

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2767.

DURST MÁTÉ

Neuromorfológia és sejtbiológia
című program

Programvezető: Dr. Alpár Alán, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Tóth Zsuzsanna, tudományos főmunkatárs

Intrauterin alultáplált patkányok táplálékfelvétel- és cukorháztartás-szabályozásában fellépő agyi változások vizsgálata

Doktori értekezés

Durst Máté

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tóth Zsuzsanna, PhD, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Dávid Csaba, PhD, egyetemi docens
Dr. Kalló Imre, PhD, főmunkatárs

Szigorlati bizottság:

Elnöke: Dr. L. Kiss Anna, DSc, egyetemi tanár

Tagjai: Dr. Hrabovszky Erik, DSc, tudományos tanácsadó
Dr. Barna János, PhD, egyetemi docens

Budapest
2022

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	5
2. Bevezetés és irodalmi áttekintés	7
2.1 Intrauterin növekedési retardáció	7
2.2 A táplálékfelvétel szabályozása	9
2.2.1 A homeosztatikus szabályozás fontosabb elemei	9
2.2.1.1 Perifériás impulzusok	9
2.2.1.2 A hypothalamusban történő integráció és kimenetek	12
2.2.2 Nem-homeosztatikus szabályozás, a jutalom szerepe a táplálékfelvételben	17
2.2.2.1 Az ízek útja az agyba	17
2.2.2.2 A mesolimbikus jutalmazó rendszer és a nucleus accumbens	18
2.2.2.3 Különböző neurotranszmitterek szerepe a NAc működésében	19
2.2.2.4 A jutalom komponensei és a jutalmi szabályozás területi reprezentációja	20
2.2.3 Kapcsolatok a homeosztatikus és a nem-homeosztatikus szabályozó rendszerek között	23
2.2.4 A jutalmi szabályozás zavarának esetleges szerepe az elhízásban	24
2.3 A cukorháztartás központi szabályozása és zavara	24
2.3.1 A cukorháztartás központi idegrendszeri szabályozása	24
2.3.1.1 A nem elhízottak 2TDM-a	26
2.4 A nesfatin-1 neuropeptid	26
2.5 Laboratóriumunknak a témában publikált egyéb eredményei	31
3. Célkitűzések	35
4. Módszerek	36
4.1 Állatok	36
4.2 Intrauterin fehérjeredukált modell	36
4.3 Mágneses rezonancia képalkotás	38
4.4 A jutalmi tápfogyasztás értékelése	38
4.5 D1R-agonista kezelés	39
4.6 Intraperitoneális glükóz (ipGTT) és inzulin- (ipITT) tolerancia tesztek	40
4.7 Akut intracerebroventrikuláris (icv) nesfatin-1 beadás	40

4.8	Krónikus icv nesfatin-1 beadás.....	41
4.9	A jutalmi tápfelvétel mintázatának elemzése	42
4.10	Immunhisztokémia (IHC).....	42
4.11	In situ hibridizáció	44
4.12	Immunhisztokémiai képkötés és analízis	46
4.13	Az in situ hibridizációs képek kvantálása.....	48
4.14	Statisztika	48
5.	Eredmények	50
5.1	Az FR állatok fejlődése	50
5.2	Magas élvezeti értékkel bíró táp fogyasztásának elemzése.....	52
5.3	A táplálkozási jutalom hatása a cFos által jelzett neuronális aktivációra a NAc és a rostralis LHA területén	52
5.4	A dopaminerg transzmisszió fő elemeinek kiértékelése.....	57
5.5	A medialis shell-ben található D1R-pozitív neuronok jutalmi tápfelvételben való szerepe	61
5.6	Az FR állatok cukorháztartásának vizsgálata	65
5.7	Nucb2 génextpresszió a hypothalamusban.....	66
5.8	A nesfatin-1 hatása a táp- és vízfelvétele	68
5.9	A nesfatin-1 hatása a hypothalamus éhezés-indukálta sejtaktivációjára	70
5.10	A krónikus centrális nesfatin-1 kezelés cukorháztartásra való hatása.....	73
6.	Megbeszélés.....	76
6.1	FR modellünk fejlődési jellemzői.....	76
6.2	A jutalmi tápfelvétel értékelése	78
6.3	A jutalmi tápfelvétel hatása a nucleus accumbens sejtaktivációjára	79
6.4	A dopaminreceptorok expressziója a nucleus accumbens területén.....	80
6.5	A dopaminerg transzmisszió szerepe a LHA orexigén sejtjeinek gátlásában	81
6.6	Az FR állatok cukorháztartása.....	83
6.7	A Nucb2/nesfatin-1 megváltozott expressziója és anorexigén funkciója FR állatokban	84
6.8	A nesfatin-1 szerepe a cukorháztartás szabályozásában NR és FR állatokban ..	86
7.	Következtetések.....	89
8.	Összefoglalás	90

9. Summary.....	91
10. Irodalomjegyzék	92
11. Saját publikációk jegyzéke	114
11.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	114
11.2 Egyéb, az értekezéshez fel nem használt közlemény	114
12. Köszönetnyilvánítás	115

1. Rövidítések jegyzéke

2TDM: 2-es típusú diabetes mellitus; 2-es típusú cukorbetegség

α -MSH: α -melanocyt-stimuláló hormon

ACTH: adrenocortikotrop hormon

AGIC: agrularis insularis cortex

aCSF: mesterséges agy-gerincvelői folyadék (artificial cerebrospinal fluid)

AgRP: agouti-related peptid

AP: area postrema

ARC: nucleus arcuatus

AVP: arginin-vazopresszin; antidiuretikus hormon

BrDU: brómdeoxiuridin

BSA: szarvasmarha (bovine) szérum albumin

ca: commissura anterior

CART: kokain- és amfetamin-regulált transzkript

CRH: kortikotropin-releasing hormon

CST: cukrozott sűrített tej

D1R: 1-es típusú dopaminreceptor

D2R: 2-es típusú dopaminreceptor

DAB: diaminobenzidin

DMN: nucleus dorsomedialis hypothalami

DMX: nucleus dorsalis nervi vagi

DPM: percenkénti bomlás (decay per minute)

DTT: ditiotreitól

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

ELISA: enzimhez kötött

immunszorbiens próba

FR: intrauterin fehérjeredukált

GABA: γ -amino vajsav

GIC: granularis insularis cortex

GLP-1: glukagonszerű peptid-1

HRP: tormaperoxidáz (horseradish peroxidase)

icv: intracerebroventricularis

IHC: immunhisztokémia (immunohistochemistry)

ILC: infralimbicus cortex

ipGTT: intraperitonealis glükóztolerancia teszt

ipITT: intraperitonealis

inzulintolerancia teszt

ISH: *in situ* hibridizáció

IUGR: intrauterin növekedési retardáció (intrauterin growth retardation)

LH: a lateralis hypothalamicus area lateralis része (analizált területünk)

LHA: lateralis hypothalamicus area

MCH: melanin-koncentráló hormon

MDT: nucleus mediodorsalis thalami

MSN: közepes tüskés neuron (medium spiny neuron)

Med. shell: medialis shell alrégió

NAC: nucleus accumbens

NDS: normális számár szérum (normal donkey serum)

NE: nemzetközi egység

NGS: normális kecske szérum (normal goat serum)
NMDA: N-metil-d-aszparaginsav
NPY: neuropeptid Y
NR: intrauterin (az anya tekintetében) normál tápon tartott, nem intrauterin fehérjeredukált
NSc: nucleus suprachiasmaticus
NTS: nucleus tractus solitarii
Nucb2: nucleobindin-2
ORX: orexin
OXT: oxitocin
PBS: sós foszfát puffer, pH: 7,4
PBr: nucleus parabrachialis
PF: perifornicalis régió a lateralis hypothalamicus areában
PI3K: foszfatidilinoszitol-3-kináz
POMC: proopiomelanocortin

PV: pallidum ventrale
PVN: nucleus paraventricularis hypothalami
PYY: YY peptid
R: korrelációs koefficiens
ROI: immunhisztokémiai analízisre kijelölt terület (region of interest)
SPZ: subparaventricularis zóna
SON: nucleus supraopticus hypothalami
SSC: sós nátrium-citrát puffer (saline sodium citrate buffer)
TRH: thyreotropin-releasing hormon
TH: tirozin-hidroxiláz
VMN: nucleus ventromedialis hypothalami
VPM: nucleus ventralis posteromedialis thalami
VTA: ventralis tegmentalis area

2. Bevezetés és irodalmi áttekintés

2.1 Intrauterin növekedési retardáció

Intrauterin növekedési retardációról (IUGR) akkor beszélünk, amikor a magzat méhen belüli fejlődése kórosan elmarad a nemének és életkorának megfelelő normától (Saleem és mtsai 2011).

Kialakulásának hátterében számos tényező állhat. Az anya alapbetegségei, valamint a terhességgel összefüggésben keletkező kóros állapotai, a méhlepény elváltozásai, a magzat DNS-el összefüggő, vagy szerzett elváltozásai mind okozhatnak magzati retardációt (Paulin és Pajor 2009). Előidézésében szerepet játszik még – a ma leginkább a harmadik világban előforduló – súlyos anyai alultápláltság. Azért említem meg külön, mert az állatmodelleket gyakran ezen a kóroki alapon hozzák létre (Desai és mtsai 2005, Ozanne és mtsai 2005).

Sajnos az IUGR súlyosan növeli a perinatalis morbiditást és mortalitást. Többek között növeli a koraszülést, a meconium aspirációs szindróma, a korai szepszis, a szülés közbeni asphyxia esélyét, befolyásolhatja a korai fejlődést (Saleem és mtsai 2011).

Az intrauterin és perinatalis szövődmények azonban az IUGR következményeinek csak az egyik csoportját teszik ki. Felnőtt korban ugyanis az érintettek körében az átlagnál gyakrabban fordulnak elő különböző betegségek. Erre először a második világháborúban zajlott ún. „nagy holland éhezés” (Great Dutch Famine) hatásainak vizsgálata alapján jöttek rá. Kimutatták, hogy az éhezésnek kitett várandós anyák gyermekei fejlődésükben, az elhízottak arányában, felnőtt kori jellemző betegségeikben markánsan különböznek a korábbi vagy későbbi időszakban születettektől (Ravelli és mtsai 1976, Roseboom és mtsai 2006). Pár jellemző példa betegségek gyakoribb előfordulására: neurológiai problémák (Visser és mtsai 2010), mentális deficit (Alford 2013), szív-és érrendszeri megbetegedések (Szostak-Wegierek 2014), dyslipidaemia (Munoz-Valverde és mtsai 2015), vesebetegségek és magas vérnyomás (Luyckx és Brenner 2015). Mivel gyakran a korai életkor elégtelen tápanyagellátottsága áll a szindróma hátterében, nem meglepő, hogy sok esetben a metabolizmus is megváltozik. Különböző mértékben elhízás alakulhat ki, (Desai és mtsai 2005, Martorell és mtsai 2001), valamint 2-es típusú cukorbetegség (2TDM) jelentkezhet (Barker, Hales, és

mtsai 1993, Vaag és Lund 2007). Ez utóbbi olyannyira jellemző, hogy az intrauterin retardált modelleket gyakran használják 2TDM vizsgálatára (Pinney 2013).

Mi állhat ezen metabolikus változások hátterében? A korai fejlődés során elszenvedett károsodásra vagy kihívásra a szervezet prediktív alkalmazkodással válaszol. Bizonyos géneknek megváltozik a működése, ami hosszú távon befolyásolja a szervezet működését (Heijmans és mtsai 2008). A jelenség hátterében jelen levő géneket „gatekeeper” (magyarul: kapus, portás) - géneknek nevezik, és magát az elméletet gatekeeper-hipotézisnek (Mcmullen és mtsai 2012). A magzat szervezetében létrejövő válaszok összességét magzati programozásnak hívjuk („fetal programming”)(Barker, Gluckman, és mtsai 1993), amely hosszú távon befolyásolja a tápfelvétel, energialeadás és cukorháztartás szabályozásában részt vevő élettani rendszereket, többek között a hypothalamicus szabályozó köröket is (Pedroso és mtsai 2017).

Ha a magzati programozásnak a sanyarú, táplálékszegény méhen belüli körülményeket kell kompenzálnia, mint az általunk tárgyalt IUGR eseteiben, az ún. takarékos fenotípus (eredetiben: „thrifty phenotype”) alakul ki. Ilyenkor az érintett organizmus olyan energiaszegény környezetre „számít” extrauterin korban is, mint amilyenben intrauterin korában is része volt (Mcmullen és mtsai 2012). Ennek következménye, hogy a táplálékok felhalmozására, raktározására rendezkedik be a szervezet. Egyik jele ennek az intenzív „catch-up” (felzárkózó) növekedés, amikor az érintettek gyermekkorban fokozott testtömegnövekedéssel reagálnak a korábbi lemaradásra, ezzel utolérve, vagy le is hagyva nem IUGR társaikat (Boersma és Wit 1997, Coupe és mtsai 2009).

Természetesen az IUGR következtében kialakuló metabolikus szindróma és egyéb betegségek megjelenése nagyon egyénfüggő, számos tényező befolyásolja, így az egyéni genetikai hajlamok, valamint az intrauterin és postnatalis körülmények jellemzőinek pontos mértéke (Carey és mtsai 2013, Levin 2006, Pedroso és mtsai 2017, Timper és Brüning 2017).

A fehérje-csökkentés révén létrehozott intrauterin alutáplálás (FR) a 2TDM kutatásában széles körben alkalmazott rágcsálómodell (Martin-Gronert és Ozanne 2007, Pinney 2013). Ez a modell jól adja vissza az emberi IUGR következményeit (Ozanne és mtsai 2005), ezért kísérleteink kivitelezéséhez nekünk is erre esett a választásunk.

2.2 A táplálékfelvétel szabályozása

A táplálék, a tápanyagok szabályozott bevitele nagy fontossággal bír a homeosztázis fenntartása szempontjából. Nem elegendő mennyiségű és/vagy minőségű tápanyagfelvétel fogyáshoz, majd alultáplált állapotához vezet, amelyet számos kísérő és következményes betegség életveszélyes állapotig, illetve a halál beálltaig súlyosbíthat (Maleta 2006). A túlzott tápanyagbevitel viszont épp ellenkezőleg: túlsúly, illetve elhízás kialakulását eredményezheti. Bár azt gondolhatnánk, hogy a tartalék tápanyag bizonyos esetekben még jól is jöhet, a megnövekedett metabolikus- és súlyterhelés számos betegség kialakulásához vezet (De Lorenzo és mtsai 2020). Látható tehát, hogy a tápfelvétel mértékének, eloszlásának szabályozása a szervezet egyik fontos feladata.

Maga a szabályozás két alapvető rendszer, a homeosztatikusan és a nem-homeosztatikusan működésén át valósul meg. Előbbi az éhség- és a telítettségérzet, valamint a homeosztázis többi összetevője által meghatározott táplálékfelvételt serkentő, illetve gátló utakat jelöli (Saper és mtsai 2002). Utóbbi kifejezés pedig utal minden egyéb befolyásoló tényezőre (Berthoud 2006), hiszen „eszünk örömmel, eszünk bánatunkban”. A kulináris élvezetek emberi szociális életünk fontos alkotóelemét képezik, számos pszichés zavar pedig, mint például a krónikus stressz, egyéb betegségek kialakulása mellett táplálékfelvételi zavarok megjelenéséhez is vezethet (Hardaway és mtsai 2015).

2.2.1 A homeosztatikusan szabályozás fontosabb elemei

2.2.1.1 Perifériás impulzusok

A szervezet tápanyagellátottságát számos humoralis és idegi impulzus közvetíti az idegrendszer felé. Az alábbiakban szeretném ismertetni a legfontosabb tényezőket.

Zhang és munkatársai azonosították a leptin nevű hormont 1994-ben (Zhang Y. és mtsai 1994). A leptin a zsírszövetben termelődik, szintje a zsírszövet mennyiségétől függ, vagyis a szervezet hosszú távú tápanyagellátottságának függvénye (Maffei és mtsai 1995). Receptora a hypothalamus több területén, de leginkább az arcuatus magban (ARC), a ventromedialis (VMN), dorsomedialis (DMN) és a ventralis premamillaris

magokban fejeződik ki (Schwartz és mtsai 1996). Az anorexigén hatású, tehát a táplálékfelvételt csökkentő, a proopiomelanocortint (POMC) és a kokain- és amfetamin-regulált transzkript (CART) nevű peptidet (az esetek többségében) koexpresszáló neuronok aktiválódnak leptin hatására. Az orexigén (táplálékfelvételt növelő) agouti-related peptidet (AgRP) és neuropeptid Y-t (NPY) koexpresszáló idegsejteket ezzel szemben a leptin gátolja (Saper és mtsai 2002).

Egy másik perifériásan termelődő hormon a ghrelin. Először receptorát írták le (Howard és mtsai 1996), majd megtalálták annak endogén ligandját is (Kojima és mtsai 1999). Legnagyobb mértékben a gyomorban termelődik, szintje növekszik éhezés hatására és csökken telt gyomor esetén (Ariyasu és mtsai 2001). Receptora az agyban leginkább a hypothalamus (főleg az ARC és a VMN magvak területén), a hypophysis, a hippocampus, a ventralis tegmentalis area (VTA) és a substantia nigra területén található meg (Guan és McBride 1989). Az ARC-ban főként az NPY/AgRP tartalmú neuronokat aktiválja (Dickson és Luckman 1997), ezzel serkentve a tápfelvételt.

A táplálékfelvételt követő inzulin-emelkedés hatása is szerepel a szabályozásban, hiszen az inzulin receptora az egész agy területén megtalálható, bár nagy területi különbségekkel (Schulingkamp és mtsai 2000). Az azonban egyértelmű, hogy a hypothalamusban az ARC, a paraventricularis (PVN) és a supraopticus (SON) magvak területén nagy a receptorsűrűség (Schulingkamp és mtsai 2000). Az inzulin intracerebroventricularisan (icv) adva gátolta a tápfelvételt, míg a jelpályájában szereplő foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) gátlószerével együtt adva ez az inhibíció nem valósult meg (Niswender és mtsai 2003).

A glükóz szintje nemcsak az inzulinon keresztül járul hozzá a szabályozó folyamatokhoz. A perifériás glükózreceptorokon kívül az agy számos területén találhatóak a glükózsztint változásaira reagáló, ún. glükózérzékeny neuronok, amelyek közül kiemelkedik az agytörzs (ezen belül: nucleus tractus solitarii (NTS), nucleus dorsalis nervi vagi, nucleus hypoglossus), valamint a hypothalamus (Dunn-Meynell és mtsai 1998, Levin és mtsai 2004). Ez utóbbi területen az egyik kiemelt mag a VMN. Neuronjainak egy részét a glükóz aktiválja (glükóz-aktivált neuronok), egy másik részét pedig gátolja (glükóz-gátolt neuronok) (Dunn-Meynell és mtsai 2002). A másik legfontosabb az ARC, ahol az NPY/AgRP populáció glükóz-gátolt, míg a POMC/CART neuronok glükóz-aktiváltak (Yoon és Diano 2021). Úgy tűnik, hogy az

alacsony glükózsint növeli a tápfelvételt (Miselis és Epstein 1975, Smith és Epstein 1969), míg a magas csökkenti azt (Kurata és mtsai 1986).

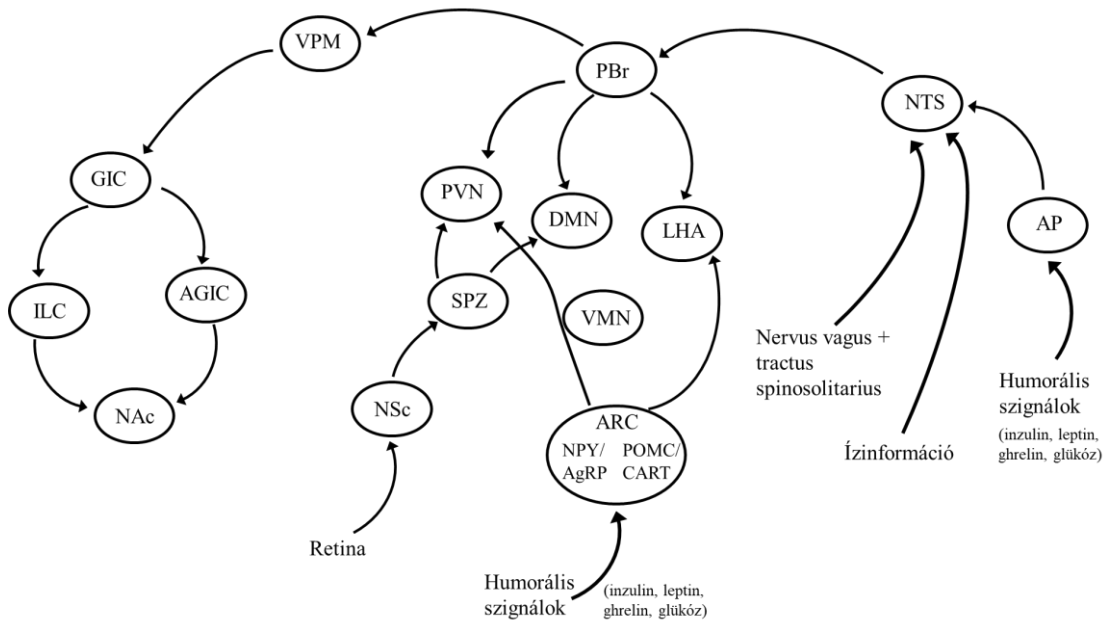
Egyéb periférián termelődő peptidek is hozzájárulnak a táplálékfelvétel szabályozásához. Ide tartozik a vékonybél I-sejteiben termelődő cholecystokinin, amely szintén aktiválja például az NTS-t és a hypothalamus táplálékfelvételben résztvevő magvait (Billig és mtsai 2001). A glukagonszerű peptid-1 (GLP-1) a vékony- és vastagbél L-sejtjeiben termelődik, főként az area postrema keresztül kifejtett hatással befolyásolja az idegrendszer működését, anorexigén hatású (Van Dijk és mtsai 1997). Szintén a L-típusú enteroendokrin sejtekben termelődik az YY peptid (PYY), amely szintén anorexigén hatású (Batterham és mtsai 2002).

A nervus vagus, a bolygóideg kétoldali kommunikációt teremt a gyomor-bélhuzam és az agy között. Az afferens rostok egyrészt feszülést közvetítenek, elsősorban a gyomorból, amely a tápfelvétel leállítását szabályozza, másrészt kemoszenzitív információt főként a vékonybélből (Berthoud 2008). A rostok az NTS-ben végződnek, innen vetülnek tovább. A perifériáról a gerincvelőbe haladó viscerosensoros rostok által közvetített információ felszálló rostok útján többek között eléri az NTS-t, a parabrachialis magot (Pbr), a hypothalamus magvait (Menétrey és De Pommery 1991). A gyomornak viscerotopiás reprezentációja is van a thalamusban és az insularis kéregben (Cechetto és Saper 1987).

Idegi bemenetként meg kell említeni a cirkadián ritmus szerepét is. A retinohypothalamicus pálya a nucleus suprachiasmaticusban végződik, és innen sugárzik szét többek között a hypothalamus egyéb magjaira, valamint a tobozmirigyre. A fény számos életműködésre hat, a tápfelvétel időpontját például fajspecifikusan befolyásolja (Ma és Morrison 2022). Fontos hangsúlyozni, hogy a dolgozatban tárgyalt háziasított patkány (*Rattus norvegicus domesticus*) a sötétségben él aktív életet és táplálkozik, míg a világosság alatt van nyugalomban.

A fő afferens útvonalak a következők (Saper és mtsai 2002): az NTS az egyik fontos bemeneti központ. Az ízézés, a vagalis, illetve a gerincvelőből érkező afferensek is ide vetülnek, a közeli circumventricularis, vagyis vér-agy gáton kívüli terület, az area postrema pedig humoralis impulzusokat közvetít ide. Az NTS-ből a parabrachialis (PBr) mag közvetítésével rostok két fő irányban haladhatnak: egyrészt a thalamus ventralis

posteromedialis (VPM) magjához, amely a kéregre is vetül és létrejön a tudatosulás; másrészt pedig a hypothalamus magvaira. A humoralis hatások másik fő célpontja az ARC, amely a hypothalamus számos táplálékfelvételben résztvevő magjának működését szabályozza. Ezen fő útvonalakat az 1. ábrán szemléltetem.



1. ábra. A táplálkozást befolyásoló agyba érkező főbb afferens útvonalak (Saper és mtsai 2002) alapján.

Jelmagyarázat: AGIC: agranularis insularis cortex; AgRP: agouti-related peptid; AP: area postrema; ARC: nucleus arcuatus; CART: kokain- és amphetamin-regulált transzkript; DMN: nucleus dorsomedialis; GIC: granularis insularis cortex; ILC: infralimbicus cortex; LHA: lateralis hypothalamicus terület; NAc: nucleus accumbens; NPY: neuropeptid Y; NSc: nucleus suprachiasmaticus; NTS: nucleus tractus solitarii; PBr: nucleus parabrachialis; POMC: proopiomelanocortin; PVN: nucleus paraventricularis; SPZ: subparaventricularis zóna; VMN: nucleus ventromedialis hypothalami; VPM: nucleus ventralis posteromedialis thalami.

2.2.1.2 A hypothalamusban történő integráció és kimenetek

A homeosztatisz táplálékszabályozás felső központja a hypothalamus. Az első megfigyelés a táplálékfelvétel központi idegrendszeri szabályozásával kapcsolatban az volt, hogy a hypothalamus ventromedialis magvai gátló, a lateralis területei (lateralis

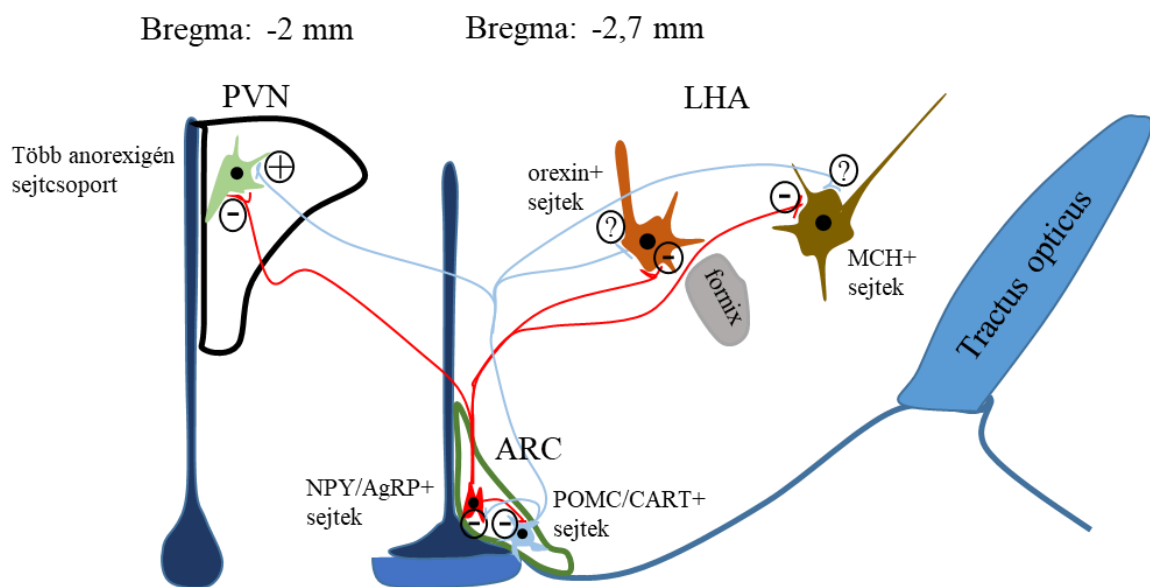
hypothalamicus area, LHA) pedig aktiváló szerepet töltenek be (Anand és Brobeck 1951, Hetherington és Ranson 1940). Azóta tudásunk sokat finomodott ehhez a durva megközelítéshez képest.

A táplálékfelvételi szabályozás elsődleges központjának tekintjük az ARC-ot, amely az idegi bemenet mellett integrálja a humoralis szignálok által közvetített információt is. A LHA-ra, a VMN-ra és a PVN-ra vetül, ezért ezeket másodlagos központoknak is nevezzük.

A hypothalamusban a táplálékfelvétel szabályozásának tekintetében jelentős szerepet játszanak az orexigén és anorexigén neuropeptidek. A magokon belüli, illetve a magvak közötti kommunikációban is részt vesznek (Harrold és mtsai 2012).

Az ARC mindkét előző csoportba tartozó neuropeptidet expresszáló sejtpopulációnak helyet ad. A POMC/CART koexpresszáló anorexigén neuronok inkább a mag lateralis területén találhatóak. A POMC az α -melanocyta-stimuláló hormon (α -MSH) prekursora. Az α -MSH, a melanocortin 3-as (MC3R) és 4-es (MC4R) receptorokon hat (Marks és Cone 2001). Az MC3R elsősorban az ARC területén, míg az MC4R tulajdonképpen az egész agyban expresszálódik, így az agykéreg, a NAc, a thalamus, a hypothalamus, valamint az agytörzs területén is. A hypothalamuson belül kiemelendő a PVN, supraopticus mag (SON), LHA, ScN, anteroventralis periventricularis mag, a DMN és a VMN, valamint a preopticus területek magas MC4R receptorsűrűsége (Mountjoy és mtsai 1994). A CART receptorát még nem azonosították, de feltételezik, hogy specifikus receptorral rendelkezik, amelynek G-protein kapcsoltságát bizonyították (Lin és mtsai 2011). A mag medialis részén NPY/AgRP tartalmú, ezen peptideket koexpresszáló orexigén neuronok találhatóak. Az AgRP szintén MC3R-en és MC4R-en hat mint inverz agonista, többek között így gátolják az AgRP-sejtek a POMC/CART sejteket az ARC magon belül (Harrold és mtsai 2012, Mercer és mtsai 2011). A NPY az idegrendszer számos területén expresszálódik, kiemelkedően a hippocampus gyrus dentatusában, valamint az ARC medialis részén (Tatemoto 2004). Több receptorát azonosították már, az Y1 és Y5-ös típusú receptorokon orexigén hatást közvetít (Marsh és mtsai 1998) (Kanatani és mtsai 2000), mint ahogyan általános orexigén peptidként is van számon tartva. Ezzel ellentétben kísérleti állatok az Y2-es receptor hiányában fokozott tápfelvételt mutattak, tehát itt ellentétes hatás sejthető (Sainsbury és mtsai 2002).

Az ARC két neuronpopulációja eléri mind a PVN, mind a LHA idegsejtcsoportjait. Az AgRP/NPY neuronok gátolják a PVN anorexigén sejtjeit és érdekes módon szintén gátolják az LHA orexigén sejtjeit (Mercer és mtsai 2011, Schwartz és mtsai 2000) A POMC/CART sejtcsoport bizonyítottan serkenti a PVN több anorexigén populációját is (Ghamari-Langroudi és mtsai 2015, Schwartz és mtsai 2000). Ezek a sejtek az LHA sejtcsoportjait is eléri (Elias és mtsai 1998), azonban itt hatásuk még nem pontosan tisztázott, hiszen MC4R nem található orexint és melanin-koncentráló hormont (MCH) expresszáló sejteken (Cui és mtsai 2012) (2. ábra).



2. ábra. Az ARC két sejtcsoportjának hypothalamuson belüli projekciói. A szerző saját ábrája.

Az ábra két rostrocaudalis hypothalamicus szintet mutat a PVN, ARC és LHA területeivel. Az ARC medialisán elhelyezkedő AgRP/NPY sejtcsoportja (piros) orexigén hatású, általánosan gátolja a PVN anorexigén sejtjeit, és a LHA orexigén sejtcsoportjait, valamint a POMC/CART sejtjeket. Az ARC lateralisabb POMC/CART sejtcsoportja (kék) anorexigén hatású, aktiválja a PVN anorexigén sejtjeit és gátolja az NPY/AgRP sejtjeket.

Rövidítések: ARC: nucleus arcuatus; AgRP: agouti-related peptide; AVP: arginin-vazopresszin; CART: kokain- és amfetamin-regulált transzkript; CRH: corticotrop-releasing hormon; LHA: lateralis hypothalamicus area; MCH: melanin-koncentráló

hormon; NPY: neuropeptid Y; OXT: oxitocin; POMC: proopiomelanocortin; PVN: nucleus paraventricularis; TRH: thyreotropin-releasing-hormon.

Az LHA szerepe régóta ismert a táplálékfelvétel befolyásolásában. Több neuroncsoportot találunk itt, amelyek részt vesznek ebben a folyamatban. Az orexint (vagy másik nevén hypocretint) expresszáló neuronok csak az LHA-ban fordulnak elő, itt is a perifornicalis régióban koncentrálódnak (Sakurai és mtsai 1998). Elnevezésüknek megfelelően először orexigén hatásuk került előtérbe. A közelmúltban azonban inkább ébresztő/élénkítő szerepükre jut nagyobb figyelem (Siegel J. M. 2004), valamint a jutalmi mechanizmusokra való hatásukra, hiszen erőteljesen beidegzik a VTA-t (Korotkova és mtsai 2003). Általánosan glutamátergek, de van egy GABA (γ -amino vajsav)-erg alcsoportjuk (Bonnavion és mtsai 2016). Másik ismert orexigén neuroncsoport a MCH-t expresszáló sejtek csoportja (Bittencourt és mtsai 1992). Általánosan GABAerg sejteknek tartják őket. Koexpresszálnak többek között nesfatint és 50 %-uk CART-ot is (Bonnavion és mtsai 2016). Az MCH génjének vagy az MCH-pozitív neuronoknak a kiütése anorexigén hatást okoz, soványsághoz vezet (Alon és Friedman 2006, Shimada és mtsai 1998).

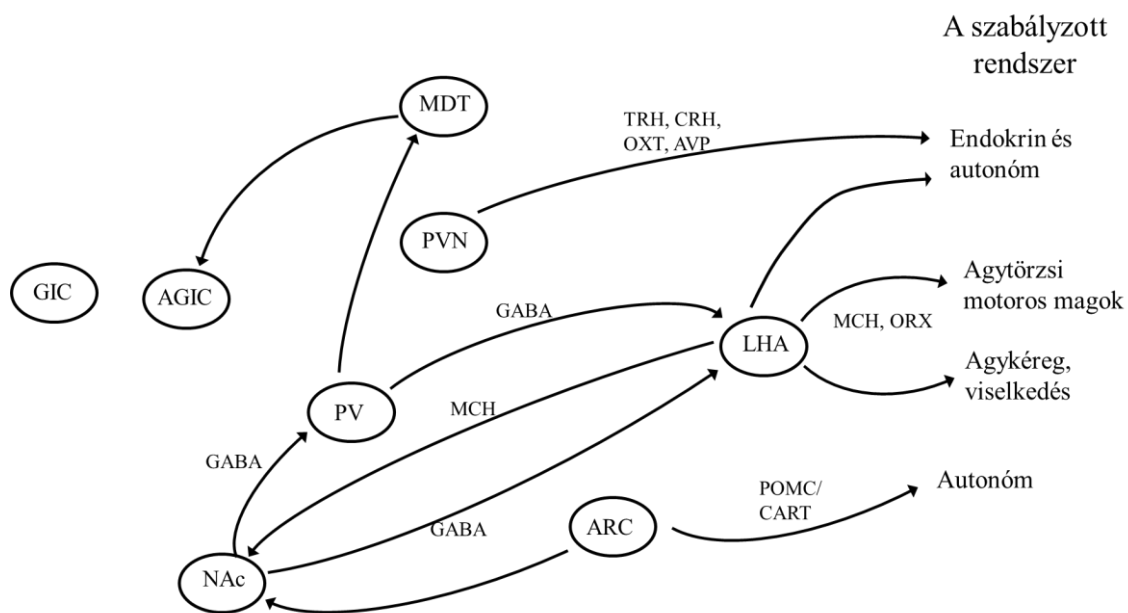
Van egy GABAerg sejtcsoport a LHA területén, amely nem koexpresszál sem orexint, sem MCH-t, és erőteljes orexigén hatással bír (Jennings és mtsai 2015). Ezek a sejtek a nucleus accumbens shell 1-es típusú dopaminreceptor (D1R)-pozitív sejtjeinek egyik fő kimenetét alkotják (O'Connor és mtsai 2015).

Leírtak egy glutamáterg anorexigén sejtpopulációt is az LHA-n belül. Ez a bed nucleus of the stria terminalis (BNST) GABAerg neuronjaitól kap innervációt, amelyet ha serkentünk, fokozódik a tápfelvétel. Tehát ez a neuroncsoport önmagában anorexigén (Jennings és mtsai 2013).

A lateralis hypothalamus sejtcsoportjai beidegeznek agytörzsi motoros magvakat, a rágás, nyelvmozgások, nyelés irányítóit. Eléri a nyúltvelő és a gerincvelő preganglionáris magvait, amelyekkel a nyáleválasztás, gastrointestinális motilitás, gyomorsav és hormonelválasztás folyamataiba avatkozhatnak bele. Beidegzik továbbá az agytörzs monoaminerg sejtcsoportjait. A fentiekén kívül az agykérget is diffúzan innerválják (Saper és mtsai 2002).

