

# A jóllakottság szabályozásáért felelős agyi hálózat vizsgálata újraetetés modellel

Doktori tézisek

**Zséli Györgyi**

Semmelweis Egyetem  
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola

Magyar Tudományos Akadémia  
Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet



- Témavezető: Dr. Fekete Csaba MD, DSc  
tudományos tanácsadó
- Hivatalos bírálók: Dr. Puskár Zita PhD  
tudományos főmunkatárs
- Dr. Gaszner Balázs MD, PhD  
egyetemi docens
- Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tóth Miklós MD, DSc  
egyetemi tanár
- Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Halasy Katalin DSc  
egyetemi tanár
- Dr. Várnainé Tóth Zsuzsanna PhD  
egyetemi kutató

Budapest

2017

## BEVEZETÉS

Az energiaháztartás szabályozásában a központi idegrendszer kulcsfontosságú szerepet játszik. Az agy összehangolja a táplálékfelvételt és az energialeadást az energiaraktárak aktuális állapotának és a szövetek energiaszükségeinek megfelelően. Ehhez a precíz szabályozáshoz az agy a vérkeringés és a perifériás idegek közvetítésével kap információkat. A vérkeringésen keresztül hormonok és metabolitok érik el a központi idegrendszert. Az energiaháztartás szabályozásával kapcsolatos hormonok egy része, mint a leptin és inzulin, a szervezetben tárolt energia mennyiségéről szállít információt, míg a béltraktusban termelődő hormonok, mint a cholecystokinin (CCK) és a polipeptide YY (PYY) felvett táplálék mennyiségéről és minőségéről szolgáltatnak jeleket. E keringő faktorok egyik fő központi idegrendszeri célpontja a nucleus arcuatus (ARC), mely idegmagban két az energiaháztartás szabályozásában kulcsszerepet játszó sejtcsoport található. Az egyik sejtcsoport táplálkozást gátló hatású peptideket termel, a pro-opiomelanokortin (POMC) fehérjéből poszttranszlációs hasítás útján keletkező  $\alpha$ -melanocita-serkentő hormont ( $\alpha$ -MSH), és cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptideket, míg a másik sejtcsoport táplálkozást serkentő hatású peptideket, agouti-related proteint (AgRP) és neuropeptid Y-t (NPY) termel. Ezek a sejtek érzékelik a hormonok és metabolitok változásait és közvetítik ezen információt az úgynevezett másodlagos táplálkozást szabályozó központok felé. E hatás közvetítésében kritikus szerepet játszik a melanokortin 4 receptor (MC4-R), mivel e receptoron fejt ki hatását az  $\alpha$ -MSH és az AgRP is. Az  $\alpha$ -MSH az MC4-R agonistája, míg az AgRP e receptor antagonistája. Az MC4-R mutációja súlyos elhízást okoz.

A gyomor és béltraktus állapotáról, annak telítettségéről, és a táplálék összetevőiről mechano- és kemoreceptorok és a béltraktus falában felszabaduló hormonok nyújtanak információt az agynak elsősorban a nervus vagus-on keresztül. E perifériás ideg axonjai a központi idegrendszerben a nucleus tractus solitarii (NTS) idegsejtjein végződnek. Az NTS sejtjei a perifériás idegek által közvetített információk mellett perifériás hormonok hatását is érzékelik és közvetítik az agy táplálkozást szabályozó sejtcsoportjai felé. Az NTS lokális agytörzsi hálózatokon kívül felszálló pályákon keresztül is befolyásolja a táplálékfelvételt. Így az NTS glutamaterg sejtjeinek aktivációja az NTS-parabrachiális mag (PBN)-centrális amygdala (CEA) pálya közvetítésével gátolja a táplálékfelvételt.

A központi idegrendszer az energiaháztartás két fő paraméterét, a táplálékfelvételt és az energialeadást általában egyidőben szabályozza, például egyszerre csökkenti a táplálékfelvételt és fokozza az energialeadást. Van azonban egy állapot, amikor e két folyamat szabályozása különválik, ez az éhezést követő újbóli táplálékfelvétel során valósul meg. Két órával a táplálékfelvétel megkezdése után az állatok jóllaknak, befejezik a táplálkozást. Ebben az időpontban az ARC POMC sejtjeinek aktivációja figyelhető meg, amire a sejtaktivációs marker, c-Fos fehérje, POMC sejtekben való megjelenése utal. Az újraetetés e szakaszában az energialeadás még nem fokozódik, csak később, 24 óra elteltével emelkedik meg. Ez alapján feltételeztük, hogy az újraetetés korai szakaszában aktiválódó neuroncsoportok és idegpályák részletes feltérképezése hozzájárul a jóllakottság kialakulásában szerepet játszó folyamatok jobb megértéséhez.

