

A pályázati témában elért eredményeket 10 közleményben (ebből 4 közlés alatt) és 29 hazai és nemzetközi kongresszuson előadás vagy poszter formájában mutattuk be. A vizsgálatok döntő többségét PhD hallgatók (5 fő) és tudományos diákköri hallgatók (2 fő) végezték. A téma kezdetekor valamennyien „kezdő” kutatók voltak, akiknek a neuroanatómiai tudást is meg kellett szerezni, és a számos alkalmazott módszert (ld. *Függelék 1*) el kellett sajátítaniuk. Az új kutatási eredmények elérése mellett a pályázatnak ez volt az egyik legfontosabb célja, amit sikerült is teljesíteni. A fiatal kutatók 19 kongresszusi előadást, ill. poszter bemutatót tartottak, életükben először – és sikerrel. Az elmúlt négy év során annyi tapasztalatot szereztek és annyi eredményt értek el, hogy mind az öten PhD téziseiket (ld. *Függelék 2*) két éven belül meg tudják védeni.

### *Tudományos eredmények*

#### *1) Megfigyelések éheztetés és újraetetés (jóllakottság) hatására bekövetkezett változásokról a nyúltvevő dorsomedialis neuronjaiban*

A vizsgálatokat 2 napig éheztetett, valamint éheztetett és újraetett (2 h) patkányokon végeztük. Az értékelést az idegsejtek aktivitását jelző *c-fos* gén expressziójának immunhisztokémiai és *in situ* hibridizációs hisztokémiai vizsgálatával és azok kvantitatív értékelésével végeztük. A vizsgálatok négy állatcsoporton történtek: kezeletlen, 10 nappal szubdiafragmatikus vagotomia utáni posztnatálisan monosodium glutamáttal (MSG) kezelt és vagotomizált – MSG-kezelt állatcsoporton. Megállapítottuk: a) a kétnapos éheztetés után nem volt látható és mérhető *c-fos* aktivitás a vagus érző (nucleus tractus solitarii – NTS), motoros (nucleus motorius dorsalis nervi vagi – DVN) magjaiban és az area postremában. b) Kétnapos éheztetés után jóllakott állatok NTS neuronjaiban és az area postremában igen erős (a kontroll állatokénak 4-14-szerese) *c-fos* pozitivitás volt kimutatható, jelezve, hogy a jóllakottság érzése itt vált ki akut neuronális aktivitást. c) Megállapítottuk – várakozásainkkal ellentétében –, hogy vagotomizált állatokban a jóllakottság az álműtött állatoknál nagyobb mértékben váltott ki *c-fos* aktivitást, amit az NTS és area postrema neuronok fokozott szenzitivitásával tudunk magyarázni. Igazoltuk, hogy a vagotomizált állatoknál az alternatív (extra-vagal) pályák szerepe megnő: 1) a gyomorból a gerincvelőn át az NTS-be futó pályát retrográd transzporttal igazoltuk, 2) a humorális (érpályán át) úton érkező vizsgálatok szerepét igazolja, hogy MSG-vel kezelt állatoknál, ahol az area postrema – NTS közötti keringés sérül, az újra etetés gyengébb *c-fos* aktivitást vált ki mind a kontroll, mind a vagotomizált állatokban. A megfigyelések összegzéséül megállapítottuk, hogy a jóllakottság (satiety) inger elsődleges támadáspontja a vagus érző magjának és az area postremanak a neuronjai és a jóllakottsági szignál nemcsak a n. vaguson, hanem alternatív neuronális és humorális úton is eljut a gyomor-bélrendszerből a nyúltvelőbe (Puskás *et al.*, submitted).

