

**Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

**A táplálékfelvételt befolyásoló neuropeptidok vizsgálata a patkány
laterális septumának magvaiban**

PhD értekezés

Készítette:

Kovács Éva Gabriella

2009

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető:

.....
Prof. Halasy Katalin
Szent István Egyetem,
Anatómiai és Szöveti Tanszék

Témabizottsági tagok:

Prof. Fekete Éva
Szegei Tudomány Egyetem,
Élettani, Szervezeti és Idegtudományi Tanszék

Prof. Dr. Kiss József
Simmelweis Egyetem,
Humánmorfológiai és Fejlődési Intézet

Készült 8 példányban. Ez az 1. példány.

.....
Kovács Éva Gabriella

**"Keresd az igazság hő sugarát
Keress új, ismeretlen utakat,
A tudás fáklyáját ragadd kezvedbe
S múlt századok munkáját koronázva
Építsd fel a jövő templomát."**

Adam Asnyk
(Marie Curie kedves költője)

Rövidítések jegyzéke

ARC: nucleus arcuatus

Gal: galanin

IR: immunreaktív

Leu-enk: leucin enkephalin

LHA: lateralis hypothalamus

LS: lateralis septum

LSD: lateralis septum nucleus dorsalis

LSI: lateralis septum nucleus intermedialis

LSV: lateralis septum nucleus ventralis

NPY: neuropeptid Y

OVX: ovariectomia, ovariectomizált (értelemszerűen)

PB: foszfát puffer

PVN: nucleus paraventricularis

Tartalomjegyzék

1. Összefoglalás	7
2. Bevezetés	9
3. Irodalmi áttekintés	10
3. 1. A lateralis septum neuroanatómiája patkányban.....	10
3. 1. 1. A lateralis septum sejtípusai.....	11
3. 1. 2. A lateralis septum afferens és efferens kapcsolatai.....	13
3. 1. 3. A lateralis septum kémiai neuroanatómiája	16
3. 2. Leucin-enkephalin, neuropeptid-Y, galanin és a táplálékfelvétel kapcsolata	18
4. Célkitűzés	21
5. Anyagok és módszerek	22
5. 1. Felhasznált állatok.....	22
5. 2. Műtéti technika.....	22
5. 3. Éheztetéses kísérletek kivitelezése	22
5. 3. 1. Egy hétig tartó teljes éheztetés	22
5. 3. 2. Egy hétig tartó részleges éheztetés	23
5. 3. 3. A részleges éheztetés kiterjesztése 2-3-4 hétre	23
5. 4. Perfúzió és immuncitokémiai festési technika	24
5. 4. 1. Perfúzió	24
5. 4. 2. Pre-embedding immunocitokémiai festés fény- és elektronmikroszkópra	24
5. 5. Metszetek denzitometriás kiértékelése.....	25
5. 6. Eredményeink statisztikai kiértékelése	26
6. Eredmények	27
6.1. Leucin-enkephalin-, neuropeptid-Y- és galanin-immunpozitív idegelemek anatómiai elhelyezkedése és rostrocaudális megoszlása	27
6. 2. A peptiderg idegelemek ultrastruktúrája	30
6. 3. Éheztetéses kísérletek.....	33
6. 3. 1. Hím patkányok 1 hétig tartó teljes éheztetésének hatása	33
6. 3. 2. Egy hétig tartó 40%-os táplálék megvonás hatása hímekben	35
6. 3. 3. Egy hétig tartó 40 %-os táplálék megvonás hatása nőstény és ovariectomizált állatokon.....	38
6. 3. 4. Több hétig tartó 40 %-os táplálék megvonás hatása hímekben és nőstényekben	45
7. Megbeszélés	50
7. 1. Leucin-enkephalin elhelyezkedése és rostrocaudalis megoszlása patkány LS-ban	50
7. 2. Neuropeptid Y elhelyezkedése és rostrocaudalis megoszlása patkány LS-ban	51
7. 3. Galanin elhelyezkedése és rostrocaudalis megoszlása patkány LS-ban	52
7. 4. OVX hatása a LS neuropeptidjeire.....	52
7. 4. 1. Általános megfigyeléseink	52
7. 4. 2. Leu-enk, NPY és Gal denzitás változásai OVX hatására.....	53
7. 5. Éhezés hatása a LS neuropeptidjeire	54
7. 5. 1. Általános megfigyeléseink	55
7. 5. 2. Éhezés és részleges táplálék megvonás hatása Leu-enk denzitására hím, nőstény és OVX patkányok LS-ban	57
7. 5. 3. Éhezés és részleges táplálék megvonás hatása NPY denzitására hím, nőstény és OVX patkányok LS-ban.....	58

7. 5. 4. Éhezés és részleges táplálékmegvonás hatása Gal denzitására hím, nőstény és OVX patkányok LS-ban.....	59
8. Új tudományos eredmények.....	62
9. Summary.....	63
10. Irodalom.....	65
11. Tudományos publikációk	78
11. 1. A témában megjelent tudományos publikációk:	78
11. 2. Egyéb publikációk:.....	79
12. Köszönetnyilvánítás	81

1. Összefoglalás

A lateralis septum (LS), a limbikus rendszer részeként jelentős közvetítő szerepet tölt be a limbikus kérgi, illetve hypothalamikus és az agytörzsi területek kommunikációjában. Kísérletes bizonyítékok alapján fontos szerepet játszik számos viselkedés mintázat kialakításában. A neuroendokrin rendszerrel (hypothalamus) fenntartott kapcsolatai révén befolyással van többek között az állatok táplálék- és vízfelvételére. Területén kimutatható neuropeptidok közül a leucin-enkephalin (Leu-enk), a neuropeptid Y (NPY) és a galanin (Gal) a hypothalamikus magvakban is bizonyítottan fontos szereplője a táplálékfelvétel szabályozásának. Vizsgálatainkban feltártuk a Leu-enk, NPY és Gal megoszlását patkány LS-nak rostrocaudalis tengelye mentén. Arra is kerestük a választ, hogy a patkány LS területén előforduló három neuropeptid immunocitokémiailag detektálható denzitás értékei változnak-e rövid távú, teljes, illetve hosszú távú, részleges táplálékmegvonás hatására. Kísérleteinket hím és nőstény, valamint ovariectomizált (OVX) állatok esetében is elvégeztük, az esetleges nemi különbségek megvilágítására. Alkalmazott módszereink részleges és teljes éheztetés, pre-embedding immunocitokémia, és computeres denzitometria voltak.

A rostrocaudalis megoszlás alapján megállapítottuk, hogy mindhárom neuropeptid képviselteti magát a LS egész rostrocaudalis tengelye mentén. Legnagyobb mennyiségben a Leu-enk-t mutattuk ki, kisebb mennyiségben NPY-t és és legkisebb denzitásúnak a Gal-t találtuk. Míg a Leu-enk és a Gal csak varikózus rostokban fordult elő, a NPY-t sejttestekben is kimutattuk. Ezen sejtek egy része az ependyma réteghez közel volt lokalizálható, ami esetleges monitorozó funkciójukra utalhat.

Kísérleteinkben az éheztetés fajtájától függetlenül megállapíthatjuk, hogy a Leu-enk, NPY és Gal immunocitokémiailag detektálható mennyisége változott a táplálékfelvétel csökkentésének hatására. E változásokat befolyásolta az éhezés időtartama és erőssége (100 %-os vagy 40 %-os éhezés). A három neuropeptid denzitására hatással vannak a női nemi ciklus hormonszint ingadozásai, illetve a LS területén található ösztrogén receptorokon keresztül közvetlenül az ösztrogén. Ezt támasztják alá nőstény, illetve OVX nőstényekkel folytatott kísérleteink eredményei.

A LS táplálékfelvételt szabályozó szerepével kapcsolatban kevés információ áll rendelkezésre. Jelen munkánkkal a táplálékfelvétel szabályozásának pontosabb megértéséhez kívántunk hozzájárulni, megvilágítva, hogy az endocrin rendszerrel szoros kapcsolatban álló hypothalamus mellett más, az endocrin rendszerrel közvetlen kapcsolatot nem fenntartó,

kifejezetten neuronális jellegű agyterületek, mint pl. a LS is szerepet játszhatnak a táplálékfelvétel és a szervezet energia homeosztázisának befolyásolásában.

2. Bevezetés

Az emberiség fejlődéstörténete során a legkeményebb és legkeservesebb harcát a napi betevő falat megszerzéséért vívta. Azt gondolhatnánk, hogy ezt a harcot a 21. század elejére világméretben megnyertük. A helyzet azonban ellentmondásos, mert Földünkön egyszerre van jelen az éhínség és a bőség. Az emberiség jelentős része, 800 millió ember alultáplált, közülük 300 millió éhezik, és naponta 23 ezer ember pusztul el éhhalálban, míg a világ gazdagabb felén évente sok százezer ember korai halálát okozza a túltápláltság, a szinte járványszerűen terjedő elhízás és a nyomában járó civilizációs betegségek (Ádám, 2004). Mi mondja meg a szervezetnek, hogy táplálékfelvételre van szüksége? A hypothalamus területén található azok a speciális magcsoportok, amelyek a perifériáról érkező szignál molekulákat receptoraikon felfogják és a tápláltsági állapotnak, a szervezet pillanatnyi energiaigényének megfelelően táplálékfelvételre, vagy éppen az étkezés abbahagyására utasítják a szervezetet. Túlzott energia felvétel esetén növekszik testsúlyunk, ami a fehér zsírszövet által termelt fehérje, a leptin felszabadulását fokozza, a vér-agy gáton átjutva a hypothalamus nucleus arcuatusában (ARC), illetve nucleus paraventricularisában (PVN) előidézi olyan anorexigén peptidek felszabadulását, amelyek bonyolult biokémiai folyamatok sorát indítják el. Ennek hatására a szervezet felgyorsítja anyagcseréjét és csökkenti táplálékfelvételét. Éhezéskor a leptin szint lecsökken, ami az előbb említett hypothalamikus magokban növeli a fő orexigén neuropeptid, a neuropeptid Y (NPY) felszabadulását, és ez a raktározó folyamatok felé tolja el a szervezet energiagazdálkodását, ami fokozott táplálékfelvételre ösztönzi az élőlényt. A táplálékfelvétel szabályozásával kapcsolatos kutatások főleg a hypothalamus funkciójának pontos felderítésére irányulnak. Amellett, hogy a hypothalamus energiaháztartásban betöltött szerepéről egyre többet tudunk, vannak más agyterületek is, pl. a nucleus tractus solitarii (Ishizaki és mts., 2002), valamint a nucleus Edinger-Westphal (Kozicz, 2003), amelyek ugyancsak részt vesznek a táplálékfelvétel szabályozásában. Ide sorolható a számos más vegetatív funkció (anyai viselkedés, szorongás) regulációjában is kiemelten szerepet játszó lateralis septum (LS), amely reciprok kapcsolatot tart fenn a ARC-al, a PVN-al, valamint a lateralis hypothalamusszal. Ezen hypothalamikus területek fontos szerepet játszanak egyes specifikus motivációs cselekvések elindításában, mint pl. a táplálék megszerzésére, a táplálék felderítésére, illetve elfogyasztására irányuló viselkedésmintázatok.

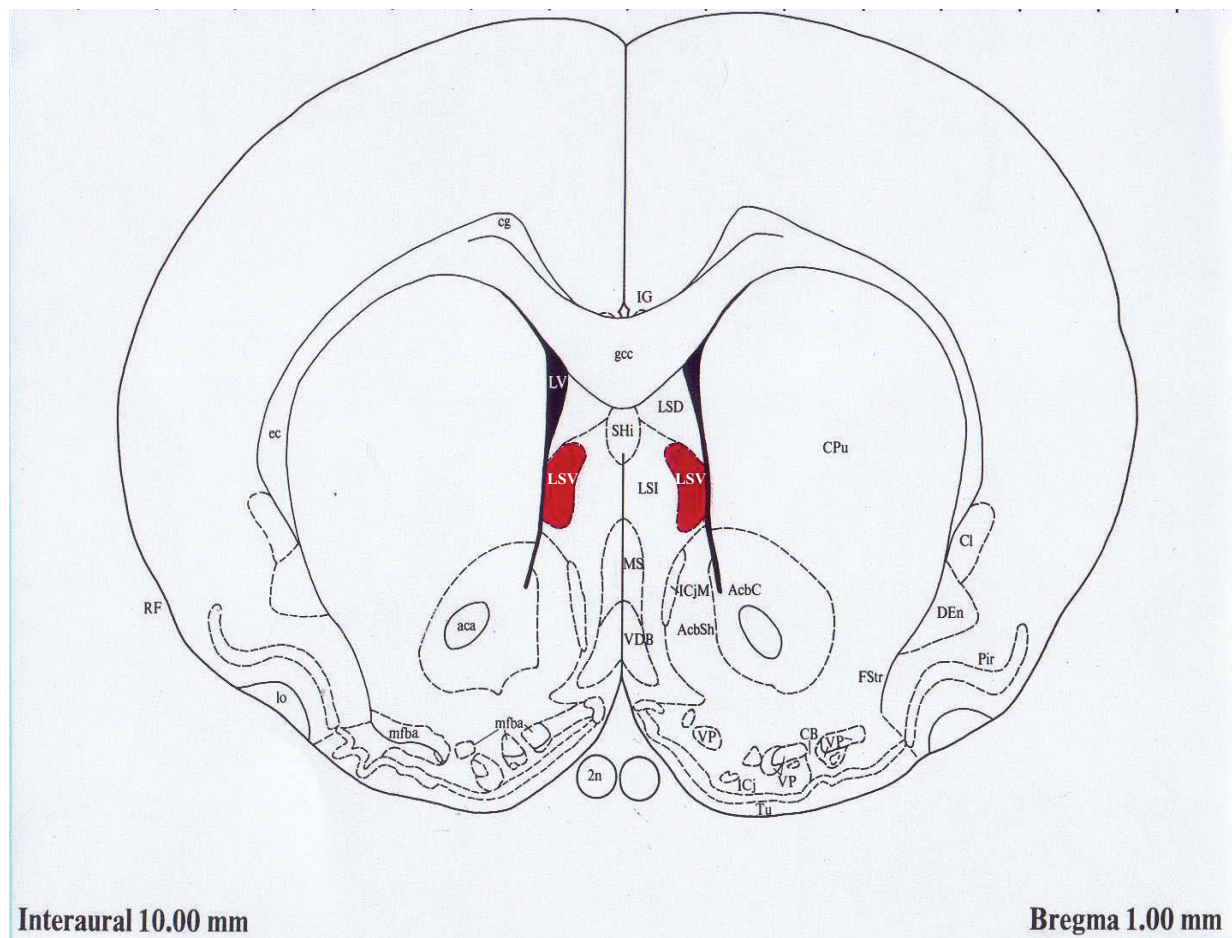
3. Irodalmi áttekintés

3. 1. A lateralis septum neuroanatómiája patkányban

A septalis komplex az utóbbi néhány évtizedben az idegrendszeri kutatások előterébe került agyterület. A limbikus rendszer részeként rendkívül sokrétű kapcsolatot tart fenn számos más agyterülettel, amelyek közül kiemelhető a neuroendocrin rendszer központjaként számon tartott hypothalamusszal, valamint a tanulás és memória központjaként ismert hippocampalis formatioval való reciprok kapcsolata. A kérgi neuronkörök működésében igen jelentős folyamat, a neuronális aktivitás különféle frekvenciákon történő szinkronizációja a medialis septum pacemaker sejtjeivel hozható kapcsolatba (Rose és Schubert, 1977; Freund és Antal, 1988; Gulyás és mts., 1990; Dutar és mts., 1995). A septalis komplex lateralis része (LS) kísérletes bizonyítékok szerint nem kevésbé fontos szerepet játszik számos viselkedési mintázat kialakításában. A neuroendocrin rendszerrel fenntartott kapcsolatai révén befolyással van az állatok táplálék- és vízfelvételére, vérnyomására (Stradford és Kelley, 1999; Skelton és mts., 2000), különféle viselkedésmintázataira, pl. a szorongás kiváltásában (Cheeta és mts., 2000), valamint a maternalis viselkedésben, pl. szoptatásban (Li és mts., 1999; Sheehan és mts., 2000) is kimutatható szerepet játszik.

A septalis komplex az agyféltekék vastag medialis fala a lamina terminalis és a commissura anterior előtt és fölött helyezkedik el. Pre- és supracommissuralis részekre osztható magtömegek és rostkötegek alkotják. Topográfiai viszonyai, cytoarchitekturája és összeköttetései alapján medialis, lateralis és posterior részekre tagolható (Paxinos és Watson, 1986). A LS a septalis komplex rostradorsalisán az oldalkamrák medialis falánál elterülő legnagyobb páros sejtcsoportja (1. ábra), míg a medialis és posterior septalis területek az agy középvonalában elhelyezkedő páratlan struktúrák.

Jakab és Leranthy (1995) a LS-t a területen elhelyezkedő neuronok nagysága és denzitása alapján nucleus dorsalis- (LSD), nucleus intermedialis- (LSI) és nucleus ventralisra (LSV) osztotta fel. Ezt a felosztást, retrográd és anterográd pályajelöléses, immunohisztokémiai, illetve in situ hibridizációs technikákat kombináló kísérleteik alapján Risold és Swanson (1997a,b) módosította. Az új felosztás szerint, mely nemcsak a magok dorso-ventralis, kétdimenziós elrendezését veszi figyelembe, hanem a rostro-caudalis kiterjedésükkel is számol, megkülönböztetünk rostroventralis részt (LSr), caudodorsalis részt (LSc) és ventralis részt (LSv). A LSr- és a LSc neurokémiai szerkezete alapján további 20 zónára tagolható, amelyek régiókra, a régiók pedig doménekre oszthatók (lásd neurokémiai felosztásnál).

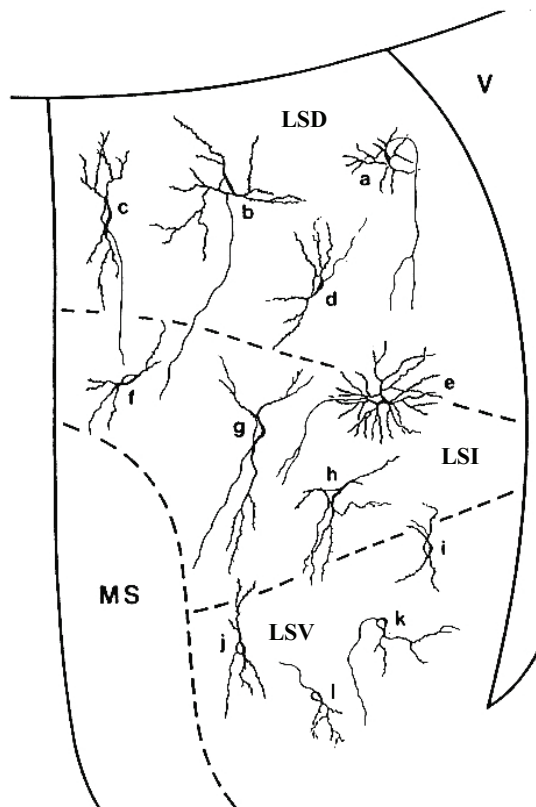


1. ábra: A LS az oldalkamrák medialis falánál található sejtcsoport. A koronális metszeten a dorsalis, az intemedier és a ventralis magcsoport van feltüntetve. Utóbbi területre koncentráltak az általunk vizsgált neuropeptidek. (LSD: nucleus dorsalis, LSI: nucleus intermedialis, LSV: nucleus ventralis, sötétszürke) (Paxinos és Watson után, 1986)

A LSc azonos a régi nomenklatura alapján az LSI-al, illetve a LSV rostralis részével. A LSc a régi LSD-t és az LSI és LSV dorsalis részét foglalja magába. Végül a LSV a régi LSV caudalis részének felel meg.

3. 1. 1. A lateralis septum sejttípusai

A LS neuronjairól általánosan elmondható, hogy dendritjeik kisebb, vagy nagyobb mértékben, de mindig tartalmaznak dendrit tüskéket, sohasem varikózusak, ami megkönnyíti a medialis septum-diagonális köteg neuronjaitól való elkülönítésüket. Neuronjait négy nagy típusba sorolhatjuk: I. típus, II.a típus, II.b típus és III. típus (Alonso és Frotscher 1989a,b; Phelan és mts., 1989; Jakab és Leranthe, 1990a,b) (2. ábra).



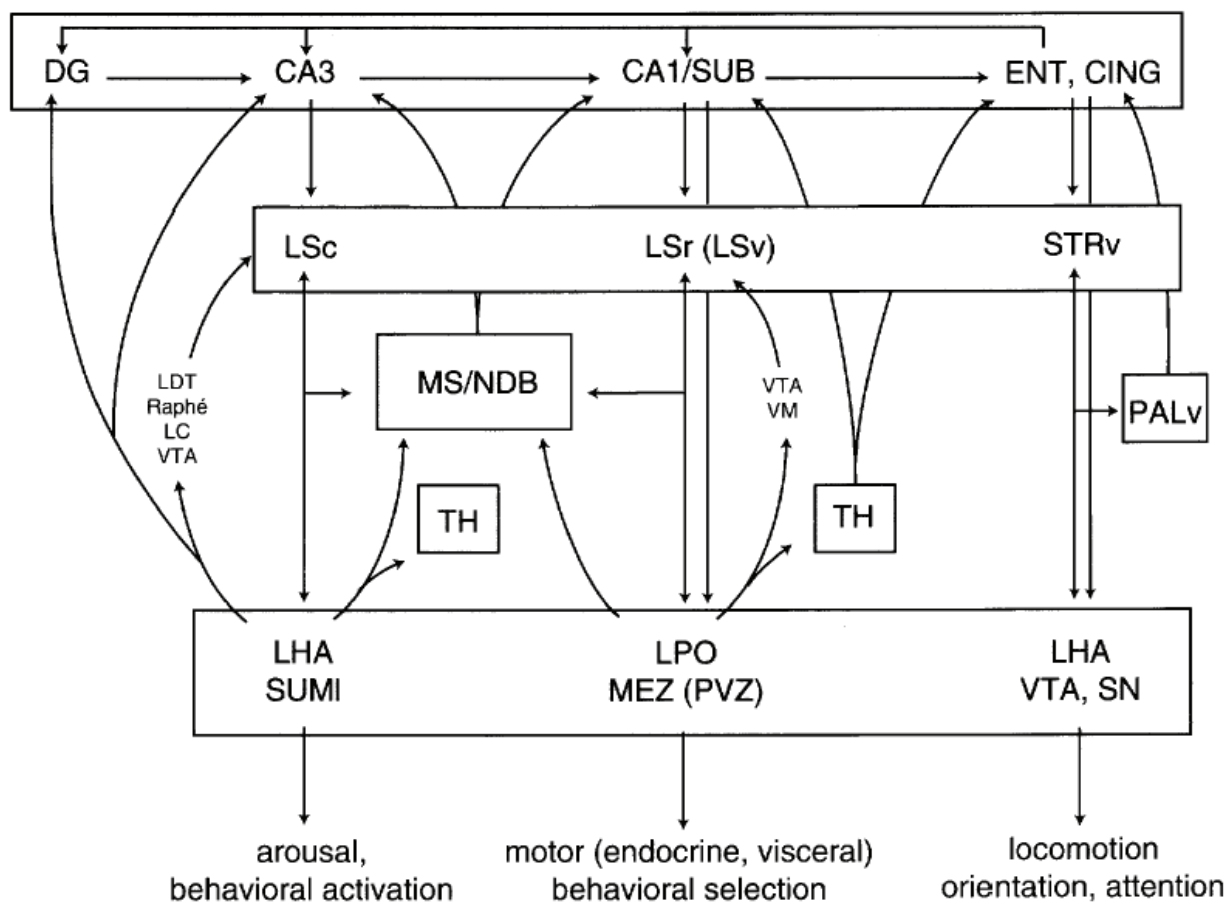
2. ábra: Jellemző sejtípusok a LS területén: **a**: I. típusú sejt; **b-e**: II.a típusú sejtek; **f-h**: II. b típusú sejtek; **i-l**: III. típusú sejtek. (LSD: nucleus dorsalis, LSI: nucleus intermedius, LSV: nucleus ventralis, MS: medialis septum, v: oldalkamra) (Jakab és Leranthy, 1990 szerint)

Az I-es típusba tartozó neuronok a LSD (dorsalis LSc, Risold és Swanson (1997a,b)) területén fordulnak elő. Nagy, kerek, többszögű, vagy ovális sejttestjeik vannak, kb. 15-20 μm -es átmérővel. Általában 3-5 μm vastag primer dendrittel rendelkeznek, amely dichotómikusan elágazva alakítja ki kb. 600 μm átmérőjű gömb, vagy ovális formájú dendritfáját (Phelan és mts., 1989). A sejttest és a proximális primer dendritek dendrittüske mentesek, míg a distális dendrit nyúlványok sűrűn elhelyezkedő, rövid tüskéket hordoznak (Alonso és Frotscher, 1989a). Sejtmagjuk mély betűrődésekkel szabdalts, citoplazmájuk sok organelumot tartalmaz. Axonjaik a septumon kívülre projektálnak (Phelan és mts., 1989), viszont sok kollaterálisukkal bonyolult, a LSV területén elágazódó axonfát alakítanak ki. A II.a típusba tartozó neuronok a LSD és LSI (LS medialis zónájában, a LSr és a LSc ventralis részén, Risold és Swanson (1997a,b)) területén fordulnak elő. A bipolaris, vagy fuziform neuronok közepes méretű sejttesttel rendelkeznek, két irányba kiterjedő dendrit arborizációval. Hosszú dendritjeiken kevés a dendrittüske, sejtmagjuk kis betűrődésekkel tagolt. Sejtplazmájuk vékony sávban veszi körül a sejtmagot, kevés sejtorganelummal.

Dendritjeik elhagyják a LSD-t és LSI-t (LSr-t és a ventralis LSc-t, majd a dorsalis LSc után, Risold és Swanson (1997a,b)) a medialis septum területére érkeznek. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy résztvesznek a LS belső neuronköreinek kialakításában (Alonso és Frotscher, 1989a). A II.b típusú sejtek csak a LSI (lateralis LSr, a mediodorsalis LSc és a lateralis Lsv, Risold és Swanson (1997a,b)) területén fordulnak elő. Jellegzetes, sejttesten elhelyezkedő dendrittüskéik alapján Jakab és Leranthe (1990a) „somatospiny” neuronoknak nevezte el őket. A LS sejteinek 20-25%-át teszik ki. Közepes nagyságú kerek, ovális, vagy háromszög alakú sejttesttel és legfeljebb 5 dendrittel rendelkeznek. Az I-es típusal ellentétben dendritjeik hosszúak és vékonyak, kevesebb és hosszabb dendrittüskével. Sejtmagjuk kis betűrodéseket visel, citoplazmájuk sejtorganellumokban gazdag. A septumon kívülre projektálnak (Jakab és Leranthe, 1991a). A III-as típusba tartozó neuronok az Lsv területén találhatóak meg. Kicsi kerek, vagy ovális sejttestük van, kicsi dendritikus arborizációs területtel. Rövid dendritjeik sok dendrittüskével rendelkeznek. A sejtplazma vékony sávban, kevés sejtorganellummal övezi az enyhén tagolt magot (Alonso és Frotscher, 1989a).

3. 1. 2. A lateralis septum afferens és efferens kapcsolatai

A LS, a limbikus rendszer részeként jelentős közvetítő szerepet tölt be a limbikus kérgi, illetve hypothalamikus és az agytörzsi területek kommunikációjában. Nemcsak egyszerű információ-továbbítóként, hanem integráló állomásként is szerepet játszik az endokrin, az autonóm funkciók és a kérgi kognitív folyamatok összehangolásában (Jakab és Leranthe, 1995). Autoradiográfiás és anterográd pályajelöléses kísérletekkel igazolták, hogy a LS topográfiailag rendezett formában efferenseket küld a medialis septum-diagonális köteg felé, a substantia innominatába, a hypothalamusba, a thalamus középvonali magvaihoz és egyes agytörzsi struktúrákhoz (Meilbach és Siegel, 1977; Garris, 1979; Swanson és Cowan, 1979; Krayniak és mts. 1980; Staiger és Nürnbergger, 1991a; Staiger és Nürnbergger, 1991b; Risold és Swanson, 1996). A terület egyik bemenetét a hippocampalis formatio szolgáltatja, amely az explicit memórianyomok kialakításának és rövid távú tárolásának helye (O’Keefe és mts., 1978; McNaughton és mts., 1987; Squire és mts., 1992; Eichenbaum és mts., 2001), valamint a térbeli tájékozódás idegi centruma (O’Keefe és mts., 1978; Maguire és mts., 1998). Emellett a fent említett efferenseit fogadó területektől is kap afferenseket, így ezekkel reciprok kapcsolatot tart fenn (Swanson és Cowan, 1976; Swanson és Cowan, 1977; Van Groen és Wyss, 1990; Risold és Swanson, 1996) (3. ábra).