A tápfelvételi parancsok integrálásában van fontos szerepe a PVN magnak. Az ARC-ból mind a POMC/CART sejtek, mind az AgRP/NPY sejtek elérik, előbbiek aktiváló, utóbbiak gátló hatással. Itt ugyanis anorexigén hatású neuropeptidok termelődnek (thyreotropin-releasing-hormon (TRH), corticotropin-releasing hormon (CRH), oxitocin, nesfatin-1, CART) (Hill 2012). A CRH amellett, hogy az adrenocorticotrop hormon (ACTH) termelését irányítja, agytörzsbe és a gerincvelőbe vetítő neuronokban is megtalálható. A TRH neuronok egyrészt a TSH (pajzsmirigy-serkentő hormon) termelődését irányítják, amellyel a pajzsmirigyhormonokon keresztül közvetve a termogenezis és a metabolizmus általános karmesterének szerepét töltik be, másrészt egy csoportjuk caudalisabb idegrendszeri területekre projiciálva ezeket a funkciókat idegi szabályozással befolyásolja (Hill 2012). A harmadik PVN-beli sejtcsoport, amely anorexigén, az oxitocint tartalmazó neuronok. Közülük a magnocellularis sejtek a neurohypophysisbe vetülnek, az oxitocin a szülés és tejtermelés folyamatát szabályozza ezen az úton. A parvocellularis oxitocinsejtek viszont az agy számos területére, illetve a gerincvelőre vetülve szociális, érzelmi és tápfelvételi mechanizmusokat irányítanak (Althammer és Grinevich 2018, Blevins és mtsai 2004). Az oxitocinhiányos egér elhízik (Camerino 2009), a túlzott cukorbevitel pedig részben pont az oxitocin hatásának gátlásával okoz elhízást (Mitra és mtsai 2010). Az α -MSH a PVN-ben valószínűleg főleg az oxitocin neuronokon hat a tápfelvételre, hiszen az oxitocin receptor antagonistával az α -MSH anorexigén hatását ki lehetett védeni (Yosten és Samson 2010).

A táplálkozási válasz alapvetően motoros, endokrin és autonóm rendszereken keresztül valósul tehát meg. A LHA sejteit többek között az agykéregre (viselkedés) és az agytörzs motoros rendszerére vetülnek, a PVN az endokrin és az autonóm válaszok kiindulópontja, mellettük az ARC POMC/CART sejtek is részt vesznek az autonóm irányításban (3. ábra) (Saper és mtsai 2002).



3. ábra. A hypothalamicus táplálékfelvételi szabályozás fontosabb kimenetei (Saper és mtsai 2002) alapján.

Jelmagyarázat: AGIC: agranularis insularis cortex, ARC: nucleus arcuatus; AVP: arginin-vasopressin; CART: kokain- és amfetamin-regulált transzkript; CRH: corticotropin-releasing hormon; GABA: γ -amino vajsav; GIC: granularis insularis cortex; LHA: lateralis hypothalamicus terület; MCH: melanin-koncentráló hormon; MDT: nucleus mediodorsalis thalami; NAc: nucleus accumbens; ORX: orexin; OXT: oxtocin; POMC: proopiomelanocortin; PV: pallidum ventrale; PVN: nucleus paraventricularis; TRH: thyreotropin-releasing hormon.

2.2.2 Nem-homeosztatisz szabályozás, a jutalom szerepe a táplálékfelvételen

2.2.2.1 Az ízek útja az agyba

A táplálék jutalmi értékelése elsősorban az ízeken (és a szagokon) alapszik (Saper és mtsai 2002). A klasszikus négy alapíz receptorain kívül felfedeztek már aminosavakra reagálókat is (Nelson és mtsai 2002). Az ízérzékelő sejtek általában nem egy-, hanem többféle receptort tartalmaznak (Gilbertson és mtsai 2001).

Az ízeket a nyelv szemölcsökön található ízlelőbimbókkal érzékeljük. Itt sekunder érzékhámsejtek találhatóak, amelyek az információt 3 agyideg 3 ganglionjában

(ganglion geniculi, ganglion inferius nervi glossopharyngei, ganglion inferius nervi vagi) található pseudounipolaris sejtek perifériás nyúlványainak adják át. A sejtek centralis nyúlványai az NTS-be vetülnek.

Az íz információja az NTS-ből a parabrachialis magba jut (amely magot azonban főemlősökben és így emberben is kikerüli (Scott és Small 2009)). Innen többfelé vetülnek ízt közvetítő rostok: a thalamus VPM magvába, a frontalis lebeny lateralis részébe, a centralis amygdalába, valamint a hypothalamus PVN, VMN és LHA területeire (Saper és mtsai 2002).

Az, hogy az íz alapvetően meghatározza az ételhez való hozzáállást, széles körben ismert: az édes íz nagyfokú vonzalmat, míg a keserű nagyfokú averziót okoz. Ezeket társítjuk is az adott étellel és később a feltételes reflex már ízlelés nélkül is meghatározza viselkedésünket.

2.2.2.2 A mesolimbikus jutalmazó rendszer és a nucleus accumbens

A táplálkozási jutalom rendszere az agytörzsből kiinduló három mesotelecephalicus dopaminerg rendszer közül kettő közreműködésével funkcionál. A substantia nigrából kiinduló mesocorticalis dopaminerg pálya a kérgi területeket (kivéve a limbikus kérget) és részben a NAc-t idegzi be, a VTA-ból eredő mesolimbikus pálya pedig a hippocampust, amygdalát, limbikus kérget és részben a NAc-t innerválja (Palkovits 2018).

A táplálkozási jutalmi viselkedés egyik legfontosabb központja a nucleus accumbens, mely a ventralis striatum része. Három fő részét különböztetjük meg: legrostralisabb vége az úgynevezett „pole” (Zahm és Heimer 1993), ennél caudalisabb fő részét pedig lateralisabb core (mag) és medialisabb shell (héj) régiókra osztották fel (Zaborszky és mtsai 1985). Ez a hagyományos felosztás elsősorban morfológiai és kapcsolati alapon nyugszik (Zahm és Brog 1992).

A NAc neuronjainak többsége közepes méretű perykarionnal rendelkező sűrűn tüskés neuron (medium spiny neuron, MSN) ($15,8 \pm 2,8 \mu\text{m}$ átmérő), többféle alakjuk lehet: hosszúkás, multipoláris, bipoláris. Ezek a neuronok 3-6 primer dendrittel rendelkeznek, általában kevesebbel a shell-ben, mint a core-ban (O'donnell és Grace 1993). A shell-belieknek kevesebb elágazódásuk és kevesebb terminális szegmentjük

van. Egy core-neuron átlagos dendritikus felszíne 80 %-al nagyobb, mint egy medialis shell neuron (Meredith és mtsai 1992). A shell-ben leírtak még egy nagy, tüske nélküli 25 µm átmérőjű sejtípust. Említésre méltó még egy gyengén tüskés sejt a core-ban, ami 16 µm, és egy szintén gyengén tüskés a shell-ben, ami 25 µm átmérőjű (O'donnell és Grace 1993). A MSN-ok jellemzően GABAerg sejtek, tehát gátolják az általuk beidegzett sejtcsoportokat (Castro és mtsai 2015).

A NAc fő afferensei az amygdala, a thalamus egyes magvai, az infralimbicus és insularis kéreg, a NTS és a VTA. Fontosabb efferens célterületei között meg kell említenünk a pallidum ventralét (PV), a LHA-t, és a VTA-t (Groenewegen és mtsai 1999).

2.2.2.3 Különböző neurotranszmitterek szerepe a NAc működésében

A jutalmat először a kábítószer-függőség vonatkozásában értelmezték, de mivel egyes drogok szintén befolyásolták a táplálkozással összefüggő viselkedést, rájöttek, hogy a két rendszer közös útvonalat használ. Ezek alapján jutottak el a felfedezéshez, hogy az opioid rendszerek aktiválása a ventralis striatum területén serkenti a táplálékfelvételt (Majeed és mtsai 1986). Leírták, hogy ezen rendszerek gátlása a táplálkozási jutalmi viselkedés csökkenéséhez vezet (Hayward és mtsai 2002).

Az endogén és exogén opioidok G-protein-kapcsolt receptoraikhoz kötődnek: megkülönböztetünk µ-, κ-, δ- valamint nociceptin vagy orphanin FQ receptort (Feng és mtsai 2012). Ezen receptorok specifikus agonistái és antagonistái segítenek feltérképezni az opioid rendszerek működését. Például DAMGO-t, egy µ-opioid receptor agonistát a VTA-ba, vagy NAc-be juttatva növekszik a táplálékfelvétel, míg ha agonistát juttatunk a VTA-ba és naltrexont, egy µ-opioid receptor antagonistát a NAc-be, gátolni tudjuk ezt a hatást. Ugyanakkor a VTA-ba adott antagonistá önmagában nem gátolja meg teljesen a NAc-be juttatott agonista hatását, tehát a VTA-nak csak befolyásoló szerepe van (Macdonald és mtsai 2003).

A dopamin hasonlóan fontos szerepéhez egy olyan megfigyelés vezetett el, hogy a dopamint szintetizálni nem képes egerek éhen halnak, míg ha a dopamin szintet helyreállítjuk, újra képesek lesznek a táplálékfelvételre (Szczyepka és mtsai 2001). A NAc MSN sejtjei 1-es típusú és/vagy 2-es típusú (D2R) receptort fejeznek ki, a

dopaminerg bemenet a VTA-ból érkezik (Yager és mtsai 2015). Az accumbens mag mély agyi stimulációja a mohó táplálékfelvétel csökkenéséhez vezetett, ezt D2R antagonista gátolta, míg D1R antagonista hatástalan volt (Halpern és mtsai 2013). Ez a D2R-on való hatás elsőbbségét mutatná, azonban más eredmények a D1R-nak is szerepet tulajdonítanak. Ghrelin VTA-ba való injektálása növelte a hedonikus és motivációs táplálékfelvételt, azonban mind D1R-, mind D2R-antagonistákkal blokkolni lehetett ezt a hatást (Skibicka és mtsai 2013).

Az opioid és dopamin rendszerek egymásra is hatnak a NAc-ben. Leírták például, hogy az opioid μ -receptor agonistával kiváltott táplálékfelvétel-növekedés mind D1R-, mind D2R-antagonistával gátolható volt, a δ -receptor agonista hasonló hatását nem lehetett blokkolni ilyen módon (Ragnauth és mtsai 2000).

Jelentős szerepe van a glutamáterg transzmisszióknak is. A NAc core régiójában az N-metil-D-aszparaginsav (NMDA) -receptor gátlás esetén a táplálékfelvétel és következményesen a súlynövekedés is csökken. Másrészt, a szelektív medialis shell-beli NMDA-receptor gátlás enyhe hiperaktivitást okozott, nőtt az állatok táplálékfelvétele és súlya (Maldonado-Irizarry és Kelley 1995).

Az endogén szerotonin befolyásoló szereppel bír a mesolimbicus dopamin-rendszerre: a dorsalis raphe mag elektromos stimulálása frekvenciafüggő módon növelte a dopamin felszabadulását a NAc területén (De Deurwaerdere és mtsai 1998), így feltételezhető, hogy a szerotonin közvetve a nem-homeosztatiszikus működésekre is hat.

2.2.2.4 A jutalom komponensei és a jutalmi szabályozás területi reprezentációja (v. ö.: 4. ábra)

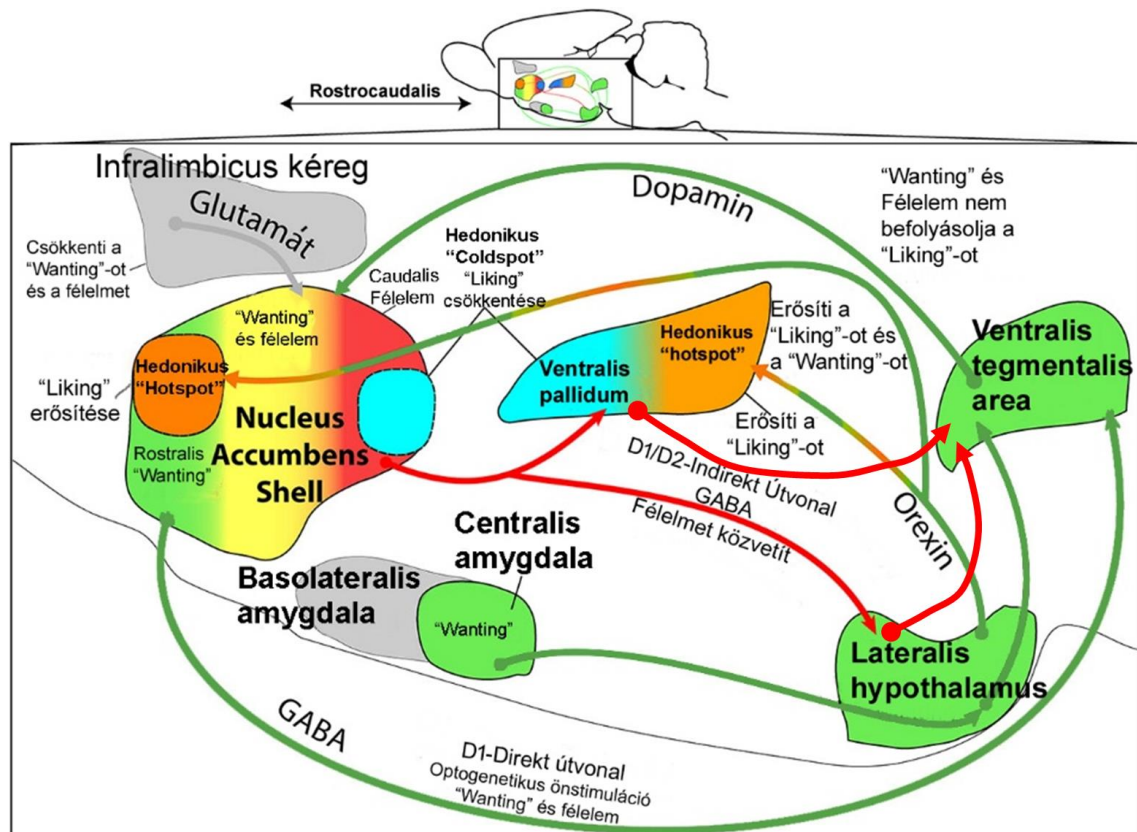
A táplálkozási jutalom három komponense a (1) „wanting”, ami az étvágyra (sóvárgás, motivációs komponens, illetve „ösztönző kiemelés” („incentive saliance”)) utal, a (2) „liking”, ami az ízletességet (aktuális élvezet, esetleg élvezet hiánya, undor) jelenti, valamint a (3) memóriával rögzülő, és e két előzőhöz társuló tanulás (asszociáció, a múltbeli élmények alapján jövőre vonatkozó jóvendülés) (Berridge 1996, Berridge és Kringelbach 2008). Ez a fiziológiai jutalom felfogás különbözik a köznapi jutalomfelfogástól, amelyet általában a tudatosuló jutalom, illetve „jutalomérzés” esetén értünk. Az étvágnak, az ízletességnek és a tanulásnak is van tudatosuló része, de van

nem tudatosuló része is, amelyek tudatosulás nélkül is részben az előbbiekkal azonos struktúrákat vesznek igénybe (Berridge és Kringelbach 2008). Fontos kérdés, hogy hogyan mérjük tehát a „wanting” és a „liking” folyamatokat, főleg, ha nem tudatosulnak? A téma szaktekintélye, Kent C. Berridge amellett érvel, hogy a hagyományosabb jutalommérő technikák, mint az elfogyasztott mennyiség, preferencia, de leginkább az operáns feladatok teljesítésének analízise elsősorban a „wanting”-ot méri (Berridge 1996). A „liking” ezzel szemben az ízre való érzéki választ, válaszkészséget jelöli. Ezt nem a mozgásokkal végrehajtott viselkedés jelzi, hanem inkább a tápfogyasztás körül mutatott finommotorika. Ahogy Grill és Norgren (Grill és Norgren 1978) leírják, az édes íz előről látható ritmikus szájmozgásokat és nyelv-előrenyújtásokat, laterális nyelvkinnyújtást követő ajkon történő nyelv-visszahúzást, és elnyújtott lefetyelést okoz patkányokban. Ezzel szemben a keserű íz, amely averziót okoz, ásítást, ágaskodást, fejrázást, manccsal való mosakodást, mancsrázást vált ki (Grill és Norgren 1978). John Davis és G. P. Smith viszont a folyékony táplálék fogyasztása közben mutatott nyelvmozgások finommotorikáját elemezték ki. Rájöttek, hogy a nyelvcsapások kisebb egységeket, burst-öket alkotnak, ezek pedig klasztereket (utóbbiak minimum 0,5 másodperccel egymástól elválasztott időbeli egységeket jelentenek). Kimutatták, hogy a fogyasztás első három percében tapasztalt nyelvcsapás-frekvencia jelzi az ízletességet és az ízérzet pozitív visszacsatoló erejét az adott állatnál. Hasonló jelentése van a burst és a klaszter méretének, amelyek a nyelvcsapások számában kifejezett ivási egységek. A frekvencia korai és késői csökkenése, valamint a burst-ök és a klaszterek száma pedig a kondicionált és nem-kondicionált negatív visszacsatolások különböző aspektusai eredményeként alakulnak ki (Davis és Smith 1992, Smith 2001).

Három olyan területet különítettek el az agyon belül, amely képes arra, hogy felerősítse az íz által okozott hedonikus, „liking” hatást. Ezek: a NAc medialis shell részének rostradorsalis negyede, a PV caudalis része és a PBr (Castro és Berridge 2014). Ezért ezeket „liking” forró pontoknak („hotspot”) is nevezik. Velük szemben állnak az averzív viselkedést felerősítő területek, amelyek csökkentik a „liking”-ot (rostralis PV, illetve egy kisebb terület a caudalis medial shellben) (Castro és mtsai 2015). A „wanting” elsősorban a már említett két dopaminerg rendszer (mesolimbikus és mesocorticalis) működéséhez kapcsolódik (Berridge 1996). A táplálékfelvételre

vonatkozó „wanting” a NAc-en belül a medialis shellben, annak rostralis részén, valamint az egész core területén reprezentálódik, (Pecina és Berridge 2013), ezen kívül a a VTA-ban, az LHA-ban és a centralis amygalában. A NAc shell területének a caudalis végén ezzel szemben félelem / védekezés azonosítható / erősíthető fel (Castro és mtsai 2015).

A DIR-t tartalmazó sejtek axonjai vesznek részt a közvetlenül a VTA-ba vetítő „direkt útvonal” alkotásában, míg a PV és a LHA közvetítésével a VTA felé haladó „indirekt útvonal” sejtei DIR-t és/vagy D2R-t hordoznak.



4. ábra. A jutalmi rendszerek legfontosabb útvonalai a patkánygyagon belül. (Castro és mtsai 2015) alapján, módosítva.

Az ún. „direkt útvonal” a nucleus accumbens 1-es típusú dopaminreceptort tartalmazó sejteiből egyenesen a ventralis tegmentalis areába megy, míg az 1-es és/vagy 2-es típusú dopaminreceptort hordozó sejtek az „indirekt útvonalon” a pallidum ventralén és a lateralis hypothalamicus areán keresztül érik el a ventralis tegmentalis areát.

Rövidítések: D1: dopamin 1-es receptort hordozó sejtek; D2: dopamin 2-es típusú receptort hordozó sejtek

A jutalmi rendszer efferenciája szempontjából fontos a LHA szerepe, amelyet a NAc GABAerg rostjai érnek el. A tápfelvétel leállítása köthető ehhez, a medialis shell-ből induló útvonalhoz (O'Connor és mtsai 2015, Prado és mtsai 2016). Ebben a funkcióban D1R-t expresszáló MSN-ek vesznek részt, amelyek aktivációja leállítja a tápfelvételt egerekben (Prado és mtsai 2016). Ezek a D1R-pozitív neuronok a lateralis hypothalamus rostralis részét érik el, azon belül a korábban már említett orexin- és MCH-negatív, GABAerg idegsejteket (O'Connor és mtsai 2015, Sano és Yokoi 2007). Ezt a területet is a jutalom befolyásolta tápfelvételi központok között tartják számon (Saper és mtsai 2002).

2.2.3 Kapcsolatok a homeosztatis és a nem-homeosztatis szabályozó rendszerek között

Az eddigiekből is látszik, hogy a „homeosztatis” és a „jutalmi” tápfelvételi rendszerek nem különülnek el élesen. Bemeneti alapon, illetve a részt vevő agyterületek szerint elkülöníthető a kettő, de a valóságban mind a bemenet, mind a kimenet szintjén egymást befolyásolva alakítják az állat viselkedési reakcióit. Az összefonódást pár jellemző példán mutatnám be!

Már a NTS szintje közös, hiszen mind az ízérzésért, mind az általános viscerosensoros érzékelésért felel. A viscerosensoros információ eljut a thalamuson keresztül az insulába, ahonnan a NAc-t is eléri (Saper és mtsai 2002). MCH 1-es típusú receptor is található a NAc shell régió sejtjein, a LHA MCH-tartalmú idegsejtjei a NAc-ben hatva is orexigén hatásúak (Georgescu és mtsai 2005). Fordított irányban, a NAc GABA-erg projekcióval éri el a LHA-t, illetve a VP-ot is (Saper és mtsai 2002). Az MCH-val ellentétben az orexint expresszáló sejtek nem vetítenek a NAc-be, viszont dynorphinnal együtt expresszálódva beidegzik a VTA dopaminerg sejtjeit, és itt maga az orexin a dynorphin „jutalom-ellenes” hatását gátolja (Muschamp és mtsai 2014).

A leptinről bebizonyították, hogy a jutalmi feldolgozást is befolyásolja az agyban. Icv beadása lecsökkentette a LHA serkentésével okozott jutalmi hatást (Fulton és mtsai 2000). A leptin csökkenti, míg a ghrelin növeli VTA-beli dopaminerg neuronjainak aktivitását, befolyásolva ezzel a mesolimbikus rendszer működését (Van Zessen és mtsai 2012).

2.2.4 A jutalmi szabályozás zavarának esetleges szerepe az elhízásban

A táplálkozási jutalmi mechanizmusokban bekövetkező zavarok a túlevésnek és a következményes elhízásnak alapvetői okai között vannak számon tartva (Stice, Spoor, Bohon, Veldhuizen, és mtsai 2008). Az ebben az esetben a jutalmi szabályozás zavarához vezető pontos folyamat még nem tisztázott, de mind az alacsony, mind a magas születési súly kockázati tényezőként jön szóba (Gonzalez-Bulnes és Ovilo 2012, Perala és mtsai 2012). Azok a patkányok, amelyek prenatalisan teljes táp- vagy csak fehérjemegvonásnak lettek kitéve, hyperphagiát mutatnak (Desai és mtsai 2005, Vickers és mtsai 2000). Ezenkívül esetükben a jutalmi tápfelvétel is megváltozik (Laureano és mtsai 2016, Tonkiss és mtsai 1990). A háttérben jutalmi „hiányt” valószínűsítene, ami azt jelenti, hogy az étkezés kisebb mértékben vált ki jutalmat és tovább kell enni a megfelelő jutalmi szint eléréséhez. Ezt a mechanizmust striatalis D2R leszabályozáshoz és alulműködéshez szokták kötni (Dalle Molle és mtsai 2015, Stice, Spoor, Bohon, Small 2008, Wang G. J. és mtsai 2001). Más adatok szerint ugyanakkor a D2R leszabályozása nem lehet a túlevés elsődleges oka, hanem inkább a túlevés, a megnövekedett testtömegindex és a magasabb leptinszintek együttes eredménye (Billea és mtsai 2012, Johnson és Kenny 2010, Wang G. J. és mtsai 2001).

2.3 A cukorháztartás központi szabályozása és zavara

2.3.1 A cukorháztartás központi idegrendszeri szabályozása

Claude Bernard híres kísérlete óta – amikor a negyedik agykamra fenekének sértésével a vércukorszint megváltozását tudta elérni (Bernard 1855) – a központi idegrendszer vércukorszintet befolyásoló hatását sokan kutatták. A homeosztatisz szabályozó rendszerekről írva már említettem, hogy a glükózérzékeny (glükóz-gátolt és glükóz-aktivált) neuronok a tápfelvételre mekkora hatást gyakorolnak. Természetesen ugyanezen neuronok részt vesznek a cukorháztartás szabályozásában is. Bár az agy számos területén megtalálhatóak, az eddigi adatok szerint a cukorháztartást leginkább a VMN és az ARC befolyásolja (Routh 2010). Például a VMN-ba glükózt juttatva a hypoglycaemiára bekövetkező glukagon- és katekolamin emelkedést gátolni lehetett

(Borg és mtsai 1997). Az icv alkalmazott glükóz csökkenti a perifériás inzulin- és cukorszinteket (Lam, Gutierrez-Juarez, és mtsai 2005). A máj endogén glükóztermelését gátolja a hypothalamusban helyileg alkalmazott glükóz, ebben a K_{ATP} –csatornának, illetve ezen csatorna Kir6.2 nevű alegységének a szerepét bizonyították (Lam, Gutierrez-Juarez, és mtsai 2005, Parton és mtsai 2007).

A K_{ATP} -csatorna a glükóz-aktiválta neuronok közös jellemzője (Dunn-Meynell és mtsai 1998). A csatorna aktiválása és nyitása hyperpolarizációt, gátlása és ezzel zárása a sejt depolarizációját okozza. Természetesen nem csak a glükóz képes hatni a csatornára és ezzel a sejtekre. Ezekben a sejtekben az inzulin is aktiválja például a csatornát, amely hatást a csatorna különböző gátlószereivel gátolni lehetett (Spanswick és mtsai 2000). Az icv bejuttatott inzulin az ARC AgRP-sejtjein keresztül csökkenti a máj glükóztermelését (Könner és mtsai 2007). Inzulin receptor antitesttel vagy az inzulin jelpályájában részvevő PI3K helyi gátlásával ezt a csökkenést gátolni lehetett. Az icv inzulin általi glükóztermelés-csökkenés mértéke közel 40 %-ot ért el, utalva a centrális inzulinhatásnak az endogén glükóztermelés visszafogásában játszott óriási szerepére (Obici, Zhang, és mtsai 2002).

Az endogén glükóztermelést a zsírsavak is befolyásolják, de érdekes módon nem mindegyik. Például a hosszú szénláncú olajsav icv adva a tápfelvételt, a glükoneogenezist és a máj glükóztermelését is csökkenti, míg a rövid szénláncú zsírsavaknak nem volt ilyen hatása (Obici, Feng, és mtsai 2002). Ez a hatás is K_{ATP} -csatornán keresztül valósul meg (Lam, Poci, és mtsai 2005).

Az előzőekben szintén emlegetett leptin is aktiválja a K_{ATP} -csatornát ARC és VMN sejteken, hatására a sejt hiperpolarizálódik (Spanswick és mtsai 1997). A leptin serkenti a glükoneogenezist és a glükóz-6-foszfátáz expressziót a melanocortin rendszeren keresztül, ettől a rendszertől független módon viszont gátolja a glikogenolízist és az összesített endogén glükóztermelést (Gutierrez-Juarez és mtsai 2004). A leptinhiányos egerekben 2TDM fejlődik ki (Zhang Y. és mtsai 1994).

A centrális hatásokban az NPY-pozitív neuronok mellett POMC-neuronok is részt vesznek. Van egy POMC neuron alpopuláció, amely a nucleus dorsalis nervi vagi (DMX) gátlása révén a nervus vagus endogén glükóztermelést gátló hatását blokkolja és növekszik a máj glükóztermelése (Kwon és mtsai 2020).

Az eddig leírt megfigyelésekben közös, hogy a hypothalamusból a máj glükózháztartását befolyásoló jelet a bolygóideg közvetíti (Kwon és mtsai 2020, Lam, Pocai, és mtsai 2005, Pocai és mtsai 2005). Szintén közösen jellemző a rendszerre, hogy a glükóznak, inzulinnak, leptinnek és a hosszú szénláncú zsírsavaknak a hypothalamicus K_{ATP} -csatornára, illetve a cukorháztartásra kifejtett hatásait a zsírdús táp, illetve az elhízás csökkenti (Morgan és mtsai 2004, Parton és mtsai 2007, Spanswick és mtsai 1997, Spanswick és mtsai 2000).

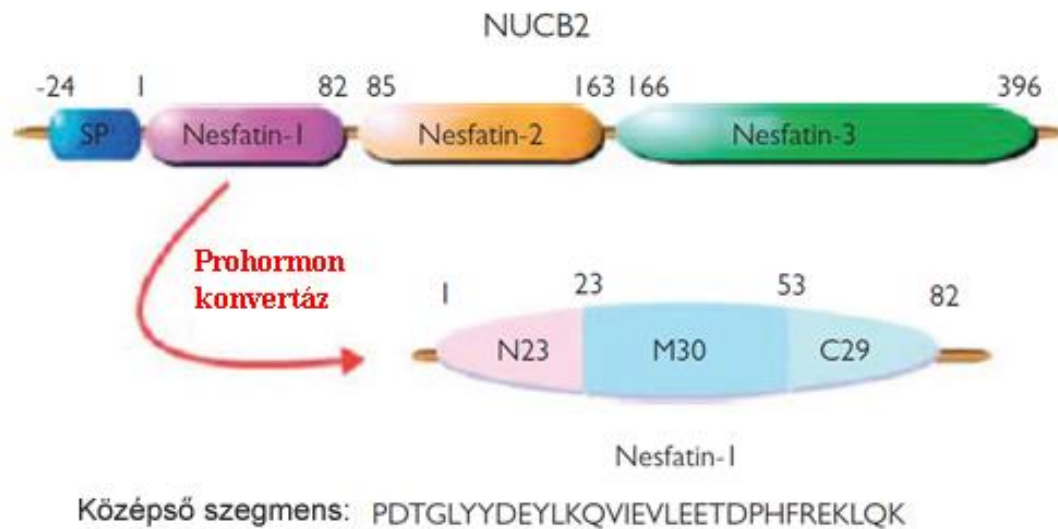
2.3.1.1 A nem elhízottak 2TDM-a

A centrális glükózháztartás szabályozásának fontosságát aláhúzza a 2TDM előfordulásának mind gyakoribbá válása. Gyakorlatilag ma már majdnem minden tizedik európai cukorbeteg és az összes halálozás 8,5 %-a valamilyen módon összefügg a cukorbetegséggel és annak komplikációival (Elek és Bíró 2021). Sajnos, szegényebb és tanulatlanabb emberek körében magasabb az előfordulása (Elek és Bíró 2021). Jelentőségét aláhúzza az is, hogy a közelmúlt COVID-19 járványában a fertőzöttek közül a cukorbetegek közel kétszer akkora valószínűséggel kerültek súlyos állapotba, mint a cukorbetegségben nem szenvedők (Huang és mtsai 2020). Bár az elhízás a 2TDM kialakulásában fő kockázati tényező, nem minden 2TDM-os beteg elhízott, Európában a 2TDM betegek mintegy 20 %-a mentes az elhízástól, míg Ázsiában ez az arány magasabb (Vaag és Lund 2007). Említésre méltó még, hogy a betegség kialakulása nem függ a zsírszöveti hormon, a leptin szintjétől (Wang B. és mtsai 2014). A nem-elhízottak körében kialakuló 2TDM kóroktana és kórélettana még nem kellőképpen tisztázott, azt azonban már kimutatták, hogy az alacsony születési súllyal társuló IUGR (lásd 2.1 fejezet) okozhat ilyen állapotot (Vaag és Lund 2007).

2.4 A nesfatin-1 neuropeptid

A nesfatin1 a nucleobindin-2 (Nucb2) prohormon 82 aminosav hosszú N-terminális fragmentje (Oh-I és mtsai 2006) (5. ábra). A Nucb2 prohormonból prohormonkonvertáz választja le, a folyamat során a nesfatin-2 és a nesfatin-3 is felszabadulnak. Először 2006-ban írták le, egy olyan neuropeptidként, amely icv alkalmazva anorexigén

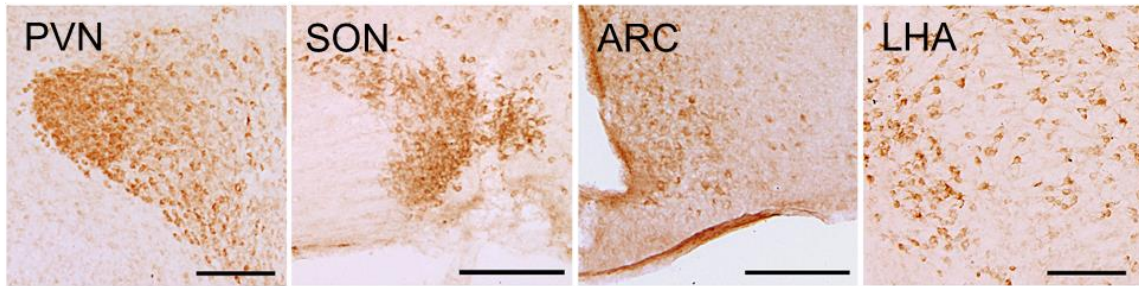
és hosszú távon súlycsökkentő hatással bír (Oh-I és mtsai 2006). Ebben az első kutatásban vizsgálták, hogy a nesfatin-2-nek, illetve a nesfatin-3-nak van-e hasonló hatása, de esetükben sem akkor, sem azóta nem tudtak biológiai hatást kimutatni. Fontos megjegyezni, hogy az első kutatásban önmagában a Nucb2 fehérje is súlycsökkentő hatással bírt, valamint, hogy a nesfatin-1 antitestek felismerik a Nucb2-t is. Ezért a kettő hatását egyértelműen szétválasztani még nem lehet.



5. ábra. A Nucb2 szerkezete és a három származéka (Tekin és mtsai 2019) alapján.

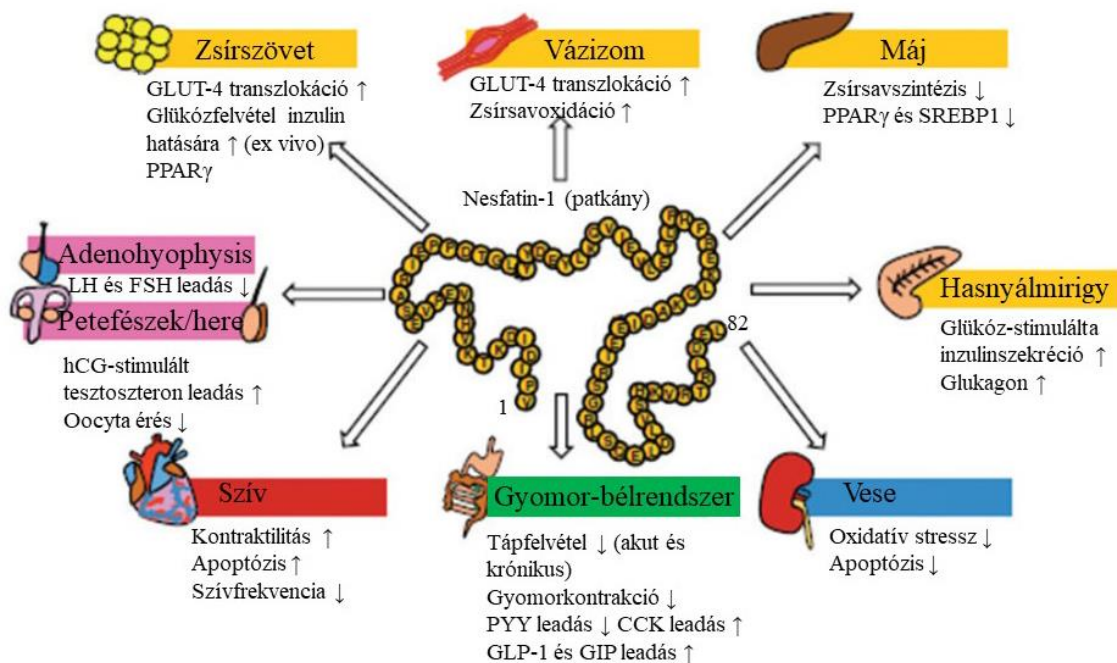
Jelmagyarázat: Nucb2: nucleobindin-2; SP: szignálpeptid;

A nesfatin-1 a hypothalamusban a SON, PVN, ARC és az LHA területén expresszálódik (Brailoiu és mtsai 2007, Foo és mtsai 2008) (6. ábra.). Ezek a területek mind szerepet játszanak az energiaháztartás szabályozásában (Maejima és mtsai 2018, Schwartz és mtsai 2000), ezért is merült fel először a nesfatin-1 lehetséges szerepe a táplálékfelvétel irányításában. Azóta azonban felfedezték, hogy számos más szervben is előfordul, többek között a szívben, a hasnyálmirigyben, a zsírszövetben, az adenohypophysisben, a gyomor-bélrendszerben és a herében is (Stengel 2015). A szervekben leírt fontosabb hatásokról mellékelem a 7. ábrát.



6. ábra. A nesfatin-1 expressziója a hypothalamus paraventricularis (PVN), supraopticus (SON), arcuatus (ARC) magjaiban és a lateralis hypothalamicus területen (LHA). A szerző saját ábrája. Immunhisztokémia. Skála: 300 μ m.

