2644.

Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M. (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, 98: 437-451.

Chou TC, Lee CE, Lu J, Elmquist JK, Hara J, Willie JT, Beuckmann CT, Chemelli RM, Sakurai T, Yanagisawa M, Saper CB, Scammell TE. (2001) Orexin (hypocretin) neurons contain dynorphin. *J Neurosci*, 21: RC168.

Christ JF. Derivation and boundaries of the hypothalamus, with atlas of hypothalamic grisea In: W Haymaker, E Anderson, WJH Nauta (szerk.), *The Hypothalamus*. Charles C. Thomas, Springfield, 1969: 13-60.

Ciriello J, Caverson MM, McMurray JC, Bruckschwaiger EB. (2013) Co-localization of hypocretin-1 and leucine-enkephalin in hypothalamic neurons projecting to the nucleus of the solitary tract and their effect on arterial pressure. *Neuroscience*, 250: 599-613.

Ciriello J, de Oliveira CV. (2003) Cardiac effects of hypocretin-1 in nucleus ambiguus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284: R1611-1620.

Ciriello J, McMurray JC, Babic T, de Oliveira CV. (2003) Collateral axonal projections from hypothalamic hypocretin neurons to cardiovascular sites in nucleus ambiguus and nucleus tractus solitarius. *Brain Res*, 991: 133-141.

Cutler DJ, Morris R, Evans ML, Leslie RA, Arch JR, Williams G. (2001) Orexin-A immunoreactive neurons in the rat hypothalamus do not contain neuronal nitric oxide synthase (nNOS). *Peptides*, 22: 123-128.

Cutler DJ, Morris R, Sheridhar V, Wattam TA, Holmes S, Patel S, Arch JR, Wilson S, Buckingham RE, Evans ML, Leslie RA, Williams G. (1999) Differential distribution of orexin-A and orexin-B immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Peptides*, 20: 1455-1470.

Date Y, Mondal MS, Matsukura S, Ueta Y, Yamashita H, Kaiya H, Kangawa K, Nakazato M. (2000) Distribution of orexin/hypocretin in the rat median eminence and pituitary. *Brain Res Mol Brain Res*, 76: 1-6.

Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M. (1999) Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 748-753.

de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 322-327.

de Lecea L, Sutcliffe JG. (1999) The hypocretins/orexins: novel hypothalamic neuropeptides involved in different physiological systems. *Cell Mol Life Sci*, 56: 473-480.

de Oliveira CV, Rosas-Arellano MP, Solano-Flores LP, Ciriello J. (2003) Cardiovascular effects of hypocretin-1 in nucleus of the solitary tract. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284: H1369-H1377.

Deboer T, Overeem S, Visser NA, Duindam H, Frolich M, Lammers GJ, Meijer JH. (2004) Convergence of circadian and sleep regulatory mechanisms on hypocretin-1. *Neuroscience*, 129: 727-732.

Diano S, Horvath B, Urbanski HF, Sotonyi P, Horvath TL. (2003) Fasting activates the nonhuman primate hypocretin (orexin) system and its postsynaptic targets. *Endocrinology*, 144: 3774-3778.

Dube MG, Kalra SP, Kalra PS. (1999) Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action. *Brain Res*, 842: 473-477.

Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR. (1999) The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Endocrinol*, 160: R7-R12.

Eggermann E, Serafin M, Bayer L, Machard D, Saint-Mleux B, Jones BE, Muhlethaler M. (2001) Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurones. *Neuroscience*, 108: 177-181.

Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK. (1998) Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol*, 402: 442-459.

Eliassi A, Nazari M, Naghdi N. (2009) Role of the ventromedial hypothalamic orexin-1 receptors in regulation of gastric acid secretion in conscious rats. *J Neuroendocrinol*, 21: 177-182.

Erami E, Azhdari-Zarmehri H, Ghasemi-Dashkhasan E, Esmaeili MH, Semnanian S. (2012) Intra-paragigantocellularis lateralis injection of orexin-A has an antinociceptive effect on hot plate and formalin tests in rat. *Brain Res*, 1478: 16-23.

Eriksson KS, Sergeeva O, Brown RE, Haas HL. (2001) Orexin/hypocretin excites the histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus. *J Neurosci*, 21: 9273-9279.

Espana RA, Plahn S, Berridge CW. (2002) Circadian-dependent and circadian-independent behavioral actions of hypocretin/orexin. *Brain Res*, 943: 224-236.

Espana RA, Reis KM, Valentino RJ, Berridge CW. (2005) Organization of hypocretin/orexin efferents to locus coeruleus and basal forebrain arousal-related structures. *J Comp Neurol*, 481: 160-178.

Espana RA, Valentino RJ, Berridge CW. (2003) Fos immunoreactivity in hypocretin-synthesizing and hypocretin-1 receptor-expressing neurons: effects of diurnal and nocturnal spontaneous waking, stress and hypocretin-1 administration. *Neuroscience*, 121: 201-217.

Estabrooke IV, McCarthy MT, Ko E, Chou TC, Chemelli RM, Yanagisawa M, Saper CB, Scammell TE. (2001) Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. *J Neurosci*, 21: 1656-1662.

Fadel J, Bubser M, Deutch AY. (2002) Differential activation of orexin neurons by antipsychotic drugs associated with weight gain. *J Neurosci*, 22: 6742-6746.

Fadel J, Deutch AY. (2002) Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience*, 111: 379-387.

Fort P, Salvert D, Hanriot L, Jegu S, Shimizu H, Hashimoto K, Mori M, Luppi PH. (2008) The satiety molecule nesfatin-1 is co-expressed with melanin concentrating hormone in tuberal hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience*, 155: 174-181.

Furlong TM, Vianna DM, Liu L, Carrive P. (2009) Hypocretin/orexin contributes to the expression of some but not all forms of stress and arousal. *Eur J Neurosci*, 30: 1603-1614.