3. ábra: A LS afferens és efferens kapcsolatai. Risold és Swanson (1997b) után (CA1: hippocampus CA1-es zónája, CA3: hippocampus CA3-es zónája, CING: cingulum, DG: gyrus dentatus, ENT: entorhinalis cortex, LC: locus coeruleus, LDT: laterodorsalis nucleus tegmentalis, LHA: lateralis hypothalamus, LPO: lateralis preopticus area, MS/NDB: medialis septum és Broca-féle diagonális köteg, PALv: ventralis pallidum, PVZ: hypothalamikus periventricularis zóna, SN: substantia nigra, SUB: subiculum, SUMI: lateralis nucleus supramammillaris, STRv: ventralis striatum, TH: thalamus, VM: thalamus nucleus ventromedialis, VTA: ventralis tegmentalis area)

A septalis komplex **afferenseinek** nagy részét a LS fogadja. A LSr és LSv a hippocampus CA1-es régiójából, valamint a subiculumból kap innervációt, míg LSc-ba kétoldali bemenet érkezik a CA3-as zónából (Tóth és mts., 1993; Risold és Swanson, 1997), másrésztől fontos bemenetek jönnek a supramammillaris mag (Kiss és mts., 2000; Vertes és Mckenna, 2000), a preoptikus area, az elülső, paraventricularis és ventromedialis hypothalamikus magok, és a lateralis hypothalamikus területek felől (Sakana és mts., 1982; Poulain és mts., 1984; Csáki és mts., 2000). A LSv-ba a paraventricularis magokból érkező

projekció arginin vasopressin tartalmú, érdekessége, hogy nagyon érzékeny a szex szteroidok mennyiségére, (nagy mennyiségű androgén, ill. ösztrogén receptorral rendelkeznek) és ivari dimorfizmus jellemző rá. A köztiagy területei közül a ventralis tegmentalis- és laterodorsalis tegmentalis nucleusból (dopaminerg rostok), valamint az agytörzsi régió területéről a locus coeruleusból (monoaminerg beidegzés) és a közepagy raphe magvak felől (szerotoninerg beidegzés) érkeznek afferensei. Ezen agytörzsi magvak kapcsolatban állnak a lateralis hypothalamusszal, amely a különböző viselkedés mintázatok kialakításában fontos szerepet betöltő agyterület (Saper, 1987), illetve a nucleus supramammillaris lateralis részével (Borhegyi és mts., 1998; Leranthy és mts., 1999), amely a mozgás szabályozásában és a limbikus kérgi szinkronizációs folyamatokban játszik szerepet. Mindkét terület reciprok kapcsolatot tart fenn a LS egészével.

Hypothalamusba küldött **efferensek**:

Varoquaux és Poulain (1994) feltételezték, hogy a LS csak indirekt úton a medialis septumon és a diagonális kötegen keresztül befolyásolja a neuroendokrin és autonóm szabályozást. Ezt az elgondolást anterográd és retrográd pályajelöléses kísérletek módosították, amelyek felhívták a figyelmet a közvetlen szabályozásra (Sawchenko és Siegel, 1977a; Wouterlood és mts., 1988; Ferris et al., 1990; Staiger és Wouterlood, 1990; Staiger és Nürnbergger, 1991a; Risold és Swanson, 1996). Másrészt a jelentős projekciót, amit a medialis septum és a diagonális köteg felé feltételeztek, Leranthy és mts. (1992) anterográd pályajelölési kísérletei megkérdőjelezték: *Phaseolus vulgaris* leucoagglutininint használva ezt a kapcsolatot gyengének találták. Az efferensek három útvonalon közelítik meg az egyes hypothalamikus magokat: (1) A LS fő kimenete rostroventralisan csatlakozik a diagonális köteg dorsalis, majd caudalisabban a ventralis ágához, végül a medialis előagyi köteghez. Egy kisebb átmérőjű pálya kiválik a diagonális köteg tengelyére merőlegesen és a medialis és lateralis preopticus területekhez tart. (2) A septofugális rostok egy része először caudalis irányba fordul, majd a perifornicális rostköteghez csatlakozva, a fornix melletti hypothalamikus területen végződik. (3) Végül a septofugális köteg másik része az anterior perifornicális területen áthaladva éri el a hypothalamus periventricularis zónáját.

A medialis előagyi kötegen át a medialis preoptikus területekre a LS_v-ből, a lateralis preoptikus területekre a LS_r-ből, az elülső hypothalamusba (Blume és mts., 1982) és a nucleus supramammillarisba a LS_c-ből (Borhegyi és Freund, 1998) érkeznek rostok. A septofugális rostok az anteriodorsalis hypothalamikus területen, a zona incertában, illetve a lateralis hypothalamus területén (a LS_c-ből) (Staiger és Wouterlood, 1990), valamint a dorsalis és ventralis premammillaris és a mediolaterális nucleus supramammillarisban

végződnek, a LSr-ből kiinduló rostok pedig a medialis hypothalamusban, mely célterületek befolyásolják a táplálékfelvételt, a szaporodást, a védekező magatartás formákat, illetve a cirkadián ritmus generálást (King és Nance, 1986; Wetmore és Nance, 1991; Luckman, S. M., 1995; Canteras és Swanson, 1998). A LSv-ből kiinduló septofugalis rostok periventricularis zónába érkező axonjait szomatosztatint (anterior periventricularis és periventricularis PVN) (Jakab és Leranthy, 1991a; Jakab és Leranthy, 1993), növekedési hormon releasing faktort (ventrolateralis ARC), dopamint (dorsomedialis ARC), corticotropin releasing faktort és thyreotropin releasing faktort (medialis PVN) termelő sejtek közelében (Swanson és Cowan, 1979; Staiger és Nürnberger, 1991a; Risold és Swanson, 1997a) detektálták. Továbbá proopiomelanocortin gén termékei ellen termeltetett ellenanyaggal jelölt LSv axonokat a mutattak ki a ARC-ban (Finley és mts., 1981; Kawai és mts., 1984).

Thalamusba érkező **efferensek**:

Phaseolus vulgaris-szal végzett kísérleteik alapján Risold és Swanson (1997) mérsékelt erősségű kapcsolatot talált a thalamikus magvakkal. Eredményeik rámutattak, hogy a stria medullaris thalami közvetítésével a harmadik agykamra dorsomedialis fala mentén a LSc, LSr rostokat küld a nucleus parataenialisba, a nucleus interanteriomedialisba, a LSr és a LSv pedig a nucleus paraventricularis thalamival tart fenn kapcsolatot, míg a LSr a nucleus reunienst innerválja. Végezetül az egész LS területéről érkeznek rostok a lateralis habenularis magvakba. A habenulából a fasciculus retroflexus révén az információ az interpeduncularis magba és a ventralis tegmentalis területre jut. Ez a kapcsolat arra enged következtetni, hogy az előagyi limbikus struktúrák eddig még nem felderített befolyást gyakorolhatnak a középagyi magvakra is.

3. 1. 3. A lateralis septum kémiai neuroanatómiája

A LS neurokémiai változatosságát már a 70-es években elkezdték vizsgálni. Az azóta folyó kutatások derítették fényt a LS sejtjei által termelt neurotranszmitterekre és neuroaktív anyagokra, amelyek a következők:

- GABA (gamma-amino-vajsav): nagyszámú, kerek GABA-erg sejtet találunk az LSc-ben és LSv-ben, amelyek szalagként húzódnak előre, elkülönítve az LSc dorsalis részét a stria terminalis bed nucleusától (Costa és mts., 1983; Onteniente és mts., 1984; Ottersen és Strom-Mathisen, 1984; Panula és mts., 1984). Nagyméretű GABA tartalmú sejtek találhatóak a LS mediolateralis zónájában (Jakab és Leranthy, 1990b).

- Serkentő aminosavak: A septalis area LS része gazdag glutamátban, aspartátban. Itt erős innervációt találunk a limbikus kortikális efferensektől, amelyeknek serkentő aminosavak a neurotranszmitterei (Zacsek és mts. 1979; Joels és Urban 1984; Stevens és Cotman 1986).
- Neuropeptidek: A lateralis septumban több mint tíz neuropeptidet találtak a perikaryonokban, és másik húszat pedig az axon terminálisokban. A septalis régióban többek közt kimutatták a következő neuropeptideket: CCK, enkephalin, neurotensin, somatostatin, P-anyag (substance P), neuropeptid Y (NPY), galanin (Gal) (Stengaard és Larsson, 1983; Gall és Moore, 1984; Onteniente és mts., 1989; Sakanaka és Magari, 1989; Jakab és Leranth, 1995).
- Kalcium-kötő proteinek: calbindin, calretinin, parvalbumin. E proteinek meghatározzák az egyes sejtek, különösen a gátló neuronok elektrofiziológiai sajátosságait (Jakab és Leranth, 1995).
- Szteroid receptor-tartalmú sejtek. A LS sejtjei nagyszámban tartalmaznak gonadalis és mellékvese eredetű hormonokra érzékeny, androgén és ösztrogén receptor tartalmú sejteket (Pfaff és Keiner 1973; Stumpf és mts. 1975). Számos LS-ban lévő kisebb magcsoportot találtak, amelyek androgén és ösztrogén receptorokat expresszáló RNS-t tartalmaznak (Simerly és mts., 1990). Sok glükokortikoid tartalmú sejtet és nagymennyiségű glükokortikoid receptort találtak a LS-ban (McEwen és mts., 1986). Ezek a sejtek valószínűleg érzékenyek a vér szteroidhormon szintjére, amely különböző fiziológiai és környezeti feltételekre adott sejtválaszok aktivitását módosítják.

A fenti felsorolást egészíti ki ill. pontosítja a LS felosztását átformáló, pályajelöléses és immunohisztokémiai technikákat kombináló munkájukban Risold és Swanson (1997b), akik az alábbi, területenkénti neurokémiai felosztást javasolják:

A **LSv**, amely a LS legkisebb sejtcsoportosulása, gazdag ösztrogén és androgén receptorokat expresszáló neuronokban.

A **LSr** sűrű enkephalin és neurotensin innervációja alapján különül el. Dorsolaterális zónájának medialis régiója calcitonin gene-related peptide és substance P beidegzést, míg lateralis régiója az enkephalin innerváción kívül, thyreotropin releasing faktor immunpozitív axon terminálisokat kap.

A **LSc**, amelyet szomatosztatin és mineralocorticoid receptort expresszáló neuronjai alapján különítettek el, a legösszetettebb a három terület közül. *Ventralis* zónájának neuronjai sok androgén receptort expresszálnak, amelyeket substance P pozitív axonok vesznek körül. A ventralis zóna medialis régiója dopaminerg innervációja, lateralis régiója vasopresszin és Gal tartalmú axon terminálisai alapján különböztethető meg, míg intermedialis régiója csak

kevés, az előbbieken felsorolt beidegzést kap. A LSc *dorsalis* zónája szintén három régióra különül el. Dorsalis régiójában sok dynorphin expresszáló neuront mutattak ki. Ventralis régiója substance P immunreaktív neuronjaival jellemezhető, míg lateralis régiója csak dopaminerg beidegzést kap, és nem tartalmaz substance P-t, illetve dynorphin-t expresszáló sejteket.

3. 2. Leucin-enkephalin, neuropeptid-Y, galanin és a táplálékfelvétel kapcsolata

A szervezet energia homeosztázisa komplex neuroendokrin szabályozás alatt áll, beleértve – többek között - a perifériáról érkező leptin (Houseknecht és mts., 1998) és ghrelin (Horváth és mts., 2001; Tschöp és mts., 2000) szerepét, valamint az agy táplálkozást szabályozó központjainak neuropeptidjeit is (Magni, 2003). A központi idegrendszer elsődleges táplálékfelvételt szabályozó területe a hypothalamus. A hypothalamikus magokban felszabaduló neuropeptideket két csoportra oszthatjuk a táplálkozásra gyakorolt hatásuk alapján: *anorexigén* hatásúak (pl. pro-opiomelanocortin, cocaine- and amphetamine-regulated transcript, corticotrophin-releasing hormone) (Cowley és mts., 2003), és *orexigén* hatásúak (pl. NPY, agouti-related protein, Gal és melanin-concentrating hormone) (Xu és mts., 1999; Savontaus és mts., 2002; Diano és mts., 2003). A táplálékfelvétel pontos szabályozásának megértési nehézségeihez nemcsak a neuropeptidok száma, hanem a szabályozásban résztvevő neuronkörök komplexitása is hozzájárul. Az eddigi kutatások a táplálkozás-szabályozással kapcsolatban elsősorban hypothalamikus magcsoportokra (ARC, PVN, lateralis hypothalamikus területek (LHA), nucleus ventromedialis és nucleus dorsomedialis) (Hillebrand és mts., 2002) terjedtek ki. A perifériáról érkező hormonális jelek közül a leptin hatása a legismertebb. A leptin a fehér zsírszövet által termelt, erősen anorexigén hatású hormon, amely a vér-agy gáton átjutva a fent említett hypothalamikus magcsoportok neuronjainak neuropeptid termelését befolyásolja (Houseknecht és mts., 1998).

A hypothalamuson belül található neuronális szabályzó körök fontos anabolikus effektor molekulái a NPY és Gal (Kyrkouli és mts., 1990; Schwarts és mts., 2000; Magni, 2003). A NPY az idegrendszer neuronjai által leggyakrabban expresszált neuropeptid (Wettstein és mts., 1995). A 36 aminosavból álló peptidet először 1982-ben írták le (Tatemoto és mts., 1982). A pancreatikus polipeptidok (PP) családjába tartozik, evolúciós szempontból erősen konzervált génszakasz kódolja. Ezt támasztja alá, hogy a patkányban előforduló fehérje aminosavsorrendje 100 %-ban megegyezik a humán NPY aminosav sorrendjével (Magni, 2003). Sok fiziológiai folyamat regulációjában játszik kulcsszerepet, így a kognitív

funkciók, a táplálékfelvétel, a circadián ritmus, neuroendokrin folyamatok, szaporodási és cardio-vascularis funkciók kialakításában és szabályozásában. Erős orexigén hatása van, a makronutriensek közül, főleg a szénhidrátok felvételét stimulálja. Az egyik leggyakrabban előforduló hypothalamikus neuropeptid (Allen és mts., 1983). Elsősorban a ARC gazdag NPY expresszáló neuronokban, amely területen a vér-agy gát hatása kevésbé érvényesül, így az itt lévő neuronok kivételes helyzetbe kerülnek, hogy a perifériáról jövő energia homeosztázissal kapcsolatos szignál molekulákat érzékeljék (leptin, inzulin, ghrelin), és továbbítsák az információkat más táplálkozás szabályozással kapcsolatos agyterületek felé (Grove és mts., 2003). NPY mRNS tartalmú sejteket mutattak ki a LS területén, a nucleus septohippocampalisban (A mag a septum leprostromedialisabb pontjától tart a nucleus septofimbrialis kezdetéig, amely már lateralisabb elhelyezkedésű, beékelődve a LS állományába. Kapcsolataik és neuropeptid tartalmuk alapján, a szerzők javaslatot tettek a két mag funkcionális LS-hoz való csatolására.), illetve a mellette húzódó sávban, közel a nucleus septofimbrialishoz (Risold és Swanson, 1997a).

A 29 aminosavból álló peptidet, a galanint-t először vékonybélből, később a központi idegrendszer területén is kimutatták, főleg a hypothalamikus magvakban, különös tekintettel a ARC és PVN Gal-t expresszáló neuronjaira (Gundlach és mts., 2001). Ezen idegsejtek nyúlványaikkal behálózzák a hypothalamus Gal receptorokat (GalR1 és GalR2) tartalmazó területeit. A Gal ugyan rendelkezik NPY-hoz hasonló hatással, központi idegrendszerbe történő adása az első kísérletek során elősegítette a táplálékfelvételt (Kyrkouli és mts., 1986), de ismételt bejuttatása sem az elhízást, sem a hyperphagiát nem befolyásolta (Smith és mts., 1994; Beck, 2000). A ARC NPYerg sejtjei a PVN Gal- tartalmú neuronjaival szinaptizálnak. A Gal stimulálni tudja továbbá a NPY felszabadulását a PVN neuronjaiból (Ceccatelli és mts., 1989; Bergonzelli és mts., 2001). A LS területén Melander és mts. (1986) mutattak ki Gal tartalmú rostokat, illetve Risold és Swanson (1997b) Gal tartalmú terminálisokat írt le a LSc ventralis területén.

A 70-es évekbeli felfedezésük óta, sok adat gyűlt össze az opioidok táplálkozási mintázatokat befolyásoló, szabályozó szerepéről. Általánosan kijelenthetjük, hogy az opioidok serkentik a táplálékfelvételt. Az ún. „opiooid-ízlelés hipotézis” szerint ízletes táplálék elfogyasztása előidézi az endogén opiátok felszabadulását a szervezetben, ami fokozott táplálékfelvételhez vezet. Állatokkal végzett kísérletekkel bizonyították, hogy ízletes táplálék fogyasztása serkentette a hypothalamikus β -endorphin felszabadulást (Dum és mts., 1983), illetve speciális diétával hízlalt patkányok hipofízisében megemelkedett β -endorphin immunoreaktivitást mutattak ki (Gunion és Peters, 1981). Opioid agonisták hatására

emlősökben nőtt a felvett táplálék mennyisége (Gosnell és Levine, 1996). Normál testtömegű személyeknél opioid antagonisták hatására (naloxon), rövid távon a felvett táplálék mennyiségének szignifikáns csökkenését észlelték (Cohen és mts., 1985). Egy másik tanulmány rámutat arra, hogy a NPY által kiváltott orexigén hatás eléréséhez elengedhetetlen a központi opioid szignál serkentő hatása (Yeomans és Gray, 2002). Az endogén opiátok egyik fontos képviselője a Leu-enk, amely az endogén opiátok három prekursor molekulája közül a proenkephalinból szintetizálódik. Legnagyobb mennyiségben a hipofízis elülső lebenyében, valamint még három agyterületen, így a ARC, nucleus tractus solitariiben és a nucleus commissuralisban keletkezik prekursorából (Khachaturian és mts., 1983). A LS területe is kap enkephalin beidegzést, főleg a LSr (Gall és Moore, 1984; Onteniente és mts., 1989; Sakanaka és Magari, 1989; Risold és Swanson, 1997a,b).

Amellett, hogy a hypothalamus energiaháztartásban betöltött szerepéről egyre többet tudunk, más agyterületek ugyancsak befolyásolják a táplálékfelvétel szabályozását, pl. a nucleus tractus solitarii (Ishizaki és mts., 2002) és a nucleus Edinger-Westphal (Kozicz, 2003). Továbbá több közleményben vizsgálták a korai géntermékek, mint például a c-fos mennyiségének változását csökkentett táplálékfelvétel hatására. Ezen tanulmányokban vizsgált agyterületek közül a LS bizonyos sejtpopulációit is megnövekedett c-fos aktivitásúnak találták, ami a terület táplálékfelvétel szabályozásában betöltött szerepére utal (Chaillou és mts., 2000; Timofeeva és Richard, 2001). Azonban a c-fos immuncytokémia nem ad információt arra nézve, hogy ezek az aktiválódó sejtek milyen neurokémiai természetűek. Elektrofiziológiai mérések szerint is (Oliveira és mts., 1990) a LS sejteinek aktivitás fokozódása észlelhető a táplálékfelvétel során. Ugyanakkor a LS is immuncytokémiai módszerekkel detektálhatóan jelentős mennyiségű orexigén és anorexigén neuropeptidet tartalmaz. Ezért döntöttünk a LS területén, bizonyítottan a táplálékfelvétel szabályozásban is fontos szerepet játszó három neuropeptid immuncytokémiailag detektálható, éhezés okozta denzitás változásainak tanulmányozása mellett.

4. Célkitűzés

A LS-ban kimutatható neuropeptidek közül az enkephalinok, a NPY és a Gal a hypothalamikus magvakban is bizonyítottan fontos szereplője a táplálékfelvétel szabályozásának. Mivel a LS táplálékfelvételt szabályozó szerepével kapcsolatban kevés információ áll rendelkezésre, célul tűztük ki, hogy munkánkban megvizsgáljuk a patkány LS területén előforduló NPY, Gal és Leu-enk rostrocaudalis megoszlását, valamint immunocytokémiailag lokalizálható mennyiségének éhezés hatására bekövetkező változásait. Ezen vizsgálatokat hím és nőstény, valamint ovariectomizált (OVX) állatok estében is elvégeztük, az esetleges nemi különbségek feltárása érdekében.

Kísérleteinkben a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Milyen neuronális elemekben és hol fordul elő a LS magcsoportjaiban a Leu-enk, NPY és Gal?
- Van-e különbség a három neuropeptid immunocytokémiailag detektálható mennyiségében a magcsoportok rostro-caudalis kiterjedése mentén?
- Változik-e a Leu-enk, NPY és Gal immunocytokémiailag detektálható mennyiségének denzitása egy hetes teljes táplálékmevönás hatására hím állatokban?
- Milyen változások történnek a három neuropeptid denzitásában 1-4 hétig tartó 40 %-os táplálék megvonás hatására hím patkányokban?
- Befolyásolják-e a női nemi hormonok a három neuropeptid expresszióját a LS területén?
- Hasonló denzitásbeli változásokat tapasztalunk-e nőstény állatok esetében 1-4 hétig tartó 40 %-os táplálék megvonásra, mint a hímeknél?
- Hogyan befolyásolják a gonadális hormonok a 40 %-os táplálékmevönás neuropeptidek expressziójára gyakorolt hatását (OVX és nőstény állatok összehasonlító vizsgálata)?

5. Anyagok és módszerek

5. 1. Felhasznált állatok

Vizsgálatainkhoz azonos korú, fiatal, ivarérett, Wistar hím (n=26) és nőstény (n=32) patkányokat (250-280 g) használtunk fel. Az állatokat a Tomker Kft.-től szereztük be. Az állatokon végrehajtott kísérleteket a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Karának Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának engedélyével, valamint az EU (86/609.EEC) előírásait és a 243/98-as kormányrendeletben leírtakat követve végeztük el. Az állatokat ért stresszt, szenvedést a kísérletek során minimálisra próbáltuk csökkenteni, valamint a kísérleti állatszámot is a lehetséges minimumra redukáltuk.

5. 2. Műtéti technika

Ovariectomia (OVX): a fiatal, ivarérett nőstény állatokat (n=8) intraperitoneálisan beadott Nembutal injekcióval (100 µl / 250 g testsúly) altattuk el. A szőrzet eltávolítása és a bőr jóddal való fertőtlenítése után, a medence lapát felett 1 cm-rel felvágtuk a bőrt, majd átvágtuk az izomzatot. A résen keresztül kiemeltük a zsírszövetbe ágyazott petefészkét a petevezetővel. A petevezető és a vele futó erek lekötése után, eltávolítottuk a petefészkét. A petevezető csonkját visszahelyeztük a hasüregbe. A keletkezett sebfelszíneket összevarrtuk, majd jóddal fertőtlenítettük. A műtétek során az állatok mindkét oldali petefészkét eltávolítottuk. Az altatás alatt gondoskodtunk testük melegen tartásáról. A műtétet követő két napon a fájdalom és láz enyhítésére csecsemőknek ajánlott Panadol szuszpenziót (5 ml / 0,5 l) kevertünk az állatok ivóvizébe.

5. 3. Éheztetéses kísérletek kivitelezése

A kísérletek alatt az állatonak próbáltunk 12/12 órás megvilágítási illetve sötét periódust, valamint állandó 20-22 C körüli hőmérsékletet biztosítani.

5. 3. 1. Egy hétig tartó teljes éheztetés

Hím 1 hétig tartó teljes éheztetés (n=3, ahol **n** egy csoportban szereplő állatok számát jelöli): az éhező csoport egy héten keresztül nem kapott táplálékot *ad libitum* ivóvízfogyasztás mellett. A kontroll csoport *ad libitum* fogyaszthatott laboratóriumi patkánytápot és csapvizet. Az egy hét elteltével az állatok agyát perfúziós fixálás után feldolgoztuk.

5. 3. 2. Egy hétig tartó részleges éheztetés

Hím 1 hétig tartó 40 %-os táplálék megvonás (n=4): a kísérlet megkezdése előtt egy hétig visszamérési technikával ellenőriztük a napi táplálékfogyasztás mennyiségét. Ketrecenként egy állatot helyeztünk el, hogy az esetleges versengést kiküszöböljük. A kapott napi mennyiségeket átlagoltuk, és ezt vettük 100 %-os táplálékfogyasztásnak. Az éhező csoport ennek a laboratóriumi patkánytáp mennyiségének 60%-át kapta naponta, mindig ugyanabban az időpontban, egy héten keresztül, *ad libitum* vízfogyasztás mellett. A kontroll csoport tápot és csapvizet kapott *ad libitum*. Az első hét végén az éhező és a kontroll csoportból egyaránt mintát vettünk.

Nőstény és ovariectomizált nőstény 1 hétig tartó 40 %-os táplálék megvonás (n=4): két héttel az OVX után indítottuk a kísérletet, időt hagyva az állatoknak az operációból való felépülésre. Az intakt nőstény és az ovariectomizált nőstény kontroll csoport *ad libitum* táplálkozhatott, ihatott. Az éhező intakt és ovariectomizált állatok az előzetes felmérések alapján megállapított napi elfogyasztott táplálék mennyiségnek 60 %-t kapták naponta, ugyanabban az időpontban egy héten keresztül, *ad libitum* vízfogyasztás mellett. Az első hét után az éhező intakt, az éhező ovariectomizált, a kontroll intakt és a kontroll ovariectomizált állatok agyát perfúziós fixálás után feldolgoztuk. Az éhezés alátámasztására a szív bal kamrájából vért vettünk, melyből plazma glükóz, koleszterin, triglicerid, illetve szabadzsírsav tartalmát határoztunk meg. Az állatok testtömegét a perfúziós fixálás előtt lemértük.

5. 3. 3. A részleges éheztetés kiterjesztése 2-3-4 hétre

Hím 2-3-4 hétig tartó 40 %-os táplálék megvonás (n=2): a kísérlet megkezdése előtt egy hétig visszamérési technikával ellenőriztük a napi táplálékfogyasztás mennyiségét. Ketrecenként egy állatot helyeztünk el, hogy az esetleges versengést kiküszöböljük. A kapott napi mennyiségeket átlagoltuk és ezt vettük 100 %-os táplálékfogyasztásnak. Az éhező csoport ennek a laboratóriumi patkánytáp mennyiségnek 60%-t kapta naponta, mindig ugyanabban az időpontban, négy héten keresztül, *ad libitum* vízfogyasztás mellett. A kontroll csoport tápot és csapvizet kapott *ad libitum*. A második, a harmadik és a negyedik hét végén az éhező és a kontroll csoportból egyaránt mintát vettünk.

Nőstény és ovariectomizált nőstény 2 és 4 hétig tartó 40 %-os táplálék megvonás (n=2): két héttel az OVX után indítottuk a kísérletet, időt hagyva az állatoknak operációból való felépülésre. Az intakt nőstény és az ovariectomizált nőstény kontroll csoport *ad libitum* táplálkozhatott, ihatott. Az éhező intakt és ovariectomizált állatok az előzetes felmérések alapján megállapított napi elfogyasztott táplálék mennyiségnek 60 %-t kapták naponta,

ugyanabban az időpontban négy héten keresztül, *ad libitum* vízfogyasztás mellett. A második és a negyedik hét után az éhezõ intakt, az éhezõ ovariectomizált, a kontroll intakt és a kontroll ovariectomizált állatok agyát perfúziós fixálás után feldolgoztuk. Az éhezés alátámasztására a szív bal kamrájából vért vettünk, melyből plazma glükóz, koleszterin, triglicerid, illetve szabadzsírsav tartalmat határoztunk meg. Az állatok testtömegét a perfúziós fixálás előtt lemértük.