A nesfatin receptorát eddig még nem azonosították (Schalla és mtsai 2020). Autoradiográfiás módszerekkel kimutatták, hogy a szervezetben számos helyre képes kötődni, beleértve az agy különböző területeit, a gyomor-bélrendszer elemeit, a mellékvesét, herét, zsírszövetet, vázizmot, szívet, tüdőt, májat és vesét (Prinz és mtsai 2016). Növeli a Ca^{++} -beáramlást a sejtbe, (Brailoiu és mtsai 2007, Iwasaki és mtsai 2009), nem foszfolipáz A és nem is protein kináz A részvételével (Nakata és mtsai 2011). Mindezek miatt G-protein-kapcsolt receptort és protein kináz C részvételét tételezik fel a hatások közvetítésében.



7. ábra. A nesfatin-1 fő hatásai a periférián (Tekin és mtsai 2019) alapján.

Rövidítések: CCK: cholecystokinin; FSH: folliculus stimuláló hormon; GLP-1: glukagon-szerű peptid-1; GLUT4: 4-es típusú glükóztranszporter; hCG: humán choriongonadotropin; LH: luteinizáló hormon; PPAR γ : peroxiszóma-proliferátor aktiválta receptor-gamma; PYY: YY peptid; SREBP1: szterolszabályozó elemet kötő fehérje 1.

A nesfatin-1 szerepét kiterjedt expressziója és hatásai alapján már számos betegségben felvetették. Mi jelen témánk miatt a metabolikus betegségekkel való kapcsolatával foglalkozunk. Elhízott gyermekekben egymásnak ellentmondó eredményekről számol be az irodalom: volt, hogy a szérumban a nesfatin-1 szintjének csökkenését tapasztalták (De Dios és mtsai 2019, Dokumacioglu és mtsai 2020), míg volt, hogy emelkedett nesfatin-1 szintet mértek elhízottakban (Güneş és mtsai 2020, Yin és mtsai 2020). Felnőttekben a nesfatin-1-szint és a testtömegindex negatív asszociációját mutatják a mérések (Mirakhor Samani és mtsai 2019, Tsuchiya és mtsai 2010). Vizsgálták a szérumszinteket metabolikus szindróma és pre-diabetikus állapotok tekintetében is. Mindkét esetben úgy tűnik, csökken a nesfatin-1 szintje (Al-Qudah és mtsai 2018, Algul és mtsai 2016).

A kísérletes kutatás is számos további bizonyítékkal szolgál. Az anorexigén hatást azóta mások is igazolták (Könczöl és mtsai 2012, Shimizu és mtsai 2009), illetve azt, hogy ez leptinfüggetlen módon valósul meg (Shimizu és mtsai 2009). A nesfatin-1 PVN-beli gátlásával a tápfelvétel növekedését figyelték meg (Sedbazar és mtsai 2013). Gastrectomián átesett elhízott patkányok súlycsökkenését gátolta és tápfelvételét szintén növelte a hypothalamusbeli antisense morfolino-oligonukleotiddal történő Nucb2 gátlás (Zhang T. és mtsai 2019). Hasonló technikával, hypothalamicus nesfatin-1 transzlációt akadályozó shRNS-sel történt hypothalamicus nesfatin-1 gátlás csökkentette a tápfelvételt normális tömegű állatban is (Wu és mtsai 2014). A Nucb2^{-/-} génkiütött egérnek normális tápfelvétele és súlygyarapodása van, ami egy ilyen modellnél a kompenzációs mechanizmusok miatt érthető (Ravussin és mtsai 2018). A nesfatin valószínűleg α -MSH-függő módon közvetve a PVN oxitocin-pozitív sejtjein keresztül éri el az anorexigén hatást (Yosten és Samson 2010).

Míg a nesfatin-1 tápfelvétel-szabályozását az irodalom elsősorban a hypothalamus felől közelíti meg, a cukorháztartás szabályozásának tekintetében nagyon értékes eredmények vannak a perifériás szervek vonatkozásában is. Kimutatták, hogy a nesfatin-1 az inzulin hatásait erősíti: növeli a glükózaktiválta inzulin-leadást in vitro, elősegíti a vázizomban és a zsírszövetben az inzulin-aktiválta Akt-foszforilációt, elősegíti a 4-es típusú glükóztranszporter (GLUT-4) membránba helyeződését és növeli a vázizomban a foszforilált 5' adenzin monofoszfát-aktiválta protein kináz (p-AMPK) és acetyl-koenzim A karboxiláz expresszióját ezzel csökkentve a (streptozotocin-indukált) 2TDM-os patkány vércukorszintjét és inzulinrezisztenciáját (Schalla és mtsai 2020).

A nesfatin-1 a cukorháztartás központi szabályozásában is szerepet játszik. Ezt már az is valószínűsítette, hogy inzulin okozta hypoglicaemia aktiválta a nesfatin-1-expresszáló neuronokat az ARC, PVN, LHA, DMX és az NTS területén patkányban (Bonnet és mtsai 2013). Ezen kívül a lateralis parabrachialis magba injektálva a nesfatin-1 a tápfelvétel gátlása mellett a mag glükóz-gátolt neuronjainak nagy részét gátolta (Yuan és mtsai 2017).

A máj és a hasnyálmirigy autonóm idegrendszeri kontrollt a hypothalamus területéről elsősorban az ARC, a PVN és a LHA területéről kap (Pozo és Claret 2018, Sandoval és

mtsai 2009, Uyama és mtsai 2004), amelyek sűrűn tartalmaznak nesfatin-1-pozitív idegsejteket.

A hypothalamicus nesfatin-1 rendszer a perifériás vércukorszintet is befolyásolja. Icv bejuttatása csökkenti a vércukorszintet, mégpedig az izom cukorfelvételének fokozása, az inzulinreceptor-jelátvitel elősegítése, a glükoneogenesis csökkentése és a máj foszfoenolpiruvát-karboxikináz gátlása révén (Yang és mtsai 2012). A korábban említett, a hypothalamicus nesfatin-1 transzlációját gátló shRNS bejuttatása viszont növeli a máj glükóztermelését megnövekedett glükóz-6-foszfát- és foszfoenolpiruvát-karboxikináz-expressziója révén, valamint csökkenti a perifériás szervek glükózfelvételét az inzulin jelátviteli pályájában részt vevő faktorok gátlásával (Wu és mtsai 2014). A máj és más perifériás szervek inzulinérzékenysége nőtt nesfatin-1 icv injekciójára euglycaemiás-hyperinzulinaemiás clamp kísérlet során (Guo és mtsai 2013).

Az eddig összegyűlt eredmények alapján arra lehet következtetni, hogy a Nucleus2/nesfatin-1 az általuk befolyásolt szabályozó folyamatokkal együtt ígéretes célpontja lehet az elhízás, a metabolikus szindróma és a 2TDM kezelésének (Nakata és Yada 2013).

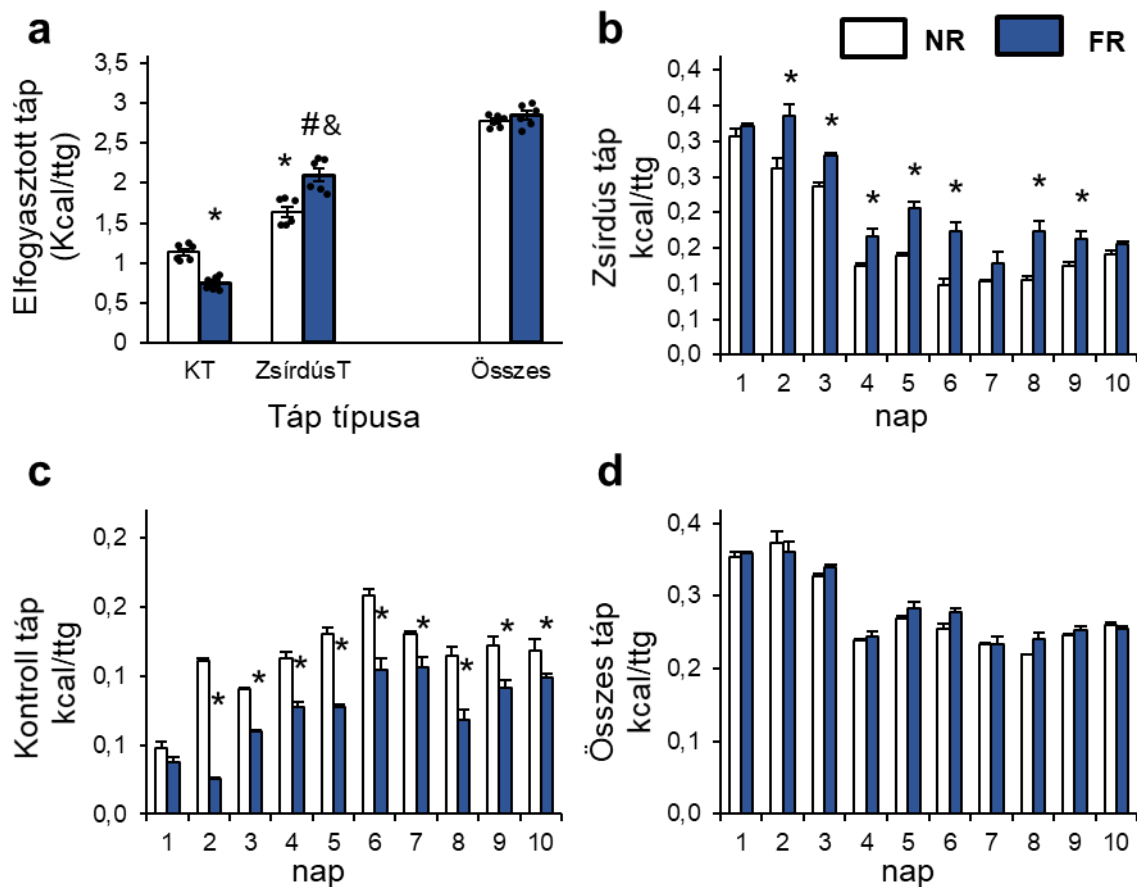
2.5 Laboratóriumunknak a témában publikált egyéb eredményei

Laboratóriumunknak a témához szorosan kapcsolódó olyan eredményeit összegezném, amelyek nem elsősorban az én hozzájárulásommal készültek. Ezek természetesen nem tartoznak bele a dolgozat érdemi részébe, de a bevezetés zárásaként röviden ismertetem őket, hiszen a kísérleti állatmodell jellemzéséhez hozzátartoznak (Durst és mtsai 2022).

Kutatócsoportunk megvizsgálta az IUGR modell keretében tenyésztett patkányok kalóriafelvételét és zsírpreferenciáját. Az állatok 10 napig „normál” és + 50 %-ban zsírral dúsított táp közül választhattak, amelyek fogyasztását mértük. A catch-up growth periódus alatt, 6 hetesen végzett mérés azt mutatta, hogy mindkét csoport tagjai, vagyis az intrauterin fehérjeredukált (FR), illetve a kontroll, nem intrauterin fehérjeredukált (NR) állatok a normál tápnál szívesebben fogyasztották a zsírdús tápot, a preferencia

mértékében nem volt köztük különbség: körülbelül ugyanolyan mértékben fogyasztottak mind a két típusból.

A felnőttkori, 12 hetes korban elvégzett méréskor mindkét csoportban megmaradt a zsírdús táp preferenciája. Ekkor viszont az NR csoport állatai többet fogyasztottak normál tápból, az FR csoport tagjai viszont többet zsírdús tápból. A kettő kiegyenlítette egymást, tehát az összes kalóriefelvételük nem különbözött egymástól. Érdekes volt azt látni, hogy a 10 napos tesztidőszak első harmadában mindkét csoport jóval többet fogyasztott a zsírdús tápból, és kevesebbet a normál tápból. Miután lecsengett az „újdonság ereje”, már nem részesítették ennyire túlzott mértékben előnyben a zsíros tápot, viszont a csoportok közötti különbség mind a zsírdús, mind a normál táp esetében a tesztidőszak majdnem minden napján külön-külön is látható volt. Megállapítottuk tehát, hogy ebben az esetben az FR állatoknál jelentkezett zsírpreferencia még nem jelent általános hyperphagiát is, az állat a normál táp kisebb mértékben való fogyasztásával kompenzál. Tehát az energiaháztartás egyensúlya nem borult fel az FR csoportban, csak más arányban preferálták a két táptípust (8. ábra)



8. ábra. Testtömegre viszonyított kalóriafogyasztás nem intrauterin fehérjeredukált (NR) és intrauterin fehérjeredukált (FR) állatokban a 12. héten. (Durst és mtsai 2022)

a. 10 nap során történő összes kalóriabevitel kontroll (KT) és zsirdús (ZsirdúsT) tápból. Kétutas ANOVA: fenotípus és táp interakció: $F_{(1,20)} = 49,01$, $p < 0,001$. Tukey-féle post-hoc teszt, * $p < 0,001$ vs. NR-KT, # $p < 0,001$ vs. FR-KT, & $p < 0,001$ vs. NR-ZsirdúsT.

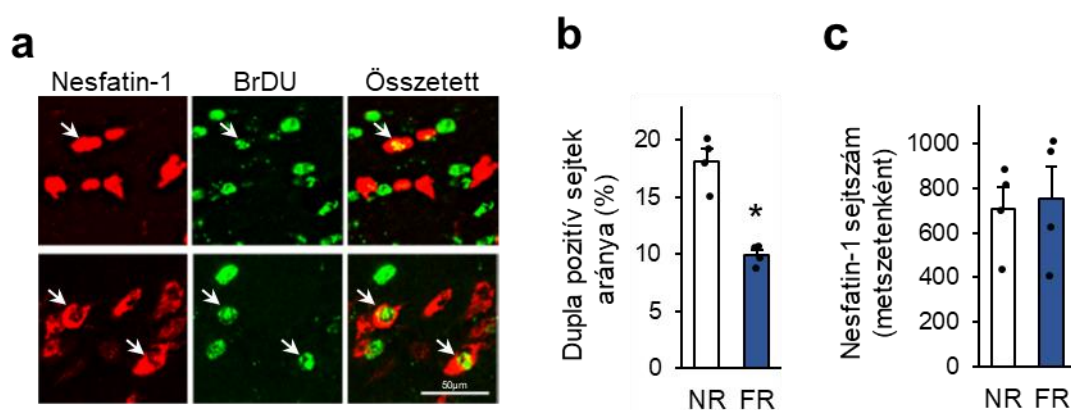
b–d. Relatív napi kalóriabevitel a zsírpreferencia tesztek alatt a 12. héten

b. Zsirdús táp. Kétutas ismételt méréses ANOVA. Az idő hatása: $F_{(9,90)} = 286,9$, $p < 0,001$, fenotípus hatása: $F_{(1,90)} = 19,28$, $p < 0,001$, fenotípus és idő interakció: $F_{(9,90)} = 8,48$, $p < 0,001$.

c. Kétutas ismételt méréses ANOVA, az idő hatása: $F_{(9,90)} = 107,81$, $p < 0,001$, a fenotípus hatása: $F_{(9,90)} = 51,06$, $p < 0,001$, fenotípus és idő interakció: $F_{(9,90)} = 20,03$, $p < 0,001$.

d. NT + ZsirdúsT összegzett kalóriaként. Kétutas ismételt méréses ANOVA, az idő hatása: $F_{(9,90)} = 168,83$, $p < 0,001$. Tukey-post-hoc tesztek. NR vs. FR egy napon belül * $p < 0,01$. Átlag \pm átlag szórása, $n = 6$. Rövidítések: FR: intrauterin fehérjeredukált; kcal: kilokalória; KT: kontroll táp; NR: nem intrauterin fehérjeredukált; ttg: testtömeggramm; zsirdúsT: zsirdús táp.

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy az ún. „magzati programozás” hogyan befolyásolja a hypothalamikus nesfatin-1-pozitív sejtek fejlődését. A magzati fejlődés 13. napján az anyaállatba brómdezoxiuridint (BrDU) injektáltunk intraperitonealisan. Ezen a napon jelentős számú végleges hypothalamus-sejt képződik (Markakis 2002). Az ekkor beépülő BrDU később kimutatva jelzi az ezen a napon képződő neuronokat. Kiderült, hogy a 13. napon képződő sejtek kisebb arányban mutatnak nesfatin-1 pozitivitást felnőtt korban az FR állatokban, mint a kontrollokban. Azonban a nesfatin-1 sejtek teljes mennyisége nem tért el a két csoportban, tehát bár az FR állatok nesfatin-pozitív sejtjeinek képződése zavart szenvedett, később a kontrollokhoz képest, később behozták ezt a lemaradást (9. ábra).



9. ábra. A 13. intrauterin napon keletkezett hypothalamikus nesfatin-1-pozitív sejtek arányának meghatározása felnőtt, 12 hetes állatokban brómdezoxiuridin (BrDU) segítségével. (Durst és mtsai 2022)

a. Konfokális mikroszkóppal rögzített, NR állatokból származó képek képek mutatják a nesfatin-1-, a BrDU- és a duplán pozitív sejteket. Illusztráció. b. A 13. napon keletkezett nesfatin-1-pozitív sejtek és az összes nesfatin-1-pozitív sejt arányát mutatja az ábra. Kétutas ismételt mérés ANOVA (állatonként két metszet) fenotípus hatása: $F_{(1,2)} = 71,83$, $*p = 0,014$, $n = 2$ állat és 4 metszet/csoport. c. Az összes hypothalamikus nesfatin-1 sejttség nem különbözött a csoportok között. $n = 4$.

Rövidítések: FR: intrauterin fehérjeredukált; NR: nem intrauterin fehérjeredukált.

Enzimhez kötött immunszorbiens próba (ELISA) segítségével újszülött és felnőtt állatokon is megmértük a vérplazma nesfatin-1 szintjét, ezek a mérések egyik életkorban sem mutattak különbséget a csoportok között (Durst és mtsai 2022).

3. Célkitűzések

Feltételeztük, hogy az intrauterin korban történő fehérje-alultáplálás a nucleus accumbens szabályozó köreiből hosszútávú változásokat okoz, és a jutalmi táplálékfelvétel leállításában részt vevő mechanizmusokat befolyásolja.

1. Egy olyan, működő intrauterin fehérjeredukált modell felállítása, amely catch-up growth jelenséget mutat
2. Az intrauterin alultáplált modellállatokon a jutalmi tápfelvétel és a tápfelvétel mozgásmintázatának mérése, karakterizálása
3. A jutalmi tápfelvétel közben a nucleus accumbens és a lateralis hypothalamus területén aktiválódó idegsejtek analízise
4. A nucleus accumbens dopaminreceptor expressziójának leírása
5. A jutalmi tápfelvétel közben aktiválódó accumbens sejtek dopaminreceptor-expressziójának vizsgálata
6. A jutalmi tápfelvétel befolyásolása D1R aktiválásával az accumbens mag medialis shell régiójában

Feltételeztük, hogy a rendszernek szerepe van az IUGR talaján létrejövő nem-elhízott 2TDM kialakulásában a hypothalamicus cukorháztartás-szabályozás befolyásolása révén. Emellett feltettük a kérdést, hogy az IUGR fenotípusban a Nucleus accumbens/nesfatin-1 rendszer részvételével zajló homeosztatisz táplálékfelvételi mechanizmusok megváltoznak-e.

7. Az intrauterin fehérjeredukált (FR) állatok cukorháztartásának vizsgálata
8. Az intrauterin fehérjeredukált állatok hypothalamicus nesfatin-expressziójának vizsgálata
9. A nesfatin-1-nek NR és FR állatok táp- és vízfelvételére, valamint éheztetés következtében megjelenő hypothalamicus sejtaktivációjára való vizsgálata
10. A nesfatin-1, illetve a nesfatin-1-rezisztencia lehetséges hatásának feltárása a kísérleti állatok cukorháztartására

4. Módszerek

4.1 Állatok

A kísérletekben patkányokkal (*Rattus norvegicus*) (Wistar, Toxi-Coop Toxicological Research Center Zrt, Dunakeszi, Magyarország) dolgoztunk. Standard laboratóriumi körülmények között voltak tartva, $20,5 \pm 1,5$ °C között, 12 h sötét és 12 h világos fényváltásban. Fenntartó táppal (Altromin Specialfutter GmbH, Lage, Németország, katalógusszám: #1324) etettük és csapvízzel itattuk őket (a kivételeket később részletezem). Altatás esetén (műtétek és transcárdialis perfúziók) ketamin (75 mg/ttkg) (Richter Gedeon Nyrt, Budapest, Hungary) és xylasin (15 mg/ttkg) (CP-Pharma, Burgdorf, Germany) elegyét alkalmaztuk intramuscularisan. A kísérletek megtervezésénél és elvégzésénél az Európai Parlament és Tanács 86/609/EEC/2 és 2010/63/EU számú irányelveit vettük figyelembe. A kísérleteket a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága engedélyezte (engedélyszámok: XIV-I-001/2262-4/2012; PE/EA/1563-7/2017; PE/EA/1122-2-7/2020).

4.2 Intrauterin fehérjeredukált modell

Az intrauterin fehérjeredukált állatok tenyésztését a párzástól mi felügyeltük. Egy-egy hím egy-egy nőténnyel egy éjszaka hosszan volt közös ketrecben. A párosodás megtörténtét hüvelykenet vizsgálatával ellenőriztük. Ondóváladék jelenléte esetén az adott napot a vemhesség első napjaként azonosítottuk. Minden esetben, amikor vemhességet indítottunk, az egyedül tartott, bepárazott anyákat két részre osztottuk. Egyik részük fehérjeredukált (jutalmi tápfelvétel vizsgálatára irányuló kísérletek esetében: „Protein deficient diet I”, Altromin, katalógusszám: C1003; illetve a cukorháztartás vizsgálatára irányuló kísérletek esetében: Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Németország, katalógusszám: E15202-24) tápot kapott a vemhesség teljes időtartama alatt. (A tápváltásra beszerzési nehézségek miatt került sor, nem tapasztaltunk különbséget a két táp hatásai között. Mindkét tápot felhasználják hasonló kutatásokban (Reamon-Buettner és mtsai 2014, Schmidt M. és mtsai 2019)). Az anyák másik csoportja nem fehérjeredukált, azaz kontroll tápot (Maintenance diet, Altromin, katalógusszám: 1324) kapott a vemhesség teljes időtartama alatt. Az Altromin

fehérjeredukált táp fehérjetartalma a kontroll táp 42 %-a, míg ugyanez a Ssniff táp esetén a kontroll 46 %-a volt. A tápösszetétel további részleteit az 1. táblázatban adom meg, a tápok teljes összetétele pedig letölthető a gyártók honlapjáról (<http://www.ssniff.com> és <https://altromin.com>). A fialás után mindkét csoport anyaállatai kontroll tápot kaptak (Desai és mtsai 2007) és az alomméretet 8 utódra redukáltuk. A fehérjeredukált tápot fogyasztó anyák utódait intrauterin fehérjeredukált (FR), a kontroll tápot fogyasztó anyák utódait nem intrauterin fehérjeredukált (NR) állatoknak neveztük el és ezt a nomenklaturát használom a dolgozatban. Az utódok testtömegét és tápfelvételét hetente mértük.

Az almok közötti különbségek zavaró hatását elkerülendő minimum 3 alomból válogattuk be az alanyokat egy-egy kísérleti csoportba. A kísérleteket újszülött állatokon (1-4 nap), 6 heteseken és felnőtt 12-14 hetes állatokon végeztük.

1. táblázat. A kísérletekben felhasznált tápok alapvető összetétele. További információ a gyártók weboldalán (altromin.com, illetve ssniff.com) található.

	Altromin 1320	Ssniff EF R/M	Altromin C1003
	Normál fenntartó táp	Fehérjeszegény táp	Fehérjeszegény táp
Metabolizálható energia MJ/kg	13,5	16,2	14,9
Fehérje az energia %-ában	24	9	9
Lipidek az energia %-ában	11	19	13
Szénhidrátok az energia %-ában	65	72	78
Nyers fehérje %	19,2	8,8	8,1
Nyers lipid %	4,1	8,1	5,1
Nyers rost %	6,1	5	3,1
Nyers hamu %	5,9	5,3	5,5
Nitrogénmentes származékok %	53,4	72,3	70,5

4.3 Mágneses rezonancia képalkotás

Testösszetétel mérést (zsírtömeg, sovány tömeg, szabad és összes víztartalom) végeztünk 12 hetes éber állatokon (n = 5/FR és NR) egy EchoMRI 700 Whole Body Composition Analyzer (Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt am Main, Németország) készülék használatával.

4.4 A jutalmi tápfogyasztás értékelése

Az ízletes, magas élvezeti értékkel bíró táp fogyasztásához való affinitást cukrozott, sűrített tej (CST; Sole-Mizo Zrt, Csorna, Magyarország) (csapvízben 1:2 arányban hígítva) itatásával mértük Brand munkája segítségével (Brand és mtsai 2012). A háromnapos kísérlet első estéjén az állatok kaptak kevés CST-t a megszokott vizespalackjukban, a saját ketrecükben, hogy hozzászokjanak az új ízhez. Másnap, a világos, passzív fázis elején, a jóllakott állatokat (hiszen a sötét fázisban táplálkoznak) a kísérleti ketrecbe helyeztük 5 percre, hogy hozzászokjanak a körülményekhez. Ezután 10 percre CST-tartalmú palackot helyeztünk be nekik, és mértük a fogyasztást.

Ezt az „előkísérleti” napot követte a harmadik, „éles” kísérleti nap. Egy menetben mindig párhuzamosan egy NR és egy FR állatot vetettünk alá a kísérletnek (lásd: 10. ábra). A protokoll megegyezett az előző, „előkísérleti” napival, azzal a különbséggel, hogy videófelvétel is készült, amelyet később kiértékelünk. Az állatokat a kísérlet végeztével visszahelyeztük a saját dobozukba, majd 90 perccel később altatás után transcardialisan perfundáltuk 4 %-os paraformaldehiddel (sós foszfát pufferben, pH: 7,4 (PBS) oldva).



10. ábra A CST-itatásának kísérleti elrendezése. Egy időben mindig egy intrauterin fehérjeredukált és egy nem fehérjeredukált állat vett részt a kísérletben.

4.5 D1R-agonista kezelés

A kísérletben alkalmazandó NR állatokat naponta kézbe vettük („handling”) a kísérlet előtti három hét alatt, hogy megszokják az emberi kontaktust és a testhelyzetet.

Egy héttel a kísérlet előtt egy végleges vezetőkanült (Plastics One Inc, Roanoke, VA, USA) (22 ga) ültettünk be a koponyához rögzítve, úgy pozicionálva, hogy a vége 0,5 mm-rel a NAc medialis shell régiója felett legyen. Stereotaxikus koordináták: 1.48 mm-re a Bregmától rostralisán, 0.82 mm-re a középvonaltól jobbra, 6,47 mm-re a koponyafelszín alatt (Paxinos és Watson 2007).

A műtét után a patkányokat egyesével tartottuk. A jutalmi tápfogyasztást a regeneráció után értékeltük. A kísérlet az előző pontban leírtakkal megegyezően zajlott, az intraaccumbalis injekciót kivéve, amit az állatok a CST felkínálása előtt 10 perccel kaptak. A különböző csoportoknak 0,5 vagy 3 μ g-nyi 1 μ l fiziológias sóoldatban feloldott SKF-82958-et (Sigma-Aldrich Kft.; Budapest, Magyarország), szelektív D1 receptor agonistát adtunk. A kontroll állatok azonos mennyiségű vivőanyagot kaptak. A beadások 10 μ l-es Hamilton fecskendőkhöz csatlakoztatott műanyag csövön és a vezető

kanülnél 5 mm-rel hosszabb belső kanülon keresztül történtek a NAc medialis shell alrégiójába. A kanülok pontos helye a perfúziós fixálás után, agyszeleten került meghatározásra. Csak a megfelelő kanülpozícióval és nem sérült laterális agykamrával rendelkező állatok adatai kerültek be a végső analízisbe.

4.6 Intraperitoneális glükóz (ipGTT) és inzulin- (ipITT) tolerancia tesztek

IpGTT módszerrel az állatok glükózmétabolizáló képességét, míg ipITT módszerrel az inzulinérzékeny szövetek érzékenységét kívántuk vizsgálni. 6 hetes és felnőtt kezeletlen FR és NR állatokat, valamint krónikusan nesfatin-1 injektált állatokat vettünk bele ezekbe a kísérletekbe. 12 órás éheztes után 2 g/ttkg glükózt (Merck Kft., Budapest, Magyarország) vagy 0,75 nemzetközi egység (NE)/ttkg inzulint (Humulin R, Eli Lilly, Utrecht, Hollandia) juttattunk be intraperitoneálisan az állatokba, mindkettőt fiziológiás sóoldatban oldva. A glükózkoncentrációt a farokhegyből vett vérmintákból, D-cont Trend Blood GlucoseMeter (77 Elektronika Kft., Budapest, Magyarország) készülék segítségével határoztuk meg közvetlenül a glükóz- és inzulinbeadás előtt (0 perc), valamint azok után 15, 30, 60, 90, 120 és 150 perccel.

4.7 Akut intracerebroventrikuláris (icv) nesfatin-1 beadás

Az icv kanül beültetése a következőképpen zajlott: egy polietilén vezető („guide”) kanült (Smiths Medical ASD, Inc., NH, USA) ültettünk be felnőtt állatok jobb oldali oldalkamrájába stereotaxikus módszerrel (0.8 mm-re a bregmától caudalisan, 2.0 mm-rel a sutura sagittalistól laterálisan és 4.0 mm-rel a koponyafelszín alá.) A kanülok helyes pozícióját 3 µl fiziológiás sóoldatban oldott 10 nM angiotenzin II beinjektálásával ellenőriztük. Csak azokat az állatokat vontuk bele a későbbi beadásos kísérletekbe, amelyek az angiotenzin II beadását követő 1 percen belül jól látható, intenzív vízfogyasztással reagáltak.

Az állatokat négy csoportra osztottuk: NR–Sóoldat, NR-Nesfatin-1, FR-Sóoldal, FR-Nesfatin-1. A nesfatin-1-et (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, USA) fiziológiás sóoldatban oldottuk fel 5 pmol/µl végső koncentrációra. Az állatok 5 µl

nesfatin-1-oldatot (25 pmol) vagy fiziológias sóoldatot kaptak az éjjeli, sötét fázis kezdetekor. Ezt az akut nesfatin-1 beadásos módszert kétféle kísérletben alkalmaztuk.

1. A nesfatin-1 táp- és vízfelvételekre kifejtett hatását vizsgálándó az icv beadások előtt 1 órával elvettük tőlük a tápot. Közvetlen a beadás után a tápot visszaadtuk és mind a tápot, mind a vizet a beadástól számított 4, 8, illetve 12 óra múlva visszamértük a fogyasztás meghatározása céljából.

2. A nesfatin-1-nek az éhezés-indukálta hypothalamicus sejtaktivációra kifejtett hatását szeretnénk volna megvizsgálni. Ehhez az állatokat 24 óra hosszan éhezettük a beadás előtt. Az icv beadás után 90 perccel altatás, majd 4 %-os paraformaldehiddel való perfúziós fixálás következett. Az agyakat kivettük és cFos antitesttel történő immunhisztokémiai vizsgálatra készítettük elő azokat.

4.8 Krónikus icv nesfatin-1 beadás

Egy Alzet ozmotikus minipumpát (Alzet Model 2001, Durect Corporation, Cupertino, CA, USA) ültettünk be az állatok bőre alá, és az ahhoz csatlakoztatott agyba vezethető katétert (Alzet brain-infusion kit 2) az állatok jobb agykamrájába a 4.7 fejezetben részletezett koordinátáknak megfelelően a gyártó előírásai alapján. A minipumpa nesfatin-1-et (70 pmol/nap) vagy csupán a vivőanyagot [steril mesterséges agy-gerincvelői folyadék (aCSF), összetétel: 140 mmol/l NaCl, 3,35mmol/l KCl, 1,15 mmol/l MgCl₂, 1,26 mmol/l CaCl₂, 1,2 mmol/l Na₂HPO₄, 0,3 mmol/l NaH₂PO₄] juttatta be az agykamrába 1 µl/h sebességgel 7 napon keresztül (1. kísérlet: NR-nesfatin-1 és NR-aCSF: n=6/csoport, 2. kísérlet: FR-nesfatin-1 és FR-aCSF, n=6/csoport). A testtömeget és a tápfelvételt naponta mértük.

A beadási időszak hetedik napján ipGTT, egy napra rá ipITT tesztet végeztünk, majd dekapitációval leöltük a patkányokat. A kanülök helyes pozícióját később az agymetszeteken ellenőriztük, a nem helyes pozícióval rendelkező állatok eredményeit kihagytuk az értékelésből.

4.9 A jutalmi tápfelvétel mintázatának elemzése

A jutalmi tápfelvételről készített videófelveteleket 0,25 x-es sebességgel játszottuk le (VLC media player, VideoLAN, Paris, Franciaország) az elemzés alatt a megfelelő időbeli felbontás érdekében. A tápfelvétel idejét, a nyelvcsapási klaszterek számát és időtartamát, a kezdő és átlagos nyelvcsapási frekvenciát határoztuk meg állatonként.

A tápfelvétel ideje a tíz perc alatt ivással töltött időt jelentette. Egy nyelvcsapási klaszternek tekintettük azokat a nyelvcsapási folyamatokat, amelyeket több, mint 500 ezredmásodperc szünet választott el egymástól (Davis és Smith 1992). Meghatároztuk a nyelvcsapási klaszterek számát és abból számoltuk ki az átlagos klaszterhosszt (ivási idő/klaszterek száma) és a klaszter méretet (klaszterhossz x átlagos nyelvcsapásszám). Az átlagos nyelvcsapási sebességet 6 db, időben a 10 perc alatt egyenletesen eloszló, 10 másodperc hosszú, folyamatos ivással telt periódus alapján határoztuk meg, másodpercre viszonyítva. Ezek közül az első, a legelső ivási epizód alatt számított sebesség adta a kezdeti nyelvcsapási sebességet.

4.10 Immunhisztokémia (IHC)

A perfúzió után egy éjszakára 1,5 % -os paraformaldehid oldatban utófixáltuk az agyakat. Ezután a fagyasztási károsodás megelőzése céljából 2 napig 20 %-os szacharózoldatban (Merck) inkubáltuk őket, majd szárazjéggel lehűtött 2-metilbutánban (Merck) fagyasztottuk le. Tárolásuk $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os mélyhűtőben történt. Frigomobilhoz (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Németország) kapcsolt száncás mikrotommal (SM 2000R, Leica) $50\text{ }\mu\text{m}$ vastag koronális metszeteket készítettünk a vizsgálni kívánt agyterületből.

A standard IHC-i reakciókat (szimpla cFos, szimpla D1R, dupla cFos-orexin, dupla cFos-MCH) szabadon úszó metszeteken végeztük standard protokollok szerint (Könczöl és mtsai 2012).

Pufferként PBS-t használtunk. Az immunfestés előkészítése során a metszeteket először mostuk (3x5 perc PBS-ben), majd az endogén peroxidáz enzimet blokkoltuk úgy, hogy a metszeteket 15 percig 3%-os H_2O_2 oldatban inkubáltuk. A metszeteket ezután szérumblokkoló (részletesen lásd: 2. táblázat) és 0.5% TritonX-100 (Sigma)

PBS-alapú oldatában inkubáltuk az aspecifikus kötőhelyek gátlása és membránpermeabilizálás céljából 1 óra hosszan. A D1R jelölése esetén az előkészítés a fentiekől eltérően történt: a membránok védelmében csupán etanol és PBS 1:1 arányú elegyében inkubáltuk a metszeteket fél óra hosszan, sérumblokkolót és TritonX-et nem alkalmaztunk.

Ezután a primer antitestet alkalmaztuk (anti-c-fos, anti-D1R, anti-MCH vagy anti-orexin) 2 nap hosszan. Ezt fluoreszcensen jelölt vagy biotinnal konjugált sekunder antitest alkalmazása követte (1 h időtartamban). Biotinilált sekunder alkalmazása esetén extravidinnel konjugált-tormaperoxidázt (HRP)-t kötöttünk a sekunderhez (szintén 1 h az inkubációs idő), hogy utolsó lépésként diaminobenzidin (DAB), illetve nikkel-szulfát és diaminobenzidin H_2O_2 jelenlétében történő megfelelő, előzetesen tesztelt időtartamban való alkalmazásával a peroxidáz reakció eredményeként barna, illetve fekete csapadék létrejöttével láttathassuk a szöveti antigént. Két egymást követő lépés között a metszeteket 3 x 5 percig PBS oldatban mostuk.

Az *in situ* hibridizáció előtt alkalmazott cFos immunhisztokémia esetében a következőképpen jártunk el: 20 μ m vastag metszeteken sérumentes protokollt alkalmaztunk. Minden oldatot 0,1 %-os dietilpirokarbonáttal kezeltünk, ezután 20 percig 121 °C-on autoklávban sterilizáltuk. Előkezelésként 15 perc 3 %-os H_2O_2 -ben való endogén peroxidáz blokkolást követően 30 percig 50 % etanol – 50 % steril PBS elegyében való inkubálást 30 perc 0,3 % TritonX alkalmazása követett. A primer és szekunder antitestek oldatához 1000 U/ml heparint (Sigma) az RNázok gátlása céljából. Az immunreakció elvégzése után a metszeteket továbbra is RNáz-mentes körülmények között Superfrost Ultra Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) tárgylemezre húztuk fel, majd 1 óra szobahőmérsékleten és 3 óra 36 °C-on való szárítást követően -80 °C-on tároltuk az *in situ* hibridizáció megkezdése előtt. Az alkalmazott antitestek és termékek koncentrációját és gyártóját a 2. táblázat szemlélteti.