#### *2) Megfigyelések éheztetés és újraetetés (jóllakottság) hatására bekövetkezett változásokról a hypothalamus neuronjaiban*

Ismeretes, hogy a hypothalamus a táplálkozás idegrendszeri szabályozásában központi szerepet foglal el. Több sejtcsoportjában (arcuatus, ventromedialis, paraventricularis magok) és areájában (lateralis és dorsolateralis areák) jelenleg mintegy 10 orexi- és anorexigén neuropeptidet és ezek receptorait ismerjük, melyek a táplálékfelvétel egyensúlyát vannak hivatva fenntartani. Megállapítottuk (Renner *et al.*, 2010), hogy a) a kétnapos éheztetés nem váltott ki nagyobb méretű idegsejt aktivitást egyik területen sem, de ez nem zárja ki, hogy a kétnapos éheztetés folyamán nem volt aktív hypothalamikus sejtcsoport. (A kísérletet megismételve, egynapos éheztetés esetén sem kaptunk lényeges változást. Az éheztetés

okozta változások szisztematikus vizsgálata a jelenlegi vizsgálatok témája.) b) Újraetetés hatására nagyon markáns és körülírt változást észleltünk a hypothalamusban: a dorsomedialis mag ventralis sejtcsoportjaiban igen erős volt a *c-fos* aktivitás, a kontroll állatokban mért érték közel tízszerese. Ez a jóllakottság inger hatására létrejött neuronális aktivitás kimutatható volt vagotomizált és MSG-kezelt állatokban egyaránt. Ez utóbbi kiemelendő, mert az MSG-kezelés elpusztította a nucleus arcuatus neuronjait, melyek a hypothalamusba vezető humorális út kiemelt célpontja, és a jóllakottsági inger ennek ellenére hatásos volt. Ez a tény logikusan indukálta, hogy vizsgálni kell a nucleus dorsomedialis ventralis sejtcsoportjának beidegzését, vagyis a „satiety szignál” útját a hypothalamusba (ld. 3. pont).

### 3) Neuronális kapcsolat a nucleus tractus solitarii és a hypothalamus dorsomedialis sejtcsoportja között.

Megállapítottuk, hogy a) a nucleus dorsomedialis ventralis sejtcsoportjának neuronjai között axonokból és végződésekből álló finom hálózat van. b) Immunhisztokémiai festésekkel prolactin-releasing peptide (PrRP) és glucagon-like peptid-1 (GLP-1) mutatható ki. Mindkét neuropeptid idegsejtjei a nyúltvelőben (az NTS-ben) található, ill. PrRP neuronok a n. dorsomedialis caudalis részében is vannak. Annak bizonyítására, hogy a nucleus dorsomedialis ventralis területén levő PrRP hálózat a nyúltvelőből ered, féloldalt átmetszettük az alsó agytörzset a híd-nyúltvevő határon és PrRP immunfestést végeztünk. Az immunfestéssel a különböző síkban készült sorozatmetszeteken nyomon tudtuk követni a PrRP rostokat, melyeket a féloldali metszés megszakított, ezért ezen az oldalon a nucleus dorsomedialisban a PrRP hálózat nem volt látható, míg az intakt oldalon a PrRP pálya az NTS-től a nucleus dorsomedialisig követhető volt. Megismételve a vizsgálatot éheztetett / újraetett állatokon, a műtött oldalon „eltűnt” a PrRP-pozitív hálózat a nucleus dorsomedialis ventralis sejtcsoportjából és itt az idegsejtekben nem volt kimutatható *c-fos* pozitivitás, szemben az intakt oldallal, ahol PrRP-pozitív hálózat és erős *c-fos* aktivitás volt látható újraetetés után. Megállapítottuk, hogy a jóllakottság szignál a nyúltvelőből egy idegi pályán jut el a hypothalamusba, és ennek a pályának részei a PrRP-t tartalmazó idegrostok (Renner *et al.*, 2010). További vizsgálatok folynak e pálya más, a táplálékfelvételben szerepet vivő komponenseinek neurokémiai azonosítására.

### 4) Megfigyelések az éheztetés és jóllakottság hatására bekövetkezett változásokról agykérgi és nucleus accumbens neuronokban

A kétnapos éheztetés, valamint az éheztetést követő újraetetés (2 h) hatását vizsgáltuk a frontális agykéregben (anterior cingulate cortex, infralimbikus és prelimbikus cortikális areák), valamint a nucleus accumbens „shell” és „core” területén lévő idegsejtekben *c-fos* immunfestéssel és *in situ* hibridizációs hisztokémiai módszerrel. A sorozatmetszetek kvantitatív értékelése folyamatban van. A kvantitatív értékelés eredményei azt mutatják, hogy az infralimbikus kéreg és a nucleus accumbens shell neuronjai erős *c-fos* expresszióval válaszoltak a jóllakottság ingerére. A vizsgálatok befejezése az év közepére várható.