5. 4. Perfúzió és immuncitokémiai festési technika

5. 4. 1. Perfúzió

A kísérletekben résztvevõ állatokat mély altatásban (Nembutal: 100 µl / 250 g testsúly),- mindig ugyanazon napszak, ugyanazon órájában-, a bal szívkamrán át perfundáltuk: a vért az érpályából 0,9 %-os NaCl oldattal távolítottuk el (50-100 ml / patkány), majd 4 % paraformaldehidet, 0,1 % glutáraldehidet és 15 % pikrinsavat tartalmazó 0,1 M foszfát pufferes (PB) (pH: 7,4) fixáló oldatot használtunk a szövetek fixálására.

5. 4. 2. Pre-embedding immunocitokémiai festés fény- és elektronmikroszkópra

A kipreparált agyakból egy éjszakás 4 %-os paraformaldehides utófixálás után, az agy septalis régiót tartalmazó részébõl (bregma 1,70 mm és -0,40 mm között [Paxinos és Watson, 1998]) a koronális síkban 60 µm-es vibratom metszeteket készítettünk. Állatonként 25-30 koronális metszetet készítettünk a septális terület rostro-caudális kiterjedésének megfelelõen. A metszeteket 0,1 M PB-ben mostuk, majd a metszeteken free-floating fénymikroszkópos pre-embedding Leu-enk-, NPY- és Gal-immuncitokémiai reakciót végeztünk. Mosás után a metszeteket 0,1 %-os Na-borohidrid oldatban inkubáltuk 30 percig. A nonspecifikus kötõdést 10 %-os normál kecske szérummal blokkoltuk 45 percig szobahõmérsékleten. Rövid 0,1 M PB-es mosás után, a fénymikroszkópiára szánt metszeteket 0,5 % Triton X-100-zal (PB-ben) kezeltük 10 percig. Az elektronmikroszkópiára szánt metszeteket egy éjszakán át fagyálló folyadékkal (10 ml glicerin, 25 g szaharóz, 10 ml 0,1 M PB 100 ml-re desztillált vízzel kiegészítve) kezeltük, majd másnap folyékony nitrogénben fagyasztottuk. Fagyasztást követõen rövid 0,1 M PB-es mosás, majd egy éjszakás inkubáció következett az elsõdleges szérumokkal (rabbit anti-leucin-enkephalin, Peninsula Laboratories, INC., 1:650, rabbit anti-galanin, Serotec Ltd., 1:400, rabbit anti-neuropeptid Y, DiaSorin, 1:500, 0,1 M PB-ben 0,5 % Triton X-100-al fénymikroszkópiára, 0,1 M PB-ben elektronmikroszkópiára). Többszõri,

megfelelő pufferekben történő mosást követően a másodlagos szérummal (biotinilált kecske anti-nyúl IgG, Vector Laboratories, 1:250, 0,1 M PB-ben mind fény-, mind elektronmikroszkópiára) inkubáltunk 6 órán keresztül. A tercier szérum avidin-biotin-torma peroxidáz komplex volt (ABC Elite Kit, Vector Laboratories, 1:100) 2 órahosszat, majd 0,05 M TRIS pufferes (pH: 7,6) mosás következett. A fénymikroszkópos metszetek előhívása 15 mg diaminobenzidint, 12 mg NH₄Cl-ot, 0,12 mg glükóoxidázt, 600 µl 0,05 M Ni-(NH₄)SO₄-ot, 600 µl 10 % β-D-glükózt és 40 ml 0,1 M PB-t tartalmazó oldattal, míg az elektronmikroszkópos metszetek előhívása 15 mg diaminobenzidint, 10 %-os H₂O₂ és 40 ml 0,1 M PB-t tartalmazó oldattal történt. A fénymikroszkópos metszetek zselatinos tárgylemezre húzása után, felszálló alkohol sorral való víztelenítés és xilolos kezelés következett, majd lefedés DePeX-el. Az elektronmikroszkópos metszeteket 1 %-os OsO₄-dal utófixáltuk, majd felszálló alkohol sorral való víztelenítés 10-10 perce (70 %-os etanolban uranylacetátoztuk 30 percig) után propilén oxid, majd propilén oxid – műgyanta (1:1 arányú keveréke) keverékéből műgyantába kerültek egy éjszakára. Másnap műgyantában felhúztuk őket tárgylemezre és 56 °C-on polimerizáltuk. Az immunreaktív elemekben gazdag területeket blokkokba átagyztuk, majd 60 nm ultravékony metszeteket készítettünk Reichert ultramikrotómmal. Az elektromikroszkópos felvételeket JEOL 100C elektronmikroszkóppal készítettük.

5. 5. Metszetek denzitometriás kiértékelése

A kontroll és éhezett állatokból készült metszetek LS-t tartalmazó részéről Olympus BX2 típusú digitális kamerával 40x alpnagyítású mikrofotókat készítettünk 2272 x 1704 pixeles méretben, 24 bites színmélységgel. A képelemzéshez a Scion Image for Windows v4,02 β verziójú (Scion Corporation, Frederick, MD, USA) programot alkalmaztuk. A képfájlokat 8 bites színmélységű szürkeárnyalatos TIF file-okká konvertáltuk, amelyekből egy 250 × 250 pixeles reprezentatív mezőt emeltünk ki denzitometriás vizsgálat céljára. A reprezentatív mezők kiválasztása minden esetben véletlenszerűen, de az ependyma réteget kihagyva, az oldalkamrához közeli területről történt. A metszetek jobb és bal oldaláról egyaránt készültek felvételek (n=14-20). Minden mező esetében egységes matematikai transzformációt hajtottunk végre a kontraszt egységesítésére. Az eltérő megvilágítás és mélység-élességi különbségek miatt a küszöbértékek beállítása manuálisan történt, úgy, hogy az immunreaktív (IR) elemek különüljenek el a háttértől. A küszöbszint beállításához az eredeti szürkeárnyalatos képhez viszonyítottunk. A küszöb beállítását követően bináris képet hoztunk létre, amelyen a mező pozitív reakciót adó területét fekete, a háttérét fehér pixelek

reprezentálták. Az egyes metszeteken a pozitivitás mértékét az egységnyi terület relatív pozitivitása, vagyis a fekete-fehér pixelek aránya határozta meg. A fenti procedúra sorozatos végrehajtásához saját készítésű makrókat hoztunk létre. A fenti méréseket a Scion Image for Windows program segítségével ugyanazon kísérletből származó anyagon, egymástól függetlenül három személy végezte el. A képek file nevei csak számokat tartalmaztak, hogy a vizsgálatot végzőt ne befolyásolja a kép tartalma az eredmény kialakításában. Az eredményeinket összegző grafikonokat az Excel program (Microsoft) segítségével rajzoltuk meg.

5. 6. Eredményeink statisztikai kiértékelése

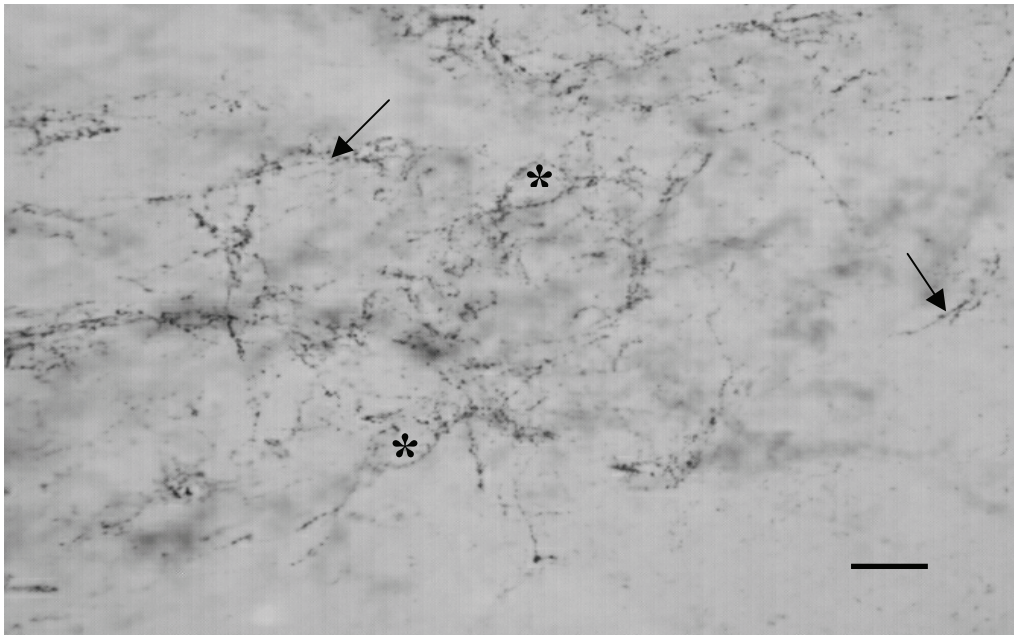
A denzitometriás eredményeinket Excel program (Microsoft) segítségével összegeztük. Majd ugyanabból a csoportból származó állatok értékeit először Student t -tesztnek vetettük alá. A kísérleti csoportokon belül az egyes állatok értékei között nem találtunk szignifikáns eltérést ($P > 0,4$). Ennek fényében egy-egy csoport állatainak denzitometriás adataiból átlagot számoltunk és meghatároztuk a csoportokon belüli szórást (SE) is. A kísérleti csoportok átlag denzitás értékei közötti különbségeket Student t -teszttel mutattuk ki. Nem minden kiértékelhető létszámú csoport értékei tértek el egymástól szignifikánsan, akkor tekintettük szignifikánsnak az eltérést, ha $P < 0,05$ (részletes leírás az eredmények részben). A statisztikai analízist Kaleidagraph (Synergy Software) program, az eredményeinket összegző grafikonokat Excel program (Microsoft) segítségével készítettük el.

6. Eredmények

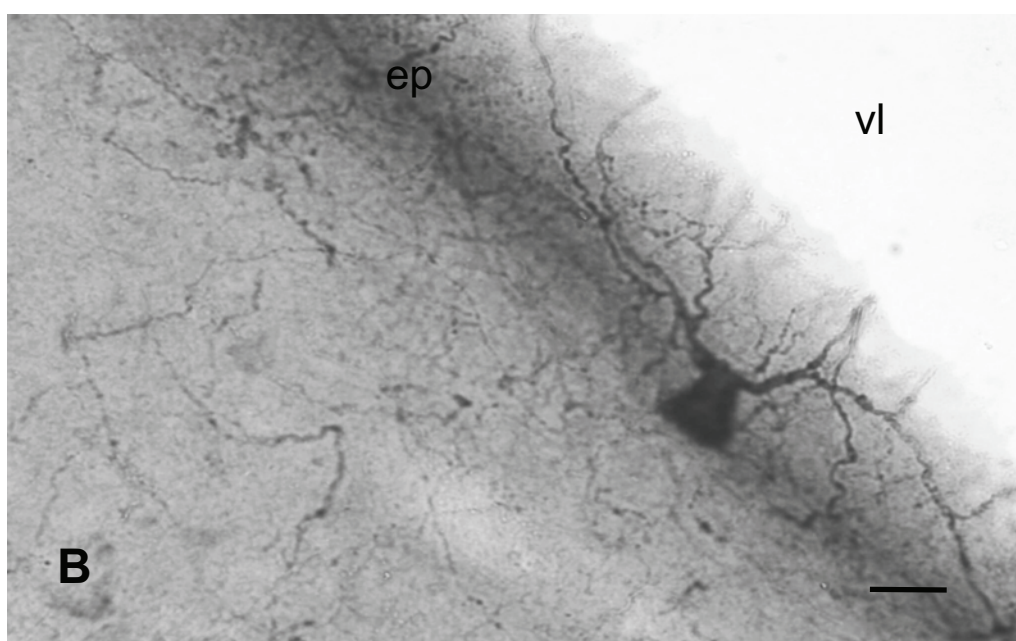
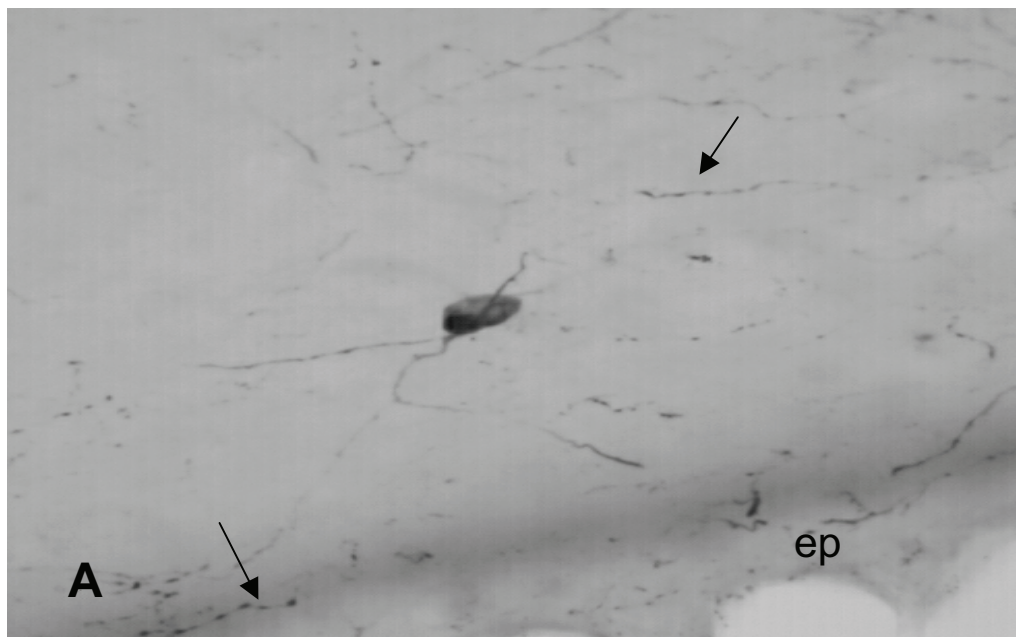
6.1. Leucin-enkephalin-, neuropeptid-Y- és galanin-immunpozitív idegelemek anatómiai elhelyezkedése és rostrocaudális megoszlása

A LS magvaiban a három neuropeptid elhelyezkedését kontroll hím, illetve nőstény patkányok agyának koronális metszetein vizsgáltuk. A kontroll állatokban nemtől függetlenül hasonló képet kaptunk.

Leu-enk immunpozitív rostokat a LSD medialis részén, a LSI lateralis és a LSV dorsalis és lateralis részén detektáltunk. A varikózus rostok gyakran alakítottak ki ún. pericelluláris kosárcákát immunnegatív sejtestek körül (4. ábra). A rostok varikózus jellege arra utal, hogy nemcsak a LS területén áthaladó rostrendszerrel van szó, hanem ezek a varikozitások szinaptikusan aktív szegmentumokat reprezentálnak, így hozzájárulnak a LS belső neuron hálózatának kialakításához.



4. ábra: Leu-enk-IR elemek a LS területén. Jól láthatóak a varikózus axonok (nyilak) és az általuk formált pericelluláris kosárcák immunnegatív sejtek (csillagok) körül. Lépték: 20 μ m.



5. ábra: NPY-IR elemek a LS területén. **A**, Az ependyma réteghez (ep) közel található varikózus rostrendszer (nyilak) és egy immunpozitív sejttest proximalis dendritekkel. **B**, Dendritjeivel az oldalkamra (vl) felé forduló immunpozitív idegsejt az ependyma rétegben. Lépték: 20 μ m. (A és B ábra nagyítása azonos)

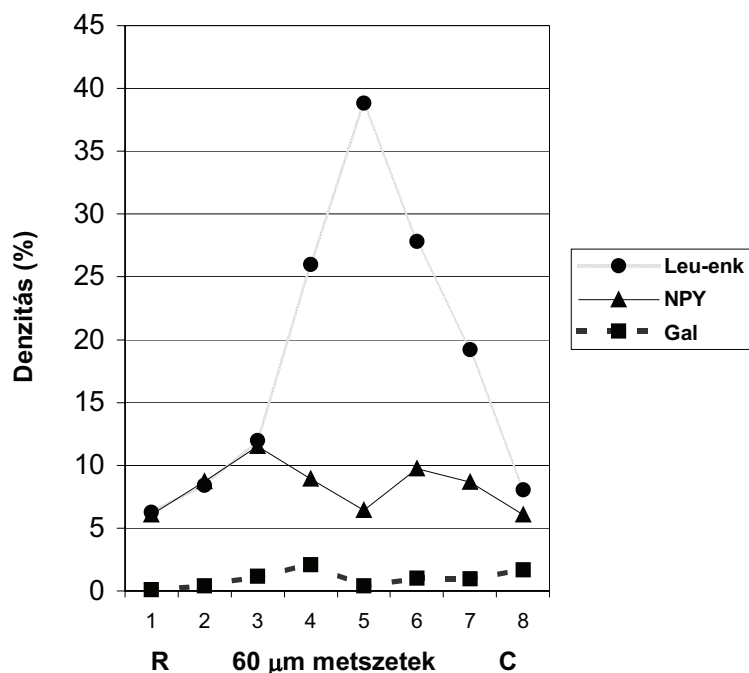
A NPY volt az egyetlen általunk tanulmányozott neuropeptid, amelyet varikózus rostok mellett perikaryonban/szómában is detektáltunk (5. ábra). A rostok főleg a LSD, LSI és LSV lateralis részén helyezkednek el. Jelölt sejttesteket legnagyobb mennyiségben a LSD-ban találtunk. Elszórva megfigyeltünk IR sejteket az ependymához közel eső, mindhárom magcsoportozható területen, nyúlványaikkal az ependyma réteg felé fordulva.

A Gal esetében, hasonlóan a Leu-enk-hoz, csak varikózus rostokat detektáltunk a LSI és LSV lateralis részén. A varikózus rostok néhol negatív sejteket vettek körbe, ún. pericelluláris kosárcákát kialakítva (6. ábra).



6. ábra: Gal-IR elemek a LS területén. Jól láthatóak a területet behálózó varikózus axonok (nyilak), illetve az általuk formált pericellularis kosárcákák immunnegatív sejtek (csillagok) körül. Lépték: 20 μ m.

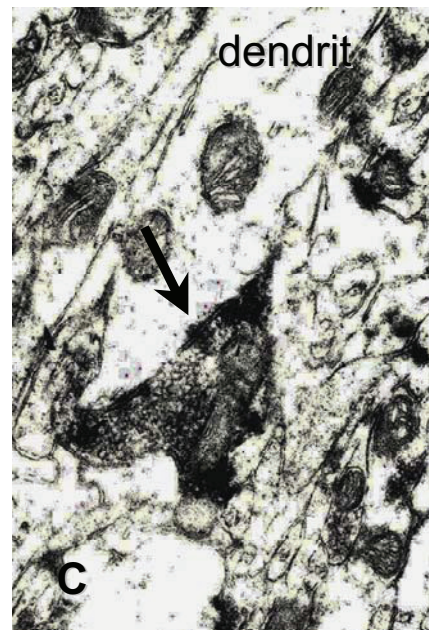
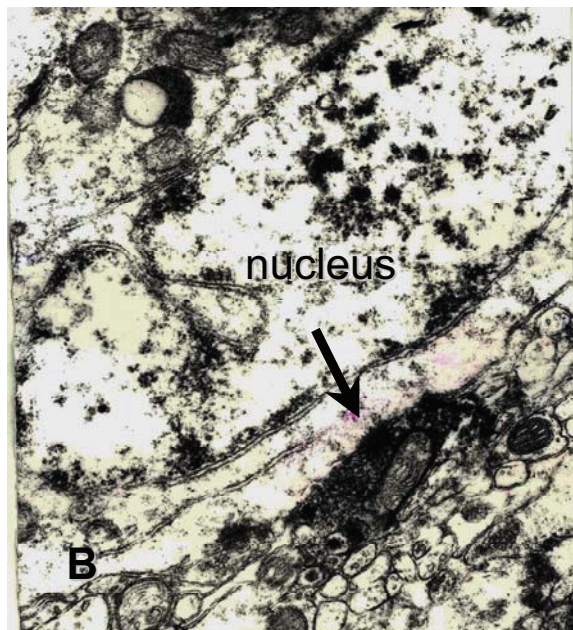
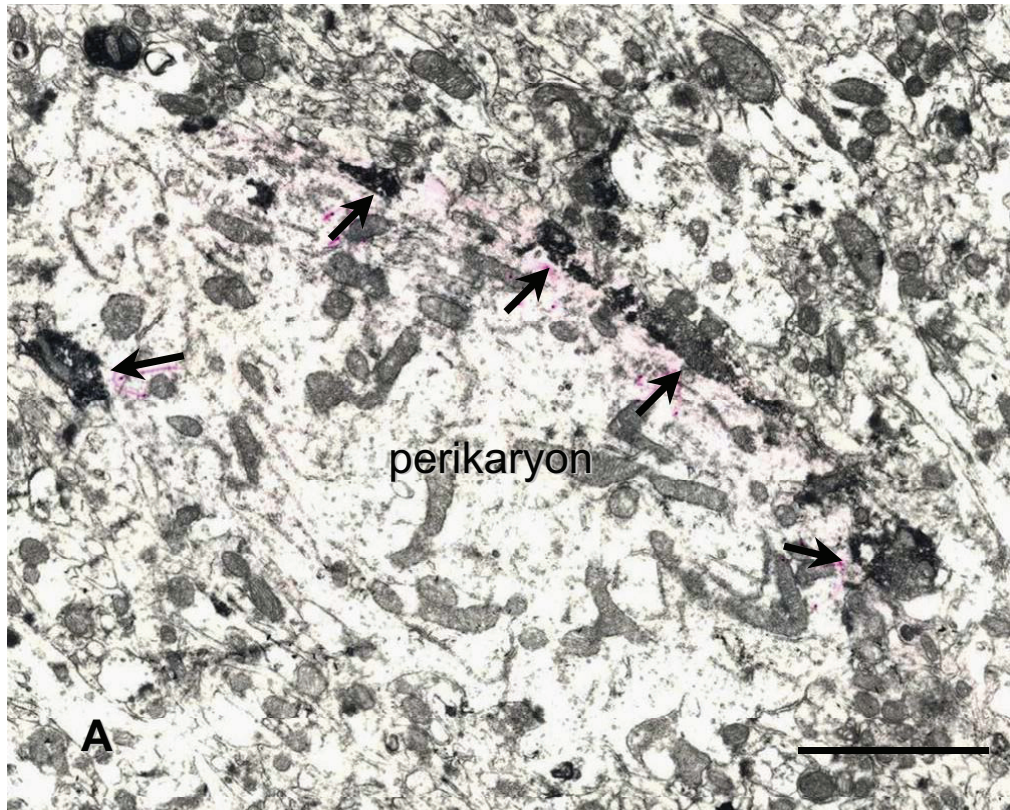
Leu-enk, NPY és Gal- IR-nak denzitásbeli változásait a LS rostrocaudális tengelyének megfelelően hím kontroll állatainkon vizsgáltuk (7. ábra). A Leu-enk denzitása abszolút értékben a legnagyobb. Rostrocaudalis megoszlási görbéje egy csúcsot tartalmaz, ami a LS rostrocaudalis tengelyének középső részén található, középvonaltól kissé caudálisan. Az ezen a területen mért maximális denzitás nyolcszor nagyobb, mint a mért minimum denzitás értékek a legrostralisabb és legcaudalisabb területen. Az NPY denzitás görbéje két maximumot tartalmaz, a LS rostrocaudalis tengelyének első és második harmadában. A maximális denzitás értéke kétszerese a mért minimum denzitás értéknek. A három általunk vizsgált neuropeptid közül a Gal relatív denzitása volt a legkisebb. Görbéje a legkiegyenlítettebb lefutást mutatja, egy a NPY első denzitási csúcsa után található csekély maximummal.



7. ábra: Leu-enk, NPY és Gal rostrocaudalis megoszlása hím patkány LS-ban. (n=4) A denzitás értékek a fekete pixelek százalékos arányát fejezik ki. R: rostralis, C: caudalis felé haladva.

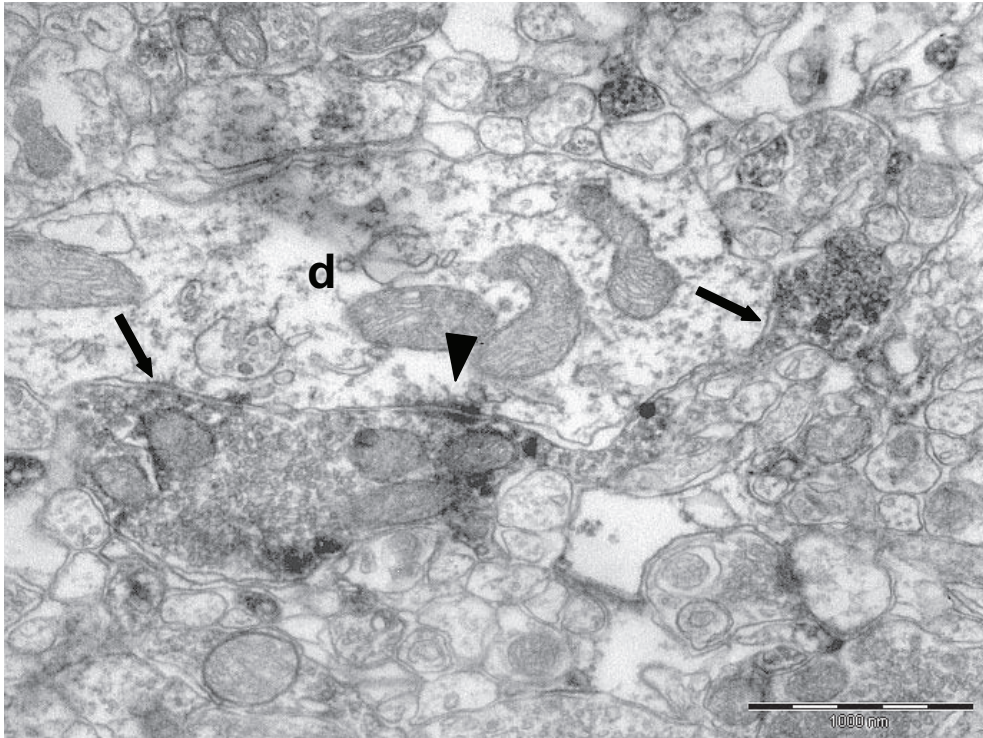
6. 2. A peptiderg idegelemek ultrastruktúrája

Elektronmikroszkópos vizsgálatokat kontrollként felhasznált állatokon végeztünk. A három vizsgált neuropeptidet tartalmazó terminálisok/varikozitások finomszerkezete megegyezett a peptiderg terminálisok általános ultrastruktúrájával (8-10. ábrák). Mindegyik esetben az immunreaktív boutonokat denz csapadéktartalmuk alapján azonosítottuk. Az immuncsapadék részben elfedte a boutonok finomszerkezetét, de mindegyikben felismerhető volt a heterogén – kis agranuláris és nagyobb dense-core vesiculákat egyaránt tartalmazó – vesicula populáció. A dense-core vesiculák felett volt minden esetben a legerőteljesebb immuncsapadékképződés (8. ábra B, C, 9 és 10. ábrák). A nagyobb méretű varikozitásokban rendszerint néhány mitochondrium is előfordult (8. ábra B, C, 9 és 10. ábrák). A legkönnyebben Leu-enk-tartalmú idegelemeket találtunk, ami ezen neuropeptid nagy előfordulási gyakoriságának tulajdonítható (8. ábra). Az ultravékony metszetek metszési síkjában is gyakran előfordultak többszörös szinaptikus kapcsolatok a pericelluláris Leu-enk immunreaktív varikozitások és immun-negatív sejtestek között (8. ábra A). Ezek az axoszomatikus szinapszisok aszimmetrikus típusúnak bizonyultak (8. ábra B).