2. táblázat

Az alkalmazott immunhisztokémiai reagensek adatai

Rövidítések: BSA: szarvasmarha szérum albumin, D1R: dopamin 1-es típusú receptor, DAB: diaminobenzidin, HRP: tormaperoxidáz, IHC: immunhisztokémia; NDS: normál számár szérum, NGS: normál kecske szérum, PBS: sós foszfát puffer.

Primer antitest és hígítás	Gyártó	Secunder antitest és hígítás	Gyártó	Enzim	Gyártó	Csapadék-képző szubsztrát
nyúlban termelt anti-c-fos, 1:20 000, PBS (+ 3 % BSA és 0,5 % Triton-X)	Merck Kft Budapest, Magyarország	kecskében termelt biotinilált anti-nyúl, 1:1000	Vector laboratories, Burlingame, CA, USA	Extravidinnel konjugált HRP, 1:3000	Sigma	NiSO ₄ és DAB, illetve steril IHC esetén DAB
nyúlban termelt anti-orexin A, 1:5,000, PBS (+ 10 % NGS és 0,5 % Triton-X)	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA					DAB
nyúlban termelt anti-MCH, 1:10,000, PBS (+ 10 % NGS és 0,5 % Triton-X)	Phoenix Europe Gmbh, Karlsruhe, Németország					DAB
egérben termelt anti-D1R, 1:500, PBS (+ 5 % NDS)	Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság	számárban termelt anti-egér AlexaFluor 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA			

4.11 In situ hibridizáció

Preproenkephalin, D1R, D2R, valamint tirozin-hidroxiláz mRNS-t mutattunk ki *in situ* hibridizációs (ISH) technikával. A D1 és D2 receptor cDNS fragmenteket Mezey

Éva jóvoltából kaptuk (Mezey és mtsai 1998). A D1R ribopróbához a (GenBank Acc: NM_012546.3), 981–1393 bps-t tartalmazó, a D2R ribopróbához a (NM_012547.1) 981–1393 bp-t tartalmazó cDNS fragmenteket Bluescript KSII + vector templátba klónoztuk. A cDNS specificitását szekvenálás biztosította és a patkány genom BLAST screenelésével értékeltük (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A patkány preproenkephalin cDNS-t W. Scott Young 3rd bocsátotta rendelkezésünkre (Siegel R. E. és Young 1985). A patkány tirozin-hidroxiláz (TH) intron cDNS-ét Harold Gainer (NIH, Bethesda, MD) volt szíves rendelkezésünkre bocsátani (Rusnak és Gainer 2005).

A 12 µm vastag metszeteket cryostat (Leica) metszőgéppel készítettük, majd Superfrost Ultra Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) tárgylemezekre húztuk fel (ún. friss fagyasztott metszetek) és -80 °C-on tároltuk felhasználásig. Ettől eltérően azokat a metszeteket, amelyeken a D1R ISH előtt steril cFos immunhisztokémiát végeztünk, frigomobilhoz csatlakoztatott száncás mikrotómon metszettük le, 20 µm vastagon. Ezeket a metszeteken – 20 °C-on tároltuk fagyálló oldatban, hiszen a steril IHC úszó metszeten történt (lásd: 4.10).

Az ISH előkészítéseként a friss fagyasztott metszeteket 10 percig 4 %-os formalinoldatban fixáltuk. Egyszeri öblítés, majd 2 x 5 perc PBS-beli mosás következett. Ezután 10 percre 0,25 %-os ecetsav anhidridet tartalmazó 0,1 M-os trietanolaminba (Fluka Chemie, Buchs, Svájc) (pH: 8,0) tettük a metszeteket. Majd 2x töménységű sós nátrium-citrát pufferben (SSC) öblítettük le kétszer, azután felszálló alkoholsoron vittük végig őket (70 %: 1perc, 85 %: 2 per, 95 %: 3 perc, 100 %: 4 perc, illetve 95 %: 1 perc). Végül szobahőmérsékleten megszárítottuk a metszeteket.

A cDNS próbákból antiszenz 35S-UTP-vel jelölt radioaktív próbákat készítettünk, majd 1 µl próbát 5 ml szcintillációs folyadékba elegyítve mértük meg a radioaktivitást. Ezután úgy kevertük ki a hibidizációs oldatot, hogy 10⁶ bomlás/perc (DPM) aktivitású próba jusson egy lemezre. A hibidizációs oldat elkészítéseként a radioaktív próba, a steril víz és az RNS keverék összekeverése után 65 °C-on 5 percig, majd vízjégen további 5 percig tartottuk, majd hozzáadtunk 5M dithiothreitol (DTT) (Sigma), 10 % nátrium-duodecyl-szulfátot, 10 % nátrium tiosulfátot és a hibidizációs pufferoldatot (összetevői: 2,4 % 1 M TRIS-HCl puffer, pH 7,4; 0,24 % 0,5 M etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), pH 8,0; 59,5 % 100 %-os formamid; 7,15 % 5 M NaCl-oldat; 23,8 % 50 %-os dextrán-szulfát; 2,4 % 50x Denhard-oldat (Sigma); 4,5 % steril víz). Alapos

keverés után egy tárgylemezre 80 µl hibridizációs oldatot helyeztünk, majd üveglemezzel lefedtük. 24 órán át nedves kamrában, 65 °C-ra melegített gőzfürdőben inkubáltuk. Másnap a fedőlemezeket 4x töménységű SSD-ben úsztattuk le, majd 4 x 5 percig 4x töménységű SSD-ben mostuk őket. 30 percig 37 °C-on 20 µg/ml-t tartalmazó RNáz A (Sigma) oldatban inkubáltuk a nem kötődött RNS eltávolítása céljából. Majd megint mosás következett, 2 x 5 perc 2x SSC-ben, 5perc 1x SSC-ben és 5 perc 0,5x SSC-ben. 1 óra hosszan 65 °C-on mostuk a 0,1 x SSC-ben, majd ugyanilyen, de friss oldatban még egyszer fél óra hosszan. A mosásra használt SSC oldatok mindig tartalmaztak 1 mM DTT-t. Kihűlés után 70 %-os, majd 85 %-os, végül 96 %-os etanolban mostuk a metszeteket 1-1 percig, majd megszáritottuk őket.

Ezután a metszeteket egy BAS-MS foszfor-képkalkotó lemezre (Fuji Photo Film Co., Ltd., Kanagawa, Japan, NJ) vetítettük 2 nap (dopamin receptorok), 1 nap (preproenkephalin), illetve 7 nap (TH) időtartamra. A képet Fujifilm FLA-8000 Image Analyzer (Fuji) készülék segítségével detektáltuk. A D1 és D2 R-jelölt lemezeket Kodak NTB nukleáris emulzióba mártottuk (Carestream Health Inc., Rochester, NY) 5 napig a gyártó utasítása szerint és Kodak előhívóval és fixálóval zártuk le a folyamatot (Rusnak és mtsai 2007, Toth és mtsai 2013). A metszetek háttérét Giemsa oldattal festettük meg, kivéve azokat, amelyeken korábban immunhisztokémia történt.

4.12 Immunhisztokémiai képkalkotás és analízis

Az immunhisztokémiai módszerekkel előhívott metszetekről világos látóterű képeket készítettünk egy SPOT Xplorer 17.4 típusú kamera (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, MI, USA) használatával, amely egy Olympus BX60 mikroszkóp (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) (objektív: UPlan FL 4×/0.13 és UPlanFLN 10x/0.30) képkalkotását rögzítette. Az illusztrációra használt képek kontrasztját és élességét Adobe Photoshop CS 8.0 (Adobe Systems Inc., San José, CA, USA) programmal állítottuk be. (A disszertációban szereplő összetett ábrákat a PowerPoint 2016 (Microsoft Corporation, Santa Rosa, CA, USA) programmal készítettük).

A cFos-jelölt sejtek számolását a metszetekről készített világos látóterű képeken végeztük bilaterálisan, előre kijelölt területek alapján (ROI – region of interest). A ROI-

kat a kérdéses területek közepére helyeztük, amelyeket a Paxinos és Watson patkányagy-atlasz (Paxinos and Watson, 2007) alapján határoztunk meg.

A CST-itatott állatok metszeteinek értékelésénél a ROI mérete 200 x 200 μm volt a NAc területén és 400 x 400 μm a LHA területén. A NAc területén a Bregmától 1.7–2.2 mm-re rostralis irányban (Paxinos és Watson 2007) értékeltünk állatonként 3, a rostralis NAc-et reprezentáló metszetet. A medialis shell régió értékelésére {„hedonikus hotspot”, (Pecina és Berridge 2005)}, valamint a ventralis shell értékelésére 1-1 ROI-t, a core régióban viszont 2-2 ROI-t elemeztünk metszetenként (12. a ábra). A LHA-t állatonként 5 metszetből értékeltük, 1,8–2,4 mm-re caudalisan a Bregmától (O'Connor és mtsai 2015). Ezen a területen az első ROI a fornixtól lateralisán került elhelyezésre, a perifornicalis LHA-t képviselve (PF), míg a másik ROI a tractus opticus-tól medialisán került elhelyezésre a LHA lateralis részét (LH) képviselve (14. a ábra). A statisztikai analízisben az állatonkénti számolt összejszám került értékelésre.

A nesfatin-1-beadott állatok analízise esetén a ROI mérete 100 x 100 μm (SON, parvocellularis PVN, magnocellularis PVN és ARC esetén), vagy 200 x 200 μm (LHA esetén) volt. A SON magra és a PVN almagjaira metszetenként 1 ROI-t, míg az ARC-ra 2, a LHA-ra 3 ROI-t helyeztünk. A SON és PVN magokat állatonként 4 metszetből, míg az ARC és LHA magokat állatonként 7 metszetből értékeltük.

Az ImageJ számítógépes program (Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) manuális sejtszámoló (Cell counter tool) segítségét vettük igénybe az analízishez. A sejteket vakon számoltuk, vagyis a számolást végző személynek nem volt tudomása arról, hogy az adott állat melyik csoportba tartozik. Állatonként és területenként egy átlagos ROI értékét számoltuk ki és azzal végeztük a statisztikai számítást.

A D1R-immunpozitív metszeteket Sato és munkatársai (Sato és mtsai 2008) módszerét felhasználva értékeltük. A medialis shell és a core területén a fent részletezett ROI-kat használva szürkeárnyalatos képen határoztuk meg az optikai denzitást, három metszetet értékelve állatonként. Az állatonkénti átlag denzitást használtuk a statisztikai számításhoz.

4.13 Az *in situ* hibridizációs képek kvantálása

A radioaktív *in situ* hibridizáció bizonyos határon belül lineáris kapcsolatot ad az mRNS szint és a jelintenzitás között (Chen C. C. és mtsai 2012).

A D1R és D2R mRNS expressziót autoradiográfiás, emulzióval fedett metszeteken értékeltük (Lanoue és mtsai 2013, Toth és mtsai 2008). A mikroszkópos felvételeket egy QImaging QCam system (Quantitative Imaging Corporation, Surrey, Canada) típusú kamerával készítettük, amelyhez a képalkotást egy Olympus BX51 mikroszkóp (Olympus) (objektív: UPlan FLN 10×/0.30) biztosította. Egy területről egy sötét- és egy világos látóteres képet is készítettünk, ahol a világos látóteres képen azonosítottuk be a sejteket, a mérések viszont a sötétlátóteres képen történtek. A sejt területén az ezüstszemcsék sűrűségét mértük le és a háttér levonása után az expressziót átlagos pixel/sejt formában fejeztük ki (Lanoue és mtsai 2013, Wittmann és mtsai 2015).

A TH prekursor mRNS expressziós szintjét a Fujifilm Image Analyzer által rögzített képről értékeltük (Vas és mtsai 2013).

Mindkét módszer esetén ImageJ program segítségével határoztuk meg az átlagos szürke-értékeket. Ez D1R esetén a Bregmaponttól rostralisan számított 1,7 és 2,2 mm között, három metszeten, míg TH esetén a Bregmaponttól caudalisan számított 5,0-5,4 mm között hat metszeten történt, bilaterálisan. Az állatonként számított átlagot alkalmaztuk a statisztikai számításokban.

A NAc-ben együttesen alkalmazott D1R-jelölés és cFos immunhisztokémia értékelése az immunfestés értékelésénél leírt módszerhez hasonlóan történt (az értékeléshez használt képeket Olympus BX60 mikroszkóppal (objektív: UPlan 20×/0.50 Ph1) fényképeztük. A kétszeresen (cFos+D1R) jelölt sejteknek az összes cFos-pozitív sejthez viszonyított arányát számoltuk ki.

4.14 Statisztika

A kísérleti csoportok méretét korábbi kísérleteinkből, illetve előkísérletekből nyert tapasztalataink alapján határoztuk meg (Könczöl és mtsai 2012).

A statisztikai számításokat a Sigmapstat 3.5 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA) programot használva végeztük el. Kétutas Student-féle t-próbát alkalmaztunk két,

normál eloszlású csoport összehasonlítására, nem normális eloszlás esetén Mann-Whitney-U tesztet használtunk. Amikor 3 különböző csoport összehasonlítására volt szükség, egyutas ANOVA-t végeztünk, Tukey *post-hoc* analízissel. Amikor nem-paraméteres próbára volt szükség, az előbbi ANOVA-t Kruskal-Wallis teszttel helyettesítettük. Amikor több tényező hatásának összehasonlítására volt szükség, kétutas ANOVÁt, vagy egymást követő mérések esetén kétutas ismétléses ANOVÁt használunk, Tukey-féle *post-hoc* teszttel követve. Az esetleges korrelációk feltárása esetén normális eloszlásnál Pearson-féle, míg nem normális eloszlásnál Spearman-módszert használtunk. A számításokat mindig az eredeti adatokon végeztük (akkor is, ha az ábrázolás a kontroll %-ában mutatja az adatokat). A különbségeket $p < 0.05$ esetén fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak. Az adatokat átlag \pm átlag szórása alakban fejeztük ki.

5. Eredmények

5.1 Az FR állatok fejlődése

Az alacsony fehérjetartalmú táp nem befolyásolta sem a vemhesség időtartalmát (NR: $22,6 \pm 0,2$ nap és FR: $22,3 \pm 0,3$ nap), sem az utódok számát (NR: $15,1 \pm 0,9$ és FR: $14,6 \pm 0,6$ újszülött állat). Az FR-ek születési súlya azonban szignifikánsan alacsonyabb volt (11. a és b ábra). Testtömegük ezután az első és a második, valamint a negyedik héten sem érte el az NR csoport testtömegét. Eddigre az FR állatok súlyban kezdtek felzárkózni az NR csoporthoz, az 5. héttől már nem különbözött a testtömegük. A 11-14 hetes periódusban sem különbözött a testtömegük (11. ábra b.), a kísérleteket ekkor végeztük (a kivételeket jelzem).

Az első élethéten az FR-ek lemaradtak a NR-ek mögött relatív, testtömegre viszonyított gyarapodás tekintetében (11. c ábra.). A második, a harmadik, az ötödik és a hatodik héten viszont gyorsabban gyarapodtak, mint az NR-ek („catch up” növekedés). Ezután már nem volt megfigyelhető különbség.

Az állatok tápfelvétele eleinte nem különbözött, de az FR csoport a tizenegyedik héttől kezdve többet evett, mint a NR (11. d ábra).

Ha az elfogyasztott táp mennyiségére viszonyítjuk a heti testtömegnövekedést, adatot kapunk arról, hogy növekedés szempontjából milyen mértékben hasznosítják a tápot az állatok. Ez az arány az 5. (NR: $0,48 \pm 0,02$ és FR: $0,53 \pm 0,04$, $p < 0,05$) és a 6. héten (NR: $0,36 \pm 0,03$ és FR: $0,41 \pm 0,02$, $p < 0,001$) különbözött az FR állatok javára.

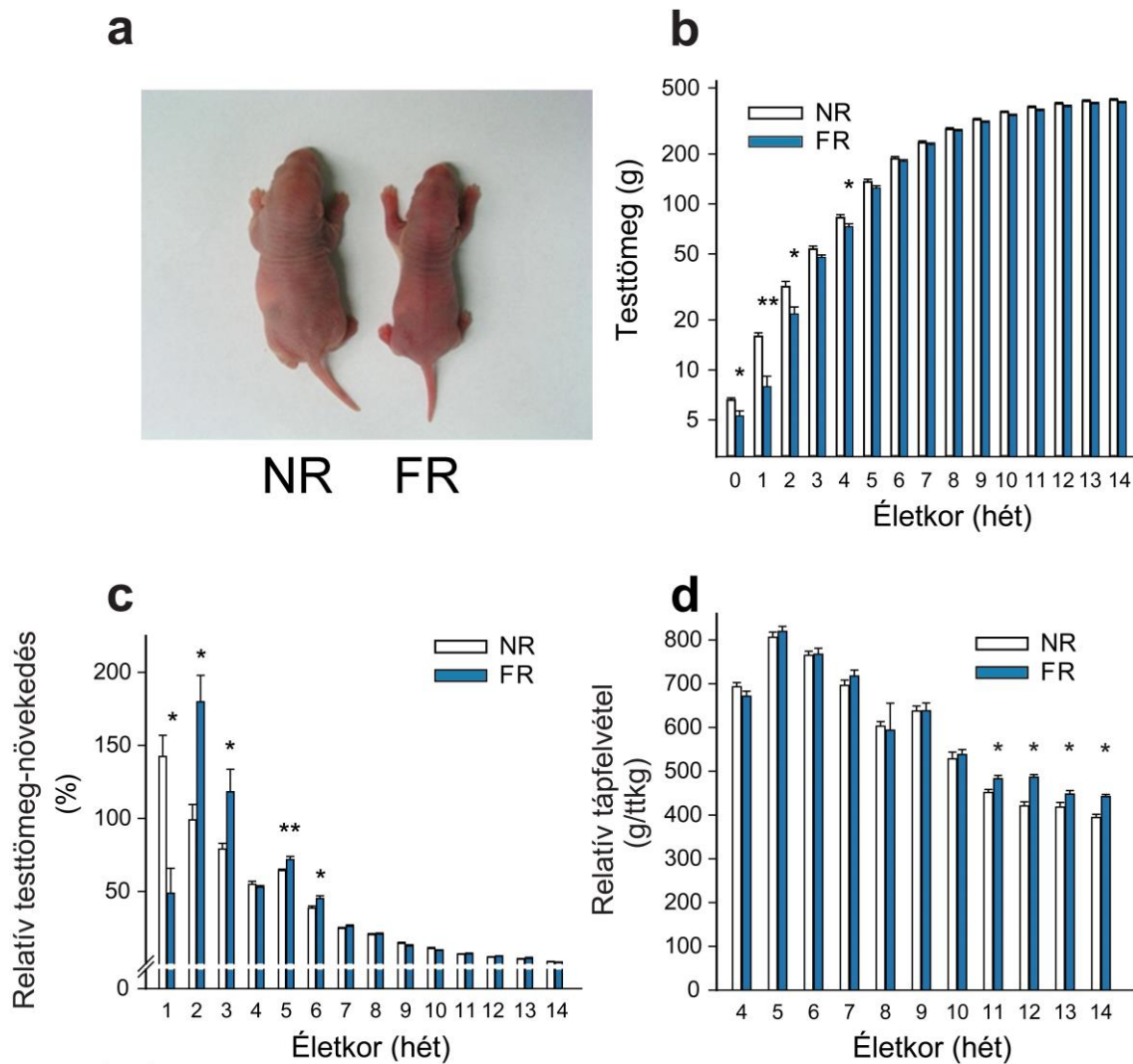
Az Echo MRI segítségével végzett testösszetétel mérés azt igazolta, hogy a 12 hetes NR és FR állatok nem különböztek egymástól zsírösszetételben, sovány testtömegben, valamint a teljes- és szabadvíz-tartalomban sem (3. táblázat).

3. táblázat. 12 hetes kísérleti állataink testösszetétele MRI mérés alapján.

Az adatok átlag \pm átlag szórása alakban vannak megadva. Student-féle t-próba, $n = 5$.

(Durst és mtsai 2022)

	Testtömeg (g)	Zsíros tömeg (%)	Sovány testtömeg (%)	Teljes víztartalom (%)	Szabad víztartalom (%)
NR	446 ± 17	$14,3 \pm 0,69$	$80,2 \pm 0,73$	$67,0 \pm 0,70$	$0,32 \pm 0,02$
FR	494 ± 9	$16,3 \pm 0,94$	$77,5 \pm 0,95$	$64,6 \pm 0,70$	$0,34 \pm 0,04$
p	0,176	0,251	0,232	0,240	0,591



11. ábra Az intrauterin fehérjeredukált (FR) és nem fehérjeredukált (NR) állatok testtömeg- és tápfelvételi adatai.

a. Illusztráció az újszülött állatokról: láthatóan kisebbek az FR fenotípus képviselői. b. Hetenkénti testtömegmérések eredménye. c. Heti testtömeg-növekedés az előző heti tömeghez viszonyítva. d. A testtömegre vonatkoztatott tápfelvétel az elválasztás után. Az adatok átlag \pm átlag szórása alakban vannak ábrázolva. $n = 9-8$, Student-féle T-próba, illetve Mann-Whitney-féle U-próba, $**p < 0,01$, $*p < 0,05$ NR vs. FR. Rövidítések: FR: intrauterin fehérjeredukált; NR: nem intrauterin fehérjeredukált; ttkg: testtömegkilogramm.

(Durst és mtsai 2019)

5.2 Magas élvezeti értékkel bíró táp fogyasztásának elemzése

A tápfelvételi jutalmi mechanizmusok vizsgálata céljából igen ízletesnek minősülő, cukrozott sűrített tejet kínáltunk jóllakott állatoknak. Az FR patkányok mind az előkísérleti napon (NR: $6,16 \pm 0,9$ g, FR: $15,11 \pm 1,3$ g; $p < 0,001$), mind az éles kísérlet alatt (4. táblázat) többet fogyasztottak a CST oldatából.

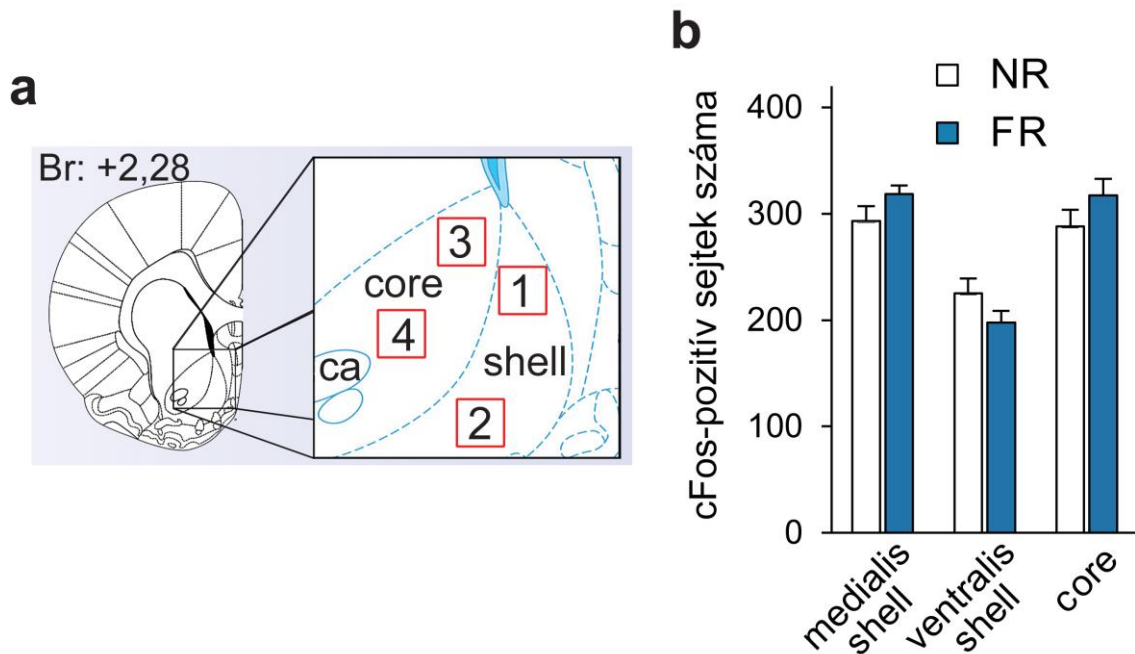
A tejivás alatt mutatott motorikus cselekmények mintázatának elemzése az FR állatok enyhe, nem szignifikáns ivási idő növekedését mutatta ($p=0,071$). Nem volt szignifikáns különbség sem a kezdeti, illetve átlagos nyelvcsapási frekvencia, sem a nyelvcsapási klaszterek mérete, illetve hossza tekintetében (4. táblázat).

4. táblázat. Jutalmi tápfelvétel finommotorikájának elemzése. Az adatok átlag \pm átlag szórása alakban vannak megadva. $n = 8-9$ a fogyasztott mennyiségre, $n = 7-8$ a többi paraméterre. Student-féle t-próbák. $*p < 0,05$. (Durst és mtsai 2019)

	CST - fogyasztott mennyiség	tápfelvétel időtartama (mp)	kezdeti nyelvcsapási sebesség (nyelvcsapás/mp)	átlagos nyelvcsapási sebesség (nyelvcsapás/mp)	átlagos cluster méret (nyelvcsapás)	átlagos clusterhossz (mp)
NR	$9,5 \pm 1,1$	342 ± 40	$6,3 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,1$	$59,3 \pm 5,6$	$9,6 \pm 1,0$
FR	$14,1^* \pm 1,2$	441 ± 28	$6,2 \pm 0,0$	$6,0 \pm 0,1$	$61,6 \pm 7,3$	$10,2 \pm 1,2$

5.3 A táplálkozási jutalom hatása a cFos által jelzett neuronális aktivációra a NAc és a rostralis LHA területén

A CST fogyasztása következtében aktiválódó neuronokat cFos IHC segítségével azonosítottuk. A cFos-pozitív neuronokat megszámláltuk a NAc „core” alrégiójában, amely a jutalom motivációs komponenséért felelős, és a medialis shell régióban, amely a motiváció mellett a „liking” reprezentációs helye is, valamint az ezektől ventralisan fekvő területen (ventralis shell, ezt nem asszociálják külön funkcióhoz) (12. a ábra), amely területek azonosításában Pecina és Berridge cikke volt segítségünkre (Pecina és Berridge 2005). Az átlagos cFos-pozitív sejtszám nem különbözött a csoportok között egyik alrégióban sem (12. b ábra).



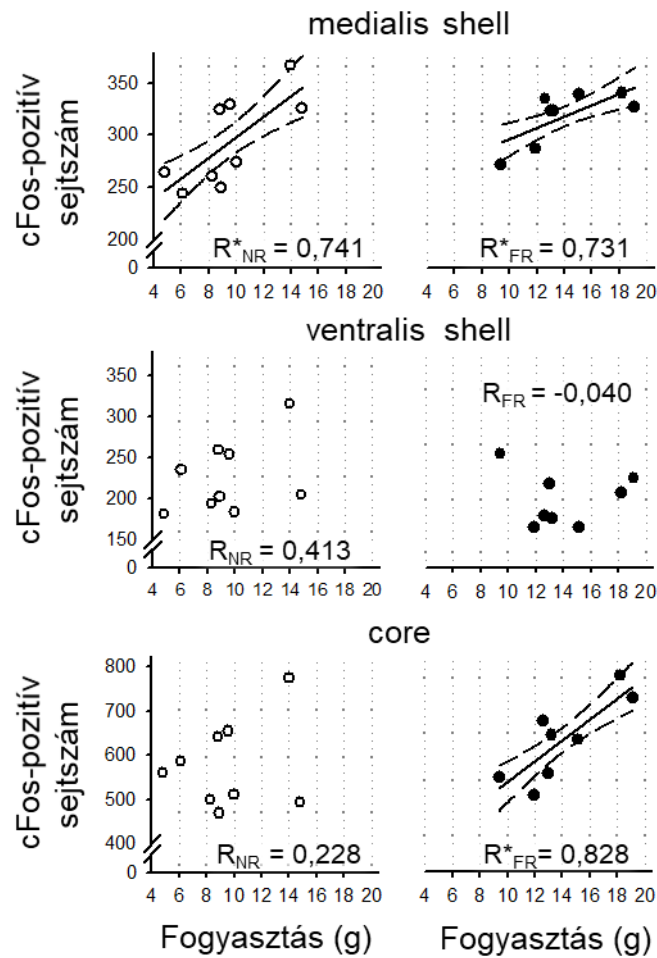
12. ábra A jutalmi tápfelvétel hatására aktiválódott sejtek a nucleus accumbensben.

a. Paxinos (Paxinos és Watson 2007) nyomán készített sémás ábra mutatja a nucleus accumbens területén elhelyezett, cFos-pozitív sejtek számolására alkalmazott $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ -es négyzetek (ROI) pozícióját. ROI1: medialis shell, ROI2: ventralis shell, ROI 3 és ROI4: core alrégió. A rostrocaudalis szint: a Bregmaponttól rostralisán 2,28 mm.

b. Az adott régió állatonkénti összege csoportra vonatkoztatva. Átlag \pm átlag szórása. Student-féle t-próba. $n = 8-9$. Rövidítések: Br: bregmapont; FR: intrauterin fehérjeredukált; NR: nem intrauterin fehérjeredukált. (Durst és mtsai 2019)

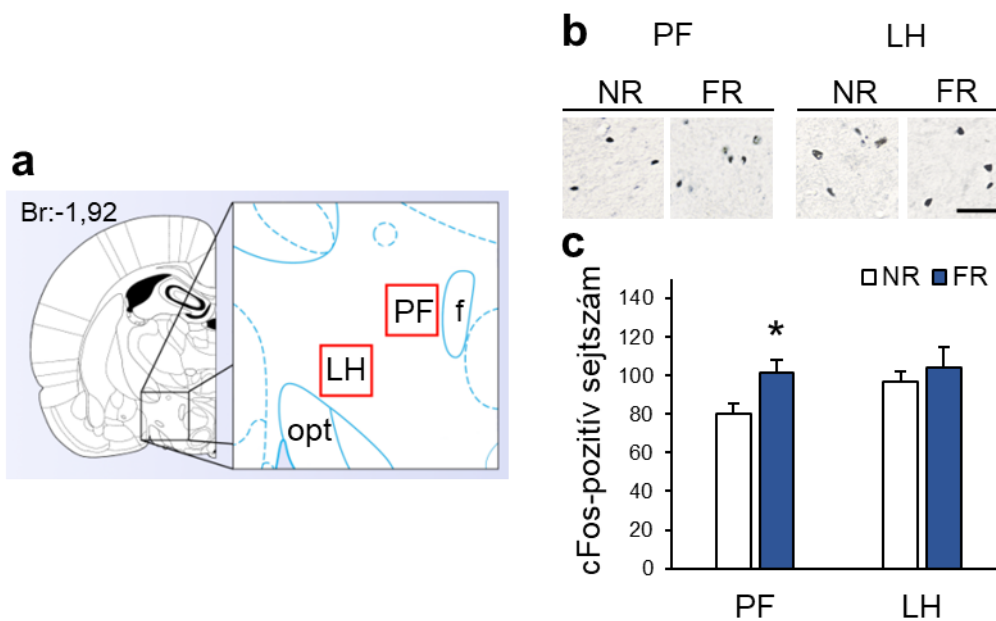
Arra is kíváncsiak voltunk, hogy vajon a jutalmi tápfelvétel tükröződik-e valahogyan az aktiválódott neuronok számában. Az elfogyasztott CST mennyisége és a cFos-pozitív sejtszám között szoros, lineáris, pozitív korrelációt találtunk a medialis shell területén mind az NR, mind az FR csoportban. Mindazonáltal az FR csoportban több elfogyasztott mennyiséghez társult ugyanannyi pozitív sejt, mint a NR csoportban (13. ábra, fent).

A 'core' régióban csak az FR állatoknál találtuk meg ezt a szoros korrelációt (13. ábra, lent). A kontroll régióként használt ventralis shell területén egyik csoportban sem találtunk hasonló összefüggést (13. ábra, középen).



13. ábra. Az elfogyasztott CST és az aktiválódott sejtek számának összefüggése. Az egyenes és a szaggatott vonalak a regressziós egyeneseket, valamint a 95 %-os konfidencia-intervallumot jelzik. Pearson, illetve Spearman-féle korrelációs analízis. Az ábrán látható a korrelációs koefficiens (R) $*p < 0,05$, $n = 8-9$. Rövv.: FR: intrauterin fehérjeredukált; NR: nem intrauterin fehérjeredukált. (Durst és mtsai 2019)

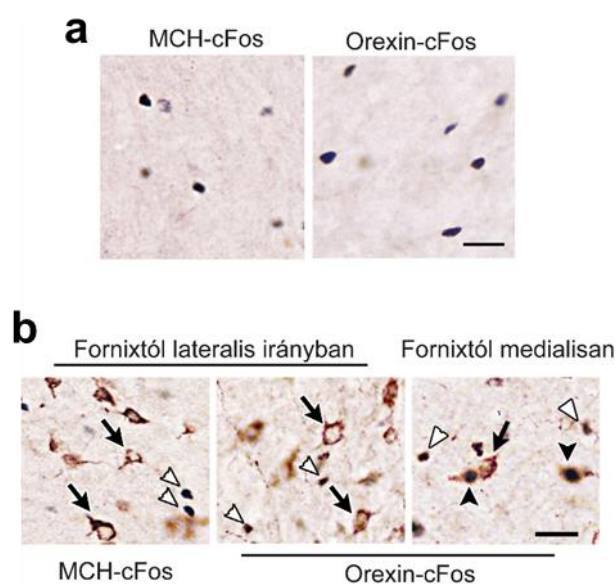
A magas élvezeti értékkel bíró táp fogyasztására bekövetkező neuronális aktivációt a medialis shell idegsejtjeinek vetítési területén, a rostralis LHA régiójában is meghatároztuk. Korábbi irodalmi adatok alapján (O'Connor és mtsai 2015) a ROI analízist két alterületen végeztük el: egyrészt a fornixtól lateralisán, a PF területén, másrészt a tractus opticusától medialisán, az LH területén (14.a ábra). A magasabb jutalmi táp felvételt mutató FR állatoknak több sejt aktiválódott a PF régióban (14. b, c ábra). Az LH terület sejtjei hasonlóképpen aktiválódtak a két csoportban (14. b, c ábra).



14. ábra. A jutalmi tápfelvétel hatása az LHA sejtaktivitására

a. Paxinos (Paxinos és Watson 2007) nyomán készített sémás ábra mutatja a nucleus accumbens területén elhelyezett, cFos-pozitív sejtek számolására alkalmazott 400 μm x 400 μm -es négyzetek (ROI) pozícióját. A rostrocaudalis szint: a Bregmaponttól caudalisan 1,92 mm. b. cFos immunhisztokémia mutatja a két területet a két kísérleti csoportban illusztrációként. Lépték: 50 μm . c. A cFos-pozitív sejtek száma területenként, csoportonként. Student-féle t-próbák, $*p < 0,05$. Ábrázolás: átlag \pm átlag szórása. NR vs FR. $n = 7$. Rövidítések: Br: bregmapont; f: fornix; FR: intrauterin-fehérjeredukált; LH: a lateralis hypothalamus lateralis területe; NR: nem intrauterin-fehérjeredukált; opt: tractus opticus; PF: perifornicalis lateralis hypothalamicus area. (Durst és mtsai 2019)

MCH- és orexin-pozitív sejteket nem találtunk ezen a rostrocaudalis szinten (15. a ábra). Ettől a területtől caudalisan a fornix lateralis oldalán a cFos-pozitív sejtek orexin- és MCH-negatívak voltak, míg a fornixtól medialisán több cFos-pozitív sejt orexinre nézve is pozitív lett (15.b ábra).



