

A hypothalamus dorsomedialis magjának szerepe a táplálékfelvétel központi szabályozásában

Doktori tézisek

Dobolyiné Renner Éva

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



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

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

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. 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

1. BEVEZETÉS

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. 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. Ezzel ellentétben, a jóllakottsági szignálok elsősorban az alsó agytörzsben elhelyezkedő neuronokon keresztül fejtik ki hatásukat. Szemben a tónusosan aktív testsúlyt meghatározó szignálokkal, melyek folyamatosan szolgáltatják az információt, a jóllakottsági szignálok az aktuálisan elfogyasztott táplálék mennyiségével függnek 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) nevű mag, egy visceroszenzoros sejtcsoport a nyúltvelő dorsomedialis részén. A gyomor-bél traktusból származó perifériás idegek, valamint a gyomor-bél traktusból felszabaduló hormonális szignálok többek között a gyomor telítettségéről hoznak információt.

A NTS és a hypothalamus természetesen egymással is kommunikál felszálló és leszálló pályákon keresztül a táplálékfelvétel finomszabályozása érdekében. Azok a hypothalamikus neuronok, amelyekre testsúlyt meghatározó szignálok hatnak, befolyásolják a jóllakottsági szignálok küszöbértékét az agytörzsben. Ezzel ellentétben, az agytörzsi táplálékfelvétellel kapcsolatos átkapcsolómagvak befolyása a hypothalamikus rendszerekre kevésbé ismert. Az NTS a solitarii-hypothalamikus pályán, illetve a laterális parabrachiális magban (PBN) részben átkapcsolódva küld információt a hypothalamus felé. Az NTS-ből a hypothalamusba felszálló projekció lehet az anatómiai kapcsolat a nyúltvelői visceroszenzoros központ és a hypothalamikus energia-homeosztázist szabályozó körök között. A rendszer kimenete egyfelől viselkedésbeli változás, az evés abbahagyása, de emellett a vegetatív idegrendszerre ható kimenetek is fontosak. Az NTS-ban találhatóak jellegzetes

eloszlású neuropeptid tartalmú neuronok. Ezek közül a prolactin-releasing peptid (PrRP) és glukagon-szerű peptid-1 (GLP-1) centrális alkalmazása gátolja a táplálékfelvételt patkányban. Ezen neuropeptideket tartalmazó NTS neuronok fontos alkotóelemei lehetnek a hypothalamusba felszálló pályáknak.

A hypothalamus dorsomedialis magja (DMH) citoarchitektonikai alapon a dorsalis, ventrális, és a kettő között elhelyeződő kompakt szubdivízióra osztható. 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, melyek felé projekciókkal is rendelkeznek. A DMH léziója befolyásolta a táplálkozási viselkedést, és bizonyították a DMH testtömeg homeosztázis fenntartásában játszott szerepét is. 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. Elektrofiziológiai adatok alapján feltételezhető, hogy az ebben a magban található idegsejtek hormonális bemeneteket és felszálló agytörzsi információkat összegeznek, és a táplálékfelvétel, valamint az energiaegyensúlyt fenntartásában is szerepet játszanak. Emellett az utóbbi időben a DMH a cirkadián ritmusok szabályozásával kapcsolatban is előtérbe került, elsősorban a táplálkozás vezette napi ritmusok kivitelezésében lehet fontos.

2. CÉLKITŰZÉSEK

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 levő 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

3. MÓDSZEREK

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.

3.1. Az I-es kísérleti modell és II-es kísérleti modell

Az I-es kísérleti modellben (éheztetési-újraetetés) részt vevő állatokat 3 fő csoportra bontottuk. 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 újraetettet patkányokat először 48 órán át éheztetjük 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 folyadék felvételi fázisok szakították meg. Körülbelül 80-85 perccel az állatok folyamatos táplálékfelvételének befejezése után öltük le az állatokat.