Mivel újraetetés során egyszerre aktiválódik az agy két fő energiaháztartás szabályozásában szerepet játszó szenzor területe, az NTS és az ARC POMC idegsejtjei, és az NTS szerepe jól ismert az egy táplálékfelvétel mennyiségének szabályozásában, feltételeztük, hogy az ARC POMC sejtjeit a nervus vagus-NTS-ARC pályán keresztül érkező információk aktiválják újraetetés során.

## CÉLKITŰZÉSEK

Mivel az elhízás járványszerű terjedése és a gyógyszeres terápia hiánya miatt fontos a táplálkozást szabályozó neuronhálózatok pontosabb megértése, a PhD munkám céljaul a jóllakottság kialakulásában szerepet játszó neuroncsoportok és neuronhálózatok jobb megértését tűztük ki célul. Specifikus céljaink a következők voltak:

1. Az újraetetés során aktiválódó idegsejtcsoportok feltérképezése.
2. A n. vagus és az agytörzsi felszálló idegpályák szerepének tisztázása a POMC sejtek újraetétést követő aktivációjának kialakításában.
3. A PBN anterográd és retrográd kapcsolatainak feltérképezése más újraetetés hatására aktiválódó agyterületekkel.
4. A CEA anterográd és retrográd kapcsolatainak feltérképezése más újraetetés hatására aktiválódó agyterületekkel.
5. A CEA almagok szerepének vizsgálata a táplálékfelvétel mennyiségének szabályozásában újraetetett állatokban.

## MÓDSZEREK

### Állatok

Kísérleteinkhez 270-310g tömegű, hím Wistar (TOXI-COOP KKT, Budapest, Hungary) illetve 230-250g tömegű, hím Sprague–Dawley (Charles River Hungary Ltd, Isaszeg, Hungary) patkányokat használtunk. Az állatkísérletek a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézete Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának engedélyével, valamint az Európai Unió Tanácsának 2010/63/EU irányelve szerint történtek.

### Műtéti technikák

#### *Retrográd és anterográd idegpálya-jelölés*

A retrográd irányba transzportálódó kolera toxin  $\beta$  alegységet (CTB, List Biological Laboratories) illetve az anterográd módon transzportálódó *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHAL) iontoforézissel juttattuk a PBN illetve a CEA területére (7,0  $\mu$ A erősségű, 7 másodpercenként váltakozó négyszögimpulzusos, 15 percig folyó áram), sztereotaxikus készülék segítségével pozicionált üvekapillárison keresztül (csúcsának átmérője 17,5-20  $\mu$ m), a Paxinos és Watson agyatlasz koordinátái alapján. A transzport ideje 7-10 nap volt.

#### *Vagotómia*

Mélyen altatott Sprague–Dawley patkányok hasát a középvonalban feltártuk és a nyelvőcső rekesz alatti szakasza mellett elhelyezkedő nervus vagus ágakat és a nyelvőcső e szakaszát körülvevő kötőszövetet eltávolítottuk. Álműtött, kontroll állatok esetében hasonló feltárást alkalmaztunk, de a nyelvőcső körüli kötőszövetet és a nervus vagust nem távolítottuk el. Egy nappal a műtét után a vagotomizált állatokat két, az álműtötöket három csoportra osztottuk. Az első csoport vagotomizált és az első csoport álműtött állatot 40 óráig éhezettük. A második csoport vagotomizált és álműtött állatokat az éheztetést követően újraetettük, majd 2 órával később transzkardiális perfúzióval fixáltuk. A harmadik csoport álműtött állatot éheztetés után szintén újraetettük, de csak annyit ehettek,

amennyit a vagotomizált újraetett csoport. A kísérlet végén az állatokat túlaltattuk és transzkardiális perfúzióval fixáltuk.