15. ábra. A jutalmi tápfelvétel által aktivált, a NAc-célterületeként azonosított LHA neuronok nem mutattak koexpressziót sem MCH-val, sem orexinnel.

a. Dupla immunhisztokémia mutatja az MCH, illetve orexin hiányát a cFos-jelölt mag körül. b. cFos expresszió a LHA caudalis részén. Fehér nyílhegyek: szimpla cFos-pozitív sejtek. Fekete nyilak: cFos-negatív orexin, illetve MCH-pozitív sejtek. Fekete nyílhegyek: orexin és cFos duplán jelölődött sejtek. A festés NR állatokban készült. Lépték: 50 μ m. (Durst és mtsai 2019)

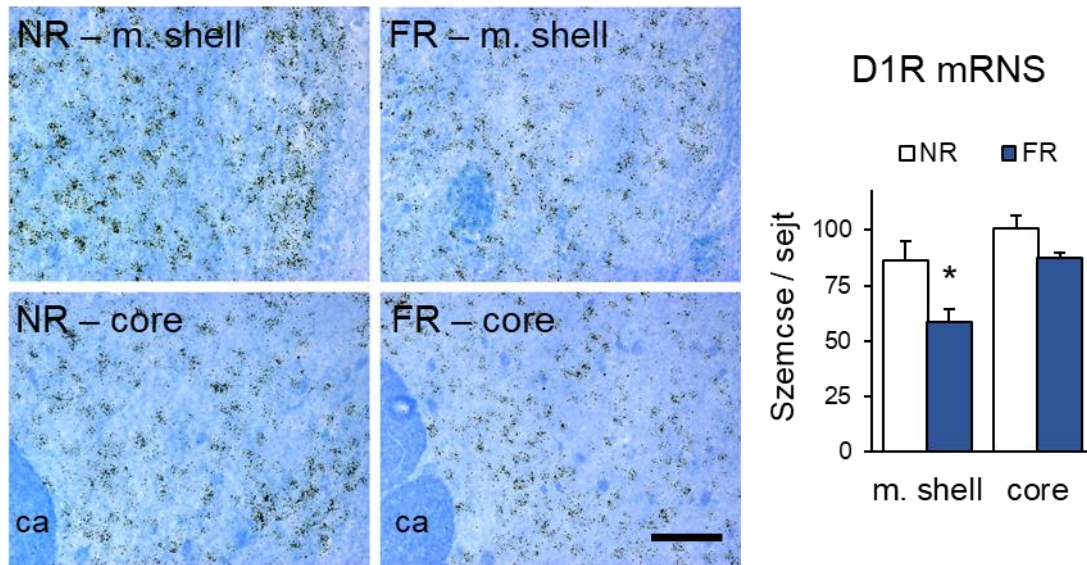
Az elfogyasztott tápmennyiség és a LHA-alterületeken aktiválódott sejtek száma között is összefüggést kerestünk. Szignifikáns korrelációt csak az FR állatok esetében találtunk az LH alterület cFos-pozitív sejtjeinek mennyisége és az ivott CST-mennyiség között (5. táblázat).

5. táblázat. Az elfogyasztott CST és az aktiválódott sejtek számának összefüggése. Pearson-féle korrelációs analízis. A táblázat feltünteti a korrelációs koefficiens (R), illetve a p-értéket, $n = 7$. Publikálatlan adatok.

	PFA		LH	
	NR	FR	NR	FR
R	0,058	0,025	0,101	-0,869*
p	0,901	0,958	0,830	0,011

5.4 A dopaminerg transzmisszió fő elemeinek kiértékelése

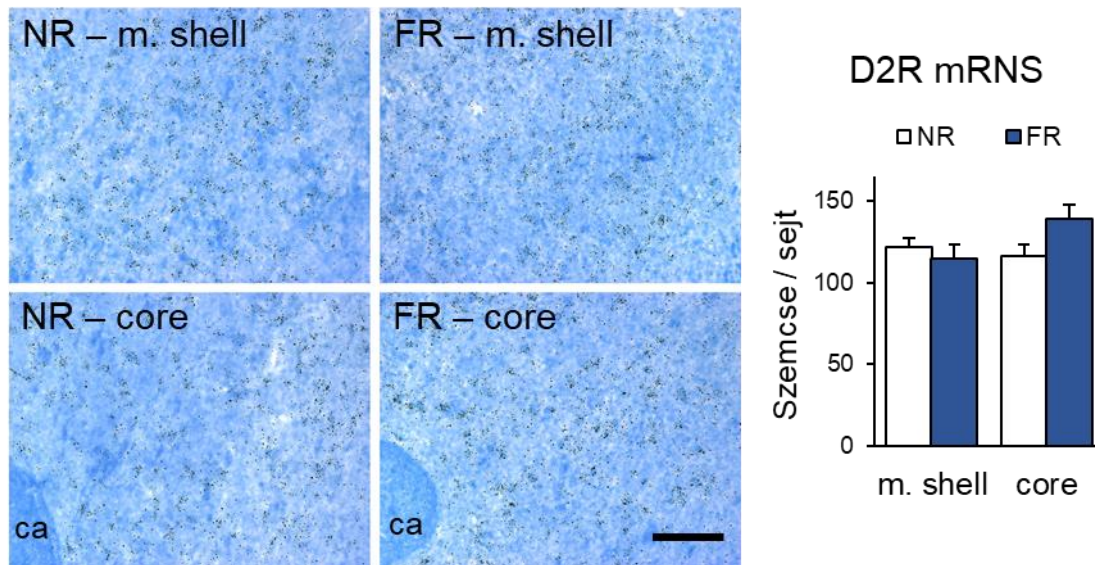
A medialis shell alrégióban jelentősen kevesebb D1R mRNS expresszáldott a neuronok szómáján FR állatokban a NR csoporthoz képest, de ilyen különbséget a core területen nem találtunk (16. ábra). A D2R tekintetében nem találtunk különbséget a csoportok között egyik területen sem (17. ábra).



6. ábra. A dopamin 1-es típusú receptor expressziója a nucleus accumbens területén.

Balra: In situ hibridizáció mutatja a dopamin D1-es receptorának expresszióját a NAc különböző területein NR és FR állatban. Jobbra: ábrázolás: átlag \pm átlag szórása. Student-féle t-próba. NR vs. FR $p < 0,05$. $n = 6$ /csoport. Lépték: 100 μ m.

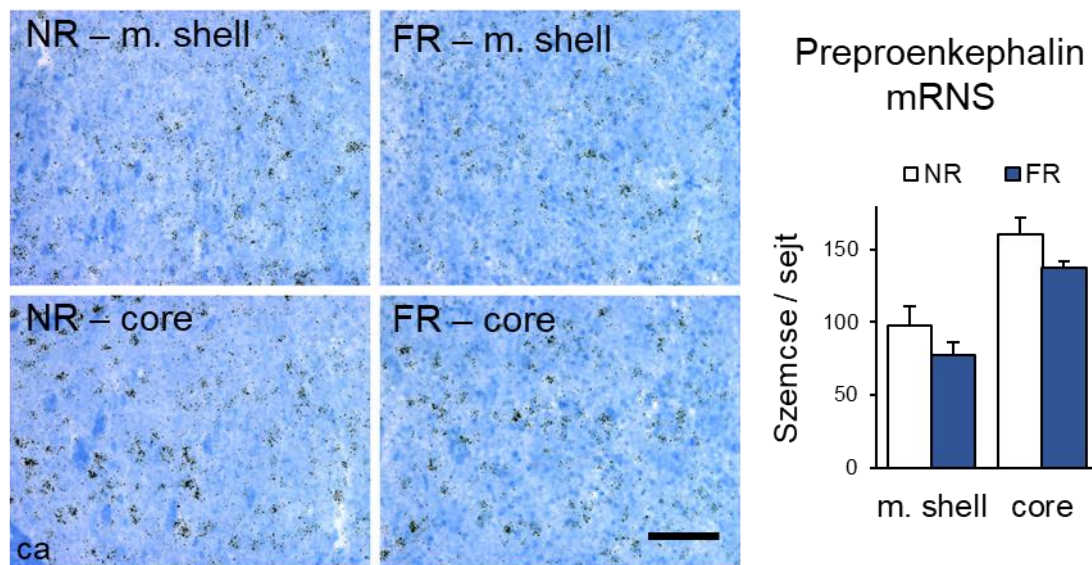
Rövidítések: ca: commissura anterior; D1R: dopamin 1-es típusú receptora; FR: intrauterin fehérjeredukált; m. shell: medialis shell; NR: nem intrauterin fehérjeredukált. (Durst és mtsai 2019)



17. ábra. A dopamin 2-es típusú receptor expressziója a nucleus accumbens területén. Balra: *In situ* hibridizációs reprezentatív képek a dopamin D2-es receptorának expressziójáról a NAc különböző területein NR és FR állatban. Jobbra: Ábrázolás: $\bar{x} \pm \text{SD}$. Student-féle T-próba, illetve Mann-Whitney-féle U-próba alapján: N.S. $n = 6/\text{csoport}$. Lépték: $100 \mu\text{m}$.

Rövidítések: *ca*: *commissura anterior*; *D2R*: dopamin 2-es típusú receptora; *FR*: *intrauterin fehérjeredukált*; *m. shell*: *medialis shell*; *NR*: *nem intrauterin fehérjeredukált*. (Durst és mtsai 2019)

A dopaminreceptorokon kívül a preproenkephalin mRNS expresszióját is kiértékeltek, de nem találtak különbséget a csoportok között (18. ábra).

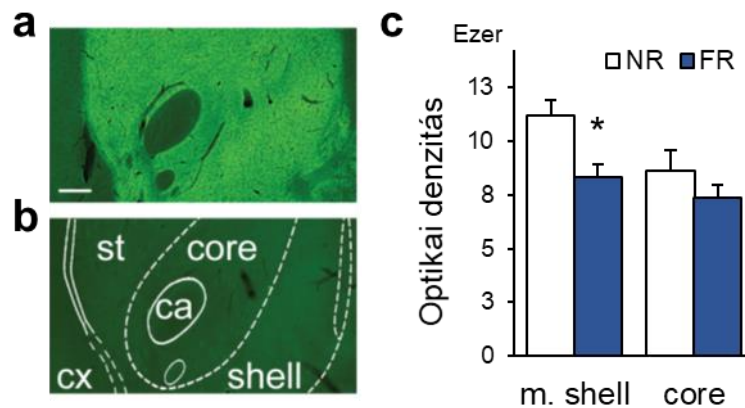


18. ábra. A preproencephalin mRNS expressziója a nucleus accumbens területén

Balra: In situ hibridizáció mutatja a preproenkephalin expresszióját a NAc különböző területein NR és FR állatban. Jobbra: ábrázolás: átlag \pm átlag szórása. Student-féle t-próba, illetve Mann-Whitney – U próba alapján: N.S. $n = 6-5$. Lépték: 100 μ m.

Rövidítések: ca: commissura anterior; FR: intrauterin fehérjeredukált; m. shell: medialis shell; NR: nem intrauterin fehérjeredukált. Publikálatlan adatok.

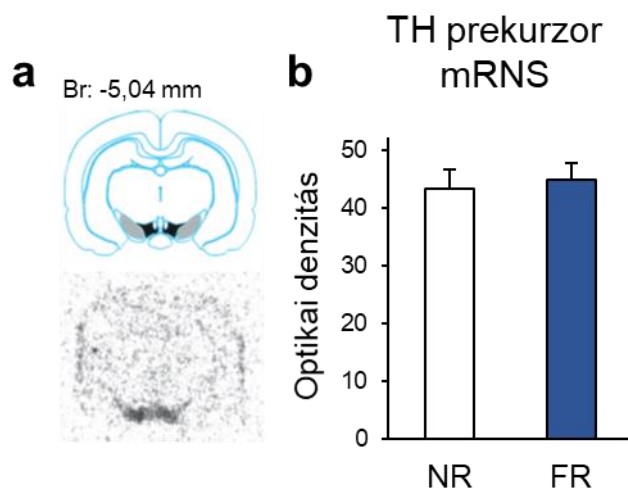
A D1R immunhisztokémia a striatum és a NAc területén jóval erősebb D1R expressziót mutatott, mint más területeken, pl. az agykéregben (19. a ábra). Az immunfestés látszólag homogén jelet adott: a perikaryon, a dendritek, axonok nem voltak megkülönböztethetőek egymástól, ahogy ezt már korábban is leírták (Levey és mtsai 1993). A jel specifikusságát a primer antitest reakciósorból való kihagyásával is ellenőriztük: ekkor nem kaptunk értékelhető jelet (19. b ábra). A D1R-jel optikai denzitását megmérve a medialis shell területén csökkent D1R expresszió igazolódott, amely nem volt kimutatható a core területén (19. c ábra).



19. ábra. DIR immunhisztokémia a nucleus accumbens területén

a. A DIR homogén festődést mutatott a striatum területén. b. A primer antitest nélkül elvégzett immunhisztokémia jelzi, hogy az előbbi jel specifikus. c. A medialis shell területén csökkent a DIR expressziója. NR vs. FR $p < 0,05$. $n = 6$ /csoport. Student-féle t -próba, illetve Mann-Whitney-féle U -próba. $p < 0,05$. Lépték: $250 \mu\text{m}$. Rövidítések: ca: commissura anterior; cx: cortex; FR: intrauterin fehérjeredukált; m. shell: medialis shell; NR: nem intrauterin fehérjeredukált; st: striatum. (Durst és mtsai 2019)

A dopaminháztartás további vizsgálata céljából megmértük a TH precursor mRNS expresszióját a VTA területén, amely közvetlenül a transzkripció mértékét jelzi. Adataink azt mutatták, hogy a TH génexpressziót nem befolyásolták a megváltozott intrauterin körülmények (20. ábra).

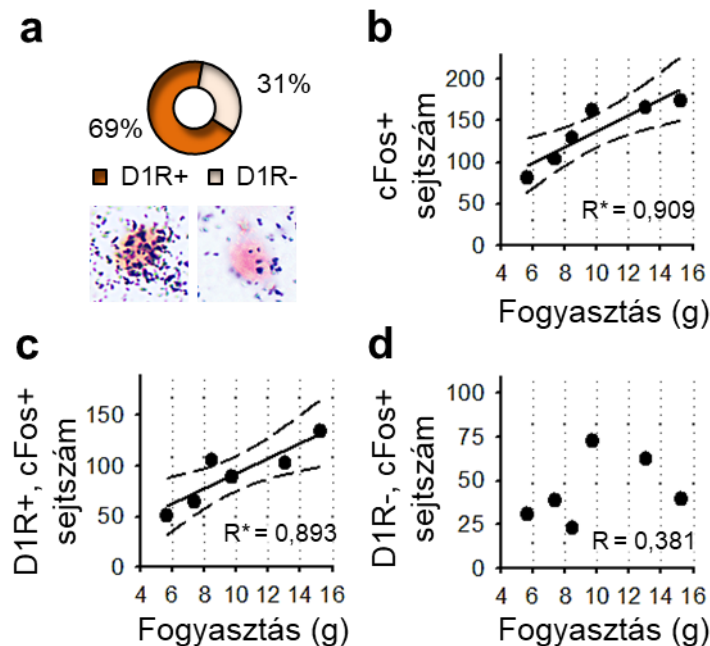


20. ábra: A TH prekursor mRNS expressziója. a: fent: a ventralis tegmentalis area (VTA) területe Paxinos és Watson nyomán a Bregmaponttól 5,04 mm-re caudalis irányban (Paxinos és Watson 2007). A szürke terület a substantia nigrát, a fekete a VTA-t jelöli. Lent: Autoradiográfiás kép a megfelelő szintű metszetről. Látható, hogy a sémás képen jelölt területen van csak TH prekursor mRNS expresszió, a többi területen kizárólag a háttér ad jelet. b: a grafikon az átlag \pm átlag szórása értékeket mutatja. Student-féle T-próba. $n = 6$ /csoport. Rövidítések: FR: intrauterin fehérjeredukált; NR: nem intrauterin fehérjeredukált. (Durst és mtsai 2019)

5.5 A medialis shell-ben található D1R-pozitív neuronok jutalmi tápfelvételben való szerepe

A jutalmi tápfelvétel által aktivált neuronok és a D1R-expresszió intrauterin alultáplálás hatására történő megváltozását a korábbi eredmények megalapozták, de a két eredmény közötti kapcsolatot még nem lehetett bizonyítani. Ennek vizsgálatára normálisan táplált állatokkal (NR) újra elvégeztük a jutalmi tápfelvétel értékelésére szolgáló kísérletet, hogy a D1R és a cFos kolokalizációját értékelhessük a medialis shell területén. Az aktiválódott, cFos-pozitív neuronok több mint 2/3-a ($69 \pm 4\%$) expresszált D1R mRNS-t is (21. a ábra). Itt is ki tudtuk mutatni az erős lineáris korrelációt az elfogyasztott CST mennyisége és a cFos-pozitív sejtek száma között (21. b ábra). Azonban, amikor a D1R-pozitív és D1R-negatív cFos-jelölt alpopulációkat külön vetettük alá a korrelációs analízisnek, az eredmény azt mutatta, hogy csak a D1R-t

expresszáló idegsejtek száma arányos az elfogyasztott magas élvezeti értékkel bíró táppal (21. c, d ábra).

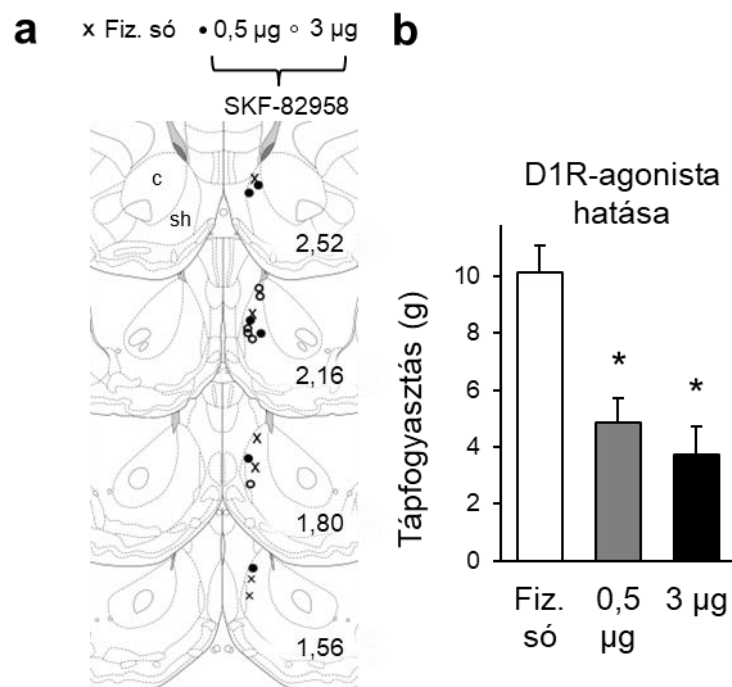


21. ábra. A jutalmi tápfelvétel aktiválta medialis shell neuronok és a DIR kapcsolata.

a. A c-fos-pozitív neuronok kb. 69 %-a expresszál DIR-t. Egy-egy példa kép mutatja a DIR-t expresszáló cFos-pozitív neuront (magas szemcsesűrűség) és a DIR-t nem expresszáló cFos-pozitív neuront (alacsony, basalis szintű szemcsesűrűség). b-d. Az összes cFos-pozitív sejtszám (b), a DIR- és cFos dupla pozitív sejtszám (c), és a cFos-pozitív, de DIR-negatív sejtszám (d) az elfogyasztott cukrozott tej függvényében. $n=6$. Jelmagyarázat: Az egyenes vonalak a lineáris regresszió egyenesét, míg a szagatott vonalak a 95%-os konfidencia intervallumot mutatják. Pearson-korrelációs analízis, R : korrelációs koefficiens. $*p < 0,05$, $n=6$. DIR: dopamin 1-es típusú receptor.

(Durst és mtsai 2019)

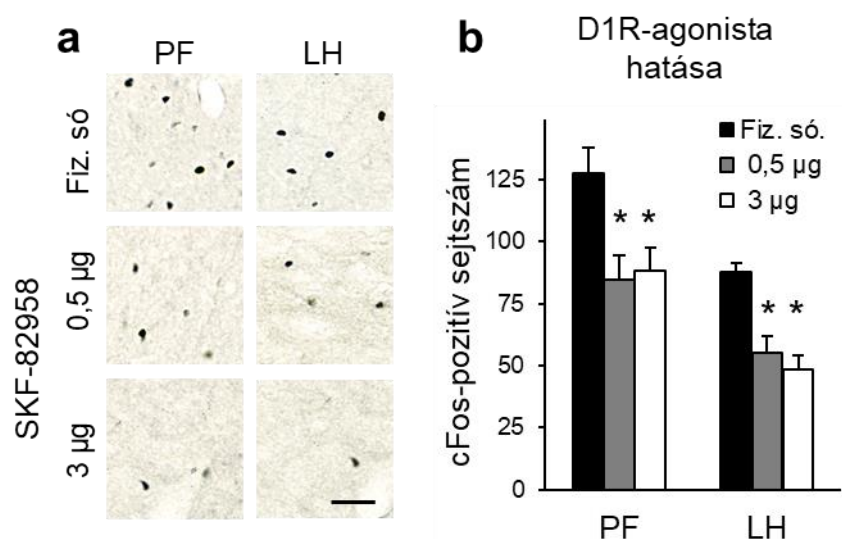
A DIR-nak a táplálékfelvételi jutalmazási rendszerben betöltött szerepe vizsgálatához egy szelektív D1R agonistát, SKF-82958-at juttattunk be NR állatok jobb oldali medialis shell régiójába közvetlenül a jutalmi tápfelvétel előtt (22. a ábra). Az alkalmazott mennyiségek (0,5 és 3 μg) jelentősen csökkentették az elfogyasztott CST mennyiségét, (22. b ábra), valamint a tápfelvétel időtartamát (5. táblázat). A különböző dózisok hatása között nem volt szignifikáns különbség.



22. ábra. A D1R-agonista, SKF-82958 hatása a jutalmi tápfelvételre.

a. Az ábra mutatja az analisisbe került állatokban a lokális injekció központját. Abban az esetben, ha nem a medialis shellben volt az injekció központja, az állat adatait kivettük az elemzésből (ezek nem szerepelnek az ábrán). Az ábra Paxinos munkája nyomán készült (Paxinos és Watson 2007). A számok a Bregmától való távolságot jelzik rostralis irányban, mm-ben. A szimbólumok a beadott anyag entitását jelzik, az ábra fölött jelezve. b. Egyutas ANOVA. $F_{(2,17)} = 10,793$. $p = 0,001$. Tukey-féle post-hoc teszt: $*p < 0,01$. Átlag \pm átlag szórása. $n = 6$. Rövidítések: D1R-agonista: dopamin 1-es típusú receptor agonista, SKF-82958; Fiz. só: fiziológiás sóoldat. (Durst és mtsai 2019)

A csökkent tápfogyasztással összefüggésben, a medialis shell-beli D1R-stimuláció a LHA területén is a cFos-pozitív neuronok számának csökkenéséhez vezetett. A két dózis hasonló mértékben hatott és a csökkenés mindkét vizsgált régióban látványos volt (23. ábra).



23. ábra. A medialis shell régióba injektált D1R agonista, SKF82958 hatása a lateralis hypothalamus sejtaktivációjára jutalmi tápfogyasztás alatt.

a. Immunhisztokémiai képeken látható a két vizsgált LHA-terület, a perifornicalis és a lateralis alterület cFos-pozitív sejtmagjainak eloszlása. Lépték: 50 µm. b. Egyutas ANOVA. PF: $F_{(2,17)} = 6,006$, $p = 0,012$. LH: $F_{(2,16)} = 15,426$, $p < 0,001$. Tukey post-hoc teszt: $*p < 0,05$. Átlag ± átlag szórása. $n = 6$. Rövidítések: D1R: dopamin 1-es típusú receptor; Fiz. só: fiziológiás sóoldat; LH: a lateralis hypothalamicus terület lateralis része; PF: perifornicalis lateralis hypothalamus. (Durst és mtsai 2019)

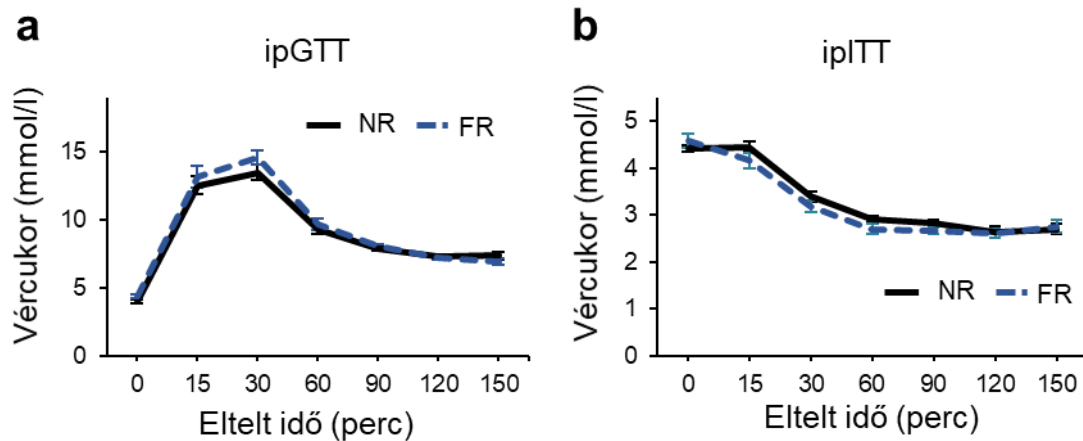
A D1R-agonista beadása nem befolyásolta szignifikánsan a tápfogyasztási mintázat 'liking'-gal összefüggésbe hozható elemeit, mint a kezdeti és az átlagos nyelvcsapási frekvenciát, az átlagos klaszterhosszt és klaszter időtartamot (6. táblázat).

6. táblázat. A D1R-agonista injekció után tesztelt jutalmi tápfelvétel finommotorikájának elemzése. Egyutas ANOVA, illetve Kruskal-Wallis próba. Tápfelvétel időtartama: $F_{(2,17)} = 7,93$. $p = 0,004$. Tukey-féle post-hoc teszt: $*p < 0,05$. Az adatok átlag ± átlag szórása alakban vannak megadva. $n = 6$. (Durst és mtsai 2019)

	tápfelvétel időtartama (mp)	kezdeti nyelvcsapási sebesség (nyelvcsapás/mp)	átlagos nyelvcsapási sebesség (nyelvcsapás/mp)	átlagos klaszter méret (nyelvcsapás)	átlagos klaszter-hossz (mp)
Fiziológiás sóoldat	402 ± 29	6,6 ± 0,1	6,5 ± 0,1	68,3 ± 5,9	10,5 ± 0,8
0,5 µg SKF-82958	232* ± 42	7,0 ± 0,3	6,6 ± 0,2	59,9 ± 9,5	9,2 ± 1,4
3 µg SKF-82958	181* ± 50	7,3 ± 0,1	6,9 ± 0,1	52,4 ± 7,9	7,5 ± 1,0

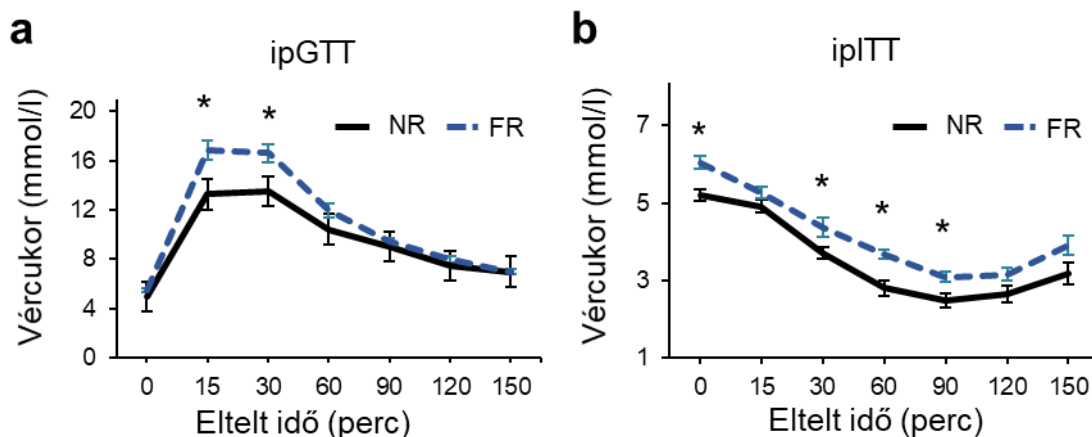
5.6 Az FR állatok cukorháztartásának vizsgálata

Az intrauterin alultáplált állatok vizsgálatát intraperitoneálisan beadott glükóz és inzulin hatására változó vércukorszint mérésével folytattuk. 6 hetesen még nem volt különbség sem a beadott glükóznak, sem a beadott inzulinnak hatására kialakuló változásokban a csoportok között (24. ábra).



24. ábra. Intraperitoneális glükóz- (ipGTT) (a) és inzulinteszt (ipITT) (b) 6 hetes állatoknak. $n = 8$. Rövidítés: FR: intrauterin fehérjeredukált; NR: nem fehérjeredukált. (Durst és mtsai 2022)

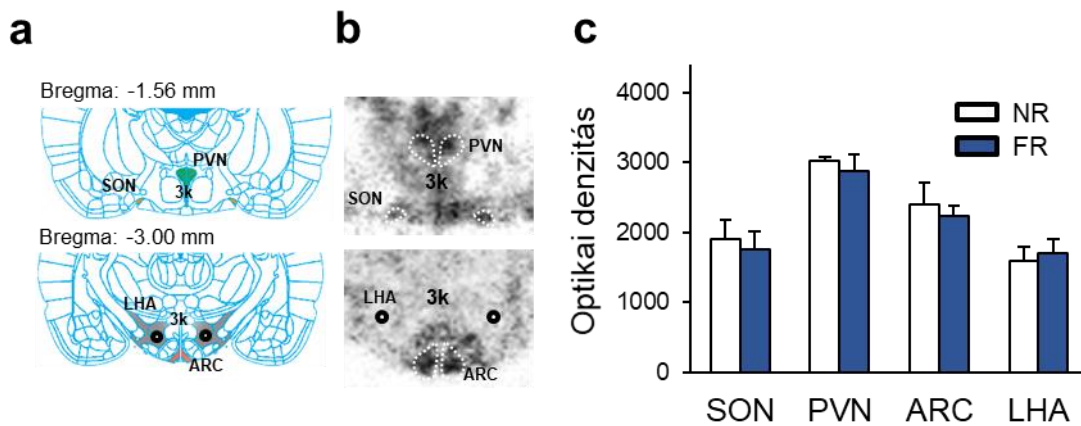
Azonban a 12. héten végzett mérések azt mutatták, hogy az FR állatok glükóztoleranciája és inzulinérzékenysége is lecsökkent a NR csoporthoz képest (25. ábra). Ráadásul, ha a két teszt előtt közvetlenül mért éhomi vércukorértékeket („0. időpont”) összevonnjuk, akkor látható, hogy az FR állatok 12 hetesen már magasabb vércukorértékkel rendelkeznek, mint NR társaik (NR: $5,09 \pm 0,12$ mmol/l, FR: $5,77 \pm 0,14$ mmol/l, Student-féle t-teszt, $p < 0,001$).



25. ábra. Intraperitoneális glükóz- (ipGTT) (a) és inzulinteszt (ipITT) (b) 12 hetes állatoknak. a. Kétutas ismételt méréses ANOVA, fenotípus hatása: $F_{(1, 78)} = 6,494$, $p = 0,023$, idő hatása: $F_{(6, 78)} = 87,342$, $p < 0,001$, interakció: $F_{(6,78)} = 2,972$, $p = 0,011$. b. Kétutas ismételt méréses ANOVA, fenotípus hatása: $F_{(1,81)} = 18,714$, $p < 0,001$, idő hatása: $F_{(6, 81)} = 93,725$, $p < 0,001$. Tukey-féle post-hoc tesztek. * $p < 0,05$ Átlag \pm átlag szórása. $n = 8$. Rövidítés: FR: intrauterin fehérjeredukált; NR: nem fehérjeredukált. (Durst és mtsai 2022)

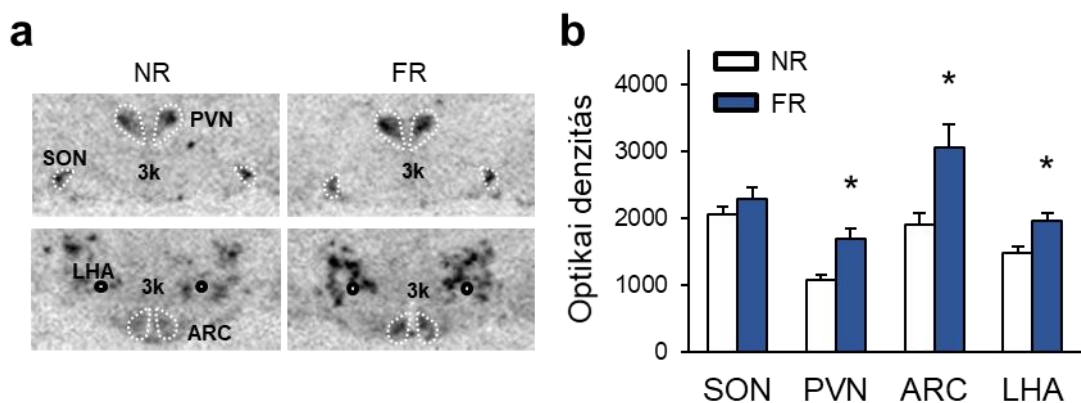
5.7 Nucb2 génextpresszió a hypothalamusban

In situ hibridizációval megvizsgáltuk a nesfatin-1 fehérje prekursorának, a Nucb2 fehérje mRNS-ének az expresszióját a hypothalamus különböző területein. Újszülött patkány agyában a Nucb2 minden vizsgált területen kimutatható volt, de nem volt génextpressziós különbség a csoportok között (26. ábra). Ezzel ellentétben, felnőtt, 12 hetes állatokból származó agyakon a PVN, ARC és LHA területén magasabb expressziós szintet mértünk (27. ábra).



26. ábra. *Nucb2* in situ hibridizáció újszülött állatban.

a. Paxinos és Watson atlasza (Paxinos és Watson 2007) alapján készült sémás ábra mutatja azon hypothalamicus magok elhelyezkedését, ahol a mérés történt. A coronalis metszetek Bregmától való távolságát jelzi az ábra. b. Autoradiográfias képen láthatóak ugyanezen szintek *Nucb2* ISH után. c. Oszlopdiaagram szemlélteti a *Nucb2* mRNS szintjét újszülött állatokban a különböző hypothalamicus magvakban. Átlag \pm átlag szórása. $n = 4-6$. Rövidítések: 3k: harmadik agykamra; ARC: nucleus arcuatus; FR: intrauterin fehérjeredukált; LHA: lateralis hypothalamus; NR: nem fehérjeredukált; PVN: nucleus paraventricularis; SON: nucleus supraopticus. (Durst és mtsai 2022)



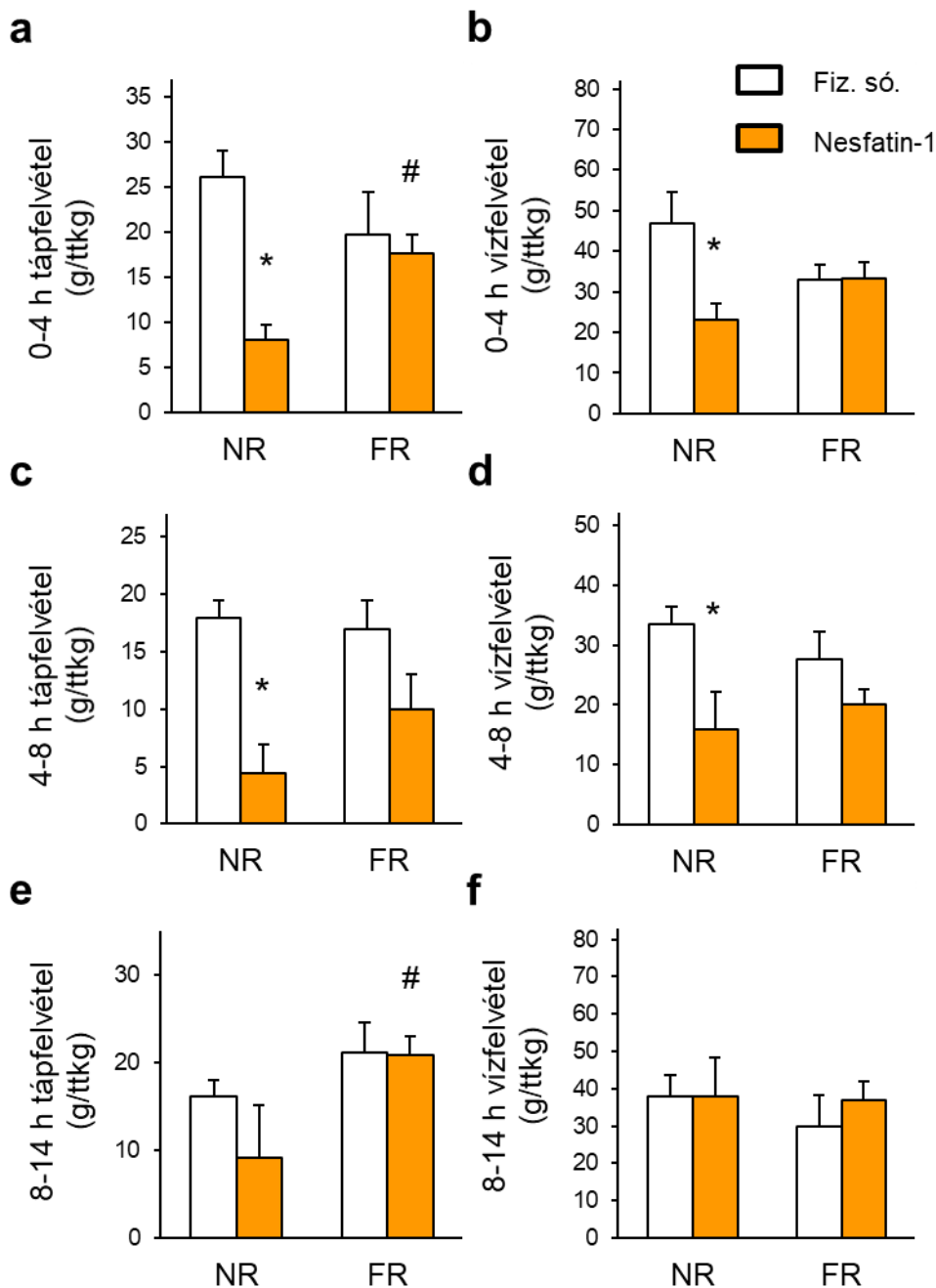
27. ábra. *Nucb2* expressziója felnőtt állatban.

a. Autoradiográfias képen láthatóak a vizsgált szintek egy-egy NR és FR állatból *Nucb2* in situ hibridizáció után. b. Oszlopdiaagram szemlélteti a *Nucb2* mRNS szintjét felnőtt állatokban. Student-féle *t*-próba, illetve Mann-Whitney *U*-próba, $*p < 0,05$. Átlag \pm átlag szórása. $n = 4-6$. Rövidítések: 3k: harmadik agykamra; ARC: nucleus arcuatus; FR: intrauterin fehérjeredukált; LHA: lateralis hypothalamus; NR: nem

fehérjeredukált; PVN: nucleus paraventricularis; SON: nucleus supraopticus. (Durst és mtsai 2022)

5.8 A nesfatin-1 hatása a táp- és vízfelvételekre

Icv nesfatin-1-et juttattunk 12 hetes patkányokba a sötét, aktív periódus kezdetekor és egy éjszakán keresztül mértük a táp- és vízfogyasztásukat. Míg a nesfatin-1 NR állatokba beadva a vivőanyaghoz képest az első, majd a második 4 órában is csökkentette a táp- és vízfogyasztást, az FR állatoknál ezt nem tapasztaltuk (28. ábra). Úgy tűnt, hogy nem reagálnak úgy a nesfatin-1-re, mint az normális, tehát táp- és vízfelvétel tekintetében rezisztensek a hypothalamicus nesfatin-1 hatásra.