Furutani N, Hondo M, Kageyama H, Tsujino N, Mieda M, Yanagisawa M, Shioda S, Sakurai T. (2013) Neurotensin co-expressed in orexin-producing neurons in the lateral hypothalamus plays an important role in regulation of sleep/wakefulness states. *PLoS One*, 8: e62391.

Galvao MdOL, Sinigaglia-Coimbra R, Kawakami SE, Tufik S, Suchecki D. (2009) Paradoxical sleep deprivation activates hypothalamic nuclei that regulate food intake and stress response. *Psychoneuroendocrinology*, 34: 1176-1183.

Geeraedts LM, Nieuwenhuys R, Veening JG. (1990) Medial forebrain bundle of the rat: IV. Cytoarchitecture of the caudal (lateral hypothalamic) part of the medial forebrain bundle bed nucleus. *J Comp Neurol*, 294: 537-568.

Georgescu D, Zachariou V, Barrot M, Mieda M, Willie JT, Eisch AJ, Yanagisawa M, Nestler EJ, DiLeone RJ. (2003) Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal. *J Neurosci*, 23: 3106-3111.

Gerashchenko D, Kohls MD, Greco M, Waleh NS, Salin-Pascual R, Kilduff TS, Lappi DA, Shiromani PJ. (2001) Hypocretin-2-saporin lesions of the lateral hypothalamus produce narcoleptic-like sleep behavior in the rat. *J Neurosci*, 21: 7273-7283.

Goto M, Canteras NS, Burns G, Swanson LW. (2005) Projections from the subfornical region of the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol*, 493: 412-438.

Grabauskas G, Moises HC. (2003) Gastrointestinal-projecting neurones in the dorsal motor nucleus of the vagus exhibit direct and viscerotopically organized sensitivity to orexin. *J Physiol*, 549: 37-56.

Greco MA, Shiromani PJ. (2001) Hypocretin receptor protein and mRNA expression in the dorsolateral pons of rats. *Brain Res Mol Brain Res*, 88: 176-182.

Guan JL, Saotome T, Wang QP, Funahashi H, Hori T, Tanaka S, Shioda S. (2001) Orexinergic innervation of POMC-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroreport*, 12: 547-551.

Guan JL, Uehara K, Lu S, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Yanagizawa M, Shioda S. (2002) Reciprocal synaptic relationships between orexin- and melanin-concentrating hormone-containing neurons in the rat lateral hypothalamus: a novel circuit implicated in feeding regulation. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26: 1523-1532.

Guan JL, Wang QP, Kageyama H, Kita T, Takenoya F, Hori T, Shioda S. (2005) Characterization of orexin A immunoreactivity in the rat area postrema. *Regul Pept*, 129: 17-23.

Gurdjian ES. (1927) The diencephalon of the albino rat. *Studies on the brain of the rat*. No. 2. *J Comp Neurol*, 43: 1-114.

Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N. (1999) Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 10911-10916.

Hahn JD. (2010) Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin peptide expression patterns in a current parceling scheme of the lateral hypothalamic zone. *Neurosci Lett*, 468: 12-17.

Hahn JD, Swanson LW. (2010) Distinct patterns of neuronal inputs and outputs of the juxtaparaventricular and supraforminal regions of the lateral hypothalamic area in the male rat. *Brain Res Rev*, 64: 14-103.

Hahn JD, Swanson LW. (2012) Connections of the lateral hypothalamic area juxtadorsomedial region in the male rat. *J Comp Neurol*, 520: 1831-1890.

Hakansson M, de Lecea L, Sutcliffe JG, Yanagisawa M, Meister B. (1999) Leptin receptor- and STAT3-immunoreactivities in hypocretin/orexin neurones of the lateral hypothalamus. *J Neuroendocrinol*, 11: 653-663.

Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. (2001) Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*, 30: 345-354.

Hara J, Yanagisawa M, Sakurai T. (2005) Difference in obesity phenotype between orexin-knockout mice and orexin neuron-deficient mice with same genetic background and environmental conditions. *Neurosci Lett*, 380: 239-242.

Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G. (2005) A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature*, 437: 556-559.

Harrison TA, Chen CT, Dun NJ, Chang JK. (1999) Hypothalamic orexin A-immunoreactive neurons project to the rat dorsal medulla. *Neurosci Lett*, 273: 17-20.

Hassani OK, Henny P, Lee MG, Jones BE. (2010) GABAergic neurons intermingled with orexin and MCH neurons in the lateral hypothalamus discharge maximally during sleep. *Eur J Neurosci*, 32: 448-457.

Haynes AC, Jackson B, Overend P, Buckingham RE, Wilson S, Tadayyon M, Arch JR. (1999) Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides*, 20: 1099-1105.

Henny P, Jones BE. (2006) Innervation of orexin/hypocretin neurons by GABAergic, glutamatergic or cholinergic basal forebrain terminals evidenced by immunostaining for presynaptic vesicular transporter and postsynaptic scaffolding proteins. *J Comp Neurol*, 499: 645-661.

Herdegen T, Leah JD. (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev*, 28: 370-490.

Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison DC, Roberts JC, Leslie RA. (2001) Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience*, 103: 777-797.

Hill XL, Pascovich C, Urbanavicius J, Torterolo P, Scorza MC. (2013) The median raphe nucleus participates in the depressive-like behavior induced by MCH: differences with the dorsal raphe nucleus. *Peptides*, 50: 96-99.

Horvath TL, Diano S, van den Pol AN. (1999a) Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci*, 19: 1072-1087.

Horvath TL, Peyron C, Diano S, Ivanov A, Aston-Jones G, Kilduff TS, van den Pol AN. (1999b) Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. *J Comp Neurol*, 415: 145-159.

