

A hypothalamus dorsomedialis magjának szerepe a táplálékfelvétel központi szabályozásában

Doktori értekezés

Dobolyiné Renner Éva

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Halasy Katalin egyetemi tanár, az MTA doktora
Dr. Oláh Márk egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Vigh Béla egyetemi tanár, az MTA doktora
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kovács Krisztina Judit csoportvezető, az MTA doktora
Dr. Lovas Gábor főorvos, Ph.D.

Budapest
2013

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2. BEVEZETÉS	8
2.1. <i>A táplálékfelvétel központi idegrendszeri szabályozása</i>	<i>8</i>
2.2. <i>A hypothalamus szerepe a táplálékfelvétel szabályozásában.....</i>	<i>10</i>
2.3. <i>A hypothalamus dorsomediális magjának szerepe a táplálékfelvétel szabályozásában.....</i>	<i>11</i>
2.4. <i>A táplálékfelvétel szabályozásában résztvevő neuropeptidok.....</i>	<i>13</i>
2.5. <i>Glucagon-szerű peptid-1</i>	<i>14</i>
2.6. <i>Prolactin-releasing peptid</i>	<i>16</i>
3. CÉLKITŰZÉSEK	17
4. MÓDSZEREK	18
4.1. <i>Kísérleti állatok.....</i>	<i>18</i>
4.2. <i>Az éheztetés-újraetetés kísérleti eljárás 1.....</i>	<i>18</i>
4.3. <i>Az éheztetés-újraetetés kísérleti eljárás 2.....</i>	<i>19</i>
4.4. <i>MSG kezelés.....</i>	<i>20</i>
4.5. <i>Idegpályák átvágása</i>	<i>20</i>
4.6. <i>Az agyak szövettani feldolgozása</i>	<i>21</i>
4.7. <i>Hisztológiai festési eljárások.....</i>	<i>22</i>
4.7.1. <i>Krezil-ibolya festés</i>	<i>22</i>
4.7.2. <i>Luxol Fast Blue krezil-ibolya festés.....</i>	<i>22</i>
4.7.3. <i>Fos immunhisztokémia</i>	<i>23</i>
4.7.4. <i>Fluoreszcens Nissl festés Fos immunfestéssel kombinálva</i>	<i>23</i>
4.7.5. <i>PrRP és GLP-1 immunhisztokémia</i>	<i>23</i>
4.7.6. <i>PrRP/GLP-1 és Fos dupla immunhisztokémia</i>	<i>24</i>
4.7.7. <i>PrRP és TH dupla immunhisztokémia</i>	<i>24</i>
4.8. <i>In situ hibridizációs hisztokémia</i>	<i>25</i>
4.8.1. <i>C-fos és GLP-1R in situ hibridizációs próbák előállítása.....</i>	<i>25</i>
4.8.2. <i>In situ hibridizációs hisztokémiai eljárás</i>	<i>26</i>
4.8.3. <i>GLP-1R in situ hibridizációjának és Fos immunhisztokémiai festésének kombinációja</i>	<i>26</i>
4.9. <i>Mikroszkópia és fényképezés.....</i>	<i>27</i>
4.10. <i>A Fos kifejeződés kvantitatív analízise</i>	<i>27</i>
5. EREDMÉNYEK.....	28

5.1. Jóllakottság hatása a dorsomediális mag sejtjeinek aktivitására.....	28
5.1.1. Testtömegváltozás és táplálékfelvétel az éheztetéses-újraetetéses kísérletek során.....	28
5.1.2. Fos expresszió éheztetés és újraetetés hatására	29
5.1.3. Fos-ir sejtek lokalizációjának topográfiai azonosítása	31
5.1.4. Fos mRNS megjelenése újraetetés hatására	32
5.1.5. Fos aktiválódás gyomortelítettség után a DMV-ban.....	33
5.2. DMV-beli idegrostok és agytörzsi eredetük.....	36
5.2.1. PrRP-tartalmú idegrostok és idegvégződések a DMH-ban	36
5.2.2. Az NTS PrRP-tartalmú sejtjei, és az azokból kiinduló felszálló rostok	37
5.2.3. GLP-1 tartalmú idegrostok és idegvégződések a DMH-ban	40
5.2.4. A GLP-1 sejtek a PrRP-sejtektől elkülönülő populációt alkotnak.....	40
5.3. Pályaátvágás és lézió hatása a DMH-beli PrRP és GLP-1 rostokra és a Fos aktivációra.....	42
5.3.1. PrRP rostok átvágása és ennek hatása a Fos aktivációra.....	42
5.3.2. GLP-1 tartalmú nyúltvelői-hypothalamikus útvonal és átmetszésének a hatása a DMH-ban található neuronok Fos aktivitására	45
5.3.3. A Fos-ir neuronok száma a solitarii-hypothalamikus pálya átvágásának hatására.....	47
5.3.4. GLP-1 receptorok (GLP-1R) a DMH-ban	48
5.3.5. Az MSG kezelés hatása a Fos aktivációra a DMH-ban.....	50
6. MEGBESZÉLÉS	52
6.1. A DMH neuronok aktivációja.....	52
6.2. A DMH neuronokat aktiváló inger.....	53
6.3. A solitarii-hypothalamikus pálya szerepe a DMH neuronok aktivációjában	53
6.4. PrRP-tartalmú neuronális bemenet a DMH ventralis szubdivíziójába.....	54
6.5. GLP-1 neuropeptid-receptor rendszer a DMH ventralis szubdivíziójában	55
6.6. A DMH neuronok aktivációját potenciálisan befolyásoló egyéb neuronális transzmitterek	56
6.7. Az NTS-DMH projekció funkcionális jelentősége	57
6.8. A felszálló NTS-DMH projekcióban levő PrRP potenciális szerepe	58
6.9. A felszálló NTS-DMH projekcióban levő GLP-1 potenciális szerepe	58
6.10. A DMH neuronjainak lehetséges funkciói.....	59
7. KÖVETKEZTETÉSEK	61
8. ÖSSZEFOGLALÁS	62
9. SUMMARY.....	63
10. IRODALOMJEGYZÉK	64
11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	75

<i>11.1. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények</i>	75
<i>11.2. Egyéb tudományos cikkek</i>	75
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	76

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A rövidítések egyértelmősége érdekében a táblázat az anatómiai elnevezések esetében, amennyiben lehetséges, a szokásos angol formát, valamint a latin kifejezést is tartalmazza:

Rövidítés	Angol elnevezés	Latin elnevezés
AgRP	agouti-related peptide	
Amy	amygdala	nucleus amygdaloideus
AP	area postrema	area postrema
AN, Arc	arcuate nucleus	nucleus arcuatus
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	
CART	cocaine-and-amphetamine-regulated transcript	
cc	central canal	canalis centralis
CCK	cholecystokinin	
CG	celiac ganglion	ganglion coeliacum
cp	cerebral peduncle	pedunculus cerebri
CRH	corticotropin-releasing hormone	
Cx	cerebral cortex	cortex cerebri
DAB	3'3-diaminobenzidine	
DM(H)	dorsomedial hypothalamic nucleus	nucleus dorsomedialis hypothalamicus
DM(H)d	DM(H), dorsal subdivision	DM(H), pars dorsalis
DM(H)c	DM(H), compact subdivision	DM(H), pars compacta
DM(H)v	DM(H), ventral subdivision	DM(H), pars ventralis
DVN	dorsal motor vagal nucleus	nucleus motorius vagalis dorsalis
f	fornix	fornix
FITC	fluorescein-isothiocyanate	
GLP	glucagon-like peptide	
Gr	gracile nucleus	nucleus gracilis
GRPP	glicentin-related pancreatic peptide	

Hipp	hippocampus	hippocampus
IML	intermediolateral cell column	columna intermediolateralis
IP	intervening peptide	
IR	interpeduncular recess of the third ventricle	recessus interpeduncularis ventriculus tertius
LFB	Luxol Fast Blue	
LH	lateral hypothalamic area	
MCH	melanin-concentrating hormone	
mcp	medial cerebellar peduncle	pedunculus cerebellaris medialis
mfh	medial forebrain bundle	fasciculus medialis telencephali
ml	medial lemniscus	lemniscus medialis
MSG	monosodium glutamate	
α MSH	alpha melanocyte stimulating peptide	
mt	mamillothalamic tract	tractus mamillothalamicus
m5	motor trigeminal nucleus	nucleus motorius nervi trigemini
NPY	neuropeptide Y	
NTS	nucleus of the solitary tract	nucleus tractus solitarii
oc	optic chiasm	chiasma opticum
PB	phosphate buffer	
PBN	parabrachial nucleus	nucleus parabrachialis
Pe	hypothalamic periventricular nucleus	nucleus periventricularis hypothalamicus
PF	perifornical area	area perifornicalis
PnC	pontine reticular nu., caudal part	nucleus reticularis pontis, pars caudalis
PrRP	prolactin-releasing peptide	
PVN	hypothalamic paraventricular nucleus	nucleus paraventricularis hypothalamicus
SCN	suprachiasmatic nucleus	nucleus suprachiasmaticus
scp	superior cerebellar peduncle	pedunculus cerebellaris superior
SN	substantia nigra	substantia nigra
sp5	spinal trigeminal tract	tractus spinalis trigeminalis

SOC	superior olivary complex	
TH	tyrosine hydroxylase	
TRH	thyrotropin-releasing hormone	
VCN	ventral cochlear nucleus	nucleus cochlearis ventralis
VMH	hypothalamic ventromedial nucleus	nucleus ventromedialis hypothalami
VPM	ventral posteromedial thalamic nucleus	nucleus ventralis posteromedialis thalami
3V	third ventricle	ventriculus tertius, ventriculus III
7n	facial nerve	nervus facialis

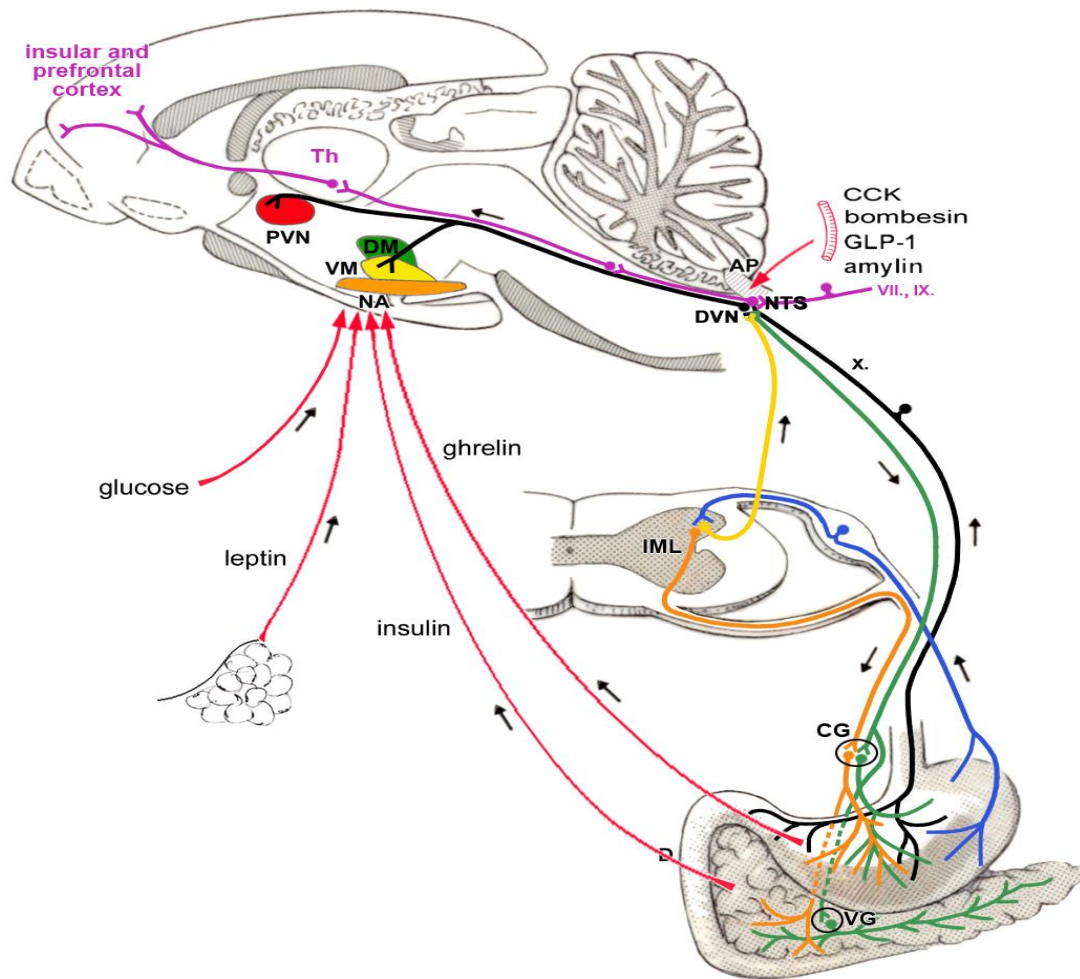
2. BEVEZETÉS

2.1. A táplálékfelvétel központi idegrendszeri szabályozása

A táplálékfelvétel célja a szervezet energiaraktárainak a feltöltése. Egy homeosztatikusan kijelölt beállítási pont (set point) körüli tápanyagraktár feltöltöttségi szintre törekszik a szervezet. A feltöltésnek határt szab, ha ennek a beállítási pontnak megfelelő mértéket eléri a táplálékfelvétel, ezt ún. testsúlyt meghatározó (adiposity) szignálok szabályozzák. A táplálékfelvételnek az is határt szab, ha az elérte adott pillanatban a fiziológiás maximumát, ezt az agy felé jóllakottsági, vagy telítettségi (satiety) szignálok közvetítik (Palkovits 2003). A szignálok elsősorban hormonok formájában érik el az idegrendszert. Bár a két rendszer közötti szétválasztás nem mindig egyértelmű, általánosságban mégis elmondható, hogy a testsúlyt meghatározó szignálok közvetlenül a hypothalamust érik el (Coll és mtsai 2007, Woods 2005, Wynne és mtsai 2005). Itt, az arcuatus mag (Arc) ventromedialis részén részben nyitott a vér-agy gát, ami lehetővé teszi a hormonoknak a megfelelő receptorokkal rendelkező neuronokhoz való hozzáférését. Így a zsírszövetből felszabaduló leptin, a gyomorból felszabaduló ghrelin, vagy a pancreas eredetű inzulin elsősorban a hypothalamus sejtjeire hat (Elias és mtsai 2000, Kobelt és mtsai 2008). Ezzel ellentétben, a jóllakottsági szignálok elsősorban az alsó agytörzsben elhelyezkedő neuronokon keresztül fejtik ki hatásukat (1. ábra). Szemben a tónusosan aktív testsúlyt meghatározó szignálokkal, melyek folyamatosan szolgáltatják az információt, a jóllakottsági szignálok az aktuálisan elfogyasztott táplálék mennyiségével függenek össze. A jóllakottsági szignálokat perifériás afferens idegek, elsősorban a nervus vagus közvetítik az NTS-be, valamint a keringési rendszerből is érkeznek jóllakottsági szignálok. Célterületük a nucleus tractus solitarii (NTS) nevezetű mag, egy visceroszenzoros sejtcsoport a nyúltvelő dorsomedialis részén. A gyomor-bél traktusból származó perifériás idegek többek között a gyomor telítettségéről hoznak információt. Az idegrostvégződések glutamát mellett neuromodulátor peptideket is tartalmaznak, pl. a kolecisztokinint (CCK) és bombesin-t. A bélből a vérkeringésbe jutó CCK emellett hormonként is szolgál. Más jóllakottsági hormonokhoz hasonlóan az NTS felett elhelyezkedő zona subpostremán keresztül jut be az idegrendszerbe, mert itt, a circumventricularis szervekre jellemzően,

nyitott a vér-agy gát. A CCK mellett a bombesin, a perifériás glucagon-like peptide-1 (GLP-1), és a hasnyálmirigy eredetű amylin jóllakottsági szignál szerepét is igazolták (Chaudhri és mtsai 2008, Crawley és Corwin 1994, Lutz 2005).

A NTS és a hypothalamus természetesen egymással is kommunikál felszálló és leszálló pályákon keresztül a táplálékfelvétel finomszabályozása érdekében (1. ábra). Azok a hypothalamikus neuronok, amelyekre testsúlyt meghatározó szignálok hatnak, befolyásolják a jóllakottsági szignálok küszöbértékét az agytörzsben (Coll és mtsai 2007, Woods 2005). Ezzel ellentétben, az agytörzsi táplálékfelvétellel kapcsolatos átkapcsolómagvak befolyása a hypothalamikus rendszerekre kevésbé ismert (Luckman és Lawrence 2003). Az NTS a solitarii-hypothalamikus pályán, illetve a laterális parabrachiális magban (PBN) részben átkapcsolódva küld információt a hypothalamus felé (Pierret és mtsai 1994). Ez a projekció lehet az anatómiai kapcsolat a nyúltvelői viszceroszenzoros központ és a hypothalamikus energia-homeosztázist szabályozó körök között (Rinaman 2010). A rendszer kimenete egyfelől viselkedésbeli változás, az evés abbahagyása, de emellett a vegetatív idegrendszerre ható kimenetek is fontosak (Loewy 1991, Palkovits 1999), amik a gerincvelő intermediolaterális (szimpatikus) és a dorsal motor vagus (paraszimpatikus) magján keresztül valósulnak meg (1. ábra).



1. ábra

A táplálékfelvétel szabályozásának vázlatja. Az ábra szemlélteti a résztvevő fő agypályák és hormonális elemek (piros nyilak) feltüntetésével, hogy míg a táplálékfelvétel szabályozással kapcsolatos idegi bemenet a nucleus tractus solitarii-n keresztül jut az agyba, hormonális bemenet az area postrema és az arcuatus magon keresztül is érkezik (Palkovits 2003).

2.2. A hypothalamus szerepe a táplálékfelvétel szabályozásában

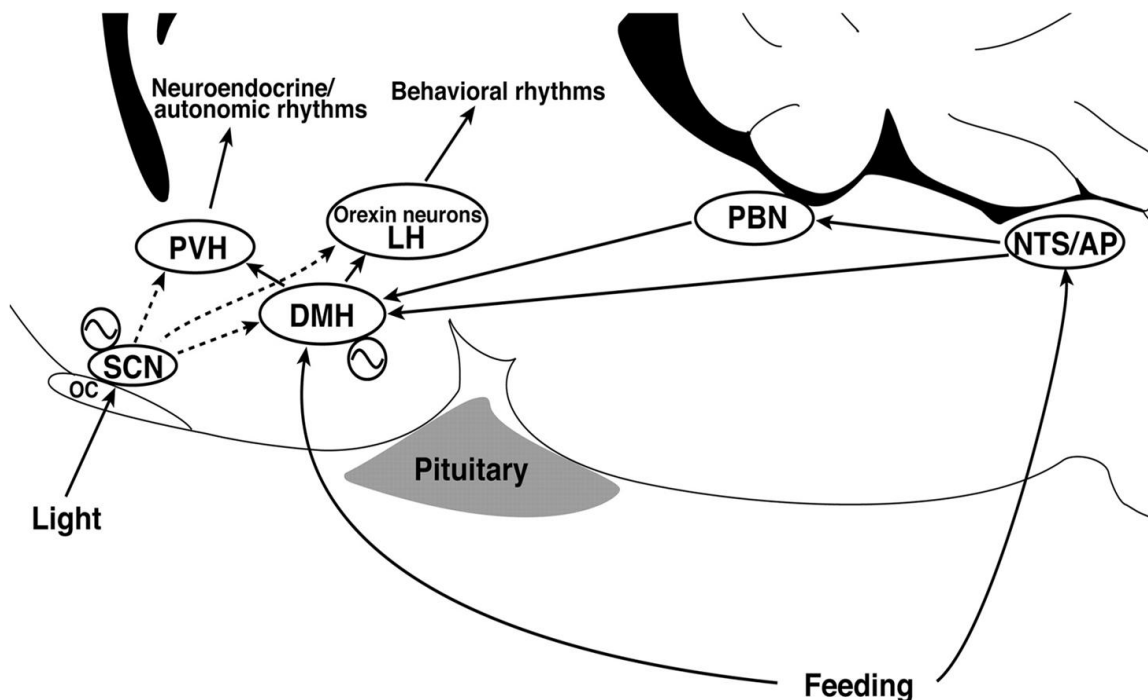
A hypothalamus központi szerepe a táplálékfelvétel és energia felhasználás szabályozásában régóta jól megalapozott kutatási eredményeken alapul. Lokális agyi léziókkal itt már évtizedekkel ezelőtt sikerült éhség-, és jóllakottsági központokat azonosítani. A hypothalamus táplálékfelvételben játszott szerepét a modern élettan már kifinomultabb eszközökkel vizsgálja, és óvatosabban értelmezi (Coll és mtsai 2007,

Palkovits 2003, Valassi és mtsai 2008, Woods és D'Alessio 2008). Az arcuatus mag a kapuja a testsúlyt meghatározó szignálok jelentős részének, ami táplálékfelvételt serkentő (orexigén) és táplálékfelvételt gátló (anorexigén) neuronokat is tartalmaz. Ezek az idegsejtek információt közvetítenek a perifériáról a paraventriculáris, dorsomediális, és ventromediális maghoz, valamint a laterális hypothalamikus areához, amely területek mindegyike kritikus szereppel bír a testtömeg szabályozásában. Mindezek mellett a hypothalamus idegi bemenetet is kap az agytörzsből eredő felszálló rostokon át (Ungerstedt 1970), melyek a gasztrointesztinális traktusból a nervus vagus által közvetített, illetve az area postrema-n keresztül az NTS-t elérő humorális bemenő jeleket közvetítik (Marshall és mtsai 1974).

2.3. A hypothalamus dorsomediális magjának szerepe a táplálékfelvétel szabályozásában

A dorsomedialis mag (DMH) a hypothalamus tuberális régiójában helyezkedik el, citoarchitektónikai alapon a dorsalis, ventrális, és a kettő között elhelyezkedő kompakt szubdivízióra osztható. A DMH fő extrahypothalamikus bemenetei a következő területekről érkeznek: prefrontális cortex, laterális septális mag, parabrachiális mag (PBN) és a nucleus tractus solitarii. Emellett számos hypothalamikus terület is vetül a DMH neuronjaihoz: a mediális preoptikus és anterior hypothalamikus terület, a paraventriculáris (PVN), ventromediális (VMH), supraoptikus és suprachiasmikus magok (Thompson és Swanson 1998). A DMH funkciója nem ismert pontosan, de feltételezik, hogy több homeosztatisz folyamatban, így a reprodukció (Gallo 1981, Gunnet és Freeman 1985), a stresszfolyamatok (Stotz-Potter és mtsai 1996), a hőegyensúly szabályozásában (Rothwell 1994) szerepet játszhat. Emellett ismert, hogy a DMH neuronjai részt vesznek a testtömeg homeosztázisának szabályozásában más hypothalamikus magokkal együtt, mint az arcuatus mag, a ventromedialis mag, a paraventricularis mag, valamint a laterális hypothalamikus (LH) area (Bellinger és Bernardis 2002, Berthoud 2002, Palkovits 2003, Wynne és mtsai 2005), melyek felé projekciókkal is rendelkeznek (Thompson és mtsai 1996). A DMH léziója befolyásolta a táplálkozási viselkedést (Bellinger és Bernardis 1999), és bizonyították a DMH testtömeg homeosztázis fenntartásában játszott szerepét is (Bellinger és Bernardis 2002). A nucleus tractus solitarii, a parabrachiális mag, az arcuatus mag, és a cirkadián

ritmus szabályozásában alapvető jelentőségű suprachiasmaticus mag (SCN) is vetül a hypothalamus dorsomedialis magjába (Thompson és Swanson 1998) (2. ábra). Elektrofiziológiai adatok alapján feltételezhető, hogy az ebben a magban található idegsejtek hormonális bemeneteket és felszálló agytörzsi információkat összegeznek, és a táplálékfelvétel, valamint az energiaegyensúly fenntartásában is szerepet játszanak (Zhu és mtsai 2007). Emellett az utóbbi időben a DMH a cirkadián ritmusok szabályozásával kapcsolatban is előtérbe került, elsősorban a táplálkozás vezette napi ritmusok kivitelezésében lehet fontos (Fuller és mtsai 2008, Saper és mtsai 2002). Táplálékfelvétel által vezérelt napi ritmusú patkányokban etetés hatására Fos-aktivált neuronok megjelenését írták le a DMH-ban (Gooley és mtsai 2006, Johnstone és mtsai 2006, Poulin és Timofeeva 2008), ami alapjául szolgálhat a fent említett funkcióknak.