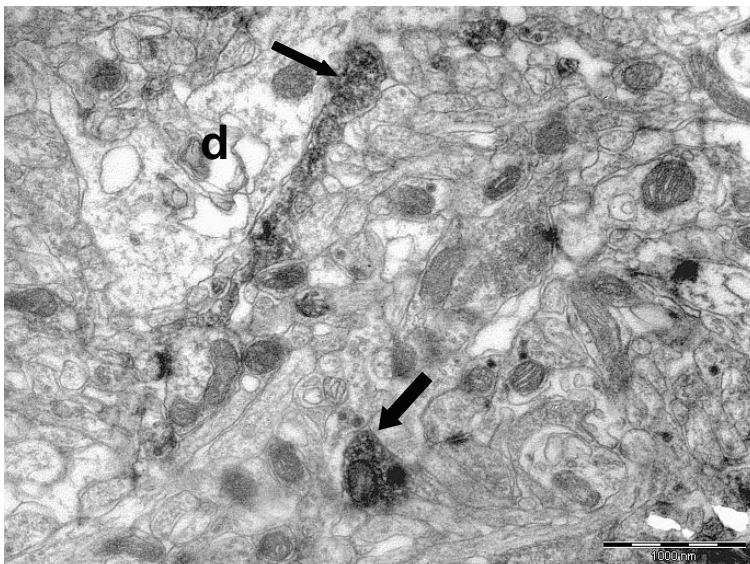


8. ábra: A Leu-enk-IR neuronális elemek finomszerkezete és kapcsolatai: A: Leu-enk-pozitív boutonok sora (nyilak) egy immun-negatív sejttest körül. B: erősebb nagyítású kép egy axosomatikus aszimmetrikus szinapszist (nyíl) létesítő enkephalinerg terminálisról. C Axodendritikus aszimmetrikus szinapszis (nyíl) egy enkephalinerg terminális és egy ismeretlen neurokémiai természetű dendrit között. Lépték: A: 500 nm; B,C: 1000nm

A Leu-enk-pozitív terminálisok gyakran hasonló szinapszisokat hoztak létre immun-negatív dendritekkel is (8. ábra C). Az NPY-IR axon terminálisok gyakoriak voltak immun-negatív dendritek körül, de ezek szinapszissai inkább szimmetrikus jellegűek voltak (9. ábra). A szinapszisok közelében előfordultak desmosoma-szerű (nyílhegy) mechanikai membránkapcsoló struktúrák is (9. ábra). A galaninerg szinaptikus struktúrák általában kisebb méretűek voltak, szintén gyakorta dendritekkel álltak szinaptikus kapcsolatban (10. ábra). A szinapszisok jellege szimmetrikus volt.



9. ábra: Két NPY-immunpozitív bouton (nyilak) egy immun-negatív dendrit (d) körül. A nagyobb terminális 5 mitochondriumot is tartalmaz, számos kis agranuláris vesicula és erősen jelölt dense-core vesicula mellett. A szimmetrikus szinapszis (nyílhegy) mellett egy mechanikai kapcsoló struktúra is látható.

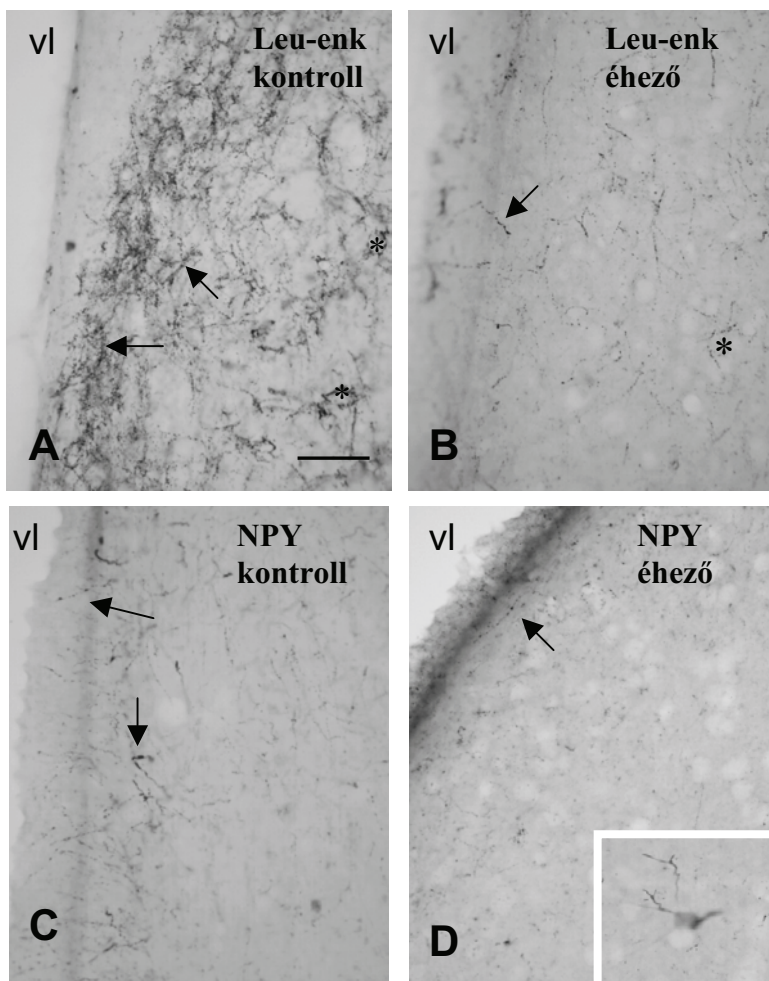


10. ábra: Galaninerg axon hosszszete és varicositásai (nyilak) kisebb kaliberű dendritek (d) mellett. Finomszerkezetük az előzőekhez hasonló (kis agranuláris vesiculák mellett nagy dense-core vesicula, ill. egy mitochondrium is azonosítható).

6. 3. Éheztetéssel kísérletek

6. 3. 1. Hím patkányok 1 hétig tartó teljes éheztetésének hatása

Mindhárom vizsgált neuropeptid esetében egy hétig tartó éhezés hatására, denzitometriával kimutatható mennyiségi változásokat észleltünk. Ezek a változások a Leu-enk és NPY esetében csökkenést, míg a Gal esetében növekedést jelentettek. Éhező állatokban a Leu-enk pozitív rostok elhelyezkedése és varikózus jellege a kontrollhoz képest nem változott (11. ábra, A, B; 13. ábra).

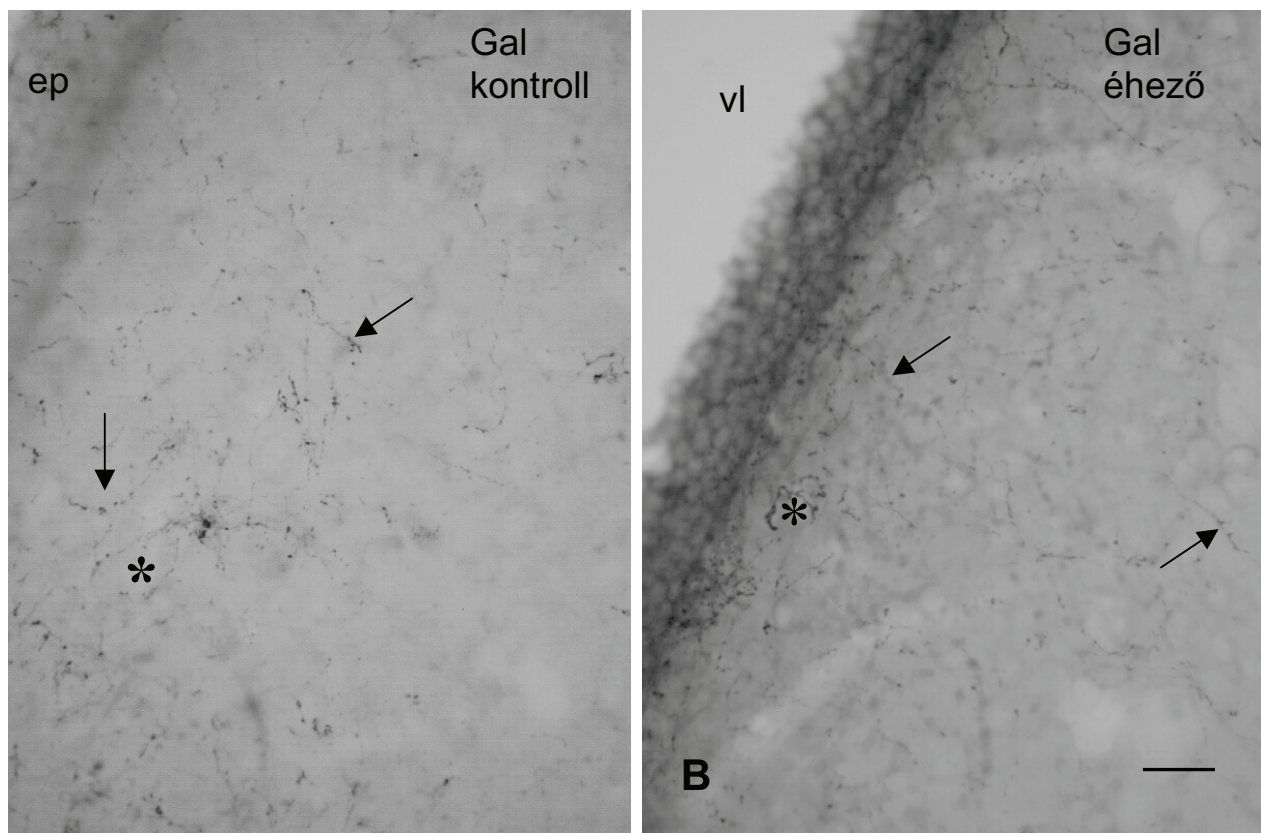


11. ábra: 1 hétig tartó teljes éheztetés hatása **Leu-enk** és **NPY** immunoreaktivitására.

A, Leu-enk immunpozitív rostok gazdag fonadéka (nyílak) kontrollban. A rostok helyenként immunnegatív neuronokat vesznek körül ún. pericelluláris kosárként formálva (csillag). **B**, Éheztetett állatban jól látható a Leu-enk-immunpozitív rostok (nyíl) denzitásának csökkenése. Immunnegatív neuron körüli pericelluláris kosárka éhező állatban is detektálható (csillag). **C**, Kontroll állat NPY-pozitív rostjai (nyíla), többségük a ventriculus lateralis (vl) irányába rendeződve láthatók. **D**, Éheztetett állat LS-ának NPY-pozitív rostjai (nyíl) kevésbé sűrű fonadékot alkotnak. Az éhezés hatására a pozitív sejtek mennyisége nem változott (insert). Lépték: 40 μm .

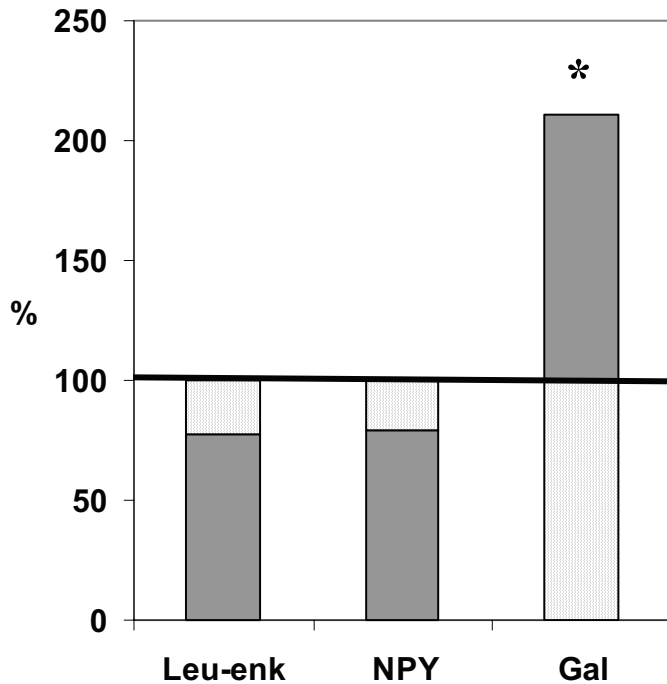
Az immunnegatív sejtestek körül a kontrollban igen sűrű pericelluláris fonadék (kosár) detektálható, ami az éhezés után kisebb mértékben, de felismerhetően megmarad. Denzitometriás vizsgálataink kimutatták, hogy az éhező állatokban a Leu-enk immuncytokémiaailag detektálható mennyisége a kontrollt 100 %-nak tekintve mintegy 23 %-kal nem szignifikánsan csökkent ($P=0,5$) (11. ábra, A,B; 13. ábra).

A kontroll állatokhoz képest a NPY detektálható mennyisége hasonló mértékben csökkent éhezés hatására, mint a Leu-enk-é (a kontroll 79 %-ára) ($P=0,4$) (11. ábra, C,D; 13. ábra).



12. ábra: Egy hétig tartó teljes éheztetés hatása **Gal** immunoreaktivitására hím patkány LS-ban. **A**, Gal-immunpozitív rostok és festődött rostok által körberajzolt immunnegatív sejt ún. pericelluláris kosárkát formázva (csillag) kontroll állatban. **B**, Éheztetett állat Gal-immunpozitív rostjai (nyílak) sűrűbb fonadékot alkotnak. Immunnegatív neuront körbevevő pozitív rostok (csillag) itt is azonosíthatók. vl: ventriculus lateralis ep: endyma. Lépték: 40 μ m.

A hét napos éhezés hatására a Gal-pozitív rostok mennyisége szignifikánsan több mint kétszeresére (210,5 %) növekedett a kontroll csoporthoz képest ($P<0,05$) (12. ábra A, B; 13. ábra).

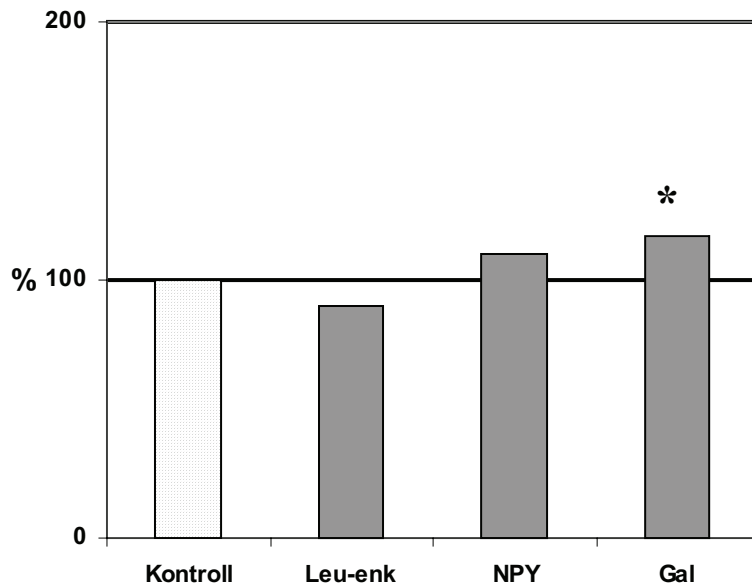


13. ábra: Hét napos éheztetés hatása Leu-enk, NPY és Gal immunoreaktivitására hím patkány LS-ban. (n=3) A pontozott mintázat a kontroll állatok denzitás értékeit jelölik (100 %), míg a rávetített szürke szín az 1 hétig éhező állatokét. Az Y tengelyen a tanulmányozott neuropeptideket tüntettük fel. Csillaggal a szignifikáns változást jelöltük.

6. 3. 2. Egy hétig tartó 40%-os táplálék megvonás hatása hímegekben

A vizsgált neuropeptideknek kontroll állatoknál tapasztalt anatómiai elhelyezkedése az egy hetes éhezés hatására nem változott. Ezzel ellentétben a 40 %-os táplálék megvonás jól detektálható változásokat okozott a Leu-enk, NPY és Gal denzitásában, Leu-enk-IR rostok denzitása csökkent, míg NPY- és Gal-IR rostoké nőtt.

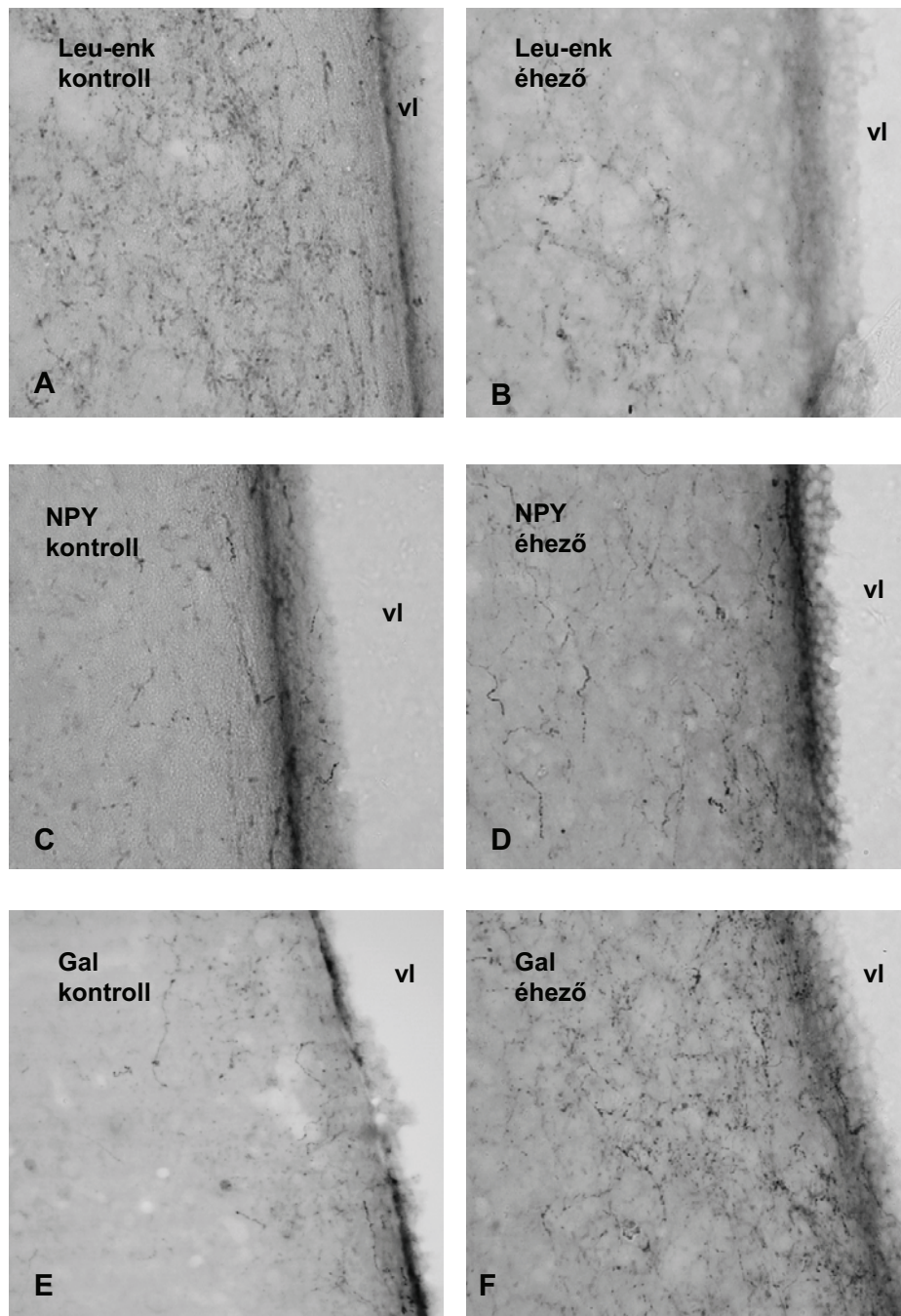
Leu-enk immunpozitív rostok denzitása az egy hét után kicsi és nem szignifikáns csökkenést mutatott (90 %-ka a kontroll értéknek) ($P=0,1$). 40 %-os éhezés hatására a varikózus rostok által formált pericelluláris kosárcák megfigyelhetőek maradtak, csak mennyiségük csökkent (14., 15. A,B ábrák).



14. ábra: Egy hétig tartó 40 %-os táplálékmegevonás hatása Leu-enk, NPY-, Gal-IR-ra hím patkány LS-ban. (n=4) Az Y tengelyen a pozitív pixelek aránya van feltüntetve százalékban kifejezve. A pontozott terület a kontroll csoport denzitás értékeit jelöli (100 %), míg szürkével az éhező állatok denzitás értékeit ábrázoltuk a kontroll %-ában. Az Y tengelyen a tanulmányozott neuropeptideket tüntettük fel. Csillaggal a szignifikáns változást jelöltük.

Egy hétig tartó részleges éhezés után a NPY IR rostok átlagos denzitás értéke 110 %-ra nőtt a kontroll értékhez képest, ami egy nem szignifikáns növekedés ($P=0,4$) (14., 15. C,D ábrák).

A Gal átlagos denzitás értékeinek változása az egy hét alatt követte a NPY denzitás változásait. Az egy hét 40 %-os éheztetés után szignifikáns növekedést detektáltunk (117 %) ($P<0,01$) (14.,15. E,F ábrák).



15. ábra: Egy hétig tartó 40 %-os táplálékmegevonás hatása **Leu-enk**, **NPY** és **Gal** immunocitokémiaiag detektálható mennyiségére hím patkány LS-ban. **A**, Leu-enk-IR axon hálózat kontroll állatból készült metszeten. **B**, Egy hét éhezés után már jól detektálható a Leu-enk immunpozitív rostok denzitásának csökkenése. **C**, NPY-IR axon hálózat kontroll állatból készült metszeten. **D**, Egy hét után a 60 %-os táplálékfelvétel hatására az NPY immunpozitív rostok mennyisége kissé megnőtt. **E**, Gal-IR axon hálózat kontroll állatból készült metszeten. **F**, A megemelkedett Gal-IR rostdenzitás az egy hetes 40 %-os táplálékmegevonás eredménye. lv: ventriculus lateralis. Lépték: 40 μ m (A-F-ig a nagyítás azonos). A metszeteket egymásnak megfelelő rostrocaudalis szintekről választottuk ki.

6. 3. 3. Egy hétig tartó 40 %-os táplálék megvonás hatása nőstény és ovariectomizált állatokon

6. 3. 3. 1. Az OVX és a táplálék megvonás általános hatásai

Nőstény állataink ovariectomizálásával a célunk a női szteroid hormonok feltételezett hatásának kiküszöbölése volt, hogy kizárólag az éhezés hatását tudjuk vizsgálni Leu-enk, NPY és Gal átlagos denzitására. Az *ad libitum* táplált, petefészek irtott nőstények meghíztak az intakt kontroll állatokhoz képest. Testsúly-gyarapodásukat (150 %) különösen az abdominalis zsírtömeg szélsőséges megnövekedése okozta, mint azt a boncolás kiderítette (melynek során ellenőriztük, hogy a petefészek eltávolítás sikeres volt-e). A vér glükóz, koleszterin és szabadzsírsav tartalma megemelkedett az ovariectomizált állatokban, az intakt, kontroll állatok értékeihez viszonyítva. Éhezés hatására ugyanezen vér paraméterek csökkenését detektáltuk az intakt éhezők és az OVX-k esetében is. Eltérést csak a koleszterin mennyiségének csökkenésben tapasztaltunk. Intakt éhezők esetében a koleszterin szint az egy hét éhezés után a kontroll érték 50 %-ka volt, míg az OVX állatoknál nem detektáltunk változást.

6. 3. 3. 2. 40 %-os éhezés és OVX hatása Leu-enk, NPY és Gal immunocitokémiailag detektálható átlagos denzitására

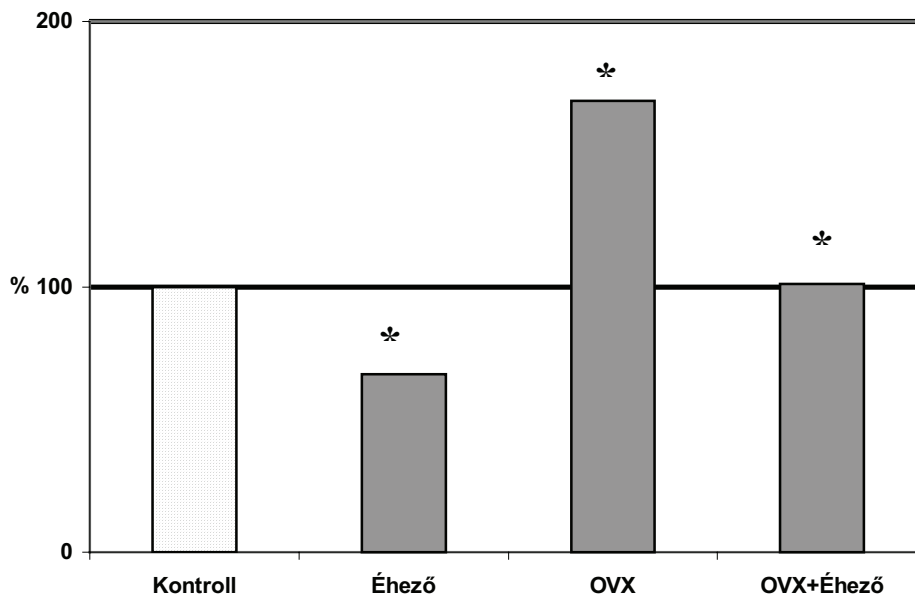
Kísérletünkben az OVX és/vagy a 40 %-os éhezés jól detektálható változásokat okozott a vizsgált neuropeptidok átlagos denzitásában a LS területén. A hím állatokkal végzett 1 hetes éheztesnél tapasztaltakhoz hasonlóan a Leu-enk, NPY és Gal immunpozitív elemek anatómiai elhelyezkedése nem mutatott különbséget a kontroll állatokhoz képest. Egyedül a pericelluláris kosárcák száma csökkent mind a Leu-enk, mind a Gal estében. A NPY-IR sejtek mennyiségében látható változást nem tapasztaltunk, igaz méréseink erre nem terjedtek ki, a megállapításaink csak mikroszkópos kvalitatív megfigyeléseinken alapulnak.

6. 3. 3. 2. 1. Egy hétig tartó 40%-os éhezés és OVX hatása Leu-enk átlagos denzitására

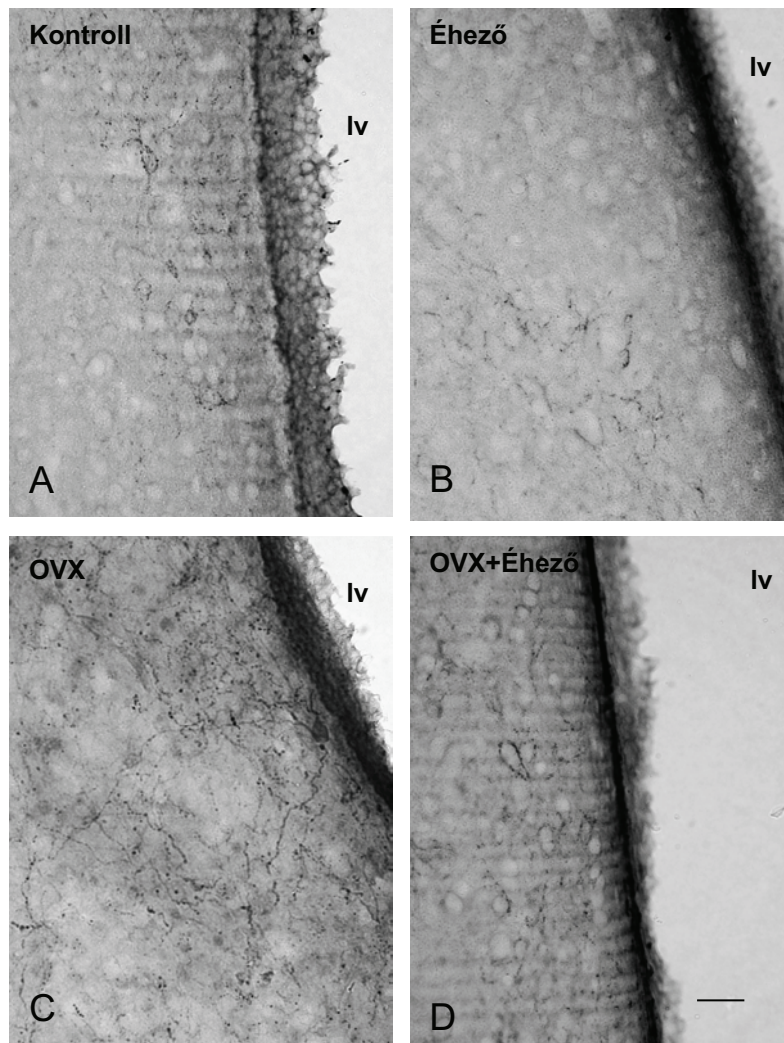
Az intakt, kontroll állatok átlagos denzitás értékeit 100%-nak véve az OVX a Leu-enk esetében az IR rostok denzitásának több mint másfélszeres szignifikáns növekedését okozta (170%) ($P < 0,01$) (16., 17. A,C ábrák).