Hökfelt T, Foster GA, Johansson O, Schultzberg M, Holets V, Ju G, Skagerberg G, Palkovits M, Skirboll L, Stolk JM, U'Prichard DC, Goldstein M. Central phenylethanolamine-N-methyltransferase-immunoreactive neurons: distribution, projections, fine structure, ontogeny and coexisting peptides. In: JM Stolk, DC U'Prichard, K Fuxe (szerk.), *Epinephrine in the central nervous system*. Oxford University Press, New York, 1988: 10-32.

Hökfelt T, Johansson O, Goldstein M. Central catecholamine neurons as revealed by immunohistochemistry with special reference to adrenaline neurons. In: A Björklund, T Hökfelt (szerk.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy Vol. 2*. Elsevier, Amsterdam, 1984: 157-276.

Huang ZL, Qu WM, Li WD, Mochizuki T, Eguchi N, Watanabe T, Urade Y, Hayaishi O. (2001) Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 9965-9970.

Hughes P, Dragunow M. (1995) Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev*, 47: 133-178.

Hwang LL, Chen CT, Dun NJ. (2001) Mechanisms of orexin-induced depolarizations in rat dorsal motor nucleus of vagus neurones in vitro. *J Physiol*, 537: 511-520.

Ida T, Nakahara K, Murakami T, Hanada R, Nakazato M, Murakami N. (2000) Possible involvement of orexin in the stress reaction in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 270: 318-323.

Imaki T, Nahan JL, Rivier C, Sawchenko PE, Vale W. (1991) Differential regulation of corticotropin-releasing factor mRNA in rat brain regions by glucocorticoids and stress. *J Neurosci*, 11: 585-599.

Imaki T, Vale W, Sawchenko PE. (1992) Regulation of corticotropin-releasing factor mRNA in neuroendocrine and autonomic neurons by osmotic stimulation and volume loading. *Neuroendocrinology*, 56: 633-640.

Inutsuka A, Yamanaka A. (2013) The physiological role of orexin/hypocretin neurons in the regulation of sleep/wakefulness and neuroendocrine functions. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 4: 18.

Jaszberenyi M, Bujdoso E, Pataki I, Telegdy G. (2000) Effects of orexins on the hypothalamic-pituitary-adrenal system. *J Neuroendocrinol*, 12: 1174-1178.

Johnson PL, Molosh A, Fitz SD, Truitt WA, Shekhar A. (2012) Orexin, stress, and anxiety/panic states. *Prog Brain Res*, 198: 133-161.

Kanbayashi T, Inoue Y, Chiba S, Aizawa R, Saito Y, Tsukamoto H, Fujii Y, Nishino S, Shimizu T. (2002) CSF hypocretin-1 (orexin-A) concentrations in narcolepsy with and without cataplexy and idiopathic hypersomnia. *J Sleep Res*, 11: 91-93.

Kayaba Y, Nakamura A, Kasuya Y, Ohuchi T, Yanagisawa M, Komuro I, Fukuda Y, Kuwaki T. (2003) Attenuated defense response and low basal blood pressure in orexin knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285: R581-R593.

Kiss A, Jezova D, Mikkelsen JD. (2004) Activation of Fos in hypocretin neurons of the rat by insulin-induced hypoglycemia. *Endocr Regul*, 38: 97-102.

Kitka T, Adori C, Katai Z, Vas S, Molnar E, Papp RS, Toth ZE, Bagdy G. (2011) Association between the activation of MCH and orexin immunoreactive neurons and

REM sleep architecture during REM rebound after a three day long REM deprivation. *Neurochem Int*, 59: 686-694.

Ko EM, Estabrooke IV, McCarthy M, Scammell TE. (2003) Wake-related activity of tuberomammillary neurons in rats. *Brain Res*, 992: 220-226.

Kodama T, Usui S, Honda Y, Kimura M. (2005) High Fos expression during the active phase in orexin neurons of a diurnal rodent, *Tamias sibiricus barberi*. *Peptides*, 26: 631-638.

Korotkova TM, Sergeeva OA, Eriksson KS, Haas HL, Brown RE. (2003) Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins. *J Neurosci*, 23: 7-11.

Krashes MJ, Shah BP, Koda S, Lowell BB. (2013) Rapid versus delayed stimulation of feeding by the endogenously released AgRP neuron mediators GABA, NPY, and AgRP. *Cell Metab*, 18: 588-595.

Krowicki ZK, Burmeister MA, Berthoud HR, Scullion RT, Fuchs K, Hornby PJ. (2002) Orexins in rat dorsal motor nucleus of the vagus potently stimulate gastric motor function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283: G465-G472.

Kukkonen JP, Holmqvist T, Ammoun S, Akerman KE. (2002) Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283: C1567-C1591.

Kunii K, Yamanaka A, Nambu T, Matsuzaki I, Goto K, Sakurai T. (1999) Orexins/hypocretins regulate drinking behaviour. *Brain Res*, 842: 256-261.

Kurose T, Ueta Y, Yamamoto Y, Serino R, Ozaki Y, Saito J, Nagata S, Yamashita H. (2002) Effects of restricted feeding on the activity of hypothalamic orexin (OX)-A containing neurons and OX2 receptor mRNA level in the paraventricular nucleus of rats. *Regul Pept*, 104: 145-151.

Kuru M, Ueta Y, Serino R, Nakazato M, Yamamoto Y, Shibuya I, Yamashita H. (2000) Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport*, 11: 1977-1980.

Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M. (2009) Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev*, 89: 535-606.

Lawrence CB, Snape AC, Baudoin FM, Luckman SM. (2002) Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology*, 143: 155-162.

Li Y, Gao XB, Sakurai T, van den Pol AN. (2002) Hypocretin/Orexin excites hypocretin neurons via a local glutamate neuron-A potential mechanism for orchestrating the hypothalamic arousal system. *Neuron*, 36: 1169-1181.