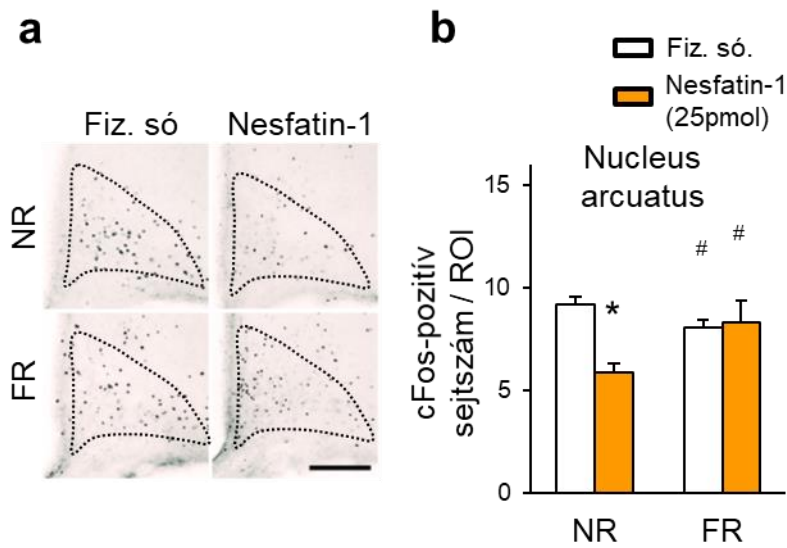
28. ábra. Az akut icv nesfatin-1 (25 pmol), illetve a vivőanyagként használt fiziológiás sóoldat hatása a nem intrauterin fehérjeredukált (NR) és az intrauterin fehérjeredukált (FR) patkányok éjjeli táp- és vízfelvételére.

0 a nesfatin-1-beadás időpontja. a és b: Az első négy órában mind a táp- (a), mind a vízfelvétel (b) csökkent nesfatin-1 hatására NR állatokban, F állatokban nem. Kétutas ANOVA, tápfelvétel: kezelés hatása: $F_{(1,16)} = 10,43$, $p = 0,005$; kezelés x fenotípus interakció: $F_{(1,16)} = 6,530$, $p = 0,021$; vízfelvétel: kezelés x fenotípus: $F_{(1,16)} = 5,66$, $p = 0,03$. c és d: 4-8 h. Kétutas ANOVA: tápfelvétel, kezelés hatása: $F_{(1,16)} = 16,85$,

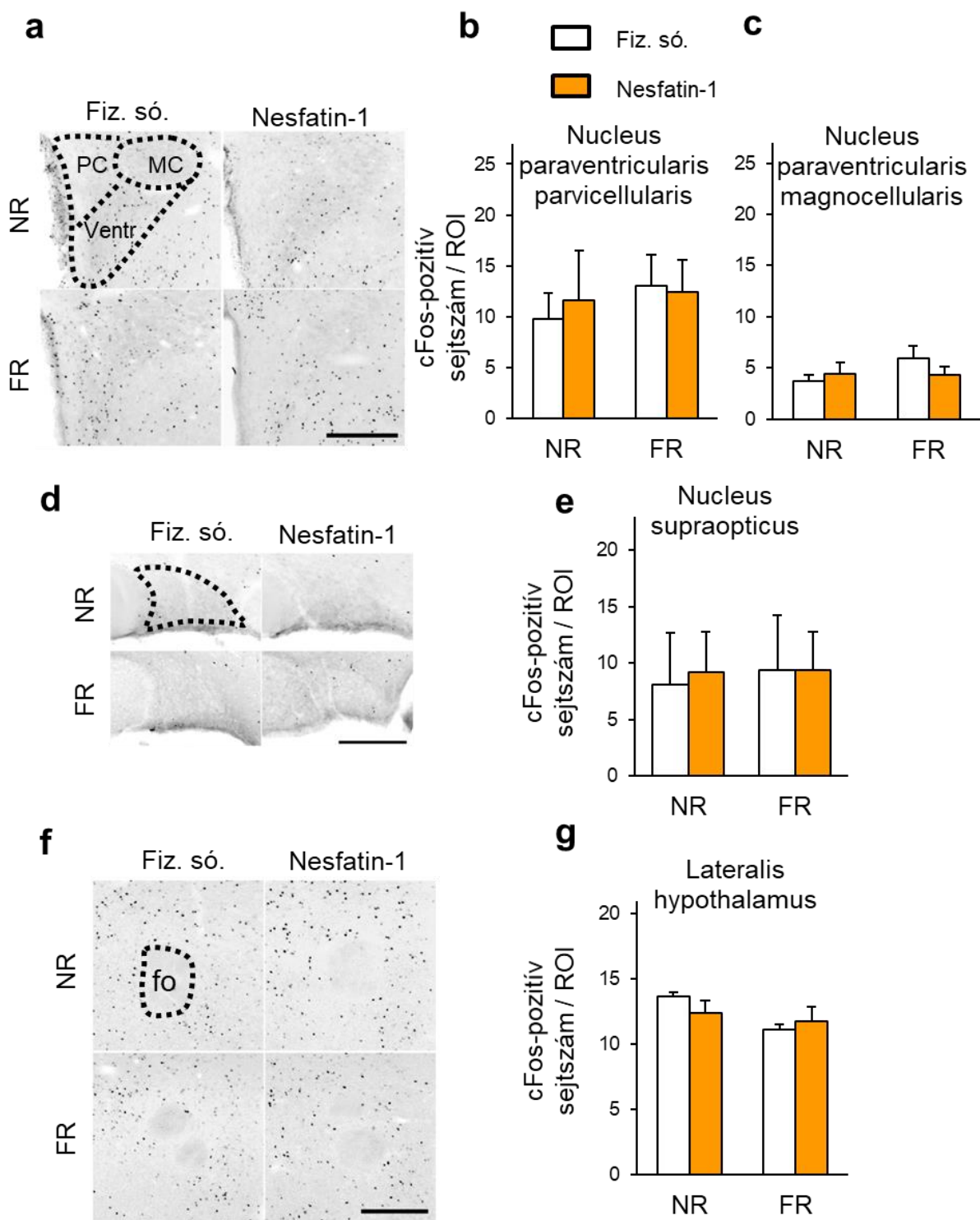
$p < 0,001$, vízfelvétel: kezelés hatása: $F_{(1,16)} = 8,51$, $p < 0,01$. e és f: 8-12 h. tápfelvétel: kétutas ANOVA, fenotípus hatása: $F_{(1,16)} = 5,04$, $p = 0,039$; NR vs. FR a nesfatin-1-kapottakon belül: $p = 0,041$. Tukey post-hoc tesztek. * $p < 0,05$ vs. NR-fiz.só. # $p < 0,05$ vs. NR-nesfatin-1. A grafikon az átlag \pm átlag szórását mutatja. $n = 5$. (Durst és mtsai 2022)

5.9 A nesfatin-1 hatása a hypothalamus éhezés-indukálta sejtaktivációjára

További kérdésként felmerült, hogy tudunk-e azonosítani a hypothalamusban egy olyan sejtcsoportot, amely aktiválódása szintén zavart szenved orexigén hajtóerő (tápfelvételi készlet) alatt nesfatin-1 hatására. Négy hypothalamicus régió (ARC, PVN, SON, LHA) sejtjeinek aktiválódását mértük le cFos markerrel, nesfatin-1 icv beadása után, amely 24 órás éheztetés végén történt. Azt láttuk, hogy egyedül az ARC régióban változott, nevezetesen csökkent a cFos-pozitív sejtek száma a nesfatin-1 hatására NR állatokban. Ez a csökkenés azonban nem volt kimutatható FR állatok esetén, tehát az FR állatok rezisztensek voltak icv beadott nesfatin-1-re (29. ábra). Ez az eredmény a tápfelvételre vonatkozó nesfatin-rezisztenciával együtt világosan mutatja, hogy a nesfatin-1 jelátvitel valamilyen módon sérül az intrauterin alultáplált állatokban. A PVN, SON, LHA területén nem tapasztaltunk sejtaktivációs különbséget a csoportok között (30. ábra).



29. ábra. A cFos expressziója az ARC-ban éheztetett, nesfatin-1-kezelt állatokban.
 a. cFos immunhisztokémiai képek a jelzett kísérleti csoportokból az ARC területén. b. Oszlopdiaagram mutatja a kétutas ANOVA eredményét. A kezelés hatása: $F_{(1,24)} = 5,743$, $p = 0,025$; kezelés és fenotípus interakciója: $F_{(1,24)} = 7,671$, $p = 0,011$. Tukey-féle post-hoc teszt: $*p < 0.05$ vs. NR- fiz. só; $\#p < 0,05$ vs. NR-nesfatin-1. Átlag \pm átlag szórása, $n = 7$. Lépték: $200 \mu\text{m}$. Rövidítések: fiz. só.: fiziológiás sóoldat (vivőanyag, illetve kontroll oldatként); FR: intrauterin fehérjeredukált; NR: nem fehérjeredukált. (Durst és mtsai 2022)



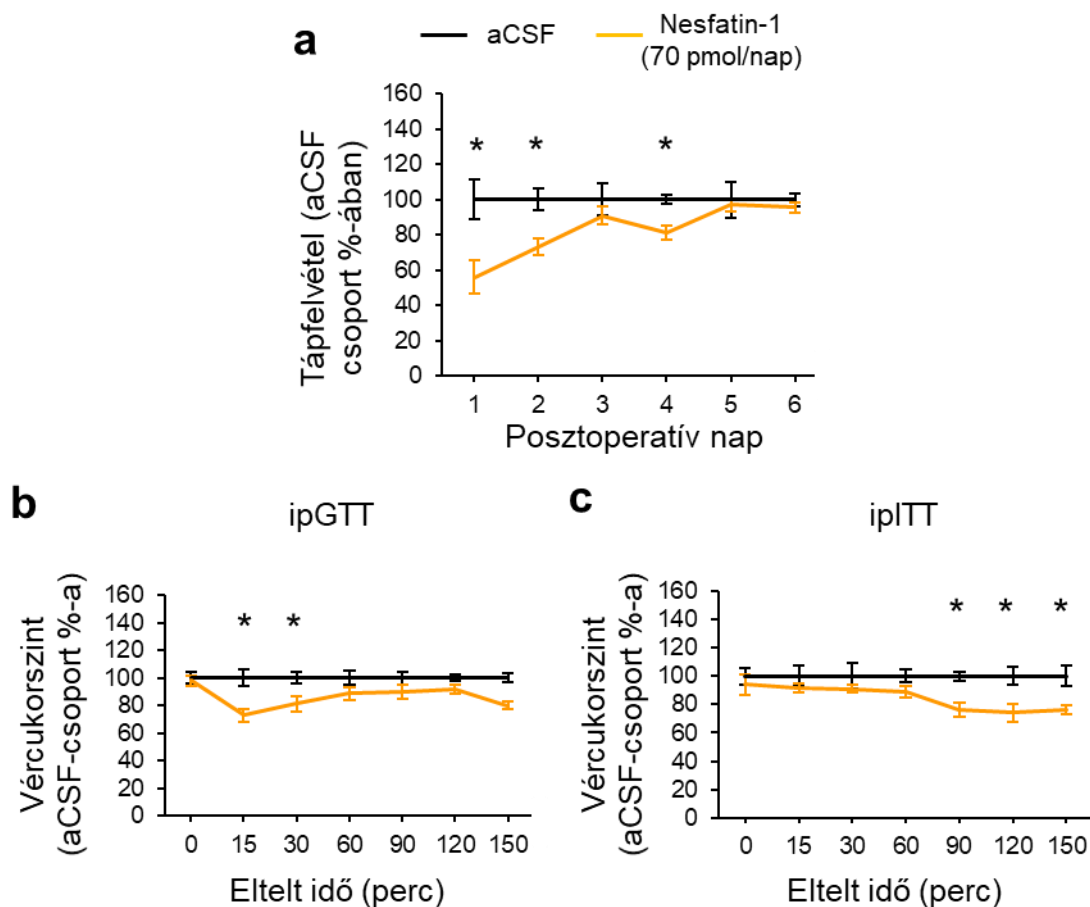
30. ábra. A cFos expressziója a hypothalamus PVN, SON, LHA területein éhezettett, nesfatin-1-kezelt állatokban

a, d, f: cFos immunhisztokémiai képek a jelzett kísérleti csoportokból a PVN (a) alterületeivel, az SON (d) körberajzolásával és a LHA (f) közepével, jelezve a fornixot. b-c. Oszlopdiaagram mutatja a PVN két jelzett alterületének, a SON és a LHA adatait.

Lépték: 300 μm. Rövidítések: ARC: nucleus arcuatus; fiz.só.: fiziológias sóoldat; fo: fornix; FR: intrauterin fehérjeredukált; LHA: lateralis hypothalamus; MC: magnocellularis; NR: nem intrauterin fehérjeredukált; PC: parvicellularis; PVN:nucleus paraventricularis; SON: nucleus supraopticus; ventr: ventralis. (Durst és mtsai 2022)

5.10 A krónikus centrális nesfatin-1 kezelés cukorháztartásra való hatása

Következő kérdésként feltettük, hogy vajon a cukorháztartás FR patkányokban tapasztalt elváltozásai összefügghetnek-e a tapasztalt nesfatin-1 rezisztenciával. Mivel irodalmi adatok arra utalnak, hogy az egyszeri, 25 pmol centrális nesfatin-1 beadásnak nincs számottevő hatása a vércukorszintre (Li és mtsai 2013, Su és mtsai 2010), 7 napos icv nesfatin-1 kezelésnek vetettük alá állatainkat (70 pmol/nap). Feltételeztük, hogy a krónikus kezelés nesfatin-rezisztenciát okoz és az NR állatok kezelése után elvégzett cukor- és inzulin tesztek ugyanazt az eredményt adják, mint a nesfatin-1-rezisztens FR állatok GTT és ITT tesztjei. NR állatainkban a kezelés láthatóan lerontotta a műtétből való felépülés sebességét (0-6 nap testtömeg-változás; vivőanyag-kezeltek: $1 \pm 3,2$ g, nesfatin-1-kezeltek: $-14,8 \pm 2,4$ g, $p = 0,034$). A nesfatin-1-kezelés az NR állatok tápfelvételét is lecsökkentette (31. a ábra). Az ipGTT és az ipITT, amely teszteket a krónikus kezelés végén végeztünk el, emelkedett glükóztoleranciát (31. b ábra) és inzulinérzékenységet (31. c ábra) igazolt a nesfatin-1-kezelt állatokban.



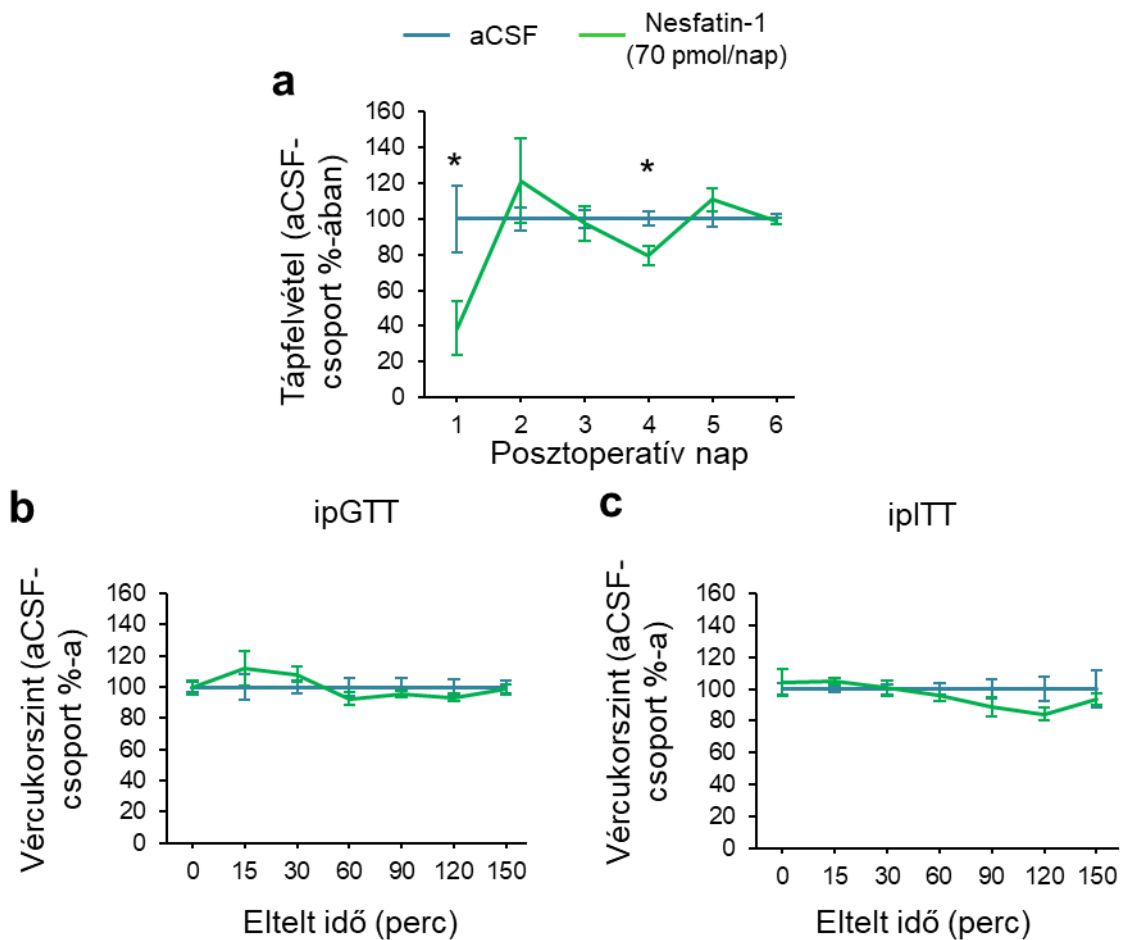
31. ábra. Krónikus centrális (icv) nesfatin-1-infúzió hatásai NR állatban.

A nulladik nap a minipumpa implantációt és a nesfatin-1 infúzió kezdetét jelenti.

a. Testtömegre vonatkoztatott tápfelvétel a vivőanyagot kapott csoport értékeinek %-ában. Student-féle t-próba, aCSF vs. Nesfatin-1, 1. nap: $*p = 0,013$, 2. nap: $*p = 0,007$, 4. nap: $*p = 0,003$. b. ipGTT a vivőanyagot kapott csoport értékeinek %-ában. Kétutas ANOVA, a fenotípus hatása: $F_{(1,60)} = 17,554$, $p = 0,002$, az idő hatása: $F_{(6,60)} = 81,649$, $p < 0,001$, az idő és a fenotípus interakciója: $F_{(6,60)} = 3,760$, $p = 0,003$. c. ipITT a vivőanyagot kapott csoport %-ában. Kétutas ANOVA, a fenotípus hatása: $F_{(1,60)} = 19,324$, $p = 0,001$, az idő hatása: $F_{(6,60)} = 23,382$, $p < 0,001$. Tukey-féle post-hoc tesztek (b és c). aCSF vs. Nesfatin-1 $*p < 0,05$. Az adatok az aCSF-kezelt csoport átlagának %-ában \pm átlag szórása vannak ábrázolva. $n = 6$. Rövidítések: aCSF: mesterséges agy-gerincvelői folyadék; ipGTT: intraperitonealis glükóztolerancia teszt; ipITT: intraperitonealis inzulintolerancia teszt. (Durst és mtsai 2022)

A kezelést megismételtük FR állatokon, feltéve a kérdést, hogy vajon az esetükben akután kimutatott nesfatin-1 rezisztencia krónikus nesfatinkezelés esetén érvényesül-e a

tápfelvétel és a cukorháztartás tekintetében. A műtött FR állatok nagyjából ugyanúgy regenerálódtak (0-6 nap testtömeg-változás; vivőanyag-kezeltek: $2,2 \pm 2,1$ g, nesfatin-1-kezeltek: $5,3 \pm 4,8$ g, $p = 0,557$). Érdekes módon a nesfatin-1-kezeltek tápfelvétele az első és a negyedik napon alacsonyabb volt, mint a vivőanyagot-injektált csoportnak (32. a ábra). Azonban sem az intraperitonealisan alkalmazott glükóz, sem az intraperitonealis inzulin hatására nem különbözött a vércukorgörbe a két kezelési csoport között az FR állatokban (32. b ábra).



32. ábra. Krónikus centrális (icv) nesfatin-1-infúzió eredményei FR állatban. A nulladik nap az minipumpa implantációt és a nesfatin-1 infúzió kezdetét jelenti.

a. Testtömegre vonatkoztatott tápfelvétel a vivőanyagot kapott csoport értékeinek %-ában. Student-féle t-próba, aCSF vs. Nesfatin-1, 1. nap: $*p = 0,029$, 4. nap: $*p = 0,011$.
b-c. ipGTT (b) és ipITT (c) Kétutas ANOVA. Az adatok az aCSF-kezelte csoport átlagának %-ában \pm átlag szórása vannak ábrázolva. $n = 6$. Rövidítések: aCSF: mesterséges agy-gerincvelői folyadék; ipGTT: intraperitonealis glükóztolerancia teszt; ipITT: intraperitonealis inzulintolerancia teszt. (Durst és mtsai 2022)

6. Megbeszélés

6.1 FR modellünk fejlődési jellemzői

A jutalmi tápfelvétel és a Nucb2/nesfatin-1-háztartás vizsgálatát állatmodellen végeztük. Olyan állatmodellt szerettünk volna használni, amely idősebb korban hajlamos metabolikus betegségekre, különösen 2TDM kialakulására. Ismert, hogy az intrauterin alultáplálás túlevéshez, illetve a táplálék jutalmi értékelésének megváltozásához vezethet (Desai és mtsai 2005, Laureano és mtsai 2016, Tonkiss és mtsai 1990, Vickers és mtsai 2000). A „takarékos fenotípus” hipotézis alapján (Barker, Gluckman, és mtsai 1993) az FR állapot a szervezet egészének prediktív adaptív válasza keretében a szervek alternatív metabolikus programozását okozza a tápanyagok lehető leghatékonyabb hasznosítása érdekében. Ennek egyik jele az intenzív „catch-up” (felzárkózó) növekedés.

Nagyon sok intrauterin alultáplált modell létezik (Martin-Gronert és Ozanne 2007). Az általunk használt, intrauterin fehérje alultáplálással előállított fenotípus jól modellezi a későn jelentkező, metabolikus szindrómával társuló elhízást (Ozanne és mtsai 2005). Fontos azonban hangsúlyozni, hogy ennek az állapotnak a felnőttkori megjelenése nagyban függ a születést követő táplálástól (Coupe és mtsai 2009, Lim és mtsai 2011). Ha közvetlenül a születés után az anyaállat újra normál tápot kap, a kölykök hamar utolérik normál társaikat, tehát a „catch-up” növekedés hamar következik be. Ha azonban az anyát a szoptatás alatt is csökkentett fehérjetartalmú (vagy más szempontból redukált) tápon tartjuk, későn következik be a „catch-up” növekedés. A későn bekövetkező „catch-up” növekedés, illetve a magas kalóriatartalmú ételek előrehozzák a metabolikus szindróma megjelenését (Coupe és mtsai 2009, Vickers és mtsai 2000), míg ezen faktorok hiánya későbbre tolja azt (Erhuma és mtsai 2007, Lim és mtsai 2011).

A mi kísérleti alanyaink olyan fiatal felnőtt állatok voltak, amelyek anyja a születés után visszakapta a normál tápot, őket pedig az elválasztástól kezdve normál patkánytáppal etettük. Ennek megfelelően a „catch-up” növekedés korán kezdődött, de még nem az első héten. A születéskor ugyanis az FR csoport tagjai kisebbek voltak, mint az NR-ek, így gyengébbek is (11. a ábra). Ez tükröződött az első hetes gyarapodási

adatokban, amikor testtömegre viszonyítva sokkal kevesebbet gyarapodtak, mint az NR-ek (11. c ábra). A második hétre viszont megerősödtek, és a második, harmadik, ötödik és hatodik héten is többet nőttek, mint a nem-alultáplált csoport. Mivel a negyedik héttől végzett tápfelvétel-mérés nem mutatott különbséget a csoportok között, jobb táphasznosítást feltételezhetünk az ötödik és hatodik héten. Erre utal az ebben az időszakban egységnyi tápfelvételre számított gyarapodásnak FR-ekre jellemző többlete is. Az anabolikus folyamatokról még pontosabb képet metabolikus ketrec használatával kaphattunk volna. Mivel ilyen adataink nincsenek, az anabolikus folyamatok további elemzésébe nem bocsátkozhatunk. Látszik tehát, hogy FR állataink ún. korai „catch-up” növekedést mutattak, tehát a korábban említett irodalmi adatok szerint késői metabolikus eltérések jellemzőek rájuk. Hyperphagiát, túlevést azonban csak a 11. héttől lehetett megfigyelni az ő esetükben (11. d ábra). A kísérleteket azért jellemzően a 12-14 hetes életkorban végeztük, mert ezek az állatok már kifejlett, felnőtt állatoknak számíthatnak, esetükben a hyperphagia is megjelent, azonban testtömegükben még nem különböztek kontroll társaiktól. Ez azért is fontos, mert a testtömeg számos olyan tényezőt befolyásol, amelyek részt vesznek a metabolizmusban, de így mi az eltérő testtömeg oksági befolyásától eltekinthettünk.

A fentiekén túl FR modellünk még arról is ismert, hogy az állatok még 9 hónaposan is normális lipidprofillal, normális postprandialis vércukor- és inzulinszinttel rendelkeznek. Komoly eltérés az előbbi paraméterekben később várható (Coupe és mtsai 2009, Erhuma és mtsai 2007). A zsírtömeg mérete szintén nem különbözik még ekkor (Bellinger és mtsai 2006, Bieswal és mtsai 2006), amelyet saját MRI-mérésünk is alátámaszt (3. táblázat). Ezek a jelenségek arra utalnak, hogy ebben az életkorban a metabolikus szabályozásnak még elég mozgástere, lehetősége van arra, hogy a kezdődő metabolikus eltéréseket kordában tartsa. Jó példa erre a zsírdús táp preferenciája, amelyet a Bevezetésben részletezett korábbi kísérleteinkben mutattunk ki. Bár az FR állatok többet ettek zsírdús tápból 12 hetes korban, a párhuzamosan adott normál tápból viszont kevesebbet, tehát az összes kalóriabevitelüket így kordában tudták tartani (8. ábra) (Durst és mtsai 2022). Kérdésként felmerülhet, hogy hogyan lehet az, hogy abban a kísérletben az összesített kalóriabevitel nem különbözött a csoportok között, míg jelen méréseink a 11. héttől hyperphagiát mutattak. A két mérés közé azonban ilyen értelemben nem lehet egyenlőségjelet tenni, hiszen jelenleg tárgyalt, normál tápfelvétel-

mérésünkben csak egyféle tápot fogyasztottak az állatok, zavartalan, megszokott környezetben, más befolyásoló tényező nélkül, tehát a mérési körülmények több tényezőben különböztek.

A modell tulajdonságairól összefoglalásként elmondható, hogy klinikai mértékben nem alakultak ki eltérések a vizsgált életkorban. Ez azért fontos, mert így azokat a folyamatokat tudtuk vizsgálni, amelyek megelőzik a később kialakuló klinikai eltéréseket és nem kellett elkülönítenünk őket a betegségeket követő, kísérő változásoktól.

6.2 A jutalmi tápfelvétel értékelése

Amikor a kísérleti állatoknak a jutalmi tápfogyasztását vizsgáltuk, az FR állatok jelentősen többet fogyasztottak a magas élvezeti értékkel bíró CST-ből, mint kontroll társaik (4. táblázat). Az a tény, hogy jóllakott állatok nappal, nem a normális tápfelvételi idejükben rövid idő alatt jelentős mennyiséget fogyasztanak az édes tápból, önmagában a jutalmi tápfelvétel fokozott jelenlétére utal, mégpedig elsősorban a „wanting” vonatkozásában (Berridge 1996). Tonkiss és munkatársai egy operáns kondicionálási feladatot használó kísérletükről leírták, hogy az FR állatok magasabb válaszkészséggel reagálnak cukoroldatra, mint a kontrollok (Tonkiss és mtsai 1990), ami ugyanígy, fokozott motivációt jelent. Abból kiindulva, hogy a jutalmi mechanizmus két alapeleme a „liking” és a „wanting” együtt határozzák meg a fogyasztást, mi a „liking” paramétereit szeretnénk volna közelebbről megvizsgálni (Davis és Smith 1992, Dwyer 2012). A nyelvcsapási klaszterek mérete és a kezdeti nyelvcsapási frekvencia az ízletességre való hedonikus válaszként azonosítható (Davis és Smith 1992, Smith 2001). Ezen paraméterek azonban nem különböztek szignifikánsan kísérleti csoportjaink között (4. táblázat), így nem tartjuk valószínűnek, hogy az FR állatoknál fokozott hedonikus, azaz „liking” reakció játszana fontos szerepet a jutalmi tápfelvételben tapasztalt különbségben. Fenti tényezők, illetve a későbbiekben részletezendő dopaminreceptor-változás egyaránt a „wanting” tényező, a motivációs aspektus megváltozását sugallják.

6.3 A jutalmi tápfelvétel hatása a nucleus accumbens sejtaktivációjára

Az édes íz magas élvezeti értékkel bír és intenzív neuronális aktivációt okoz az accumbens mag területén (Hajnal és mtsai 2009). Az aktiválódott sejtek mennyisége függhetne a helyben leadott dopamin mennyiségétől, hiszen például a dopaminleadás egyenesen arányos az elfogyasztott cukor mennyiségével patkányok esetében (Duong és Weingarten 1993, Hajnal és mtsai 2004). Mi azonban a NAc egyik alterületén sem láttunk magasabb számú cFos-t kifejező sejtmagot az FR állatoknál, amelyek (fokozott motiváció mellett) több CST-et fogyasztottak (12. ábra). Tehát nem mondhatjuk, hogy a több magas élvezeti értékkel bíró táp felvétele erősebb sejtaktivációs választ váltott ki belőlük. Ehelyett az alterületek aktiválódó neuronjainak számát és az elfogyasztott CST mennyiségét állatonként egymáshoz viszonyítva kiderült, hogy egyéni összefüggés van az elfogyasztott élvezetes táp és a medialis shell területén aktiválódó sejtek száma között (13. ábra). A neuronok aktivációja egyenesen arányos az elfogyasztott édes táppal. Tehát a cFos az elfogyasztott jutalmi táp egyfajta „lenyomata” a medialis shellben. Azonban ha a cFos „lenyomat”, akkor az egységnyi elfogyasztott CST-re különböző cFos-mennyiség esik a két csoportban. Tehát az FR medialis shell régiója csökkent érzékenységgel rendelkezik a jutalmi tápfogyasztásra, hiszen a kontrollban aktiválódó neuronmennyiséget csak magasabb CST elfogyasztásával tudja elérni. Azt is kimutattuk, hogy ezekben a sejtekben jellemzően D1R fejeződik ki (21. ábra).

A ventralis shell aktiválódó neuronjainak száma nem korrelált az elfogyasztott tápmennyiséggel, ami hipotéziünket megerősítette, hiszen ez a terület nem szerepel jutalmat reprezentáló területként (Castro és mtsai 2015). A core viszont igen, mégpedig a „wanting” vonatkozásában. Ebben az almagban azt láttuk, hogy a kontrolloknál nem volt összefüggés, az FR állatoknál viszont magas korreláció mutatkozott a táp és a cFos-pozitív sejtek száma között. Eltérően reagáltak tehát a két csoport állatai, amely szintén arra utal, hogy más szerepet játszott a motivációs komponens a tápfelvételben.

6.4 A dopaminreceptorok expressziója a nucleus accumbens területén

Génexpressziós, illetve a fehérjét kimutató immunhisztokémiai méréseink a D1R relatív hiányát mutatták FR állatokban a medialis shell területén (16. és 19. ábra). Kérdés, hogy a D1R csökkenése nem lehet-e esetleg a beidegzés emelkedett dopaminexpressziójára adott kompenzációs válasz. Mivel a NAc a VTA-ból kapja a dopaminerg beidegzést, itt mértük meg a TH enzim expresszióját. Ez a terület a TH mRNS- és fehérjeraktáraként is működik, mi a TH prekursor mRNS expresszióját mértük meg, amely sokkal közvetlenebbül jelzi a transzkripció mértékét, mint az mRNS. A VTA területén nem látszik emelkedett dopaminszintézis (20. ábra), a D1R leszállítódását nem VTA-függő folyamatnak tekintjük.

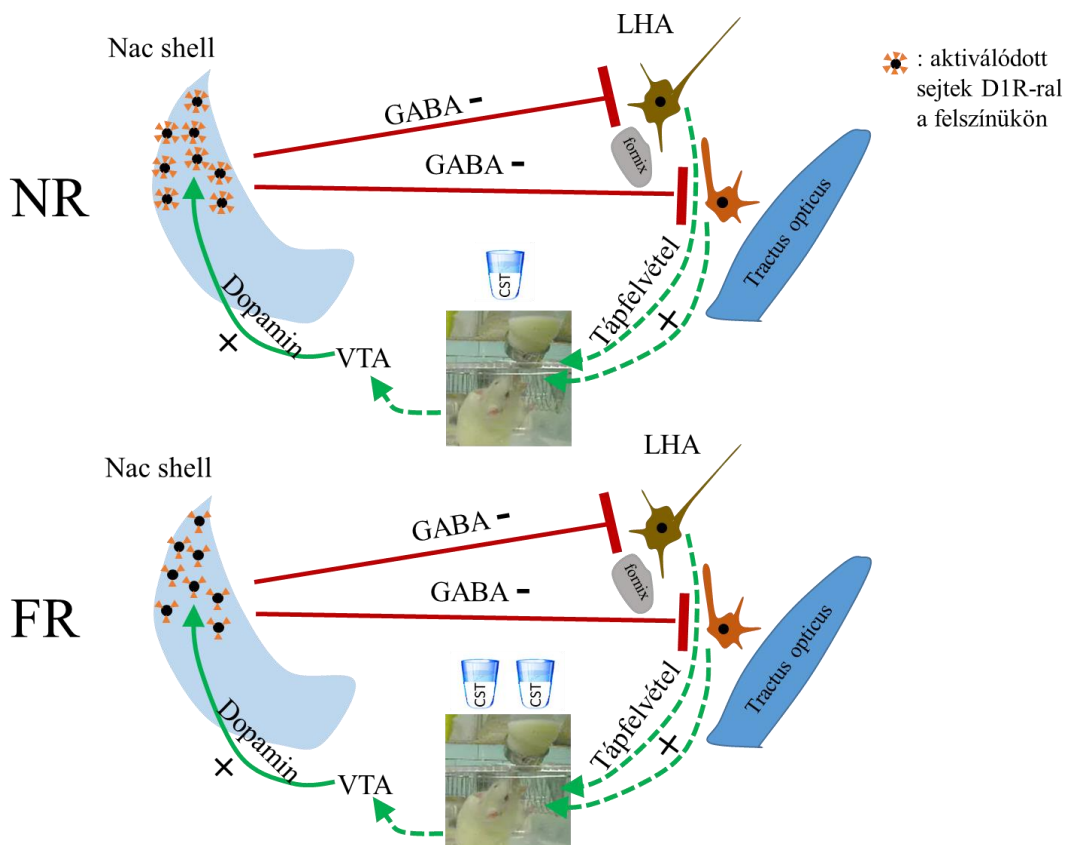
A túlevés ún. „jutalom-hiány” (reward deficiency) hipotézise szerint a jutalom keresésének elsődleges hajtóereje a dopaminhiány (Blum és mtsai 2012). Másrészt, a nucleus accumbensben mind a D1R, mint a D2R szükséges a függőséggel kapcsolatos viselkedés kifejeződéséhez (Schmidt H. D. és Pierce 2006). A D2R expresszióban nem volt különbség a vizsgált csoportok között. Ez megerősítette, hogy jó modellel dolgozunk, ugyanis mindenképpen az elhízást megelőző folyamatokat akartuk vizsgálni. Mivel a striatumbeli D2R hiánya leptindependens folyamat (Billesa és mtsai 2012, Dalle Molle és mtsai 2015, Wang G. J. és mtsai 2001), elhízott vagy nagyobb zsírtömeggel rendelkező állatok esetén vártunk volna eltérő szintet. A mi FR állataink még nem híztak el, testösszetételük nem különbözött, ezért a D2R azonos szintje a két csoport között (17. ábra) megerősítette az irodalmi adatokat. A másik receptor, a D1R kifejeződése nem függ a leptintől (Billesa és mtsai 2012), viszont a ghrelin, a jutalmi tápfelvételre pozitívan ható hormon csökkenteti expresszióját az accumbens magban (Skibicka és mtsai 2012). Magasabb ghrelinszinteket már több különböző intrauterin alultáplált modellben mutattak ki újszülöttkorban (Kyriakakou és mtsai 2009, Wang X. és mtsai 2007) és IUGR-érintett emberi újszülöttekben is (Chiesa és mtsai 2008).