A II-es kísérleti modellben a patkányokat 3 csoportra osztottuk: 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 ketrectető egymásra helyezésével történt. Ezzel a módszerrel történő összeállításnál az állatok képtelenek a felső fémtetőbe 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 újraetettet” 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 újraetettet 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 (telítettnek) tekintettük őket. Ez a csoport 14 intakt, és 6 pályaátmetszett állatot tartalmazott.

3.2. Idegpályák átvágása

Hosszú alakú lyukat fűrtünk az agyba (1x3 mm) a koponya egyik oldalán. A féloldali átvágásokat 2,0 mm és 2,5 mm-közötti szélességű üveggéssel végeztük el. A kemény agyhártya átvágása után az üveggést vertikális irányba átvezettük a célterületen, mélyen az agytörzs bazális felszínéig a híd és a nyúltvelő átmenetnél.

3.3. Az agyak szövettani feldolgoása

Az immunhisztokémiai eljáráshoz a patkányokat túllattuk (a részletesen leírva az anyagok és módszerek részben) és perfundáltuk a szíven keresztül 150 ml fiziológiás sóoldattal való atmoszféra követően 300 ml jéghideg 4 %-os paraformaldehidet tartalmazó 0,1 mólos foszfát-puffer oldattal. In situ hibridizációs hisztokémia céljára a patkányokat elaltattuk, majd dekapitáltuk. Az agyukat azonnal kivettük, szárazjégen fagyasztottuk, és -80°C-on tároltuk. Az agyaktól 12 µm vastag metszeteket készítettünk, melyeket megszáritottuk, és a felhasználásig -80°C-on tároltuk. Az agyakat a következő hisztológiai eljárásokkal dolgoztuk fel:

3.3.1. Krezil-ibolya festés

3.3.2. Luxol Fast Blue krezil-ibolya festés

3.3.3. Fos immunhisztokémia

3.3.4. Fluoreszcens Nissl festés Fos immunfestéssel kombinálva

3.3.5. PrRP és GLP-1 immunhisztokémia

3.3.6. PrRP/GLP-1 és Fos dupla immunhisztokémia

3.3.7. PrRP és TH dupla immunhisztokémia

3.3.8. In situ hibridizációs hisztokémiai eljárás

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

3.4. *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.

4. EREDMÉNYEK

5.1. A jóllakottság hatása a dorsomediális mag sejtjeinek aktivitására

5.1.1. Testtömegváltozás és táplálékfelvétel az éheztetéses-újraetetéses kísérletek során

Kísérleteink végrehajtása során mértük a testtömeg változását 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 (közéérték \pm a közéérték 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 (az állatoknak a táplálékhoz való szabad hozzáférése esetén) csökkenés a mérések alapján elvárt $11,6$ g testtömeg növekedés helyett. 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 a $7,8 \pm 0,8$ 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 állatoknak a szabad táplálékhoz való hozzáférésű kontroll csoport esetén (nincs bemutatva), és ehhez hasonló az eredmény az éheztetett csoportnál. Az újraetétést követően a Fos-expressziót mutató sejtek száma megnőtt a DMH teljes kiterjedését vizsgálva; mindazonáltal egy jól körülhatárolt területen a magon belül különösen nagy sűrűsége figyelhető meg az aktiválódó sejteknek a mag teljes kiterjedésén át rostrocaudalis irányban 48 órás éheztetést követően, 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, illetőleg a Fos-pozitív sejtek számának átlagos mennyisége nagyon szignifikánsan emelkedett ($p \leq 0,001$) az újraetetés után $96,7 \pm 7,7$ -re.

5.1.3. Fos-ir sejtek lokalizációjának topográfiai azonosítása

Az újraetetés hatására megjelenő sejtcsoport lokalizációja megfelel a DMH ventrális szubdivíziójának Nissl festett metszetek alapján. Az aktiválódott sejtek pozíciójának további megerősítése érdekében Fos immunreaktivitást és fluoreszcens Nissl festést tartalmazó dupla festett metszeteket készítettünk, amelyek megerősítették az aktiválódott sejteknek DMH ventrális szubdivíziójában való elhelyezkedését.