2. ábra

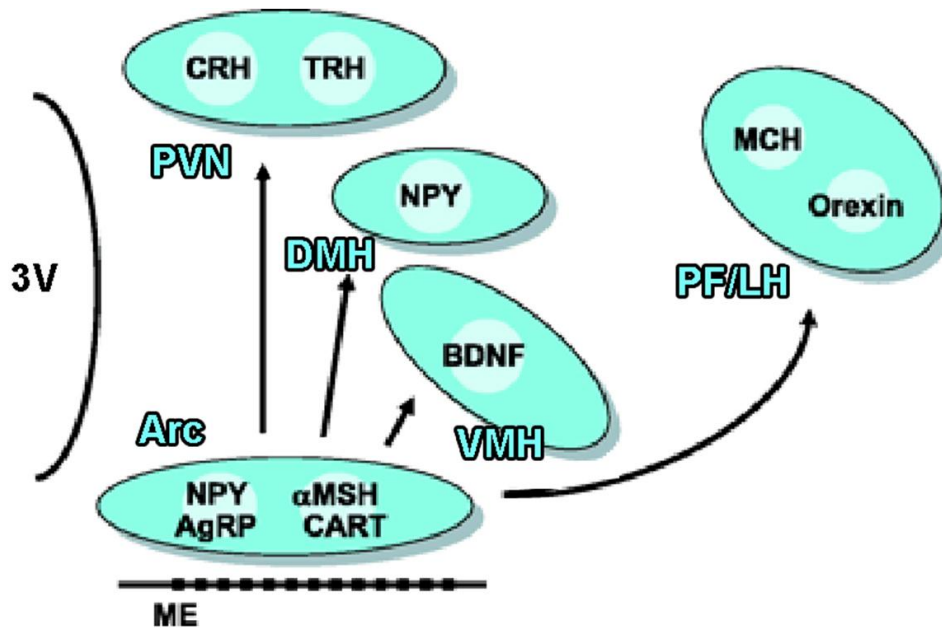
A DMH táplálékfelvétellel, és a cirkadián ritmussal összefüggő neuronális kapcsolatrendszere (Mieda és mtsai 2006). A DMH kap táplálékfelvétel szabályozásával kapcsolatos bemenetet a hypothalamus más részei, és az NTS felől, míg a cirkadián ritmusról a suprachiasmaticus mag (SCN) felől szállítódik információ a DMH neuronjaihoz.

2.4. A táplálékfelvétel szabályozásában résztvevő neuropeptidek

A neuropeptidek tipikusan 3-50 aminosavból álló peptidek, melyeket a genom kódol, de számos poszttranszlációs módosítás után válnak csak funkcionálisan éretté (Hokfelt és mtsai 2000). A neuropeptidek a preszinaptikus terminálisokból ürülnek aktivitás-függő módon, de felszabadulásuk a klasszikus neurotranszmitterekkel szemben csak nagyfrekvenciájú stimulus hatására következik be (Bean és mtsai 1994). Vagyis akkor jelennek meg az extracelluláris térben, amikor az őket termelő neuron különösen aktív. A neuropeptidek receptorai minden esetben G protein-csatolt receptorok (Fredholm és mtsai 2007), melyeket a peptid gyakran hosszabb diffúzió után ér el (Baraban és Tallent 2004). Ezért a neuropeptidek lassú neuromodulátorok (van den Pol 2012), amik tehát különösen alkalmasak arra, hogy olyan szabályozó folyamatokban vegyenek részt, melyek a perc nagyságrendű és nem a másodperces nagyságrendű időintervallumba esnek, mint például a táplálékfelvétel szabályozása.

A táplálékfelvétel szabályozásában számos hypothalamikus neuropeptid játszik fontos szerepet (Arora és Anubhuti 2006). Az arcuatus mag (Arc) területén két fontos sejtpopuláció van, egyik a neuropeptid Y-t (NPY-t), és agouti-related peptidet (AgRP-t), a másik pedig alfa melanocyta stimuláló peptidet (α MSH-t) és cocaine-and-amphetamine-regulated transcript (CART) nevű neuropeptidet tartalmaz (Meister és mtsai 1989, Valassi és mtsai 2008). Ezek a sejtek vetülnek más, a táplálékfelvétel szabályozásában szerepet játszó hypothalamikus magcsoportba (Bi és mtsai 2001). Így innerválják a paraventricularis mag corticotropin (CRH), és thyrotropin (TRH) tartalmú sejtjeit, a DMH neuropeptid Y (NPY) sejtjeit, a ventromediális mag (VMH) brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-et expresszáló, és a perifornicalis/lateral hypothalamikus area (PF/LH) melanin-concentrating hormone (MCH) és orexin neuropeptidet tartalmazó neuronjait (3. ábra).

Az NTS területén szintén több neuropeptid játszik fontos szerepet a táplálékfelvétel szabályozásában. Ezek egy részét már megemlítettük, mikor az ide érkező perifériás rostok leírásakor említettük a bombesint és CCK-t. Az NTS-ben expresszálódó, a táplálékfelvételben szerepet játszó két legfontosabb neuropeptidről, a glukagon-szerű peptid-1-ről, és a prolactin-releasing hormonról (PrRP) a következő 2 fejezetben részletesebben is szólnunk.



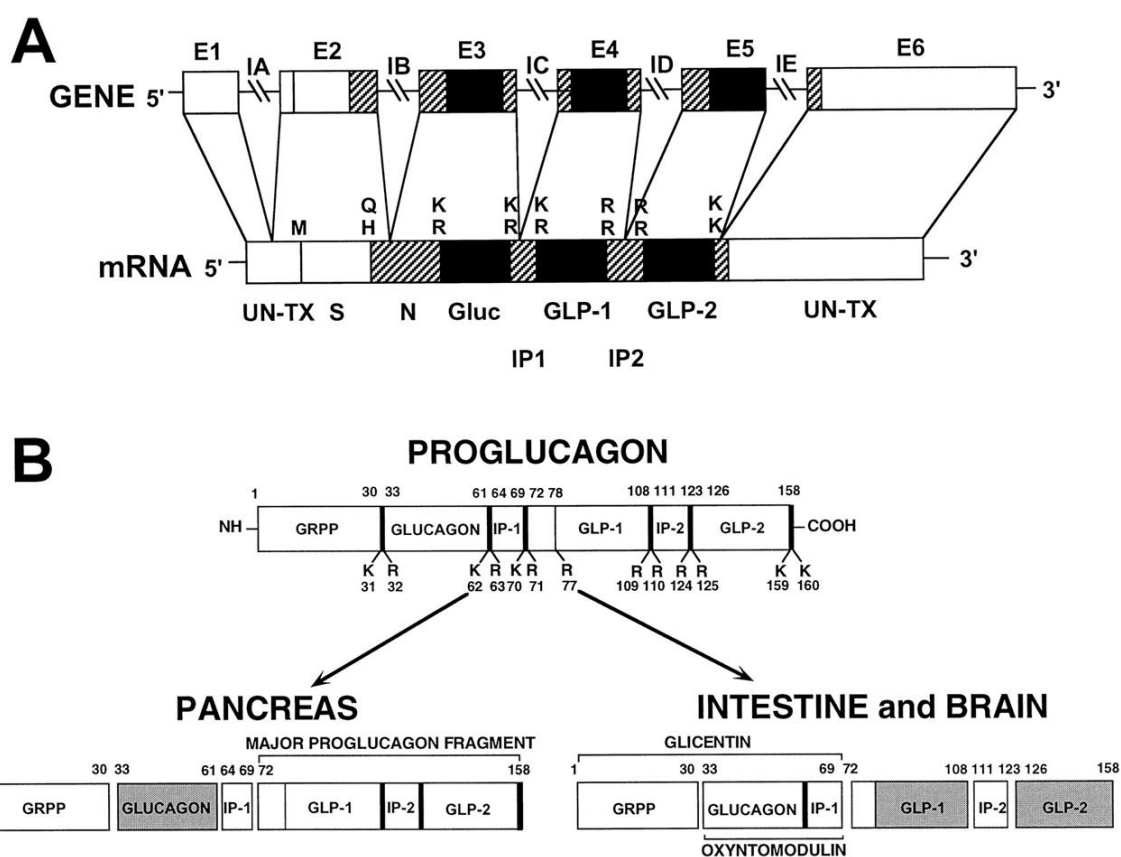
3. ábra

A hypothalamus táplálékfelvétel szabályozással kapcsolatos központjai, és a szabályozásban résztvevő neuropeptidek. A nyilak jelzik, hogy a hormonális bemenetet az arcuatus mag (Arc) neuronjai a paraventriculáris mag (PVN), a DMH, a ventromedialis mag (VMH), és a perifornikális/laterális hypothalamikus area (PF/LH) felé továbbítják. Ebben a szabályozásban az arcuatus magban elhelyezkedő orexigén és anorexigén neuropeptid tartalmú sejtek játszanak szerepet (Wynne és mtsai 2005).

2.5. Glucagon-szerű peptid-1

A glukagon-szerű peptid-1 (GLP-1) egy amidált terméke a preproglukagon génnek (Holst 2007). A preproglukagon génnek alternatív poszttranszlációs módosítással keletkező fő terméke a pancreasban a glukagon, az agyban és a vékonybélben pedig a GLP-1 és GLP-2 (4. ábra). A GLP-1 nem csak perifériás szignálként szerepel, amely a vékonybél L-sejtjeiben termelődik és a táplálékfelvétel után a vérkeringésbe szekretálódik, hanem neuropeptidként centrálisan is hat (Hayes és mtsai 2011, Trapp és Hisadome 2011). A GLP-1 expresszió lokalizációja az agyban erősen korlátozott. Az NTS-ben leírt sejtcsoport mellett csupán a szaglólagyma egyes sejtjeiben fejeződik ki (Jin és mtsai 1988, Llewellyn-Smith és mtsai 2011). A GLP-1 centrális beadása meggátolja a táplálékfelvételt (Kreymann és mtsai 1987, Tang-Christensen és mtsai

1996, Turton és mtsai 1996, Williams és mtsai 2009), és csökkenti a vércukorszintet (D'Alessio és mtsai 2005, Sandoval és mtsai 2008). A GLP-1 meghatározott G-protein csatolt receptoron fejt ki a hatását (Gu és mtsai 2013, Thorens 1992), ami az agyon belül több helyen is kifejeződik, beleértve a hypothalamust is, ahol különösen bőségesen megtalálható a DMH-ban (Goke és mtsai 1995, Merchenthaler és mtsai 1999, Shughrue és mtsai 1996). GLP-1 rostokat és idegvégződéseket találtak a hypothalamus különböző részein, ezen belül is a legnagyobb mennyiségben a dorsomedialis és a paraventriculáris magokban (Jin és mtsai 1988, Llewellyn-Smith és mtsai 2011). Retrográd pályakövető módszert alkalmazó munkák alapján kiderült, hogy egy jelentős mennyiségű idegvégződés a DMH-ban agytörzsi eredetű, az NTS caudalis részén található GLP-1 neuronokból ered (Larsen és mtsai 1997, Vrang és mtsai 2007).



4. ábra

A preproglukagon gén processzálása mRNS-sé (A), majd szövettől függően különböző érett neuropeptidké (B). A preproglukagon mRNS-ét 6 exon kódolja. A processzált glukagon szekvenciát a 3., a GLP-1-et a 4., és a GLP-2-t az ötödik exon tartalmazza. A

poszttranszlációs módosítások másképpen mennek végbe a hasnyálmirigyben, mint a bélben és az agyban. Előbbi esetben glukagon, utóbbiakban GLP peptidek termelődnek (Kieffer és Habener 1999).

2.6. Prolactin-releasing peptid

A prolactin-releasing peptid (PrRP) a neuropeptideknek az ún. RF-amid családjába tartozik a C-terminálisának szerkezete alapján. Jelenleg 5 db emlősben is ismert neuropeptid tartozik ebbe a családba, de legjobban ismert képviselőjük a PrRP (Fukusumi és mtsai 2006). A PrRP-t eredetileg neurohormonként írták le, de ma már ismert, hogy a prolactin szekréció szabályozásában nincsen fontos szerepe (Hinuma és mtsai 1998). Ezzel szemben viszont több kutatócsoport is kimutatta, hogy a PrRP szerepet játszik a táplálékfelvétel szabályozásában, az energia egyensúly fenntartásában, centrális alkalmazása gátolja a táplálékfelvételt patkányban (Lawrence és mtsai 2000)). A PrRP az agyban legnagyobb mennyiségben az NTS-ben szintetizálódik, emellett a ventrolaterális nyúltvelőben és a hypothalamusban is kimutattak PrRP sejteket. Míg a nyúltvelői PrRP a tirozin-hidroxilázt (TH) kifejező sejtekben fordul elő, nevezetesen az A2 noradrenerg sejtcsoportban az NTS-ben, és az A1 noradrenerg sejtcsoportban a ventrolaterális nyúltvelőben, addig a hypothalamusban a PrRP nem kolokalizál catecholaminokkal (Fukusumi és mtsai 2006). Az NTS PrRP neuronjai a hypothalamus több területére is vetülnek. PrRP rostok denz hálózata található a paraventriculáris, periventriculáris, és a dorsomediális magban, valamint a thalamus retikuláris magjában is (Takayanagi és mtsai 2008). A PrRP receptora a GPR10 nevű G-protein csatolt receptor, melynek az eloszlása jól látható összefüggést mutat a PrRP rostok elhelyezkedésével a hypothalamusban (Onaka és mtsai 2010, Roland és mtsai 1999).

3. CÉLKITŰZÉSEK

Abból a célból, hogy jobban megértsük a hypothalamus dorsomediális magjának (DMH) újraetetési és jóllakottsági szignálok processzálásában játszott szerepét, a következő specifikus célkitűzéseket tűztük ki magunk elé:

- A Fos aktiváció összehasonlítása a DMH területén 2 nap éheztetést követő limitált és szabad táplálékhoz jutás esetén, valamint az állat által hozzá nem férhető táplálék bemutatásának hatására
- A Fos-aktivációt mutató neuronok topográfiai eloszlásának leírása a DMH egyes szubdivízióiban
- A DMH-t innerváló solitarii-hypothalamikus rostok lokalizációja és kémiai karakterizálása
- A felszálló solitarii-hypothalamikus útvonal átmetszésének a hatása a DMH-ban elhelyezkedő NTS eredetű PrRP és GLP-1 rostokra
- A felszálló solitarii-hypothalamikus útvonal átmetszésének a hatása az újraetetésre bekövetkező Fos aktivációra a DMH-ban
- Az arcuatus mag nátrium glutamáttal való léziójának hatása a DMH neuronjainak újraetetés hatására bekövetkező aktivációjára
- A GLP-1 receptor kifejeződésének a bemutatása a DMH-ban, illetve a jóllakottság alatt Fos-aktivációt mutató sejteken a DMH ventrális szubdivíziójában

4. MÓDSZEREK

4.1. *Kísérleti állatok*

Kísérleteinkhez 114 hím, felnőtt, 300 és 400 g közötti tömegű Wistar patkányt használtunk (Charles River Laboratórium, Isaszeg, Magyarország) és 18-at közülük születésük után közvetlenül a glutaminsav nátriumsójával (monoszódium-glutamát; MSG) kezeltük. Minden lehetőséget megragadtunk, hogy a kísérletekben felhasznált állatok számát minimalizáljuk. Minden kísérlet, amelyet elvégeztünk, az Európai Közösségi Tanács Bizottsága által jóváhagyott eljárás, és összhangban volt a tudományos kísérletekben részt vevő állatok tartására és felhasználására vonatkozó 1986. november 24.-i keltezésű (86/609/EEC) dokumentummal. Minden kísérletet a Semmelweis Egyetem Állatvédelmi Tanácsadó Testület Állatügyi Etikai Bizottsága által jóváhagyott (#63/2000) kísérleti protokolljának alapján végeztünk el, amelyek megfeleltek a Mezőgazdasági Minisztérium Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrzési Osztálya által kiadott útmutatásoknak. Az állatok tartása automatikusan szabályozott laboratóriumi körülmények között, 12 órás fény és 12 órás sötétség ciklusban váltakozva (a világítás minden reggel 6 órakor kapcsol be automatikusan) történt, és az állatok a száraz patkány táplálékhoz és a vízhez az éheztetést is tartalmazó kísérletek kezdetéig szabadon hozzáférhettek, a vízhez pedig az éheztetéses kísérletek alatt is folyamatos volt a hozzáférésük. Ketrecekenként 3 állatot tartottunk, 22 ± 1 °C hőmérsékleten, a kísérletek alatt pedig egyesével voltak az állatok a ketrecekben elhelyezve. Standard patkánytápot (VRF1 laboratory chow for rodents, Charles Rivers Laboratories) használtunk mind az állatok tartásához, mind az újraetetésükhöz.

Az állatokat altatókeverék - mely ketamint (100 mg/mL; CP-Pharma, 31303 Burgdorf, Németország) 0,1 mL /100 g testtömeg arányban és xylazin-hydrochlorid-ot (20 mg/mL; CP-Pharma) 0,066 mL/100 g testtömeg arányban tartalmazott – izomba történő injekciójával altattuk el a műtéteket, valamint a perfúziót megelőzően.

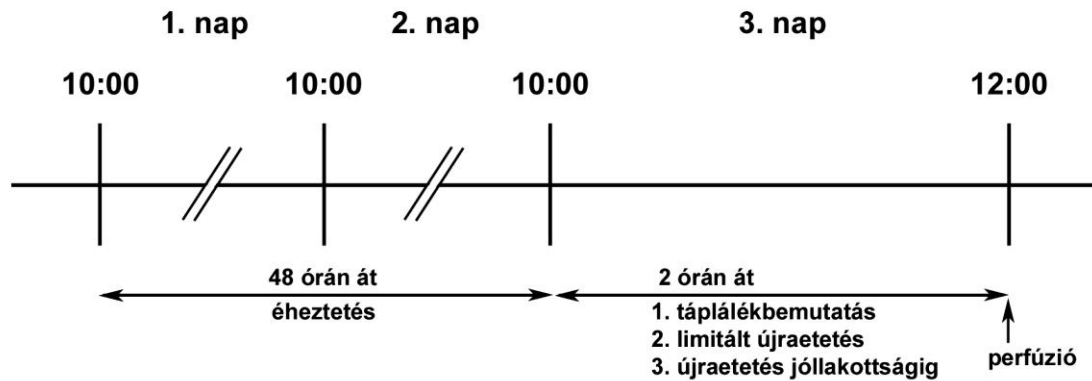
4.2. *Az I-es kísérleti modell I*

Az I-es kísérleti modellben (éheztetés-újraetetés) részt vevő állatokat 3 fő csoportra osztottuk. Az első csoportban voltak a kontroll állatok, melyek folyamatosan hozzáférhettek a táplálékhoz. Ez a csoport 9 kezeletlen, 6 MSG-vel kezelt, 6 agytörzsi

átmetszésen átesett és 3 hátsó hypothalamikus átmetszésen átesett patkányt tartalmazott. Az éheztetett állatok esetében éheztetés délelőtt 10 órakor kezdődött, az állatok 48 órán át nem jutottak táplálékhoz, majd a 48 óra elteltével feláldoztuk őket. Ebben az állatcsoportban 6 kezeletlen, 3 MSG-vel kezelt, 9 agytörzsi átmetszésen átesett, és 3 hátsó hypothalamikus átmetszésen átesett patkányt tartalmazott. Az újraetett patkányokat először 48 órán át éhezttük az éheztetett állatcsoportnál leírt módon, majd 2 órával a leölés előtt újraetettük őket. Az éheztetés után az állatok azonnal elkezdtek folyamatosan enni, mialatt az evési fázisokat folyadékfelvételi fázisok szakították meg. Körülbelül 80-85 perccel az állatok folyamatos táplálékfelvételének befejezése után öltük le az állatokat. Ez az állatcsoport 12 kezeletlen, 9 MSG-vel kezelt, 9 agytörzsi átmetszésen átesett, és 3 hátsó hypothalamikus átmetszésen átesett patkányt tartalmazott. A kísérletben szereplő állatok többségét perfundáltuk immuhisztokémiai feldolgozás céljából, de 3 állatot, melyet 48 órán át éhezttünk, majd 1 órán át újraetettünk, és 3 éheztetett állatot *in situ* hibridizációs hisztokémiai eljárásnak vetettünk alá. Minden állat folyamatosan szabadon juthatott hozzá a vízhez, az éheztetés időszaka, és az újraetetés során egyaránt.

4.3. A II-es kísérleti modell

A patkányokat a kísérletben 3 csoportra osztottuk (5. ábra): 1) “táplálék bemutatott” csoport (n=6), melyeknek 48 óra éheztetés után olyan tápot mutattunk 2 órán át, melyet ahhoz, hogy elfogyaszthassák azt, nem értek el. A táplálék bemutatás kivitelezése 2 fém ketrecetű rácsnak az egymásra helyezésével történt. Ezzel a módszerrel történő összeállításnál az állatok képtelenek a felső fémretőbe helyezett táplálékpasztillákat a rács résein át elérni, így a perfúziót megelőző 2 órában láthatták a táplálékot és érezhették annak a szagát, de nem tudtak táplálkozni. 2) “Limitáltan újraetett” patkányok csoportja (n=4), melyek 48 óra éheztetés után 1,5 g tápot kaptak. Ez a mennyiség körülbelül a negyede a 2 nap éhezés utáni fogyasztásnak. 3) jóllakásig újraetett patkányok csoportja, melyek szabadon ehetek 2 órán át egy 48 órás éheztetést követően. Ezek az állatok $7,3 \pm 0,7$ g tápot fogyasztottak 30-35 perc fejezték a táplálkozást, ezért jóllakottnak (telítettnak) tekintettük őket. Ez a csoport 14 intakt, és 6 pályaátmetszett állatot tartalmazott.



5. ábra

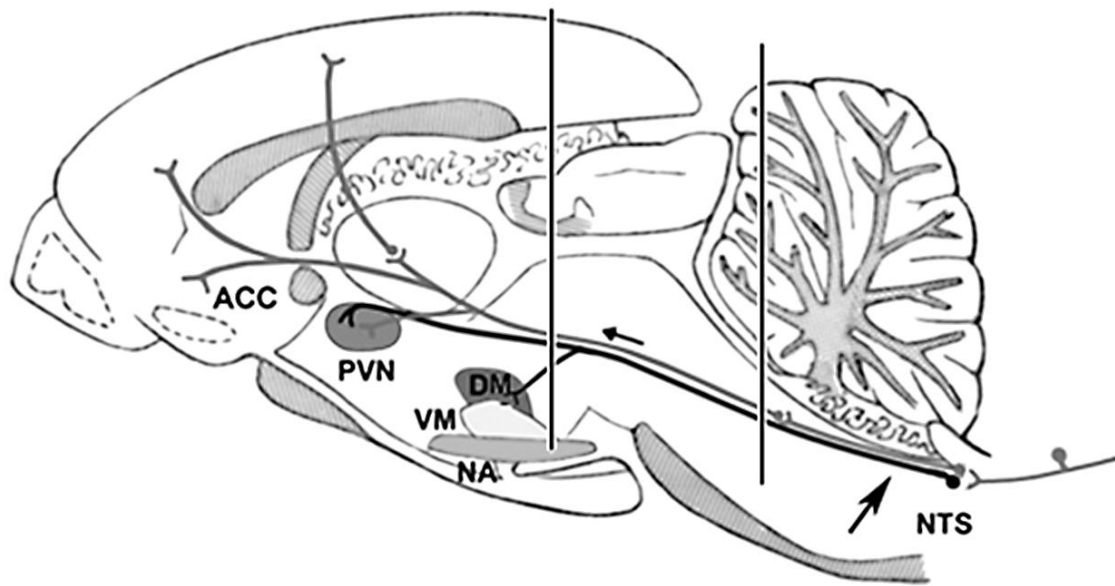
Az éheztetés-újraetetés protokolljának vázlata. Az első nap reggel 10 órakor kezdődő 48 órás éheztetést a feltüntetett 3 féle kezelés követi a 3. nap első két órájában, amit az állatok perfúziója követ. A vonal megtörése jelzi, ahol az időskála nem lineáris.

4.4. MSG kezelés

Patkánykölykök ($n=18$) bőr alá fecskendezett nátrium glutamát (MSG) injekciót (4 mg/g testtömeg, 0,9%-os sóoldatban oldva) kaptak az első 10 nappal születésük után minden második napon, abból a célból, hogy ezzel az irodalomban leírtak szerint az arcuatus mag lézióját váltsuk ki (Meister 1991, Meister és mtsai 1989).

4.5. Idegpályák átvágása

Hosszúkás alakú lyukat fúrtunk az agyba (1x3 mm) a koponya egyik oldalán. A féloldali átvágásokat 2,0 mm és 2,5 mm-közötti szélességű üveggéssel végeztük el (Palkovits és mtsai 1982). A kemény agyhártya átvágása után az üveggést vertikális irányba átvezettük a célterületen, mélyen az agytörzs bazális felszínéig a híd és a nyúltvelő átmenetnél (6. ábra). A célterületek koordinátái, ahova az üveggés közepét céloztuk, a következők voltak agytörzsi átmetszéshez: antero-posterior, -9,0 mm; lateralis, 1,3 mm; ventralis, 7,5 mm; míg caudalis hypothalamikus transzekció esetén: antero-posterior -4,0 mm; lateralis 1,6 mm; ventralis 9,0 mm (Paxinos és Watson 2005). Az állatokat a műtétet követő nyolcadik vagy kilencedik napon öltük le. Huszonnégy agytörzsi és kilenc hypothalamikus átmetszést végeztünk el.



6. ábra

A solitarii-hypothalamikus pálya átmetszésének pozíciói. A két függőleges vonal jelzi a solitarii-hypothalamikus pálya agytörzsi, illetve hátsó hypothalamikus átmetszésének antero-posterior pozícióját.