Li Y, van den Pol AN. (2005) Direct and indirect inhibition by catecholamines of hypocretin/orexin neurons. *J Neurosci*, 25: 173-183.

Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E. (1999) The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*, 98: 365-376.

Liu RJ, van den Pol AN, Aghajanian GK. (2002) Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. *J Neurosci*, 22: 9453-9464.

Llewellyn-Smith IJ, Martin CL, Marcus JN, Yanagisawa M, Minson JB, Scammell TE. (2003) Orexin-immunoreactive inputs to rat sympathetic preganglionic neurons. *Neurosci Lett*, 351: 115-119.

Loewy AD, Saper CB, Baker RP. (1979) Descending projections from the pontine micturition center. *Brain Res*, 172: 533-538.

Lopez M, Seoane LM, Tovar S, Nogueiras R, Dieguez C, Senaris R. (2004) Orexin-A regulates growth hormone-releasing hormone mRNA content in a nucleus-specific manner and somatostatin mRNA content in a growth hormone-dependent fashion in the rat hypothalamus. *Eur J Neurosci*, 19: 2080-2088.

Lopez M, Tena-Sempere M, Dieguez C. (2010) Cross-talk between orexins (hypocretins) and the neuroendocrine axes (hypothalamic-pituitary axes). *Front Neuroendocrinol*, 31: 113-127.

Lu XY, Bagnol D, Burke S, Akil H, Watson SJ. (2000) Differential distribution and regulation of OX1 and OX2 orexin/hypocretin receptor messenger RNA in the brain upon fasting. *Horm Behav*, 37: 335-344.

Ma X, Zubcevic L, Bruning JC, Ashcroft FM, Burdakov D. (2007) Electrical inhibition of identified anorexigenic POMC neurons by orexin/hypocretin. *J Neurosci*, 27: 1529-1533.

Malendowicz LK, Hochol A, Ziolkowska A, Nowak M, Gottardo L, Nussdorfer GG. (2001) Prolonged orexin administration stimulates steroid-hormone secretion, acting directly on the rat adrenal gland. *Int J Mol Med*, 7: 401-404.

Malendowicz LK, Tortorella C, Nussdorfer GG. (1999) Orexins stimulate corticosterone secretion of rat adrenocortical cells, through the activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 70: 185-188.

Maaloud N, Meister B. (2010) Nociceptin/orphanin FQ peptide in hypothalamic neurones associated with the control of feeding behaviour. *J Neuroendocrinol*, 22: 75-82.

Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK. (2001) Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol*, 435: 6-25.

Marson L. (1997) Identification of central nervous system neurons that innervate the bladder body, bladder base, or external urethral sphincter of female rats: a transneuronal tracing study using pseudorabies virus. *J Comp Neurol*, 389: 584-602.

Martin G, Fabre V, Siggins GR, de Lecea L. (2002) Interaction of the hypocretins with neurotransmitters in the nucleus accumbens. *Regul Pept*, 104: 111-117.

Martinez GS, Smale L, Nunez AA. (2002) Diurnal and nocturnal rodents show rhythms in orexinergic neurons. *Brain Res*, 955: 1-7.

Matsumura K, Tsuchihashi T, Abe I. (2001) Central orexin-A augments sympathoadrenal outflow in conscious rabbits. *Hypertension*, 37: 1382-1387.

Messanvi F, Eggens-Meijer E, Roozendaal B, van der Want JJ. (2013) A discrete dopaminergic projection from the incertohypothalamic A13 cell group to the dorsolateral periaqueductal gray in rat. *Front Neuroanat*, 7: 41.

Meye FJ, Adan RA. (2014) Feelings about food: the ventral tegmental area in food reward and emotional eating. *Trends Pharmacol Sci*, 35: 31-40.

Mitsuma T, Hirooka Y, Mori Y, Kayama M, Adachi K, Rhue N, Ping J, Nogimori T. (1999) Effects of orexin A on thyrotropin-releasing hormone and thyrotropin secretion in rats. *Horm Metab Res*, 31: 606-609.

Miyata S, Tsujioka H, Itoh M, Matsunaga W, Kuramoto H, Kiyohara T. (2001) Time course of Fos and Fras expression in the hypothalamic supraoptic neurons during chronic osmotic stimulation. *Brain Res Mol Brain Res*, 90: 39-47.

Modirrousta M, Mainville L, Jones BE. (2005) Orexin and MCH neurons express c-Fos differently after sleep deprivation vs. recovery and bear different adrenergic receptors. *Eur J Neurosci*, 21: 2807-2816.

Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Yanagisawa M, Matsukura S. (1999) Widespread distribution of orexin in rat brain and its regulation upon fasting. *Biochem Biophys Res Commun*, 256: 495-499.

Monti JM. (2010) The role of dorsal raphe nucleus serotonergic and non-serotonergic neurons, and of their receptors, in regulating waking and rapid eye movement (REM) sleep. *Sleep Med Rev*, 14: 319-327.

Moore RY, Card JP. Noradrenaline-containing neuron systems. In: A Björklund, T Hökfelt (szerk.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy Vol. 2*. Elsevier, Amsterdam, 1984: 123-156.

Morgan JJ, Curran T. (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci*, 14: 421-451.

Moriguchi T, Sakurai T, Nambu T, Yanagisawa M, Goto K. (1999) Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia. *Neurosci Lett*, 264: 101-104.

Morrison SF, Madden CJ, Tupone D. (2012) An orexinergic projection from perifornical hypothalamus to raphe pallidus increases rat brown adipose tissue thermogenesis. *Adipocyte*, 1: 116-120.

Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443: 289-295.

Mukai K, Kim J, Nakajima K, Oomura Y, Wayner MJ, Sasaki K. (2009) Electrophysiological effects of orexin/hypocretin on nucleus accumbens shell neurons in rats: an in vitro study. *Peptides*, 30: 1487-1496.

