

A dorsolateralis hypothalamus funkcionális anatómiai vizsgálata patkányban

Doktori tézisek

Papp Rege Sugárka

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



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

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

Dr. Reglődi Dóra egyetemi tanár, az MTA doktora

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

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

Dr. Hrabovszky Erik tud. tanácsadó, az MTA doktora

Budapest
2014

1. BEVEZETÉS

A dorsolateralis hypothalamus (DLH) a hypothalamus hátsó részén található, viszonylag nagy, de pontosan körül nem írt terület. Patkányban ez a terület rostrocaudalisan a nucleus paraventricularis caudalis szélétől (körülbelül 2,2 mm-re a bregma szintjétől caudalisan) kezdődik és a harmadik agykamra recessus mamillarisának szintjéig tart (körülbelül 3,4 mm-re a bregma szintjétől caudalisan). Munkám során korábbi, a hypothalamus coronalis sorozatmetszeteire vonatkozó sejtdenzitás mérések, valamint az ezen a területen található különböző neuropeptid-tartalmú sejtek kvantitatív topográfiai elemzése alapján a DLH területét három részre, és ezeken belül további nyolc szubrégióra osztottuk. Az *area hypothalamica dorsomedialis* magában foglalja az area periventricularis (PeVe) hátsó részének felső részét, a DMN dorsalis részének (DMNd) lateralis részét, és a dorsomedialis hypothalamust (DMH), ami az area perifornicalis és a DMN közti területet jelenti. Az *area perifornicalis* (PeF) a rostralis (PeFr), a caudomedialis (PeFcm) és a caudolateralis (PeFcl) PeF-ből áll. A PeFr felnőtt patkányokban a fornix és a tractus mamillothalamicus közti területet jelenti a DMN-től a lateralis hypothalamus (LH) medialis határáig. Rostrocaudalisan 2,2 és 2,8 mm-nyire található a bregma szintjétől caudalisan. A fornix fölötti nagy terület a bregma szintjétől caudalisan 2,8 és 3,4 mm között képezi a PeF caudalis részét. Egy, a fornixtól induló függőleges vonal egy medialis és egy lateralis részre osztja ezt a területet. A *lateralis hypothalamust* a fornix aljától a pedunculus cerebri/capsula interna medialis széléhez induló egyenes egy ventralis (LHv) és egy dorsalis (LHd) szubdivízióra osztja.

Az orexin A és B, vagy más néven hipokretin 1 és 2 neuropeptidek azonosítása 1998-ban történt két, egymástól független laboratóriumban. Az orexineket expresszáló neuronok a központi idegrendszerben kizárólag a DLH területén találhatóak. Ezekből a sejtekből négy pálya indul ki, egy dorsalis és egy ventralis felszálló, valamint egy dorsalis és egy ventralis leszálló, ezek rostjai gazdagon behálózják a teljes idegrendszert. A patkány agyban az orexin-tartalmú neurális mező a nucleus paraventricularistól caudalisan, a nucleus tuberomamillarisától rostralisán található, a harmadik agykamrától lateralis irányba terjed egészen a tractus opticusig. Az orexin sejtek eloszlási mintázata egyedi és nem tisztelik az anatómiai határokat. Az orexin-tartalmú sejtek topográfiája és denzitása, valamint a DLH felosztása alapján a patkány hypothalamus orexin-tartalmú területeit három részre és azt további öt alterületre osztottuk a következőképpen: az *area hypothalamica dorsomedialis* itt is jól körülhatárolható, de csak két szubdivíziót, a PeVe-t és a DMNd-t különítettünk el benne, a PeF-t nem osztottuk további részekre, az LH-on belül pedig elhatároltunk egy ventralis és egy dorsalis részt.

Az orexin-tartalmú neuronok számos funkcióban betöltött szabályozó szerepét mind a sejtek, mind pedig a rostok eloszlása sejteti.

Az orexinek a nevüket is a táplálékfelvételt serkentő hatásuk révén kapták az orexis (étvágy) görög eredetű szóból származtatva. Az orexin sejtek premotor neuronokként a szimpatikus és paraszimpatikus preganglionaris sejtcsoportokkal való kapcsolatuk által a bennük integrálódott információk függvényében befolyásolják a táplálékfelvételt és a szervezet energiaháztartását.

Az orexin sejtek aktiválják a nucleus tuberomamillaris hisztamin-, a locus coeruleus noradrenalin-, a raphe magok szerotonin-, és a bazális előagy kolinerg-tartalmú sejtjeit, amelyek aktiválják a thalamicus és a kérgi központokat, előidézve az ébredést és ezt az állapotot stabilizálják.

A stresszválasz során az orexin-tartalmú neuronok a hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengelyt és a szimpatikus-adrenomedullaris rendszert is képesek befolyásolni.