6.5 A dopaminerg transzmisszió szerepe a LHA orexigén sejteinek gátlásában

A D1R-pozitív medialis shell-neuronok a táplálékfelvétel szabályozói. Serkentésük direkt kapcsolaton keresztül a rostralis LHA területén levő GABAerg neuronokat gátolja, amely a tápfelvétel leállításához vezet (Ferrario és mtsai 2016, O'Connor és mtsai 2015). Mindezek az irodalmi adatok arra utaltak, hogy a medialis shell D1R-pozitív neuronjainak csökkent érzékenysége, a helyi D1R csökkenés és a megnövekedett jutalmi tápfelvétel összefüggésben állhatnak egymással. Kontroll állatok medialis shell-be történő D1R-agonista injektálásával megmutattuk, hogy a D1R helyi serkentése elősegíti a jutalmi beteljesülés elérését, csökkenti a jutalmi tápfelvételt (22. ábra).

A Bevezetés 2.2.1.2 fejezetében leírtam, hogy van egy olyan orexigén GABAerg sejtcsoport a rostralis LHA területén, amely sem MCH-t, sem orexint nem tartalmaz. Ennek stimulációja mind a jutalomvezérelt, mind a megszokott élembeszerző viselkedést erősíti (Jennings és mtsai 2015, Sano és Yokoi 2007). Minden bizonnyal ezek a sejtek a medialis shell D1R-pozitív sejteinek célpontjai, hiszen kísérletünkben is a D1R-serkentés csökkentette a rostralis LHA perifornicalis és lateralis alterületén is a nem-orexin, nem-MCH sejtek aktiválódását (23. ábra).

A D1R-deficiens FR állatokban viszont ezen LHA-sejteknek a szabályozása zavart szenvedett, hiszen magasabb aktivációt mutattak a fornixtól lateralisán lévő LHA területén (14. ábra), amihez emelkedett CST fogyasztása társult. Minden bizonnyal az alacsonyabb érzékenységű, kevesebb D1R-ral rendelkező NAc medialis shell-beli sejtek nem voltak képesek megfelelő mértékben gátolni ezeket a neuronokat, ezért látunk magasabb aktivációt (33. ábra).



33. ábra. Az FR fenotípus jutalmi táplálékfelvételi szabályozásában lejátszódó változások. Egyszerűsített modell.

A felső ábra NR, míg az alsó FR állatokban mutatja be a D1R-positív medialis shell neuronok aktivációját és hatását a LHA orexigén sejtjeire. FR állatokban több elfogyasztott magas jutalmi értékkel bíró táp vezet ugyanannyi nucleus accumbens medialis shell-beli sejt aktivációjához, a csökkent DIR szint miatt. Következésképpen a tápfelvétel lateralis hypothalamicus areán belüli gátlása zavart szenved. Rövidítések: DIR: dopamin 1-es típusú receptor, CST: cukrozott sűrített tej, FR: intrauterin fehérjeredukált, GABA: γ -amino vajsav, LHA: lateralis hypothalamicus terület, NR: nem intrauterin fehérjeredukált, VTA: ventralis tegmentalis area.

Érdekes, hogy a vizsgált LHA régiók között különbséget találtunk aktiválódás tekintetében, hiszen míg a D1R agonista az NR állatoknál mindkét régió sejtaktiválódását erősen gátolta, a D1R-deficiens FR állatoknál csak a PFA emelkedett aktivációja látszott.

Továbbá, az eredeti jutalmi tápfelvételt vizsgáló kísérletünkben az elfogyasztott tejmennyiség és a LHA sejteinek aktivációja közötti összefüggés is eltért az alterületek, illetve a csoportok között (5. táblázat). Míg a PFA területén aktiválódott sejtszám nem tükrözte az elfogyasztott tejmennyiséget, az LH területén fordított arányosság mutatkozott a cFos-pozitív sejtszám és a CST mennyisége között, de csak FR állatokban. Mivel kontrollokban nem volt ilyen összefüggés, ezt a jelenséget is a megzavart jutalmi mechanizmusoknak, a csökkent érzékenységnek tudhatjuk be. Ez a két, a sejtcsoportok eltérő aktivációjában jelentkező különbség valószínűleg arra utal, hogy a perifornicalis és lateralis sejtcsoportok eltérően érzékenyek a NAc területéről jövő gátlásra, illetve annak hiányára. Jennings és mtsai. munkája is utal ennek a populációnak a heterogenitására (Jennings és mtsai 2015).

Érdekes módon a jutalmi tápfelvétel a caudalis LHA területén, a fornixtól medialisán orexinerg sejteket aktivált (15. b ábra). Ezek valószínűleg a tápfogyasztás alatt a VTA sejteitől kibocsátott dopaminra reagálva aktiválódtak. Ezek az orexinerg sejtek ugyanis nem expresszálnak D1 és D2 receptorokat, viszont transzsinaptikusan reagálnak dopaminra (Bubser és mtsai 2005). Mivel nem a NAc-ből kapnak innervációt, vizsgálatuk egy másik tanulmány tárgyát képezhetné.

6.6 Az FR állatok cukorháztartása

A 2TDM-ra általánosan jellemző a máj megnövekedett glükóztermelése és az inzulinrezisztencia. A betegség korai jelei közé sorolható a romló éhomi vércukorszint és a romló glükóztolerancia (AI-Goblan és mtsai 2014), viszont a postprandialis vércukorszint még nem különbözik (Erhuma és mtsai 2007). A mi FR állatainkban a 6. héten még nem találtunk eltérést a cukorháztartásban (24. ábra). A 12. héten azonban már nem csak romló glükóztoleranciát, de növekvő inzulinrezisztenciát is mértünk (25. ábra), valamint az éhomi vércukorszint is megemelkedett. Ekkor az állatok testösszetétele és testtömege még normális volt (3. táblázat). Így kijelenthető, hogy ebben az esetben az intrauterin fehérjeredukció okozta magzati programozás, és nem a másodlagosan kialakuló elhízás a 2TDM-t megelőző elváltozások elsődleges oka.

6.7 A Nucleob2/nesfatin-1 megváltozott expressziója és anorexigén funkciója FR állatokban

Bár a Nucleob2 mRNS-szintje a hypothalamus magvaiban újszülött állatban nem különbözött a kísérleti csoportok között (26. ábra), felnőtt állatban az intrauterin alultáplált csoportban magasabb expressziós szintet mértünk a PVN, az LHA és az ARC területén (27. ábra). A nesfatin-1 krónikus centrális alkalmazása testtömegcsökkenéshez vezet (Oh-I és mtsai 2006), illetve a PVN vagy az LHA területére való injektálása tápfelvétel-csökkenést okoz (Chen X. és mtsai 2012), tehát abszolút anorexigén, tápfelvétel-csökkentő neuropeptidnek tekinthető. Így azt várnánk, hogy a magasabb expresszió valamilyen fokozott hatással jár együtt, például csökkenti a tápfogyasztást. Azonban az általunk mért magasabb génextpresszió nem csökkentette a tápfelvételt, illetve a testtömeg-növekedést, sőt adataink szerint ebben az időszakban már hyperphagia jelentkezhet. Felmerül tehát a kérdés, hogy a magasabb expresszió nem jelenhet-e meg csökkent nesfatin-1 jelátvitelre válaszul. Az általunk centrálisan alkalmazott nesfatin-1 az FR állatokban nem csökkentette a táp-és vízfelvételt a kontroll (NR) csoportban kimutatott (és az irodalomban már sokszor megerősített (Könczöl és mtsai 2012, Oh-I és mtsai 2006)) hatással szemben (28. ábra). Ez arra utal, hogy a nesfatin-1-jelátvitel az FR állatokban nem működik megfelelően. A megemelkedett expressziós szint tehát nem elsődleges válasz a megváltozott magzati környezetre, hanem minden bizonnyal az állatokban kialakuló rezisztencia kompenzálására jött létre. Tehát úgy tűnik, hogy a megváltozott energiaháztartásban a PVN, ARC és LHA területén expresszálódó nesfatin-1 peptidnek fontos szerepe van.

A nesfatin-1 lecsökkentette az éhezés-aktiválta neuronok számát az ARC magban, amikor a várt tápfelvétel idejében alkalmaztuk (29. ábra). Ugyanilyen körülmények között az éheztetett állatok tápfelvételét is csökkenti (Yosten és Samson 2009). Kérdés ezeknek a neuronoknak a fenotípusa. Bár a mérés során egy laterális és egy medialis ROI-t is felhasználtunk az ARC mag analízise során, tehát mindkettő együttes eredménye mutatja a csökkenést, tudjuk, hogy a két alapvető neuroncsoport eloszlása jócskán átfed (Hahn és mtsai 1998).

Az NPY-sejtek éhezés hatására, míg a POMC/CART sejtek újraetetés hatására aktiválódnak (Betley és mtsai 2013, Fekete és mtsai 2012). Éheztetett egérben majdnem

mindegyik (94%) cFos-pozitív, tehát aktiválódott sejt NPY-pozitív is egyben (Becskei és mtsai 2009). Éheztesítés során többek között a ghrelin aktiválja az NPY sejteket (Dickson és Luckman 1997), és a ghrelin a várt tápfelvétel idejében emelkedik meg (Cummings és mtsai 2001, Drazen és mtsai 2006). Ebből egyértelmű, hogy a nesfatin-1 a cFos-pozitív sejtek számát az NPY-neuronokon való hatással csökkentette. Ezt erősíti az az eredmény, hogy szeletmintán bizonyították, hogy a nesfatin-1 hyperpolarizálja az NPY-sejteket (Price és mtsai 2008). Ebből természetesen nem következik, hogy más metabolikus állapotban a nesfatin-1 ne lehetne hatással a POMC/CART-sejtekre.

Az éhezés részben az ARC NPY/AgRP neuronjainak aktivációja révén egy erős orexigén választ indít el. Az icv beadott nesfatin ezt az erős orexigén hajtóerőt csökkentette a kontroll, de nem csökkentette az FR állatokban (28. ábra). Emellett a nesfatin-1 az FR állatokban nem volt képes csökkenteni az előzőekben leírt folyamatban aktiválódott sejtek számát (29. ábra). Minden bizonnyal az, hogy a nesfatin-1 az FR állatokban nem volt képes csökkenteni a tápfelvételt, jelentős részben annak köszönhető, hogy nem volt képes csökkenteni az orexigén sejtek aktiválódását, tehát az ARC mag neuronjai bizonyos mértékben nesfatin-1 rezisztenssé váltak. Mint ahogy a Bevezetés 2.2.1.2, illetve 2.3.1 fejezeteiben részleteztem, az ARC az energiaszabályozás, a tápfelvétel és a cukorháztartás szabályozásának tekintetében központi szerepet játszik. Az ARC mag orexigén működésének nesfatin-1 által történő gátlása, és ennek a funkciónak az FR állatokban történő károsodása nagy jelentőséggel bír a nesfatin-1 metabolikus folyamatokban játszott szerepének megismerése tekintetében. Ez az eredmény tehát egy olyan helyként azonosítja az ARC magot, ahol a nesfatin-rezisztenciának funkcionális következménye is van.

6.8 A nesfatin-1 szerepe a cukorháztartás szabályozásában NR és FR állatokban

A táplálékfelvétel és a cukorháztartás hypothalamus-beli központjai átfednek (Kleinridders és mtsai 2009, Sandoval és mtsai 2009). A Bevezetés 2.4. alfejezetében részletezett irodalmi adatok szerint a hypothalamicus nesfatin-1 csökkenti a vércukorszintet, növeli a glükózfelhasználást és csökkenti az endogén glükóztermelést (Wu és mtsai 2014, Yang és mtsai 2012). A saját kísérleteinkben FR állataink cukorháztartásának vizsgálatánál láttuk, hogy kisebb glükóztolerancia és romló inzulinérzékenység jellemzi őket, mint a kontrollokat. A nesfatin-1-háztartás zavara, a nesfatin-1-rezisztencia kialakulása, mint láttuk, szintén sajátja ennek, a később 2TDM kialakulására hajlamos fenotípusnak. Az irodalmi adatok sejtetik, hogy a két eredménynek lehet köze egymáshoz, de az is elképzelhető lenne, hogy egymástól függetlenül alakulnak ki ezek a változások. Erre a lehetséges kapcsolatra szerettünk volna megerősítő vagy cáfoló bizonyítékot szerezni. Egy olyan ozmotikus minipumpát ültettünk be a lateralis agykamrába NR állatoknak, amely 7 napig napi 70 pmol nesfatin-1 peptidet infundált a kamrarendszerbe. A nesfatin-1 sokak által leírt anorexigén hatása az első napokban nyilvánvaló volt, de az 5-6. napon már nem látszott táplálékfelvételt csökkentő hatás (31. a ábra). Egyfajta rezisztencia, hozzászokás kezdődhetett el. Ahogy ezt az Eredmények 5.10 fejezetében megemlítem, számítottunk erre. Arra gondoltunk, hogy egy viszonylag magas nesfatin-1-dózis egy héten át adagolva deszenzitivizálja a hypothalamusban a nesfatin-1 jelátvitel elemeit és az FR fenotípushoz hasonló nesfatin-1 érzéketlenséggel rendelkező állatokat kapunk. Ha ez teljes mértékben így történt volna, a nesfatin-1 rezisztencia és a cukorháztartás általunk feltételezett oksági kapcsolata esetén a cukor- és inzulin tesztek hasonló eredményt mutattak/mutathattak volna krónikusan nesfatin-1-kezelt állatok esetében, mint a FR fenotípusnál. Amikor azonban a hét végén elvégeztük az ipGTT-t és ipITT-t, meglepetésünkre a nesfatin-1-kezelt állatok nem hogy rosszabb, hanem egyenesen jobb vércukor értékeket mutattak mindkét teszt esetén (31. b, c ábra). Jobban tudták kordában tartani a növekvő vércukorszintet intraperitonealis glükóz beadásánál és érzékenyebbek voltak inzulinra intraperitonealis inzulinkezelés esetén. Tehát arra bizonyítékot találtunk, hogy a mi kísérleti felállásunkban a krónikus centrális nesfatin-

1-kezelés komoly változásokat okoz a cukorháztartásban. Ezt a már említett irodalom is alátámasztja (Wu és mtsai 2014, Yang és mtsai 2012). Ezen adatunk abban újszerű, hogy ezzel a módszerrel, tehát magának a nesfatin-1-nek a krónikus centrális infúziójával még nem értékelték a cukorháztartást. Li és mtsai használtak ugyan ozmotikus minipumpát krónikus nesfatin-1 adagolásra, de ők a peptidet a perifériára juttatták (Li és mtsai 2013). Eredményeik egyébként – az eltérő célállomás ellenére – a cukorháztartás terén hasonlóak a mieinkhez.

Nagyon elgondolkodtató az is, hogy a tápfelvétel tekintetében elért nesfatin-1-rezisztencia nem jelent még rezisztenciát más, a nesfatin-1 által befolyásolt rendszeren. A különböző rendszerek tehát eltérő érzékenységgel bírnak. Erre is találunk példát az irodalomban: a nesfatin-1 egy akut alkalmazásban a tápfelvétele befolyásolja, de a cukorháztartást nem, míg a perifériás krónikus alkalmazás (hasonlóan az általunk alkalmazott centrális krónikus alkalmazáshoz) inkább a cukorháztartás befolyásolása szempontjából látványos és kevésbé a peptid anorexigén hatása okán (Li és mtsai 2013).

Még mindig nem kaptunk tehát választ arra, hogy az FR állatok nesfatin-rezisztenciája összefügg-e a romló cukorháztartással. Az előző kérdést tehát fordítva tettük fel: a krónikus nesfatinkezelés FR állatban is hatással van-e a glükóz- és inzulin tesztekre. Ezért FR állatokon is elvégeztük a krónikus nesfatin-1 infúziót, majd a két tesztet. Mindkettő esetén hatástalan volt a krónikus nesfatin-1 kezelés, nem kaptunk sem javuló glükóztoleranciát, sem fokozott inzulinérzékenységet (32. ábra). Ebből az következik, hogy az FR állatok a cukorháztartás hypothalamicus befolyásolása tekintetében is rezisztensnek tűnnek nesfatin-1-re.

A Nucleus arcuatus/nesfatin-1-rezisztencia és a 2TDM-t megelőző cukorháztartásbeli változások pontos molekuláris kapcsolatának feltárása a jövő kutatásának feladata. Sajnos, mivel a nesfatin-1 receptorát még nem sikerült azonosítani, agonisták és antagonisták alkalmazására nincs mód. A további kutatásokban transzgén egér modellek lehetnek segítségünkre. Mivel a nesfatin-1 nem szállítódik axonokban, a nesfatin-1 peptidnek lokális, auto- és parakrin hatását valószínűsítik, amely valószínűleg dendritikus leadás útján valósul meg (Brailoiu és mtsai 2007, Foo és mtsai 2008). Az ARC szerepe a cukorháztartás vonatkozásában is nagyon valószínű, hiszen mind az NPY, mind a POMC neuronpopulációkról kimutatták, hogy befolyásolják a máj glükóztermelését (Dodd és mtsai 2018, Könner és mtsai 2007). Az ARC neuronjai

bőségesen expresszálják a nesfatin-1-et, (Brailoiu és mtsai 2007), így a peptid helyben hatva is könnyen módosíthatja a cukorháztartást a neuronfunkció megváltoztatásán keresztül. Tudjuk is, hogy a nesfatin-1 hatása jelentős részben MC3R és MC4R receptoron keresztül valósul meg, az NPY neuronokat pedig a nesfatin-1 gátolta (Schalla és mtsai 2020).

Összességében kimondható, hogy az intrauterin alultáplált, nem elhízott állatokban kialakuló nesfatin-1 rezisztencia nagy valószínűséggel hozzájárul a fenotípusban megjelenő, a későbbi cukorbetegséget előjelző, elindító változásokhoz.

7. Következtetések

1. A nucleus accumbens rostralis medialis shell területén azonosítottunk egy D1R-pozitív sejtcsoportot, amelynek aktivációja tükrözi a jutalmi tápfelvétel mértékét.
2. Az intrauterin fehérjeredukált (FR), metabolikus betegségekre hajlamos, de még nem elhízott patkány medialis shell régiójában a neuronok jutalmi tápfelvételre való érzékenysége csökken, emellett a D1R alacsonyabb szinten expresszálódik.
3. D1R-agonista alkalmazásával bizonyítottuk, hogy a D1R funkcionális zavara hozzájárul az FR állatok megnövekedett jutalmi táplálékfelvételéhez. Ennek mechanizmusa a LHA orexigén neuronjainak nem megfelelő gátlása.
4. Az FR állatoknál a 6. és a 12. hét között csökkent glükóztolerancia és inzulinérzékenység kezdődik el, emelkedett éhomi glükózzal.
5. Az FR állatokban újszülött korban még nem, de felnőtt korban megnövekszik a Nucleob2 expresszió a hypothalamus ARC, PVN és LHA területein.
6. Az icv beadott nesfatin-1 jól ismert, a homeosztikus táplálékfelvételi szabályozás elemeként azonosított táp- és vízfelvételt csökkentő hatása nem váltható ki FR állatokban.
7. Az ARC neuronok éhezésre való aktivációját a centrálisan alkalmazott nesfatin-1 gátolja. Ezzel szemben, FR állatok ARC magjában nesfatin-1 rezisztenciát mutattunk ki.
8. A krónikusan, 7 napig alkalmazott intracerebroventricularis nesfatin-1 javítja a glükóztoleranciát és az inzulinérzékenységet, viszont a 2TDM-re hajlamos FR állatok rezisztensek erre a hatásra.

8. Összefoglalás

Az intrauterin retardáció hosszú távú hatásai magában foglalják az elhízásra, a metabolikus szindróma kialakulására, és az ezektől akár függetlenül is kialakuló 2-es típusú cukorbetegség megjelenésére való hajlamot. Érdeklődésünk középpontjában a fenotípus kialakításában fontos szerepet játszó centrális, tápfelvételt és cukorháztartást szabályozó rendszerek vizsgálata állt.

Munkánkhoz egy intrauterin fehérjeredukált (FR) patkánymodellt használtunk.

A jutalmi tápfelvétel vizsgálata során cFos immunhisztokémiával azonosítottunk egy sejtcsoportot a nucleus accumbens (NAc) medialis shell régiójában, amely aktivációjával tükrözi a bevitt magas jutalmi értékkel bíró táp mennyiségét. FR állatokban lecsökkent ezeknek a sejteknek az érzékenysége, hiszen magasabb tápfelvétel társult hasonló mértékű sejtaktivációhoz. *In situ* hibridizációval kimutattuk, hogy az FR csoportban a medialis shell régióban csökkent dopamin 1-es típusú receptor (D1R) expresszió van jelen és a jutalmi tápfelvételre aktiválódó medialis shell neuronok D1R-pozitívak. Szelektív D1R-agonista NAc medialis shell területre injektálva leállította a jutalmi tápfelvételt a lateralis hypothalamicus terület (LHA) orexigén sejteinek gátlásán keresztül, ez a mechanizmus FR állatokban késik.

Az FR állatoknál 12 hetes korban intraperitoneális glükóz- és inzulinbeadással kezdődő glükóztoleranciát és inzulinrezisztenciát mutattunk ki, amely emelkedett éhomi glükózzal társult. *In situ* hibridizációval kimutattuk, hogy újszülött korban még normális a hypothalamicus Nucleus accumbens 2 expresszió, azonban 12 hetes korra az expresszió megemelkedik az arcuatus (ARC) és a paraventricularis mag, valamint a LHA területén. Intracerebroventricularis (icv) nesfatin-1 beadással bizonyítottuk, hogy bár a nesfatin-1 a táp- és vízfelvételt, valamint az éhezésre aktiválódó ARC-neuronok számát kontroll állatokban lecsökkenti, az FR állatok a neuropeptid mindkét hatására rezisztensek. 7 napig infundáltunk nesfatin-1-et kontroll állatok agykamrájába, amely a glükóztolerancia és az inzulinérzékenység javulását okozta. Az FR állatok hasonló kezelése esetén a nesfatin-1 nem hatott a cukorháztartás előbbi paramétereire.

Összefoglalva elmondható, hogy az FR fenotípus esetén mind a jutalmi tápfelvételi rendszer csökkent érzékenysége és a következményes hyperphagia, mind a nesfatin-1 neuropeptidre való csökkent érzékenység és a következményes cukorháztartási rendellenességek növelik a metabolikus betegségek kialakulásának esélyét.

9. Summary

Long-term consequences of intrauterine growth retardation comprise the susceptibility to the development of obesity, metabolic syndrome and diabetes mellitus. Our focus was on the investigation of the central, food intake- and glucose-homeostasis-regulating processes behind the developing phenotype. We used an intrauterine protein-restricted (FR) rat model for our work.

Using cFos immunohistochemistry we identified a group of neurons in the medial shell region of accumbens nucleus (NAc), whose activation level reflects the amount of the consumed high reward value food during reward-related food intake.

The sensitivity of these cells was decreased in FR animals, because more high reward value food consumed was associated to the same amount of activated neurons. Using *in situ* hybridization we showed that the FR animals express less amount of dopamine receptor type 1 (D1R) in the medial shell region and the neurons activated by the reward-related food intake are positive for D1R. The injection of a selective D1R-agonist to the medial shell of NAc stopped the reward-related food intake through the inhibition of an orexigenic cell group in the lateral hypothalamic area (LHA), which mechanism is delayed in FR animals.

As our intraperitoneal glucose and insulin tolerance tests show, the FR rats exhibit a beginning glucose intolerance and insulin resistance at the age of 12th weeks, as well as increased fasting glucose. Our *in situ* hybridization measures indicate that the hypothalamic *Nucb2* expression is normal in the newborn, but it is increased in the arcuate (ARC), paraventricular nuclei and in the LHA at the age of 12 weeks. By using intracerebroventricular (icv) injection of nesfatin-1 we proved that while this peptide decreases the food and water intake, as well as the number of the fasting activated neurons in the ARC in control animals, the FR rats are resistant to each of these effects. Chronic (7-day-long) icv infusion of nesfatin-1 had a positive effect on the glucose tolerance and insulin sensitivity of controls. On the other hand, the same nesfatin-1 treatment of FRs failed to influence these parameters of the glucose homeostasis.

We can conclude, that the susceptibility to the metabolic diseases of FR phenotype can be at least partially attributed to the decreased sensitivity of the reward-related food intake and the consequential hyperphagia, as well as to the decreased sensitivity to the nesfatin-1 and the consequential alterations in glucose homeostasis.

10. Irodalomjegyzék

- Al-Goblan AS, Al-Alfi MA, Khan MZ. (2014) Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 7: 587-591.
- Al-Qudah SA, Kasabri V, Saleh MI, Suyagh M, AlAlawi S, Yasin N. (2018) Cross-sectional correlates of nesfatin and lipopolysaccharide binding protein in metabolic syndrome patients with and without prediabetes. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 36.
- Alford AA. (2013) The association of fetal and early childhood growth with adult mental distress: evidence from the Johns Hopkins Collaborative Perinatal Study Birth Cohort. *Front Psychiatry*, 4: 96.
- Algul S, Ozkan Y, Ozcelik O. (2016) Serum nesfatin-1 levels in patients with different glucose tolerance levels. *Physiol Res*, 65: 979-985.
- Alon T, Friedman JM. (2006) Late-onset leanness in mice with targeted ablation of melanin concentrating hormone neurons. *J Neurosci*, 26: 389-397.
- Althammer F, Grinevich V. (2018) Diversity of oxytocin neurones: Beyond magno- and parvocellular cell types? *Journal of Neuroendocrinology*, 30: e12549.
- Anand BK, Brobeck JR. (1951) Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *The Yale journal of biology and medicine*, 24: 123-140.
- Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. (2001) Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 4753-4758.
- Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. (1993) Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*, 341: 938-941.
- Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. (1993) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*, 36: 62-67.
- Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, Wren AM, Brynes AE, Low MJ, Ghatei MA, Cone RD, Bloom SR. (2002) Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature*, 418: 650-654.

- Becskei C, Lutz TA, Riediger T. (2009) Blunted fasting-induced hypothalamic activation and refeeding hyperphagia in late-onset obesity. *Neuroendocrinology*, 90: 371-382.
- Bellinger L, Sculley DV, Langley-Evans SC. (2006) Exposure to undernutrition in fetal life determines fat distribution, locomotor activity and food intake in ageing rats. *Int J Obes (Lond)*, 30: 729-738.
- Bernard C. *Leçons de physiologie expérimentale appliquée à la médecine: faites au Collège de France*. JB Baillière et fils 1855.
- Berridge KC. (1996) Food reward: brain substrates of wanting and liking. *Neurosci Biobehav Rev*, 20: 1-25.
- Berridge KC, Kringelbach ML. (2008) Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. *Psychopharmacology (Berl)*, 199: 457-480.
- Berthoud HR. (2006) Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. *Obesity (Silver Spring)*, 14 Suppl 5: 197s-200s.
- Berthoud HR. (2008) Vagal and hormonal gut-brain communication: from satiation to satisfaction. *Neurogastroenterol Motil*, 20 Suppl 1: 64-72.
- Betley JN, Cao ZF, Ritola KD, Sternson SM. (2013) Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. *Cell*, 155: 1337-1350.
- Bieswal F, Ahn MT, Reusens B, Holvoet P, Raes M, Rees WD, Remacle C. (2006) The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity (Silver Spring)*, 14: 1330-1343.
- Billesa SK, Simonds SE, Cowley MA. (2012) Leptin reduces food intake via a dopamine D2 receptor-dependent mechanism. *Molecular Metabolism*, 1: 86-93.
- Billig I, Yates BJ, Rinaman L. (2001) Plasma hormone levels and central c-Fos expression in ferrets after systemic administration of cholecystokinin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281: R1243-1255.
- Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, Vale W, Sawchenko PE. (1992) The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol*, 319: 218-245.

- Blevins JE, Schwartz MW, Baskin DG. (2004) Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287: R87-96.
- Blum K, Gardner E, Oscar-Berman M, Gold M. (2012) "Liking" and "Wanting" Linked to Reward Deficiency Syndrome (RDS): Hypothesizing Differential Responsivity in Brain Reward Circuitry. *Current Pharmaceutical Design*, 18: 113-118.
- Boersma B, Wit JM. (1997) Catch-up Growth. *Endocrine Reviews*, 18: 646-661.
- Bonnaïon P, Mickelsen LE, Fujita A, de Lecea L, Jackson AC. (2016) Hubs and spokes of the lateral hypothalamus: cell types, circuits and behaviour. *J Physiol*, 594: 6443-6462.
- Bonnet MS, Djelloul M, Tillement V, Tardivel C, Mounien L, Trouslard J, Troadec J-D, Dallaporta M. (2013) Central NUCB2/Nesfatin-1-Expressing Neurones Belong to the Hypothalamic-Brainstem Circuitry Activated by Hypoglycaemia. *Journal of Neuroendocrinology*, 25: 1-13.
- Borg MA, Sherwin RS, Borg WP, Tamborlane WV, Shulman GI. (1997) Local ventromedial hypothalamus glucose perfusion blocks counterregulation during systemic hypoglycemia in awake rats. *J Clin Invest*, 99: 361-365.
- Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, Inan S, Yang J, Chang JK, Dun NJ. (2007) Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology*, 148: 5088-5094.
- Brand T, Spanagel R, Schneider M. (2012) Decreased reward sensitivity in rats from the Fischer344 strain compared to Wistar rats is paralleled by differences in endocannabinoid signaling. *PLoS One*, 7: e31169.
- Bubser M, Fadel JR, Jackson LL, Meador-Woodruff JH, Jing D, Deutch AY. (2005) Dopaminergic regulation of orexin neurons. *Eur J Neurosci*, 21: 2993-3001.
- Camerino C. (2009) Low sympathetic tone and obese phenotype in oxytocin-deficient mice. *Obesity (Silver Spring)*, 17: 980-984.
- Carey M, Kehlenbrink S, Hawkins M. (2013) Evidence for central regulation of glucose metabolism. *J Biol Chem*, 288: 34981-34988.
- Castro DC, Berridge KC. (2014) Advances in the neurobiological bases for food 'liking' versus 'wanting'. *Physiol Behav*, 136: 22-30.

- Castro DC, Cole SL, Berridge KC. (2015) Lateral hypothalamus, nucleus accumbens, and ventral pallidum roles in eating and hunger: interactions between homeostatic and reward circuitry. *Front Syst Neurosci*, 9: 90.
- Cechetti DF, Saper CB. (1987) Evidence for a viscerotopic sensory representation in the cortex and thalamus in the rat. *J Comp Neurol*, 262: 27-45.
- Chen CC, Wada K, Jarvis ED. (2012) Radioactive in situ hybridization for detecting diverse gene expression patterns in tissue. *J Vis Exp*, doi:10.3791/3764.
- Chen X, Dong J, Jiang ZY. (2012) Nesfatin-1 influences the excitability of glucosensing neurons in the hypothalamic nuclei and inhibits the food intake. *Regul Pept*, 177: 21-26.
- Chiesa C, Osborn JF, Haass C, Natale F, Spinelli M, Scapillati E, Spinelli A, Pacifico L. (2008) Ghrelin, leptin, IGF-1, IGFBP-3, and insulin concentrations at birth: is there a relationship with fetal growth and neonatal anthropometry? *Clin Chem*, 54: 550-558.
- Coupe B, Grit I, Darmaun D, Parnet P. (2009) The timing of "catch-up growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 297: R813-824.
- Cui H, Sohn JW, Gautron L, Funahashi H, Williams KW, Elmquist JK, Lutter M. (2012) Neuroanatomy of melanocortin-4 receptor pathway in the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol*, 520: 4168-4183.
- Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, 50: 1714-1719.
- Dalle Molle R, Laureano DP, Alves MB, Reis TM, Desai M, Ross MG, Silveira PP. (2015) Intrauterine growth restriction increases the preference for palatable foods and affects sensitivity to food rewards in male and female adult rats. *Brain Res*, 1618: 41-49.
- Davis JD, Smith GP. (1992) Analysis of the microstructure of the rhythmic tongue movements of rats ingesting maltose and sucrose solutions. *Behav Neurosci*, 106: 217-228.

- De Deurwaerdere P, Stinus L, Spampinato U. (1998) Opposite change of in vivo dopamine release in the rat nucleus accumbens and striatum that follows electrical stimulation of dorsal raphe nucleus: role of 5-HT₃ receptors. *J Neurosci*, 18: 6528-6538.
- de Dios O, Herrero L, Gavela-Pérez T, Soriano-Guillén L, Garcés C. (2019) Sex-specific association of plasma nesfatin-1 concentrations with obesity in children. *Pediatr Obes*, 14: e12567.
- De Lorenzo A, Romano L, Di Renzo L, Di Lorenzo N, Cennamo G, Gualtieri P. (2020) Obesity: A preventable, treatable, but relapsing disease. *Nutrition*, 71.
- Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. (2005) Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288: R91-96.
- Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. (2007) The timing of nutrient restriction during rat pregnancy/lactation alters metabolic syndrome phenotype. *Am J Obstet Gynecol*, 196: 555.e551-557.
- Dickson SL, Luckman SM. (1997) Induction of c-fos messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue, GH-releasing peptide-6. *Endocrinology*, 138: 771-777.
- Dodd GT, Michael NJ, Lee-Young RS, Mangiafico SP, Pryor JT, Munder AC, Simonds SE, Brüning JC, Zhang ZY, Cowley MA, Andrikopoulos S, Horvath TL, Spanswick D, Tiganis T. (2018) Insulin regulates POMC neuronal plasticity to control glucose metabolism. *Elife*, 7.
- Dokumacioglu E, Iskender H, Sahin A, Erturk EY, Kaynar O. (2020) Serum levels of nesfatin-1 and irisin in obese children. *Eur Cytokine Netw*, 31: 39-43.
- Drazen DL, Vahl TP, D'Alessio DA, Seeley RJ, Woods SC. (2006) Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion: evidence for a learned response independent of nutrient status. *Endocrinology*, 147: 23-30.
- Dunn-Meynell AA, Rawson NE, Levin BE. (1998) Distribution and phenotype of neurons containing the ATP-sensitive K⁺ channel in rat brain. *Brain Res*, 814: 41-54.

- Dunn-Meynell AA, Routh VH, Kang L, Gaspers L, Levin BE. (2002) Glucokinase is the likely mediator of glucosensing in both glucose-excited and glucose-inhibited central neurons. *Diabetes*, 51: 2056-2065.
- Duong A, Weingarten HP. (1993) Dopamine antagonists act on central, but not peripheral, receptors to inhibit sham and real feeding. *Physiol Behav*, 54: 449-454.
- Durst M, Könczöl K, Balázs T, Eyre MD, Tóth ZE. (2019) Reward-representing D1-type neurons in the medial shell of the accumbens nucleus regulate palatable food intake. *Int J Obes (Lond)*, 43: 917-927.
- Durst M, Könczöl K, Ocskay K, Sípos K, Várnai P, Szilvásy-Szabó A, Fekete C, Tóth ZE. (2022) Hypothalamic Nesfatin-1 Resistance May Underlie the Development of Type 2 Diabetes Mellitus in Maternally Undernourished Non-obese Rats. *Frontiers in Neuroscience*, 16.
- Dwyer DM. (2012) Licking and liking: The assessment of hedonic responses in rodents. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 65: 371-394.
- Elek P, Bíró A. (2021) Regional differences in diabetes across Europe – regression and causal forest analyses. *Economics & Human Biology*, 40: 100948.
- Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK. (1998) Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol*, 402: 442-459.
- Erhuma A, Salter AM, Sculley DV, Langley-Evans SC, Bennett AJ. (2007) Prenatal exposure to a low-protein diet programs disordered regulation of lipid metabolism in the aging rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292: E1702-1714.
- Fekete C, Zséli G, Singru PS, Kádár A, Wittmann G, Füzesi T, El-Bermani W, Lechan RM. (2012) Activation of anorexigenic pro-opiomelanocortin neurones during refeeding is independent of vagal and brainstem inputs. *J Neuroendocrinol*, 24: 1423-1431.
- Feng Y, He X, Yang Y, Chao D, Lazarus LH, Xia Y. (2012) Current research on opioid receptor function. *Curr Drug Targets*, 13: 230-246.