#### *A felszálló agytörzsi pályák féloldali átmetszése*

Altattott patkányok féloldali agytörzsi felszálló pályáit sztereotaxikus kontroll mellett metsztük át. Egy 3mm széles, téglalap alakú üveggést engedtünk le a patkányok agytörzsébe a középagy szintjében a koronális síkkal párhuzamosan. A kontroll állatok esetében azonos feltárást végeztünk el, de az üveggéssel nem hatoltunk be a középagyba. Két hét felépülési időt követően az állatok egyik csoportja éheztetésen, a másik fele éheztetést követő újraetetésen esett át. Az átmetszés hatékonyságát a POMC idegsejtek noradrenerg beidegzésének elemzésével vizsgáltuk.

#### *Neuronok aktiválása a hSyn-hM3D(Gq)-mCherry adeno-asszociált vírus (AAV; DREADD serkentő vírus) segítségével*

A hSyn-hM3D(Gq)-mCherry AAV-t sztereotaxikus műtét során juttattuk az egyik oldali CEA almagjaiba mikroinjektor segítségével. Két héttel később az állatokat 40 óráig éheztetjük, majd az újraetetés előtt 15 perccel CNO-t (a hM3D(Gq) receptor ligandját), illetve a kontroll állatok esetében fiziológiás só oldatot injektáltunk az állatokba intraperitoneálisan. Egy héttel később a kísérletet megismételtük a különbséggel, hogy az első kísérlet kontroll állatai CNO-t kaptak, míg az első alkalommal CNO-val kezelt állatok fiziológiás só oldat kezelést kaptak. A táplálékfelvétel adatait TSE PhenoMaster rendszer segítségével rögzítettük. Ismét egy hét elteltével az állatokat éheztetjük, és két csoportra osztottuk. Az egyik csoport CNO, míg a másik csoport fiziológiás sóoldatkezelésben részesült és egyik csoport sem lett újraetette. Az állatokat a kezelés után 2 órával transzkardiálisan perfundáltuk.

#### **Éheztetés-újraetetés**

Az állatoktól 40 órára megvontuk a táplálékot. Ez idő alatt víz szabadon elérhető volt számukra. Az éheztetést követően 2 órára visszaadtuk nekik az általános rágcsáló tápot. A két óra elteltével az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk.

## **Immuncitokémia**

Minden kísérlet végén az állatokat transzkardiálisan először 5-10 ml 0,1M- PBS-sel, ezt követően pedig a 150 ml 0,1 M PB-ben (pH 7,4) oldott 4%-os paraformaldehid oldattal perfundáltuk. Az agyakat az eltávolítást és posztfixálást követően 30% cukrot tartalmazó PBS-ben inkubáltuk éjen át. Az agyakból fagyasztó mikrotómmal 25 $\mu$ m vékony metszeteket készítettünk. A permeabilitás fokozásához és az endogén peroxidázok inaktiválásához a metszeteket 0,5% Triton X-100-at és 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t tartalmazó PBS-ben inkubáltuk 15 percig. Az aspecifikus fehérje kötődés megakadályozása érdekében a metszeteket 2%-os normál ló szérumot tartalmazó PBS-ben inkubáltuk. Az elsődleges antiszérumok hígítása is ugyanilyen összetételű oldatban történt.

Az egyes kísérletekben felhasznált antitesteket, kromogéneket vagy fluorokrómokokat az **1. Táblázat** foglalja össze.

## **Statisztikai analízis**

Statisztikai analízishez a Statistica 8.0 szoftvert használtuk. Az adatok átlag $\pm$ SEM értékekben kerültek kifejezésre, míg a szignifikancia szint megjelenítésére egységesen a \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$  jelölés lett alkalmazva. Általánosságban két csoport összehasonlításához t-próbát alkalmaztunk. Három vagy több csoport statisztikai vizsgálatára egy vagy két utas ANOVA vizsgálatot és ezt követően Newman–Keuls vagy Tukey HSD *post hoc* tesztet alkalmaztunk.