#

Az első 4 pontban ismertetett vizsgálatok mellett, melyek a táplálékfelvétel szabályozása „afferens” (érző) szarának megismerésére irányultak, vizsgálatokat folytattunk az „efferens” (motoros) pályák és az azokban részt vevő neuronok lokalizálására is.

5) *A gyomor és a duodenum beidegzésében szerepet vivő szimpatikus és paraszimpatikus premotoros, valamint preganglionaris neuronok topográfiai lokalizálása retrográd transzszinaptikus pályajelöléssel.*

Jól ismert a gyomor és a duodenum beidegzésében szerepet vivő paraszimpatikus (nucleus motorius dorsalis nervi vagi – DVN) és szimpatikus (thoracalis gerincvelő oldalszár) neuronok lokalizációja. Vizsgálatainkban pseudorabies vírust alkalmaztunk retrográd transzszinaptikus pályajelölésre patkányokon. A gasztrointesztinális rendszer két fekélyre leginkább hajlamos területére (gyomor antrum és duodenum) adtunk be két különböző fluoreszcens jelölt vírust és időfüggvényben (2-3-4-5 nap) követtük nyomon a jelölést a nyúltvelőbe, majd magasabb agyterületekre. A vírus először (2 nap) jelöli (fertőzi) a preganglionaris neuronokat, majd azokon keresztül a preganglionaris neuronokat beidegző idegsejteket (ezeket nevezzük szimpatikus vagy paraszimpatikus premotoros neuronoknak). A két különböző fluorokrómmal jelölt vírus révén külön lokalizálhattuk azokat a preszinaptikus és premotoros neuronokat, melyeken vagy a gyomor, vagy a duodenum beidegzésében vesznek részt. A sejtek mintegy 5-8 %-a mindkét vírussal jelölődött, jelezve, hogy axonkollaterálisok révén mindkét területet azonos preganglionaris idegsejt idegzi be. A 3-5 napos vírusterjedés révén lokalizáltuk azokat az alsó agytörzsi adrenalin-, noradrenalin- és serotonin-tartalmú sejtcsoportokat, melyek premotoros sejteket tartalmaznak, továbbá premotoros neuronokat a hypothalamus arcuatus és paraventricularis magjaiban, valamint a dorsolateralis hypothalamikus areában, melyek részt vesznek a gyomor és a duodenum közvetett beidegzésében. Lokalizáltunk premotoros neuronokat az infralimbikus kéregben is. Mindezen eredmények (Kurucz *et al.*, közlés alatt) kiváló topográfiai alapot biztosítanak a táplálékfelvétel szabályozásában részt vevő szimpatikus és paraszimpatikus premotor neuronok további kémiai karakterizálására és célzott funkcionális vizsgálatokhoz.

6) *Kapcsolatok a táplálékfelvétel szabályozásban szerepet vivő dorsolateralis hypothalamusban elhelyezkedő és agytörzsi adrenalin- és noradrenalin-tartalmú neuronok között.*

A hypothalamus dorsolateralis területén foglalnak helyet azok az orexint- és melanocitát stimuláló hormont (MCH) tartalmazó neuronok, melyek a táplálkozási szabályozó kör efferens (motoros) szárát képezik, és táplálékfelvételt fokozó (orexigén) hatásúak. Az alsó agytörzsből található az adrenalin- (C1, C2) és noradrenalin-tartalmú sejtcsoportok, melyek mint szimpatikus premotoros neuronok a szimpatikus preganglionaris neuronokon át hatnak a perifériás szimpatikus rendszerre és a glukóz metabolizmusra kifejtett hatásuk révén vesznek részt a szervezet energiaháztartásának szabályozásában. Kettős fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal igazoltuk (Puskás *et al.*, submitted), hogy a hypothalamus orexin-tartalmú neuronjai beidegzik valamennyi szimpatikus premotoros neuront tartalmazó adrenalin és noradrenalin sejtcsoportot. Megjegyzendő, hogy az orexin-adrenalin/noradrenalin kapcsolat kétirányú, korábbi vizsgálatainkban igazoltuk, hogy adrenalin-tartalmú rostok finom hálózatot képeznek a dorsolateralis hypothalamusban mintegy reprezentálva a két rendszer közötti feedback mechanizmus morfológiai alapját.