40 %-os táplálék megvonás egy hét után azonnali szignifikáns csökkenést (67 %) okozott a Leu-enk-IR rostok átlagos denzitásában az intakt kontroll állatok átlagos denzitásához képest ($P < 0,05$) (16., 17. A,B ábrák).

Egy hétig tartó 40 %-os éhezés az OVX, éhező nőstényekben a Leu-enk denzitását nem változtatta meg (101 %) a intakt kontroll állatokhoz képest, míg az OVX kontrollokhoz képest szignifikáns csökkenés (69 %-os) történt (16., 17. A,D ábrák)(P<0,05).



16. ábra: 40%-os táplálékmegevonás és OVX hatása **Leu-enk-IR**-ra nőstény patkány LS-ban. (n=4) Az Y tengelyen a pozitív pixelek aránya van feltüntetve százalékban kifejezve. Az X tengelyen a tanulmányozott hatások (éhezés, OVX és OVX+éhezés) szerepelnek. A pontozott terület a kontroll csoport denzitás értékeit jelöli (100 %), míg szürkével az éhező, OVX és OVX+éhező állatok denzitás értékeit ábrázoltuk a kontroll %-ában. Csillaggal jelöltük a szignifikáns változásokat az intakt kontrollhoz (Éhező, OVX csoportoknál), illetve az OVX kontrollhoz képest (OVX+Éhező csoportnál).



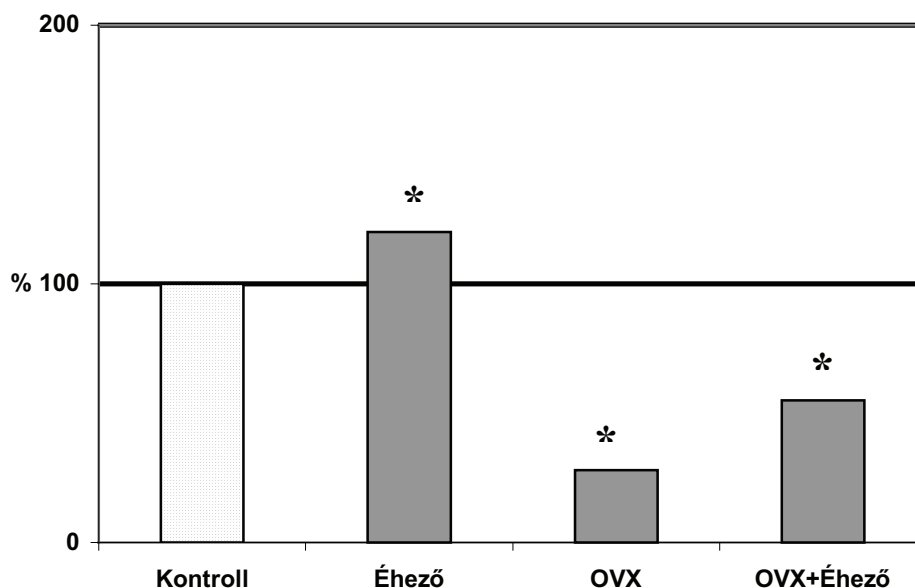
17. ábra: 40%-os táplálékmegevonás és OVX hatása **Leu-enk** átlagos denzitására kontroll és OVX patkányok LS-ban. **A**, Leu-enk-IR axon hálózat intakt nőstény metszetén. **B**, A Leu-enk denzitását az éhezés jól láthatóan csökkentette (67%). **C**, A Leu-enk denzitását az OVX két és félszeresére növelte (243%). **D**, A Leu-enk denzitása az OVX és éhezés együttes hatására az intakt kontroll állatokhoz képest nem változott (101%). lv: ventriculus lateralis Lépték: 40 μ m (A-D-ig a nagyítás azonos). A metszeteket egymásnak megfelelő rostrocaudalis szintekről választottuk ki.

6. 3. 3. 2. 2. Egy hétig tartó 40%-os éhezés és OVX hatása NPY átlagos denzitására

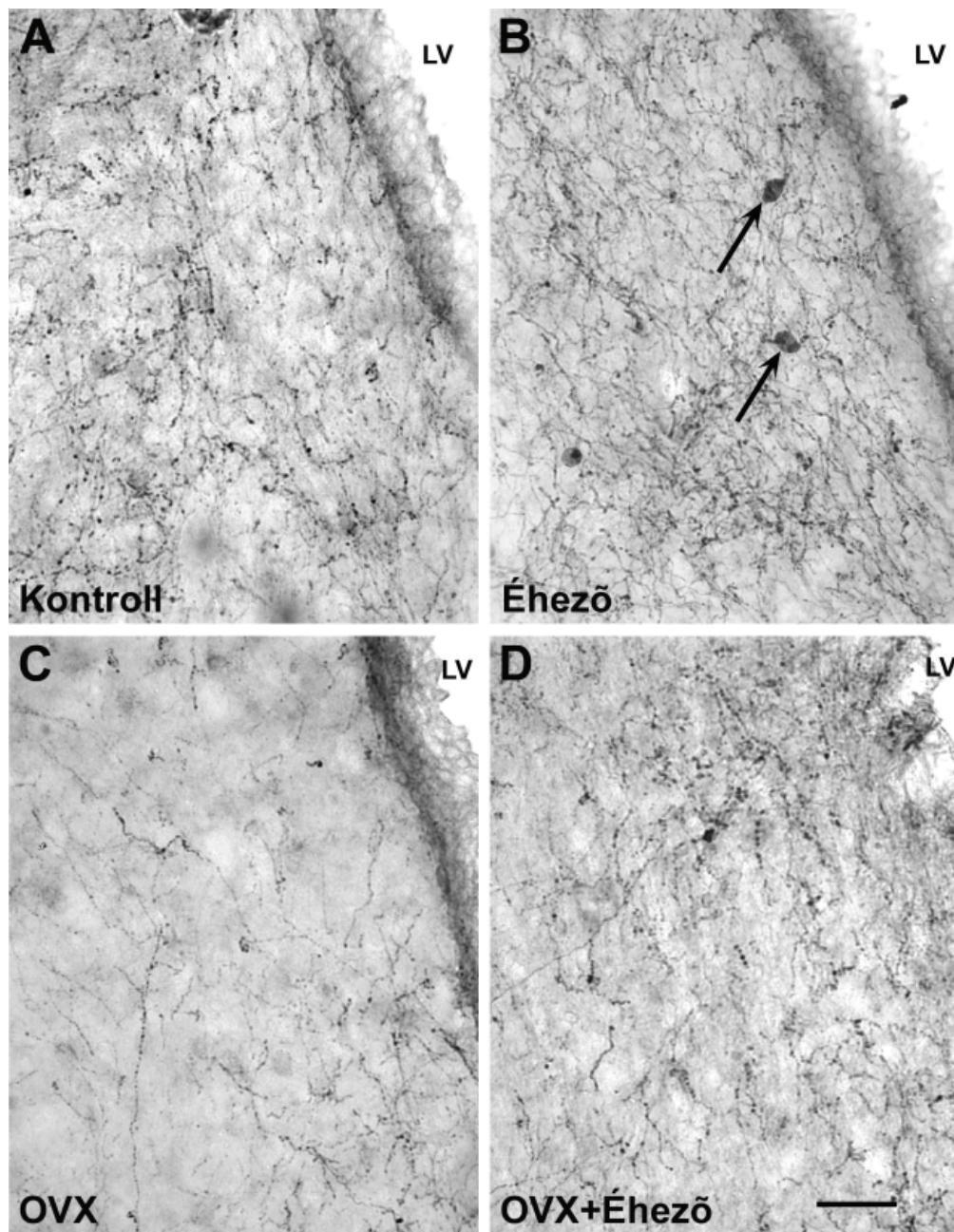
A Leu-enk-nál megfigyelttel ellentétben szignifikáns csökkenést tapasztaltunk az OVX NPY átlagos denzitására gyakorolt hatásánál (28%)($P<0,01$) (18., 19. A,C ábrák).

40 %-os táplálék megvonás egy hét után szignifikáns növekedést (120 %) okozott a NPY-IR rostok átlagos denzitásában (18., 19. A,B ábrák) ($P<0,05$).

Az OVX és a 40 %-os táplálék megvonás kombinált hatására az NPY-IR axonok denzitása az OVX kontroll állatokhoz képest 223 %-ra nőtt, míg az intakt kontroll állatok denzitásához képest 45%-kal csökkent ($P<0,01$) (18., 19. A,D ábrák)



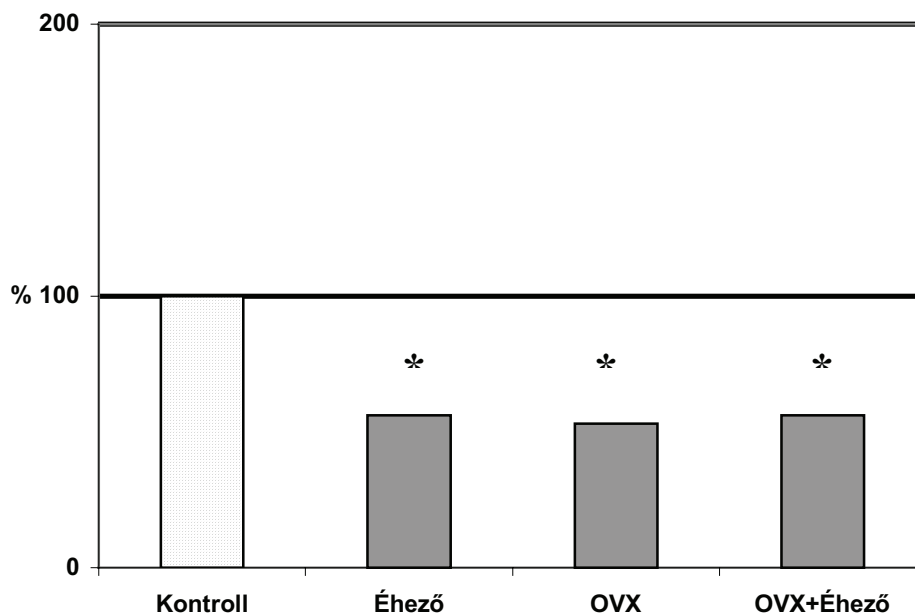
18. ábra: 40%-os táplálék megvonás és OVX hatása **NPY-IR**-ra nőstény patkány LS-ban. (n=4) Az Y tengelyen a denzitás értékek, illetve a pozitív pixelek aránya van feltüntetve százalékban kifejezve. Az X tengelyen a tanulmányozott hatások (éhezés, OVX és OVX+éhezés) szerepelnek. A pontozott terület a kontroll csoport denzitás értékeit jelöli (100 %), míg szürkével az éhező, OVX és OVX+éhező állatok denzitás értékeit ábrázoltuk a kontroll %-ában. Csillaggal jelöltük a szignifikáns változásokat az intakt kontrollhoz (Éhező, OVX, OVX+Éhező csoportoknál), illetve az OVX kontrollhoz képest is (OVX+Éhező csoportnál).



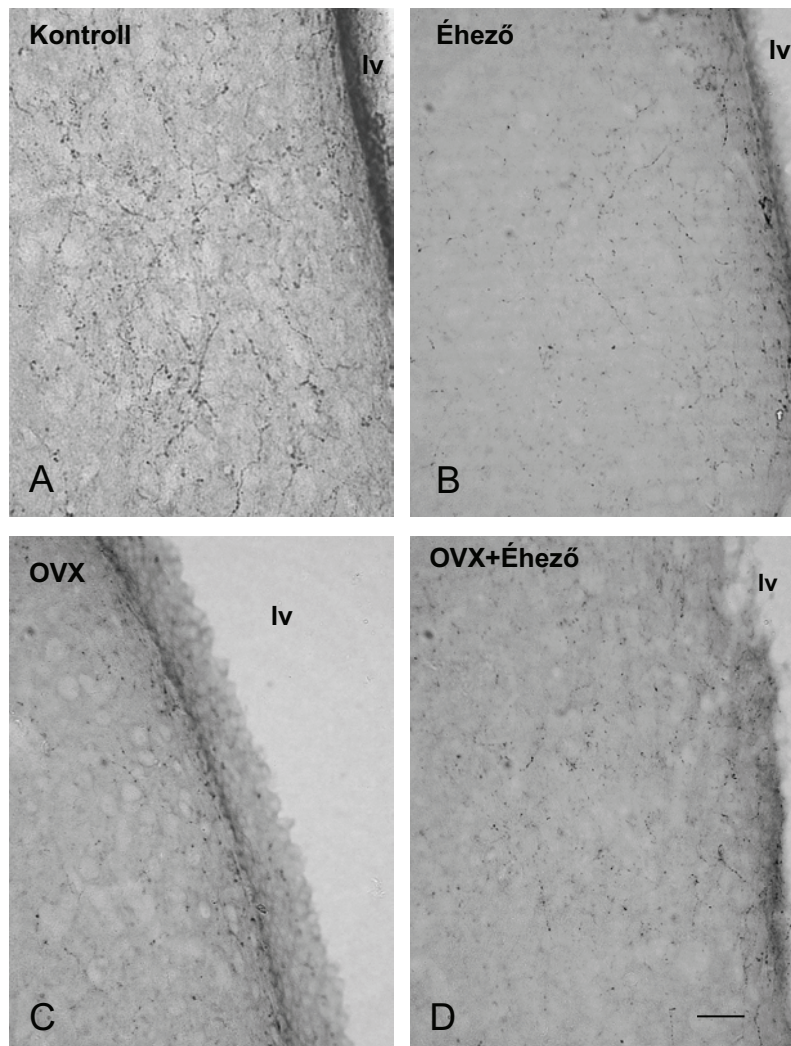
19. ábra: 40%-os táplálékmegevonás és OVX hatása NPY átlagos denzitására kontroll és OVX patkányok LS-ban. **A**, NPY-IR axon hálózat intakt nőstény metszetén. **B**, A NPY denzitását az éhezés növelte. A nyilak immunopozitív sejtek jelölnek. **C**, A NPY denzitását az OVX egyértelműen csökkentette (28%-ra). **D**, A NPY denzitása az OVX és éhezés együttes hatására az OVX kontroll állatokhoz képest megemelkedett (223%). lv: ventriculus lateralis Lépték: 40 μ m (A-D-ig a nagyítás azonos). A metszeteket egymásnak megfelelő rostrocaudalis szintekről választottuk ki.

6. 3. 3. 2. 3. Egy hétig tartó 40%-os éhezés és OVX hatása Gal átlagos denzitására

Hasonlóan az NPY-nál tapasztaltakhoz Gal-IR rostok átlagos denzitása OVX hatására szignifikánsan csökkent 53%-ra az intakt, kontrollhoz képest ($P < 0,01$) (20., 21. A,C ábrák). Az egy hetes a 40 %-os éhezés után a Gal-IR rostok átlagos denzitása 56 %-ra csökkent (20., 21. A,B ábrák) ($P < 0,05$). Ehhez hasonló szignifikáns csökkenést (56 %) figyeltünk meg a Gal-IR rostok denzitásában OVX és 40 %-os éhezés kombinált hatására egy hét után az intakt kontroll állatokhoz képest ($P < 0,01$) (20., 21. A,D ábrák), míg az OVX kontroll állatokhoz viszonyítva nem detektáltunk változást.



20. ábra: 40%-os táplálékmegevonás és OVX hatása **Gal-IR**-ra nőstény patkány LS-ban. (n=4) Az Y tengelyen a denzitás értékek, illetve a pozitív pixelek aránya van feltüntetve százalékban kifejezve. Az X tengelyen a tanulmányozott hatások (éhezés, OVX és OVX+éhezés) szerepelnek. A pontozott terület a kontroll csoport denzitás értékeit jelöli (100 %), míg szürkével az éhező, OVX és OVX+éhező állatok denzitás értékeit ábrázoltuk a kontroll %-ában. A csillagok az intakt kontrollhoz képest szignifikáns eltéréseket jelölik.



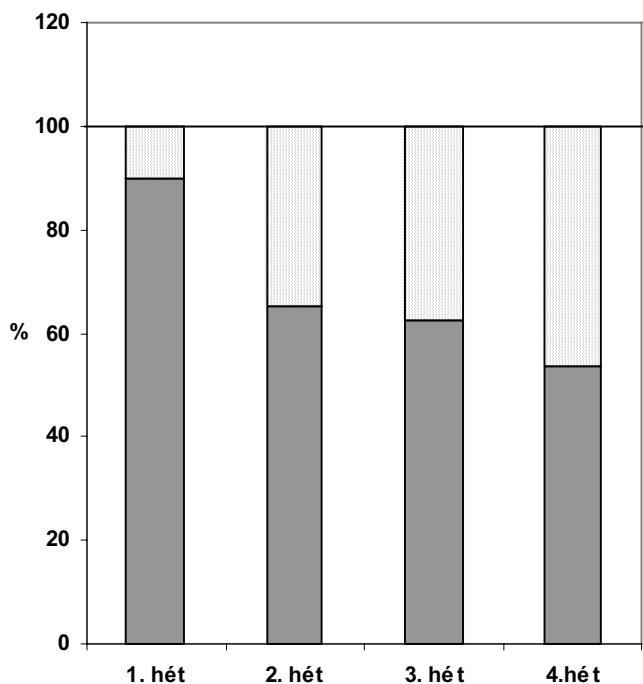
21. ábra: 40%-os táplálékmegevonás és OVX hatása **Gal** átlagos denzitására kontroll és OVX patkányok LS-ban. **A**, Gal-IR axon hálózat intakt nőstény metszetén. **B**, A Gal denzitását az éhezés jól láthatóan csökkentette (44 %-kal). **C**, A Gal denzitását az OVX egyértelműen csökkentette (47 %-kal). **D**, A Gal denzitása az OVX és éhezés együttes hatására az OVX kontroll állatokhoz képest lecsökkent (56 %). lv: ventriculus lateralis Lépték: 40 μ m (A-D-ig a nagyítás azonos). A metszeteket egymásnak megfelelő rostrocaudalis szintekről választottuk ki.

6. 3. 4. Több hétig tartó 40 %-os táplálék megvonás hatása hímeiben és nőstényekben

Az egy hétig tartó 40 %-os éheztes kísérleteink eredményei után megfogalmaztuk azt a kérdést, hogy vajon több hetes 40 %-os éheztes hogyan befolyásolná az általunk vizsgált neuropeptid előfordulását a LS területén. Egy hím, egy nőstény és egy OVX nőstény csoportot állítottunk fel. Az állatokat 2-3-4 hétig éheztesztük és az egyes periódusok végén 2-2 állat került feldolgozásra. Megjegyzendő, hogy a csoportonkénti alacsony egyedszám nem tette lehetővé a statisztikai értékelést.

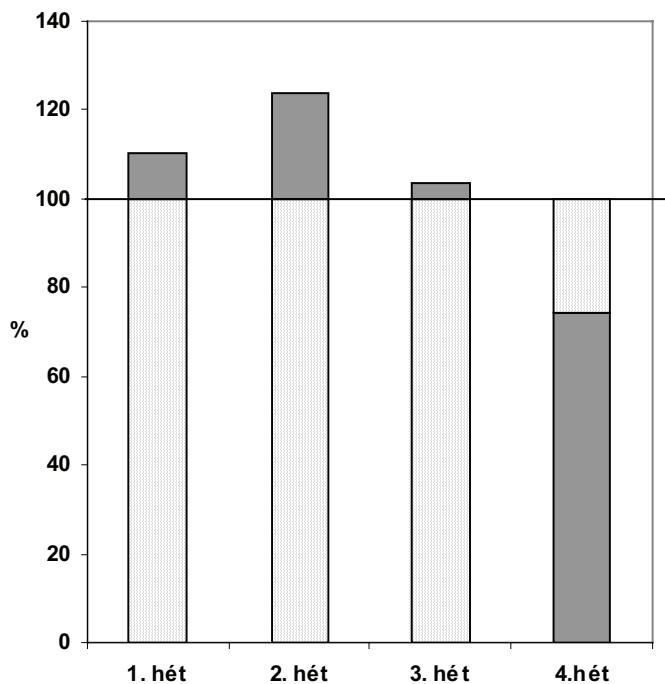
6. 3. 4. 1. Négy hétig tartó 40 %-os táplálék megvonás hatása hímeiben

A vizsgált neuropeptideknek kontroll állatoknál tapasztalt anatómiai elhelyezkedése a négy hétig tartó 40 %-os éheztes hatására nem változott. Leu-enk immunpozitív rostok denzitásában folyamatos csökkenés volt nyomon követhető egészen a negyedik hétig, ahol a kontrollhoz viszonyított 54 %-ot detektáltunk. 40 %-os éheztes hatására a varikózus rostok által formált pericelluláris kosárcák megfigyelhetőek maradtak, csak mennyiségük csökkent (22. ábra).



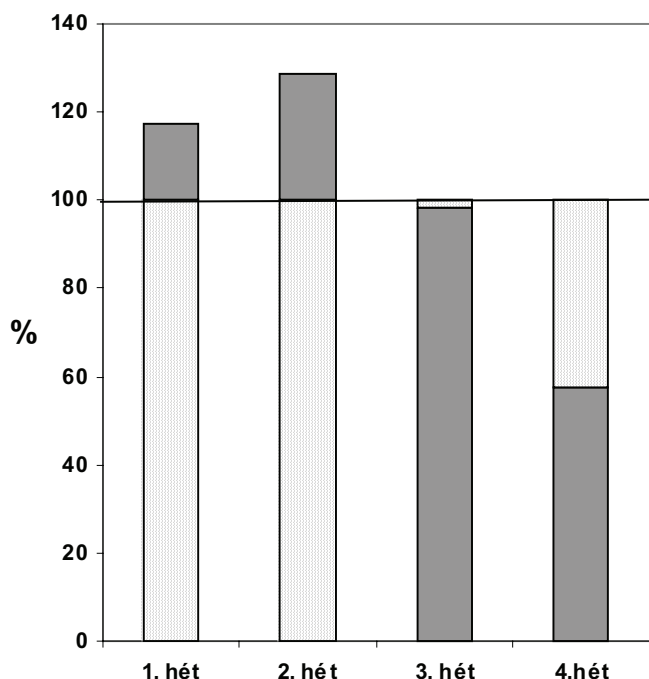
22. ábra: 4 hétig tartó 40%-os táplálék megvonás hatása **Leu-enk-IR**-ra hím patkány LS-ban. (n=4 az első héten, n=2 a 2-4. hétig) Az Y tengelyen a denzitás értékek, illetve a pozitív pixelek aránya van feltüntetve százalékban kifejezve. Az X tengelyen az éheztes hetek szerepelnek. A pontozott terület a kontroll csoport denzitás értékeit jelöli (100 %), míg szürkével az 1-4 hétig éheztesztett állatok denzitás értékeit ábrázoltuk a kontroll %-ában.

Két hétig tartó 40 %-os éhezés után a NPY-IR rostok átlagos denzitás értéke 124 %-ra emelkedett, meghaladva az első héten tapasztalt 110 %-os növekedést (23 ábra). A harmadik hétre a mért érték visszasüllyedt a kontroll denzitás szintjére (104 %), amely csökkenés a negyedik hétre elérte a 75 %-t (23 ábra).



23. ábra: 4 hétig tartó 40%-os táplálékmevонás hatása NPY-IR-ra hím patkány LS-ban. (n=4 az első héten, n=2 a 2-4. hétig) Az Y tengelyen a denzitás értékek, illetve a pozitív pixelek aránya van feltüntetve százalékban kifejezve. Az X tengelyen az éheztetés hetei szerepelnek. A pontozott terület a kontroll csoport denzitás értékeit jelöli (100 %), míg szürkével az 1-4 hétig éheztetett állatok denzitás értékeit ábrázoltuk a kontroll %-ában.

A Gal-IR rostok átlagos denzitás értékének az első héten tapasztalt 117 %-os növekedése a második hétre, követve a NPY-IR növekedését, 129 %-ra nőtt (24 ábra). A harmadik hétre a denzitás 98 %-ra csökkent azaz, a kontroll értékre. Majd a negyedik héten egy nagyobb csökkenést detektáltunk, így a Gal IR rostok átlagos denzitása megközelítette a kontroll érték felét (58 %)(24. ábra).



24. ábra: 4 hétig tartó 40%-os táplálékmevönás hatása **Gal-IR**-ra hím patkány LS-ban. (n=4 az első héten, n=2 a 2-4. hétig) Az Y tengelyen a denzitás értékek, illetve a pozitív pixelek aránya van feltüntetve százalékban kifejezve. Az X tengelyen az éheztetés hetei szerepelnek. A pontozott terület a kontroll csoport denzitás értékeit jelöli (100 %), míg szürkével az 1-4 hétig éheztetett állatok denzitás értékeit ábrázoltuk a kontroll %-ában.

6. 3. 4. 2. Négy hétig tartó 40 %-os táplálék megvonás hatása intakt és OVX nőstényekben

6. 3. 4. 2. 1. Az OVX és a táplálék megvonás általános hatásai

Tapasztalataink hasonlóak voltak, mint az egy hétig tartó 40 %-os éheztetés kísérletünk során. Említést érdemel, hogy az intakt éhezők esetében a koleszterin szint az egy hét éhezés utána kontroll érték 50 %-ka volt, míg az OVX állatoknál egy hét alatt nem detektáltunk változást. Az OVX állatok koleszterin szintje csak a harmadik hétre csökkent a kontroll érték alá, míg az intakt éhezők esetében a csökkenés már az első hét után a kontroll érték 50 %-a volt. Az OVX állatok testsúlya 43 %-kal, míg az intakt éhezők testsúlya csak 10 %-kal csökkent a negyedik hét végére.

6. 3. 4. 2. 2. 40 %-os éhezés és OVX hatása Leu-enk, NPY és Gal immuncitokémiailag detektálható átlagos denzitására

Kísérletünkben az OVX és/vagy a 2-4 hétig tartó 40 %-os éhezés jól detektálható változásokat okozott a vizsgált neuropeptidek átlagos denzitásában a LS területén. (Megjegyzendő, hogy a 3. hét végén is elvégeztük a kísérletet, de az immunreakció

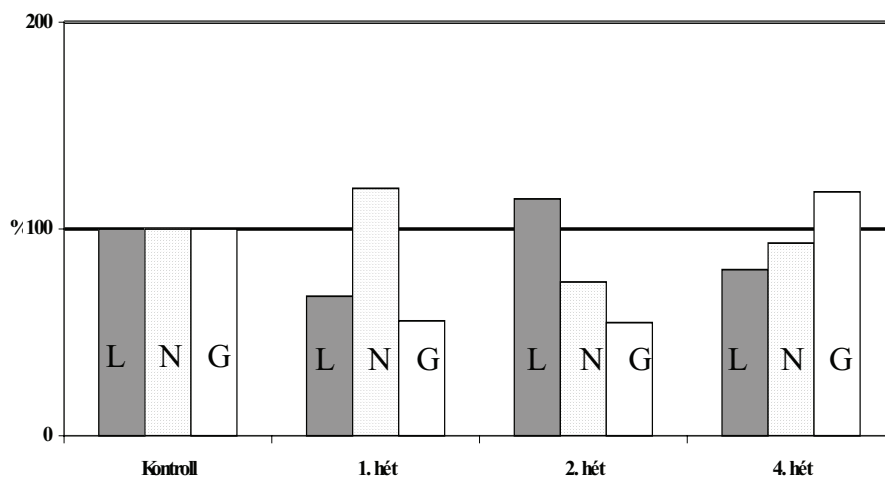
sikertelensége miatt nem kaptunk értékelhető adatokat.) A hím állatokkal végzett 4 hétig tartó 40 %-os éheztesnél tapasztaltakhoz hasonlóan a Leu-enk, NPY és Gal immunpozitív elemek anatómiai elhelyezkedése nem mutatott különbséget a kontroll állatokhoz képest. Egyedül a pericelluláris kosárcák száma csökkent mind a Leu-enk, mind a Gal estében. Az a NPY-IR sejtek mennyiségében látható változást nem tapasztaltunk, igaz méréseink erre nem terjedtek ki, a megállapításaink csak mikroszkópos kvalitatív megfigyeléseinken alapulnak.