<b>1. Táblázat Az immunhisztokémiai eljáráshoz használt antitestek, reagensek és fluorokrómok összefoglalása</b>		
<b>Vizsgált antigén</b>	<b>Elsődleges antitest</b>	<b>Megjelenítés</b>
c-Fos	c-Fos elleni nyúl antiszérum (Oncogen; 1:10000)	biotinált-anti-nyúl IgG (Jackson), ABC biotinált tiramid erősítés, Ni-DAB
		Nissl-festés
DBH/ POMC	DBH elleni egér antiszérum (oncogene; 1:1000)	Alexa 555-konjugált számár anti-egér IgG (Invitrogen)
	POMC elleni nyúl antiszérum (Phoenix; 1:2000)	FITC-konjugált számár anti-nyúl IgG (Jackson)
c-Fos/ POMC	c-Fos elleni nyúl antiszérum (Oncogen; 1:10000)	biotinált számár anti-nyúl IgG (Jackson), ABC, biotinált tiramid erősítés, streptavidin-FITC (Vector)
	POMC elleni nyúl antiszérum (Phoenix; 1:2000)	Alexa 555-konjugált számár anti-nyúl IgG (Jackson)
CTB	CTB elleni kecske antiszérum (Listlab; 1:10000)	biotinált számár anti-birka IgG (Jackson), ABC, Ni-DAB
		Nissl-festés
PHAL	PHAL elleni kecske antiszérum (Vector; 1:10000)	biotinált számár anti-birka IgG (Jackson), ABC, Ni-DAB
		Nissl-festés
CTB/ c-Fos	CTB elleni kecske antiszérum (Listlab; 1:5000)	biotinált számár anti-birka IgG (Jackson), ABC, DAB
	c-Fos elleni nyúl antiszérum (Oncogen; 1:10000)	biotinált számár anti-nyúl IgG (Jackson) ABC, Ni-DAB
CTB/ c-Fos/ POMC	CTB elleni kecske antiszérum (Listlab; 1:10000)	biotinált-anti-birka IgG (Jackson), ABC, biotinált tiramid erősítés, streptavidin- FITC (Vector)
	c-Fos elleni nyúl antiszérum (Oncogen; 1:2000)	FITC-konjugált számár anti-nyúl IgG (Jackson)
	POMC elleni nyúl antiszérum (Phoenix; 1:2000)	Cy5 számár anti-nyúl IgG (Jackson)
PHAL/ c-Fos/ HuC/HuD	PHAL elleni kecske antiszérum (Vector; 1:5000)	biotinált számár anti-birka IgG (Jackson), ABC, biotinált tiramid erősítés, streptavidin-Alexa 555 (Vector)
	c-Fos elleni nyúl antiszérum (Oncogen; 1:2000)	FITC-konjugált számár anti-nyúl IgG (Jackson)
	HUC/D elleni egér antiszérum (Molecular probes; 1:500)	Cy5-anti-egér IgG (Jackson)
c-Fos/ RFP/ HuC/HuD	c-Fos elleni nyúl antiszérum (Oncogen; 1:10000)	biotinált-anti-nyúl IgG (Jackson), ABC, biotinált tiramid erősítés, streptavidin-FITC (Vector)
	RFP elleni nyúl antiszérum (1:3000, Rockland)	Alexa 555-konjugált számár anti-nyúl IgG (Jackson)
	HUC/D elleni egér antiszérum (Molecular probes; 1:500)	DyLight 649-konjugált anti-egér IgG (Jackson)



## EREDMÉNYEK

### **Éhezést követő újraetetés hatására aktiválódó agyterületek feltérképezése**

Az előagyban, újraetetés hatására a c-Fos tartalmú idegsejtek számának legnagyobb mértékű növekedése a következő agyterületeken volt megfigyelhető: prelimbikus kéreg, CEA, bed nucleus of stria terminalis (BST), e magon belül elsősorban a mediális almag, hypothalamikus dorzomediális mag, lateralis preoptikus terület, a hypothalamus paraventrikuláris magjának (PVN) ventrális és laterális parvocelluláris almagjai (PVNv, PVNI). Az agytörzsben a legnagyobb mértékű, újraetetés hatására kialakuló idegsejt aktiváció növekedés a PBN mediális és laterális almagjaiban, NTS középső és commissurális almagjaiban és az area postremában volt megfigyelhető. Kisebb mértékű aktivitás fokozódás volt észlelhető a szomatoszenzoros kéregben a szájfelszín, állkapcsi és felső ajak régiójában, a medialis orbitális kéregben, a laterális szagló traktusban, a piriform-amygdalar areaban, a szagló gumóban, a poszterolaterális kérgi amygdaloid nucleus-ban, agranularis insuláris területen és a másodlagos motoros kéregben. Mérsékelt neuronális aktiválódás jelent meg az amygdaloid komplex-ben a mediális amygdalában, corticalis amygdaloid nucleus-ban, a köztiagyban az anterior hypothalamikus területen, a laterális hypothalamikus területen, az ARC laterális és dorzomediális posterior területén, a zona incertában, a thalamus paraventrikuláris és parateniális magjaiban. A középagyi periaqueductális szürkeállományban (PAG) a c-Fos tartalmú idegsejtek eloszlásának átrendeződése volt megfigyelhető. Míg éhező állatokban a PAG ventrolaterális almagjának laterális részén, addig újraetettet állatban az almag ventrális részén koncentrálódtak a c-Fos tartalmú neuronok. Az éhező állatokhoz képest csökkent neuronális aktiváció volt tapasztalható a nucleus reuniens-ben, a középagyi retikuláris magban és a hídi szürkeállományban. Kisebb mértékű aktivitáscsökkenés volt megfigyelhető a laterális septális magban.