- Ferrario CR, Labouebe G, Liu S, Nieh EH, Routh VH, Xu SJ, O'Connor EC. (2016) Homeostasis Meets Motivation in the Battle to Control Food Intake. *Journal of Neuroscience*, 36: 11469-11481.
- Foo KS, Brismar H, Broberger C. (2008) Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience*, 156: 563-579.
- Fulton S, Woodside B, Shizgal P. (2000) Modulation of brain reward circuitry by leptin. *Science*, 287: 125-128.
- Georgescu D, Sears RM, Hommel JD, Barrot M, Bolanos CA, Marsh DJ, Bednarek MA, Bibb JA, Maratos-Flier E, Nestler EJ, DiLeone RJ. (2005) The hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone acts in the nucleus accumbens to modulate feeding behavior and forced-swim performance. *J Neurosci*, 25: 2933-2940.
- Ghamari-Langroudi M, Digby GJ, Sebag JA, Millhauser GL, Palomino R, Matthews R, Gillyard T, Panaro BL, Tough IR, Cox HM, Denton JS, Cone RD. (2015) G-protein-independent coupling of MC4R to Kir7.1 in hypothalamic neurons. *Nature*, 520: 94-98.
- Gilbertson TA, Boughter JD, Jr., Zhang H, Smith DV. (2001) Distribution of gustatory sensitivities in rat taste cells: whole-cell responses to apical chemical stimulation. *J Neurosci*, 21: 4931-4941.
- Gonzalez-Bulnes A, Ovilo C. (2012) Genetic basis, nutritional challenges and adaptive responses in the prenatal origin of obesity and type-2 diabetes. *Curr Diabetes Rev*, 8: 144-154.
- Grill HJ, Norgren R. (1978) The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Res*, 143: 263-279.
- Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AV, Voorn P. (1999) Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Ann N Y Acad Sci*, 877: 49-63.
- Guan XM, McBride WJ. (1989) Serotonin microinfusion into the ventral tegmental area increases accumbens dopamine release. *Brain Res Bull*, 23: 541-547.
- Guo Y, Liao Y, Fang G, Dong J, Li Z. (2013) Increased nucleobindin-2 (NUCB2) transcriptional activity links the regulation of insulin sensitivity in Type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest*, 36: 883-888.

- Gutiérrez-Juárez R, Obici S, Rossetti L. (2004) Melanocortin-independent effects of leptin on hepatic glucose fluxes. *J Biol Chem*, 279: 49704-49715.
- Güneş H, Alkan Baylan F, Güneş H, Temiz F. (2020) Can Nesfatin-1 Predict Hypertension in Obese Children? *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 12: 29-36.
- Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. (1998) Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature Neuroscience*, 1: 271-272.
- Hajnal A, Norgren R, Kovacs P. Parabrachial Coding of Sapid Sucrose: Relevance to Reward and Obesity. In: Finger TE (szerk.), *International Symposium on Olfaction and Taste Vol. 1170*. Wiley-Blackwell, Malden, 2009: 347-364.
- Hajnal A, Smith GP, Norgren R. (2004) Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286: R31-37.
- Halpern CH, Tekriwal A, Santollo J, Keating JG, Wolf JA, Daniels D, Bale TL. (2013) Amelioration of binge eating by nucleus accumbens shell deep brain stimulation in mice involves D2 receptor modulation. *J Neurosci*, 33: 7122-7129.
- Hardaway JA, Crowley NA, Bulik CM, Kash TL. (2015) Integrated circuits and molecular components for stress and feeding: implications for eating disorders. *Genes Brain Behav*, 14: 85-97.
- Harrold JA, Dovey TM, Blundell JE, Halford JC. (2012) CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology*, 63: 3-17.
- Hayward MD, Pintar JE, Low MJ. (2002) Selective reward deficit in mice lacking beta-endorphin and enkephalin. *J Neurosci*, 22: 8251-8258.
- Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, Slagboom PE, Lumey LH. (2008) Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 17046-17049.
- Hetherington A, Ranson S. (1940) Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *The Anatomical Record*, 78: 149-172.
- Hill JW. (2012) PVN pathways controlling energy homeostasis. *Indian J Endocrinol Metab*, 16: S627-636.
- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK,

- McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevicz M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH. (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, 273: 974-977.
- Huang I, Lim MA, Pranata R. (2020) Diabetes mellitus is associated with increased mortality and severity of disease in COVID-19 pneumonia – A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 14: 395-403.
- Iwasaki Y, Nakabayashi H, Kakei M, Shimizu H, Mori M, Yada T. (2009) Nesfatin-1 evokes Ca²⁺ signaling in isolated vagal afferent neurons via Ca²⁺ influx through N-type channels. *Biochem Biophys Res Commun*, 390: 958-962.
- Jennings JH, Rizzi G, Stamatakis AM, Ung RL, Stuber GD. (2013) The inhibitory circuit architecture of the lateral hypothalamus orchestrates feeding. *Science*, 341: 1517-1521.
- Jennings JH, Ung RL, Resendez SL, Stamatakis AM, Taylor JG, Huang J, Veleta K, Katak PA, Aita M, Shilling-Scriver K, Ramakrishnan C, Deisseroth K, Otte S, Stuber GD. (2015) Visualizing hypothalamic network dynamics for appetitive and consummatory behaviors. *Cell*, 160: 516-527.
- Johnson PM, Kenny PJ. (2010) Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nature Neuroscience*, 13: 635-641.
- Kanatani A, Mashiko S, Murai N, Sugimoto N, Ito J, Fukuroda T, Fukami T, Morin N, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Saga Y, Nishimura S, Ihara M. (2000) Role of the Y1 receptor in the regulation of neuropeptide Y-mediated feeding: comparison of wild-type, Y1 receptor-deficient, and Y5 receptor-deficient mice. *Endocrinology*, 141: 1011-1016.
- Kleinridders A, Könnner AC, Brüning JC. (2009) CNS-targets in control of energy and glucose homeostasis. *Curr Opin Pharmacol*, 9: 794-804.

- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402: 656-660.
- Korotkova TM, Sergeeva OA, Eriksson KS, Haas HL, Brown RE. (2003) Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins. *J Neurosci*, 23: 7-11.
- Könczöl K, Pintér O, Ferenczi S, Varga J, Kovács K, Palkovits M, Zelena D, Tóth ZE. (2012) Nesfatin-1 exerts long-term effect on food intake and body temperature. *Int J Obes (Lond)*, 36: 1514-1521.
- Könner AC, Janoschek R, Plum L, Jordan SD, Rother E, Ma X, Xu C, Enriori P, Hampel B, Barsh GS, Kahn CR, Cowley MA, Ashcroft FM, Brüning JC. (2007) Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab*, 5: 438-449.
- Kurata K, Fujimoto K, Sakata T, Etou H, Fukagawa K. (1986) D-glucose suppression of eating after intra-third ventricle infusion in rat. *Physiol Behav*, 37: 615-620.
- Kwon E, Joung H-Y, Liu S-M, Chua SC, Schwartz GJ, Jo Y-H. (2020) Optogenetic stimulation of the liver-projecting melanocortineric pathway promotes hepatic glucose production. *Nature Communications*, 11: 6295.
- Kyriakakou M, Malamitsi-Puchner A, Mastorakos G, Boutsikou T, Hassiakos D, Papassotiriou I, Kanaka-Gantenbein C. (2009) The role of IGF-1 and ghrelin in the compensation of intrauterine growth restriction. *Reprod Sci*, 16: 1193-1200.
- Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Poci A, Rossetti L. (2005) Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science*, 309: 943-947.
- Lam TK, Poci A, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Schwartz GJ, Rossetti L. (2005) Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis. *Nat Med*, 11: 320-327.
- Lanoue AC, Blatt GJ, Soghomonian JJ. (2013) Decreased parvalbumin mRNA expression in dorsolateral prefrontal cortex in Parkinson's disease. *Brain Res*, 1531: 37-47.
- Laureano DP, Dalle Molle R, Alves MB, Luft C, Desai M, Ross MG, Silveira PP. (2016) Intrauterine growth restriction modifies the hedonic response to sweet

- taste in newborn pups - Role of the accumbal mu-opioid receptors. *Neuroscience*, 322: 500-508.
- Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara RK, Niznik HB, Kitt CA, Price DL, Maggio R, Brann MR, Ciliax BJ. (1993) Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 8861-8865.
- Levin BE. (2006) Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361: 1107-1121.
- Levin BE, Routh VH, Kang L, Sanders NM, Dunn-Meynell AA. (2004) Neuronal glucosensing: what do we know after 50 years? *Diabetes*, 53: 2521-2528.
- Li Z, Gao L, Tang H, Yin Y, Xiang X, Li Y, Zhao J, Mulholland M, Zhang W. (2013) Peripheral effects of nesfatin-1 on glucose homeostasis. *PLoS One*, 8: e71513.
- Lim JS, Lee JA, Hwang JS, Shin CH, Yang SW. (2011) Non-catch-up growth in intrauterine growth-retarded rats showed glucose intolerance and increased expression of PDX-1 mRNA. *Pediatr Int*, 53: 181-186.
- Lin Y, Hall RA, Kuhar MJ. (2011) CART peptide stimulation of G protein-mediated signaling in differentiated PC12 cells: identification of PACAP 6-38 as a CART receptor antagonist. *Neuropeptides*, 45: 351-358.
- Luyckx VA, Brenner BM. (2015) Birth weight, malnutrition and kidney-associated outcomes-a global concern. *Nat Rev Nephrol*, doi:10.1038/nrneph.2014.251.
- Ma MA, Morrison EH. Neuroanatomy, Nucleus Suprachiasmatic. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC., Treasure Island (FL), 2022.
- MacDonald AF, Billington CJ, Levine AS. (2003) Effects of the opioid antagonist naltrexone on feeding induced by DAMGO in the ventral tegmental area and in the nucleus accumbens shell region in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285: R999-R1004.
- Maejima Y, Yokota S, Nishimori K, Shimomura K. (2018) The Anorexigenic Neural Pathways of Oxytocin and Their Clinical Implication. *Neuroendocrinology*, 107: 91-104.

- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al. (1995) Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*, 1: 1155-1161.
- Majeed NH, Przewłocka B, Wedzony K, Przewłocki R. (1986) Stimulation of food intake following opioid microinjection into the nucleus accumbens septi in rats. *Peptides*, 7: 711-716.
- Maldonado-Irizarry CS, Kelley AE. (1995) Excitotoxic lesions of the core and shell subregions of the nucleus accumbens differentially disrupt body weight regulation and motor activity in rat. *Brain Res Bull*, 38: 551-559.
- Maleta K. (2006) Undernutrition. *Malawi Med J*, 18: 189-205.
- Markakis EA. (2002) Development of the neuroendocrine hypothalamus. *Front Neuroendocrinol*, 23: 257-291.
- Marks DL, Cone RD. (2001) Central melanocortins and the regulation of weight during acute and chronic disease. *Recent Prog Horm Res*, 56: 359-375.
- Marsh DJ, Hollopeter G, Kafer KE, Palmiter RD. (1998) Role of the Y5 neuropeptide Y receptor in feeding and obesity. *Nat Med*, 4: 718-721.
- Martin-Gronert MS, Ozanne SE. (2007) Experimental IUGR and later diabetes. *J Intern Med*, 261: 437-452.
- Martorell R, Stein AD, Schroeder DG. (2001) Early Nutrition and Later Adiposity. *The Journal of Nutrition*, 131: 874S-880S.
- McMullen S, Langley-Evans SC, Gambling L, Lang C, Swali A, McArdle HJ. (2012) A common cause for a common phenotype: the gatekeeper hypothesis in fetal programming. *Med Hypotheses*, 78: 88-94.
- Menétrey D, De Pommery J. (1991) Origins of Spinal Ascending Pathways that Reach Central Areas Involved in Visceroception and Visceronociception in the Rat. *Eur J Neurosci*, 3: 249-259.
- Mercer RE, Chee MJS, Colmers WF. (2011) The role of NPY in hypothalamic mediated food intake. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 32: 398-415.
- Meredith GE, Agolia R, Arts MP, Groenewegen HJ, Zahm DS. (1992) Morphological differences between projection neurons of the core and shell in the nucleus accumbens of the rat. *Neuroscience*, 50: 149-162.

- Mezey E, Eisenhofer G, Hansson S, Hunyady B, Hoffman BJ. (1998) Dopamine produced by the stomach may act as a paracrine/autocrine hormone in the rat. *Neuroendocrinology*, 67: 336-348.
- Mirakhor Samani S, Ghasemi H, Rezaei Bookani K, Shokouhi B. (2019) Serum nesfatin-1 level in healthy subjects with weight-related abnormalities and newly diagnosed patients with type 2 diabetes mellitus; a case-control study. *Acta Endocrinol (Buchar)*, -5: 69-73.
- Miselis RR, Epstein AN. (1975) Feeding induced by intracerebroventricular 2-deoxy-D-glucose in the rat. *Am J Physiol*, 229: 1438-1447.
- Mitra A, Gosnell BA, Schiöth HB, Grace MK, Klockars A, Olszewski PK, Levine AS. (2010) Chronic sugar intake dampens feeding-related activity of neurons synthesizing a satiety mediator, oxytocin. *Peptides*, 31: 1346-1352.
- Morgan K, Obici S, Rossetti L. (2004) Hypothalamic responses to long-chain fatty acids are nutritionally regulated. *J Biol Chem*, 279: 31139-31148.
- Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD. (1994) Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol*, 8: 1298-1308.
- Munoz-Valverde D, Rodriguez-Rodriguez P, Gutierrez-Arzapalo PY, Lopez de Pablo AL, Carmen Gonzalez M, Lopez-Gimenez R, Somoza B, Arribas SM. (2015) Effect of fetal undernutrition and postnatal overfeeding on rat adipose tissue and organ growth at early stages of postnatal development. *Physiol Res*, 64: 547-559.
- Muschamp JW, Hollander JA, Thompson JL, Voren G, Hassinger LC, Onvani S, Kamenecka TM, Borgland SL, Kenny PJ, Carlezon WA, Jr. (2014) Hypocretin (orexin) facilitates reward by attenuating the antireward effects of its cotransmitter dynorphin in ventral tegmental area. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: E1648-1655.
- Nakata M, Manaka K, Yamamoto S, Mori M, Yada T. (2011) Nesfatin-1 enhances glucose-induced insulin secretion by promoting Ca²⁺ influx through L-type channels in mouse islet β -cells. *Endocr J*, 58: 305-313.
- Nakata M, Yada T. (2013) Role of NUCB2/nesfatin-1 in glucose control: diverse functions in islets, adipocytes and brain. *Curr Pharm Des*, 19: 6960-6965.

- Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJ, Zuker CS. (2002) An amino-acid taste receptor. *Nature*, 416: 199-202.
- Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG, Jr., Seeley RJ, Schwartz MW. (2003) Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes*, 52: 227-231.
- O'Connor EC, Kremer Y, Lefort S, Harada M, Pascoli V, Rohner C, Luscher C. (2015) Accumbal D1R Neurons Projecting to Lateral Hypothalamus Authorize Feeding. *Neuron*, 88: 553-564.
- O'Donnell P, Grace AA. (1993) Physiological and morphological properties of accumbens core and shell neurons recorded in vitro. *Synapse*, 13: 135-160.
- Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanas G, Rossetti L. (2002) Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes*, 51: 271-275.
- Obici S, Zhang BB, Karkanas G, Rossetti L. (2002) Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med*, 8: 1376-1382.
- Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, Eguchi H, Yamamoto M, Imaki T, Hashimoto K, Tsuchiya T, Monden T, Horiguchi K, Yamada M, Mori M. (2006) Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*, 443: 709-712.
- Ozanne SE, Jensen CB, Tingey KJ, Storgaard H, Madsbad S, Vaag AA. (2005) Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression. *Diabetologia*, 48: 547-552.
- Palkovits M. Neuroanatómiai szöszedet. In: Komoly S, Palkovits M (szerk.), *Gyakorlati neurológia és neuroanatómia*. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2018: 441-482.
- Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, Zhang CY, Xu C, Vianna CR, Balthasar N, Lee CE, Elmquist JK, Cowley MA, Lowell BB. (2007) Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature*, 449: 228-232.
- Paulin F, Pajor A. Kóros terhesség. In: *A szülészet-nőgyógyászat tankönyve*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2009: 171-248.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier, 2007.

- Pecina S, Berridge KC. (2005) Hedonic hot spot in nucleus accumbens shell: where do mu-opioids cause increased hedonic impact of sweetness? *J Neurosci*, 25: 11777-11786.
- Pecina S, Berridge KC. (2013) Dopamine or opioid stimulation of nucleus accumbens similarly amplify cue-triggered 'wanting' for reward: entire core and medial shell mapped as substrates for PIT enhancement. *Eur J Neurosci*, 37: 1529-1540.
- Pedroso AP, Souza AP, Dornellas APS, Oyama LM, Nascimento CMO, Santos GMS, Rosa JC, Bertolla RP, Kla-Witter J, Christians U, Tashima AK, Ribeire EB. (2017) Intrauterine Growth Restriction Programs the Hypothalamus of Adult Male Rats: Integrated Analysis of Proteomic and Metabolomic Data. *Journal of Proteome Research*, 16: 1515-1525.
- Perala MM, Mannisto S, Kaartinen NE, Kajantie E, Osmond C, Barker DJP, Valsta LM, Eriksson JG. (2012) Body Size at Birth Is Associated with Food and Nutrient Intake in Adulthood. *Plos One*, 7: 6.
- Pinney SE. (2013) Intrauterine Growth Retardation - A Developmental Model of Type 2 Diabetes. *Drug Discov Today Dis Models*, 10: e71-e77.
- Pocai A, Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Schwartz GJ, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Rossetti L. (2005) Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature*, 434: 1026-1031.
- Pozo M, Claret M. (2018) Hypothalamic Control of Systemic Glucose Homeostasis: The Pancreas Connection. *Trends Endocrinol Metab*, 29: 581-594.
- Prado L, Luis-Islas J, Sandoval OI, Puron L, Gil MM, Luna A, Arias-Garcia MA, Galarraga E, Simon SA, Gutierrez R. (2016) Activation of Glutamatergic Fibers in the Anterior NAc Shell Modulates Reward Activity in the aNAcSh, the Lateral Hypothalamus, and Medial Prefrontal Cortex and Transiently Stops Feeding. *J Neurosci*, 36: 12511-12529.
- Price CJ, Samson WK, Ferguson AV. (2008) Nesfatin-1 inhibits NPY neurons in the arcuate nucleus. *Brain Res*, 1230: 99-106.
- Prinz P, Goebel-Stengel M, Teuffel P, Rose M, Klapp BF, Stengel A. (2016) Peripheral and central localization of the nesfatin-1 receptor using autoradiography in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 470: 521-527.

- Ragnauth A, Znamensky V, Moroz M, Bodnar RJ. (2000) Analysis of dopamine receptor antagonism upon feeding elicited by mu and delta opioid agonists in the shell region of the nucleus accumbens. *Brain Res*, 877: 65-72.
- Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. (1976) Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med*, 295: 349-353.
- Ravussin A, Youm YH, Sander J, Ryu S, Nguyen K, Varela L, Shulman GI, Sidorov S, Horvath TL, Schultze JL, Dixit VD. (2018) Loss of Nucleobindin-2 Causes Insulin Resistance in Obesity without Impacting Satiety or Adiposity. *Cell Rep*, 24: 1085-1092.e1086.
- Reamon-Buettner SM, Buschmann J, Lewin G. (2014) Identifying placental epigenetic alterations in an intrauterine growth restriction (IUGR) rat model induced by gestational protein deficiency. *Reproductive Toxicology*, 45: 117-124.
- Roseboom T, de Rooij S, Painter R. (2006) The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum Dev*, 82: 485-491.
- Routh VH. (2010) Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus. *Sensors (Basel)*, 10: 9002-9025.
- Rusnak M, Gainer H. (2005) Differential effects of forskolin on tyrosine hydroxylase gene transcription in identified brainstem catecholaminergic neuronal subtypes in organotypic culture. *Eur J Neurosci*, 21: 889-898.
- Rusnak M, Toth ZE, House SB, Gainer H. (2007) Depolarization and neurotransmitter regulation of vasopressin gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *J Neurosci*, 27: 141-151.
- Sainsbury A, Schwarzer C, Couzens M, Fetissov S, Furtinger S, Jenkins A, Cox HM, Sperk G, Hökfelt T, Herzog H. (2002) Important role of hypothalamic Y2 receptors in body weight regulation revealed in conditional knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 8938-8943.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92: 573-585.

- Saleem T, Sajjad N, Fatima S, Habib N, Ali SR, Qadir M. (2011) Intrauterine growth retardation--small events, big consequences. *Ital J Pediatr*, 37: 41.
- Sandoval DA, Obici S, Seeley RJ. (2009) Targeting the CNS to treat type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov*, 8: 386-398.
- Sano H, Yokoi M. (2007) Striatal medium spiny neurons terminate in a distinct region in the lateral hypothalamic area and do not directly innervate orexin/hypocretin- or melanin-concentrating hormone-containing neurons. *J Neurosci*, 27: 6948-6955.
- Saper CB, Chou TC, Elmquist JK. (2002) The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron*, 36: 199-211.
- Sato K, Sumi-Ichinose C, Kaji R, Ikemoto K, Nomura T, Nagatsu I, Ichinose H, Ito M, Sako W, Nagahiro S, Graybiel AM, Goto S. (2008) Differential involvement of striosome and matrix dopamine systems in a transgenic model of dopa-responsive dystonia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 12551-12556.
- Schalla MA, Unniappan S, Lambrecht NWG, Mori M, Tache Y, Stengel A. (2020) NUCB2/nesfatin-1-Inhibitory effects on food intake, body weight and metabolism. *Peptides*, 128: 9.
- Schmidt HD, Pierce RC. (2006) Cooperative activation of D1-like and D2-like dopamine receptors in the nucleus accumbens shell is required for the reinstatement of cocaine-seeking behavior in the rat. *Neuroscience*, 142: 451-461.
- Schmidt M, Rauh M, Schmid MC, Huebner H, Ruebner M, Wachtveitl R, Cordasic N, Rascher W, Menendez-Castro C, Hartner A, Fahlbusch FB. (2019) Influence of Low Protein Diet-Induced Fetal Growth Restriction on the Neuroplacental Corticosterone Axis in the Rat. *Frontiers in Endocrinology*, 10.
- Schulinkamp RJ, Pagano TC, Hung D, Raffa RB. (2000) Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev*, 24: 855-872.
- Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. (1996) Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*, 98: 1101-1106.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404: 661-671.

- Scott TR, Small DM. (2009) The role of the parabrachial nucleus in taste processing and feeding. *Ann N Y Acad Sci*, 1170: 372-377.
- Sedbazar U, Maejima Y, Nakata M, Mori M, Yada T. (2013) Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 rises in synchrony with feeding suppression during early light phase in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 434: 434-438.
- Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E. (1998) Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature*, 396: 670-674.
- Shimizu H, Oh IS, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, Eguchi H, Kato I, Inoue K, Satoh T, Okada S, Yamada M, Yada T, Mori M. (2009) Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology*, 150: 662-671.
- Siegel JM. (2004) Hypocretin (orexin): role in normal behavior and neuropathology. *Annu Rev Psychol*, 55: 125-148.
- Siegel RE, Young WS, 3rd. (1985) Detection of preprocholecystinin and preproenkephalin A mRNAs in rat brain by hybridization histochemistry using complementary RNA probes. *Neuropeptides*, 6: 573-580.
- Skibicka KP, Hansson C, Egecioglu E, Dickson SL. (2012) Role of ghrelin in food reward: impact of ghrelin on sucrose self-administration and mesolimbic dopamine and acetylcholine receptor gene expression. *Addiction Biology*, 17: 95-107.
- Skibicka KP, Shirazi RH, Rabasa-Papio C, Alvarez-Crespo M, Neuber C, Vogel H, Dickson SL. (2013) Divergent circuitry underlying food reward and intake effects of ghrelin: dopaminergic VTA-accumbens projection mediates ghrelin's effect on food reward but not food intake. *Neuropharmacology*, 73: 274-283.
- Smith GP. (2001) John Davis and the meanings of licking. *Appetite*, 36: 84-92.
- Smith GP, Epstein AN. (1969) Increased feeding in response to decreased glucose utilization in the rat and monkey. *Am J Physiol*, 217: 1083-1087.
- Spanswick D, Smith MA, Groppi VE, Logan SD, Ashford ML. (1997) Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature*, 390: 521-525.

- Spanswick D, Smith MA, Mirshamsi S, Routh VH, Ashford ML. (2000) Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nat Neurosci*, 3: 757-758.
- Stengel A. (2015) Nesfatin-1 – More than a food intake regulatory peptide. *Peptides*, 72: 175-183.
- Stice E, Spoor S, Bohon C, Small DM. (2008) Relation between obesity and blunted striatal response to food is moderated by TaqIA A1 allele. *Science*, 322: 449-452.
- Stice E, Spoor S, Bohon C, Veldhuizen MG, Small DM. (2008) Relation of reward from food intake and anticipated food intake to obesity: a functional magnetic resonance imaging study. *J Abnorm Psychol*, 117: 924-935.
- Su Y, Zhang J, Tang Y, Bi F, Liu JN. (2010) The novel function of nesfatin-1: anti-hyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun*, 391: 1039-1042.
- Szczypka MS, Kwok K, Brot MD, Marck BT, Matsumoto AM, Donahue BA, Palmiter RD. (2001) Dopamine production in the caudate putamen restores feeding in dopamine-deficient mice. *Neuron*, 30: 819-828.
- Szostak-Wegierek D. (2014) Intrauterine nutrition: long-term consequences for vascular health. *Int J Womens Health*, 6: 647-656.
- Tatemoto K. Neuropeptide Y: History and Overview. In: Michel MC (szerk.), *Neuropeptide Y and Related Peptides*, doi:10.1007/978-3-642-18764-3_1. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2004: 1-21.
- Tekin T, Cicek B, Konyaligil N. (2019) Regulatory Peptide Nesfatin-1 and its Relationship with Metabolic Syndrome. *Eurasian J Med*, 51: 280-284.
- Timper K, Brüning JC. (2017) Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Dis Model Mech*, 10: 679-689.
- Tonkiss J, Shukitt-Hale B, Formica RN, Rocco FJ, Galler JR. (1990) Prenatal protein malnutrition alters response to reward in adult rats. *Physiol Behav*, 48: 675-680.
- Toth ZE, Heinzlmann A, Hashimoto H, Koves K. (2013) Distribution of secretin receptors in the rat central nervous system: an in situ hybridization study. *J Mol Neurosci*, 50: 172-178.
- Toth ZE, Zelena D, Mergl Z, Kirilly E, Varnai P, Mezey E, Makara GB, Palkovits M. (2008) Chronic repeated restraint stress increases prolactin-releasing

- peptide/tyrosine-hydroxylase ratio with gender-related differences in the rat brain. *J Neurochem*, 104: 653-666.
- Tsuchiya T, Shimizu H, Yamada M, Osaki A, Oh-I S, Ariyama Y, Takahashi H, Okada S, Hashimoto K, Satoh T, Kojima M, Mori M. (2010) Fasting concentrations of nesfatin-1 are negatively correlated with body mass index in non-obese males. *Clinical Endocrinology*, 73: 484-490.
- Uyama N, Geerts A, Reynaert H. (2004) Neural connections between the hypothalamus and the liver. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 280: 808-820.
- Vaag A, Lund SS. (2007) Non-obese patients with type 2 diabetes and prediabetic subjects: distinct phenotypes requiring special diabetes treatment and (or) prevention? *Appl Physiol Nutr Metab*, 32: 912-920.
- van Dijk G, Thiele TE, Seeley RJ, Woods SC, Bernstein IL. (1997) Glucagon-like peptide-1 and satiety. *Nature*, 385: 214.
- van Zessen R, van der Plasse G, Adan RA. (2012) Contribution of the mesolimbic dopamine system in mediating the effects of leptin and ghrelin on feeding. *Proc Nutr Soc*, 71: 435-445.
- Vas S, Adori C, Konczol K, Katai Z, Pap D, Papp RS, Bagdy G, Palkovits M, Toth ZE. (2013) Nesfatin-1/NUCB2 as a Potential New Element of Sleep Regulation in Rats. *Plos One*, 8: 10.
- Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. (2000) Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279: E83-87.
- Visser AM, Jaddoe VW, Hofman A, Moll HA, Steegers EA, Tiemeier H, Raat H, Breteler MM, Arts WF. (2010) Fetal growth retardation and risk of febrile seizures. *Pediatrics*, 126: e919-925.
- Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ. (2014) Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev*, 10: 131-145.
- Wang GJ, Volkow ND, Logan J, Pappas NR, Wong CT, Zhu W, Netusil N, Fowler JS. (2001) Brain dopamine and obesity. *Lancet*, 357: 354-357.
- Wang X, Liang L, Du L. (2007) The effects of intrauterine undernutrition on pancreas ghrelin and insulin expression in neonate rats. *J Endocrinol*, 194: 121-129.

- Wittmann G, Mohacsik P, Balkhi MY, Gereben B, Lechan RM. (2015) Endotoxin-induced inflammation down-regulates L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression at the blood-brain barrier of male rats and mice. *Fluids Barriers CNS*, 12: 21.
- Wu D, Yang M, Chen Y, Jia Y, Ma ZA, Boden G, Li L, Yang G. (2014) Hypothalamic nesfatin-1/NUCB2 knockdown augments hepatic gluconeogenesis that is correlated with inhibition of mTOR-STAT3 signaling pathway in rats. *Diabetes*, 63: 1234-1247.
- Yager LM, Garcia AF, Wunsch AM, Ferguson SM. (2015) The Ins and Outs of the Striatum: Role in Drug Addiction. *Neuroscience*, 301: 529-541.
- Yang M, Zhang Z, Wang C, Li K, Li S, Boden G, Li L, Yang G. (2012) Nesfatin-1 action in the brain increases insulin sensitivity through Akt/AMPK/TORC2 pathway in diet-induced insulin resistance. *Diabetes*, 61: 1959-1968.
- Yin C, Liu W, Xu E, Zhang M, Lv W, Lu Q, Xiao Y. (2020) Copeptin and Nesfatin-1 Are Interrelated Biomarkers with Roles in the Pathogenesis of Insulin Resistance in Chinese Children with Obesity. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 76: 223-232.
- Yoon NA, Diano S. (2021) Hypothalamic glucose-sensing mechanisms. *Diabetologia*, 64: 985-993.
- Yosten GL, Samson WK. (2009) Nesfatin-1 exerts cardiovascular actions in brain: possible interaction with the central melanocortin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 297: R330-336.
- Yosten GL, Samson WK. (2010) The anorexigenic and hypertensive effects of nesfatin-1 are reversed by pretreatment with an oxytocin receptor antagonist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 298: R1642-1647.
- Yuan JH, Chen X, Dong J, Zhang D, Song K, Zhang Y, Wu GB, Hu XH, Jiang ZY, Chen P. (2017) Nesfatin-1 in the Lateral Parabrachial Nucleus Inhibits Food Intake, Modulates Excitability of Glucosensing Neurons, and Enhances UCP1 Expression in Brown Adipose Tissue. *Front Physiol*, 8: 235.
- Zaborszky L, Alheid GF, Beinfeld MC, Eiden LE, Heimer L, Palkovits M. (1985) Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: a morphological and radioimmunological study. *Neuroscience*, 14: 427-453.

- Zahm DS, Brog JS. (1992) On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum. *Neuroscience*, 50: 751-767.
- Zahm DS, Heimer L. (1993) Specificity in the efferent projections of the nucleus accumbens in the rat: comparison of the rostral pole projection patterns with those of the core and shell. *J Comp Neurol*, 327: 220-232.
- Zhang T, Wang M, Liu L, He B, Hu J, Wang Y. (2019) Hypothalamic nesfatin-1 mediates feeding behavior via MC3/4R-ERK signaling pathway after weight loss in obese Sprague-Dawley rats. *Peptides*, 119: 170080.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372: 425-432.

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Durst M, Könczöl K, Balázs T, Eyre MD, Tóth ZE. (2019) Reward-representing D1-type neurons in the medial shell of the accumbens nucleus regulate palatable food intake. *Int J Obes (Lond)*, 43: 917-927.

Durst M, Könczöl K, Ocskay K, Sípos K, Várnai P, Szilvásy-Szabó A, Fekete C, Tóth ZE. (2022) Hypothalamic Nesfatin-1 Resistance May Underlie the Development of Type 2 Diabetes Mellitus in Maternally Undernourished Non-obese Rats. *Frontiers in Neuroscience*, 16.

11.2 Egyéb, az értekezéshez fel nem használt közlemény

Matuska R, Zelena D, Könczöl K, Papp RS, Durst M, Guba D, Török B, Várnai P, Tóth ZE. (2020) Colocalized neurotransmitters in the hindbrain cooperate in adaptation to chronic hypernatremia. *Brain Structure & Function*, 225: 969-984.

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet nyilvánítani témavezetőmnek, Tóth Zsuzsannának azért, hogy bevezetett a kutatás világába. Sokat dolgot tanulhattam tőle: szemléletet, pontosságot, alaposágot, kitartást és a tudomány iránti lelkesedést. Nem csak támogatta és megalapozta a kutatásomat, de arra is odafigyelt, hogy minél többet tanuljak a közös gondolkodásból, a cikkírásból, a kísérletezésből. Nélküle ebből a munkából semmi sem készült volna el.

Másodsorban a köszönet Könczöl Katalint illeti, aki a gyakorlati laboratóriumi és állatházasi munka alapjaiba vezetett be. Rengeteget tanultam tőle, talán legtöbbet a műtétekről, a szövetfeldolgozásról.

Laborunk állandó asszisztense Kerti Judit. Nélküle minden sokkal nehezebb és évekkel hosszabb lenne és lett volna. Precizitása, munkamorálja egészen kiemelkedő. Nem csak a munka technikai részének jelentős hányadáért, de barátságáért is hálás vagyok.

Köszönöm Palkovits Miklós Professzor Úrnak, hogy annak idején, amikor megkerestem, bizalommal azonnal felvett a laboratóriumba. Köszönöm neki azt a csodálatos szemléletet, amit az agyról és az agy működéséről nála kifejezőbben és találóbban senki nem képes átadni, és azt a lelkesedést, amellyel az agyról csak ő képes beszélni. Hálás vagyok azért, hogy – ha csak a PhD-kurzusokon is – de tanítványa lehettem.

Köszönöm Papp Rege Sugárkának, hogy a tudományról mindig hajlandó volt eszmét cserélni és hogy dolgozatomat éles kritikai szemével átnézte és javította.

Kiemelném még Gallatz Katalint, aki szüntelen biztatásával, folyamatos optimizmusával és életkedvével mindig inspiráló munkatárs és főleg az anatómia tantárgyban szakmai segítség volt.

A laboratóriumi állatokkal végzett munkáért Deák Szilviát, Gróti Zoltánt és Habrányiné Juditot illeti köszönet.

A munkában segítettek más kutatócsoportokból is. Közülük Balázs Tamás és Stiftné Szilvász-Szabó Anett nevét említem, de rajtuk kívül munkáimhoz ötletelés és közös gondolkodás szintjén még a Szentágothai, a Neuromorfológiai, az Összehasonlító Neurohisztológiai és Neurocitokémiai, valamint a Kísérletes Neuroanatómiai és Fejlődésbiológiai laboratóriumok munkatársait emelném ki.

Sokat dolgoztam együtt a labor fiatal kollégáival, illetve tdk-hallgatókkal, akikkel kölcsönösen tudtunk tanulni egymástól, feljűk szintén hálával tartozom: Matuska Rita, Sípos Klaudia, Guba Dorina, Ocskay Klementina, Csikota Péter nevét említom meg.

Zachar Gergelynek nagyon hálás vagyok, hogy a dolgozat házi bírálátát elvállalta.

Hálás vagyok az Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet igazgatóinak (Gerber Gábor, Szél Ágoston, Alpár Alán), hogy támogatták PhD-munkámat. Az intézet többi munkatársának szintén, hogy közösségük tagja lehettem. Hálás vagyok, hogy – a kutatáshoz szorosan nem kapcsolódóan bár–, de az anatómiai, szövet- és fejlődéstani tudásomat átadhattam hallgatóknak, magasabb szintre fejleszthettem. Hallgatóimnak tudásszomjukat köszönöm, az Intézet épületének pedig, hogy télen és nyáron, éjjel és nappal szinte otthonom volt.

Köszönöm szűleimnek, hogy erős alapot adtak az életben, nagynénémnek és nagybátyámnak, hogy az egyetemi évek alatt befogadtak otthonukba, feleségemnek pedig, hogy mindig maximálisan támogatott mindenben. Az ő (és két kisgyermekem) elműlt idűszakbeli áldozatvállalása nélkül a dolgozatot nem tudtam volna megírni.

Végezetűl köszönöm Istennek, hogy lehetűségeket adott, lehetűségekbem éltet, és az ő segítségével sok lehetűséget ki is tudtam használni PhD-s éveim alatt az életben és a tudományban is.