4.6. Az agyak szövettani feldolgozása

Az immunhisztokémiai eljáráshoz a patkányokat túlaltattuk (ennek módja részletesen le van írva az anyagok és módszerek részben) és perfundáltuk a szíven keresztül 150 ml fiziológiás sóoldattal való átmosást követően 300 ml jéghideg 4 %-os paraformaldehidet tartalmazó 0,1 mólos foszfát-puffer oldattal (PB; pH = 7,4). A patkányok agyának kinyerése után ugyanilyen összetételű fixáló oldatban azokat utófixáltuk 24 órán át, majd ezt követően PB-t tartalmazó 20 %-os szacharóz-oldatban tartottuk 2 napon át. A metszetek oldal orientációjának meghatározásához egy kis, kb. 1 mm-es horizontális metszést ejtettünk az agytörzsön és az előagyon az átmetszéssel ellentétes oldalon. Koronális metszetek negyven μm -es sorozatát készítettük el csúsztható vezérlésű mikrotómon (SM 2000R; Leica Microsystems, Nussloch, Németország) +1,0 és -7,0 mm között a bregma ponttól számítva. Ezen kívül 2 patkány agyát sagittalis irányban, és négy patkány agyát horizontális irányban metszettük le abból a célból, hogy kövessük a PrRP-immunreaktív (-ir) rostokat az agytörzs teljes hosszában, meghatározzuk a pályaátmetszés helyét és vizsgáljuk a PrRP

immunreaktivitás felhalmozódását az átmetszés helyénél. Minden agyból 5 párhuzamos sorozatot készítettünk a hisztológiai (krezil-ibolya és fluoreszcens Nissl festéshez) és immunhisztokémiai festésekhez (Fos, PrRP, GLP-1 és TH). A metszeteket 0,1 % nátrium-azid tartalmú PB oldatba gyűjtöttük és 4 °C-on tároltuk a további felhasználásig.

In situ hibridizációs hisztokémiai feldolgozás céljára a patkányokat elaltattuk, majd dekapitáltuk. Az agyukat azonnal kivettük, szárazjégen fagyasztottuk, és -80°C-on tároltuk. Az agykból 12 µm vastag metszeteket készítettünk és vettünk fel polilizinnel kezelt tárgylemezre (SuperfrostPlus®, Fisher Scientific) kriosztáttal (CM3050S, Leica) a bregma szinttől hátrafelé 2,0-5,0 mm közötti szakaszon. A metszeteket ezután megszárítottuk, és a felhasználásig -80°C-on tároltuk.

4.7. Hisztológiai festési eljárások

4.7.1. Krezil-ibolya festés

Két kezeletlen és 2 MSG kezelt patkányból származó felhasznált metszetek másik sorozatát vittük fel egymást követő sorrendben zselatinnal fedett tárgylemezre, majd kiszárítottuk azokat. A metszeteket 0,1 %-os krezil-ibolyát tartalmazó PB oldattal megfestettük, majd 96% etanolt tartalmazó ecetsav oldattal differenciáltuk. Ezt követően a metszeteket víztelenítettük és lefedtük Cytoseal 60 nevű fedőanyaggal (Stephens Scientific, Riverdale, NJ, USA).

4.7.2. Luxol Fast Blue krezil-ibolya festés

A Luxol Fast Blue (LFB) festés az idegi elemek vizsgálatára alkalmas festési módszer. Az idegsejtek axonját borító myelin hüvelyek foszfolipid tartalmuk alapján megkötik a festéket, amelynek eredményeképpen a myelin elemek zöldeskék színűre, az idegsejtek liláskék színűre festődnek.

A LFB festéshez a fixálóban rögzített agyszövet mintákat felszálló alkoholsoron víztelenítettük, majd paraffinba ágyaztuk. A paraffinba ágyazott blokkokból 15-20 µm vastagságú metszeteket készítettünk és Klüver-Barrera szerint festettük meg, vagyis a deparaffinálást követően, a metszeteket Luxol Fast Blue (LFB) festék 0,1%-os oldatával festettük, ezután lítium-karbonát 0,05%-os oldatába merítettük, majd 70%-os alkoholban differenciáltuk és xilollal derítettük (McIlmoyl 1965).

4.7.3. Fos immunhisztokémia

A szabadon úszó metszeteket 3%-os hidrogén-peroxid oldattal 15 percig, majd 1% borjú szérumalbumint és 0,5% triton X-100-at tartalmazó PB oldatban 30 percen át szobahőmérsékleten előkezeltük. Majd a metszeteket nyúlban termeltetett anti-Fos primer antiszérumba helyeztük (1:25000; c-fos (4) sc-52; Santa Cruz Biotechnology, Delaware, CA, USA) 24 órára szobahőmérsékleten. A következőkben a metszeteket biotinilált, nyúl ellen termeltetett szekunder antitestet tartalmazó oldatba (1:1000-szeres hígítás, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) helyeztük 2 órára, majd szintén 2 órán át ABC (avidin-biotin peroxidáz komplexet; 1:500; Vector Laboratories) tartalmazó oldatban inkubáltuk. Végül a metszeteket 0,06% 3,3'-diamino-benzidint (DAB), és 0,003% hidrogén-peroxidot Tris hidroklorid puffert (0,005M, pH=8.2) tartalmazó 0,2%-os nikkkel-szulfát oldattal kezeltük 10 percig, felvittük zselatinos tárgylemezre, néhány sorozatot háttérfestettünk 0,5%-os Kernechtrot festékkel, majd lefedtük Cytoseal 60 (Stephens Scientific) lefedő anyaggal.

4.7.4. Fluoreszcens Nissl festés Fos immunfestéssel kombinálva

Szabadon úszó metszeteken először Fos immunfestést végeztünk azzal a módszerrel, amit az előzőekben már leírtunk, kivéve, hogy fluoreszcens izotiocianát (FITC)-tiramid erősítést alkalmaztunk a jel láthatóvá tétele érdekében. Röviden leírva, az ABC kezelést követő mosási lépések után a metszeteket FITC-tiramidot (1:8000-szeres hígításban) és 0,003% hidrogén-peroxidot tartalmazó Tris hidroklorid puffer (0,005M, pH=8,2) oldatban 8 percig inkubáltuk. Egymást követő mosási lépések után a metszeteket 2 órán át 'Neurotrace' pirosan fluoreszkáló Nissl festék (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 30-szorosra hígított oldatában inkubáltuk, majd 1 éjszakán át PB oldatban mostuk és pozitívan töltött tárgylemezre (Superfrost Plus, Fischer Scientific, Pittsburg, PA, USA) vittük és a jel kifakulását meggátoló fedőanyaggal (Prolong Antifade Kit; Molecular Probes) lefedtük.

4.7.5. PrRP és GLP-1 immunhisztokémia

PrRP megjelenítéséhez nyúlban termeltetett anti-PrRP primer antitestet használtunk (1:8000; Phoenix Pharmaceuticals Inc., Belmont, CA, USA), míg a GLP-1-

et egér anti-GLP-1 primer antitesttel festettük (1:100; Santa Cruz Biotechnology, katalógusszám: sc-57166). Csoportonként 3 patkány agyából készült szabadon úszó metszeteket előkezeltük 1% borjú szérum albumint tartalmazó PB oldattal 30 percig szobahőmérsékleten, mely 0.5% Triton X-100-at is tartalmazott. Ezután a metszeteket áthelyeztük anti-PrRP vagy anti-GLP-1 primer antiszérumba szobahőmérsékleten, 48 órára. A metszetek biotinilált, nyúl, illetve egér IgG ellen termeltetett szekunder antitestet tartalmazó oldatba (1:1000-szeres hígítás; Vector Laboratories) kerültek 2 órára, majd újabb 2 órán át avidin-biotin peroxidáz komplexet (1:500 hígítás, Vector Laboratories) tartalmazó oldatban inkubáltuk azokat. A metszeteket 10 percig 0,06% DAB-ot és 0,003% hidrogén-peroxidot és 0,2% nikkel-szulfát oldatot tartalmazó Tris hidroklorid puffer oldatba helyeztük, majd sorbarendezés után tárgylemezre vittük és lefedtük őket, ahogyan azt az előzőekben már leírtuk.

4.7.6. *PrRP/GLP-1 és Fos dupla immunhisztokémia*

Szabadon úszó metszeteken elsőként PrRP/GLP-1 immunfestést végeztünk nikkel-DAB intenzifikálást vagy FITC-tiramiddal való megjelenítést alkalmazva, amint azt korábban már leírtuk. Ezután a metszeteket 1 éjszakán át inkubáltuk ugyanolyan anti-Fos antitestet tartalmazó oldatban, mint amilyent az egyszeres festésnél alkalmaztunk (1:5000-szeres hígításban a fluoreszcens festéshez és 1:25000-szeres hígításban a DAB-bal való megjelenítéshez). A fluoreszcens dupla festés elvégzése érdekében a metszeteket a primer antitestet tartalmazó oldatban való inkubálás után Alexa Fluor 594 számban termeltetett nyúl elleni szekunder antitestet tartalmazó (1:500-szoros hígítás; Molecular Probes) oldatba helyeztük 2 órára. DAB-bal való megjelenítés esetén a metszeteket biotinilált, nyúl ellen termeltetett szekunder antitestet tartalmazó oldatba, majd ABC reagens oldatba helyeztük, ahogy azt már korábban leírtuk, és Ni-erősítés nélküli DAB oldattal hívtuk elő a jelet. A metszeteket az előzőekkel megegyező módon tárgylemezre vittük és lefedtük.

4.7.7. *PrRP és TH dupla immunhisztokémia*

Először a szabadon úszó metszeteken PrRP festést végeztünk FITC-tiramid erősítést alkalmazó immunhisztokémiai eljárással. Röviden leírva, ugyanazt az anti-PrRP antiszérumot használva, mint az egyszeres festési eljárásnál, 1 éjszakán át

inkubáltuk a primer antiszérumban a metszeteket, majd biotin-kapcsolt nyúl ellen számár gazdaállatban termeltetett szekunder antitest (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) 1:500-szoros hígítású oldatában 2 órán át, majd ABC (Vector Laboratories) 1:300-szoros hígítású oldatában szintén 2 órán át inkubáltuk a metszeteket. Ezután FITC-tiramidot (1:8000) és 0,003% hidrogén-peroxidot tartalmazó Tris-hidroklorid puffer oldatban (0,005M, pH=8,2) 8 percen át inkubáltuk a metszeteket, ahogy azt az előzőekben már leírtuk. Ezt követően a metszeteket 1 éjszakán át egérben termeltetett monoklonális anti-TH antitestet (1:2000-szeres hígítás; katalógusszáma: MAB5280; Chemicon, Temecula, CA, USA) tartalmazó oldatában inkubáltuk. Az anti-TH primer antitestet tartalmazó oldatban történő inkubálás után a metszeteket Alexa Fluor 594-es számárban történő egér elleni szekunder antitest (1:500; Molecular Probes) oldatában 2 órán át inkubáltuk, majd tárgylemezre vittük és lefedtük azokat az előzőekben a fluoreszcens festési eljárás leírásánál megtalálható módon.

4.8. *In situ* hibridizációs hisztokémia

4.8.1. *C-fos* és *GLP-1R* *in situ* hibridizációs próbák előállítása

Patkány nyúltvelő különböző régióiból RT-PCR-ral előállított cDNS molekulák keverékét használtuk mintaként polimeráz láncreakciókhoz (PCR) a következő primerekkel (c-fos: AGAATCCGAAGGGAAAGGAA és ATGATGCCGGAAACAAGAAG; GLP1-R: TCTGCATCGTGATAGCCAAG és ACACTTGAGGGGTTTCATGC). Így a termék c-fos esetén az NM_022197-es számú GenBank szekvencia 573-984-es bázispárjainak, míg GLP-1R esetén NM-012728.1-es számú GenBank szekvencia 999-1330-as bázispárjainak felelt meg. A PCR terméket kitisztítottuk a gélből, beillesztettük a TOPO TA klónozó vektorba (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) és kémiai átalakítási lépések után a megfelelő baktériumba juttattuk a gyártói előírásoknak megfelelően. Ötől hétig terjedő számú kolóniából plazmidokat tisztítottunk és azokat mintaként használtuk PCR reakciókhoz specifikus primerpárokat használva abból a célból, hogy kiválasszuk azokat a plazmidokat, amelyek a specifikus insert-et tartalmazzák. A c-fos-ra, illetve GLP-1R-ra nézve pozitív plazmidokat templátként (mintaként) használtuk PCR reakciókhoz olyan primerpárokat felhasználva, melyek specifikusak az adott próbával, és a reverz primerek a T7 RNS

polimeráz felismerő helyet is tartalmazzák. Végül szekvenálás segítségével végeztük el a cDNS próbák azonosítását.

4.8.2. *In situ* hibridizációs hisztokémiai eljárás

Az eléréstelenített patkányokat (lásd a részleteket az előzőekben) lefejezéses módszerrel áldoztuk fel. Három éheztetett és 3 újraetett hím patkány agyát kiemeltük és a friss szövetet szárazjégre helyezve, azokat gyorsan lefagyasztottuk. Kriosztátot használva horizontális metszetek (12 µm) sorozatát szeleteltük le a Bregma szintjétől caudalisan 2,0 mm és 4,0 mm között és pozitívan töltött lemezekre vittük (Superfrost Plus®, Fisher Scientific), szárítottuk és -80°C-on tároltuk a felhasználásig. Antisense [³⁵S] UTP-jelölt ribopróbákat hoztunk létre az előzőekben leírt DNS próbákból a Maxiscript transzkripció készletben megtalálható T7 RNS polimeráz használatával (Ambion, Austin, TX, USA) a kit leírása szerint. A jelölt RNS próbákat lemezenként 80 µl, 1 millió d.p.m. (percenkénti beütésszám) aktivitást tartalmazó mennyiségben, hibridizációs oldatban oldva használtuk a hibridizációhoz. A lemezeket 24 órán át 55 °C-on hibridizáltuk, majd 4 M-os citrát pufferben mostuk. Ezután a metszeteket RNAase A-val kezeltük az egyszálúan maradt próba eltávolítása céljából, majd csökkenő koncentrációjú citrát puffer-ben mostuk, végül 0,1 M citrát pufferben kétszer 30 perces 65 °C-on történő melegítéssel távolítottuk el a nem-specifikus helyre kötődött próbát. A lemezeket szárítás után un. NTB emulzióba (Eastman Kodak) mártottuk és 4°C-on 3 hétig tároltuk az autoradiográfiás eljárásnak megfelelően. Ezt követően a lemezeket Kodak Dektol előhívóval kezeltük és a jelet Kodak fixálóval rögzítettük, Giemsa festékkel háttérfestettük, és Cytoseal 60 fedőanyaggal (Stephens Scientific) lefedtük.

4.8.3. *GLP-1R in situ* hibridizációjának és *Fos* immunhisztokémiai festésének kombinációja

Először a GLP-1R *in situ* hibridizációt hajtottuk végre a fentiek szerint. A *Fos* immunfestést ezután végeztük el a fentiek szerint, de még a metszetek autoradiográfiás oldatba mártása előtt. A jelet DAB-al vizualizáltuk a fent leírtak szerint. Ezután a metszeteket kiszárítottuk, emulzióba mártottuk, és háttérfestés nélkül lefedtük.

4.9. *Mikroszkópia és fényképezés*

A metszeteket egy Olympus BX60-as fluoreszcens megvilágítással és beépített sötét látóterű kondenzorral is ellátott fénymikroszkóp segítségével értékeltük ki. A felvételeket 2048 X 2048 pixel felbontással rögzítettük SPOT Xplorer digitális CCD kamera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) 4-től 40-szeres objektívok használatával. A konfokális felvételeket Nikon Eclipse E800 konfokális mikroszkóppal végeztük el, melybe Biorad Radiance 2100 Lézer szkennelő rendszer van beépítve, ami 20-40-szeres objektívekkel 3-10 µm-es optikai vastagságnál működik. A felvételek kontrasztját és élességét az Adobe Photoshop CS 8.0-ban található 'levels' és 'sharpness' utasítások alapján javítottuk. A fényképek előállítását és összegyűjtését követően kezdődött a tényleges kiértékelés.

4.10. *A Fos kifejeződés kvantitatív analízise*

A Fos-pozitív idegsejteket projekciós mikroszkóp (Visopan, ®Reichert) használatával, 10-szeres nagyítás mellett számoltuk a hypothalamus dorsomedialis magjának ventrális szubdivíziójában a bregma szintjétől caudálisan 3,2, 3,4 és 3,6 mm-rel. A statisztikai analízist egyutas ANOVA statisztikai módszert használva készítettük el, amit Bonferroni többszörös összehasonlítási post-hoc teszt követett.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Jóllakottság hatása a dorsomediális mag sejtjeinek aktivitására

5.1.1. Testtömegváltozás és táplálékfelvétel az éheztetéses-újraetetéses kísérletek során

Kísérleteink végrehajtása során mértük a testtömeget és a táplálékfelvétel időtartamát abból a célból, hogy jellemezzük a táplálékfogyasztást és a 48 órás éheztetést követő jóllakottság által bekövetkező normális viselkedésmintázat jelenlétét. Megemlítendő, hogy az általunk mért testtömeg az éheztetés és újraetetés folyamata során elfogyasztott táplálék és víz mennyiségének a függvénye. Ebből adódóan az általunk bemutatott testtömegre vonatkozó átlagérték csak látszólagos testtömeg, és nem tükrözi a testtömeg hosszú távú fiziológiai változásait.

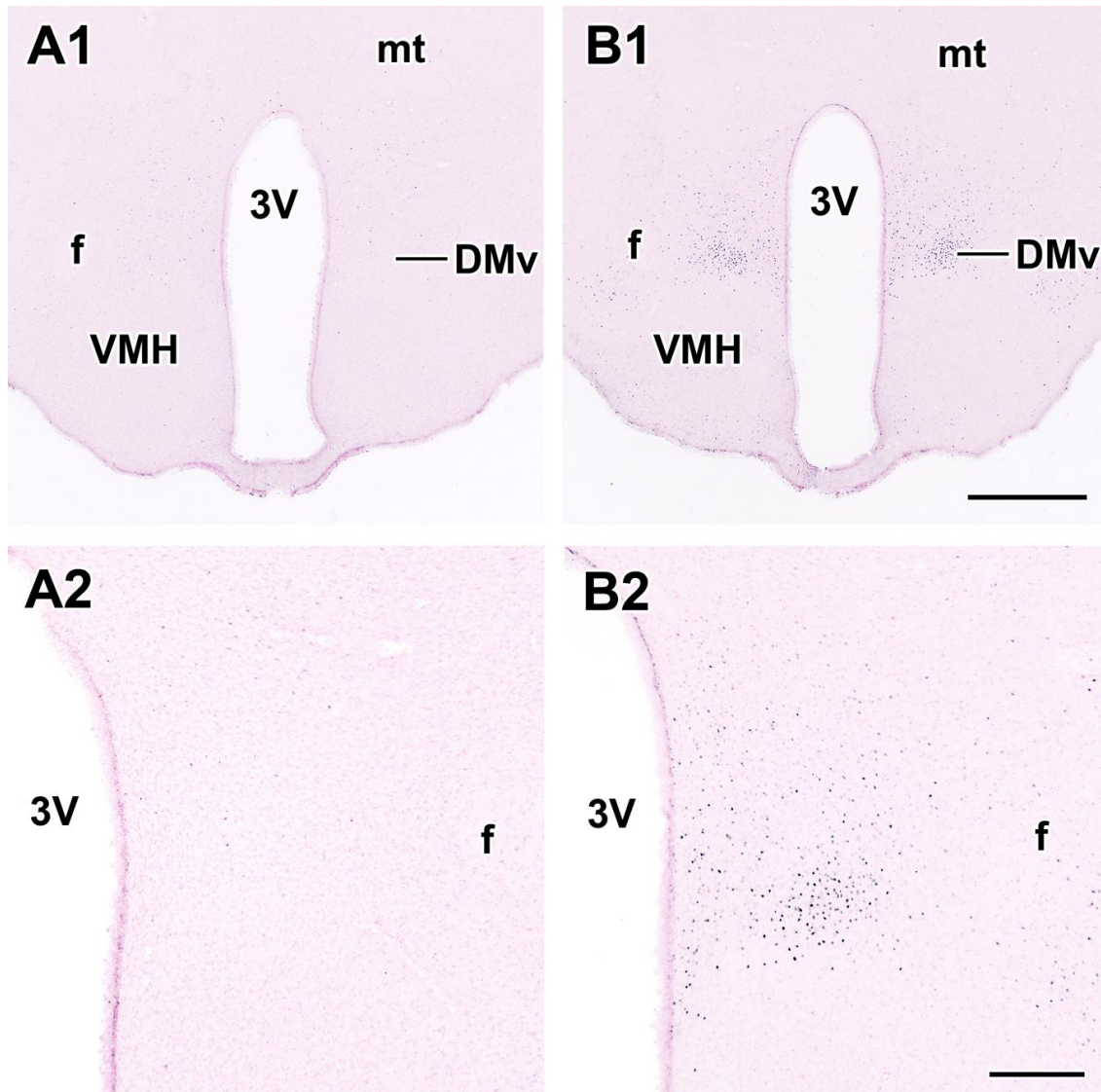
Az első kísérletsorozatban az éheztetés kezdetét megelőző napon délelőtt 9 órakor a patkányok testtömege ($n=10$) $364,0 \pm 7,5$ g (középérték \pm a középérték szórása) volt. Huszonnégy órán belül az állatok tömege $5,8 \pm 1,5$ g-mal nőtt. Az éheztetés első napján a testtömeg csökkenése $21,6 \pm 1,4$ g; ezt követte a második napon további $11,0 \pm 1,4$ g-nyi testtömeg csökkenés a mérések alapján elvárt $11,6$ g testtömeg növekedés helyett (az állatoknak a táplálékhoz való szabad hozzáférése esetén). A táplálék odaadását követő 1.-3. percben a patkányok elkezdtek enni. Tipikusan hozzávetőleg 15 percig ettek, majd szünet következett a táplálékfelvételben, amíg az állatok folyadékot vettek magukhoz. Folyadékfelvétel után az állatok körülbelül 15 percig ismét folytatták az evést, majd ittak és aludni tértek. A táplálékfelvétel időtartalma a kezdéstől a befejezésig $36,8 \pm 3,1$ perc volt. Az újraetetés időtartalmának megfelelő 2 óra alatt a patkányok testtömege $10,3 \pm 1,8$ g-mal növekedett. A száraz táp ez idő alatt elfogyasztott teljes mennyisége $7,8 \pm 0,8$ g volt.

A második kísérletben az éheztetés kezdetén délelőtt 10 órakor, a patkányok testtömege ($n=10$) $351,9 \pm 13,4$ gramm volt. A két napos éheztetés eredményeképpen az állatok $32,0 \pm 2,6$ g-ot veszítettek a testsúlyukból. Azoknak az állatoknak a testsúlya, melyek az újraetetés alatt $1,5$ g táphoz juthattak hozzá, $3,0 \pm 0,6$ g-mal növekedett az újraetetés során, miközben ezek az állatok $6,9 \pm 0,8$ g vizet fogyasztottak az újraetetés alatt. Azoknak a patkányoknak az esetében, amelyek korlátlan mennyiségben hozzáfértek a táplálékhoz az újraetetés 2 órás időtartalma alatt, $9,9 \pm 0,9$ g-mal nőtt a

testsúlyuk. Az elfogyasztott száraz táp mennyisége ebben a kísérleti csoportban $7,3 \pm 0,6$ g volt és ezek az állatok $11,7 \pm 1,3$ g vizet fogyasztottak.

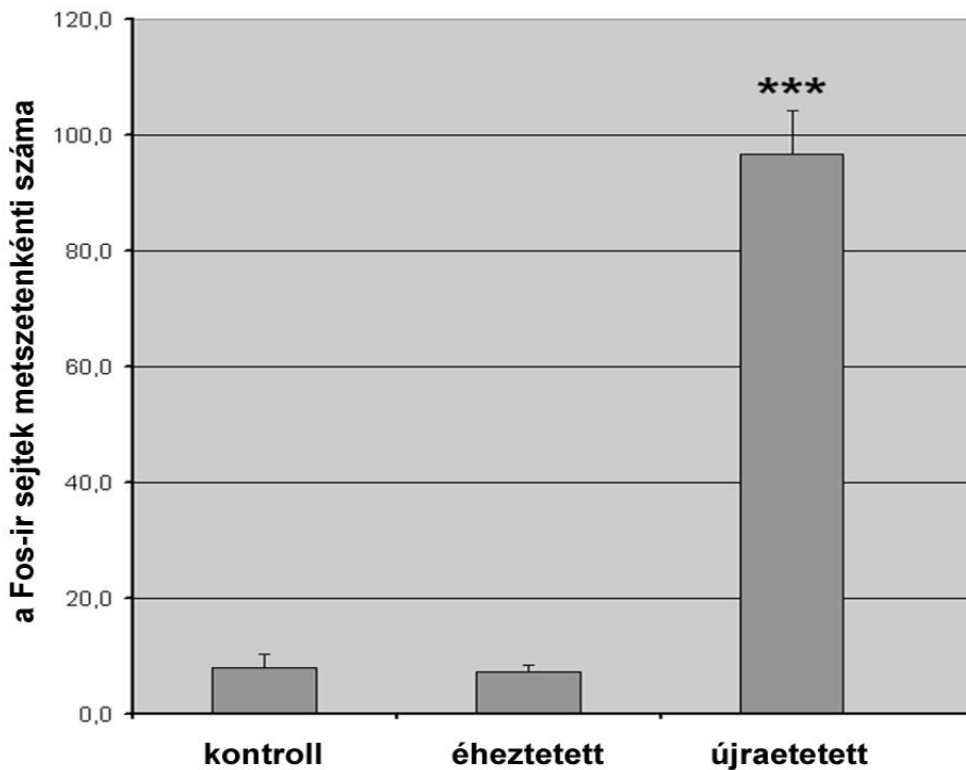
5.1.2. Fos expresszió éheztetés és újraetetés hatására

A Fos-tartalmú sejtek nagyon alacsony sűrűsége figyelhető meg a DMH-ban és a DMH-t körülvevő területeken az állatok szabad táplálékhoz való hozzáférésű kontroll csoport esetén (nincs bemutatva), és ehhez hasonló eredményt kaptunk az éheztetett csoportnál is (7A ábra). Az újraetétést követően a Fos-expressziót mutató sejtek száma megnőtt a DMH teljes kiterjedését vizsgálva; mindazonáltal a magon belül, egy jól körülhatárolt területen, a DMH ventrális szubdivíziójában (DMv) az aktiválódó sejteknek különösen nagy sűrűsége figyelhető meg a mag teljes kiterjedésén át rostrocaudalis irányban 48 órás éheztetést követően (7B ábra), éppúgy, mint 24 órás éheztetést követően. A Fos-pozitív neuronok átlagos száma kontroll, és éheztetett csoportokban $8,0 \pm 2,4$, és $7,4 \pm 1,2$ (közéérték \pm a közéérték szórása) volt, ill. a Fos-pozitív sejtek számának átlagos mennyisége pedig nagyon szignifikánsan emelkedett ($p < 0,001$) az újraetetés után $96,7 \pm 7,7$ -re (8. ábra).