## **A nervus vagus és az agytörzsi felszálló pályák szerepe az ARC POMC neuronjainak újraetetés során megfigyelhető aktiválódásának kialakulásában**

### *A kísérleti állatok táplálék- és vízfelvétele újraetetés alatt*

Az álműtött állatok szignifikánsan többet ettek (álműtött vs. vagotomizált 2 órás újraetetés:  $8,1 \pm 0,7$  g vs.  $2,7 \pm 0,6$  g;  $p < 0,001$ ) és ittak (álműtött vs. vagotomizált 1 órás vízbevitel:  $7,6 \pm 0,9$  g vs.  $2,4 \pm 0,6$  g;  $p < 0,001$ ; 2 órás vízbevitel:  $13,2 \pm 2,5$  g vs.  $6,5 \pm 5,0$  g;  $p < 0,05$ ) mint a vagotomizált állatok. Az álműtött állatok *pairfed* csoportja 2,7 g tápot fogyasztott az újraetetés során. A féloldali agytörzsi átmetszésen átesett patkányok ugyanannyit ettek, mint az álműtött csoport állatai (álműtött vs. átmetszett:  $8,7 \pm 0,9$  g vs.  $8,7 \pm 0,6$  g) a két órás újraetelési periódus alatt.

### *A vagotómia hatása az ARC POMC neuronjainak aktiválódására újraetetés során*

Az ARC POMC neuronjainak aktiválódására mind az újraetetésnek, mind pedig a vagotómiának volt befolyásoló hatása ( $p < 0,01$ , kétutas ANOVA-val elemezve). Éhező vagotomizált és álműtött állatokban is csak néhány POMC immunreaktív neuron tartalmazott c-Fos-t. Az újraetetés hatására az álműtött állatokban lényegesen megnőtt a c-Fos-tartalmú POMC neuronok száma. Kisebb mértékben ugyan, de emelkedett a vagotomizált állatokban is a kettősen jelölt, POMC- és c-Fos-immunreaktivitást is tartalmazó neuronok száma az újraetetés következtében. Az álműtött, de a vagotómián átesett újraetett állatokkal azonos mennyiségű táplálékot fogyasztó (*pairfed*) csoportban az aktivált POMC sejtek száma még kevesebb volt, de az éhező csoporthoz képest itt is a POMC/c-Fos sejtek számának növekedése volt megfigyelhető. (c-Fos tartalmú POMC neuronok száma, álműtött éhezett vs. álműtött újraetett vs. álműtött *pairfed*:  $2,1 \pm 1,5\%$  vs.  $48,7 \pm 3,7\%$  vs.  $13,5 \pm 2,4\%$ ;  $p < 0,05$ ; vagotomizált éhező vs. vagotomizált újraetett:  $2,9 \pm 0,7\%$  vs.  $27,6 \pm 2,4\%$ ;  $p < 0,001$ , egyutas ANOVA-vát követő Newman–Keuls *post-hoc* teszttel elemezve).