*Lábjegyzetek (megjegyzések) a zárójelentéshez*

1) A táplálékfelvétel szabályozása nagyon „forró” téma, nagyon sok kutatócsoport témája, így adódott, hogy amikor elkezdtük a munkaterv megvalósítását, több új adat jelent meg, ami a tervezett vizsgálatok módosítását igényelte.

2) Számos módszert tovább kellett finomítani, illetve a tervezett kísérletekhez alkalmassá tenni, így pontosítani az intracraniális sztereotaxikus beadásokat (Kovács és Palkovits, 2 közlemény publikálás alatt), kiállítani az újabban leírt anyagok optimális dózisát, és új antitestek optimális koncentrációját. Mindezek számos előkísérletet tettek szükségessé.

3) Egyes agytörzsi sejtcsoportok szerepe a táplálékfelvételben feltételezett, de hatásmechanizmusában nem ismert. Vizsgálati modelljeink felállításánál el kívántuk dönteni, hogy szisztematikus vizsgálatainkat ezen sejtcsoportokra kiterjesszük-e. Ezen vizsgálatok új megfigyeléseket hoztak, melyeket önálló közleményekben ismertettünk is (Tóth *et al.*, 2006, Gaszner *et al.*, 2007, Rezek *et al.*, 2008), de a későbbi vizsgálati modellekbe ezeket az agyterületeket nem vettük be.

### *Függelék 1*

#### *A kísérletekhez felhasznált módszerek*

- Immunhisztológia: orexin, NPY, MCH, GLU-1, TH, PNMT, PrRP immunfestések
  - egyszeri és többszöri immunfestések
  - fluoreszcens mikroszkópos immunfestések
  - konfokális mikroszkópos analízis
  - Fos és Fra-2 immunfestések
- Elektronmikroszkópos immunhisztokémia: orexin, TH, PNMT, PrRP
  - egyszeri és gold/DAB kettős jelzés
- *In situ* hibridizációs hisztokémia
  - c-fos*, mRNS kimutatása
- Pályajelölési („tract tracing”) módszerek:
  - anterograd pályajelölések: PHA-I
  - retrograd pályajelölések
  - transz-szinaptikus retrograd pályajelölés pseudorabies vírussal
- Kísérletes agyműtétek
  - sztereotaxikus léziók
  - célzott pályaátmetszések
- Szubdiafragmális vagotómia
- Lokalizált kémiai agyléziók:
  - gold thioglucose kezelés egérben
  - monosodium glutamát kezelés patkányokban

### *Függelék 2*

A vizsgálatok 5 fiatal hallgató PhD témáját képezik:

*Kovács Zsolt István:* A nucleus arcuatus kapcsolatai az agytörzsi és gerincvelői vegetatív központokkal

*Papp Rege Sugárka:* A dorsolateralis hypothalamus táplálékfelvételben szerepet játszó neuronjainak kapcsolata

*Puskás Nela:* A jóllakottság szignáljának útja a n. vagus által beidegzett gerincvelői neuronokhoz és továbbítása hypothalamikus és agykérgi központokhoz

*Renner Éva:* A hypothalamus dorsomedialis magjában levő idegsejtek szerepe a táplálékfelvétel központi szabályozásában

*Szabó-Meltzer Kinga Ibolya:* A táplálkozásban szerepet játszó hypothalamus ventromedialis mag idegsejtjeinek kémiai karakterizálása és kapcsolatrendszerük kísérletes vizsgálata

A vizsgálatokban 2 tudományos diákköri hallgató (*Kurucz Péter* és *Kirschenbaum Dániel*) vett részt.