2. CÉLKITŰZÉSEK

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

1. Az első kísérleti csoportban a DLH orexin-tartalmú neuronjainak Fos aktiválódását vizsgáltam három különböző funkcionális modellben: éheztetés, alvás-megvonás és akut fájdalom stressz után. A következő céljaim voltak:
 - a. a Fos aktiválódások összehasonlítása, annak megállapítására, hogy az orexin-tartalmú neuronok milyen mértékben vesznek részt a vizsgált három funkció szabályozásában;
 - b. a DLH különböző szubdivízióiban található Fos-aktivációt mutató orexin-tartalmú neuronok százalékos arányának összehasonlítása, hogy megtudjam, kimutathatóak-e funkció-specifikus orexin-tartalmú sejtcsoportok vagy szubdivíziók.
2. A második kísérletcsoport során a DLH alterületeinek agytörzsi kapcsolatait vizsgáltam, különös tekintettel az agytörzsi biogén amin sejtcsoportokra, annak megismerése érdekében, hogy az orexin-tartalmú neuronok mely agytörzsi struktúrákon keresztül érvényesítik a táplálékfelvételt, az alvás-ébrenlétet és a stresszválaszt szabályozó hatásukat. Ezen belül a következő céljaim voltak:

- a. annak megállapítása, hogy melyik alsó agytörzsi mag, magcsoport és terület kap a DLH-ből eredő rostokat; és hogy a DLH különböző szubdivíziói milyen mértékben vesznek részt az agytörzsi területek beidegzésében;
- b. anterográd jelölésű axonok sűrűségének meghatározásával megbecsülni, hogy a DLH különböző szubdivízióiban levő neuronok milyen mértékben vesznek részt egyes alsó agytörzsi sejtcsoportok innerválásában (nyolc szubdivízió projekciói 7 alsó agytörzsi sejtcsoportban - pl. monoamin sejtcsoportok);
- c. annak megállapítása, hogy mely alsó agytörzsi adrenalin és noradrenalin sejtcsoport kap közvetlenül a DLH orexin-tartalmú sejtjeiből beidegzést.

3. MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez felnőtt, Wistar törzsből származó, 250-300 g súlyú hím patkányokat, valamint felnőtt, C57/Bl6 törzsből származó, 30 g súlyú hím egereket használtunk. Az állatokat hármásával, automatikusan szabályozott hőmérsékleti ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) és fényviszonyok (12 órás fény és 12 órás sötét periódus) között tartottunk.

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

3.2. Aktivációs modellek

Kísérleteinkben három különböző aktivációs modellt alkalmaztunk: 24 órás éheztetés, 72 órás REM alvás-megvonás és fájdalom indukálta akut stressz. Ezek mindegyike megfelelőnek bizonyult arra, hogy a megváltozott homeosztázis következtében aktiválódott orexin-tartalmú neuronokat vizsgálhassuk minőségi és mennyiségi szempontokból. Minden egyes kísérlethez optimalizáltuk a paramétereiket (dózis, időzítés, kísérleti körülmények).

3.2.1. Éheztetés-újraetetés

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

3.2.2. REM alvás-megvonás

Az állatokat random módon két csoportba osztottuk. Saját ketrecében tartott csoport (n=8): az alvás-megvonás ideje alatt saját ketrecükben tartott kontroll állatok; ennek a csoportnak a tagjait az alvás-megvonás végével egyidőben perfundáltuk. REM alvás-megvonott csoport (n=6): 72 órát töltöttek egy kis platformon, ezt követően a csoport tagjait rögtön perfundáltuk. A REM alvás-megvonáshoz az állatokat különálló víztartály közepén elhelyezkedő platformra (a víztartály belső átmérője 41 cm, a platform átmérője 6,5 cm, a vízmélység 18 cm, a platform a víz fölött helyezkedett el 0,5 cm-rel) helyeztük. Az állatok a platformokon 72 órát töltöttek, a kontroll csoport tagjai ez idő alatt a ketrecükben voltak. A víz és a táp az állatok számára a kísérlet folyamán végig korlátlanul elérhető volt.

3.2.3. Formalin injekció

Az állatokat random módon két csoportba osztottuk. A kontroll (n=4) állatokat zavarás nélkül a ketreceikben hagytuk a kísérlet idejére, és a másik csoport állataival egyidőben perfundáltuk. A második csoport állatainak (n=5) hátsó lábába, közvetlenül a bőr alá formalint (0,2 ml/100 g testtömeg), mint gyorsan ható, nociceptív stresszort, injektáltunk. Tekintettel arra, hogy ebben az esetben nem a formalin-okozta fájdalom hatását kívántuk mérni, hanem a stressz-modell hatékonyságát (amibe beletartozott az állatok rögzítése, a szúrás okozta, majd a beadott formalin által kiváltott fájdalom), megfelelő kontrollnak intakt állatokat használtunk. Az állatokat egy órával az injekció után perfundáltuk.