## **A féloldali agytörzsi átmetszés hatása az ARC POMC neuronjainak aktiválódására újraetetés során**

A féloldali agytörzsi átmetszés hatékonyságát az ARC POMC idegsejtjeinek felszínén végződő noradrenerg (dopamin  $\beta$  hidroxiláz (DBH) tartalmú rostok) axonvarikozitások

számának vizsgálatával ellenőriztük. Az átmetszés oldalán a POMC neuronok felszínén megfigyelhető DBH-IR axonvarikozitás száma  $74,05 \pm 3,55\%$ -kal csökkent az intakt oldalhoz képest. Továbbá csökkent azoknak a POMC neuronoknak a száma is, amelyek felszínén DBH-IR axonvarikozitás volt megfigyelhető. Ez a változás jelen volt mind az éhezõ, mind az újraetett állatokban. (intakt oldal vs. átmetszett oldal éhezõ állatban:  $93,1 \pm 3,1\%$  vs  $50,8 \pm 13,1\%$ ; újraetett állatban:  $91,8 \pm 2,9\%$  vs  $56,2 \pm 2,8\%$ ;  $p < 0,05$ ).

Éhezõ állatokban az átmetszés oldalán és az intakt oldali ARC-ban is csak néhány c-Fos-IR POMC neuron volt megfigyelhető. Az újraetetés a c-Fos jelölt POMC neuronok számának jelentõs mértékû, szignifikáns emelkedését eredményezte az álmûtött állatokban és a féloldali agytörzsi átmetszésen átesett állatok ARC-ának mindkét oldalán is (kettõsjelölt POMC neuronok százaléka, intakt oldal éhezõ vs. intakt oldal, újraetett:  $6,5 \pm 2,6\%$  vs.  $28,0 \pm 3,4\%$ ;  $p < 0,001$ ; átmetszett oldal éhezõ vs. átmetszett oldal újraetett:  $7,4\% \pm 2,3$  vs.  $25,2 \pm 3,81\%$ ;  $p < 0,001$ ). Az átmetszésnek nem volt hatása az újraetetés során megjelenõ aktivált POMC neuronok mennyiségére ( $p = 0,37$ ). A c-Fos-IR POMC neuronok száma hasonló volt az álmûtött újraetett állatokban mindkét oldalon és az átmetszett agytörzsi újraetett állatok ARC-ának mindkét oldalán ( $23,4 \pm 4,6$ ; álmûtött vs. átmetszett oldal újraetett,  $p = 0,75$ ; álmûtött vs. intakt oldal újraetett,  $p = 0,69$ ).

### **A PBN újraetetés során aktiválódó agyterületekkel létesített kapcsolatai**

#### *A PBN újraetetés során aktivált területekrõl származó beidegzésének eredete*

Újraetett állatokban a legnagyobb számban a PVNv, PVNI, PSTN és az NTS középsõ és commissuralis almagjának területén figyeltünk meg újraetetés hatására aktiválódó (c-Fos-tartalmú) és a PBN-bõl retrográd úton feltöltõdõ (CTB-tartalmú) idegsejteket. Kisebb számú CTB-tartalmú neuronban a BST, a CEA, az LH és az AP területén észleltünk c-Fos-immunreaktivitást. Elszórtan az agranuláris inzuláris kéregben, az elülsõ hypothalamusban, az ARC-ban, a hypothalamus dorzomediális magjában és a zona incertában is jelen voltak kettõsen jelölt c-Fos és CTB tartalmú idegsejtek.

#### *A PBN és az ARC újraetetés hatására aktiválódó POMC idegsejtjei közti kapcsolat vizsgálata*

Hármas jelöléses metszeteken vizsgáltuk a PBN és újraetetés hatására aktiválódó ARC POMC neuronok közvetlen és közvetett kapcsolatait. Újraetétést követõen az ARC

területén nagyszámú c-Fos-tartalmú POMC idegsejt volt megfigyelhető, azonban e sejtek közül csak (1 vagy 2 sejt/metszet) néhány tartalmazott CTB-t a retrográd pályajelölő anyag PBN-be injektálását követően. A PVNv, PVNI és a PSTN területén azonban nagy számban észleltünk PBN-be vetülő, újraetetés hatására aktiválódó idegsejtet, melyek felszínén POMC-IR varikozitások voltak kimutathatók, ami arra utal, hogy e területek idegsejtjei közvetíthetik a POMC sejtek hatását a PBN felé.