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. 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.

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 érhették el és nem fogyaszthatták el azt, a Fos-immunreaktív (Fos-ir) idegsejtek száma mérsékelt arányú növekedést mutatott a DMH mindhárom részében, de a ventrális szubdivíziójában a magnak nem volt látható specifikusan erősebb festődés. 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. 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 újraetett 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 rostrocaudalis kiterjedésében. 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 ($p \leq 0,001$) a Fos-immunreaktív neuronok számában újraetetés hatására.

5.2. DMv-beli idegrostok és agytörzsi eredetük

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

PrRP immunreaktivitást figyeltünk meg a hypothalamus különböző részein. PrRP-vel jelölődő sejtek a DMH-ban kizárólag annak a legcaudalisabban 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. A metszetek Luxol Fast Blue-krezil-ibolyával festett metszetekkel való összevetése jelzi, hogy a PrRP-tartalmú rostok eloszlása a DMH ventrális

szubdivíziójában teljes átfedésben van azzal a területtel, amely Fos-immunreaktív neuronokat tartalmaz.

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. 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 a 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. 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 fordult, belépett a DMH-ba és a mag ventralis szubdivíziójában végződött. A medialis előagyi kötegben található többi PrRP rost tovább vetül, többek között a hypothalamus paraventricularis magjába.

PrRP és TH dupla immunfestésével megmutattuk, hogy az NTS caudalis részén található PrRP sejteknek, és a DMH-ban található PrRP-ir rostoknak 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.

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

GLP-1-immunfestett rostokat és végződéseket 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. 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 a Fos-immunreaktív neuronokat ezen a magon belül.

5.2.3. 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. A részleges átfedés ellenére duplán festett sejtet nem figyeltünk meg, azaz a két neuropeptid nem koexpresszálódik. A GLP-1 és a PrRP-tartalmú rostok szintén azonos területen helyezkednek el a DMH ventrális szubdivíziójában. Ennek ellenére, a rostokban sem találtunk kolokalizációt a két neuropeptid között.

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, éppúgy, mint a hypothalamus caudalis részén elvégzett pályaátmetszések, PrRP immunreaktivitás felhalmozódását eredményeztek közvetlenül a metszés helye mögött. Mind a híd területén, mind a caudalis hypothalamus területén történt átmetszések a PrRP tartalmú rostok sűrűségének markáns csökkenését eredményezték a ventralis szubdivíziójában a DMH-nak, éppúgy, mint a PrRP-tartalmú rostok más célterületein a hypothalamusban, ipszilateralisan, azaz az átmetszéssel megegyező oldalon. Ezzel szemben kontralateralisan, a pályaátmetszéshez viszonyított ellenkező oldalon, a PrRP-ir rostok sűrűségében nem tapasztaltunk változást olyan újraetett állatokkal összehasonlítva, amelyek pályaátmetszésen nem estek át.

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, a GLP-1 tartalmú rostok és idegvégződések sűrűsége rostralisán a vágás helyétől nagyon feltűnően lecsökken, és a DMH ventrális szubdivíziójában csaknem teljesen el is tűnik a vágás helyével megegyező oldalon. Párhuzamosan a GLP-1-ir rostok eltűnésével, egy drámai

csökkenés tűnik fel az újraetetésre megjelenő Fos-expresszálo neuronok sűrűségében a DMH ventralis szubdivíziójában: a Fos –immunreaktív idegsejtek száma $26,7 \pm 3,4$ (közéérték \pm a közéérték szórása) értékre csökkent ipsilateralisan az átmetszéstől összehasonlítva a $75,9 \pm 3,8$ (közéérték \pm a közéérték szórása) átlagos értékkel, amit az intakt (átmetszésen nem átesett, újraetettet) patkányok esetén találtunk ($p \leq 0,05$). Ezzel ellentétben nem találtunk látható eltérést a GLP-1 immunreaktív rostok sűrűségében a DMH ventralis szubdivíziójában a transzekciótól kontralateralisan, azaz az átmetszéssel ellentétes oldalon. A Fos-pozitív sejtek száma szignifikánsan magasabb volt kontralateralisan az átmetszés helyéhez képest, mint ipsilateralisan ($57,4 \pm 5,1$ versus $26,7 \pm 3,4$; $p \leq 0,05$), bár a kontralateralis érték egy kissé lecsökkent összehasonlítva az intakt, nem műtött, újraetettet patkányokhoz képest.