Mullett MA, Billington CJ, Levine AS, Kotz CM. (2000) Hypocretin I in the lateral hypothalamus activates key feeding-regulatory brain sites. *Neuroreport*, 11: 103-108.

Muraki Y, Yamanaka A, Tsujino N, Kilduff TS, Goto K, Sakurai T. (2004) Serotonergic regulation of the orexin/hypocretin neurons through the 5-HT_{1A} receptor. *J Neurosci*, 24: 7159-7166.

Muroya S, Uramura K, Sakurai T, Takigawa M, Yada T. (2001) Lowering glucose concentrations increases cytosolic Ca²⁺ in orexin neurons of the rat lateral hypothalamus. *Neurosci Lett*, 309: 165-168.

Murphy JA, Deurveilher S, Semba K. (2003) Stimulant doses of caffeine induce c-FOS activation in orexin/hypocretin-containing neurons in rat. *Neuroscience*, 121: 269-275.

Nagao M, Kamo H, Akiguchi I, Kimura J. (1993) Induction of c-Fos-like protein in the lateral habenular nucleus by persistent noxious peripheral stimulation. *Neurosci Lett*, 151: 37-40.

Nakamura T, Uramura K, Nambu T, Yada T, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. (2000) Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain Res*, 873: 181-187.

Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K. (1999) Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res*, 827: 243-260.

Narita M, Nagumo Y, Hashimoto S, Khotib J, Miyatake M, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakamachi T, Shioda S, Suzuki T. (2006) Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *J Neurosci*, 26: 398-405.

Niu JG, Yokota S, Tsumori T, Qin Y, Yasui Y. (2010) Glutamatergic lateral parabrachial neurons innervate orexin-containing hypothalamic neurons in the rat. *Brain Res*, 1358: 110-122.

Nixon JP, Smale L. (2004) Individual differences in wheel-running rhythms are related to temporal and spatial patterns of activation of orexin A and B cells in a diurnal rodent (*Arvicanthis niloticus*). *Neuroscience*, 127: 25-34.

Nozu T, Tuchiya Y, Kumei S, Takakusaki K, Ataka K, Fujimiya M, Okumura T. (2011) Endogenous orexin-A in the brain mediates 2-deoxy-D-glucose-induced stimulation of gastric motility in freely moving conscious rats. *J Gastroenterol*, 47: 404-411.

Olszewski PK, Li D, Grace MK, Billington CJ, Kotz CM, Levine AS. (2003) Neural basis of orexigenic effects of ghrelin acting within lateral hypothalamus. *Peptides*, 24: 597-602.

Palkovits M. (1975) A quantitative histological method for the identification of a nucleus in the brain. The perifornical nucleus. *Acta Morphol Acad Sci Hung*, 23: 283-291.

Palkovits M. (2003) Hypothalamic regulation of food intake. *Clin Neurosci*, 56: 288-302.

Palkovits M. (2008) Stress-induced activation of neurons in the ventromedial arcuate nucleus: a blood-brain-CSF interface of the hypothalamus. *Ann NY Acad Sci*, 1148: 57-63.

Palkovits M, Magyar P, Szentágothai J. (1971) Quantitative histological analysis of the cerebellar cortex in the cat. I. Number and arrangement in space of the Purkinje cells. *Brain Res*, 32: 1-13.

Palkovits M, Mezey E, Skirboll LR, Hökfelt T. (1992) Adrenergic projections from the lower brainstem to the hypothalamic paraventricular nucleus, the lateral hypothalamic area and the central nucleus of the amygdala in rats. *J Chem Neuroanat*, 5: 407-415.

Paneda C, Winsky-Sommerer R, Boutrel B, de Lecea L. (2005) The corticotropin-releasing factor-hypocretin connection: implications in stress response and addiction. *Drug News Perspect*, 18: 250-255.

Papp RS, Vas S, Renner E, Palkovits M. Functional heterogeneity of orexin-expressing neurons in the hypothalamus of rats.

Park ES, Yi SJ, Kim JS, Lee HS, Lee IS, Seong JK, Jin HK, Yoon YS. (2004) Changes in orexin-A and neuropeptide Y expression in the hypothalamus of the fasted and high-fat diet fed rats. *J Vet Sci*, 5: 295-302.

Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier/Academic Press, Amsterdam, 2007.

Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS. (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*, 18: 9996-10015.

Piper DC, Upton N, Smith MI, Hunter AJ. (2000) The novel brain neuropeptide, orexin-A, modulates the sleep-wake cycle of rats. *Eur J Neurosci*, 12: 726-730.

Pu S, Jain MR, Kalra PS, Kalra SP. (1998) Orexins, a novel family of hypothalamic neuropeptides, modulate pituitary luteinizing hormone secretion in an ovarian steroid-dependent manner. *Regul Pept*, 78: 133-136.

Puskas N, Papp RS, Gallatz K, Palkovits M. (2010) Interactions between orexin-immunoreactive fibers and adrenaline or noradrenaline-expressing neurons of the lower brainstem in rats and mice. *Peptides*, 31: 1589-1597.

Renner E, Szabó-Meltzer KI, Puskás N, Tóth ZE, Dobolyi A, Palkovits M. (2010) Activation of neurons in the hypothalamic dorsomedial nucleus via hypothalamic projections of the nucleus of the solitary tract following refeeding of fasted rats. *Eur J Neurosci*, 31: 302-314.

Ritter S, Llewellyn-Smith I, Dinh TT. (1998) Subgroups of hindbrain catecholamine neurons are selectively activated by 2-deoxy-D-glucose induced metabolic challenge. *Brain Res*, 805: 41-54.

Roeling TA, Veening JG, Kruk MR, Peters JP, Vermelis ME, Nieuwenhuys R. (1994) Efferent connections of the hypothalamic "aggression area" in the rat. *Neuroscience*, 59: 1001-1024.