#### *A PBN által beidegzett, újraetetés hatására aktiválódó neuron csoportok feltérképezése*

A PHAL PBN-be történt injektálását követően nagyszámú PHAL-IR axon volt jelen a BST-ben, CEA-ban és a PSTN-ben, ahol a PHAL-tartalmú axon varikozitások és a c-Fos-IR idegsejtek közvetlen kapcsolata volt megfigyelhető. PHAL-IR axonok kevésbé sűrű hálózata volt jelen az elülső hypothalamusban, a PVNv és PVNI-ben, ARC-ban, DMN-ben, LH-ban, ZI-ban, ahol a PBN eredetű axonok szintén kapcsolatot létesítettek újraetetés hatására aktiválódó idegsejtekkel. Kiszámú újraetetés hatására aktivált neuronhoz asszociált PHAL-IR rost volt megfigyelhető az AI-ben és az NTS-ben.

### **A CEA újraetetés során aktiválódó agyterületekkel létesített kapcsolatai**

#### *A CEA újraetetés során aktivált területekről származó beidegzésének eredete*

A retrográd pályajelölő anyag, CTB, CEA-ba történt injektálását követően nagyszámú CTB-IR és újraetetés hatására aktivált, c-Fos-IR neuron volt található a PVN-ben, a PSTN-ben, a PBN-ben és a PAGvl-ben. Kisebb számban a prelimbikus kéreg, agranuláris insularis terület, visceralis, piriform és elsődleges szomatoszenzoros kéreg, BST, ARC, PeF, LH, ZI és az NTS területén is figyeltünk meg kettősen jelölt neuronokat.

#### *A CEA és az ARC újraetetés hatására aktiválódó POMC idegsejtjei közti kapcsolat vizsgálata*

A c-Fos, POMC és CTB jelölt metszetek konfokális mikroszkópos képeinek elemzése során csak néhány újraetetés hatására aktivált POMC-neuront találtunk az ARC területén, amelyek vetülnek a CEA-ba. Azonban a PSTN területén számos CEA-ba vetülő és újraetetés hatására aktivált idegsejt felszínén észleltünk POMC-IR axonvarikozitásokat, ami a PSTN közvetítő szerepére utalhat.

*A CEA által beidegzett, újraetetés hatására aktiválódó neuron csoportok feltérképezése*

PHAL CEA-ba történő beadását követően, PHAL-IR axonok gyakran létesítettek kontaktust újraetetés hatására aktivált idegsejtekkel a beadással azonos oldalon a BST-ben, az LH-ban, a PVN posterior magnocellularis részében, a PSTN-ben, a PVT-ben, a PAG-ban, az NTS-ben és a PBN-ben. A PVN mediális parvicellularis részében csak néhány PHAL-IR rost volt megfigyelhető c-Fos-IR idegsejtek felszínén.

### **A CEA almagjainak a táplálékfelvételre gyakorolt hatása éhezést követő újraetetés során**

A CEAm kemogenetikai aktiválása szignifikáns csökkenést okozott az elfogyasztott táplálék mennyiségében az újraetetés első órájában (CNO vs. kontroll mg/g sovány testtömeg: 15,32±3,69 vs. 23,32±5,1; p<0,01), a második órában ezzel ellentétben szignifikáns emelkedést eredményezett (10,51 ±5,03 vs. 2,46±2,56; p<0,01) A két óra során összességében elfogyasztott táplálék mennyisége nem változott a CEAm aktiválásának hatására, azonban az éhezés utáni evés intenzitását csökkentette és késleltette a jóllakás elérését. A CEAlc aktiválása némileg csökkentette a táplálékfelvétel mennyiségét az újraetetés első órájában, de nem szignifikáns mértékben, a második órában pedig nem volt megfigyelhető változás ennek hatására.

*A CEA almagjainak más, újraetetés során aktiválódó agyterületek idegsejtjeire gyakorolt hatása*

Mindkét almag, a CEAm és a CEAlc, aktiválása is más, újraetetéssel kapcsolatban lévő területeken neuronális aktivációt eredményezett. A CEAm a BST-ben PSTN-ben és a PBN-ben szignifikánsan megnövelte a c-Fos-tartalmú idegsejtek számát, míg a CEAlc ennél kisebb mértékű, de szignifikáns növekedést okozott a PBN-ben az aktivált neuronok számában, de nem befolyásolta a neuronális aktivitást a BST-ben és a PSTN-ben.

## KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteink eredményei részletes információt szolgáltatnak az újraetetés hatására aktiválódó idegsejtcsoportok eloszlásáról. Ezen információ elősegíti a jóllakottság kialakulásáért felelős idegi hálózatok jobb megértését. Adataink igazolják a táplálkozás szabályozásában betöltött szerepükről jól ismert idegsejtcsoportok, mint az ARC POMC sejtsjei, az NTS, PBN és CEA szerepét az újraetetés során kialakuló jóllakottság létrehozásában, és felvetik olyan agyterületek szerepét, melyek energiaháztartás szabályozásában betöltött szerepe nem tisztázott. E területek további vizsgálata fontos, új adatokat szolgáltathat a táplálkozás agyi szabályozásának megértéséhez.

Eredményeink igazolták, hogy az ARC POMC idegsejtjei a nervus vagustól és az agytörzsi felszálló inputoktól függetlenül aktiválódnak, ami valószínűsíti, hogy e sejtek aktivációja közvetlenül a vérben keringő hormonok és metabolitok hatására alakul ki újraetetés során. Feltételezzük, hogy újraetetéskor a keringő faktorok a munkacsoportunk által korábban leírt, ARC-PVNv-NTS pályán keresztül szabályozzák az NTS érzékenységet a nervus vaguson keresztül érkező információkra.

A PBN és a CEA újraetetés során aktiválódó idegsejt csoportokkal létesített kapcsolatrendszerének feltérképezése rávilágított arra, hogy az újraetetés során aktiválódó sejtcsoportok egymással kétirányú kapcsolatokat létesítenek, felvetve a lehetőségét, hogy e sejtcsoportok közt nem egyirányú az információ áramlása, hanem visszacsatoló kapcsolatok biztosítják az egyes sejtcsoportok aktivitásának precíz beállítását. Vizsgálataink, a PSTN feltárt kapcsolatai alapján felvetik, hogy e sejtcsoportnak központi integrátor szerepe lehet a jóllakottságot kialakító ideghálózat szabályozásában.

A pályajelölési vizsgálatainkkal együtt a CEA almagjainak szerepét vizsgáló kísérleteink eredményei arra utalnak, hogy újraetetés során a mediális PBN, a mediális CEA és a két terület kapcsolata fontos szerepet játszik a táplálkozás szabályozásában. E pálya eltér a Dr. Palmiter munkacsoportja által leírt PBNel-CEAcl pályától, melyben gasztrointesztinális diszkonfort hatására a PBN CGRP idegsejtjei gátolják a CEAcl idegsejtjeinek aktiválásán keresztül a táplálékfelvételt. Így feltételezzük, hogy a PBN és CEA között több táplálkozást szabályozó pálya létezik, melyek különböző fiziológiás és pathofiziológiás körülmények között eltérően tudják szabályozni a táplálékfelvételt.

## PUBLIKÁCIÓS LISTA

### A dolgozat témájában megjelent közlemények

**Zséli G.**, Vida B, Martinez A, Lechan R M, Khan A M, Fekete C (2016) Elucidation of the Anatomy of a Satiety Network: Focus on Connectivity of the Parabrachial Nucleus in the Adult Rat. *J Comp Neurol* 524(14), pp. 2803-27

Fekete C\*, **Zséli G\***, Singru PS, Kádár A, Wittmann G, Füzesi T, El-Bermani W, Lechan RM (2012) Activation of Anorexigenic Pro-Opiomelanocortin Neurons during Refeeding is Independent of Vagal and Brainstem Inputs. *J Neuroendocrinol* 24 (11), pp. 1423-1431  
\* megosztott első szerzők

Singru PS, Wittmann G, Farkas E, **Zséli G.**, Fekete C, Lechan RM (2012) Refeeding-activated glutamatergic neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) mediate effects of melanocortin signaling in the nucleus tractus solitarius (NTS) *Endocrinology* 153 (8), pp. 3804-3814

### Egyéb közlemények

Sárvári A, Farkas E, Kádár A, **Zséli G.**, Füzesi T, Lechan RM, Fekete C (2012) Thyrotropin-releasing hormone-containing axons innervate histaminergic neurons in the tuberomammillary nucleus. *Brain Res* 1488, pp. 72-80

Kiss L, Pintye A, **Zséli G.**, Jankovics T, Szentiványi O, Hafez YM, Cook RTA (2010) Microcyclic conidiogenesis in powdery mildews and its association with intracellular parasitism by *Ampelomyces*. *Eur J Plant Pathol* 126 (4), pp. 445