3.3. Sztereotaxikus biotinilált dextrán-amin-beadás

Az állatokat elaltattuk, és fejüket sztereotaxikus készülék segítségével rögzítettük. Biotinilált dextrán-amint (BDA – 25 mg/250 µl PB, 10000 MW) juttattunk iontoforetikusan (6,5-7,5 µA pozitív áramimpulzusok [7 s be, 7 s ki], 20 percen át) a patkányok (n=42) jobb oldali DLH-ának különböző szubregióiba. A kapillárisokat (hegyük belső átmérője 18-25 µm) a beadást követő 10 percen belül a beadási helyen tartottuk, és csak ezután húztuk ki. Az állatokat két héttel

a beadást követően perfundáltuk, az agyakat eltávolítottuk és a BDA-t tartalmazó sejteket és rostokat ABC technika használatával kimutattuk.

3.4. Hisztológiai módszerek

Perfúzió, fixálás, metszés: Az állatokat elaltattuk, rögzítettük, majd a mellkas felnyitása után a szív bal kamráján át kanült vezetünk az aortába, végül a jobb pitvar megnyitását követően állatonként 50 ml 0,9% fiziológiás sóoldattal kimostuk a vért az érrendszerből. Ezután fixálószerként 300 ml 4% paraformaldehid oldatot (pH 7,4) használtunk. Elektronmikroszkópos vizsgálatokra szánt állatok esetében a fixáló oldat még 0,08% glutáraldehidet is tartalmazott.

A perfúzió után kivett agyakat 24 órán át 4°C-on 4% paraformaldehid oldatban utófixáltuk, majd egy éjszakára 20%-os, PB-ben oldott cukoroldatba helyeztük. Az agyakból fagyasztó mikrotóm segítségével coronalis metszeteket készítettünk. Aktivációs vizsgálatokhoz és az egér agyak esetében a metszetek vastagsága 40 µm, a parallel metszetek száma öt. A többi esetben a metszetek vastagsága 50 µm, a parallel metszetek száma négy. Elektronmikroszkópos vizsgálatokra az agyak VT 1000 S vibratómon lettek metszve. A metszetek vastagsága 50 µm, a parallel metszetek száma négy.

Immunhisztokémia: Fos fehérjét, orexin A-t, tirozin-hidroxilázt (TH), feniletanolamin-N-metiltranszferázt (PNMT) és szinaptofizint mutattuk ki a következő festések során:

Orexin A és TH kettős jelölés fénymikroszkópos (FM) vizsgálatokhoz

Orexin A és PNMT kettős jelölés FM vizsgálatokhoz

Orexin A, TH és szinaptofizin többszörös jelölés

Orexin A, PNMT és szinaptofizin többszörös jelölés

Orexin A és TH kettős jelölés elektronmikroszkópos (EM) vizsgálatokhoz

Orexin A és PNMT kettős jelölés EM vizsgálatokhoz

Orexin A és Fos kettős immunhisztokémia

3.5. Dokumentáció

A kettős festett metszeteket Olympus BX60 mikroszkóp segítségével vizsgáltuk, és az ehhez csatlakoztatott SPOT Xplorer digitális CCD fényképezőgép és a SPOT Advanced szoftver segítségével készítettük el a fényképeket. A konfokális képeket Nikon Eclipse E800 konfokális mikroszkóppal és a mikroszkóphoz csatlakoztatott Bio-Rad Radiance Rainbow konfokális lézerpásztázó rendszer segítségével készítettük el. Az ultravékony metszetek

vizsgálatát JEOL 2300 EX elektronmikroszkóp segítségével végeztük. A fotókat az elektronmikroszkóphoz csatolt Olympus Morada digitális kamerával készítettük.

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

3.6. Kiértékelés és statisztika

3.6.1. Orexin és Fos kettős festések analízise

A hypothalamus minden ötödik metszetén megszámoltuk a Fos-pozitív és a Fos-negatív orexin A sejteket az agy mindkét oldalán a bregma szintje utáni 2,0 mm-től 3,5 mm-ig. A sejszámolást követően a kettős festett sejtek és az orexin-tartalmú sejtek arányát a DLH minden egyes szubdivíziójára meghatároztuk. Megvizsgáltuk, hogy az alkalmazott kezelésnek volt-e statisztikailag kimutatható Fos-aktiváló hatása az orexin A-tartalmú sejtekre nézve a DLH-ban, valamint a szubdivíziókban. Az egyes kezelések Fos-aktiváló hatását a DLH szubdivíziók között külön-külön kiértékeljük egyutas ANOVA-val. Szignifikáns kezelés hatás esetén Tukey *post hoc* tesztet végeztünk. A kezelések hatását a Fos-pozitív és a Fos-negatív orexin sejtek százalékos eloszlására az egyes DLH szubdivíziókon belül a bregma szintjétől mért hét különböző rostrocaudalis síkban is megvizsgáltuk Student t-teszt segítségével. Minden adatot átlag \pm SEM-ben tüntettünk fel. Statisztikailag szignifikáns hatást $p < 0,05$ esetén állapítottunk meg.