Rolls A, Schaich Borg J, de Lecea L. (2010) Sleep and metabolism: role of hypothalamic neuronal circuitry. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 24: 817-828.

Rosin DL, Weston MC, Sevigny CP, Stornetta RL, Guyenet PG. (2003) Hypothalamic orexin (hypocretin) neurons express vesicular glutamate transporters VGLUT1 or VGLUT2. *J Comp Neurol*, 465: 593-603.

Russell SH, Small CJ, Dakin CL, Abbott CR, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR. (2001) The central effects of orexin-A in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in vivo and in vitro in male rats. *J Neuroendocrinol*, 13: 561-566.

Sakamoto F, Yamada S, Ueta Y. (2004) Centrally administered orexin-A activates corticotropin-releasing factor-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and central amygdaloid nucleus of rats: possible involvement of central orexins on stress-activated central CRF neurons. *Regul Pept*, 118: 183-191.

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ,

Yanagisawa M. (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92: 573-585.

Sakurai T, Nagata R, Yamanaka A, Kawamura H, Tsujino N, Muraki Y, Kageyama H, Kunita S, Takahashi S, Goto K, Koyama Y, Shioda S, Yanagisawa M. (2005) Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. *Neuron*, 46: 297-308.

Samson WK, Gosnell B, Chang JK, Resch ZT, Murphy TC. (1999) Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain. *Brain Res*, 831: 248-253.

Samson WK, Taylor MM. (2001) Hypocretin/orexin suppresses corticotroph responsiveness in vitro. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281: R1140-R1145.

Samson WK, Taylor MM, Follwell M, Ferguson AV. (2002) Orexin actions in hypothalamic paraventricular nucleus: physiological consequences and cellular correlates. *Regul Pept*, 104: 97-103.

Saper CB, Fuller PM, Pedersen NP, Lu J, Scammell TE. (2010) Sleep state switching. *Neuron*, 68: 1023-1042.

Satoh S, Matsumura H, Nakajima T, Nakahama K, Kanbayashi T, Nishino S, Yoneda H, Shigeyoshi Y. (2003) Inhibition of rostral basal forebrain neurons promotes wakefulness and induces Fos in orexin neurons. *Eur J Neurosci*, 17: 1635-1645.

Schöne C, Cao ZF, Apergis-Schoute J, Adamantidis A, Sakurai T, Burdakov D. (2012) Optogenetic probing of fast glutamatergic transmission from hypocretin/orexin to histamine neurons in situ. *J Neurosci*, 32: 12437-12443.

Seoane LM, Tovar SA, Perez D, Mallo F, Lopez M, Senaris R, Casanueva FF, Dieguez C. (2004) Orexin A suppresses in vivo GH secretion. *Eur J Endocrinol*, 150: 731-736.

Shigemoto Y, Fujii Y, Shinomiya K, Kamei C. (2004) Participation of histaminergic H1 and noradrenergic alpha 1 receptors in orexin A-induced wakefulness in rats. *Brain Res*, 1023: 121-125.

Shih CD, Chuang YC. (2007) Nitric oxide and GABA mediate bi-directional cardiovascular effects of orexin in the nucleus tractus solitarii of rats. *Neuroscience*, 149: 625-635.

Shirasaka T, Nakazato M, Matsukura S, Takasaki M, Kannan H. (1999) Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. *Am J Physiol*, 277: R1780-R1785.

Shiuchi T, Haque MS, Okamoto S, Inoue T, Kageyama H, Lee S, Toda C, Suzuki A, Bachman ES, Kim YB, Sakurai T, Yanagisawa M, Shioda S, Imoto K, Minokoshi Y. (2009) Hypothalamic orexin stimulates feeding-associated glucose utilization in skeletal muscle via sympathetic nervous system. *Cell Metab*, 10: 466-480.

Skofitsch G, Jacobowitz DM, Zamir N. (1985) Immunohistochemical localization of a melanin concentrating hormone-like peptide in the rat brain. *Brain Res Bull*, 15: 635-649.

Stark E, Makara GB, Palkovits M, Mihály K. (1970) Afferent pathways of stressful stimuli: their dependence on strength and the time elapsed after the onset of stimulation. *Acta Physiol Acad Sci Hung*, 38: 43-49.

Steinbusch HWM. Serotonin-immunoreactive neurons and their projections in the CNS. In: A Björklund, T Hökfelt, MJ Kuhar (szerk.), *Handbook of chemical neuroanatomy* Vol. 3. Elsevier, Amsterdam, 1984: 68-125.

Steininger TL, Kilduff TS, Behan M, Benca RM, Landry CF. (2004) Comparison of hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone neurons and axonal projections in the embryonic and postnatal rat brain. *J Chem Neuroanat*, 27: 165-181.

Sunanaga J, Deng BS, Zhang W, Kanmura Y, Kuwaki T. (2009) CO₂ activates orexin-containing neurons in mice. *Respir Physiol Neurobiol*, 166: 184-186.

Sved AF, Cano G, Passerin AM, Rabin BS. (2002) The locus coeruleus, Barrington's nucleus, and neural circuits of stress. *Physiol Behav*, 77: 737-742.

Swanson LW. The Hypothalamus. In: A Björklund, T Hökfelt, LW Swanson (szerk.), Handbook of Chemical Neuroanatomy Vol. 5. Elsevier, Amsterdam; New York, 1987: 1-124.

Swanson LW. Brain Maps: Structure of the Rat Brain. Elsevier, Amsterdam, 2004.

Swanson LW, Sanchez-Watts G, Watts AG. (2005) Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin mRNA expression patterns in a new parceling scheme of the lateral hypothalamic zone. *Neurosci Lett*, 387: 80-84.

Sweet DC, Levine AS, Billington CJ, Kotz CM. (1999) Feeding response to central orexins. *Brain Res*, 821: 535-538.