7. ábra

Fos-ir neuronok jelennek meg a DMH ventralis szubdivíziójának (DMv) területén újraetetés hatására. A-C: Fényképfelvételek mutatják a Fos-ir sejttetek eloszlását a DMH-ban kisebb (A1-B1), és nagyobb nagyításon (A2-B2). A: Csak kevés Fos-ir neuron látható a DMH-ban 48 órás éheztesítés után. B: Az újraetetés egy jelentősen megemelkedett Fos-ir sejtdenzitást eredményez a DMH ventrális szubdivíziójában, míg a DMH más részén csak kevés elszórt sejt mutat Fos immunpozitivitást. Lépték = 1 mm az A1-B1 és 200 μm az A2-B2 panelek esetén.

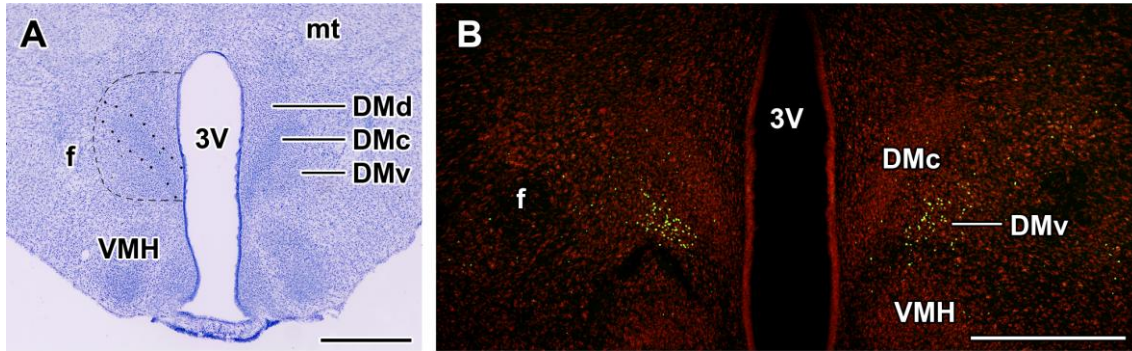


8. ábra

Újraetetés hatása a DMH ventralis szubdivíziójában elhelyezkedő Fos-ir neuronok számára. Fos-ir neuronok száma nem változott az éheztetett csoportban a táplálékhoz szabad hozzáférésű kontroll állatokhoz képest. Ezzel ellentétben az újraetetés nagymértékben növelte a Fos-ir neuronok számát (***: $p < 0,001$).

5.1.3. Fos-ir sejtek lokalizációjának topográfiai azonosítása

Az újraetetés hatására megjelenő sejtcsoport lokalizációja megfelel a DMH ventrális szubdivíziójának Nissl festett metszetek alapján (9A ábra). Az aktiválódott sejtek pozíciójának további megerősítése érdekében Fos immunreaktivitást és fluoreszcens Nissl festést tartalmazó dupla festett metszeteket készítettünk, amelyek megerősítették, hogy az aktiválódott sejtek a DMH ventrális szubdivíziójában helyezkednek el (9B ábra).

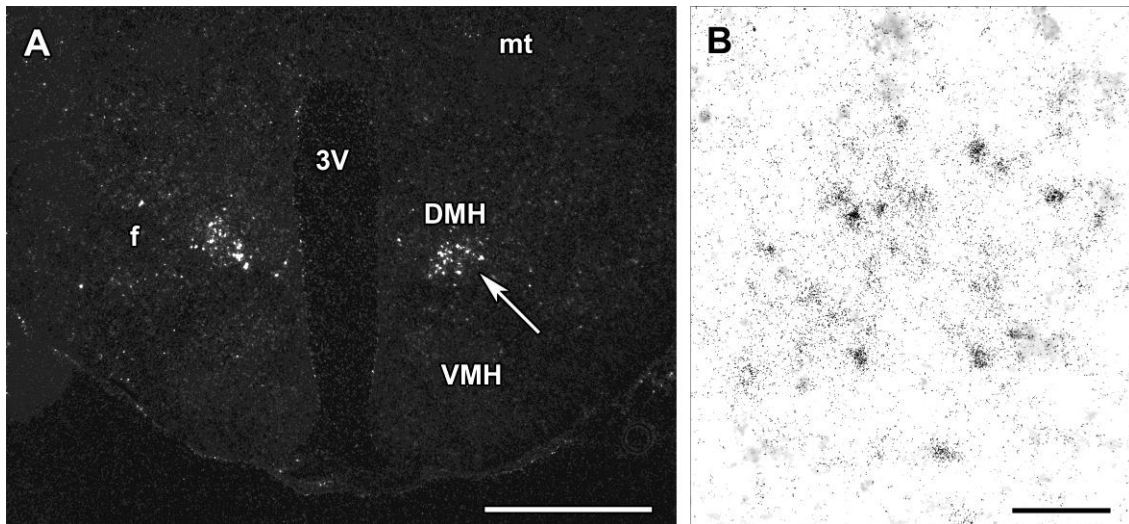


9. ábra

Újraetetés hatására megjelenő Fos-ir neuronok lokalizációjának meghatározása a DMH területén. A: Egy krezil-ibolyával festett metszet látható, amelyen jelezzük a DMH szubdivízióit. A DMH szaggatott vonallal van körülvéve. A középben elhelyezkedő pars compacta szubdivízió határát pedig pontokkal körbehatárolt vonal jelzi. B: Újraetetés hatására Fos-ir neuronok (zöld sejtmag) jelennek meg a DMH ventrális szubdivíziójában, éppen csak ventrálisan a fluoreszcens Nissl festéssel (piros sejtmagok) jól azonosítható nagy sejtdenzitású kompakt szubdivíziótól. Lépték = 1 mm.

5.1.4. Fos mRNS megjelenése újraetetés hatására

A DMH ventrális szubdivíziójában megjelenő Fos-immunreaktív szignál specificitását megerősítettük *c-fos* mRNS kimutatására alkalmas *in situ* hibridizációs hisztokémiai technikával (10. ábra). Eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy a *c-fos* mRNS elsősorban a DMH ventrális szubdivíziójában fejeződik ki, pontosan ott, ahol a Fos fehérje megjelenik ebben a magban.



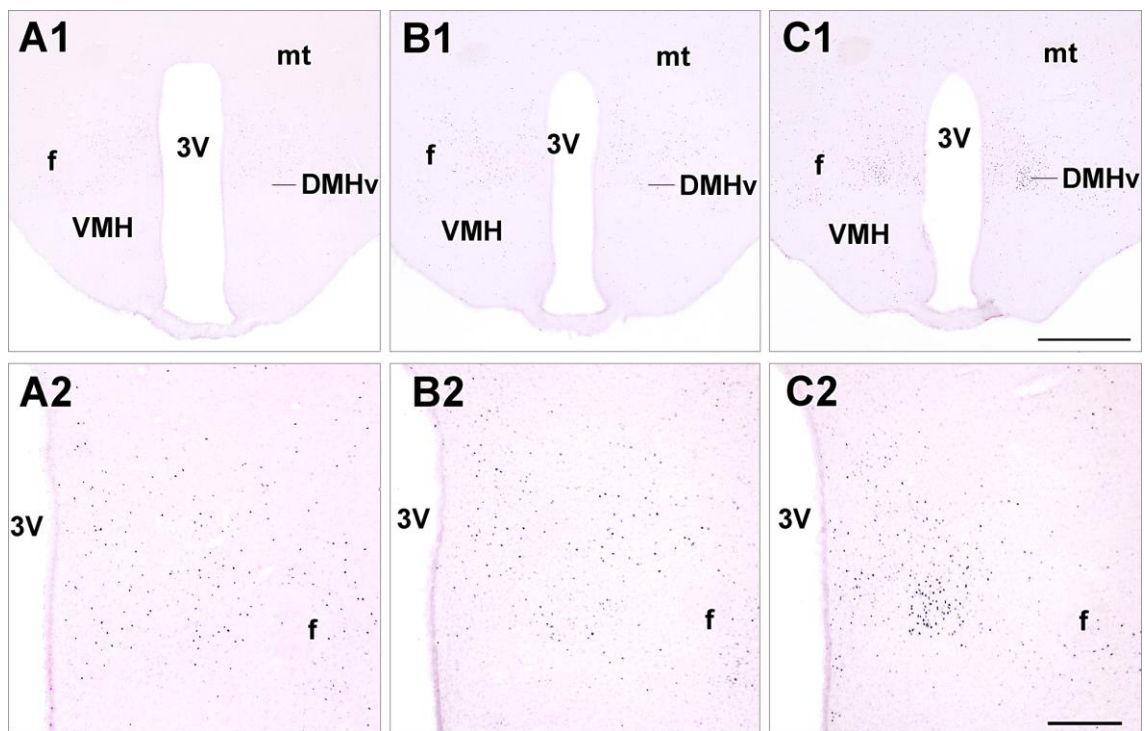
10. ábra

A c-fos mRNS kifejeződésének demonstrálása a DMH-ban in situ hibridizációs hisztokémia segítségével. A: Egy sötét látótérben készült kép, ami nagy intenzitású jelet mutat a DMH ventrális szubdivíziójában. B: Egy nagy nagyítású világos látótérben készült kép az A panelen nyíllal jelölt területről, melyen az egyéni autoradiográfiai szemcsék is jól látszanak a jelölt sejtek felett. Lépték = 1 mm az A és 100 μ m a B panel esetén.

5.1.5. Fos aktiválódás gyomortelítettség után a DMV-ban

Azokban az állatokban, amelyeknek a táplálékot csak bemutattuk, azaz a táplálékot az állatok látták és szagolhatták, de nem érhatték el és nem fogyaszthatták el azt, a Fos-immunreaktív (Fos-ir) idegsejtek száma mérsékelt arányú növekedést mutatott a DMH mindhárom részében, de a mag ventrális szubdivíziójában nem volt látható specifikusan erősebb festődés (11A ábra). Ebben az állatcsoportban a Fos-immunreaktív idegsejtek átlagos száma metszetenként, a metszet egyik oldalán nézve $16,1 \pm 3,6$ (középérték \pm a középérték szórása). Abban az állatcsoportban, amelyben a patkányok csak korlátozott mennyiségű táplálékot (1,5 g) ehettek, nem tapasztaltunk további növekedést a Fos-immunreaktív neuronok számában a DMH egyik szubdivíziójában sem, beleértve a ventrális szubdivíziót is (11B ábra). Ezekben az állatokban a Fos-immunreaktív neuronok száma $17,3 \pm 1,9$ (középérték \pm a középérték szórása) volt a DMH ventrális szubdivíziójában. A jóllakottságig újraetetett állatokban a

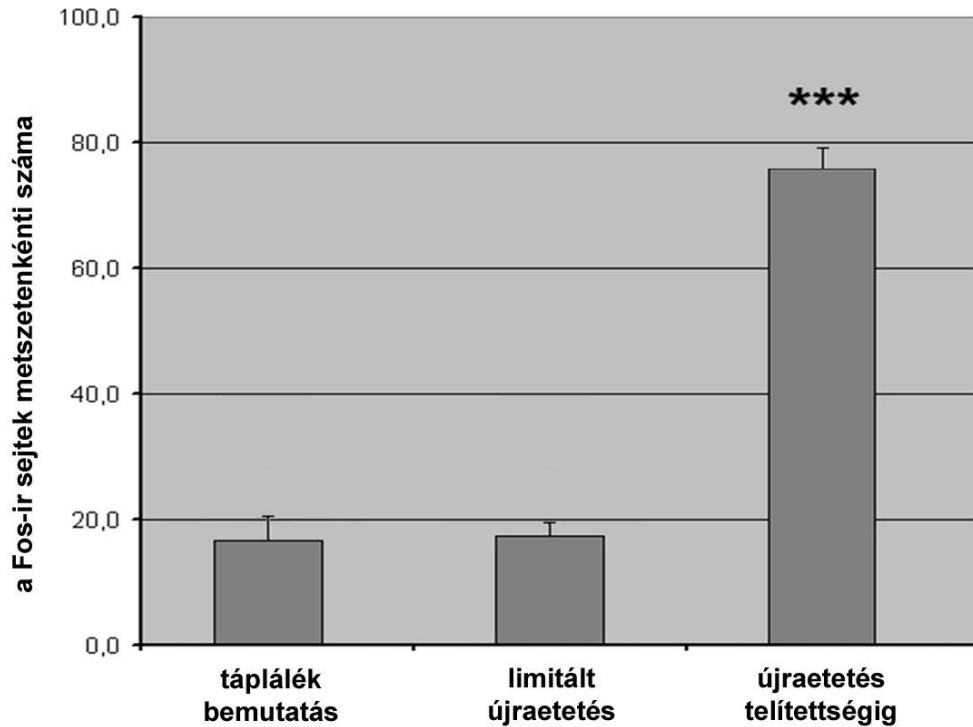
Fos-immunreaktív neuronok sűrűségében a DMH kompakt és a dorsalis szubdivíziójában nem volt látható változás, míg az aktiválódott sejtek különösen nagy sűrűségben jelentek meg mindenütt a DMH ventrális szubdivíziójának rostro-caudalis kiterjedésében (11C ábra). A jóllakottságig újraetett patkányok agyának dorsomedialis magjának ventralis szubdivíziójában a Fos-immunreaktív idegsejtek átlagos száma a $75,9 \pm 3,8$ (középérték \pm a középérték szórása) magasságig emelkedett. Ez az érték (közel 4-szeres) egy magasan szignifikáns növekedést mutat ($p < 0,001$) a Fos-immunreaktív neuronok számában újraetetés hatására (12. ábra).



11. ábra

Fos kifejeződés éheztetett patkányok újraetése során. A: Olyan patkányok, melyeknek bemutatták a táplálékot, de azt nem érhették el, így nem is fogyasztották el. B: Limitáltan újraetett (1,5 g táplálékkal) állatok. C: Telítődött, jóllakott állatok. A felső panelek (A1, B1, C1) Fos-ir neuronokat mutatnak a hypothalamusban a DMH szintjében. Az alsó panelek a DMH-t mutatják nagyobb nagyításban. Több Fos-ir neuron jelenik meg a DMH minden részén elszórva a táplálék bemutatásának hatására (A2). A Fos-ir sejtek denzitása és eloszlása hasonló az 1,5 g tápot fogyasztott csoportban is (B2). A jóllakott állatokban ezzel szemben nagyon sok Fos-ir sejt jelenik

meg specifikusan a DMH ventrális szubdivíziójában (C2). Lépték = 1 mm az A1-C1 és 200 μm az A2-C2 panelek esetén.



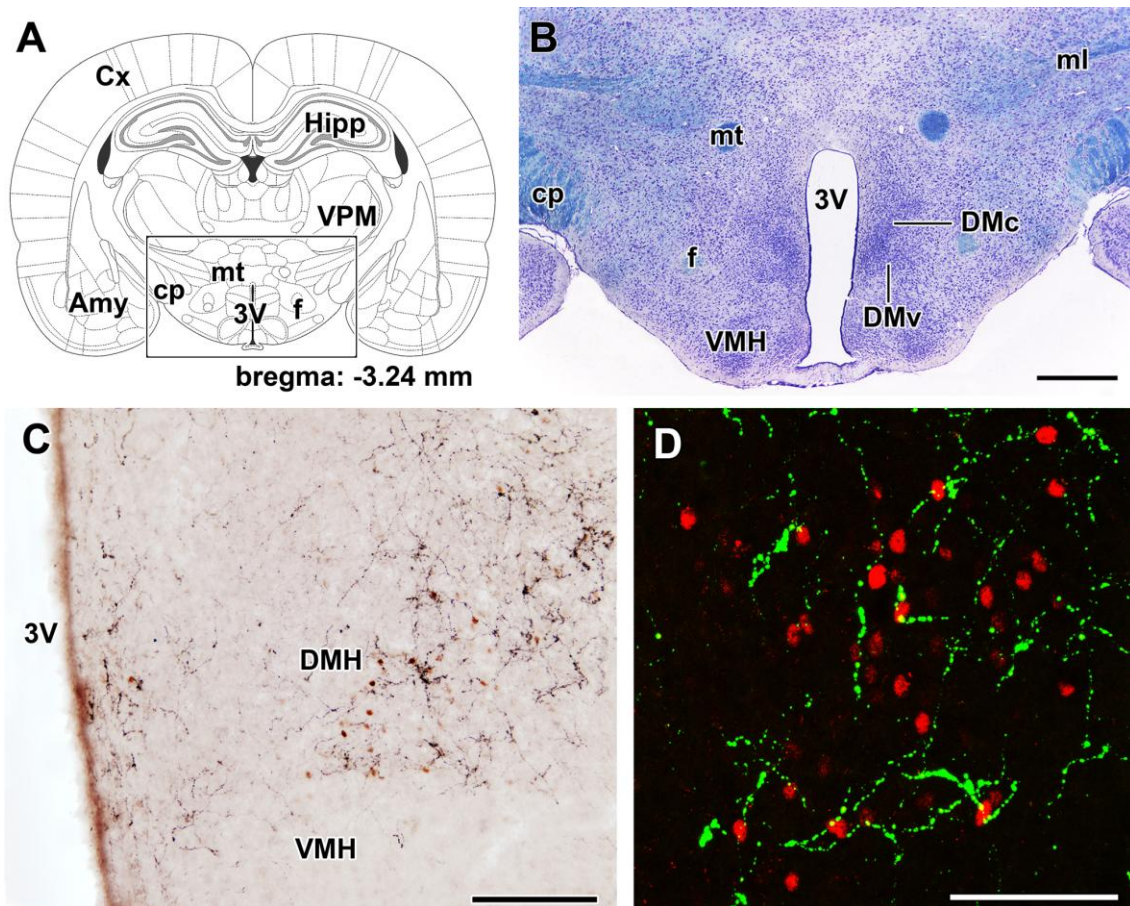
12. ábra

Újraetetés hatása a Fos-ir neuronok számára a DMH ventrális szubdivíziójában. Egy-utas ANOVA a 3 csoport között szignifikáns különbséget mutatott ki ($F=26,0$; $p < 0,0001$). Bonferroni többszörös összehasonlításra alapuló post-hoc tesztje alapján a 'táplálék bemutatott' és a 'limitáltan újraetettet' csoportok esetén nincs különbség a Fos-ir neuronok számában, viszont mindkét csoporthoz képest jelentős növekedés van a telítettségig jóllakott állatok esetén (***: $p < 0,001$).

5.2. DMv-beli idegrostok és agytörzsi eredetük

5.2.1. PrRP-tartalmú idegrostok és idegvégződések a DMH-ban

PrRP immunreaktivitást figyeltünk meg a hypothalamus különböző részein. PrRP-vel jelölődő sejtek a DMH-ban kizárólag annak a legcaudálisabban található részén figyelhetők meg, ezzel szemben PrRP immunreaktív rostok a DMH dorsalis és ventrális szubdivíziójában, és még az arcuatus magban és a paraventricularis magban is jelen vannak, és esetenként megfigyelhetők a lateralis hypothalamikus area területén belül is. A metszetek Luxol Fast Blue-krezil-ibolyával festett metszetekkel való összevetése (13B ábra) jelzi, hogy a PrRP-tartalmú rostok eloszlása a DMH ventrális szubdivíziójában teljes átfedésben van azzal a területtel, amely Fos-immunreaktív neuronokat tartalmaz (13. ábra).



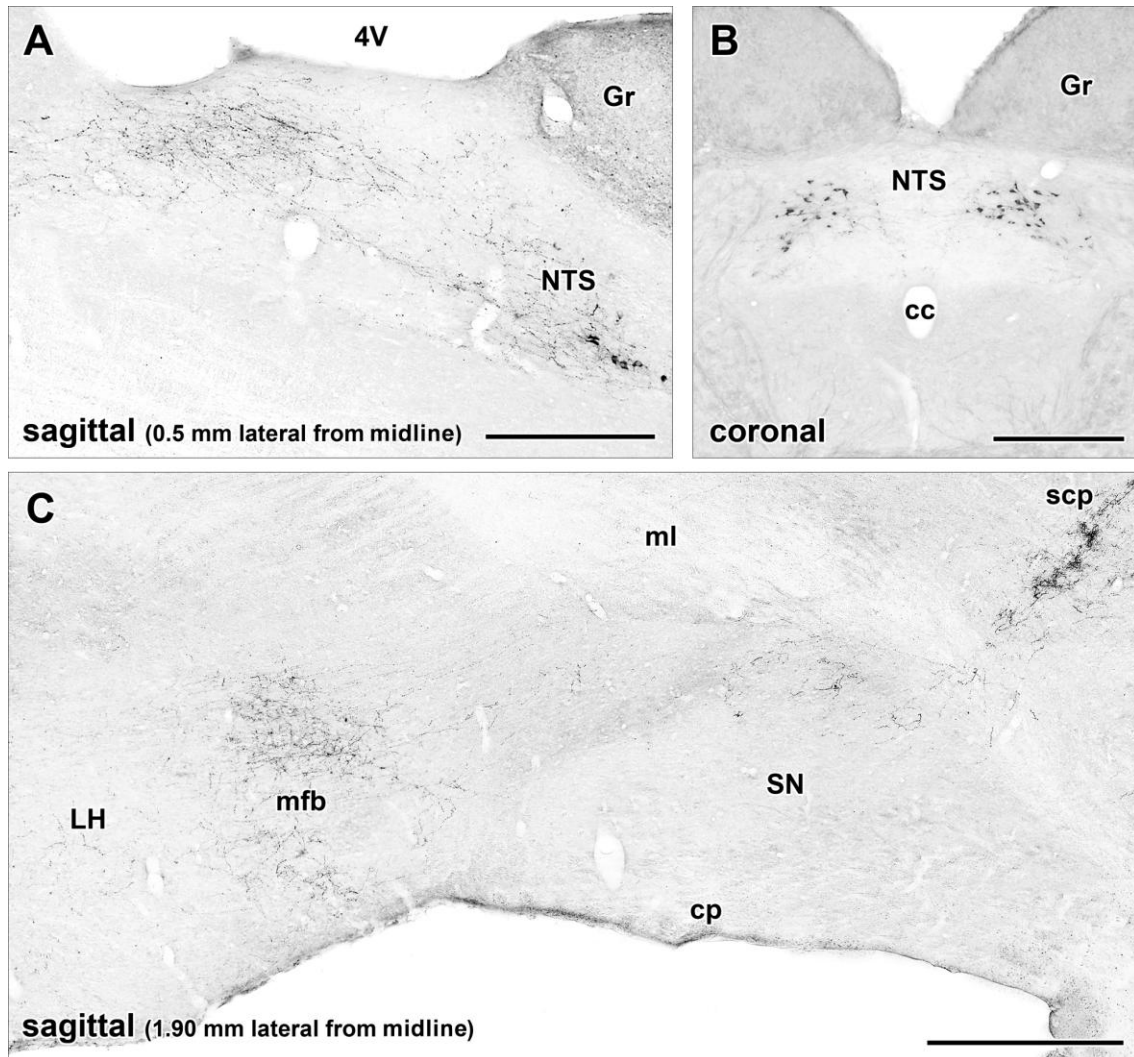
13. ábra

PrRP rostterminálisok a DMH ventrális szubdivíziójában. A: Egy, a DMH-t tartalmazó koronális metszetről készült rajz. B: Az A panelen bekeretezett terület látható Luxol Fast Blue krezil-ibolya festéssel a DMH körüli agyterület cito- és

mieloarchitektúrájának demonstrálása érdekében. C: Fekete Ni-DAB jelölt PrRP-ir rostok veszik körül a Fos-t expresszáló neuronokat (barna sejtmagok). D: Egy nagy nagyítású konfokális kép, ami arra utal, hogy a PrRP rostvégződések (zöld) a Fos-ir neuronok (piros) körül helyezkednek el. Lépték = 1 mm a B, 200 μ m a C és 100 μ m a D panel esetén.