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

Összesen 42 állatnak adtam be BDA-t. Az agykból coronalis síkú sorozatmetszeteket készítettem, és a metszeteket megfestettem a beadási helyek topográfiai meghatározása céljából. Csak azokat az állatokat fogadtuk el, amelyeknél a BDA-jelölt neuronális terület megfelelő méretű volt és elhelyezkedését tekintve a megfelelő DLH szubdivízióin belül volt. Végeredményben 22 állat felelt meg a kritériumoknak és azok agytörzsét használtam fel a BDA projekciók feltérképezéséhez.

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

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

1. melyik és hány agytörzsi terület/mag/szubdivízió tartalmazott BDA-pozitív rostokat a nyolc DLH szubdivízióba való BDA beadást követően;
2. a nyolc DLH szubdivízió részvétele az agytörzsi területek/magok/szubdivíziók beidegzésében (hány szubdivízió projiciál az adott agytörzsi területre);
3. mely agytörzsi területen/magban/szubdivízióban volt magas a jelölt rostok denzitása;
4. a BDA rostdenzitás elemzése speciális agytörzsi sejtcsoportokban.

3.6.3. Konfokális képek kvantitatív analízise

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

4. EREDMÉNYEK

4.1. Orexin A-tartalmú neuronok aktivációja különböző funkcionális modellekben

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

4.1.1.1. A dorsolateralis hypothalamus kvantitatív adatai

A DLH orexin-tartalmú neuronális mezőn belül, figyelembe véve a DLH szubdivízióit, az orexin sejtek denzitását és topográfiáját, öt régiót különítettük el: PeVe, PeF, DMNd, LHv és LHd. Az állatonként megszámlált orexin-festett sejtek száma $1332,3 \pm 22,6$ ($n = 40$). A coronalis metszeteken vizsgált DLH térfogat a *teljes* DLH-nak körülbelül 20%-át képviseli (minden ötödik rostrocaudalis metszeten számoltunk). Így az orexin neuronok teljes száma 6500 és 7000 közé tehető. Az alkalmazott kísérleti modellek nem változtatták meg

szignifikáns mértékben az orexin sejtek számát a kontrollokhoz képest. Nagy, de nem szignifikáns különbségeket találtunk az orexin sejtek számában a három kísérleti csoport közt. Néhány orexin-festett sejt a DLH-n kívül is megtalálható az area hypothalamica anterior vagy a subthalamus területén. Ezek az összes orexin-tartalmú neuronnak kevesebb, mint 1%-át teszik ki. A statisztikai kiértékelés során ezt a néhány sejtet nem vettük figyelembe.

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

4.1.1.2. Egyes dorsolateralis hypothalamicus szubdivíziók kvantitatív adatai

A PeVe orexin neuronjai a harmadik agykamra caudalis porciójának dorsalis része mentén és fölött helyezkednek el. Ennek a területnek a térfogata kicsi, és viszonylag magas az orexin-festett sejtek denzitása ($68,48 \pm 3,11$ sejt/mm³): az orexin neuronok $4,25 \pm 0,40\%$ -a található itt. A legtöbb orexin-tartalmú neuron ($44,26 \pm 3,63\%$) a PeF területén található. Ugyanitt van ezen sejtek legnagyobb denzitása is a DLH-ban: $222,65 \pm 12,94$ sejt/mm³. Ez a sejtdenzitás a rostrocaudalis metszeteken szignifikáns eltéréseket mutat.

A DMNd területén a második legmagasabb az orexin-jelölt sejtek denzitása ($88,99 \pm 2,46$ sejt/mm³), itt található ezen neuronok $12,84 \pm 0,75\%$ -a.

Az LH caudalis részének ventralis régiójában (LHv) az orexin sejtek denzitása alacsony volt ($39,89 \pm 1,73$ sejt/mm³), a sejtek $15,24 \pm 0,90\%$ -a található itt, míg az LHd a sejtek $23,00 \pm 1,85\%$ -át tartalmazza viszonylag magas sejtdenzitás mellett ($84,70 \pm 4,16$ sejt/mm³).

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

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

4.1.2.1. A DLH szubdivíziók orexin sejtjeinek aktivációja éheztetés után

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

Éhezés hatására az orexin sejtek $32,15 \pm 3,92\%$ -a válaszolt Fos expresszióval. A legtöbb (az összes orexin neuron $14,53 \pm 2,60\%$ -a) aktivált orexin neuron a PeF területén volt. A DMNd és

a PeVe aktiválódott a legnagyobb mértékben, ugyanis mindkét szubdivízió orexin sejteinek több, mint 50%-a tartalmazott Fos-t. Az LH orexin sejteinek aktivációja viszonylag alacsony volt, a kettős festett sejtek aránya nem érte el a 20%-ot egyik szubdivízióban sem. A két órás újraetetés az éheztetés után tapasztalt Fos-aktivációt szignifikánsan nem változtatta meg.