6. 3. 4. 2. 2. 1. Négy hétig tartó 40 %-os táplálék megvonás hatása

A Leu-enk 67 %-os denzitás csökkenése, melyet az egy hétig tartó 40 %-os éheztes okozott, a második hét 40 %-os táplálék megvonás hatására a kontroll érték fölé emelkedett (114 %), ami a negyedik hétre kis mértékű csökkenésre változott (80 %) (25. ábra).

Az egy hétig tartó 40 %-os éheztes kísérletünkben tapasztalt 120 %-os NPY-IR rostok denzitás növekedése 2 hét 40 %-os éheztes hatására a kontroll érték alá esett 26 %-kal, majd a negyedik hétre megközelítette a nem éhező állatok átlagos denzitás értékeit (93 %) (25. ábra).

Két hét után a 40 %-os éhezés a Gal átlagos denzitás értékét 54 %-ra csökkentette, tehát megmaradt az egy hét után tapasztalt (56 %) denzitás csökkenés, míg a negyedik hét után 118 %-os denzitásbeli növekedést detektáltunk (25. ábra)



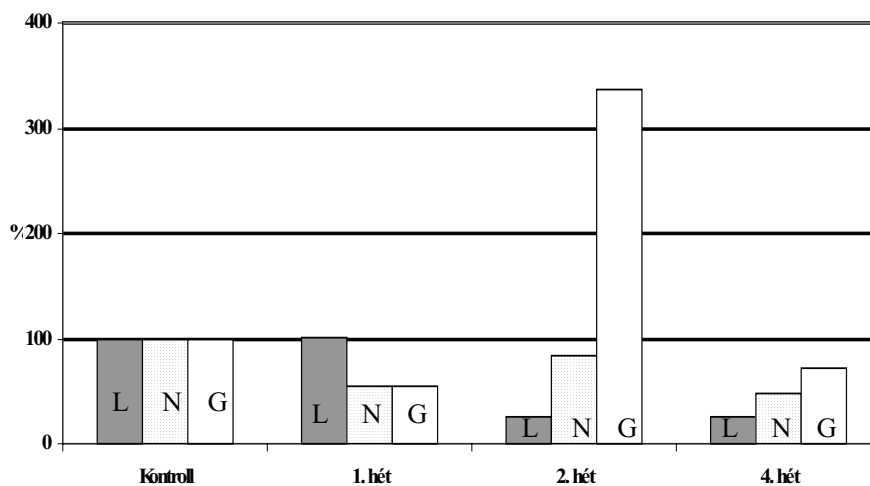
25. ábra: 4 hétig tartó 40 %-os táplálék megvonás hatása **Leu-enk**, **NPY** és **Gal-IR**-ra nőstény patkány LS. (n=4 az első héten, n=2 a 2. és 4. héten) Az Y tengelyen a pozitív pixelek aránya van feltüntetve százalékban kifejezve, az X tengelyen a hetek száma szerepel. A szürke oszlopokkal a Leu-enk (L), a pontozott oszlopokkal NPY (N) és a fehér oszlopokkal a Gal (G) denzitás értékeit ábrázoltuk 1-4 hétig tartó éhezés hatására az intakt kontrollhoz viszonyított %-ban.

6. 3. 4. 2. 2. 1. Négy hétig tartó 40 %-os táplálék megvonás és OVX együttes hatása

Hosszú távú 40 %-os éhezési kísérletünk második hetére a Leu-enk denzitásában jelentős csökkenést tapasztaltunk (26 %) az egy hétig tartó 40 %-os éheztetési kísérletünk intakt kontroll körüli (101 %) értékéhez képest, ami a negyedik hétig fennállt (25 %) (26. ábra).

A NPY denzitása az egy hétig tartó 40 %-os éheztetési kísérletben tapasztalt 55 %-os csökkenésről, második hétre az intakt kontroll körüli értékre nőtt (84 %), majd további éhezési hatására a negyedik héten 49 %-ot detektáltunk az intakt kontroll állatokhoz képest (26. ábra).

A Gal-IR rostok átlagos denzitása az egy hétig tartó 40 %-os éhezési utáni 56 %-os csökkenésről, a második hét végére 337 %-os, több mint háromszoros növekedésre változott, ami a negyedik hétre 28 %-kal visszaesett az intakt kontroll érték alá (26. ábra).



26. ábra: 4 hétig tartó 40 %-os táplálék megvonás hatása **Leu-enk**, **NPY** és **Gal-IR**-ra OVX patkány LS (n=4 az első héten, n=2 a 2. és 4. héten). Az Y tengelyen a pozitív pixelek aránya van feltüntetve százalékban kifejezve, az X tengelyen a hetek száma szerepel. A szürke oszlopokkal a Leu-enk (L), a pontozott oszlopokkal NPY (N) és a fehér oszlopokkal a Gal (G) denzitás értékeit ábrázoltuk 1-4 hétig tartó éhezési hatására az intakt kontrollhoz viszonyított %-ban.

7. Megbeszélés

Munkánk során nyomon követtük három neuropeptid, a Leu-enk, a NPY és a Gal rostrocaudalis megoszlását és denzitásbeli változásait hím, nőstény és ovariectomizált patkányok LS-ban. Megállapítottuk, hogy ezen neuropeptidok nagy mennyiségben fordulnak elő a vizsgált agyterületen, megoszlásuk a kontroll állatokban sem egyenletes, és részleges, ill. teljes éhezés hatására jelentős denzitásbeli változásokkal reagálnak, amelyek valószínűleg nem függetlenek a gonadalis hormonok hatásaitól sem. Mindezek alapján joggal feltételezhetjük, hogy a LS nemcsak igen gazdag orexigén és anorexigén neuropeptidekben, de a hypothalamussal együttműködve aktívan részt vehet a táplálékfelvétel szabályozási folyamataiban is.

7. 1. Leucin-enkephalin elhelyezkedése és rostrocaudalis megoszlása patkány LS-ban

Koronális metszeteken vizsgálva, a Jakab és Leranthe-féle (1995) nomenklatúrát figyelembevéve, Leu-enk IR sűrű rosthálózatot találtunk a LS dorsalis magjának medialis, míg intermedialis és ventralis magjának lateralis részén. Irodalmi adatok szerint e Leu-enk rosthálózat a LS-ban lehet külső és belső eredetű is (Jakab és Leranthe, 1995; Risold és Swanson, 1997a). Varikózus rostok pericellularis kosárcákat képeznek immunnegatív sejttestek körül, melyekről korábbi vizsgálatok bizonyították, hogy főleg calbindin tartalmú neuronok és 10%-uk γ -amino- vajsav (GABA) tartalmú „somatospiny” (szómán tüskés) neuron (Szeidemann és mts., 1995). Ugyanezen tanulmányban retrográd jelöléses technikával sikerült azonosítani, hogy a Leu-enk-IR axonok az azonos oldali perifornicalis area-ból, illetve az anterior hypothalamus-ból származnak. Kísérleteinkben immunpozitív sejttesteket nem tudtunk kimutatni, aminek lehetséges oka a colchicin kezelés elmaradásában keresendő. Korábbi irodalmak utalnak a területet benépesítő enkephalin mRNS-t tartalmazó neuronokra (Jakab és Leranthe, 1995; Risold és Swanson, 1997a), de immunohisztokémiai módszerrel csak metionin-enkephalin-IR neuronokat találtak, és ezek festődéséhez is szükség volt előzetes colchicin kezelésre (Williams és Dockray, 1982). Munkánkban először vizsgáltuk a LS Leu-enk immunpozitív rostok denzitásának rostrocaudalis megoszlását. A rostrocaudalis tengely középső részén tapasztaltuk a legnagyobb rostsűrűséget, amely a legrostralisabb és legcaudalisabb terület denzitásához viszonyítva nyolcszoros különbséget mutatott. Már Risold és Swanson is utal a LS rostrocaudalis tengelye mentén végighúzódó enkephalin mRNS-t expresszáló neuron populációra (1997a), amely neurotensinerg neuronokkal főleg a LSr-ban

kifejezett, illetve néhány enkephalinerg neuront említ a LS dorsocaudalis zónájában is. Az általunk kapott Leu-enk-erg mintázat e korábbi megfigyeléseket megerősíti, illetve rámutat arra, hogy a Leu-enk beidegzés főleg a rostrocaudalis tengely középső területein található neuron populációt látja el bemenetekkel.

7. 2. Neuropeptid Y elhelyezkedése és rostrocaudalis megoszlása patkány LS-ban

Hasonlóan a Leu-enk megoszlásához a NPY is a LS egész rostrocaudalis tengelye mentén kimutatható. Az IR rostok és a sejttestek egy részét főleg a lateralis, ependyma réteghez közeli területen, míg az immunpozitív sejtek másik csoportját, kevés IR rosttal együtt, a dorsalis területen azonosítottuk. Eredményeik jó összhangban vannak korábbi munkákkal (Allen és mts., 1983; Everitt és mts., 1984). Saját megfigyelésünk, hogy a lateralis területeken előforduló immunpozitív sejtek nyúlványaikkal az ependyma réteg felé fordulva festődtek. Elhelyezkedésük liquor monitorozó funkciójukra utalhat. A NPY fontos szerepet játszik a leptin táplálékfelvételt és hő-háztartást szabályozó szerepének mediálásában a központi idegrendszerben (Erickson és mts., 1996). Leptin receptor előfordulását vizsgálták kettős-jelöléses immunohisztokémiai módszerekkel birka hypothalamusban és az NPY tartalmú sejtek 60 %-án sikerült kimutatni leptin receptort (Iqbal és mts., 2001). Mivel mi nem végeztünk ilyen kísérletet, az irodalmi adatok alapján feltételezzük, hogy a LS NPY pozitív sejtjeinek egy része (ependyma réteghez közel eső csoport) is hordozhat leptin receptorokat, így a liquor leptin tartalmának változása közvetlenül befolyásolhatja ezen sejtek működését. A NPY-IR rostok denzitási görbéje két csúcsot tartalmaz. NPY mRNS tartalmú sejteket mutattak ki a nucleus septohippocampalisban (a mag a septum legrostromedialisabb pontjától tart a nucleus septofimbrialis kezdetéig, amely már lateralisabb elhelyezkedésű, beékelődve a LS állományába), illetve a mellette húzódó sávban, közel a nucleus septofimbrialishoz. Risold és Swanson (1997a), kapcsolataik és neuropeptid tartalmuk alapján, úgy találták munkájukban, hogy a hibridizációs szignál rostrocaudalisan erősödik, javaslatot tesz a két mag funkcionális LS-hoz való csatolására. Az általunk leírt denzitásbeli változások alátámasztják a Risold és Swanson (1997a) által kimutatott eredményeket, kiegészítve azokat, azzal, hogy a rostrocaudalis tengely közepén ez az erősödés gyengül, majd caudalis irányban újra sűrűbbé válik a NPY beidegzés.

7. 3. Galanin elhelyezkedése és rostrocaudalis megoszlása patkány LS-ban

Gal-IR varikózus rostok elhelyezkedése átfedésben volt a NPY-IR területekkel. A nucleus intermediális és nucleus ventralis laterális részén megegyezett a két neuropeptid elhelyezkedése, míg Gal varikózus axonok a nucleus dorsalis területén nem voltak kimutathatók. Noha patkány LS-ban előző munkák nem igazolták Gal-IR neuronok jelenlétét (Melander és mts., 1986; Risold és Swanson, 1997a), Perez és mts. (2001) colchicines előkezelés után egér LS-ban talált Gal-IR neuronokat. Kísérletünkben Gal tartalmú sejteket nem sikerült detektálnunk. Feltételezhető, hogy vagy nincsenek a LS területén, vagy olyan alacsony neuropeptid mennyiséget tartalmaznak, hogy vizualizálásuk colchines kezelést igényelt volna. A három tanulmányozott neuropeptid közül a Gal abszolút denzitása volt a legkisebb. Denzitási görbéje egy kisebb csúcsot tartalmaz, ami az egyik NPY rostokkal sűrűn ellátott területtel átfedést mutatott. A Gal és a NPY varikózus rostok térbeli elhelyezkedésének hasonlósága utalhat a két orexigén neuropeptid egymásra gyakorolt hatására, de ennek igazolására további korrelált fény és elektronmikroszkópos kettős jelöléses kísérletek szükségesek.

7. 4. OVX hatása a LS neuropeptidjeire

7. 4. 1. Általános megfigyeléseink

OVX hatására megszűnik a szervezet női nemi hormon termelése, amelynek hatására mind az ember, mind a rágcsálók szervezetében jól ismert macromorphologiai (Shimizu, 1997), míg az idegrendszer női nemi hormonok által befolyásolt területein micromorphologiai változások jönnek létre. Megfigyeléseink szerint a vér glükóz, koleszterin és szabadzsírsav tartalma megemelkedett az ovariectomizált állatokban, az intakt, kontroll állatok értékeihez viszonyítva, amely változásokat korábbi irodalmak is OVX hatásként írtak le (Roy et al. 1977, Richard, 1986). Az *ad libitum* táplált OVX állatoknál e megemelkedett vérértékek mellett a 150 %-os testtömeg növekedést is megfigyeltünk, amelynek háttérében szintén a női nemi hormonok táplálék felvételt befolyásoló hatása állhat. E testtömeg növekedés háttérében nagyrészt az abdominális zsírszövet felszaporodását láttuk a kísérletek során.

7. 4. 2. Leu-enk, NPY és Gal denzitás változásai OVX hatására

A LS neuronjai nagy mennyiségben expresszálnak ösztrogén, főleg ösztrogén- β -t és androgén receptorokat (Risold és Swanson, 1997a,b; Shugrue és mts., 1997; Mufson és mts., 1999; Shugrue és Merchenthaler, 2001), ami alapján feltételezhető a terület szexuális szteroid befolyásoltsága. Sahu és mts. (1987) tanulmányukban felhívják a figyelmet a szexuális szteroidok neuropeptid szekréciót befolyásoló szerepére. OVX hatására mindhárom neuropeptid átlagos denzitása megváltozott.

A női nemi hormonok hiánya jól detektálható növekedést okozott a Leu-enk denzitásában a LS területén. *In situ* hibridizációs technikát felhasználó korábbi tanulmányok felhívták a figyelmet az opioid peptidek mRNS szintjeinek ciklus-függő ingadozásaira intakt nőstényekben (Hammer és mts., 1994; Simerly és mts., 1996) és OVX állatokban exogén ösztrogén adagolást követően (Simerly, 1991). A ventromedialis hypothalamus területén csökkent a proenkephalin mRNS expressziója gonadectomia után, míg sem a striatum sem a bulbus olfactorius területén nem tapasztaltak változást (Laubert és mts., 1990; Hammer és mts., 1993). Ezek alapján feltételezhetünk egy területfüggő kapcsolatot a gonadalis hormonok és a központi opioid szignál között. Az általunk is kimutatott pericelluláris kosárcákát formáló rostok a LS területén valószínűleg, legalább részben, hypothalamikus eredetűek (Sakanaka és mts., 1982; Szeidemann és mts., 1995). A Leu-enk megnövekedett mennyisége feltételezhetően annak köszönhető, hogy a hypothalamikus területek neuronjainak szómájából a neuropeptid transzportálódott az axonokba, illetve axon végfácskába, így megnövelve a Leu-enk denzitását a LS területén és lecsökkentve azt a hypothalamusban.

Kísérletünkben az OVX hatására a NPY-IR rostok átlagos denzitása a kontroll érték 28 %-ra csökkent. Az OVX a női nemi hormonok jelentős csökkenését eredményezi. A petefészkek eltávolítás, a petefészkek hormonok hiánya hyperphágiához és kóros testsúlygyarapodáshoz vezet. Az OVX állatoknál a ARC és a PVN területén fokozott NPY gén expressziót figyeltek meg, amely ösztrogén adagolás hatására visszaállt az eredeti szintre (Crowley és mts., 1985; Bonavera és mts., 1994; Diano és mts., 1998; Ainslie és mts., 2001). A központi idegrendszerben az ösztrogén ösztrogén receptorokon keresztül fejti ki a hatását, amelyeket nagy mennyiségű neuron expresszál (Simerly és mts., 1990; Simerly, 1998; Laflamme és mts., 1998). Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy a hypothalamus NPY-t expresszáló sejtjei és más hypothalamicus neuronok, melyek szerepet játszanak a táplálékfelvétel szabályozásában, egyaránt expresszálnak ösztrogén receptorokat (Simerly és mts., 1990; Horváth és mts., 1995; Risold és Swanson, 1997b; Magni, 2003), amely az ösztrogén NPY termelésre kifejtett közvetlen hatását támaszthatja alá.

Egy korábbi, még nem publikált tanulmányunkban kettős jelöléses kísérletet végeztünk NPY és GABA ellenanyaggal a LS területén. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok során többször figyeltünk meg NPY immunpozitív axon terminálisokat GABA immunpozitív perikarionok közelében. Továbbá korábbi kutatások a LS és a ARC ill. PVN közötti reciprok kapcsolatot bizonyították (Herman és mts., 2002; Csáki és mts., 2000; Li és mts., 1999; Sim és Joseph, 1991). Indokolt így a feltételezésünk, hogy a LS NPY rostjai, legalábbis részben, a ARC és a PVN-ből valamint a laterális hypothalamus területéről jövő felszálló rostok. Ugyanakkor a LS GABA-erg sejtjeiből kiinduló efferens pályák legalább egy része a hypothalamuszba projektál, így teljessé téve a reciprok kapcsolatot a LS és a hypothalamus között. Valamint, ahogy azt már korábban említettük, a LS ösztrogén érzékenysége bizonyíték a területen kimutatható ösztrogén receptorok, főleg ösztrogén- β (Shugrue és mts., 1997; Mufson és mts., 1999; Shugrue és Merchenthaler, 2001). Ezek alapján, az említett reciprok kapcsolat a LS és a hypothalamus között valószínűleg direkt ösztrogén hatás alatt áll, mind a LS, mind a hypothalamus területén. Feltételezésünk szerint a NPY denzitás csökkenését a LS területén mind direkt, mind pedig indirekt módon befolyásolhatta az ösztrogén hiány. További kísérletek szükségesek, hogy felderítsük a pontos szabályozási mechanizmust a két reciprok kapcsolatban álló terület között.

Horváth és mts. (1995) Gal tartalmú neuronokon ösztrogén receptorokat mutattak ki a mediobasalis hypothalamus területén. Továbbá a proestrus alatti megemelkedett ösztrogén szint ugyanitt növeli a Gal kimutatható mennyiségét (Lopez és mts., 1991). Más tanulmányok is megerősítik, hogy az ösztrogén elősegíti a Gal expresszióját (Gabriel és mts., 1990; Merchenthaler és mts., 1993). Az általunk megfigyelt OVX hatására bekövetkezett majdnem 50 %-os átlagos denzitás csökkenés utalhat az ösztrogén hiányból adódó serkentés megszűnésére.

Összegezve kijelenthetjük, hogy a megfelelő hypothalamikus területek mellett a LS is a gonadális hormonok befolyása alatt áll, melyet bizonyít a LS területén általunk megfigyelt három neuropeptid denzitás változása az OVX által okozott női nemi hormon hiányra.

7. 5. Éhezés hatása a LS neuropeptidjeire

A számos vegetatív funkció regulációjában (anyai viselkedés, szorongás, táplálékfelvétel) szerepet játszó LS területén olyan neuropeptidek denzitásának vizsgálatát tűztük ki célul, amelyek bizonyítottan részt vesznek a táplálékfelvétel központi idegrendszeri szabályozásában. Kísérleti felállásunkban két különböző táplálékmevönási módszert

alkalmaztunk. Egyrészt a teljes éhezést, másrészt a 40 %-os táplálékmegegyezést. A nőstény állatokon végrehajtott OVX mindhárom általunk vizsgált neuropeptid denzitását befolyásolta, amely a terület nemi hormon befolyásoltságára utal, esetleges nemi különbségek meglétére a LS szabályozási mechanizmusában. Ezen különbségek megfigyelése végett hím és nőstény állatokon is elvégeztük kísérleteinket, illetve nőstény állataink egy részén OVX-t hajtottunk végre a nemi ciklussal járó hormonszint ingadozások kiküszöbölésére.

A kontroll és az éhező állatokat összehasonlítva, mindhárom neuropeptid immunreaktív rostjainak elhelyezkedése hasonló, a már előzőleg említett LS magokban volt detektálható. Éhezés hatására tehát az immunpozitív rostoknak csak a mennyisége változott eltérő irányokban, elhelyezkedésük a LS területén nem. Az immunpozitív rostok denzitás csökkenésével együtt járt a pericelluláris kosárcák számának csökkenése, illetve denzitás növekedés esetén növekedése. A kizárólag NPY esetében talált festődött sejtek mennyisége a rostok denzitás változásával nem mutatott korrelációt, a kontroll állatoknál tapasztaltakkal összhangban, az ependyma réteghez közel dendritjeikkel az oldalkamra felé nyúlva detektáltuk őket. Ebből arra következtetünk, hogy ezen sejtek kitüntetett, ún. liquor-monitorozó funkciójukat éhezés hatására is megtartották, valamint, hogy az éhezésre bekövetkezett denzitás változások valószínűleg a külső eredetű -extrinsic- rostokat érintették.

7. 5. 1. Általános megfigyeléseink

Az éhezés állapotát alátámasztotta az általunk vizsgált vérparaméterek csökkenése. A koleszterin tartalom az OVX állatoknál csak a harmadik hét után kezdett csökkeni, míg az intakt éhezőknél már az első hét után 50 %-os csökkenést mutatott. Ezt indokolhatja az OVX állatok megnövekedett zsír tartaléka, ami hosszabb távú koleszterin utánpótlást biztosított az éhezés alatt. Az éhező állatok testsúly csökkenése a lecsökkent testzsír tartalommal és a belső szervek méretének csökkenésével magyarázható, mind az intakt, mind az OVX állatok esetében (Weindruch és Sohal, 1997).

Az éhező nőstény állatok közül már a második héten egy, a harmadik hét után kettő és negyedik hét végére még egy állat pusztult el, ezzel szemben az OVX-t patkányok közül a harmadik hét után hullott el egy állat a 4 hetes éhezés alatt. A hím patkányokkal folytatott kísérleteink közben nem tapasztaltunk elhullást. Megfigyeléseink alapján kijelenthetjük, hogy a nőstény, illetve az OVX patkányok kevésbé tolerálták az éhezést, mint a hasonló kísérletben résztvevő hímek. Az OVX-t állatok nagyobb testsúllyal kezdték a kísérletet, így testsúly többletük tovább szolgált tartalék tápanyagként, ez magyarázhatja a csoporton belüli kevesebb

állat veszteséget. A hím állatoknál megfigyelt jobb túlélési arány valószínűleg a jobb adaptációs képességüknek köszönhető (Partridge és mts., 2005).

Egytől-négy hétig tartó táplálék megvonásos kísérleteinket összehasonlítva levontuk azt a következtetést, hogy a legszámottevőbb változások mindig az első héten történtek mindhárom neuropeptid denzitásában. Ezért az 1 hétig tartó éheztetéses kísérleteinket statisztikai kiértékeléshez elégséges számú állaton tudtuk kivitelezni, míg a 2-3-4 hetes éheztetéses kísérleteinket csak kis állatszámú tájékoztató jelleggel végeztük el, így ezeknél statisztikai kiértékelés nem történt (1. Táblázat). A 27. ábra táblázata összefoglalja kísérleteink eredményeit, külön táblázatban kiemelve az első hét történéseit.

1. Táblázat: Összefoglaló táblázat a grafikonok alapjául szolgáló pixel értékekről, átlag \pm szórás formájában.

	Leu-enk	NPY	Gal
Hím kontroll (teljes éhező)	2723 \pm 496	4604 \pm 562	2872 \pm 297
Hím teljes éhező	2177 \pm 560	3443 \pm 872	5841 \pm 563
Hím kontroll (1 hétig tartó 40% éhezés)	2974 \pm 244	2149 \pm 899	3698 \pm 541
Hím 1 hétig tartó 40% éhezés	2799 \pm 321	2475 \pm 528	4507 \pm 484
Nőstény kontroll (1 hétig tartó 40% éhezés)	1799 \pm 134	1701 \pm 670	1812 \pm 604
Nőstény 1 hétig tartó 40 % éhezés	1336 \pm 246	2041 \pm 297	954 \pm 126
Ovariectomizált kontroll	2656 \pm 600	1592 \pm 220	764 \pm 120
Ovariectomizált 1 hétig tartó 40 % éhezés	1803 \pm 206	1667 \pm 239	1052 \pm 231

Csoportok	Leu-enk	NPY	Gal
Hím 1 hetes teljes éhezés	▼	▼	△
Hím 4 hetes részleges éhezés	▼ ▼ ▼ ▼	△ △ ○ ▼	△ △ ○ ▼
OVX	△	▼	▼
Nőstény 4 hetes részleges éhezés	▼ △ ▼	△ ▼ ▼	▼ ▼ △
OVX 4 hetes részleges éhezés	○ ▼ ▼	▼ ▼ ▼	▼ △ ▼
Változások az első hét után:			
Csoportok	Leu-enk	NPY	Gal
Hím 1 hetes teljes éhezés	▼	▼	△
Hím 4 hetes részleges éhezés	▼	△	△
OVX	△	▼	▼
Nőstény 4 hetes részleges éhezés	▼	△	▼
OVX 4 hetes részleges éhezés	○	▼	▼
jelmagyarázat:	○: nincs változás		
(a kontrollhoz képest)	▼: csökkenés		
	△: növekedés		

27. ábra: Összefoglaló táblázat az elvégzett kísérleteink főbb eredményeiről. A nőstény és az OVX 4 hétig tartó kísérlet sorozat 3. heti eredményei technikai okokból hiányoznak.

7. 5. 2. Éhezés és részleges táplálékmgvonás hatása Leu-enk denzitására hím, nőstény és OVX patkányok LS-ban

Az éhezés típusától függetlenül a Leu-enk-immunpozitív rostok mennyisége három kísérletünkben csökkent. Hím, 40 %-os éheztetéses kísérletünkben a Leu-enk mennyisége az első hét után kevésbé csökkent, mint a teljes táplálék megvonásos és az első heti nőstény, 40%-os éheztetéses kísérletben. Ha a négy hetes kísérlet denzitásbeli változásait tekintjük, a hím, 40 %-os táplálékmgvonás esetében ez a csökkenés nem volt olyan gyors változás, inkább tekinthető időben elnyújtottabbnak. Egyedül az 1 hetes 40 %-os OVX éheztetésnél nem tapasztaltunk denzitásbeli változást a kontroll állatokhoz képest, amit a két jelenlévő hatás (OVX és éhezés) eredője magyarázhat. A 2-4 hétig tartó 40 %-os éheztetéses kísérletünk második és negyedik hetén itt is kb. 75%-os csökkenést figyeltünk meg. Korábbi tanulmányok az opioidokat úgy említik, mint a rövid távú táplálékfelvételt stimuláló neuropeptideket (Gosnell és Levine, 1996; Yeomans és Gray, 2002). Egy másik tanulmányban az opioid receptor antagonisták táplálékfelvételt csökkentő hatásáról írnak rágcsálókban és emberben is (Moron és mts., 2003). Más tanulmányok sok esélyt láttak az opioid antagonisták felhasználására az elhízás terápiás kezelésében (Atkinson, 1982; Wolkowitz és mts., 1985), később bebizonyosodott, hogy testsúlykontrolláló szerepüket hosszú távon elvesztik (Atkinson és mts., 1985; Mitchell és mts., 1987; Malcolm és mts.,

1985), ami a szervezet adaptálódásának eredménye lehet. Úgy tűnik, hogy az opioidok rövidtávú táplálékfelvételt elősegítő hatása (Marks-Kaufman, 1982; Gosnell és Levine, 1996) kísérleteinkben nem érvényesült. Érdeemes azonban megfontolni, hogy az egy hét részleges, illetve teljes táplálékmegvonás tekinthető e rövid távú táplálékmegvonásnak. Az általunk tanulmányozott körülmények inkább tekinthetők hosszú távú táplálékmegvonásnak, ebből kifolyólag a Leu-enk denzitásának csökkenése feltehetőleg a patkány szervezetének adaptációs reakciója az állat túlélése érdekében. Másrészt az éhezést valószínűleg stresszként éli meg az állat és az ehhez való habituálódás hatással lehet az endogén opiátok expressziójára, ami a csökkenő opioid denzitásban nyilvánulhat meg (Yeomans és Gray, 2002).