5.2.2. Az NTS PrRP-tartalmú sejtjei, és az azokból kiinduló felszálló rostok

Az NTS mediális szubdivíziójának a caudalis részén elhelyezkedő PrRP-sejtekből eredő PrRP-ir rostok előre vetülnek a solitarii köteg mentén a medullában (14. ábra). Ezek a rostok nem alkotnak önálló köteget, sokkal inkább nagyobb rostkötegek mentén vetülnek. A híd szintjén a rostok a felső kisagykar (superior cerebellar peduncle) mentén futnak, majd a ventrális noradrenerg köteghez csatlakoznak és belépnek a középagyba. Innen ventrális irányba fordulnak és tovább folytatják útjukat előrefelé a medialis hurokpálya (lemniscus medialis) és a substantia nigra között a ventrális tegmentális area területére (14C ábra). A lateralis hypothalamusban a PrRP-immunreaktív rostok a medialis előagyi köteg rostjai között helyezkedtek el. A hypothalamus premamillary területénél a rostok közül néhány dorsomedialis irányba fordul, belép a DMH-ba és a mag ventralis szubdivíziójában végződik. A medialis előagyi kötegben található többi PrRP rost tovább vetül, többek között a hypothalamus paraventricularis magjába.

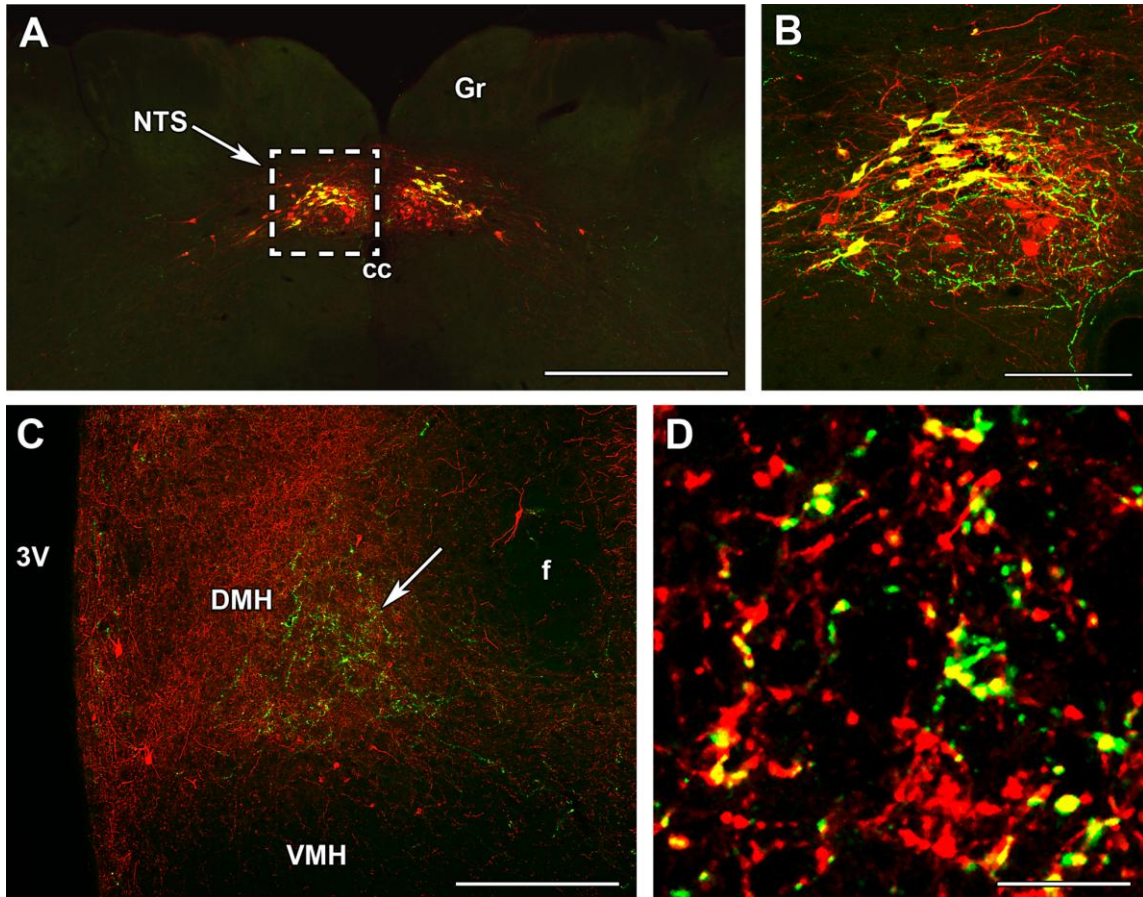


14. ábra

A solitarii-hypothalamikus PrRP-tartalmú útvonal. A, B: PrRP-tartalmú neuronok jelen vannak az NTS caudalis részén, és előrefelé vetülnek a medulla dorsalis részén. C: A PrRP rostok a pedunculus cerebellaris superiorhoz csatlakozva futnak, majd a ventralis noradrenerg köteghez csatlakoznak. Ezután belépnek a középgyba, a substantia nigra felett haladnak, majd csatlakoznak a medialis előagyi köteghez a hypothalamusban. Lépték = 500 μ m.

PrRP és TH dupla immunfestésével megmutattuk, hogy az NTS caudalis részén található PrRP sejteknek (15A,B panel), és a DMH-ban található PrRP-ir rostoknak (15C,D panel) lényegében mindegyike tartalmaz TH-t. Ezzel szemben a DMH legcaudalisabb részén található PrRP-ir sejtek nem koexpresszálnak TH-et, ami azt

bizonyítja, hogy a DMH területén található PrRP–TH duplán jelölt rostok medullaris eredetűek.

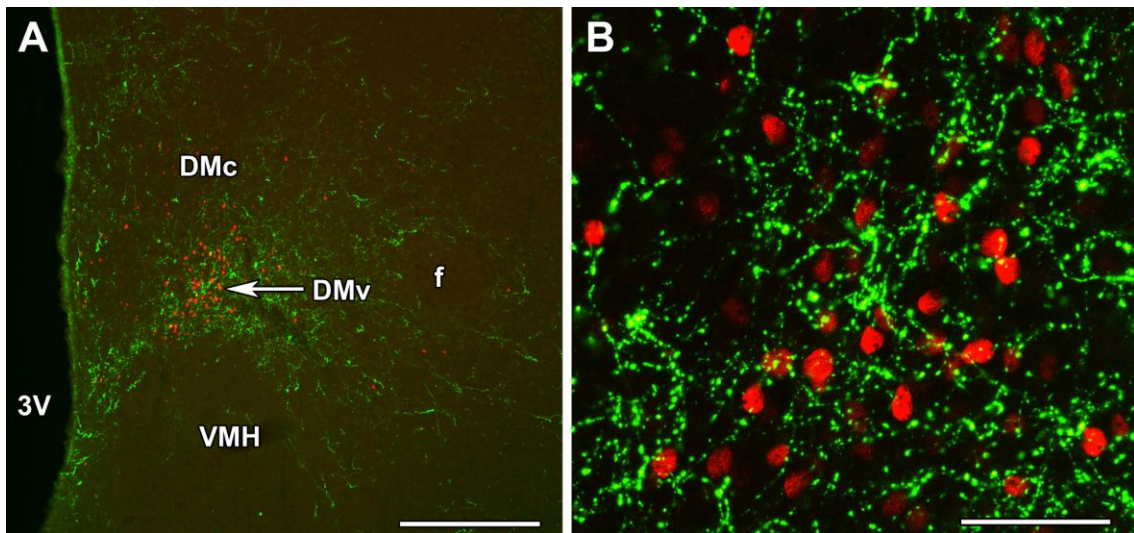


15. ábra

PrRP és tirozin hidroxiláz (TH) az NTS-ben és a DMH-ban. Dupla fluoreszcens immunjelölés a TH (piros) és PrRP (zöld) tartalmú sejtek és rostok esetén. A: A PrRP jelenléte a TH-ir sejtek egy szubpopulációjában (sárga sejttestek) az NTS-ben (A2 sejtcsoport). B: Az A panelen bekeretezett terület látható egy nagy nagyítású konfokális képen. C: Sűrű TH-ir rosthálózat látható a DMH minden részén. A PrRP-ir rostok denzitása ellenben csak a DMH ventrális szubdivíziójában nagy. D: Egy nagy nagyítású konfokális kép a C panelen nyíllal jelölt területről, ami demonstrálja, hogy minden PrRP rost egyben TH-t is tartalmaz. Emellett jelentős számú, csak TH immunreaktivitást mutató rost is van a DMH ventrális szubdivíziójában. Lépték = 1 mm az A, 200 μ m a B, 400 μ m a C, és 30 μ m a D panel esetén.

5.2.3. *GLP-1* tartalmú idegrostok és idegvégződések a DMH-ban

GLP-1-immunfestett rostokat és végződésekét találtunk a hypothalamus különböző részein, beleértve a dorsomedialis, az arcuatus, a paraventricularis magokat és a lateralis hypothalamikus area néhány részét. A GLP-1-immunreaktív rostok legnagyobb sűrűségben a DMH-ban vannak jelen, és a GLP-1 rostok a DMH-n belül csaknem kizárólagosan a DMH ventrális szubdivíziójában voltak megtalálhatóak. A DMH ventrális szubdivíziójában található GLP-1 tartalmú rostok topográfiai eloszlása az a terület, amely nagy mennyiségben tartalmazza az éheztetést követő újraetetés esetén látható Fos-immunreaktív neuronokat ezen a magon belül (16. ábra).



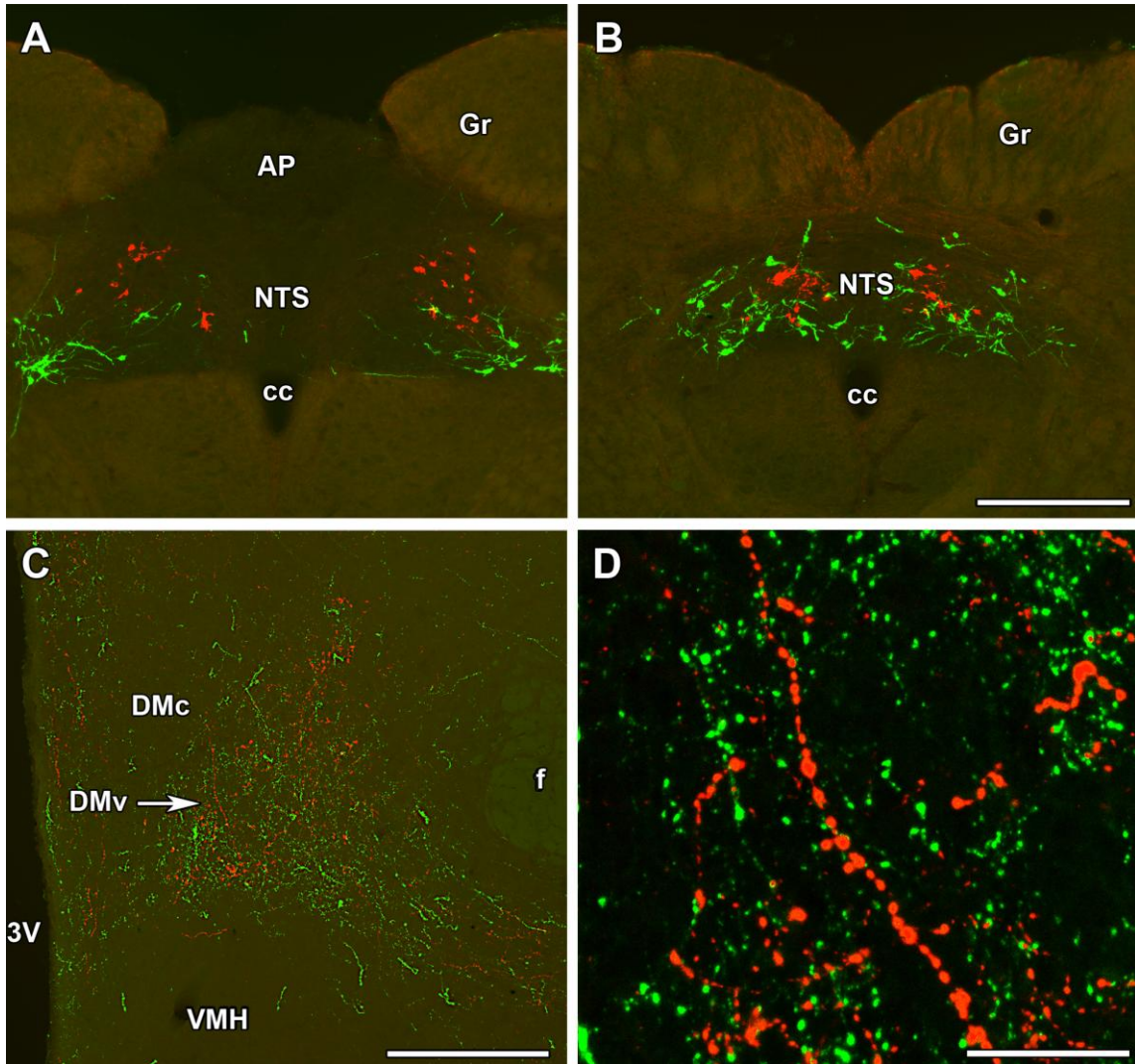
16. ábra

GLP-1-ir rostvégződések a DMH-ban. A: A GLP-1 rostok (zöld) sűrű hálózata a DMH ventrális szubdivíziójában a Fos-ir sejtekkel (piros) azonos lokalizációt mutat. B: Egy nagy nagyítású konfokális kép, ami arra utal, hogy a GLP-1 rostvégződések (zöld) a Fos-ir neuronok (piros) körül helyezkednek el a DMH ventrális szubdivíziójában. Lépték = 500 μ m a C, és 50 μ m a D panel esetén.

5.2.4. *A GLP-1* sejtek a PrRP-sejtektől elkülönülő populációt alkotnak

A GLP-1 neuronok főként a nucleus tractus solitarii caudalis részén helyezkednek el, a PrRP neuronokhoz képest kissé caudalisan és ventrálisan, de velük részben átfedve (17A,B ábra). A részleges átfedés ellenére duplán festett sejtet nem

figyeltünk meg, azaz a két neuropeptid nem koexpresszálódik (17A,B ábra). A GLP-1 és a PrRP-tartalmú rostok szintén azonos területen helyezkednek el a DMH ventrális szubdivíziójában (17C ábra). Ennek ellenére, a rostokban sem találtunk kolokalizációt a két neuropeptid között (17D ábra).



17. ábra

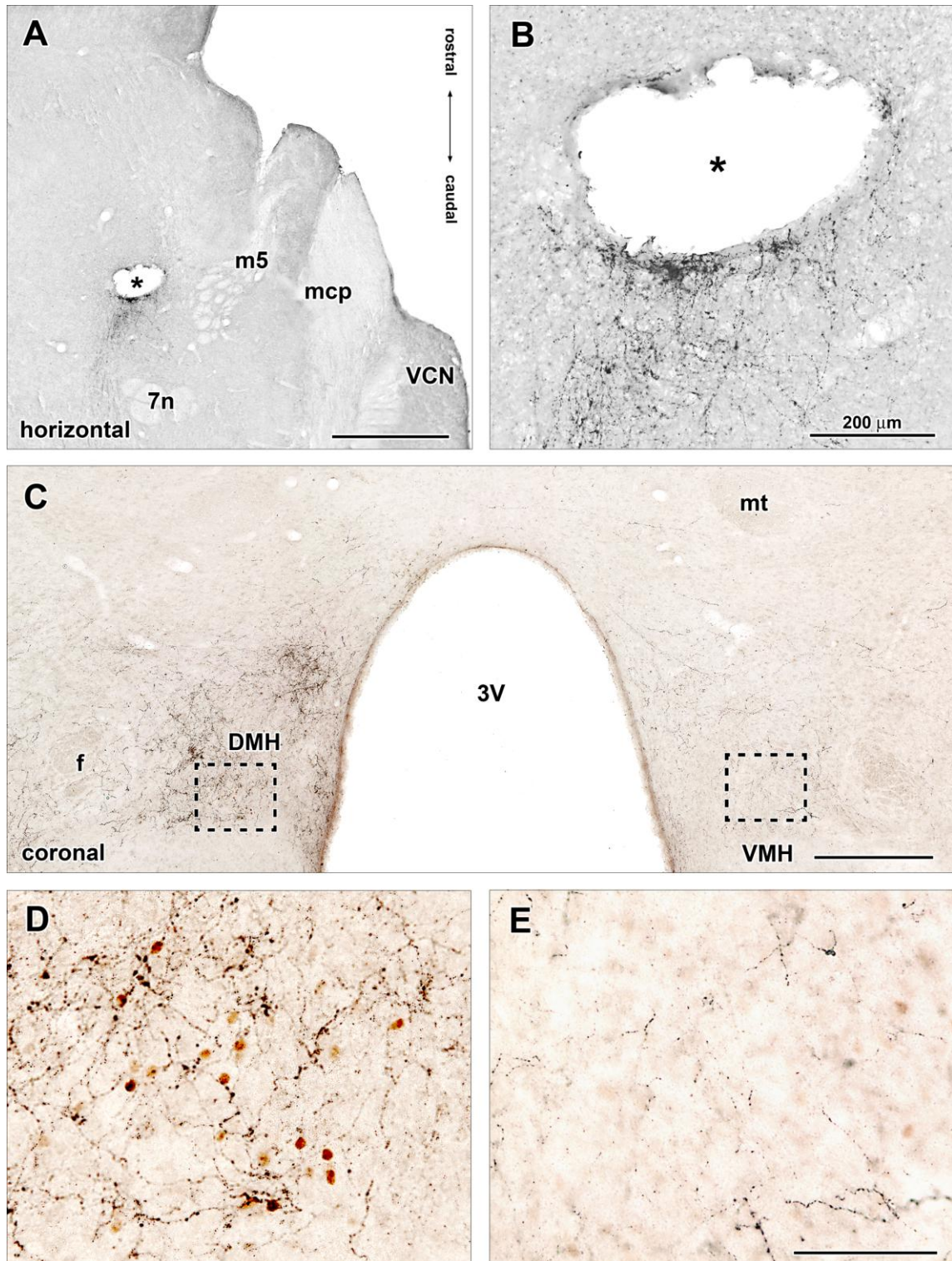
GLP-1 és PrRP-ir sejttestek és rostok az NTS-ben, illetve a DMH-ban. A: GLP-1 (zöld) és PrRP-ir (piros) sejttestek az NTS-ben 13,8 mm-re caudalisan a bregma szinttől. B: Egy caudalisabb metszet ugyanazzal a festéssel 14,4 mm-re caudalisan a bregma szinttől. A két neuropeptidet tartalmazó neuronok eloszlása egymással átfed. Mindazonáltal egyik szinten sem található duplán jelölt sejt. C: PrRP (piros) és GLP-1-rostok (zöld) a DMH ventralis szubdivíziójában azonos eloszlást mutatnak. D: A nagy nagyítású konfokális kép demonstrálja, hogy a PrRP (piros) és GLP-1 szignál (zöld)

nem kolokalizál a DMH-ban. Lépték = 500 μm a B, 400 μm a C, és 50 μm a D panel esetén.

5.3. Pályaátvágás és lézió hatása a DMH-beli PrRP és GLP-1 rostokra és a Fos aktivációra

5.3.1. PrRP rostok átvágása és ennek hatása a Fos aktivációra

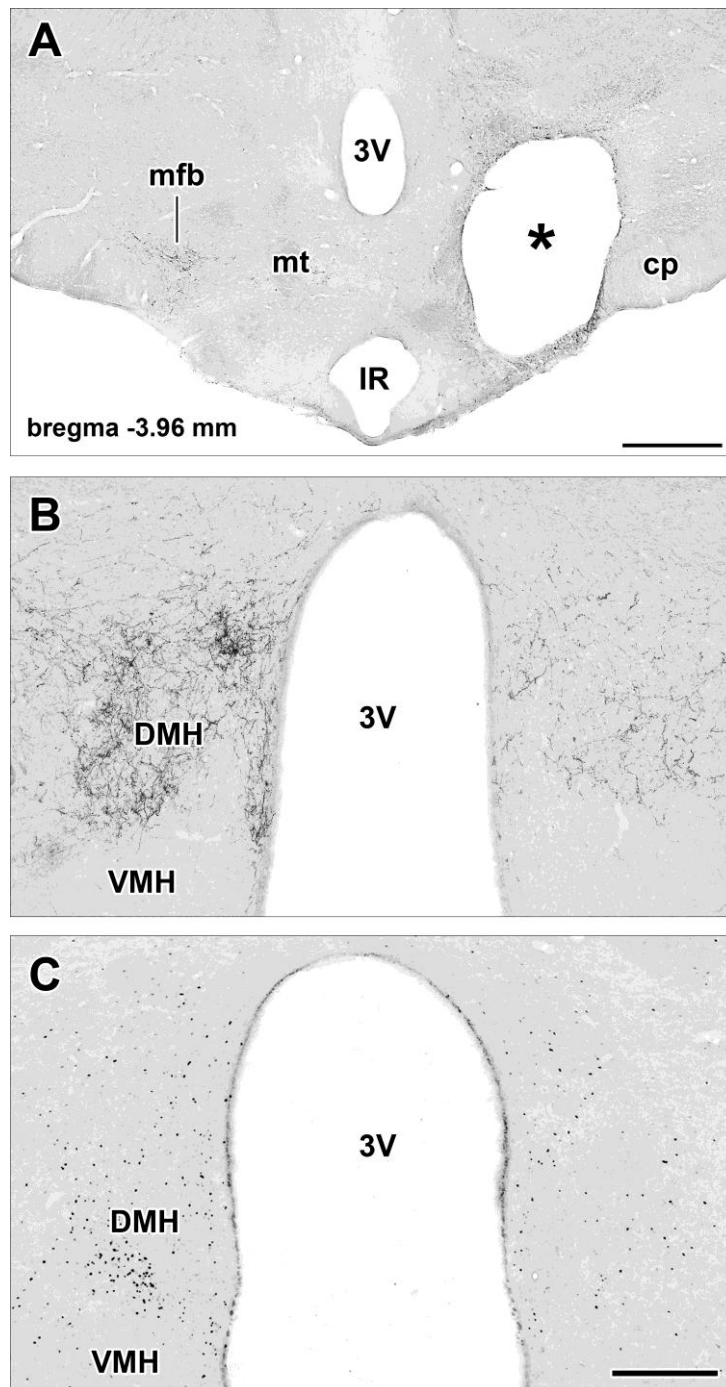
A felszálló NTS-hypothalamus útvonalnak, ami a felszálló PrRP tartalmú rostokat is magába foglalja, féloldali transzekcióját végeztük el két különböző rostrocaudalis szinten üveggéssel végzett koronális irányú vágásokat ejtve. A híd területén elvégzett pályaátmetszések (18A,B), éppúgy, mint a hypothalamus caudalis részén elvégzett pályaátmetszések (19A), PrRP immunreaktivitás felhalmozódását eredményeztek közvetlenül a metszés helye mögött (18A,B panelek). Mind a híd területén, mind a caudalis hypothalamus területén történt átmetszések a PrRP tartalmú rostok sűrűségének markáns csökkenését eredményezték a DMH ventralis szubdivíziójában, éppúgy, mint a PrRP-tartalmú rostok más célterületein a hypothalamusban, ipsilateralisan, azaz az átmetszéssel megegyező oldalon (18C-E és 19B ábrák). Ezzel szemben kontralateralisan, a pályaátmetszés helyéhez viszonyított ellenkező oldalon, a PrRP-ir rostok sűrűségében nem tapasztaltunk változást összehasonlítva olyan újraetett állatokkal, amelyek pályaátmetszésen nem estek át.



18. ábra

PrRP rostoknak a híd területén történő átmetszése, és ennek hatása a DMH PrRP-ir terminálisaira és az újraetetés hatására bekövetkező Fos expressziójára. A: Egy horizontális metszetről készült kép mutatja a PrRP rostok átmetszését. Az átmetszés helyét fekete csillag jelöli (*). B: Egy nagy nagyítású kép mutatja a PrRP rostok

felhalmozódását a transzekció caudalis részén. C: A transzekció oldalán a PrRP-ir rostok drámai mértékű csökkenése látható a DMH-ban. D, E: Nagy nagyítású fényképek mutatják a C panelen bekeretezett területeken a Fos-ir sejtek (barna sejtmagok) számának csökkenését a lézió oldalán. Lépték = 1 mm az A, 200 μ m a B, 500 μ m a C, és 100 μ m az E panel esetén.