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

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

Az alvás-megvonás során a saját ketrecben tartott állatok feleltek meg kontrollnak. A kísérleti körülményeknek köszönhetően viszonylag magas Fos aktivációt találtunk ezekben az állatokban: az orexin-tartalmú sejtek $20,79 \pm 5,51\%$ -a tartalmazott Fos jelölést. A 72 órás REM alvás-megvonás erőteljes *c-fos* expressziót eredményezett: az orexin sejtek $54,65 \pm 2,37\%$ -a ($p < 0,0001$, $F_{1,50} = 105,8929$) aktiválódott, ami $33,86\%$ -kal több, mint a kontroll csoport esetében. A legtöbb aktiválódott orexin neuron (az összes orexin sejt $26,11 \pm 2,19\%$ -a) a PeF területén volt, ugyanakkor a legerőteljesebb választ a DMNd és a PeVe adta, mindkét esetben az itt lévő orexin sejteknek több mint 60% -a volt Fos pozitív. A kettős festett sejtek százalékos aránya az LH területén meghaladta a 40% -ot. Tukey *post hoc* összehasonlítás szerint a Fos aktiváció mindegyik vizsgált terület esetén szignifikáns ($p < 0,001$) volt a kontroll csoporthoz képest.

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

A kontroll állatok esetében az orexin sejtek $16,92 \pm 6,68\%$ -a volt Fos pozitív. A subcutan formalin injekció szignifikánsan megnövelte az orexin sejtek Fos-pozitivitását ($p < 0,0001$, $F_{1,35} = 59,3332$), az összes orexin neuron $45,68 \pm 1,31\%$ -a volt kettős festett. A PeF tartalmazta az összes aktivált sejt $23,80 \pm 1,54\%$ -át, ugyanakkor a DMNd és a PeVe válaszolt a legintenzívebben az akut fájdalomra, mivel az itt található sejteknek több, mint 70% -a volt Fos-pozitív. A Tukey *post hoc* összehasonlítás szerint szignifikáns különbség volt az injektált állatokban a kontrollokhoz képest a PeF, PeVe ($p < 0,01$), és a DMNd ($p < 0,005$) területén.

4.1.2.4. Az aktiválódott orexin sejtek rostrocaudalis eloszlása

Rostrocaudalisan vizsgálva a DLH aktiválódott és nem aktiválódott orexin-tartalmú sejteinek eloszlását, az éhezés hatására a kontrollhoz képest szignifikáns ($p < 0,05$) aktiválódást találunk a PeF és az LHd rostralis részén. Ezzel szemben a PeVe, a DMNd és az LHd területén az aktiválódott sejtek a caudalis részben voltak nagyobb százalékban. A teljes DLH területén az orexin-tartalmú neuronok figyelemreméltó Fos-aktiválódását tapasztaltuk alvás-megvonás eredményeképpen, ugyanakkor rostrocaudalisan a szubdivíziók közt nagyfokú eltéréseket találtunk. Szignifikáns Fos indukciót találtunk a DMNd területén caudalisan a bregma szintjétől 2,52 és 2,76 mm között. A PeVe és az LHv területén egy magas plató volt megfigyelhető a bregma szintjétől caudalisan 2,52 és 3,00 mm közt, akárcsak a PeF és az LHd területén 2,76 és 3,00 mm közt. Formalin-indukálta stressz hatására rostrocaudalisan a DMNd, a PeF és az LHd mutatott magas Fos-aktivitást a bregma szintjétől caudalisan 2,76 mm-nyire. Továbbá viszonylag sok kettős festett sejt volt az LHv caudalis részén.

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

4.2.1. BDA-beadási helyek lokalizációja

4.2.1.1. Area hypothalamica dorsomedialis

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

A PeVe esetében a beadási helyek nagyon kicsik voltak, az átlagos mediolateralis átmérőjük coronalis metszeten nem haladta meg a 250 μm -t. A beadási helyek közvetlenül a harmadik agykamra mellett láthatóak, némileg a kamra fölé nyúltak dorsalisán és csak kis átfedést mutattak a DMN-nel.

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

A DMH-ba adott beadások 350 és 400 μm -esek voltak, a DMN és a PeF medialis része közé estek. A BDA kissé átterjedt mindkét szomszédos területre.

4.2.1.2. Area perifornicalis

A beadási hely tizenegy esetben volt az area perifornicalis területén: kettő a PeFr, hat a PeFcm és három a PeFcl területén.

A PeFr területére adott beadások mérete 350 és 450 μm volt. Mindkét esetben a beadási hely a terület határain belül volt.