A tapasztalt jelenségek a szervezet éhezéssel való alkalmazkodásának tekinthetőek, illetve újabb bizonyítékok arra, hogy az opioidok csak rövid távon felelősek a fokozott táplálék felvételért, így antagonistáik adása hosszútávon nem jár súlyvesztéssel (Atkinson és mts., 1985; Mitchell és mts., 1987; Malcolm és mts., 1985).

7. 5. 3. Éhezés és részleges táplálékmegvonás hatása NPY denzitására hím, nőstény és OVX patkányok LS-ban

A NPY az egyik legorexigénebb neuropeptid, amely részt vesz a táplálékfelvétel szabályozásában (Hillebrand és mts., 2002). Orexigén hatását mind intracerebrális beadása, mind a táplálék megvonás (csökkenő leptin szint) kiválthatja (Edwards és mts., 1999; Kalra és mts., 1999; Magni, 2003; Leibowitz és Wortley, 2004). A táplálék felvétel szabályozásában résztvevő hypothalamikus területeken *in situ* hibridizációs technikával kimutatták, hogy a NPY mRNS-ek mennyisége megemelkedett éhezés hatására (Leibowitz, 1998; Schwartz és mts., 1998). A táplálékfelvétel drasztikus csökkentésére a szervezet a zsírok minél nagyobb mértékű mobilizációjával, illetve a zsírsav lebontás serkentésével válaszol (Moron és mts., 2003). Ez a zsírszövet által termelt leptin keringésbe, illetve a vér-agy gáton át a liquorba jutó mennyiségének csökkenésével jár, így a NPY sejtek felszabadulnak a leptin gátló hatása alól a hypothalamikus magokban (ARC, PVN), utat engedve a felszabaduló NPY táplálékfelvételt serkentő hatásának (Magni, 2003). A LS és a hypothalamikus magok reciprok kapcsolatai révén ez a hatás valószínűleg indirekt úton a LS NPY-rendszerén is érvényesülni látszik. Kapott eredményeink összhangban állnak a NPY erős orexigén hatásával. Mind hímek, mind nőstény patkányok LS-nak NPY denzitása növekedett az első hetes 40 %-os táplálékmegvonás hatására. Kivétel az egy hetes teljes éhezéssel és az OVX részlegesen éheztetett csoportnál tapasztalt denzitás csökkenés, ami látszólag ellentmond a NPY orexigén

hatásának. Érdeemes azonban megfontolni, hogy a teljes éhezés hatására a downreguláció, amit a 4 hetes éheztetéses kísérletek második hetétől tapasztaltunk, már hamarabb érvényesülhet, visszaszorítva az állat éhségérzetét, megkönnyítve az éhezés által okozott stressz túlélését, illetve utalhat a szervezet alkalmazkodására, tehát anyagcserét lassító törekvés, a teljes táplálék megvonásra válaszolva. Továbbá ugyanezen kísérletünkben szereplő másik orexigén hatású neuropeptid, a Gal denzitása viszont megnőtt, ami tekinthető a NPY funkció átvételének az irodalom alapján: a NPY szerepét a NPY termelésére képtelen knock-out egerekben a Gal vette át (Magni, 2003).

Négy hetes, 40 %-os éheztetéses kísérleteinkben OVX nőstényeknél már az első héten, nőstény állatainknál a második héttől, hím állatainknál a harmadik héttől a NPY denzitásában egy csökkenő tendenciát detektáltunk. Ugyan a NPY esetében tapasztalt csökkenés gyorsabban és nagyobb mértékben zajlott le nőstényeknél és OVX nőstényeknél, mint a hímeknél, de a változás tendenciája hasonló volt. E különbséget okozhatja a NPY esetében is fellépő közvetett, vagy közvetlen ösztrogén hatás, illetve annak kiesése (Bonavera et al., 1994; Ainslie et al., 2001).

7. 5. 4. Éhezés és részleges táplálékmevönás hatása Gal denzitására hím, nőstény és OVX patkányok LS-ban

A Gal-t hasonlóan a NPY-hoz az orexigén neuropeptidek közé soroljuk, valamint a két neuropeptid anatómiailag közeli neuronokban fordul elő a hypothalamikus magokban (ARC, PVN) (Bergonzelli et al., 2001), mégis a Gal esetében eredményeink több helyen eltérnek az NPY esetében tapasztaltaktól. A hím, egy hetes teljes éheztetéses kísérletünk után a Gal denzitása növekedett a LS területén. A NPY-t expresszáló ARC neuronok a PVN Gal-t expresszáló neuronjaira expressziót serkentő hatással bírnak. A LS területén is feltételezhető kapcsolat a NPY-t expresszáló sejtek és a Gal tartalmú rostok között, ami magyarázhatja a Gal későbbi denzitás növekedését. Utóbbi csak a NPY expresszió növekedést követően emelkedik, átvéve, vagy elősegítve a NPY táplálékfelvételt serkentő hatását. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy a NPY szerepét NPY termelésére képtelen knock-out egerekben a Gal vette át (Magni, 2003). Valószínűsíthető, hogy miközben az NPY denzitása lecsökkent, az egy hetes éhezés után a Gal lett felelős az orexigén hatás kialakításáért.

A hím 4 hétig taró, 40 %-os éhezés alatt a NPY-hoz hasonlóan az első héten emelkedett a Gal mennyisége, majd a harmadik hétre a kontroll értékre süllyedt, végül a negyedik hét végére lesüllyedt a kontroll érték alá több, mint 30 %-kal. Figyelmet érdemel az a megfigyelésünk, hogy a Gal és az NPY denzitási görbéje azonos lefutást mutat, ami a két

neuropeptid hasonló szerepére utalhat. Eredményeink összhangban vannak az *in situ* hybridizációs irodalmi adatokkal is, melyek szerint az NPY mRNS szint megemelkedik éhezés alatt a megfelelő hypothalamikus területeken, illetve a Gal és az NPY mennyisége is emelkedést mutat táplálék megvonás hatására ugyanitt (Moron és mts., 2003; Magni, 2003). Már az első héten tapasztalt megemelkedett NPY és Gal denzitási értékek a LS magjaiban az állat energia egyensúlyának a lebontási folyamatok (pl.: fokozott zsírsav lebontás) felé való eltolódásának tulajdonítható, míg a harmadik és negyedik hétre lecsökkent neuropeptid szintek a szervezet energia metabolizmusának adaptálódására utalhatnak.

A 4 hétig tartó nőstény és OVX, 40 %-os éhezéssel kísért kísérletünkben, a Gal mennyiségi változásaiban egy időbeli eltolódást figyeltünk meg a NPY denzitási változásaihoz viszonyítva (később növekedett a Gal mennyisége, mint a NPY-é : nőstényeknél a negyedik héten, OVX állatainknál a második héten) (Kovács és mts., 2005). Mindezek alapján feltételezhető, hogy a NPY downregulációját a Gal downregulációja detektálható késéssel követi. Igaz, a hím 4 hetes 40 % táplálék-megvonásos kísérletünkben ezt az eltolódást nem detektáltuk. A különbség oka valószínűleg az ösztrogén Gal-ra gyakorolt hatása, amely hím állatokban nem érvényesül. Ezt irodalmi adatok is alátámasztják: a proestrus alatti megemelkedett ösztrogén szint ugyanitt növeli a Gal kimutatható mennyiségét (Lopez és mts., 1991), továbbá az ösztrogén elősegíti a Gal expresszióját (Gabriel és mts., 1990; Merchenthaler és mts., 1993).

Érdekes azonban megfontolni, hogy a Gal orexigén hatása nem olyan kifejezett az irodalom szerint, mint a NPY-é (Edwards és mts., 1999; Kalra és mts., 1999; Leibowitz és Wortley, 2004). Emellett a Gal expressziójára az alacsony leptin szint sincs akkora serkentő hatással, mint a NPY esetében, amely a Gal-t expresszáló neuronokon talált alacsony leptin receptor koncentrációnak tulajdonítható (Cheung és mts., 2001). Viszont NPY hiányos knock-out egerekben a Gal-t jelölték meg, mint az NPY feladatát átvevő neuropeptidet (Leibowitz, 1998). Chaillou és mts. (2003) a nucleus infundibularisban és a dorsalis hypothalamusban Gal tartalmú neuronok számának növekedését találta hosszútávon alultáplált nőstény juhokban. Ugyanakkor, túltáplált patkányok nucleus infundibularisban növekedett a Gal expressziója (Pedrazzi és mts., 1998). Továbbá, a PVN és az eminentia mediana területén a Gal expresszió erősen megemelkedett ösztrogén, illetve ösztrogén és progeszteron együttes hatására (Edwards és mts., 1999), ami és a saját OVX alkalmazó kísérletünkben leírtak alapján feltételezhetjük, hogy a Gal expresszióját a LS területén ható női nemi hormonok ciklusfüggően is befolyásolták. Ezen ellentmondásos eredmények tükrében kijelenthetjük, hogy a

Gal expressziós változásai mind terület-, mind pedig fajspecifikusak, valamint a nőstény állatok nemi ciklusából eredő hormonszint ingadozások is befolyásolhatták eredményeinket.

Munkánk eredményeinek végső konklúziójaként megállapíthatjuk, hogy a hypothalamikus szabályozó központtal kölesönös kapcsolatban álló LS - ha csak indirekt módon is- részét képezi a táplálékfelvételt befolyásoló bonyolult neuroendocrin szabályozó rendszernek.

8. Új tudományos eredmények

Munkánk során elsőként vizsgáltuk a patkány LS-nak néhány orexigén és anorexigén neuropeptidjét táplálékmegvonás, ill. a gonadalis hormonok változásainak hatására.

Kísérleteink főbb eredményei a következők:

1. Kontroll állatokban felmértük a Leu-enk, NPY és Gal rostrocaudalis megoszlását a LS rostrocaudalis tengelye mentén és megállapítottuk, hogy a Leu-enk átlagos denzitása volt a legnagyobb, ezt követte a NPY és a legkisebb átlagos denzitást a Gal-nál detektáltunk. Megállapítottuk továbbá, hogy míg a Gal denzitása többé-kevésbé egyenletesnek mondható, a Leu-enk-immunreaktív fonadék jóval magasabb denzitású a középső metszetek területén, mint a legrostralisabb, vagy legcaudalisabb metszeteken. Ugyanakkor, az NPY denzitása kétszűcsű görbével ábrázolható, kb. a rostrocaudalis kiterjedés egyharmadánál és kétharmadánál mérhető maximális értékekkel.
2. Táplálékmegvonási kísérleteinkben hím patkányok esetében sikerült egy hetes teljes, és részleges éheztetés neuropeptidekre gyakorolt hatását megvizsgálni. Egy hetes teljes táplálék megvonás hatására a Leu-enk és NPY mennyisége csökkent, míg a Gal denzitása közel kétszeresére nőtt. Ugyanakkor 4 hétig tartó 40 %-os éheztetés a Leu-enk átlagos denzitását folyamatosan csökkentette, míg a NPY és Gal denzitása egymáshoz hasonló változást mutatott: az első két hétben nőtt, majd lecsökkent a kontroll érték alá.
3. OVX hatására Leu-enk mennyisége növekedett, míg a Gal és a NPY csökkent.
4. Intakt nőstényekkel folytatott 4 hétig tartó 40 %-os éhezés különböző mértékben befolyásolta az általunk vizsgált neuropeptidok átlagos denzitását. A NPY, mint a szervezet legorexigénebb neuropeptidjének átlagos denzitása nőtt az első héten, majd csökkent. Meglepő módon a Gal nem követte a NPY denzitási változást, a tapasztalt csökkenés az esetleges nemi hormonhatásnak tulajdonítható. A Leu-enk átlagos denzitásának csökkenését figyeltük meg, illetve mennyiségének kis mértékű növekedését a második héten.
5. OVX nőstényeknél 4 hétig tartó 40 %-os éhezés hatására a LS területén mért Leu-enk és Gal denzitás változása ugyanezen körülmények között éheztetett hímek eredményeihez volt hasonló, igaz a Gal denzitás növekedése csak késve történt meg. A NPY átlagos denzitásának csökkenését figyeltük meg kisebb ingadozásokkal.

9. Summary

Lateral septum (LS) plays an important role in the regulation of several autonomic functions. The peptidergic networks, especially prominent in the ventral LS nucleus seem to influence water and food intake. LS was shown to contain considerable amounts of neuropeptides, including leucin-enkephalin (Leu-enk), neuropeptide Y (NPY) and galanin (Gal), also present in the hypothalamus. We focused our study to reveal the rostrocaudal distribution of three neuropeptides and the effect of 100 % (during one week) and 40 % food deprivation during four weeks on the immunohistochemically detectable amount of NPY, Gal and Leu-enk in order to establish their putative role in these septal neural networks. Our experiments were carried out not only on male, but female and (OVX) rats to demonstrate the effect of estrogen on food intake regulation of the LS and the effect on the density changes of Leu-enk, NPY and Gal in the LS.

We studied the rostrocaudal distribution of Leu-enk-, Gal- and NPY-IR along the longitudinal axis of the lateral septal area with pre-embedding ICC combined with computer-assisted densitometry. The highest density of varicose fibres showing Leu-enk-IR was observed. In comparison with Leu-enk, the relative amount of the NPY was found to be lower and Gal was found the lowest from among the three examined neuropeptides. Leu-enk-, NPY- and Gal-IR were present in varicose fibres, while in addition to varicose axons, NPY-IR cell bodies and dendrites were also visualized. One of our interesting findings was that some of the NPY-IR cell bodies were located close to the ependymal layer lining the lateral ventricles. Their position and the possible contact of their dendrites with the cerebrospinal fluid suggest a liquor-monitoring function.

Our results indicate that fasting affects the expression of Leu-enk, NPY and Gal in the LS area of rats in a differential manner. These changes were influenced by the length and the extent of fasting. We also examined the probable interaction between sexual steroids and Leu-enk, NPY and Gal in the LS. Our findings support that Leu-enk, NPY and Gal secretion may be modulated by gonadal steroids in the LS area, which is very rich in estrogen receptors. Furthermore, estrogen can modulate the effect of fasting on the examined three neuropeptides.

The role of LS nuclei in the regulatory processes of food intake is still not completely revealed. With the help of our experiments, we provided evidence about the expression changes of NPY, Gal and Leu-enk during fasting in the LS and the exact anatomical,

neurochemical and fine structural characteristics of these networks possibly also taking part in the regulation of food intake. In summary, beside the well established role of the hypothalamic nuclei in the control of appetite and energy expenditure, our study can enlighten an unknown part of the complex regulation of the food intake process.

10. Irodalom

1. Ainslie, D. A., Morris, M. J., Wittert, G., Trunbull, H., Proietto, J., Thronburn, A. W. (2001) Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25, 1680-1688.
2. Allen, Y. S., Adrian, T. E., Allen, J. M., Tatemoto, K., Crow, T. J., Bloom, S. R., Polack, J. M. (1983) Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science* 4613, 877-879.
3. Alonso, J. R., Frotsher, M. (1989a) Organization of the septal region in the rat brain: A Golgi/EM study of lateral septal neurons. *J. Comp. Neurol.* 286, 472-487.
4. Alonso, J. R., Frotsher, M. (1989b) Hippocampo-septal fibers terminate on identified spiny neurons in the lateral septum: A combined Golgi/electron microscopic and degeneration study in the rat. *Cell Tissue Res.* 258, 243-246.
5. Atkinson, R. L., (1982) Naloxone decreases food intake in obese humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55, 196-198.
6. Atkinson, R. L., Berke, L. K., Drake, C. R., Bibbs, M. L., Williams, F. L., Kaiser, D. L. (1985) Effects of long-term therapy with naltrexone on body weight in obesity. *Clin. Pharmacol. Ther.* 38, 419-422.
7. Ádám, V. (2004) Mindennapi kenyérünk, mindennapi kalóriánk. *Mindentudás Egyeteme, előadás, Budapest, Magyarország.*
8. Beaulieu, J., Champagne, D., Drolet, G. (1996) Enkephalin innervation of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: distribution of fibers and origins of input. *J. Chem. Neuroanat.* 10, 79-92.
9. Beck, B. (2000) Neuropeptides and obesity. *Nutrition* 16, 916-923.
10. Bergonzelli, G. E., Pralong, F. P., Glauser, M., Cavadas, C., Grouzmann, E., Gaillard, R. C. (2001) Interplay between galanin and leptin in the hypothalamic control of feeding via corticotropin-releasing hormone and neuropeptide Y. *Diabetes* 50, 2666-2672.
11. Billington, C. J., Briggs, J. E., Harker, S., Grace, M., Levine, A. S. (1994) Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a centre coordinating energy metabolism. *Am. J. Physiol.* 266, R1765-R1770.
12. Blume, H. W., Pittman, Q. J., Lafontaine, S., Renaud, P. (1982) Lateral septum-medial hypothalamic connections: an electrophysiological study in the rat. *Neuroscience* 7, 2783-2792.

13. Bonavera, J. J., Dube, M. G., Kalra, P. S., Kalra, S. P. (1994) Anorectic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide-Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 134, 2367-2370.
14. Borhegyi, Zs., Freund, T. F. (1998) Dual projection from the medial septum to the supramammillary nucleus in the rat. *Brain. Res. Bull.* 46, 453-459.
15. Ceccatelli, S., Ericsson, M., Hökfelt, T. (1989) Distribution and coexistence of corticotrophin-releasing factor-, neurotensin-, enkephalin-, cholecystokinin-, galanin- and vasoactive intestinal polypeptide/peptid histidine isoleucine-like peptides in the parvocellular of the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 3, 309-323.
16. Chaillou, E., Baumont, R., Tramu, G., Tillet, Y. (2000) Effect of feeding on Fos protein expression in sheep hypothalamus with special reference to the supraoptic and paraventricular nuclei: an immunohistochemical study. *Eur. J. Neurosc.* 12, 4515-4521.
17. Chaillou, E., Baumont, R., Fellmann, D., Tramus, G., Tillet, Y. (2003) Sensitivity of galanin- and melanin-concentrating hormone-containing neurons to nutritional status: an immunohistochemical study in the ovariectomized ewe. *J. Neuroendocrinology* 15, 459-467.
18. Cheeta, S., Kenny, P. J., File, S. E. (2000) The role of 5-HT1A receptors in mediating the anxiogenic effects of nicotine following lateral septal administration. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3797-3802.
19. Cheung, C. C., Hohmann, J. G., Clifton, D. K., Steiner, R. A. (2001) Distribution of galanin messenger RNA-expressing cells in murine brain and their regulation by leptin in regions of the hypothalamus. *Neuroscience* 103, 423-432.
20. Cohen, M. R., Cohen, R. M., Pickar, D., Murphy, D. L. (1985) Naloxone reduces food intake in humans. *Psychosom. Med.* 47, 132-138.
21. Costa, E., Panula, P., Thompson, H. K, Cheney, D. L. (1983) The transsympathic regulation of the septo-hippocampal cholinergic neurons. *Life Sci.* 32., 165-179.
22. Crowley, W. R., Tessel, R. E., O' Donohue, T. L., Adler, B. A., Kalra, S. P. (1985) Effects of ovarian hormones on the concentration of immunoreactive neuropeptide Y in discrete brain regions of the female rat: correlation with serum luteinizing hormone (LH) and median eminence LH-releasing hormone. *Endocrinology* 117, 1151-1155.
23. Cowley, M. A., Smith, R. G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K. L., Strasburger, C. J., Bidlingmaier, C. J., Esterman, M., Heiman, M. L., Garcia-Segura, L. M., Nillni, E. A., Mendez, P., Low, M. J., Sotonyi, P., Friedman, J. M., Liu, H., Pinto, S., Colmers, W. F., Cone, R. D., Horvath, T. L.(2003) The distribution and mechanism of action

of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37, 649-661.

24. Csáki, A., Kocsis, K., Halász, B., Kiss, J. (2000) Localization of glutamatergic/aspartatergic neurons projecting to the hypothalamus paraventricular nucleus studied by retrograde transport of [³H]D-aspartate autoradiography. *Neuroscience* 101, 637-655.
25. Diano, S., Kalra, S. P., Sakamoto, H., Horvath, T. L. (1998) Leptin receptors in estrogen receptor-containing neurons of the female rat hypothalamus. *Brain Res.* 812, 256-259.
26. Diano, S., Horvath, B., Urbanski, H. F., Sotonyi, P., Horvath, T. (2003) Fasting activates the nonhuman primates hypocretin (orexin) system and its postsynaptic targets. *Endocrinology* 144, 3774-3778.
27. Dum, J., Gransch, C. H., Herz, A. (1983) Activation of hypothalamic β -endorphin pools by reward induced by highly palatable food. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 33, 119-126.
28. Dutar, P., Bassant, M. H., Senut, M. C., Lamour, Y. (1995) The septihippocampal pathway: structure and function of a central cholinergic system. *Physiol. Rev.* 75, 393-427.
29. Edwards, C. M., Abusnana, S., Sunter, D., Murphy, K. G., Ghatei, M. A., Bloom, S. R. (1999) The effect of the orexins on food intake: Comparison with neuropeptide Y, Melanin-concentrating hormone and galanin. *J. Endocrinol.* 160, 7-12.
30. Eichenbaum, H. (2001) The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behav. Brain. Res.* 127, 199-207.
31. Erickson, J. C., Hollopeter, G., Palmiter, R. D. (1996) Attenuation of the obesity syndrome of *ob/ob* mice by the loss of neuropeptide Y. *Science* 274, 1704-1707.
32. Estrada, K. M., Pompolo, S., Morris, M. J., Tilbrook, A. J., Clarke, I. J. (2003) Neuropeptide Y delays the oestrogen-induced luteinizing hormone surge in the ovariectomized ewe: further evidence that NPY has a predominant negative effect on LH secretion in the ewe. *J. Neuroendocrinology* 15, 1011-1020.
33. Everitt, B. J., Hökfelt, T., Terenius, L., Tatemoto, K., Mutt, V., Goldstein, M. (1984) Differential co-existence of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity with catecholamines in the central nervous system of the rat. *Neuroscience* 11, 443-462.
34. Ferris, C. F., Gold, L., de Vries, G. J., Potegal, M. (1990) Evidence for a functional and anatomical relationship between the lateral septum and the hypothalamus in the control of flank marking behaviour in golden hamsters. *J. Comp. Neurol.* 293, 476-485.

35. Freund, T. F., Antal, M. (1988) GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* 366, 170-173.
36. Finley, J. C. W., Lindström, P., Petrusz, P. (1981) Immunocytochemical localization of β -endorphin-containing neurons in the rat brain. *Neuroendocrinology* 33, 28-42.
37. Gabriel, S. M., Koenig, J. I., Kaplan, L. M. (1990) Galanin-like immunoreactivity is influenced by estrogen in peripubertal and adult rats. *Neuroendocrinology* 51, 168-173.
38. Gall, C., Moore, R. Y. (1984) Distribution of enkephalin, substance P, tyrosine hydroxylase and 5-hydroxytryptamine immunoreactivity in the septal region of the rat. *J. Comp. Neurol.* 225, 212-227.
39. Garris, D. R. (1979) Direct septo-hypothalamic projections in the rat. *Neurosci. Lett.* 13, 83-90.
40. Gehlert, D. R. (1999) Role of hypothalamic neuropeptide Y in feeding and obesity. *Neuropeptides* 5, 329-338.
41. Gordon, F. J., Johnson, A. K. (1981) Electrical stimulation of the septal area in the rat: Prolonged suppression of water intake and correlation with self-stimulation. *Brain Res.* 206, 421-430.
42. Gosnell, B., Levine, A. S. (1996) Stimulation of ingestive behaviour by preferential and selective opioid agonists. San Diego: Academic Press, 147-166.
43. Grove, K. L., Chen, P., Koegler, F. H., Schiffmaker, A., Smith, S., Cameron, J. L. (2003) Fasting activates neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus and the paraventricular nucleus in the rhesus macaque. *Mol. Brain Res.* 1-2, 133-138.
44. Gulyás, A. I., Görös, T. J., Freund, T. F. (1990) Innervation of different peptide-containing neurons in the hippocampus by GABAergic septal afferents. *Neuroscience* 37, 31-44.
45. Gunion, M. W., Peters, R. H. (1981) Pituitary β -endorphin, naloxone and feeding in several experimental obesities. *Am. J. Physiol.* 241, 173-184.
46. Hammer, R. P., Jr., Bogic, L., Handa, R. J. (1993) Estrogenic regulation of proenkephalin mRNA expression in the ventromedial hypothalamus of the adult male rat. *Mol. Brain Res.* 19, 129-134.
47. Hammer, R. P., Jr., Zhou, L., Cheung, S. (1994) Gonadal steroid hormones and hypothalamic opioid circuitry. *Hormones and Behavior* 28, 431-437.
48. Herman, J. P., Tasker, J. G., Ziegler, D. R., Cullinan, W. E. (2002) Local circuit regulation of paraventricular nucleus stress integration glutamate-GABA connection. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71., 457-468.

49. Hillebrand, J. J. G., de Wied, D., Adan, R. A. H. (2002) Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 23, 2283-2306.
50. Horvath, T. L., Leranath, C., Kalra, S. P., Naftolin, F. (1995) Galanin neurons exhibit estrogen receptor immunoreactivity in female rat mediobasal hypothalamus. *Brain Res.* 675, 321-324.
51. Horvath, T. L., Diano, S., Sotony, P., Heiman, M., Tschöp, M. (2001) Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance - a hypothalamic perspective. *Endocrinology* 142, 4163-4169.
52. Houseknecht, K. L., Potocarrero, C. P. (1998) Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. *Domest. Anim. Endocrinol.* 15, 457-475.
53. Houseknecht, K. L., Baile, C. A., Matteri, R. L., Spurlock, M. E. (1998) The biology of leptin: a review. *J. Anim. Sci.* 76, 1405-1420.
54. Iqbal, J., Pompolo, S., Murakami, T., Grouzmann, E., Sakura, T., Meister Clarke, I. J. (2001) Immunohistochemical characterization of localization of long form leptin receptor (OB-Rb) in neurochemically defined cells the ovine hypothalamus. *Brain Res.* 920, 55-64.
55. Ishizaki, K., Honma, S., Katsuno, Y., Abe, H., Masubuchi, S., Namihira, M., Honma, K. (2002) Gene expression of neuropeptide Y in the nucleus of the solitary tract is activated in rats under restricted daily feeding but not under 48-h food deprivation. *E. J. Neurosci.* 17, 2097-2105.
56. Jakab, R., Leranath, Cs. (1990a) Somatospiny neurons in the rat lateral septal area are synaptic targets of hippocamptoseptal fibers: A combined EM/Golgi and degeneration study. *Synapse* 6, 10-22.
57. Jakab, R., Leranath, Cs. (1990b) Catecholaminergic, GABAergic, and hippocamptoseptal innervation of GABAergic "somaspiny" neurons in the rat lateral septal area. *J. Comp. Neurol.* 302, 305-321.
58. Jakab, R., Leranath, Cs. (1991) Synaptology and origin of somatostatinerpic fibers in the rat lateral septal area: Convergent somatostatinerpic and hippocampal inputs of somatospiny neurons. *Brain Res.* 565, 123-134.
59. Jakab, R., Leranath, Cs. (1993) Presence of somatostatin or neurotensin in lateral septal dopaminergic axon terminals of distinct hypothalamic and midbrain origins: convergence on the somatospiny neurons. *Exp. Brain Res.* 92, 420-430.
60. Jakab, R., Leranath, Cs. (1995) Septum. In *The Rat Nervous System*, second edition, edited by George Paxinos, Academic Press, San Diego. The rat nervous system. 405-442.