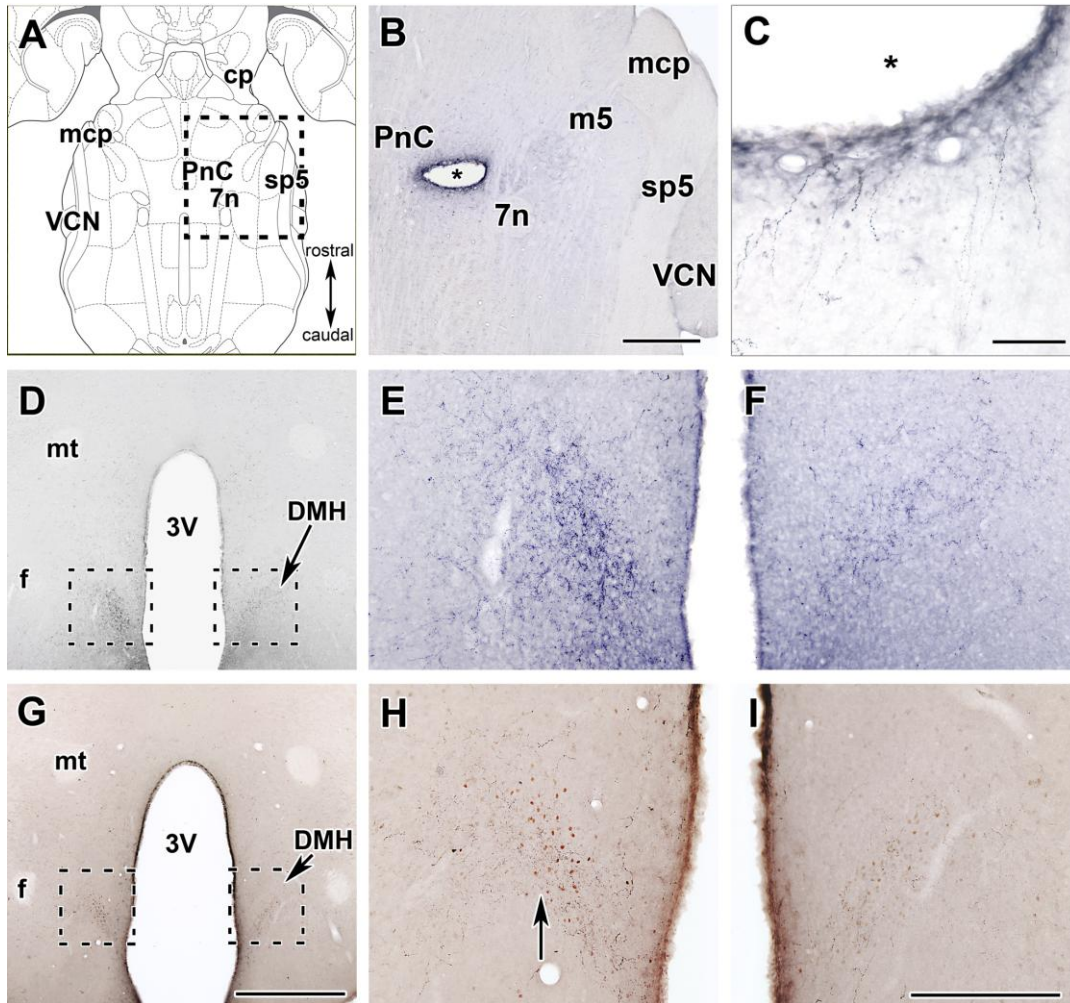


19. ábra

PrRP rostok hypothalamikus átmetszése és ennek hatása a DMH-ban a PrRP rostok és Fos-ir neuronok denzitására. A: A PrRP-immunfestett koronális metszet a corpus mamillare szintjében mutatja a PrRP rostok átmetszését a mediális előagyi kötegben. Az átmetszés helyét egy csillag jelzi (*). B: Egy nagy nagyítású fénykép mutatja, hogy az átmetszés oldalán a PrRP rostok denzitása jelentősen lecsökken a DMH-ban. C: Egy nagy nagyítású fénykép a B panelnek megfelelő területről azt demonstrálja, hogy a Fos-ir neuronok nem jelennek meg újraetetés hatására a transzekció oldalán. Lépték = 1 mm az A, és 500 μ m a C panel esetén.

5.3.2. GLP-1 tartalmú nyúltvelői-hypothalamikus útvonal és átmetszésének a hatása a DMH-ban található neuronok Fos aktivitására

A felszálló solitarii-hypothalamikus útvonal egyoldali átvágása esetén, amikor a koronális metszést a híd caudalis részén ejtettük (20A-C ábra), a GLP-1 tartalmú rostok és idegvégződés sűrűsége a vágás helyétől rostralisán nagyon feltűnően lecsökken, és a DMH ventrális szubdivíziójában csaknem teljesen el is tűnik a vágás helyével megegyező oldalon (20D-F ábrák). Párhuzamosan a GLP-1-ir rostok eltűnésével, egy drámai csökkenés tűnik fel az újraetetésre megjelenő Fos-expresszáló neuronok sűrűségében a DMH ventralis szubdivíziójában (20G-I ábrák): a Fos-immunreaktív idegsejtek száma $26,7 \pm 3,4$ (középérték \pm a középérték szórása) értékre csökkent ipsilateralisán az átmetszéstől összehasonlítva a $75,9 \pm 3,8$ (középérték \pm a középérték szórása) átlagos értékkel, amit az intakt (átmetszésen nem átesett, újraetett) patkányok esetén találtunk ($p < 0,05$). Ezzel ellentétben nem találtunk látható eltérést a GLP-1 immunreaktív rostok sűrűségében a DMH ventrális szubdivíziójában a transzekciótól kontralateralisan, azaz az átmetszéssel ellentétes oldalon. A Fos-pozitív sejtek száma szignifikánsan magasabb volt kontralateralisan az átmetszés helyéhez képest, mint ipsilateralisán ($57,4 \pm 5,1$ versus $26,7 \pm 3,4$; $p < 0,05$), bár a kontralateralis érték egy kissé lecsökkent összehasonlítva az intakt, nem műtött, újraetett patkányokban kapott adatokhoz képest.

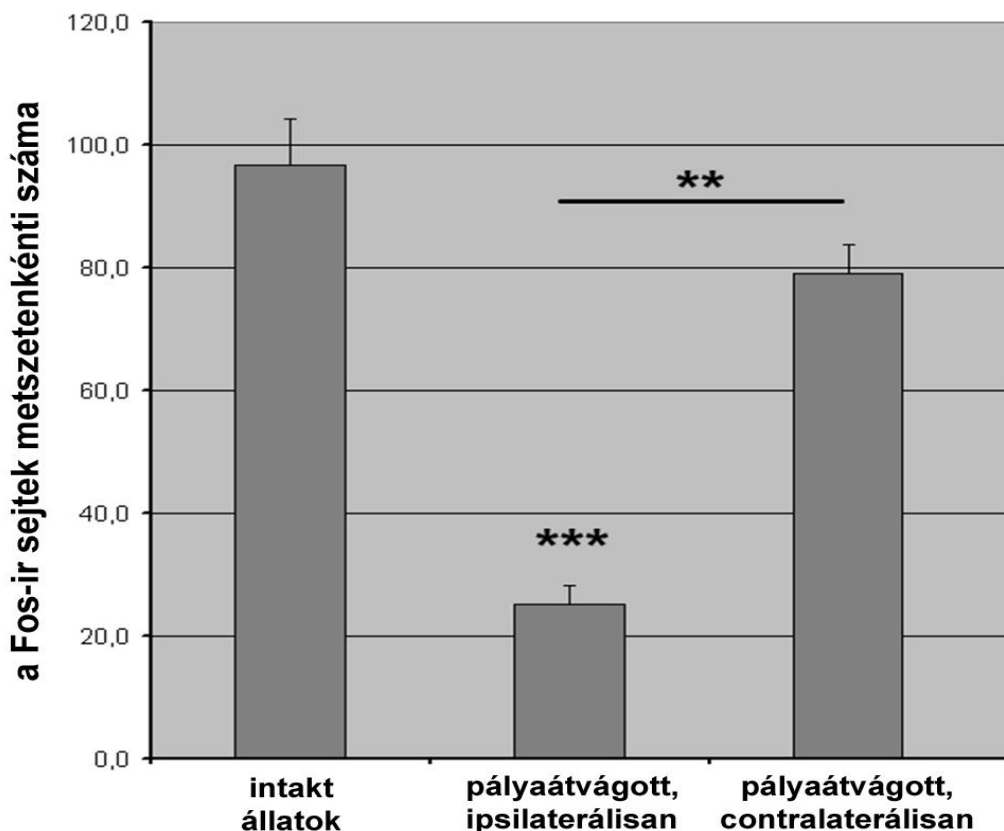


20. ábra

GLP-1 rostok hídban történt átmetszése és ennek DMH-beli Fos expresszióra kifejtett hatása. A: Az agy horizontális metszetének rajza. B: Az A panel bekeretezett részének megfelelő területről készült fénykép mutatja a GLP-1 rostok átmetszését a híd területén. C: A nagy nagyítású fotomikrográf demonstrálja a GLP-1 felhalmozódását az átmetszéstől caudalisan. D: Az átmetszés oldalán a GLP-1 rostok denzitása jelentősen csökken a DMH területén. E, F: A D panelben bekeretezett terület nagy nagyítású képe mutatja, hogy a GLP-1 rostok denzitása lecsökken az átmetszés oldalán (F). G: A Fos-ir sejtek (barna sejtmagok) jelentős csökkenése látszik újraetett patkányok DMH-jában az átmetszés oldalán. H,I: A G panelben bekeretezett terület nagy nagyítású képe mutatja, hogy a GLP-1 rostok denzitása és a Fos-ir sejtek száma lecsökken az átmetszés oldalán (I). A nyíl az átmetszéssel kontralaterális oldalon jelenlevő intenzív Fos immunreaktivitást megjelenítő neuron csoportra mutat. Lépték = 500 μ m az A, 1 mm a B, 100 μ m a C, 1 mm a G, és 300 μ m az I panel esetén.

5.3.3. A Fos-ir neuronok száma a solitarii-hypothalamikus pálya átvágásának hatására

A solitarii-hypothalamikus pálya átvágásának hatására, az újraetetés után Fos-expressziót mutató neuronok számának drámai csökkenése jelentkezett a pályaátvágás helyzetéhez képest ipsilateralisan (18C-E, 19C, és 20G,H ábrák). Az újraetetésre válaszként megjelenő Fos-immunreaktív neuronok száma a pályaátmetszés helyétől ipsilateralisan szignifikánsan csökkent ($P < 0,001$) $96,7 \pm 7,7$ -ről (pályaátmetszésen nem átesett állatok) $25,1 \pm 3,1$ -re (14. ábra). Ez az érték jelentősen alacsonyabb ($P < 0,01$) annál a $79,2 \pm 4,7$ -es értéknél is, amit a pályaátmetszett állatokban a pályaátmetszés kontralateralis oldalán kaptunk, ami egy kis mértékben csökkent érték összehasonlítva a kontrollként tekintendő, pályaátmetszésen át nem esett állatok adataihoz képest (21. ábra).



21. ábra

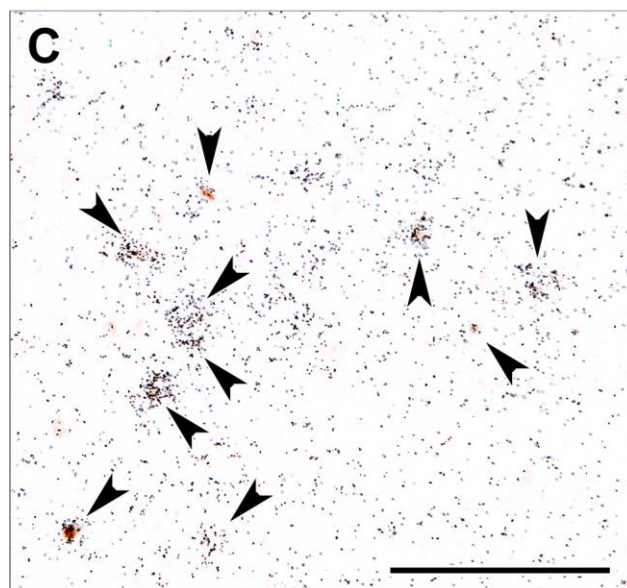
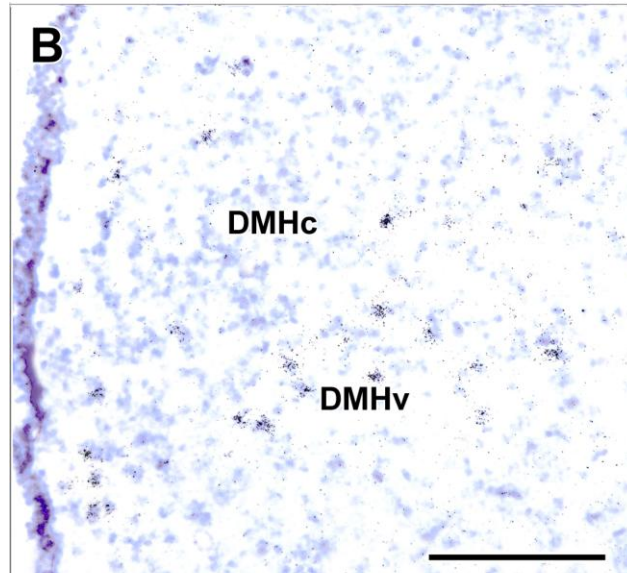
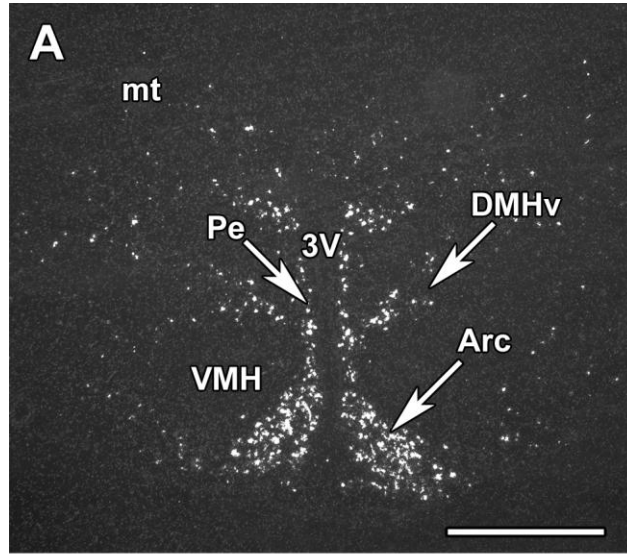
A solitarii-hypothalamikus útvonal átmetszésének hatása a Fos-ir neuronok számára a DMH ventralis szubdivíziójában. A solitarii-hypothalamikus útvonal átmetszése

jelentősen csökkentette a Fos-ir neuronok számát az átmetszés oldalán (***: $p < 0.001$). Ez a szám szintén szignifikánsan alacsonyabb, mint a Fos-ir neuronok száma az átmetszéshez képesti kontralateralis oldalon (**: $p < 0.01$).

5.3.4. *GLP-1 receptorok (GLP-1R) a DMH-ban*

GLP-1 receptorok bőségesen előfordulnak a hypothalamusban. Különösen nagy sűrűségben fordulnak elő GLP-1R-expresszáló neuronok a DMH ventrális szubdivíziójában, de az arcuatus és a paraventrikuláris magokban is, valamint a posterior hypothalamikus area területén (22A ábra).

Abból a célból, hogy demonstráljuk a Fos-aktivitás jelenlétét a dorsomedialis magban GLP-1 receptort (GLP1R) expresszáló idegsejteken, *in situ* hibridizációs technikával GLP-1R mRNS kimutatását és Fos immunfestést végeztük el. Fos immunhisztokémia elvégzése után megbizonyosodtunk arról, hogy $83,2 \pm 1,4\%$ -a a GLP-1R mRNS-t tartalmazó neuronoknak expresszált Fos-t a jóllakottságig történő újraetetés hatására (22. ábra). *Vice versa*, $76,8 \pm 1,3\%$ -a a Fos aktivált sejteknek jelölt volt GLP-1R mRNS-sel.

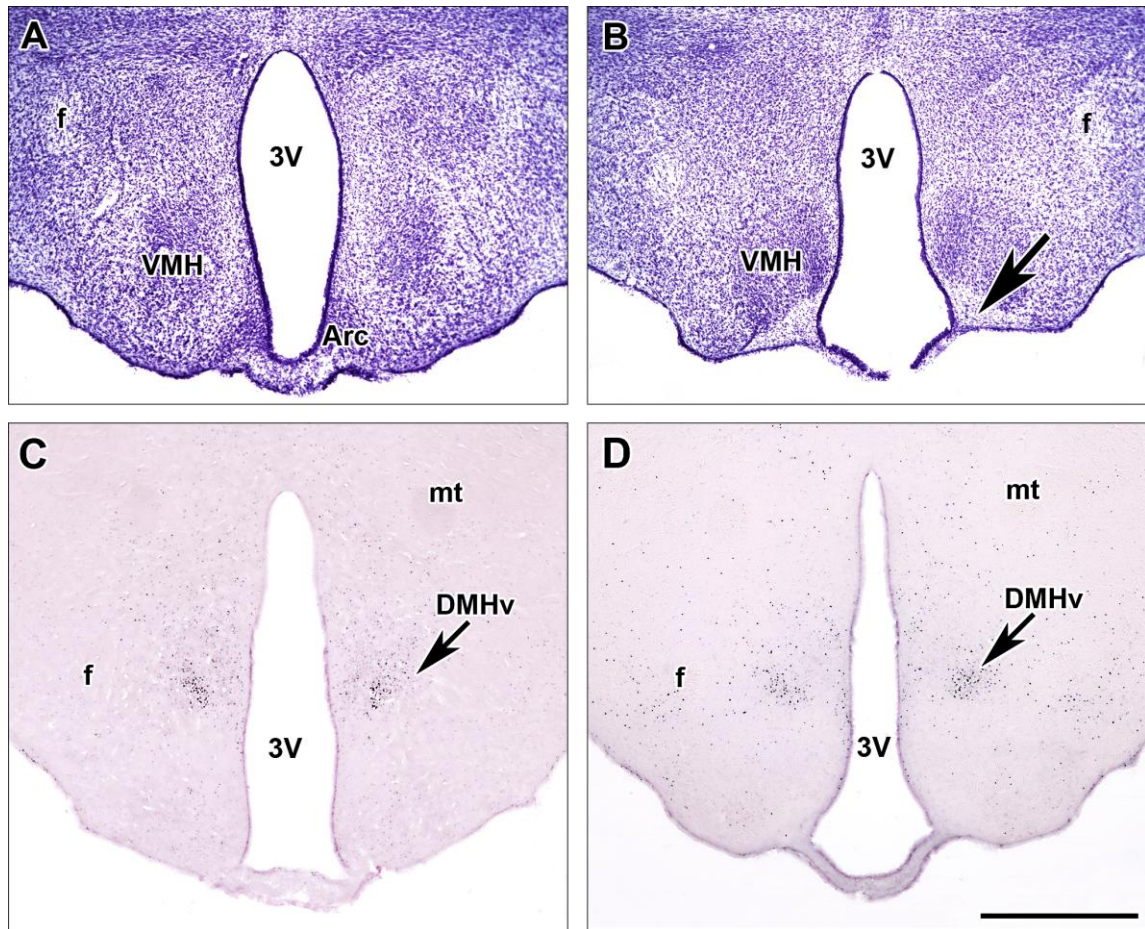


22. ábra

A GLP-1 receptor (GLP-1R) mRNS eloszlása a DMH-ban a Fos-ir neuronokhoz viszonyítva. A: Egy GLP-1R *in situ* hibridizációs hisztokémiával jelölt metszet sötét látóteres fényképfelvétele. A GLP-1R mRNS jelentős mennyiségben van jelen az arcuatus magban, a DMH-ban, és a hypothalamikus periventriculáris magban. B: A nagyfelbontású világos látótérben felvett kép mutatja, hogy a GLP-1R mRNS (fekete pontok) kifejeződik a DMH ventrális szubdivíziójában. C: Egy GLP-1R *in situ* hibridizációs hisztokémiával és Fos immunhisztokémiával duplán jelölt metszetről készült felvétel mutatja, hogy az autoradiográfias szignál (fekete pontok) a Fos-pozitív (barna sejtmag) sejtek felett helyezkedik el újraetett patkányokban. A duplán jelölt sejteket fekete nyilak jelölik. Lépték = 1 mm az A, 200 μ m a B, és 100 μ m a C panel esetén.

5.3.5. Az MSG kezelés hatása a Fos aktivációra a DMH-ban

A korai, posztnatális (születés utáni) szakaszban történő MSG kezelés az arcuatus mag léziójához, lényegében a teljes eltűnéséhez vezetett a magnak a rostrocaudalis kiterjedése mentén végig, mint ahogy azt bemutatjuk Nissl festett metszeteken (23A és 23B panelek). A hypothalamusban található többi mag esetén, beleértve az arcuatus maggal szomszédos ventromedialis magot is, nem látható citoarchitekturális változás. Az MSG kezelt, éheztetett állatok újraetése Fos-immunreaktivitás megjelenését eredményezte a DMH ventrális szubdivíziójában (23D ábra), és ezeknek az aktiválódott neuronoknak a denzitása a kezeletlen, újraetett állatokban tapasztalható aktiválódott neuronok denzitásához hasonló (23C ábra). Az újraetetés-indukálta Fos-immunreaktív neuronok számát nem befolyásolta az MSG kezelés. Az újraetetésre aktiválódó, MSG kezelt állatokban a Fos-immunreaktív neuronok száma $90,3 \pm 6,8$ (közéérték \pm a közéérték szórása), míg a kontroll állatokban $96,7 \pm 7,7$ (közéérték \pm a közéérték szórása) volt.



23. ábra

A glutaminsav nátriúmsójjával indukált lézió az újraetetés okozta aktivációra a DMH-ban. A: Egy krezil ibolyával festett metszet képe kontroll hím állatban a bregma szintjétől 2,16 mm-re caudalisan. A festődő sejtek nagy denzitása látható az arcuatus magban. B: Az arcuatus mag léziója látható egy glutaminsav nátriúmsójjával kezelt hím patkányban. A fekete nyíl jelöli a léziót, ahonnan a sejtek eltűntek. C: A bregma szintjétől 3,24 mm-re caudalisan a DMH ventrális szubdivíziójában Fos-ir sejtek jelennek meg újraetett állatokban. D: Glutaminsav nátriúmsójjával indukált lézió jelenlétében is megjelennek Fos-ir neuronok a DMH ventrális szubdivíziójában újraetetés hatására. A jelölt sejtek denzitása hasonló az intakt állatokban levő denzitáshoz. Lépték = 1 mm.

6. MEGBESZÉLÉS

Korábban már többen megmutatták, hogy éheztetést követő újraetetés hatására a DMH-ban található idegsejtek erőteljesen és gyorsan válaszolnak (Johnstone és mtsai 2006). A jelen munka során a sejtek aktiválódását tovább jellemeztük, leírtuk pontos pozíciójukat, valamint azonosítottunk egy, a nucleus tractus solitarii-ból felszálló neuropeptid tartalmú útvonalat, ami a DMH ventralis szubdivíziójába szállíthat jóllakottsági szignálokat. A *c-fos* expresszió megakadályozható a felszálló rostok műtéti pályaátvágásával, ami hozzájárulhat az állatok jóllakottsági reakcióinak lecsökkenéséhez.

6.1. A DMH neuronok aktivációja

Az idegsejtek az ingerekre azonnali *c-fos* expresszióval válaszolnak, amit a Fos fehérje akkumulációja, felhalmozódása követ a sejtmagban (Herdegen és Leah 1998, Hoffman és mtsai 1993, Morgan és Curran 1991). Ezért a Fos fehérje immunhisztokémiával történő detektálása, valamint a *c-fos* gén *in situ* hibridizációja közismerten a neuronális aktivitás nagyon érzékeny mutatói. A Fos technika alkalmazásának azonban vannak bizonyos korlátai, mivel a *c-fos* mRNS körülbelül 15-30 perccel az első stimulus után jelenik meg, és a Fos protein megjelenése még ennél is több időt vesz igénybe (30-60 perc). A Fos immunreaktivitás körülbelül 2-2.5 órával az egyszeri akut stimulus után mutat maximumot. A jelen kísérleteinkben a Fos-pozitív neuronok megjelenése megmutatta bizonyos hypothalamikus dorsomedialis idegsejtek aktivációját éheztetett állatokban újraetetés hatására. A DMH-ban található, az újraetetés hatására Fos-t expresszáló neuronoknak a különösen nagy sűrűsége azt mutatja, hogy ezeknek a neuronoknak fontos szerepe van a táplálékfelvétellel kapcsolatos információk feldolgozásában. A Fos fehérje immunfestésének specificitását a DMH-ban, közvetlenül ventralisan a magnak a könnyen felismerhető kompakt részétől, a Fos mRNS nagymértékű expressziója erősítette meg. Az aktiválódott neuronok elhelyezkedését a DMH ventralis szubdivíziójában Fos-immunreaktivitást és fluoreszcens Nissl festést magába foglaló duplafestéssel határoztuk meg, mivel a két festés kombinált használata lehetővé teszi az immunfestett struktúráknak az agyterületen belüli citoarchitektúrával összefüggésben történő pontos meghatározását.

6.2. A DMH neuronokat aktiváló inger

A jelen kísérleteinkben a patkányok befejezték a táplálékfelvételt az újraetetés kezdetétől számított 35-40 perccel. Következésképpen, az újraetetés kezdetétől számított 2 óra elteltével a Fos-immunreaktív neuronoknak a DMH ventralis szubdivíziójában megjelenő nagy száma valószínűleg az elfogyasztott táplálék hatására jelenhetett meg. Hogy valóban ez lehet az ok, azt alátámasztja, hogy az evés nélküli táplálék bemutatás, valamint a limitált mértékű táplálékkal történő újraetetés nem váltotta ki a jellegzetes Fos aktivációt specifikusan a DMH ventralis szubdivíziójában. A táplálék bemutatott állatcsoportba tartozó patkányok számos ingernek voltak kitéve miközben szagolhatták és felismerhették a táplálékot, de nem fogyaszthatták el azt, és ez az állapot számukra stresszt is okozott, ami szintén oka lehet az ezekben az állatokban kiterjedtebb területen, de ritkásan elhelyezkedő aktivált neuronok megjelenésének. A részlegesen újraetett állatcsoportba tartozó patkányok ugyanolyan ingereknek, és mindezekon kívül még az evéssel kapcsolatos további ingereknek voltak kitéve. Mindazonáltal a Fos expresszió mintázata és sűrűsége a DMH ventralis szubdivíziójában nem különbözött ebben a két állatcsoportban, ami azt feltételezi, hogy az evés művelete önmagában nem idéz elő további *c-fos* aktivációt a DMH ventralis szubdivíziójában. A két jól nem lakott csoporttal ellentétben azokban a patkányokban, amelyek addig ehetek, amíg elérték a jóllakottsági állapotot (korlátlan táplálékfogyasztás), feltűnően megnőtt a Fos-immunreaktív neuronok száma a DMH ventralis szubdivíziójában. Következésképpen ezeknek a sejteknek az aktivációja valószínűleg a jóllakottság hatására következett be, ami csak ebben az állatcsoportban valósult meg a jelen kísérleti modellben, és nem pedig a táplálék szaga, látványa, vagy az evés folyamata eredményezte azt. Érdeemes azt is megjegyezni, hogy a kísérletek délelőtt 9-10 órás kezdete (ami normális esetben a patkányok alvással töltött ideje) járul hozzá a Fos-immunreaktív neuronok alacsony szintjéhez a szabadon táplálékhoz jutó állatok csoportjában, ugyanis a zavartalan táplálékfelvétel többsége ezekben az állatokban éjszakára, azaz jóval korábban esett.