Taheri S, Sunter D, Dakin C, Moyes S, Seal L, Gardiner J, Rossi M, Ghatei M, Bloom S. (2000) Diurnal variation in orexin A immunoreactivity and prepro-orexin mRNA in the rat central nervous system. *Neurosci Lett*, 279: 109-112.

Takahashi K, Kayama Y, Lin JS, Sakai K. (2010) Locus coeruleus neuronal activity during the sleep-waking cycle in mice. *Neuroscience*, 169: 1115-1126.

Takahashi N, Okumura T, Yamada H, Kohgo Y. (1999) Stimulation of gastric acid secretion by centrally administered orexin-A in conscious rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 254: 623-627.

Tao R, Ma Z, McKenna JT, Thakkar MM, Winston S, Strecker RE, McCarley RW. (2006) Differential effect of orexins (hypocretins) on serotonin release in the dorsal and median raphe nuclei of freely behaving rats. *Neuroscience*, 141: 1101-1105.

Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, Cornford M, Siegel JM. (2000) Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron*, 27: 469-474.

Thompson RH, Canteras NS, Swanson LW. (1996) Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol*, 376: 143-173.

Torrealba F, Yanagisawa M, Saper CB. (2003) Colocalization of orexin a and glutamate immunoreactivity in axon terminals in the tuberomammillary nucleus in rats. *Neuroscience*, 119: 1033-1044.

Tóth ZE, Mezey E. (2007) Simultaneous visualization of multiple antigens with tyramide signal amplification using antibodies from the same species. *J Histochem Cytochem*, 55: 545-554.

Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM. (1998) Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett*, 438: 71-75.

Tsunematsu T, Fu LY, Yamanaka A, Ichiki K, Tanoue A, Sakurai T, van den Pol AN. (2008) Vasopressin increases locomotion through a V1a receptor in orexin/hypocretin neurons: implications for water homeostasis. *J Neurosci*, 28: 228-238.

Tucker DC, Saper CB, Ruggiero DA, Reis DJ. (1987) Organization of central adrenergic pathways: I. Relationships of ventrolateral medullary projections to the hypothalamus and spinal cord. *J Comp Neurol*, 259: 591-603.

Tupone D, Madden CJ, Cano G, Morrison SF. (2011) An orexinergic projection from perifornical hypothalamus to raphe pallidus increases rat brown adipose tissue thermogenesis. *J Neurosci*, 31: 15944-15955.

van den Pol AN. (1999) Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervation of the spinal cord. *J Neurosci*, 19: 3171-3182.

Vas S, Papp RS, Ádori C, Bagdy G, Palkovits M. Effect of escitalopram on the activation of melanin-concentrating hormone (MCH)-expressing neuron populations during rapid eye movement sleep rebound in rat.

Vittoz NM, Berridge CW. (2006) Hypocretin/orexin selectively increases dopamine efflux within the prefrontal cortex: involvement of the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology*, 31: 384-395.

Vittoz NM, Schmeichel B, Berridge CW. (2008) Hypocretin/orexin preferentially activates caudomedial ventral tegmental area dopamine neurons. *Eur J Neurosci*, 28: 1629-1640.

von Economo C. *Encephalitis Lethargica*. Oxford University Press, London, 1931.

Wang QP, Guan JL, Matsuoka T, Hirayana Y, Shioda S. (2003) Electron microscopic examination of the orexin immunoreactivity in the dorsal raphe nucleus. *Peptides*, 24: 925-930.

Wang QP, Koyama Y, Guan JL, Takahashi K, Kayama Y, Shioda S. (2005) The orexinergic synaptic innervation of serotonin- and orexin 1-receptor-containing neurons in the dorsal raphe nucleus. *Regul Pept*, 126: 35-42.

Watanabe S, Kuwaki T, Yanagisawa M, Fukuda Y, Shimoyama M. (2005) Persistent pain and stress activate pain-inhibitory orexin pathways. *Neuroreport*, 16: 5-8.

Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH. (2001) The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav*, 74: 683-701.

Williams G, Cai XJ, Elliott JC, Harrold JA. (2004) Anabolic neuropeptides. *Physiol Behav*, 81: 211-222.

Williams RH, Burdakov D. (2008) Hypothalamic orexins/hypocretins as regulators of breathing. *Expert Rev Mol Med*, 10: e28.

Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yanagisawa M. (2001) To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu Rev Neurosci*, 24: 429-458.

Winsky-Sommerer R, Yamanaka A, Diano S, Borok E, Roberts AJ, Sakurai T, Kilduff TS, Horvath TL, de Lecea L. (2004) Interaction between the corticotropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. *J Neurosci*, 24: 11439-11448.

Wittmann G, Hrabovszky E, Lechan RM. (2013) Distinct glutamatergic and GABAergic subsets of hypothalamic pro-opiomelanocortin neurons revealed by in situ hybridization in male rats and mice. *J Comp Neurol*, 521: 3287-3302.

Xi MC, Morales FR, Chase MH. (2001) Effects on sleep and wakefulness of the injection of hypocretin-1 (orexin-A) into the laterodorsal tegmental nucleus of the cat. *Brain Res*, 901: 259-264.

Yamada H, Okumura T, Motomura W, Kobayashi Y, Kohgo Y. (2000) Inhibition of food intake by central injection of anti-orexin antibody in fasted rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 267: 527-531.

Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. (2003a) Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron*, 38: 701-713.

Yamanaka A, Kunii K, Nambu T, Tsujino N, Sakai A, Matsuzaki I, Miwa Y, Goto K, Sakurai T. (2000) Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. *Brain Res*, 859: 404-409.

Yamanaka A, Muraki Y, Ichiki K, Tsujino N, Kilduff TS, Goto K, Sakurai T. (2006) Orexin neurons are directly and indirectly regulated by catecholamines in a complex manner. *J Neurophysiol*, 96: 284-298.