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. Az újraetetésre válaszként megjelenő Fos-immunreaktív neuronok száma a pályaátvágás helyétől ipsilateralisan szignifikánsan csökkent ($P \leq 0,001$) $96,7 \pm 7,7$ -ről (pályaátvágásán nem átesett állatok) $25,1 \pm 3,1$ -re. Ez az érték jelentősen alacsonyabb ($P \leq 0,01$) annál a $79,2 \pm 4,7$ -es értéknél is, amit a pályaátvágott állatokban a pályaátvágás kontralateralis oldalán kaptunk, ami egy kis mértékben csökkent érték összehasonlítva a kontrollként tekintendő, pályaátvágásán át nem esett állatok adataihoz képest.

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-expresszálo neuronok a DMH ventralis szubdivíziójában, de az arcuatus és a paraventriculáris magokban is, valamint a posterior hypothalamikus area területén.

Abból a célból, hogy demonstráljuk a Fos-aktivitás jelenlétét a dorsomedialis magban GLP-1 receptort (GLP1R) expresszálo 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 jóllakottságig történő újraetetés hatására. *Vice versa*, $76,8 \pm 1,3\%$ -a a Fos aktivált sejteknek jelölt volt GLP-1R mRNS-sel.

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 végig a magnak a rostrocaudalis kiterjedése mentén, mint ahogy azt bemutatjuk Nissl festett metszeteken. A hypothalamusban található többi mag esetén, beleértve az arcuatus maggal szomszédos ventromedialis magot is, nem látható citoarchitekturális változás. Az MSG kezelt, éheztetett állatok újraetetése Fos-immunreaktivitás megjelenését eredményezte a DMH ventralis szubdivíziójában, és ezeknek az aktiválódott neuronoknak a denzitása a kezeletlen, újraetett állatokban tapasztalható aktiválódott neuronok denzitásához hasonló. Az újraetetés-indukálta Fos-immunreaktív neuronok számát nem befolyásolta az MSG kezelés. Az újraetetésre aktiválódó, MSG kezelt állatokban a Fos-immunreaktív neuronok száma $90,3 \pm 6,8$ (középérték \pm a középérték szórása), míg a kontroll állatokban $96,7 \pm 7,7$ (középérték \pm a középérték szórása) volt.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

- Fos expressziót mutató neuronok 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 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 jelentős csökkenés, ami jelentős ipsilaterális PrRP és a GLP-1-tartalmú 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 egyezett meg, sőt kolokalizációt is kimutattunk, ami arra utal, hogy ezen receptorok szerepet játszhatnak az GLP-1 DMH neuronokra kifejtett hatásában.

6. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

6.1. *Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények*

1. **Renner E.**, 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 E.**, 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**

6.2. *Az értekezés témájában készített idézhető absztraktok*

1. **Renner E.**, Dóró M., Dobolyi A., Palkovits M. (2013) Activation of neurons in the hypothalamic dorsomedial nucleus in a rat food entrainment model. Conference Abstract: 14th Conference of the Hungarian Neuroscience Society (MITT), P4.24.
2. **Renner E.**, Puskas N., Dobolyi A., Palkovits M. (2012) Dorsomedial hypothalamic neurons are activated by glucagon- like peptide-1 of brainstem origin in satiated rats. International IBRO Workshop, Szeged 2012. *Clin. Neurosci./Ideggyogy. Sz.* 65(S1):55.
3. **Renner E.**, Puskás N., Dobolyi A., Palkovits M. (2012) Agytörzsi eredetű glucagon-like peptide-1 stimulálja a dorsomedialis hypothalamus jóllakottság során aktiválódó sejtjeit patkányban. A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Anatómusok Társasága, a Magyar Biofizikai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Kongresszusa, Debrecen, Abstract No. 122.
4. Könczöl K., Papp R.S., **Renner E.**, Balázs T.L., Gallatz K., Tóth Z.E., Palkovits M. (2011) Effect of food entrainment on activation and mRNA expression of

medullary A1 and A2 cell groups. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy

5. **Renner E.**, Puskas N., Dobolyi A., Palkovits M. (2011) Glucagon-like peptide-1 of brainstem origin activates dorsomedial hypothalamic neurons in satiated rats. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy, A214.
6. **Renner E.**, Puskás N., Dobolyi A., Palkovits M. (2011) GLP-1 fibers of brainstem origin activate dorsomedial hypothalamic neurons in refed rats. Front. Neurosci. Conference Abstract: 13th Conference of the Hungarian Neuroscience Society (MITT), P2.14. doi: 10.3389/conf.fnins.2011.84.00023. <http://mitt2011.elte.hu/Posters/P7/P7.11.pdf>
7. **Renner E.**, Szabó-Meltzer K.I., Puskás N., Tóth Z.E., Dobolyi A., Palkovits M. (2010) Brainstem PrRP- and GLP-1-containing projections to the refeeding activated neurons of the hypothalamic dorsomedial nucleus of fasted rats. International IBRO Workshop, Pécs. Frontiers in Systems Neuroscience. Conference Abstract: IBRO International Workshop 2010. doi: 10.3389/conf.fnins.2010.10.00120.
8. **Renner E.**, Szabó-Meltzer K.I., Puskás N., Tóth Z.E., Dobolyi A., Palkovits M. (2010) Brainstem PrRP- and GLP-1-containing projections mediate satiety-induced activation of neurons in the hypothalamic dorsomedial nucleus of rats. The 7th International Congress of Neuroendocrinology, Rouen, France. No. P2-151, p268.
9. **Renner E.**, Szabó-Meltzer K.I., Puskás N., Tóth Z.E., Dobolyi A., Palkovits M. (2009) Activation of neurons in the hypothalamic dorsomedial nucleus via solitary-hypothalamic ascending projections following refeeding of fasted rats. Neuropeptide Festival, Meeting of the European Neuropeptide Club and the Summer Neuropeptide Conference, Salzburg, Austria.
10. **Renner E.**, Szabó-Meltzer K.I., Puskás N., Dobolyi A., Tóth Z.E., Palkovits M. (2009) Prolactin-releasing peptide-containing neurons in the nucleus of the solitary tract activate neurons in the hypothalamic dorsomedial nucleus in response to refeeding of fasted rats. 12th Conf. Hung. Neurosci. Soc. (MITT), Budapest.

Frontiers in Systems Neuroscience. Conference Abstract: 12th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society. doi: 10.3389/conf.neuro.01.2009.04.117.

11. **Renner E.**, Puskás N., Tóth Z.E., Dobolyi A., Palkovits M. (2009) Éhezést követő újraetetés hatására aktiválódnak a dorsomediális hypothalamus idegsejtjei, és az aktivációs szignált a nucleus tractus solitarii-ből eredő felszálló rostok közvetítik. A Magyar Anatómus Társaság 15. Kongresszusa, Budapest.
12. **Renner E.**, Puskás N., Tóth Zs. E., M. Palkovits. M. (2008) Activation of neurons in the dorsomedial hypothalamic nucleus in response to refeeding of fasted rats. MÉT, Debrecen. *Acta Physiologica Hungarica* 96, 118. 2009
13. **Renner E.**, Puskás N., Tóth Z.E., Palkovits M. (2008) The role of neuropeptide-containing fibers in the c-fos activation of neurons in the dorsomedial hypothalamic nucleus in response to refeeding of fasted rats. International IBRO Workshop, Debrecen, *Clinical Neuroscience* 61, 50. 2008