6.3. A solitarii-hypothalamikus pálya szerepe a DMH neuronok aktivációjában

Az az eredmény, hogy a pályaátvágások hatására drámaian lecsökkent az újraetetés-indukálta Fos-expresszió a DMH ventralis szubdivíziójában azt feltételezi,

hogy az NTS-ből felszálló rostok hozzájárulnak ezeknek a DMH neuronoknak az aktivációjához. A nagyon erős oldaldominancia, ami megfigyelhető az unilaterális transzekció hatásában, egyértelműen jelzi, hogy a ventralis DMH neuronok aktivációjában az idegi bemenetek fontos szerepet játszanak. Az a kismértékű visszaesés a Fos-pozitív neuronok számában, amit a DMH ventrális szubdivíziójának kontralaterális oldalán figyeltünk meg, a felszálló rostok kismértékű kereszteződésének következménye lehet a transzekció szintjétől rostralisán. Az NTS-ből eredő neuronális hatások jelentőségét támasztja alá az az eredmény is, miszerint az arcuatus mag MSG-indukált léziója hatástalan volt a DMH-ban bekövetkező, az újraetetés által okozott Fos aktivációra, vagyis az arcuatus magból a DMH-ba vetülő rostok (így az arcuatus mag neuronjaira ható hormonális szignálok) jóllakottság hatására bekövetkező aktivációban való szerepe kevésbé valószínű. A felszálló neuronális aktiváció jelentősége azonban nem zárja ki azt a lehetőséget, hogy a keringésben jelen lévő hormonok közvetlenül szintén hatnak a DMH neuronjaira újraetett állatokban (Barrera és mtsai 2011b, D'Alessio és mtsai 2005), mivel elképzelhető, hogy neuronális és hormonális hatások együttesen vezetnek a DMH sejtek aktivációjához.

6.4. PrRP-tartalmú neuronális bemenet a DMH ventralis szubdivíziójába

A PrRP az NTS mediális szubdivíziójának caudalis részén található sejtekben és a ventrolaterális medullában található sejtekben szintetizálódik, és ezek a sejtek noradrenalint koexpresszálnak az A1 és A2 katecholaminerg sejtcsoportokban. Minthogy a PrRP neuronok az NTS mediális szubdivíziójának caudalis részén csaknem teljesen kolokalizálnak az A2 noradrenalin sejtekkel (Chen és mtsai 1999, Morales és mtsai 2000, Tóth és mtsai 2008), az NTS PrRP neuronjaiból kiinduló rostok részét képezhetik a felszálló ventralis noradrenerg kötegnek, mely az A2 sejtcsoport egy részéből indul ki. Az NTS-ből eredő PrRP-immunreaktív axonok a hypothalamusba vetülnek (Maruyama és mtsai 1999, Morales és mtsai 2000, Roland és mtsai 1999). Abból a célból, hogy megvizsgáljuk ezen projekciók átmetszésének a hatását, nyomon követtük az NTS-ből a DMH irányába menő felszálló PrRP-immunreaktív rostokat. A PrRP-immunreaktív rostok a ventralis noradrenerg kötegen belül futnak az alsó agytörzs teljes hosszúságában (Palkovits 1999), a rostok és idegvégződések sűrű hálózatot képeznek a DMH ventralis részén. Ezeknek a felszálló rostoknak az unilaterális

(egyoldali) átvágása jelentős csökkenést eredményezett az átmetszéssel megegyező oldali PrRP-immunreaktív hálózatban a DMH-ban, megerősítve, hogy a PrRP rostok ebben a magban elsősorban az NTS-ből erednek és a többsége ezeknek a vetületeknek ipsilaterális irányultságú.

A DMH-ban található TH tartalmú PrRP-immunreaktív rostok topográfiája, elhelyezkedése a DMH ventralis részén található Fos-expresszálo neuronok csoportosulásának területére korlátozódik. Ez a megfigyelés arra utal, hogy specifikus medulláris TH/PrRP projekciók olyan DMH neuronokon végződnek, amelyek újraetetésre aktiválódnak. A PrRP hatás közvetítői, a PrRP receptorok, szintén a DMH-nak ezen a részén találhatók legnagyobb mennyiségben a hypothalamus területén belül (Roland és mtsai 1999). Vagyis a PrRP-tartalmú rostok szerepe a DMH neuronok aktivációjában nagyon valószínű, és összhangban van a PrRP táplálékfelvételszökkentő hatását leíró korábbi adatokkal (Lawrence és mtsai 2002), valamint a PrRP-nek az energiaegyensúly szabályozásában és a zsíryanycsere szabályozásában betöltött szerepével (Takayanagi és mtsai 2008).

6.5. GLP-1 neuropeptid-receptor rendszer a DMH ventralis szubdivíziójában

Az NTS-ben található GLP-1 neuronok tirozin hidroxilázt nem tartalmaznak, így nem expresszálnak noradrenalin. Emellett topográfiailag is elkülönülnek a velük részben átfedő elhelyezkedésű, de kissé caudálisabban elhelyezkedő PrRP sejtcsoporttól (Jin és mtsai 1988, Larsen és mtsai 1997, Tang-Christensen és mtsai 2000), azaz a felszálló rendszer független tagjai. A GLP-1 tartalmú solitarii-hypothalamikus útvonal a PrRP-hez hasonlóan szintén túlnyomórészt ipsilaterális, mivel a GLP-1-immunoreaktív rostoknak csaknem teljes eltűnése a DMH-ban a pályáátvágás oldalán figyelhető meg. Munkánk során bemutattuk a GLP-1 idegrostok és idegvégzódések jelenlétét a DMH területén, megerősítve ezzel korábbi megállapításokat (Jin és mtsai 1988, Larsen és mtsai 1997, Larsen és mtsai 2002, Tang-Christensen és mtsai 2000, Vrang és mtsai 2007). Ez a hálózat különösen sűrű a DMH ventralis szubdivíziójában. A GLP-1 rosthálózat és a Fos-immunreaktív neuronok hasonló eloszlása, és az a megfigyelés, hogy a GLP-1 tartalmú rostok végzódései a Fos-expresszálo neuronokkal egymáshoz közeli elhelyezkedésűek az újraetett patkányokban, azt jelzik, hogy a GLP-1 végzódések tökéletes pozícióban vannak ezeknek a neuronoknak az aktiválásához. A

GLP-1 receptorok bőségesen előfordulnak a DMH ventrális szubdivíziójában (Merchenthaler és mtsai 1999, Shughrue és mtsai 1996). Mivel az ismert, hogy a GLP-1 neuronok az NTS-ben a gyomor kitágulásának hatására és jóllakottsági hormonok hatására aktiválódnak (Rinaman 1999, Vrang és mtsai 2003) és bemutatták a GLP-1 elválasztódást hypothalamikus szövet-szeleten kalcium-függő módon (Blazquez és mtsai 1998), nagyon valószínű, hogy a GLP-1 egy olyan neuropeptid, mely a DMH ventralis szubdivíziójában ürülve befolyásolja az ott elhelyezkedő neuronok működését (Gu és mtsai 2013). A DMH ventrális szubdivíziójában megfigyelhető nagyon magas számú kolokalizáció a GLP-1 receptor és *c-fos* expresszió között azt feltételezi, hogy azok a neuronok, melyek GLP-1 receptort expresszálnak, újraetetés hatására aktiválódnak. A GLP-1 receptor aktiváció növeli a cAMP szintet és stimulálja az Erk szabályozó kinázt (Gomez és mtsai 2002). Mindezen adatok arra utalnak, hogy a GLP-1 receptorokon keresztül befolyásolható a DMH neuronok aktivitása.

6.6. A DMH neuronok aktivációját potenciálisan befolyásoló egyéb neuronális transzmitterek

A viszceroszenzoros szignálok közül a hypothalamusba jutó táplálékfelvétellel összefüggő információkat az NTS közvetíti. Az NTS-ben lévő peptiderg és katecholaminerg (A2) sejtek a hypothalamusba vetülnek és beidegzik a hypothalamikus neuronális körök legfontosabb képviselőit (paraventrikularis, ventromedialis, perifornikalis és dorsomedialis magokat), amelyek a táplálékfelvételt és az energiafelhasználást szabályozzák (Luckman és Lawrence 2003, Morales és mtsai 2000, Thompson és Swanson 1998). A felszálló útvonal PrRP-t, glucagon-szerű peptideket, GLP-1-et és GLP-2-t (Larsen és mtsai 1997, Tang-Christensen és mtsai 2000, Vrang és mtsai 2007) és neuropeptid Y-t (NPY) (Everitt és mtsai 1984, Sahu és mtsai 1988) is tartalmazhatnak neurotranszmitterként.

Bár az általunk elvégzett pályaaátvágások, melyek az agytörzs 2 különböző szintjén történtek, ugyanolyan hatásosak voltak a ventralis DMH-ban a PrRP- és GLP1-immunreaktív rostrendszer eltűnésének és a *c-fos* expresszió meggátolódásának szempontjából, más, szintén pályaaátmetszett, a DMH neuronok működését befolyásoló rostok létezése nem zárható ki. Két héttel a felszálló katecholaminerg köteg kétoldali átmetszése után, az NPY koncentrációja jelentősen lecsökkent a hypothalamus

magjaiban, beleértve a DMH-t is (Sahu és mtsai 1988). Az NPY, úgymint a PrRP, az agytörzs katecholaminerg sejtjeiben koexpresszálódik, és ezek a katecholaminerg sejtek részt vesznek a hypothalamus NPY innervációjában. Nem hagyhatjuk figyelmen kívül azt a tényt sem, hogy a DMH számos NPY-immunreaktív idegsejtet tartalmaz azok dendritikus elágazódásaival együtt, amelyek a DMH ventralis szubdivíziójában végződnek (Larsen és mtsai 2002).

Egy másik potenciálisan az NTS-ből a hypothalamusba vetülő pályákban található neuropeptid a GLP-2, ami szintén a preproglukagon gén terméke, és a DMH-ban jelenlévő GLP-2-immunoreaktív rostok szintén az NTS-ből eredhetnek (Vrang és mtsai 2007). Azonban a GLP-2 receptorok túlnyomórészt a DMH kompakt, nem a ventrális szubdivíziójában találhatóak (Tang-Christensen és mtsai 2000), így a GLP-2-nek a lehetséges hozzájárulása a DMH ventrális szubdivíziójában az újraetetés-okozta Fos-aktivációhoz nem valószínű.

6.7. Az NTS-DMH projekció funkcionális jelentősége

A jóllakottság érzését azok a jóllakottsági szignálok irányítják, amelyek a medulla szintjén érik el az agyat egyrésztől humorális, másfelől neuronális utakon keresztül. A gasztrointesztinalis traktusból a szignálok széles választéka érkezik az agyba érző és humorális afferenseken keresztül, közvetlenül a NTS-nél, illetőleg az area postrema-n keresztül. A nervus vagus (kisebb részben a nervus glossopharyngeus) afferensein át érkező neuronális szignálok a gyomor kitágultságáról közvetítenek információt és kitüntetett szerepük van a táplálékfelvétel befejezésében (Berthoud 2002, Schwartz 2000, Timofeeva és mtsai 2005). A cholecystokinin (CCK) a legjobban ismert jóllakottsági szignál, ami a vérkeringéssel, illetve a nervus vagus-on keresztül éri el az NTS-t, és amelynek az étkezés hatására megemelkedett koncentrációja a táplálékfogyasztás befejezéséhez vezet (Coll és mtsai 2007, Crawley és Corwin 1994, Kobelt és mtsai 2006, Wynne és mtsai 2005). Ismert, hogy a CCK aktiválja az NTS caudalis végén található idegsejteket, (Appleyard és mtsai 2007, Cano és mtsai 2003, Luckman 1992, Rinaman és mtsai 1993, Vrang és mtsai 2003, Willing és Berthoud 1997). Ez a medulláris bemenet információt szolgáltat az agytörzsi táplálékfelvétel szabályozó reflexek hatásosságáról a hypothalamus homeosztatis központjai felé.

6.8. *A felszálló NTS-DMH projekcióban levő PrRP potenciális szerepe*

A perifériális CCK aktiválja a PrRP-tartalmú neuronokat az NTS-ben (Lawrence és mtsai 2002). Ezenfelül azt is leírták, hogy a PrRP közvetíti a CCK-indukált jóllakottságot: PrRP receptor (GPR 10) hiányos transzgén egerekben a CCK nem csökkentette a táplálékfelvételt (Bechtold és Luckman 2006), ami kóros elhízást eredményezett (Bjursell és mtsai 2007, Gu és mtsai 2004). Sok adat van arra vonatkozóan, hogy a PrRP részt vesz a táplálékfelvétel szabályozásában (Bellinger és Bernardis 2002, Seal és mtsai 2001, Sun és mtsai 2005, Takayanagi és mtsai 2008). PrRP-specifikus antitest centrális beadása a táplálékfelvétel növekedését eredményezte, egy PrRP-deficiens egértörzs pedig hiperfágia és kóros elhízás tüneteit mutatta (Takayanagi és mtsai 2008). Éheztetett patkányokban a PrRP expresszió lecsökkent (Morales és mtsai 2000), a PrRP intracerebroventrikuláris injekciója pedig gátolja a táplálékfelvételt (Lawrence és mtsai 2000). Ezzel szemben a PrRP intracerebroventrikuláris injekciójának nincs hatása az egy éjszakán át tartó folyadékmegvonást követő folyadékfelvételre, illetve az izotóniás térfogatcsökkenés által okozott kihívás esetén a szomjúságérzet és sóétvágy alakulására (Samson és mtsai 2000). Ezért úgy gondoljuk, hogy a DMH ventralis szubdivíziójában megfigyelhető Fos-aktiváció direkt módon összefügg a táplálékfelvétel szabályozásával, nem a jóllakottságnak egy indirekt szabályozása az iváson keresztül, bár mi nem vizsgáltuk ezt a kérdést. A DMH érintettsége a PrRP táplálékfelvételt-szabályozó hatásában feltételezhető annak alapján is, hogy PrRP direkt a DMH-ba, de nem a paraventricularis magba, történő injektálása esetén a táplálékfelvétel lecsökken (Seal és mtsai 2001). Összességében megállapítható, hogy a felszálló NTS-DMH pályában levő PrRP szerepe alapvető lehet a jóllakottság érzésének kialakulásában, ami a táplálékfelvétel befejezését eredményezi.

6.9. *A felszálló NTS-DMH projekcióban levő GLP-1 potenciális szerepe*

A PrRP neuronokhoz hasonlóan, a gyomor tágassága aktiválja az NTS-ben található GLP-1 sejteket is (Vrang és mtsai 2003). Több bizonyíték van arra vonatkozóan, hogy ezt a szignált is CCK szállíthatja a GLP-1 neuronok felé, ami viszont hozzájárulhat a DMH neuronok jóllakottság utáni ingerléséhez (Hisadome és mtsai 2011, Trapp és Hisadome 2011). Közismert, hogy a GLP-1 leállítja a táplálékfelvételt a

perifériás hatásától függetlenül is (Barrera és mtsai 2011a, Barrera és mtsai 2011b, Dossat és mtsai 2011, Hayes és mtsai 2009, Kinzig és mtsai 2002, Meeran és mtsai 1999, Tang-Christensen és mtsai 1996, Turton és mtsai 1996). Az NTS-ben található GLP-1 neuronoknak széleskörű projekciós mintázata figyelhető meg az agytörzsben és az előagyban is (Jin és mtsai 1988, Llewellyn-Smith és mtsai 2011, Vrang és mtsai 2007). GLP-1 helyi injekciója különböző agyterületekre, és ezek léziókkal és pályaátvágásokkal elvégzett kombinációi a GLP-1 megkülönböztethető funkcióit feltételezik a különböző agyterületeken. A hypothalamus területén található GLP-1 receptorok nagy valószínűséggel érintettek neuroendokrin válaszreakciókkal és az energia egyensúly szabályozásával kapcsolatos folyamatokban (Kinzig és mtsai 2003, Rinaman 2010, Schick és mtsai 2003).

6.10. A DMH neuronjainak lehetséges funkciói

A DMH egy olyan integráló központ, amely a különböző forrásokból származó táplálékfelvétellel összefüggő információkat egyesíti (Crosby és mtsai 2011, Zhu és mtsai 2007). Különböző irányú, a DMH környezetében történő átmetzések azt bizonyították, hogy a ventralis irányból a DMH-t elérő, az NTS-ből felszálló rostok nagyon fontos szerepet játszanak a normális táplálékfelvétel fenntartása szempontjából (Bellinger és Bernardis 1999). CCK perifériás injekciója Fos expressziót indukált a DMH-ban (Kobelt és mtsai 2006). Ezt a hatását a CCK az NTS-en keresztül fejt ki (Cano és mtsai 2003, Monnikes és mtsai 1997, Rinaman és mtsai 1998, Rinaman és mtsai 1993, Willing és Berthoud 1997). Funkcionális szempontból fontos, hogy a CCK okozta táplálékfelvétel csökkentés DMH-lézionált patkányokon nem következik be (Bellinger és Bernardis 1984).

A DMH a hypothalamuson belül található széleskörűen kiterjedt vetületei alapján valószínűleg szerepet játszik az energia-egyensúly állapotát jelző információknak a medullából a hypothalamikus központokba jutó kiterjesztésében (Bellinger és Bernardis 1999). Ezen kívül a DMH, és különösen a ventralis szubdivíziója a DMH-nak, a cirkadián ritmus táplálék-által vezérelt szabályozásában is érintett (Gooley és mtsai 2006). A sejtek egyes funkcionálisan működésképtelen molekuláris óra alkotórészének kizárólagosan a DMH-ban történő helyreállítása visszaállítja a táplálék-által vezérelt cirkadián ritmust (Fuller és mtsai 2008). Táplálék által vezérelt cirkadián ritmusú

patkányok DMH-jában Fos aktiváció volt megfigyelhető a táplálkozás időpontját várva (Ángeles-Castellanos és mtsai 2004, Poulin és Timofeeva 2008). Mindezek alapján feltételezzük, hogy a jóllakottság által előidézett aktivációban érintett terület, a jelen tanulmányban bemutatott ventralis DMH az alapja a táplálék által történő vezérlés lehetőségének. Ritmusgenerátorként a DMH hatással lehet a különböző homeosztatisz komponensekre a táplálékfelvétel szabályozásán túl is, mint ahogy azt is leírták, hogy a DMH neuronjainak aktivációja a specifikus premotor neuronokon át fokozza a hőtermelő és kardiovaszkuláris központokra kifejtett szimpatikus hatást (Cao és mtsai 2004).

7. KÖVETKEZTETÉSEK

- Fos expressziót mutató neuronok igen nagy sűrűségét találtuk a DMH területén éheztetést követő szabad táplálékhoz jutás hatására, viszont nem volt jelentős aktiváció limitált mennyiségű táplálék, valamint az állat által hozzá nem férhető táplálék bemutatásának hatására. Mindezek alapján arra következtetünk, hogy jóllakottság, a gyomor telítettsége szükséges a DMH neuronok aktiválódásához.
- A Fos-aktivációt mutató neuronok telítettséig történő újraetetés hatására fluoreszcens Nissl festékkel való együttes festés alapján a DMH ventrális szubdivíziójában helyezkednek el, azaz a DMH ezen része vesz részt a jóllakottsági információ feldolgozásában.
- A DMH-t innerváló solitarii-hypothalamikus rostoknak két típusát írtuk le. Az egyik az NTS PrRP tartalmú noradrenerg, a másik pedig az NTS GLP-1-et kifejező neuronjaiból indul ki. Mindkét rostrendszer terminálisainak DMH-beli eloszlása megegyezik a jóllakottság hatására aktiválódó neuronok lokalizációjával.
- A felszálló solitarii-hypothalamikus útvonal átmetszése mind a PrRP, mind pedig a GLP-1 immunreaktivitás felhalmozódását eredményezte az átmetszéstől caudálisan, emellett a PrRP és a GLP-1-tartalmú rostok denzitásának jelentős csökkenése volt megfigyelhető az ipsilaterális DMH-ban, míg az ellenoldalon nem volt számottevő csökkenés, ami jelentős ipsilaterális PrRP és a GLP-1-tartalmú, az NTS-ből a DMH felé való projekció létezésére utal.
- A felszálló solitarii-hypothalamikus útvonal féloldali átmetszésének a hatására az újraetetésre bekövetkező Fos aktiváció mértéke jelentősen lecsökkent az átmetszés oldalán, ami a rostoknak a DMH neuronok aktivációjában betöltött szerepére utal.
- Az arcuatus mag nátrium-glutamáttal való léziója nem volt hatással a DMH neuronjainak újraetetés hatására bekövetkező aktivációjára, ami azt jelenti, hogy az arcuatus magból a DMH-ba menő rostok által szállított információ, többek között az arcuatus magba érkező humorális szignál nincs jelentős hatással a DMH neuronok jóllakottság általi aktivációjára.
- A GLP-1 receptor jelenlétét sikerült kimutatnunk a DMH-ban, eloszlásuk a jóllakottság által aktivált neuronokéval megegyezett, sőt kolokalizációt is kimutattunk, ami arra utal, hogy ezen receptorok szerepet játszhatnak a GLP-1 DMH neuronokra kifejtett hatásában.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásaink fő célja az volt, hogy jellemezzük az NTS-ben található PrRP és GLP-1 tartalmú idegsejtek és a hypothalamus dorsomedialis magjának (DMH) ventralis szubdivíziója közötti neuronális kapcsolatot, és ezek szerepét a táplálékfogyasztás szabályozásában. Megmutattuk, hogy a DMH ventrális szubdivíziójában aktiválódnak neuronok újraetetés hatására. Eredményeink szerint a jóllakottság egy fontos faktor a DMH ventrális szubdivíziójában található neuronok aktivációja szempontjából. Az NTS-hypothalamus pálya unilaterális átmetszései akár a híd magasságában, akár a hypothalamus caudalis szintjén megakadályozták az újraetetésre-indukálódott *c-fos* expresszió kialakulását a DMH ventralis szubdivíziójában, ami az NTS-ből felszálló pálya fontos szerepére utal. Az arcuatus mag léziója viszont nem csökkentette az újraetetésre aktiválódó sejtek számát a DMH ventralis részén, ami arra utal, hogy a perifériáról ide érkező szignálok nem járulnak hozzá a DMH neuronjainak az újraetetés során bekövetkező aktivációjához. Szintén megmutattuk, hogy a PrRP és GLP-1 idegvégződések, valamint a GLP-1 receptorok eloszlása megegyezik a DMH-ban található Fos aktivált sejtek eloszlásával. Emellett a PrRP-, és GLP-1-immunreaktív axonok és idegvégződések csaknem teljesen eltűntek a DMH ventralis szubdivíziójából a transzekció oldalán, utalva a PrRP és GLP-1 lehetséges szerepére az NTS-hypothalamus útvonalon. Az útvonal az NTS-től a DMH-ig teljes hosszában ipszilateralisnak tűnik, mivel mind a PrRP- és GLP-1-immunreaktív rostok eltűnése, mind az újraetetés-indukálta *c-fos* expresszió unilaterális volt, és a transzekció oldalán jelentkezett, míg a kontralateralis DMH ventralis szubdivíziójában nem volt számottevő hatás. Minthogy a PrRP neuronok az NTS mediális szubdivíziójának caudalis részén csaknem teljesen kolokalizálnak az A2 noradrenalin sejtekkel, az NTS PrRP neuronjai részét képezhetik a felszálló ventralis noradrenerg kötegnek, mely az A2 sejtcsoport egy részéből indul ki. A GLP-1 tartalmú neuronok tirozin hidroxilázt nem tartalmaznak, PrRP-vel nem kolokalizálnak, azaz a felszálló rendszer független tagjai.

Az eredményeink irodalmi adatokkal való összevetése arra enged következtetni, hogy az NTS-hypothalamus útvonal, illetve annak PrRP- és GLP-1-tartalmú alkotóelemei, a CCK megemelkedett szintje által közvetített, a gyomor telítettségéről szóló információt szállíthatják a hypothalamus felé, ami hozzájárul a DMH neuronok újraetetés hatására bekövetkező aktivációjához.