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

A PeFcl területére adott BDA-beadások mérete 200 és 450 μm között volt. Ezek közül a két kisebb a PeFcm határain belül volt, míg a harmadik állat esetében a BDA átszivárgott a szomszédos LHd területére.

4.2.1.3. Lateralis hypothalamus

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

Az LHv területén lévő mindkét beadás a terület határain belül maradt. Méretük ~ 400 μm volt.

Az LHd-be adott BDA 250 és 350 μm -nyire terült szét. Két esetben a beadás a terület határain belül maradt, míg egy esetben egy kevés BDA átszivárgott az LHv területére.

4.2.2. BDA-tartalmú rostok eloszlása az alsó agytörzsben

4.2.2.1. Középagy

Általánosságban elmondható, hogy BDA-tartalmú rostokat a középagy területén ipsilateralis dominanciában találtunk az egyoldali DLH beadás után.

A BDA-jelölt rostok legnagyobb denzitásban a periaqueductalis szürkeállomány (PAG) területén voltak láthatóak, melyek nagyrészt a DLH PeF és az area hypothalamica dorsomedialis PeVe régiójából eredtek. Sűrű BDA-pozitív rosthálózatot találtunk a PAG ventralis és ventrolateralis részében, míg a többi területén csak gyenge és közepes erősségű volt a BDA-tartalmú rostok sűrűsége. Bár a rostok egy része áthaladó axonnak („axon of passage”) tűnt, köztük számos varikózus rost is látható volt, melyek lehetséges szinaptikus kapcsolatokra utaltak. Számos rostot találtunk a PAG-tól lateralisán és ventralisan, leginkább a nucleus cuneiformis, az area precuneiformis és a formatio reticularis isthmicus részének területén. A nucleus raphe dorsalisban közepes és erős denzitásban találtunk BDA-tartalmú rostokat PeF és LHv beadások után. A nucleus raphe medianus csak gyenge, vagy nagyon gyenge projekciót kapott, míg a mellette található nuclei raphe paramedianus és rhabdoideus területén közepes denzitásban találtunk BDA rostokat.

A többi vizsgált közepagygi magban, illetve területen, köztük a nucleii oculomotoriusban és trochlearisban vagy nagyon alacsony volt a rostok denzitása vagy egyáltalán nem találtunk bennük rostokat.

4.2.2.2. Híd

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

PeFcm és PeFcl beadások után a formatio reticularis pontis oralis részében közepes denzitásban találtunk részben áthaladó BDA-tartalmú rostokat. A DLH PeVe, PeFr és LHv területére való beadás után a formatio reticularis pontisnak mind az oralis, mind a caudalis részében voltak gyenge és közepes denzitásban jelölt rostok.

Mindegyik szubdivízió küld rostokat a nucleus tegmentalis laterodorsalis területére, és a nucleus tegmentalis pedunculopontinus is hat különböző DLH szubdivízióból kap rostokat. Nagy sűrűségben találtunk jelölt rostokat mindkét területen az LHv-be való BDA beadás után. Sűrű BDA-tartalmú rosthálózatot találtunk a Barrington magban PeVe beadás után. A BDA rostok denzitása a locus coeruleus területén majdnem megegyezett a Barrington magban találttal. A PeVe és a PeF szubdivíziói közepesen, míg a DLH többi régiója gyengén (vagy a DMH esetében nagyon gyengén) projiciált a locus coeruleus területére. A locus coeruleus caudalis részén nagyon ritkák voltak a jelölt rostok. A locus coeruleustól ventralisan, az area subcoerulea területén, annak is a dorsalis részében közepesen sűrű rosthálózat volt megfigyelhető. A rostok nagyrészt a DLH PeFr, PeFcm és LHv régióiból eredtek. BDA-pozitív rostokat figyeltünk meg gyenge és közepes denzitásban a nucleii parabrachiales lateralis és medialis területén. A PeFr és a PeFcl sejtszejtjei közepesen innerválják mindkét magot. A híd ventrolateralis részén, ahol az A5 noradrenalin sejtszejtsoport található, néhány BDA-tartalmú rostot találtunk. Ugyancsak néhány rost volt megfigyelhető a nucleii pontis és raphe pontis és néhány hídi szenzoros és motoros mag területén, ugyanakkor más magokban, mint például a nucleii cochlearis és a vestibularis lateralis egyáltalán nem volt BDA-tartalmú rost, vagy terminális.