6.3. *Egyéb tudományos cikkek*

1. Varga T., Mogyoródi B., Bagó A.G., Cservenák M., Domokos D., **Renner E.**, 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 E.**, 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

6.4. *Egyéb absztraktok*

1. Pál G., Vincze C., **Renner E.**, Wappler E.A., Nagy Z., Lovas G., Dobolyi A. (2013) Time course, distribution and cell types of induction of transforming growth factor betas following middle cerebral artery occlusion in the rat brain. Conference Abstract: 14th Conference of the Hungarian Neuroscience Society (MITT), P2.26.
2. Papp R.S., Balázs T., Könczöl K., Lourmet G., **Renner E.**, Vas S., Palkovits M (2012) Orexin-expressing neurons in the dorsolateral hypothalamus show functional heterogeneity in rats. International IBRO Workshop, Szeged 2012, P2-32.
3. Pál G., Vincze C., Lovas G., **Renner E.**, Dobolyi A. (2012) Transzformáló növekedési faktor-béta fehérjét expresszáló sejtek típusának azonosítása fokális ischémiát követően patkányagyban. A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Anatómusok Társasága, a Magyar Biofizikai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Kongresszusa, Debrecen, Abstract No. 118.
4. Pal G., Vincze C., **Renner E.**, Wappler A.E., Nagy Z., Lovas G., Dobolyi A. (2012) Time course, distribution and cell types of induction of transforming growth factor betas in a rat model of ischemic stroke. XXI International Semmelweis Symposium, Budapest, 2012. Orvostudományok 87(2):315.
5. Pal G., Vincze C., **Renner E.**, Lovas G., Dobolyi A. (2012) Differential expression pattern of TGFb 1 and 2 in neural and glial cells following MCAO in rat brain. International IBRO Workshop, Szeged 2012. Clin. Neurosci./Ideggyogy. Sz. 65(S1):52.
6. Papp R.S., Ádori C., Balázs T., Könczöl K., Lourmet G., **Renner E.**, Palkovits M. (2011) Functional heterogeneity of orexin-expressing neurons in the hypothalamus of rats. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy
7. Papp R.S., Kirschenbaum D., Kurucz P., **Renner E.**, Palkovits M. (2008) Orexin and MCH regulate the visceromotor functions of the antrum and the proximal duodenum. International IBRO Workshop, Debrecen, Clinical Neuroscience 61, 50. 2008.
8. Meltzer K., **Renner E.**, Puskás L., Puskás N., Palkovits M. (2006) C-fos expression in brain nuclei of monosodium glutamate-treated rats and gold thioglucose-treated

mice during fasting and after refeeding. International IBRO Workshop, Budapest. Clinical Neuroscience 59. Suppl. 1. 46.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, Palkovits Miklós Professzor Úrnak azt az egyedülálló szemléletmódot, amit átadott nekem, és amivel bevezetett a neuromorfológiai alapkutató 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 Laboratórium munkatársainak, Dr. Gallatz Katalinnak, Dr. Dobolyi Árpádnak, Dr. Tóth Zsuzsannának, Toronyay-Kasztner Magdolnának, Kiss Melittának, Cservenák Melindának, Szabó Éva Rebekának, Papp Rege Sugárkának, Balázs Tamásnak, Kézdi Dorottyanak, Hanák Nikolettnek, Könczöl Katalinnak, Kerti Juditnak, Deák Szilviának, Dellaszéga-Lábas Viktóriának és Szabó-Meltzer Kinga Ibolyának azt a segítőkészséget, a mindig jó hangulatot, mely a Palkovits Laboratórium tagjait mindennap jellemezte.

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

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

Köszönöm szüleimnek, hogy elindítottak a tudományos pályán és mindvégig maximálisan támogattak. Végül köszönöm családomnak, férjemnek, Árpádnak, gyermekeinknek, Daninak és Zsófinak azt a sok segítséget, türelmet és figyelmességet, amivel hozzájárultak munkám elkészítéséhez.