Yamanaka A, Muraki Y, Tsujino N, Goto K, Sakurai T. (2003b) Regulation of orexin neurons by the monoaminergic and cholinergic systems. *Biochem Biophys Res Commun*, 303: 120-129.

Yamanaka A, Tabuchi S, Tsunematsu T, Fukazawa Y, Tominaga M. (2010) Orexin directly excites orexin neurons through orexin 2 receptor. *J Neurosci*, 30: 12642-12652.

Yamanaka A, Tsujino N, Funahashi H, Honda K, Guan JL, Wang QP, Tominaga M, Goto K, Shioda S, Sakurai T. (2002) Orexins activate histaminergic neurons via the orexin 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 290: 1237-1245.

Yoon YS, Lee HS. (2012) Projections from melanin-concentrating hormone (MCH) neurons to the dorsal raphe or the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. *Brain Res*, 1490: 72-82.

Yoshida K, McCormack S, Espana RA, Crocker A, Scammell TE. (2006) Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *J Comp Neurol*, 494: 845-861.

Young JK, Wu M, Manaye KF, Kc P, Allard JS, Mack SO, Haxhiu MA. (2005) Orexin stimulates breathing via medullary and spinal pathways. *J Appl Physiol*, 98: 1387-1395.

Záborszky L, Alheid GF, Beinfeld MC, Eiden LE, Heimer L, Palkovits M. (1985) Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: a morphological and radioimmunological study. *Neuroscience*, 14: 427-453.

Zhang W, Sakurai T, Fukuda Y, Kuwaki T. (2006) Orexin neuron-mediated skeletal muscle vasodilation and shift of baroreflex during defense response in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290: R1654-R1663.

Zhang W, Zhang N, Sakurai T, Kuwaki T. (2009) Orexin neurons in the hypothalamus mediate cardiorespiratory responses induced by disinhibition of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res*, 1262: 25-37.

Zheng H, Patterson LM, Berthoud HR. (2005) Orexin-A projections to the caudal medulla and orexin-induced c-Fos expression, food intake, and autonomic function. *J Comp Neurol*, 485: 127-142.

Zheng H, Townsend RL, Shin AC, Patterson LM, Phifer CB, Berthoud HR. (2010) High-fat intake induced by mu-opioid activation of the nucleus accumbens is inhibited by Y1R-blockade and MC3/4R-stimulation. *Brain Res*, 1350: 131-138.

Zhu L, Onaka T, Sakurai T, Yada T. (2002) Activation of orexin neurones after noxious but not conditioned fear stimuli in rats. *Neuroreport*, 13: 1351-1353.

Zhu Y, Yamanaka A, Kunii K, Tsujino N, Goto K, Sakurai T. (2002) Orexin-mediated feeding behavior involves both leptin-sensitive and -insensitive pathways. *Physiol Behav*, 77: 251-257.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

10.1. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

1. Puskás N, **Papp RS**, Palkovits M. (2010) Interactions between orexin-immunoreactive fibers and adrenaline or noradrenaline-expressing neurons of the lower brainstem in rats and mice. *Peptides*, 31: 1589-97.
Impakt faktor: 2,654
2. **Papp RS**, Palkovits M. (2014) Brainstem projections of neurons located in various subdivisions of the dorsolateral hypothalamic area – an anterograde tract-tracing study. *Front Neuroanat*, 8: 34.
Impakt faktor: 4,058

10.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó tudományos cikkek

1. Könczöl K, Bodnár I, Zelena D, Pintér O, **Papp RS**, Palkovits M, Nagy GM, Tóth ZE. (2010) Nesfatin-1/NUCB2 may participate in the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Neurochem Int*, 57: 189-97.
Impakt faktor: 3,601
2. Kitka T, Adori C, Katai Z, Vas S, Molnar E, **Papp RS**, Toth ZE, Bagdy G. (2011) Association between the activation of MCH and orexin immunoreactive neurons and REM sleep architecture during REM rebound. *Neurochem Int*, 59: 686-94.
Impakt faktor: 2,857
3. Ruisanchez É, Cselenyák A, **Papp RS**, Németh T, Káldi K, Sándor P, Benyó Z. (2012) Perivascular expression and potent vasoconstrictor effect of dynorphin A in cerebral arteries. *PLoS One*, 7: e37798.
Impakt faktor: 3,730
4. Vas S, Ádori C, Könczöl K, Kátai Z, Pap D, **Papp RS**, Bagdy G, Palkovits M, Tóth ZE. (2013) Nesfatin-1/NUCB2 as a potential new element of sleep regulation in rats. *PLoS One*, 8:e 59809.
Impakt faktor: 3,730

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Palkovits Miklós Professor Úrnak a belém vetett hitet, a szakmai támogatást és az iránymutatást.

Köszönettel tartozom Komoly Sámuel Professor Úrnak, amiért a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV - 2012 – 0017 pályázat keretéből támogatta munkámat.

Köszönettel tartozom Dr. Gallatz Katalinnak, akihez nem csak szakmai kérdésekkel fordulhattam, és akinek kedvessége átsegített a nehezebb időszakokon is.

Hálás vagyok a Neuromorfológiai Laboratórium minden régi és új dolgozójának, mert nélkülük nem biztos, hogy itt tartanék. Hálás vagyok Helfferich Frigyesnének, Juditnak, amiért megtanított a labormunka alapjaira és Deák Szilviának, a kísérletek során nyújtott segítségéért. Köszönöm Dr. Tóth Zsuzsannának és Dr. Dobolyi Árpádnak a szakmai tanácsokat, Toronyay-Kasztner Magdolnának a lektorálásokat, Balázs Tamásnak a kávékat, Dobolyiné Renner Évának a beszélgetéseket.

Köszönöm édesanyámnak, hogy mellettem állt és támogatott.

Végül pedig köszönöm férjemnek, Tóth Zoltánnak, amiért türelemmel végigküszködte velem az elmúlt éveket.