4.2.2.3. Nyúltvelő

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

A DLH különböző szubdivízióiból kiinduló rostok alacsony denzitásban jelentek meg a nucleus reticularis gigantocellularis területén. A szomszédságában lévő nucleii

paragigantocellularis lateralis és reticularis intermedia területén pedig még ritkábbak voltak a rostok. A DMN kivételével a DLH mindegyik szubdivíziója beidegezte ez utóbbi két területet. A nucleus tractus solitarii területére a DMN kivételével az összes DLH terület küldött projekciót: gyengén projíciált a PeVe, PeFr és LHv, a többi terület pedig még kevésbé vett részt az innerválásban. A nucleus dorsalis nervi vagi kevés rostot kapott a DMN, PeFr, PeFcm, LHv és LHd területéről, és csak egy-két rostot találtunk PeFcl beadás után.

A medullaris katekolamin sejtszoptok területén jellemző a jelölt rostok alacsony denzitása, ugyanakkor ezek a rostok a DLH több szubdivíziójából eredtek. Az A2 noradrenalin sejtszoptot beidegző rostok a DLH mind a nyolc általunk elhatárolt régiójába történt beadás után megjelentek. Az A1 noradrenalin sejtszopt caudalis részét, valamint a C1 adrenalin sejtszoptot ellátó DLH rostok hét, míg az A1 noradrenalin sejtszopt rostralis részét, valamint a C2 adrenalin sejtszoptot ellátók öt különböző szubrégióból származtak.

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

A legtöbb PeF és LH beadás után BDA-tartalmú rostokat találtunk a pályák és a kötegek rostjai között. A rostok denzitása igen alacsony volt, kivéve a lemniscus medialis, a fasciculus longitudinalis medialis és a pedunculus cerebellaris superiorist, ahol a BDA-rostok denzitása egyes esetekben közepes volt. Az agytörzsben elkülönített területek/magok/szubdivíziók több, mint egyharmadában nem voltak BDA-tartalmú rostok és terminálisok.

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

4.3.1. Orexin A rosthálózat az agytörzsi adrenalin sejtszoptok területén

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

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

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

4.3.2. Orexin A rosthálózat az agytörzsi noradrenalin sejtcsoportok területén

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

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

Az A2 noradrenalin sejtcsoportban, leginkább a nucleus tractus solitarii területén, számos orexin-pozitív varikózus rost figyelhető meg. A magon belül rostrocaudalisan a rostok denzitása növekedik. A nucleus tractus solitarii commissuralis szubdivíziójában egy orexin-tartalmú rosthálózat figyelhető meg, főleg a szubdivízió dorsalis és lateralis részén, közvetlenül a nucleus gracilis mellett. A magon belül horizontálisan futó rostok kereszteződnek közvetlenül a canalis centralis felett dorsalisán. A nucleus tractus solitarii teljes hosszában megfigyelhető orexin-tartalmú rostok nagyszámú varikozitással rendelkeznek és számos szoros kapcsolatot létesítenek a TH-pozitív sejtekkel.

Az A5 sejtcsoport teljes rostrocaudalis hosszában megfigyelhető a noradrenerg sejtek orexinerg innervációja. Vékony, hosszú, varikózus rostok veszik körül a TH-tartalmú sejteket és dendriteket. Két orexin rostköteg éri el az A5 noradrenalin sejtcsoportot, az egyik az area subcoerulea felől, a másik ventrolateralis irányból.

Az alsó agytörzsből az orexin-tartalmú rostokat a legnagyobb sűrűségben a locus coeruleus, azaz az A6 noradrenalin sejtcsoport területén találjuk. A vastag, varikózus orexin-pozitív rostok finom hálózatot képeznek a locus coeruleuson belül, végig a mag medialis részén, ahol zömmel a locus coeruleus neuronjainak dendritjei találhatóak. Ugyanez a hálózat figyelhető meg az area subcoerulea területén, a locus coeruleus és az A5 noradrenalin sejtcsoport között.

Hosszú, párhuzamosan futó orexin-immunreaktív rostok futnak a negyedik agykamra alatt, a felszínhez nagyon közel. Párhuzamos, varikózus rostokat találunk a negyedik agykamra falában is a subependymalis noradrenalin-tartalmú sejtek (A4) és az ependyma sejtek közt. Szoros kapcsolat látható a TH-tartalmú perikarionok és dendritek, valamint a varikózus orexin-festett rostok közt a locus coeruleus teljes területén. A locus coeruleustól ventralisan, az area subcoeruleaban, ahol a TH-tartalmú sejtek denzitása némileg kisebb, mint a locus coeruleuson belül, jól megfigyelhető az orexin-pozitív rosthálózat elhelyezkedése jól megfigyelhető a noradrenalin sejtek körül.

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

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

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

Kettős immunfluoreszcens festéssel axo-dendritikus és axo-szomatikus szoros összefekvéseket figyeltünk meg varikózus orexin-tartalmú rostok és PNMT- vagy TH-tartalmú neuronok és dendritek között. Nagyszámú konfokális felvételt készítettünk a C1, C2 és C3 sejtcsoportok területéről. A képeken meghatároztuk, hogy az egy adrenalin-tartalmú neuronra eső szoros összefekvések hány százaléka tartalmaz szinaptofizint. Hasonlóan, az A1 és A2 noradrenalin sejtcsoport esetében is analizáltuk a konfokális felvételeket.