61. Joels, M., Urban, I. J. A. (1984). Arginin –vasopressin enhances the responses of lateral septal neurons in the rat to excitatory amino acids and fimbria-fornix stimuli. *Brain Res.* 311, 201-209.
62. Kalra, S. P., Dude, M. G., Pu, S., Xu, B., Horvath, T. L., Kalra, P. S. (1999) Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr. Rev.* 20, 68-100.
63. Kawai, Y., Inagaki, S., Shiosakas, S. et al. (1984) The distribution and projection of α -melanocyte stimulating hormone in the rat brain: an immunohistochemical analysis. *Brain Res.* 297, 21-32.
64. Khasar, S. G., Reichling, D. B., Green, P. G., Isenberg, W. M., Levine, J. D. (2003) Fasting is a physiological stimulus of vagus-mediated enhancement of nociception. *Neuroscience* 119, 215-221.
65. Khachaturian, H., Lewis, M. E., Hollt, V., Watson, S. J. (1983) Telencephalic enkephalinergic system in the rat brain. *J. Neurosci.* 3, 844-855.
66. King, T. R., Nance, D. M. (1986) Neuroestrogenic control of feeding behaviour and body weight in rats with kainic acid lesions of the lateral septal area. *Physiol. Behav.* 37, 475-481.
67. Kozicz, T. (2003) Neurons colocalizing urocortin and cocaine and amphetamine-regulated transcript immunoreactivities are induced by acute lipopolysaccharide stress in the Edinger-Westphal nucleus in the rat. *Neuroscience* 116, 315-320.
68. Kovács, É. G., Szalay, F., Halasy, K. (2005) Fasting-induced changes of neuropeptide immunoreactivity in the lateral septum of male rats. *Acta Biol. Hung.* 56, 185-197.
69. Krayniak, P. F., Weiner, S., Siegel, A. (1980) An analysis of the efferent connections of the septal area in the cat. *Brain Res.* 189, 15-29.
70. Kyrkouli, S. E., Stanley, B. G., Leibowitz, S. F. (1986) Galanin: stimulation of feeding induced by medial hypothalamic injection of this novel peptide. *Eur. J. Pharmacol.* 122, 159-160.
71. Kyrkouli, S. E., Stanley, B. G., Seirafi, R.D., Leibowitz, S. F. (1990) Stimulation of feeding by galanin: anatomical localization and behavioral specificity of this peptide's effects in the brain. *Peptides* 11, 995-1001.
72. Laflamme, N., Nappi, R. E., Drolet, G., Labrie, C., Rivest, S. (1998) Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ER α and ER β) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *J. Neurobiol.* 36, 357-378.

73. Lantos, T. A., Gores, T. J., Palkovits, M. (1995) Immunohistochemical mapping of neuropeptides in the premammillary region of the hypothalamus in rats. *Brain Res. Rev.* 20, 209-249.
74. Larsen, P. J. (1992) Distribution of substance P-immunoreactive elements in the preoptic area and the hypothalamus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 316, 287-313.
75. Lauber, A. H., Romano, G. J., Mobbs, C. V., Howells, R. D., Pfaff, D. W. (1990) Estradiol induction of proenkephalin messenger RNA in hypothalamus: doseresponse and relation to reproductive behaviour in the female rat. *Mol. Brain Res.* 8, 47-54.
76. Leibowitz, S. F. (1995) Brain peptides and obesity: pharmacologic treatment. *Obes. Res.* 3, 573S-589S.
77. Leibowitz, S. F. (1998) Differential functions of hypothalamic galanin cell groups in the regulation of eating and body weight. *Ann. NY. Acad. Sci.* 863, 206-220.
78. Leibowitz, S. F., Wortley, K. E. (2004) Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* 25, 473-504.
79. Leranth, C., Deller, T., Buzsáki, G. (1992) Intraseptal connections redefined: lack of lateral septum to medial septum path. *Brain Res.* 583, 1-11.
80. Leranth, C., Carpi, D., Buzsaki, G., Kiss, J. (1999) The entorhino-septo-supramammillary nucleus connection in the rat: morphological basis of a feedback mechanism regulating hippocampal theta rhythm. *Neuroscience* 88, 701-718.
81. Li, C., Chen, P., Smith, M. S. (1999) Neural populations in the rat forebrain and brainstem activated by the suckling stimulus as demonstrated by cFos expression. *Neuroscience* 94, 117-120.
82. Lopez, F. J., Merchenthaler, I., Ching, M., Wisniewski, M. G., Negro-Vilar, A. (1991) Galanin: a hypothalamic-hypophysiotropic hormone modulating reproductive function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4508-4512.
83. Magni P. (2003) Hormonal control of the neuropeptide Y system. *Current Protein and Peptide Sci.* 4, 45-57.
84. Maguire, E. A., Burgess, N., Donnett, J. G., Frackowiak, R. S., Frith, C. D., O'Keefe, J. (1998) Knowing where and getting there: a human navigation network. *Science* 280, 921-924.
85. Malcolm, R. J., O'Neil, P. M., Sexauer, J. D., Roddle, F. E., Cuirrey, H. S., Counts, C. (1985) A controlled trial of naltrexone in obese humans. *Int. J. Obes.* 9, 347-353.

86. McLaughlin, C. L., Baile, C. A., Della-Fera, M. A. (1986) Changes in brain met-enkephalin concentration with peripheral CCK injections in Zucker rats. *Physiol. Behav.* 36, 681-686.
87. McNaughton, N., Morris, R. G. (1987) Chlordiazepoxide, an anxiolytic benzodiazepine, impairs place navigation in rats. *Behav. Brain Res.* 24, 39-46.
88. McEwen, B. S., De Kloet, E. R., Rostene, W. (1986) Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol. Rev.* 66, 1121-88.
89. Meibach, R. C., Siegel, A. (1977) Efferent connections of the septal area in the rat: an analysis utilizing retrograde and anterograde transport methods. *Brain Res.* 119, 1-20.
90. Melander, T., Hokfelt, T., Nilsson, S., Brodin, E. (1986) Visualization of galanin binding sites in the rat central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* 124, 381-382.
91. Merchenthaler, I., Maderdrut, J. L., Altschuler, R. A., Petrusz, P. (1986) Immunocytochemical localization of proenkephalin-derived peptides in the central nervous system of the rat. *Neuroscience* 17, 325-348.
92. Merchenthaler, I., Lopez, F. J., Lennard, D. E., Negro-Vilar, A. (1991) Sexual differences in the distribution of neurons coexpressing galanin and luteinizing hormone-releasing hormone in the rat brain. *Endocrinology* 129, 1977-1986.
93. Merchenthaler, I., Lopez, F. J., Negro-Vilar, A. (1993) Anatomy and physiology of central galanin-containing pathways. *Prog. Neurobiol.* 40, 711-769.
94. Mitchell, J. E., Morley, J. E., Levine, A. S., Hatsukami, D., Gannon, M., Pfohl, D. (1987) High-dose naltrexone therapy and dietary counselling for obesity. *Biol. Psychiatr.* 22, 35-42.
95. Moron L., Pascual J., Portillo M. P., Casis L., Macarulla T., Abecia L. C., Echevarria E. (2003) Toluene alters appetite, NPY and galanin immunostaining in the rat hypothalamus. *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 195-200.
96. Mufson, E. J., Cai, W. J., Jaffar, S., Chen, E., Stebbins, G., Sendera, T., Kordower, J. H. (1999) Estrogen receptor immunoreactivity within subregions of the rat forebrain: neuronal distribution and association with perikarya containing choline acetyltransferase. *Brain Res.* 849, 253-274.
97. Musso, R., Maggi, A., Eva, C. (2000) 17 beta-estradiol stimulates mouse neuropeptide Y-Y1 receptor gene transcription by binding to estrogen receptor alpha in neuroblastoma cells. *Neuroendocrinology* 72, 360-367.
98. Nagase, H., Bray, G. A., York, D. A. (1996) Effect of galanin and enterostatin on sympathetic nerve activity to interscapular brown adipose tissue. *Brain. Res.* 709, 44-50.

99. O'Keefe, J., Nadel, L. (1978) *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford:Clarendon.
100. Oliveira, L. A., Gentil, C. G., Covian, M. R. (1990) Role of the septal area in feeding behaviour elicited by electrical stimulation of the lateral hypothalamus of the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23, 49-58.
101. Onteniente, B., Geffard, M., Calas, A. (1984) Ultrastructural immunocytochemical study of the dopaminergic innervation of the rat lateral septum with anti-dopamine antibodies. *Neuroscience* 13, 385-393.
102. Onteniente, B., Menetrey, D., Arai, R., Calas, A. (1989) Origin of the met-enkephalergic innervation of the lateral septum in the rat. *Cell Tissue Res.* 256, 585-592.
103. Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J. (1984) Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunohistochemical technique. *J. Comp. Neurol.* 229, 374-392.
104. Panula, P., Revuelta, A. V., Cheney, D. L., Wu, J. Y., Costa, E. (1984) An immunohistochemical study on the location of GABA-ergic neurons in rat septum. *J. Comp. Neurol.* 222, 69-80.
105. Partridge, L., Pletcher, S. D., Mair, W. (2005) Dietary restriction, mortality trajectories, risk and damage. *Mech. Ageing Dev.* 126, 35-41.
106. Paxinos, G., Watson, C. (1986) *„The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates”* 2nd ed. Academic Press, New York.
107. Pfaff, D., Keiner, M. (1973) Atlas of oestradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J. Comp. Neurol.* 151, 121-158.
108. Pedrazzi, P., Cattaneo, L., Valeriani, L., Boschi, S., Cocchi, D., Zoli, M. (1998) Hypothalamic neuropeptide Y and galanin in overweight rats fed a cafeteria diet. *Peptides* 19, 157-165.
109. Perez, S. E., Wynick, d., Steiner, R. A., Mufson, E. J. (2001) Distribution of galaninergic immunoreactivity in the brain of the mouse. *J. Comp. Neurol.* 434, 158-185.
110. Phelan, K. D., Hasuo, H., Twery, M. J., Gallagher, J. P. (1989) Projection neurons in the rat dorsolateral septal nucleus possess recurrent axon collaterals. *Neurosci. Lett.* 97, 259-265.
- Risold, P. Y., Swanson, L. W. (1996) Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res. Rev.* 24, 115-195.
111. Poulain, P., Martin-Bouyer, L., Beauvillain, J. C., Tramu G. (1984) Study of the efferent connections of the enkephalinergic magnocellular dorsal nucleus in the guinea pig

hypothalamus using lesions, retrograde tracing and immunohistochemistry: evidence for a projection to the lateral septum. *Neuroscience* 11, 331-343.

112. Risold, P. Y., Swanson, L. W. (1997a) Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res. Rev.* 24, 91-113.

113. Risold, P. Y., Swanson, L. W. (1997b) Chemoarchitecture of the rat lateral septal nucleus. *Brain Res. Rev.* 24, 115-195.

114. Rose, G., Schubert P. (1977) Release and transfer of [3H]adenosin derivatives into the cholinergic septal system. *Brain Res.* 121, 353-357.

115. Sahu, A., Crowley, W. R., Tatemoto, K., Balasubramaniam, A., Kalra, S. P. (1987) Effects of neuropeptide Y, NPY analog (Norleucin⁴-NPY), galanin and neuropeptide K on LH release in ovariectomized (ovx) and ovx estrogen, progesterone-treated rats. *Peptides* 8, 529-536.

116. Sahu, A., White, J. D., Kalra, P. S., Kalra, S. P. (1992) Hypothalamic neuropeptide Y gene expression in rats on scheduled feeding regimen. *Brain Research. Mol. Brain Res.* 15, 15-18.

117. Sakanaka, M., Senba, E., Shiosaka, S., Takatsuki, K., Inagaki, S., Takagi, H., Kawai, Y., Hara, Y., Tohyama, M. (1982) Evidence for the existence of an enkephalin-containing pathway from the area just ventrolateral to the anterior hypothalamic nucleus to the lateral septal area of the rat. *Brain Res.* 239, 240-244.

118. Sakanaka, M., Magari, S. (1989) Reassessment of enkephalin (enk)-containing afferents to the rat lateral septum with reference to the fine structures of septal ENK fibres. *Brain Res.* 479, 205-216.

119. Saper, C. B. (1987) Diffuse cortical projection systems: anatomical organization and role in cortical function, *Handbook of Physiology, The Nervous System*, vol. V, Warverly Press, Baltimore, CH. 6, 169-210.

120. Savontaus, E., Conwell, I. M., Wardlaw, S. L. (2002) Effects of adrenalectomy on AGRP, POMC, NPY and CART gene expression in the basal hypothalamus of fed and fasted rats. *Brain Res.* 958, 130-138.

121. Sawchenko, P. E., Swanson, L. W. (1983) The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol.* 218, 121-144.

122. Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, Jr.D., Seeley, R. J., Baskin, D. G. (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671.

123. Schwartz, M. W., Erickson, J. C., Baskin, D. G., Palmiter, R. D. (1998) Effect of fasting and leptin deficiency on hypothalamic neuropeptide Y gene transcription *in vivo* revealed by expression of a *lacZ* reporter gene. *Endocrinology* 139, 2629-2635.
124. Sim, L. J., Joseph, S. A. (1991) Arcuate nucleus projections to brainstem regions which modulate nociception. *J. Comp. Neuroanat.* 4, 97-109.
125. Simerly, R. B., Chang, C., Muramatsu, M., Swanson, L. W. (1990) Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an *in situ* hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 294., 76-95.
126. Simerly, R. B. (1991) Prodynorphin and proenkephalin gene expression in the anteroventral periventricular nucleus of the rat: Sexual differentiation and hormonal regulation. *Mol. Cell. Neurosci.* 2, 473-484.
127. Simerly, R. B., Young, B. J., Carr, A. M. (1996) Co-expression of steroid hormone receptors in opioid peptide containing neurons correlates with patterns of gene expression during the estrous cycle. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 40, 275-284.
128. Simerly, R. B. (1998) Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways. *Behav. Brain Res.* 92, 195-203.
129. Sheenan, T. P., Cirrito, J., Numan, M. J., Numan, M. (2000) Using c-Fos immunocytochemistry to identify forebrain regions that may inhibit maternal behavior in rats. *Behav. Neurosci.* 114, 337-352.
130. Shimizu, H., Shimomura, Y., Nakanishi, Y., Futawatari, T., Ohtani, K., Sato, N., Mori, M. (1997.) Estrogen increases *in vivo* leptin production in rats and human subjects. *J. Endocrinology* 154, 285-292.
131. Shughrue, P. J., Lane, M. V., Merchenthaler, I. (1997) Comparative distribution of estrogen receptor- α and $-\beta$ mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 388, 507-525.
132. Shughrue, P. J., Merchenthaler, I. (2001) Distribution of estrogen receptor β immunoreactivity in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 436, 64-81.
133. Skelton, K. H., Owens, M. J., Nemeroff, C. B. (2000) The neurobiology of urocortin. *Regul. Pept.* 93, 85-92.
134. Smith, B. K., York, D. A., Bray, G. A. (1994) Chronic cerebroventricular galanin does not induced sustained hyperphagia and obesity. *Peptides* 15, 1267-1272.
135. Squire, L. R. (1992) memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol. Rev.* 99, 195-231.

136. Staiger, J. F., Nürnberger, F. (1991a) The efferent connections of the lateral septal nucleus in the guinea pig: projections to the diencephalon and brainstem. *Cell Tissue Res.* 264, 391-413.
137. Staiger, J. F., Nürnberger, F. (1991b) The efferent connections of the lateral septal nucleus in the guinea pig: intrinsic connectivity of the septum and projections to other telencephalic areas. *Cell Tissue Res.* 264, 415-426.
138. Staiger, J. F., Wouterlood, F. G. (1990) Efferent projections from the lateral septal nucleus to the anterior hypothalamus in the rat: A study combining Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin tracing with vasopressin immunocytochemistry. *Cell Tissue Res.* 261, 17-23.
139. Stegaard-Pedersen, K., Larsson, L. I. (1983) Met- and leu-enkephalinergic innervation of the lateral septal nucleus. *Brain Res.* 264, 152-156.
140. Stratford, T. R., Kelley, A. E. (1999) Evidence of a functional relationship between the nucleus accumbens shell and lateral hypothalamus subserving the control of feeding behavior. *J. Neurosci.* 15, 11040-11048.
141. Swanson, L. W., Cowan, W.M. (1976) Autoradiographic studies of the development and connections of the septal area in the rat. In J. F. DeFrance (Ed.), *The Septal Nuclei: Advances in Behavioral Biology*, vol. 20, Plenum Press, New York, 37-64.
142. Swanson, L. W., Cowan, W.M. (1977) An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 172, 49-84.
143. Swanson, L. W., Cowan, W.M. (1979) The connections of the septal region in the rat. *J. Comp. Neurol.* 186, 621-656.
144. Szeideemann, Z., Shanabrough, M., Leranth, C. (1995) Hypothalamic Leu-enkephalin-immunoreactive fibres terminate on calbindin-containing somatospiny cells in the lateral septal area of the rat. *J. Comp. Neurol.* 358, 573-583.
145. Tatemoto, K., Carlquist, M., Mutt, V. (1982) Neuropeptide Y-a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 296, 659-660.
146. Timofeeva, E., Richard, D. (2001) Activation of the central nervous system in obese Zucker rats during food deprivation. *J. Comp. Neurol.* 441, 71-89.
147. Tóth, K., Borhegyi, Z., Freund, T. F. (1993) Postsynaptic targets of GABAergic hippocampal neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex. *J. Neurosci.* 13, 3712-3724.
148. Tschöp, M., Smiley, D. L., Heiman, M. L. (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407, 908-913.

149. Xu, B., Kalra, P. S., Farmerie, W. G., Kalra, S. P. (1999) Daily changes in hypothalamic gene expression of neuropeptide Y, galanin, pro-opiomelanocortin and adipocyte leptin gene expression and secretion: effects of food restriction. *Endocrinology* 140, 2868-2875.
150. Xu, M., Urban, J. H., Hill, J. W., Levine, J. E. (2000) Regulation of hypothalamic neuropeptide Y Y1 receptor gene expression during the estrous cycle: role of progesterone receptors. *Endocrinology* 141, 3319-3327.
151. Yeomans, M. R., Gray, R. W. (2002) Opioid peptides and the control of human ingestive behaviour. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 713-728.
152. Van Groen, T., Wyss, J. M. (1990) Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *J. Comp. Neurol.* 302, 515-528.
153. Varoquaux, F., Poulain, P. (1994) Lateral septal projections onto tubero-infundibular neurons in the hypothalamus of the guinea pig. *Cell Tissue Res.* 278, 217-225.
154. Vertes, R. P., Mckenna, J. T. (2000) Collateral projections from the supramammillary nucleus to the medial septum and hippocampus. *Synapse* 38, 281-293.
155. Weindruch, R., Sohal, R. S. (1997) Caloric intake and aging. *N. Engl. J. Med.* 337, 986-994.
156. Wettstein, J. G., Early, B., Julien, J. L (1995) Central nervous system pharmacology of neuropeptide Y. *Pharmacology & Therapeutics* 3, 397-41.
157. Williams, R. G., Dockray, G. J. (1982) Distribution of enkephalin-related peptides in rat brain: Immunohistochemical studies using antisera to Met-enkephalin and Met-enkephalin Arg⁶Phe⁷. *Neuroscience* 9, 563-586.
158. Wolkowitz, O. M., Doran, A. R., Cohen, M. R., Cohen, R. M., Wise, T. N., Pickar, D. (1985) Effect of naloxone on food consumption in obesity. *N. Engl. J. Med.* 313, 327.
159. Wouterlood, F. G. et al. (1988) The connections between the septum-diagonal band complex and histaminergic neurons in the posterior hypothalamus of the rat: Anterograde tracing with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin combined with immunocytochemistry of histidine decarboxylase. *Neuroscience* 26, 827-845.

11. Tudományos publikációk

11. 1. A témában megjelent tudományos publikációk:

Közlemények:

Kovács, É. G., Szalay, F., Halasy, K. (2005): Fasting induced changes of neuropeptide immunoreactivity in the lateral septum of male rats. *Acta Biologica Hungarica*. 2005, 56: 185-197. Impakt faktor: 0,447

Kovács, É. G., Szalay, F., Rácz, B., Halasy, K. (2007): Chronic fasting induced changes of neuropeptide Y immunoreactivity in the lateral septum of intact and ovariectomized female rats. *Brain Research*. 1153, 103-110. Impakt faktor: 2,218

Kovács, É. G. (2007) Az elhízásról: agyunk étvágyközpontja. *Élet és Tudomány* 62/1, 12-14.

Poszterek:

Halasy, K., Rácz, B., **Kovács, É.G.**, Janzsó, G., Vecsei, L. (2002): Opioiderg elements in the lateral septum of the rat.- Poster on the IBRO International Workshop on Signaling Mechanisms in the Central and Peripheral Nervous System, 24th-26th January, 2002, Debrecen, Hungary

Kovács, É.G., Szalay, F., Halasy, K. (2004): Rostrocaudal distribution of neuropeptides involved in food intake in the lateral septum of rat. *Clinical Neuroscience* 57, pp34.

Kovács, É.G., Szalay, F., Halasy, K. (2004): Effect of reduced food intake on the immunocytochemically detectable amount of three neuropeptides in the lateral septum of rat. FENS Forum, Lisbon, Portugal, Abstract no. A011.11.

Kovács, É. G., Szalay, F., Halasy, K. (2005): Chronic fasting induced changes of neuropeptides involved in food intake in the lateral septum of female and ovariectomized rats *Clinical Neuroscience*. 58, pp54.

Szalay, F., Halasy, K., **Kovács, É. G.** (2005) Egyszerű képelemzési technika immunfestett fénymikroszkópos felvételek gyors denzitometriás kiértékelésére. *Clinical Neuroscience*. 58, pp89.

Kovács, É. G., Szalay, F., Halasy, K. (2005): Chronic fasting induced changes of neuropeptides involved in food intake in the lateral septum of female and ovariectomized rats
Poster on the 24th International Summer School of Brain Research on Hypothalamic integration of energy metabolism, 29th August-1st September, 2005, Amsterdam, Netherlands.

Előadások:

Kovács, É.G., Szalay, F., Halasy, K. (2004): Leucin enkephalin és neuropeptid Y rostrocaudalis megoszlása patkány laterális septumában. MTA Állatorvostudományi Bizottság, előadás, absztrakt.

Kovács, É.G., Szalay, F., Halasy, K. (2005): Egy hetes éhezés hatása a táplálékfelvétel szabályozásában résztvevő három neuropeptid denzitására hím patkány laterális septumában. MTA Állatorvostudományi Bizottság, előadás, absztrakt.

Kovács, É.G., Szalay, F., Janzsó, G., Valcz, G., Halasy, K. (2006): Egy hetes részleges takarmány megvonás hatása a táplálékfelvétel szabályozásában résztvevő három neuropeptid denzitására nőstény és ovariectomizált patkány laterális septumában. MTA Állatorvostudományi Bizottság, előadás, absztrakt.

11. 2. Egyéb publikációk:

Közlemények:

Bagyánszki, M. **Kovács, É.G.**, Resch, B.A., Román, V., Resch, B.E, Fekete, É. (2001): Computer-aided morphometric analysis of the developing concentric structure of the human fetal intestinal tube. *Histology and Histopathology* 17(3),731-7. Impakt faktor: 2,007

É. G., Kovács, N. J., MacLusky, Cs., Leranath (2003): Effects of testosterone on hippocampal CA1 spine synaptic density in the male rat are inhibited by fimbria/fornix transection. *Neuroscience*. 122, 807-810. Impakt faktor: 3,352

Halasy, K., **Kovács, É.G.**, T., Thri-Lam, Leranath C. (2004): Distribution and origin of vesicular glutamate transporter-2 immunoreactivity in the rat hippocampus. *Hippocampus*. 14, 908-918. Impakt faktor: 5,745

Zsarnovszky, A., **Földvári, E. G.**, Rónai, Zs., Bartha, T., Frenyó, L. V. (2007) Oestrogens in the mammalian brain: from conception to adulthood-a review. *Acta Veterinaria Hungarica* 55, 333-347. Impakt faktor: 0,474

Posztterek:

Kovács, É.G., Bagyánszki, M., Resch, B., Fekete, É. (2001) Quantitative differences in the distribution of myenteric nitrenergic neurons along the longitudinal axis of the developing human fetal intestine. - Poster on the VIIIth Annual Meeting of the Hungarian Neuroscience Society, 24th-27th January, 2001, Szeged, Hungary

Halasy, K., **Kovács, É.G.**, T., Tri-Lam, Leranath, C. (2003): Vezikuláris glutamát transzporterek a patkány hippocampusban: léziók hatása az immunfestésre. *Clinical Neuroscience*. 56, pp33.

Előadások:

Halasy, K., **Kovács, É.G.**, Tri-Lam, T., Leranath, C. (2003): Fimbria-fornix lézió hatása vesiculáris glutamát transzporterek immuncytokémiai lokalizálására a patkány hippocampusban. MTA Állatorvostudományi Bizottság, előadás, absztrakt.

Kovács, É. G., Frenyó, V. L., Kirley, T., Belcher, S. M., Sótonyi, P., Zsarnovszky, A. (2007) NTPDase 3 in the CNS of the rat mapping and functional consideration. MTA Állatorvostudományi Bizottság, előadás, absztrakt.

12. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani Prof. Halasy Katalin témavezetőmnek, aki nemcsak szakmai tudását próbálta átadni nekem, hanem emberileg is támogatott, biztatott, ha kellett rámpirított, hangulatváltozásaimat tolerálta, és ha elkeseredtem egy-egy cikk bíralatán, rosszul sikerült kísérleten, segített ötleteivel továbblépni és új erőt gyűjtenem.

Köszönet Prof. Sótónyi Péternek, hogy lehetővé tette a zökkenőmentes munkámat az Anatómiai és Szövetani Tanszéken.

Köszönet az Anatómiai és Szövetani Tanszék munkatársainak, akik befogadtak, és biztosították a támogató légkört a munkámhoz, kiemelném Dr. Szalay Ferencet, aki a SCION Image programhoz a macrot elkészítette, Dr. Rác Bencét, aki a statisztika elkészítésében nyújtott segítséget, valamint Pető Klára asszisztensi segítségét.

Munkám utolsó negyedében az Élettani és Biokémiai Tanszéken voltam állásban a néhai Prof. Rudas Péter jóvoltából. Köszönöm, hogy Prof. Frenyó V. László tanár úr folyamatosan lehetőséget adott a dolgozatomon való utolsó simítások elvégzésére, az elmaradt kísérletek befejezésére, mi több, támogatott és biztatott a minél előbbi befejezésre.

Köszönet az Élettani és Biokémiai Tanszék dolgozóinak, akik olyan családi légkört varázsoltak körém, hogy olyan volt, mintha haza járnék dolgozni. Dr. Győrffy Andreának, aki mesze többé vált, mint egy egyszerű szobatárs a munkahelyen. Dr. Zsarnovszky Attilának, akinek a tudomány iránti lelkesedése, alaposága, nagy szaktudása elbűvölt, és munkára sarkallt.

És nem utolsó sorban köszönet a családomnak, férjemnek, Dr. Földvári Gábornak, aki úgy támogatott, hogy tudta mikor éppen mire van szükségem, kisfiamnak, Földvári Barna Bendének, aki türelemmel elviselte, hogy a mama nem mindig ért rá, apukának, Dr. Földvári Mihálynak, aki példát mutatott nekem kitartásból, munkabírából.

Végül köszönet az Édesanyámnak, Kondász Margitnak, aki végig bízott bennem és erején felül is támogatott.

A dolgozatomat anyósom emlékének ajánlom, Dr. Terray Jusztinának, aki tudom, hogy boldogabb lenne, mint én ebben a pillanatban.