9. SUMMARY

We report that a high number of neurons express *c-fos* mRNA and protein in response to unlimited food intake in fasted rats in the ventral subdivision of the hypothalamic dorsomedial nucleus (DMHv) but in same conditions, limited food consumption failed to induce Fos expression in DMHv neurons suggesting that satiation should be one of the important signals that activate these neurons. The possible origin of fibers conducting satiation signals to the DMHv could be in the lower brainstem, especially prolactin-releasing peptide (PrRP)- and glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-containing neurons in the nucleus of the solitary tract (NTS) whose fiber terminals topographically overlap with activated Fos-positive neurons in the DMHv in refed rats. Using a combination of immunocytochemistry and *in situ* hybridization histochemistry, we demonstrated GLP-1 receptors in Fos-expressing neurons of the DMH. Unilateral transections of ascending solitary-hypothalamic fibers from the NTS inside the pons in refed rats (unlimited food consumption) resulted in a dramatic decrease in the density of PrRP and GLP-1 fibers ipsilateral to the transection. Contralateral to the transection, however, neither the GLP-1 nor the PrRP fiber density changed significantly. Meanwhile, the density of PrRP and GLP-1 immunoreactivity was markedly accumulated in transected nerve fibers caudal to the knife cuts, as a consequence of the interruption of the ascending transport route. In correlation with these changes, the number of Fos-expressing neurons elicited by refeeding declined in the ipsilateral but remained high in the contralateral DMH. In contrast, Fos response in the ventral DMH was not attenuated following chemical lesion (neonatal monosodium-glutamate treatment) of the hypothalamic arcuate nucleus, another possible source of DMH inputs. These findings suggest that the solitary-hypothalamic projections may represent the neuronal route through PrRP and GLP-1 neurons of the NTS activate DMHv neurons by conveying information on satiety possibly by transferring information on cholecystokinin-mediated satiation.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Ángeles-Castellanos M, Aguilar-Roblero R, Escobar C. (2004) c-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286: R158-165.
- Appleyard SM, Marks D, Kobayashi K, Okano H, Low MJ, Andresen MC. (2007) Visceral afferents directly activate catecholamine neurons in the solitary tract nucleus. *J Neurosci*, 27: 13292-13302.
- Arora S, Anubhuti. (2006) Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides*, 40: 375-401.
- Baraban SC, Tallent MK. (2004) Interneuron Diversity series: Interneuronal neuropeptides--endogenous regulators of neuronal excitability. *Trends Neurosci*, 27: 135-142.
- Barrera JG, Jones KR, Herman JP, D'Alessio DA, Woods SC, Seeley RJ. (2011a) Hyperphagia and increased fat accumulation in two models of chronic CNS glucagon-like peptide-1 loss of function. *J Neurosci*, 31: 3904-3913.
- Barrera JG, Sandoval DA, D'Alessio DA, Seeley RJ. (2011b) GLP-1 and energy balance: an integrated model of short-term and long-term control. *Nat Rev Endocrinol*, 7: 507-516.
- Bean AJ, Zhang X, Hokfelt T. (1994) Peptide secretion: what do we know? *FASEB J*, 8: 630-638.
- Bechtold DA, Luckman SM. (2006) Prolactin-releasing Peptide mediates cholecystokinin-induced satiety in mice. *Endocrinology*, 147: 4723-4729.
- Bellinger LL, Bernardis LL. (1984) Suppression of feeding by cholecystokinin but not bombesin is attenuated in dorsomedial hypothalamic nuclei lesioned rats. *Peptides*, 5: 547-552.
- Bellinger LL, Bernardis LL. (1999) Effect of dorsomedial hypothalamic nuclei knife cuts on ingestive behavior. *Am J Physiol*, 276: R1772-1779.
- Bellinger LL, Bernardis LL. (2002) The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiol Behav*, 76: 431-442.

- Berthoud HR. (2002) Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev*, 26: 393-428.
- Bi S, Ladenheim EE, Schwartz GJ, Moran TH. (2001) A role for NPY overexpression in the dorsomedial hypothalamus in hyperphagia and obesity of OLETF rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281: R254-260.
- Bjursell M, Lenneras M, Goransson M, Elmgren A, Bohlooly YM. (2007) GPR10 deficiency in mice results in altered energy expenditure and obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 363: 633-638.
- Blazquez E, Alvarez E, Navarro M, Roncero I, Rodriguez-Fonseca F, Chowen JA, Zueco JA. (1998) Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide as a novel neuropeptide. *Mol Neurobiol*, 18: 157-173.
- Cano V, Caicoya E, Ruiz-Gayo M. (2003) Effect of peripheral cholecystokinin receptor agonists on c-Fos expression in brain sites mediating food consumption in rats. *Neurosci Lett*, 343: 13-16.
- Cao WH, Fan W, Morrison SF. (2004) Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus. *Neuroscience*, 126: 229-240.
- Chaudhri OB, Field BC, Bloom SR. (2008) Gastrointestinal satiety signals. *Int J Obes (Lond)*, 32 Suppl 7: S28-31.
- Chen C, Dun SL, Dun NJ, Chang JK. (1999) Prolactin-releasing peptide-immunoreactivity in A1 and A2 noradrenergic neurons of the rat medulla. *Brain Res*, 822: 276-279.
- Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S. (2007) The hormonal control of food intake. *Cell*, 129: 251-262.
- Crawley JN, Corwin RL. (1994) Biological actions of cholecystokinin. *Peptides*, 15: 731-755.
- Crosby KM, Inoue W, Pittman QJ, Bains JS. (2011) Endocannabinoids gate state-dependent plasticity of synaptic inhibition in feeding circuits. *Neuron*, 71: 529-541.
- D'Alessio DA, Sandoval DA, Seeley RJ. (2005) New ways in which GLP-1 can regulate glucose homeostasis. *J Clin Invest*, 115: 3406-3408.

- Dossat AM, Lilly N, Kay K, Williams DL. (2011) Glucagon-like peptide 1 receptors in nucleus accumbens affect food intake. *J Neurosci*, 31: 14453-14457.
- Elias CF, Kelly JF, Lee CE, Ahima RS, Drucker DJ, Saper CB, Elmquist JK. (2000) Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. *J Comp Neurol*, 423: 261-281.
- Everitt BJ, Hökfelt T, Terenius L, Tatemoto K, Mutt V, Goldstein M. (1984) Differential co-existence of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity with catecholamines in the central nervous system of the rat. *Neuroscience*, 11: 443-462.
- Fredholm BB, Hokfelt T, Milligan G. (2007) G-protein-coupled receptors: an update. *Acta Physiol (Oxf)*, 190: 3-7.
- Fukusumi S, Fujii R, Hinuma S. (2006) Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP. *Peptides*, 27: 1073-1086.
- Fuller PM, Lu J, Saper CB. (2008) Differential rescue of light- and food-entrainable circadian rhythms. *Science*, 320: 1074-1077.
- Gallo RV. (1981) Effect of electrical stimulation of the dorsomedial hypothalamic nucleus on pulsatile LH release in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*, 32: 134-138.
- Goke R, Larsen PJ, Mikkelsen JD, Sheikh SP. (1995) Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites. *Eur J Neurosci*, 7: 2294-2300.
- Gomez E, Pritchard C, Herbert TP. (2002) cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺ influx through L-type voltage-gated calcium channels mediate Raf-independent activation of extracellular regulated kinase in response to glucagon-like peptide-1 in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*, 277: 48146-48151.
- Gooley JJ, Schomer A, Saper CB. (2006) The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat Neurosci*, 9: 398-407.
- Gu G, Roland B, Tomaselli K, Dolman CS, Lowe C, Heilig JS. (2013) Glucagon-like peptide-1 in the rat brain: distribution of expression and functional implication. *J Comp Neurol*, 521: 2235-2261.

- Gu W, Geddes BJ, Zhang C, Foley KP, Stricker-Krongrad A. (2004) The prolactin-releasing peptide receptor (GPR10) regulates body weight homeostasis in mice. *J Mol Neurosci*, 22: 93-103.
- Gunnet JW, Freeman ME. (1985) The interaction of the medial preoptic area and the dorsomedial-ventromedial nuclei of the hypothalamus in the regulation of the mating-induced release of prolactin. *Neuroendocrinology*, 40: 232-237.
- Hayes MR, Bradley L, Grill HJ. (2009) Endogenous hindbrain glucagon-like peptide-1 receptor activation contributes to the control of food intake by mediating gastric satiation signaling. *Endocrinology*, 150: 2654-2659.
- Hayes MR, Leichner TM, Zhao S, Lee GS, Chowansky A, Zimmer D, De Jonghe BC, Kanoski SE, Grill HJ, Bence KK. (2011) Intracellular signals mediating the food intake-suppressive effects of hindbrain glucagon-like peptide-1 receptor activation. *Cell Metab*, 13: 320-330.
- 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.
- Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya M, Fukusumi S, Kitada C, Masuo Y, Asano T, Matsumoto H, Sekiguchi M, Kurokawa T, Nishimura O, Onda H, Fujino M. (1998) A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature*, 393: 272-276.
- Hisadome K, Reimann F, Gribble FM, Trapp S. (2011) CCK stimulation of GLP-1 neurons involves alpha1-adrenoceptor-mediated increase in glutamatergic synaptic inputs. *Diabetes*, 60: 2701-2709.
- Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG. (1993) c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*, 14: 173-213.
- Hokfelt T, Broberger C, Xu ZQ, Sergeev V, Ubink R, Diez M. (2000) Neuropeptides--an overview. *Neuropharmacology*, 39: 1337-1356.
- Holst JJ. (2007) The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev*, 87: 1409-1439.

- Jin SL, Han VK, Simmons JG, Towle AC, Lauder JM, Lund PK. (1988) Distribution of glucagonlike peptide I (GLP-I), glucagon, and glicentin in the rat brain: an immunocytochemical study. *J Comp Neurol*, 271: 519-532.
- Johnstone LE, Fong TM, Leng G. (2006) Neuronal activation in the hypothalamus and brainstem during feeding in rats. *Cell Metab*, 4: 313-321.
- Kieffer TJ, Habener JF. (1999) The glucagon-like peptides. *Endocr Rev*, 20: 876-913.
- Kinzig KP, D'Alessio DA, Herman JP, Sakai RR, Vahl TP, Figueiredo HF, Murphy EK, Seeley RJ. (2003) CNS glucagon-like peptide-1 receptors mediate endocrine and anxiety responses to interoceptive and psychogenic stressors. *J Neurosci*, 23: 6163-6170.
- Kinzig KP, D'Alessio DA, Seeley RJ. (2002) The diverse roles of specific GLP-1 receptors in the control of food intake and the response to visceral illness. *J Neurosci*, 22: 10470-10476.
- Kobelt P, Paulitsch S, Goebel M, Stengel A, Schmidtman M, van der Voort IR, Tebbe JJ, Veh RW, Klapp BF, Wiedenmann B, Tache Y, Mönnikes H. (2006) Peripheral injection of CCK-8S induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats. *Brain Res*, 1117: 109-117.
- Kobelt P, Wissler AS, Stengel A, Goebel M, Inhoff T, Noetzel S, Veh RW, Bannert N, van der Voort I, Wiedenmann B, Klapp BF, Tache Y, Mönnikes H. (2008) Peripheral injection of ghrelin induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats. *Brain Res*, 1204: 77-86.
- Kreymann B, Williams G, Ghatgei MA, Bloom SR. (1987) Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet*, 2: 1300-1304.
- Larsen PJ, Tang-Christensen M, Holst JJ, Orskov C. (1997) Distribution of glucagon-like peptide-1 and other proglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience*, 77: 257-270.
- Larsen PJ, Vrang N, Tang-Christensen M, Jensen PB, Hay-Schmidt A, Romer J, Bjerre-Knudsen L, Kristensen P. (2002) Ups and downs for neuropeptides in body weight homeostasis: pharmacological potential of cocaine amphetamine regulated transcript and pre-proglucagon-derived peptides. *Eur J Pharmacol*, 440: 159-172.

- Lawrence CB, Celsi F, Brennan J, Luckman SM. (2000) Alternative role for prolactin-releasing peptide in the regulation of food intake. *Nat Neurosci*, 3: 645-646.
- Lawrence CB, Ellacott KL, Luckman SM. (2002) PRL-releasing peptide reduces food intake and may mediate satiety signaling. *Endocrinology*, 143: 360-367.
- Llewellyn-Smith IJ, Reimann F, Gribble FM, Trapp S. (2011) Preproglucagon neurons project widely to autonomic control areas in the mouse brain. *Neuroscience*, 180: 111-121.
- Loewy AD. (1991) Forebrain nuclei involved in autonomic control. *Prog Brain Res*, 87: 253-268.
- Luckman SM. (1992) Fos-like immunoreactivity in the brainstem of the rat following peripheral administration of cholecystokinin. *J Neuroendocrinol*, 4: 149-152.
- Luckman SM, Lawrence CB. (2003) Anorectic brainstem peptides: more pieces to the puzzle. *Trends Endocrinol Metab*, 14: 60-65.
- Lutz TA. (2005) Pancreatic amylin as a centrally acting satiating hormone. *Curr Drug Targets*, 6: 181-189.
- Marshall JF, Richardson JS, Teitelbaum P. (1974) Nigrostriatal bundle damage and the lateral hypothalamic syndrome. *J Comp Physiol Psychol*, 87: 808-830.
- Maruyama M, Matsumoto H, Fujiwara K, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Fujino M, Inoue K. (1999) Immunocytochemical localization of prolactin-releasing peptide in the rat brain. *Endocrinology*, 140: 2326-2333.
- McIlmoyl M. (1965) Two neurological staining techniques utilizing the dye luxol fast blue. *Can J Med Technol.*, 27: 118-123.
- Meeran K, O'Shea D, Edwards CM, Turton MD, Heath MM, Gunn I, Abusnana S, Rossi M, Small CJ, Goldstone AP, Taylor GM, Sunter D, Steere J, Choi SJ, Ghatei MA, Bloom SR. (1999) Repeated intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide or exendin-(9-39) alters body weight in the rat. *Endocrinology*, 140: 244-250.
- Meister B. Monosodium glutamate (MSG) lesions. In: *Methods in Neurosciences*, Conn PM, Ed, Vol. Transplantation, Lesions, and Surgical Techniques, Academic Press, Orlando, 1991: pp. 70-89.
- Meister B, Ceccatelli S, Hökfelt T, Anden NE, Anden M, Theodorsson E. (1989) Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal

- hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions. *Exp Brain Res*, 76: 343-368.
- Merchenthaler I, Lane M, Shughrue P. (1999) Distribution of pre-pro-glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 403: 261-280.
- Mieda M, Williams SC, Richardson JA, Tanaka K, Yanagisawa M. (2006) The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 12150-12155.
- Monnikes H, Lauer G, Bauer C, Tebbe J, Zittel TT, Arnold R. (1997) Pathways of Fos expression in locus ceruleus, dorsal vagal complex, and PVN in response to intestinal lipid. *Am J Physiol*, 273: R2059-2071.
- Morales T, Hinuma S, Sawchenko PE. (2000) Prolactin-releasing peptide is expressed in afferents to the endocrine hypothalamus, but not in neurosecretory neurones. *J Neuroendocrinol*, 12: 131-140.
- Morgan JI, 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.
- Onaka T, Takayanagi Y, Leng G. (2010) Metabolic and stress-related roles of prolactin-releasing peptide. *Trends Endocrinol Metab*, 21: 287-293.
- Palkovits M. (1999) Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. *Front Neuroendocrinol*, 20: 270-295.
- Palkovits M. (2003) Hypothalamic regulation of food intake. *Clin Neurosci/Ideggyógy Sz*, 56: 288-302.
- Palkovits M, Tapia-Arancibia L, Kordon C, Epelbaum J. (1982) Somatostatin connections between the hypothalamus and the limbic system of the rat brain. *Brain Res*, 250: 223-228.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 5th Ed. Academic Press, San Diego, 2005.
- Pierret P, Christolomme A, Bosler O, Perrin J, Orsini JC. (1994) Catecholaminergic projections from the solitary tract nucleus to the perifornical hypothalamus. *Brain Res Bull*, 35: 153-159.

- Poulin AM, Timofeeva E. (2008) The dynamics of neuronal activation during food anticipation and feeding in the brain of food-entrained rats. *Brain Res*, 1227: 128-141.
- Rinaman L. (1999) A functional role for central glucagon-like peptide-1 receptors in lithium chloride-induced anorexia. *Am J Physiol*, 277: R1537-1540.
- Rinaman L. (2010) Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. *Brain Res*, 1350: 18-34.
- Rinaman L, Baker EA, Hoffman GE, Stricker EM, Verbalis JG. (1998) Medullary c-Fos activation in rats after ingestion of a satiating meal. *Am J Physiol*, 275: R262-268.
- Rinaman L, Verbalis JG, Stricker EM, Hoffman GE. (1993) Distribution and neurochemical phenotypes of caudal medullary neurons activated to express cFos following peripheral administration of cholecystokinin. *J Comp Neurol*, 338: 475-490.
- Roland BL, Sutton SW, Wilson SJ, Luo L, Pyati J, Huvar R, Erlander MG, Lovenberg TW. (1999) Anatomical distribution of prolactin-releasing peptide and its receptor suggests additional functions in the central nervous system and periphery. *Endocrinology*, 140: 5736-5745.
- Rothwell NJ. (1994) CNS regulation of thermogenesis. *Crit Rev Neurobiol*, 8: 1-10.
- Sahu A, Kalra SP, Crowley WR, Kalra PS. (1988) Evidence that NPY-containing neurons in the brainstem project into selected hypothalamic nuclei: implication in feeding behavior. *Brain Res*, 457: 376-378.
- Samson WK, Resch ZT, Murphy TC. (2000) A novel action of the newly described prolactin-releasing peptides: cardiovascular regulation. *Brain Res*, 858: 19-25.
- Sandoval DA, Bagnol D, Woods SC, D'Alessio DA, Seeley RJ. (2008) Arcuate glucagon-like peptide 1 receptors regulate glucose homeostasis but not food intake. *Diabetes*, 57: 2046-2054.
- Saper CB, Chou TC, Elmquist JK. (2002) The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron*, 36: 199-211.
- Schick RR, Zimmermann JP, vom Walde T, Schusdziarra V. (2003) Peptides that regulate food intake: glucagon-like peptide 1-(7-36) amide acts at lateral and

- medial hypothalamic sites to suppress feeding in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284: R1427-1435.
- Schwartz GJ. (2000) The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition*, 16: 866-873.
- Seal LJ, Small CJ, Dhillon WS, Stanley SA, Abbott CR, Ghatei MA, Bloom SR. (2001) PRL-releasing peptide inhibits food intake in male rats via the dorsomedial hypothalamic nucleus and not the paraventricular hypothalamic nucleus. *Endocrinology*, 142: 4236-4243.
- Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. (1996) Glucagon-like peptide-1 receptor (GLP1-R) mRNA in the rat hypothalamus. *Endocrinology*, 137: 5159-5162.
- Stotz-Potter EH, Willis LR, DiMicco JA. (1996) Muscimol acts in dorsomedial but not paraventricular hypothalamic nucleus to suppress cardiovascular effects of stress. *J Neurosci*, 16: 1173-1179.
- Sun B, Fujiwara K, Adachi S, Inoue K. (2005) Physiological roles of prolactin-releasing peptide. *Regul Pept*, 126: 27-33.
- Takayanagi Y, Matsumoto H, Nakata M, Mera T, Fukusumi S, Hinuma S, Ueta Y, Yada T, Leng G, Onaka T. (2008) Endogenous prolactin-releasing peptide regulates food intake in rodents. *J Clin Invest*, 118: 4014-4024.
- Tang-Christensen M, Larsen PJ, Goke R, Fink-Jensen A, Jessop DS, Moller M, Sheikh SP. (1996) Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *Am J Physiol*, 271: R848-856.
- Tang-Christensen M, Larsen PJ, Thulesen J, Romer J, Vrang N. (2000) The proglucagon-derived peptide, glucagon-like peptide-2, is a neurotransmitter involved in the regulation of food intake. *Nat Med*, 6: 802-807.
- 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.
- Thompson RH, Swanson LW. (1998) Organization of inputs to the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a reexamination with Fluorogold and PHAL in the rat. *Brain Res Brain Res Rev*, 27: 89-118.

- Thorens B. (1992) Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 8641-8645.
- Timofeeva E, Baraboi ED, Richard D. (2005) Contribution of the vagus nerve and lamina terminalis to brain activation induced by refeeding. *Eur J Neurosci*, 22: 1489-1501.
- Tóth ZE, Zelena D, Mergl Z, Kirilly E, Várnai P, Mezey E, Makara GB, Palkovits M. (2008) Chronic repeated restraint stress increases prolactin-releasing peptide/tyrosine-hydroxylase ratio with gender-related differences in the rat brain. *J Neurochem*, 104: 653-666.
- Trapp S, Hisadome K. (2011) Glucagon-like peptide 1 and the brain: Central actions-central sources? *Auton Neurosci*, 161: 14-19.
- Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JP, Smith DM, Ghatgei MA, Herbert J, Bloom SR. (1996) A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, 379: 69-72.
- Ungerstedt U. (1970) Is interruption of the nigro-striatal dopamine system producing the "lateral hypothalamus syndrome"? *Acta Physiol Scand*, 80: 35A-36A.
- Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. (2008) Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 18: 158-168.
- van den Pol AN. (2012) Neuropeptide transmission in brain circuits. *Neuron*, 76: 98-115.
- Vrang N, Hansen M, Larsen PJ, Tang-Christensen M. (2007) Characterization of brainstem preproglucagon projections to the paraventricular and dorsomedial hypothalamic nuclei. *Brain Res*, 1149: 118-126.
- Vrang N, Phifer CB, Corkern MM, Berthoud HR. (2003) Gastric distension induces c-Fos in medullary GLP-1/2-containing neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285: R470-478.
- Williams DL, Baskin DG, Schwartz MW. (2009) Evidence that intestinal glucagon-like peptide-1 plays a physiological role in satiety. *Endocrinology*, 150: 1680-1687.

- Willing AE, Berthoud HR. (1997) Gastric distension-induced c-fos expression in catecholaminergic neurons of rat dorsal vagal complex. *Am J Physiol*, 272: R59-67.
- Woods SC. (2005) Signals that influence food intake and body weight. *Physiol Behav*, 86: 709-716.
- Woods SC, D'Alessio DA. (2008) Central control of body weight and appetite. *J Clin Endocrinol Metab*, 93: S37-50.
- Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. (2005) Appetite control. *J Endocrinol*, 184: 291-318.
- Zhu JN, Guo CL, Li HZ, Wang JJ. (2007) Dorsomedial hypothalamic nucleus neurons integrate important peripheral feeding-related signals in rats. *J Neurosci Res*, 85: 3193-3204.

11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

11.1. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

1. **Renner É.**, Puskás N., Dobolyi A., Palkovits M. (2012) Glucagon-like peptide-1 of brainstem origin activates dorsomedial hypothalamic neurons in satiated rats. *Peptides* 35, 14-22.
Impakt faktor: **2,522**
2. **Renner É.**, Szabó-Meltzer K.I., Puskás N., Tóth Z.E., 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.
Impakt faktor: **3,658**

11.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó tudományos cikkek

1. Varga T., Mogyoródi B., Bagó A.G., Cservenák M., Domokos D., **Renner É.**, Gallatz K., Usdin T.B., Palkovits M., Dobolyi A. (2012) Paralemniscal TIP39 is induced in rat dams and may participate in maternal functions. *Brain Struct. Funct.* 217, 323–335.
Impakt faktor: 7,837
2. Pál G., Vincze C., **Renner É.**, Wappler E.A., Nagy Z., Lovas G., Dobolyi A. (2012) Time course, distribution and cell types of induction of transforming growth factor betas following middle cerebral artery occlusion in the rat brain. *PLoS One*, 7(10):e46731.
Impakt faktor: 3,730

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, Palkovits Miklós Professzor Úrnak azt az egyedülálló szemléletmódot, amit átadott nekem, és amivel bevezetett a neuromorfológiai alap kutatás világába. Köszönöm a tudományos munkám elkészítéséhez nyújtott legmagasabb szintű szakmai segítségét, és emberi példamutatását.

Szintén köszönettel tartozom a Neuromorfológiai Laboratórium minden dolgozójának, akiknek segítségével ez a munka nem készülhetett volna el. Köszönöm Helfferich Frigyesnének, Juditnak, hogy megtanított az immunhisztokémia iránti alázatra és az igényes munka alapjaira. Köszönöm a Neuromorfológiai Laboratórium munkatársainak, Dr. Gallatz Katalinnak, Dr. Dobolyi Árpádnak, Dr. Tóth Zsuzsannának, Toronyay-Kasztner Magdolnának, Kiss Melittának, Cservenák Melindának, Szabó Éva Rebekának, Papp Rege Sugárkának, Könczöl Katalinnak, Szabó-Meltzer Kinga Ibolyának, Balázs Tamásnak, Deák Szilviának, Hanák Nikolettnek, Kerti Juditnak, Dellaszéga-Lábas Viktóriának és Kézdi Dórának azt a segítőkészséget, a mindig jó hangulatot, mely a Palkovits Laboratórium tagjait minden nap jellemezte.

Dr. Tóth Zsuzsannának köszönöm, hogy házi védésem opponenseként hasznos kritikai megjegyzéseivel segített az értekezés javításában.

Köszönöm Csillag András Professzor Úrnak, hogy támogatta a Semmelweis Egyetem Anatómiai Intézetében végzett tudományos munkámat.

Köszönöm szüleimnek, édesapámnak, Renner Jánosnak és édesanyámnak, Renner Jánosné sz. Halász Évának, hogy elindítottak a tudományos pályán és mindvégig maximálisan támogattak. Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak, férjemnek, Árpádnak és gyermekeinknek, Daninak és Zsófinak azt a sok segítséget, türelmet és figyelmességet, amivel hozzájárultak munkám elkészítéséhez.