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

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

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

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

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

Az orexin A-tartalmú axonterminálisok aszimmetrikus axo-dendritikus szinapszisokat képeznek noradrenalin sejtek TH-festett dendritjein a vizsgált sejtsoportokban, ahogy az A2, illetve az A6 sejtsoport területéről készített reprezentatív képen is látható. Ugyanígy számos szinapszist találtunk orexin A-festett axonterminálisok és nem-jelölt dendritek között. Orexin-immunreaktív rostok számos esetben voltak közvetlenül a TH-tartalmú dendritek mellett, de köztük szinaptikus kapcsolat nem volt detektálható. A TH-tartalmú neuronokon végződő szinapszisok legtöbbje nem tartalmazott orexin A-t.

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

5. KÖVETKEZTETÉSEK

5.1. A DLH orexin-tartalmú neuronjainak funkcionális heterogenitása

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

5.2. A DLH kapcsolata az agytörzsi területekkel

- Az agytörzsi struktúrák legalább 60%-a kap a DLH területéről innervációt, és ebben az innervációban különböző mértékben mind a nyolc vizsgált DLH szubdivízió részt vesz. Kimutattam, hogy a projekció tekintetében számottevő különbségek vannak a szubdivíziók között. A legtöbb agytörzsi területre az area perifornicalis sejtjei küldenek rostokat és innen indul ki a legerősebb projekció is. Az area hypothalamica dorsomedialis területeiről feleannyi projekció indul ki, mint a perifornicalis területekről és a lateralis hypothalamus ventralis részének sejtjei is több agytörzsi területet idegeznek be, mint a dorsalis szubdivízió neuronjai.
- A táplálékfelvétel, az alvás-ébrenlét és a stresszválasz szabályozásában szerepet vivő *valamennyi* alsó agytörzsi noradrenalin, adrenalin és szerotonin sejtcsoport területén az átlagnál nagyobb sűrűségben vannak a DLH szubdivízióiból eredő rostok, sugallva, hogy a DLH neuronjai ezeken a sejtcsoportokon keresztül fejtik ki funkcionális hatásukat.
- Az alsó agytörzsi katekolamin sejtekkel szoros összefekvésben lévő varikózus orexin-festett rostok közel 70%-a tartalmazott szinaptofizint, egy preszinaptikus fehérjét. Ez a szinaptikus kapcsolat meglétére utal.
- A szinaptikus kapcsolat létét elektronmikroszkóppal igazoltam több katekolamin sejtcsoport területén orexin-festett rost és adrenalin- vagy noradrenalin-tartalmú neuron között. Ez egyrészt a hypothalamusból leszálló feedback szignál létére utal, másrészt arra, hogy a DLH orexin sejtjei ezeken a sejtcsoportokon keresztül fejtik ki különböző funkcionális hatásukat.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

1. Puskás N, **Papp RS**, Palkovits M. (2010) Interactions between orexin-immunoreactive fibers and adrenaline or noradrenaline-expressing neurons of the lower brainstem in rats and mice. *Peptides*, 31: 1589-97.

Impakt faktor: 2,654

2. **Papp RS**, Palkovits M. (2014) Brainstem projections of neurons located in various subdivisions of the dorsolateral hypothalamic area – an anterograde tract-tracing study. *Front Neuroanat*, 8: 34.

Impakt faktor: 4,058

6.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó tudományos cikkek

1. Könczöl K, Bodnár I, Zelena D, Pintér O, **Papp RS**, Palkovits M, Nagy GM, Tóth ZE. (2010) Nesfatin-1/NUCB2 may participate in the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Neurochem Int*, 57: 189-97.

Impakt faktor: 3,601

2. Kitka T, Adori C, Katai Z, Vas S, Molnar E, **Papp RS**, Toth ZE, Bagdy G. (2011) Association between the activation of MCH and orexin immunoreactive neurons and REM sleep architecture during REM rebound. *Neurochem Int*, 59: 686-94.

Impakt faktor: 2,857

3. Ruisanchez É, Cselenyák A, **Papp RS**, Németh T, Káldi K, Sándor P, Benyó Z. (2012) Perivascular expression and potent vasoconstrictor effect of dynorphin A in cerebral arteries. *PLoS One*, 7: e37798.

Impakt faktor: 3,730

4. Vas S, Ádori C, Könczöl K, Kátai Z, Pap D, **Papp RS**, Bagdy G, Palkovits M, Tóth ZE. (2013) Nesfatin-1/NUCB2 as a potential new element of sleep regulation in rats. *PLoS One*, 8:e 59809.

Impakt faktor: 3,730

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

Köszönöm édesanyámnak, hogy mellettem állt és támogatott.

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